

La gélose NTM Elite pourrait-elle être utile pour les échantillons autres que les expectorations dans une population plus générale ?

Sigi Van Den Wijngaert & Olivier Vandenberg
Service de Microbiologie

LHUB-ULB

Déclaration de conflits d'intérêt

- “ Je n'ai aucun intérêt personnel ou financier à divulguer.
- “ Je ne bénéficie d'aucun soutien financier de la part d'une source industrielle dans le cadre de la présente présentation.
- “ Les résultats de l'évaluation du milieu NTM présentés ce jour proviennent d'une collaboration de recherche et développement avec la société bioMérieux qui n'a influencé en aucune manière la construction de cet exposé.
- “ Les opinions exprimées ici sont les miennes et ne doivent pas être interprétées comme des positions du LHUB-ULB ou de l'Université Libre de Bruxelles (ULB).

MYCOBACTERIES

100 espèces

genre
MYCOBACTERIUM

famille
MYCOBACTERIACEAE

ordre
ACTINOMYCETALES

**Mycobactéries non
cultivables**

M. leprae
M. lepraemurium

**Mycobactéries tuberculeuses
(complexe *M. tuberculosis*)**

M. tuberculosis
M. africanum
M. bovis
M. bovis type BCG
M. caprae
M. pinnipedii
M. microti

**Mycobactéries atypiques
(= NTM)**

omniprésentes dans l'environnement
opportunistes ou non pathogènes

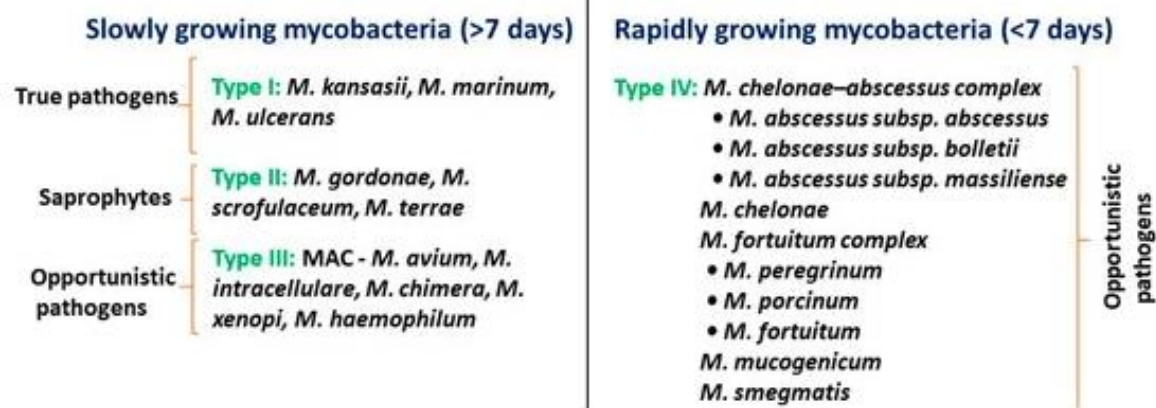
NTM (Non Tuberculous Mycobacteria)

- “ Souvent contaminants/environnemental
- “ Opportuniste - Cas particuliers
 - “ Mucoviscidose (Cystic Fibrosis – CF)
 - “ Maladies pulmonaires sous-jacentes
 - “ Immunodépression, HIV
 - “ Lésions cutanées
 - “ ...

Mycobactéries – NTM

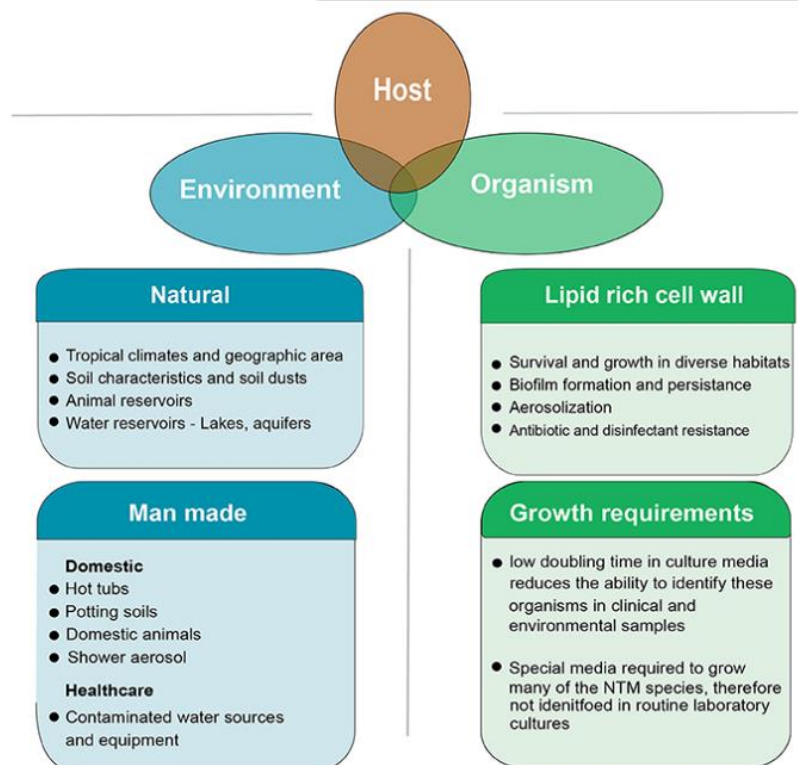
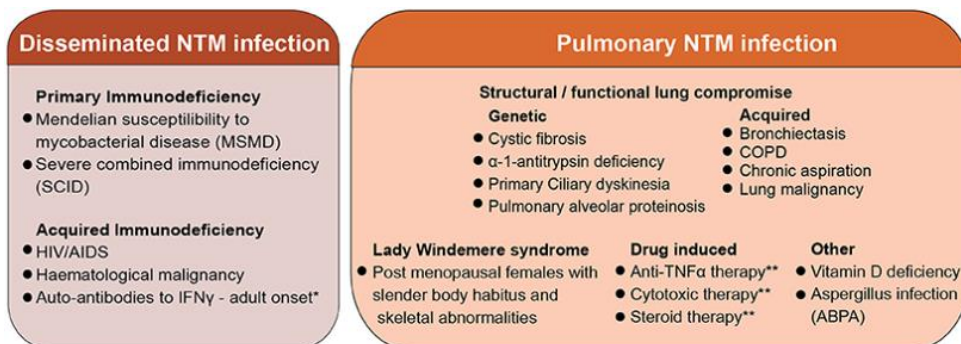
- ” > 170 espèces reconnues
- ” Organisme de l’environnement
 - ” Sol, poussière
 - ” des eaux
 - ” rivières, laques, ...
 - ” douche, eau potable/robinet

Non-tuberculous mycobacteria



NTM – Infections

- ” Primordialement pulmonaires
- ” Variété des sites corporelles
 - ” peau et tissu mou
 - ” Ganglions
 - ” associées aux dispositifs
 - ” sang
 - ” ...
- ” *Mycobacterium avium complex* (MAC) la plus fréquente
- ” Souvent pas de transmission personne – personne
 - ” exception: *Mycobacterium abscessus* chez les patients souffrant de mucoviscidose (?)



Facteurs de risque des infections à NTM

The Rise of Non-Tuberculosis Mycobacterial Lung Disease
Front. Immunol., 03 March 2020
Sec. Microbial Immunology
Volume 11 - 2020

NTM – Epidémiologie

” Sous estimation de la problématique

” Pas de rapportage systématique

” Sous-diagnostiqué

” ↑ prévalence { ↑ intérêt - ↑ conscience
↑ accès & méthode diagnostique
...

” Etudes

” ≠ guidelines, ≠ critères diagnostiques

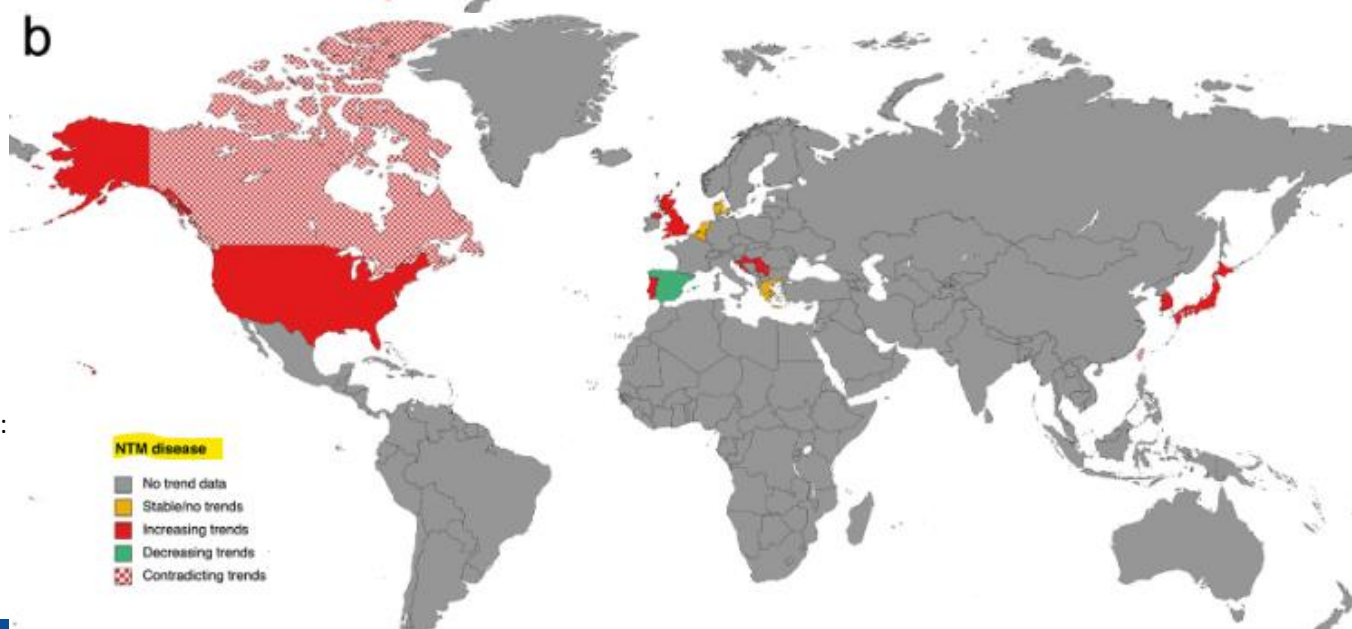
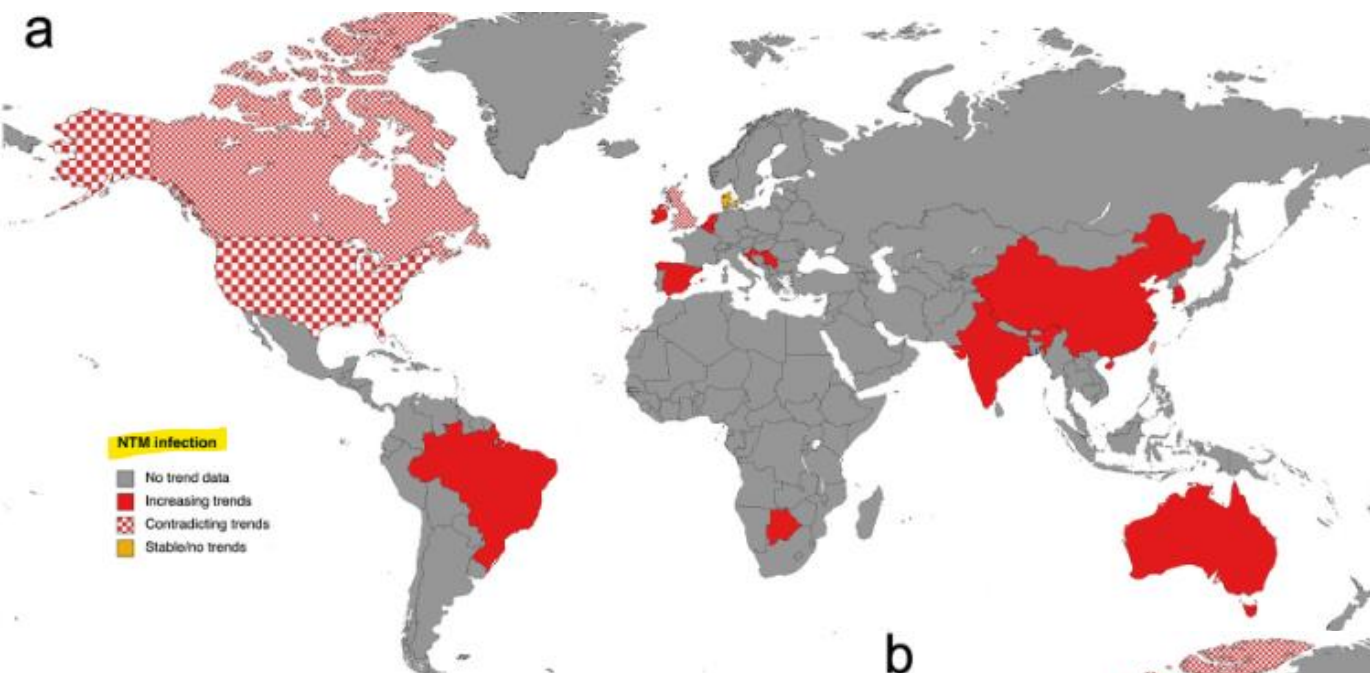
” ≠ design d'étude

” Données cliniques ?

Les mycobactéries non tuberculeuses (NTM)

- “ Les NTM sont courantes dans l'environnement, mais peuvent être dangereuses pour les populations immunodéprimées.
- “ Les personnes immunocompétentes peuvent également contracter des infections à NTM.
- “ Les cas de pneumopathie à MNT augmentent d'environ 5 % chaque année, en particulier chez les personnes immunodéprimées.
- “ En 2014, on estimait à 97 000 le nombre de cas aux Etats-Unis, dont environ 72 % étaient d'origine hydrique, et le plus grand nombre de décès attribués à des maladies d'origine hydrique était dû à des infections à NTM.

Fisher KE, et al. J AOAC Int. 2022;105(2):549-557. doi: 10.1093/jaoacint/qsab093



Review
Global trends of pulmonary infections with nontuberculous mycobacteria:
systematic review.
Victor Naestholt_Dahl et al.
International Journal of Infectious Diseases, Dec 2022

Zone	Countries	NTM isolation prevalence per 100,000 individuals	NTM disease prevalence per 100,000 individuals	Commonly isolated NTM species
North America	Canada ³⁶	22.2	9.08	MAC, <i>Mycobacterium xenopi</i> ,
	USA			<i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> ,
	Oregon ³⁹	12.7	8.6	<i>M. chelonae</i> , <i>M. gordonae</i>
	California ³⁹	191	NR	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> ,
South America	Hawaii ²²	396	NR	<i>M. xenopi</i> , <i>M. fortuitum</i>
	Brazil ⁴⁰	1.31	0.25	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. fortuitum</i>
Europe	Ireland ⁴¹	1.9	0.2	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. xenopi</i> ,
	Scotland ⁴²	NR	3.1	<i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> ,
	The United Kingdom ⁴³	2.9	1.7	<i>M. szulgai</i> , <i>M. gordonae</i> ,
	Denmark ³⁴	2.5	1.1	<i>M. abscessus</i> , <i>M. chelonae</i>
	Netherlands ⁴⁴	6.3	1.4	
	France ⁴⁵	NR	0.7	
	Greece ⁴⁶	07	0.7	
Oceania	Croatia ⁴⁷	5.3	0.75	
	Australia ⁴⁸	5.9	0.56	MAC, <i>M. kansasii</i> , <i>M. abscessus</i> ,
	New Zealand ⁴⁹	3.7	0.56	<i>M. fortuitum</i> , <i>M. simiae</i>
Africa	Kenya ^{50*}	1.7%	NR	MAC, <i>M. abscessus</i> ,
	Nigeria ^{51*}	4.3%	NR	<i>M. malmoense</i> , <i>M. marinum</i> ,
	Uganda ^{52*}	4.3%	NR	<i>M. xenopi</i> , <i>M. scrofulaceum</i> ,
	Burkina Faso ^{53*}	20.6%	NR	<i>M. simiae</i> , <i>M. gordonae</i>
Asia	Japan ²⁹	33-65	NR	MAC, <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> ,
	South Korea ⁵⁴	39.6	NR	<i>M. simiae</i> , <i>M. szulgai</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. gordonae</i>
	China ^{55*}	6.3%	NR	
	Taiwan ³⁰	7.94	NR	

Review

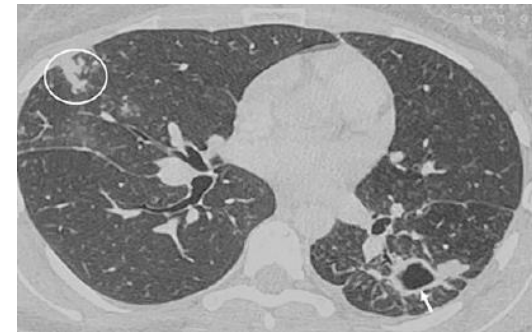
Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases

Surendra K. Sharma - Vishwanath Upadhyay

Indian J Med Res. 2020; 152(3): 185–226.

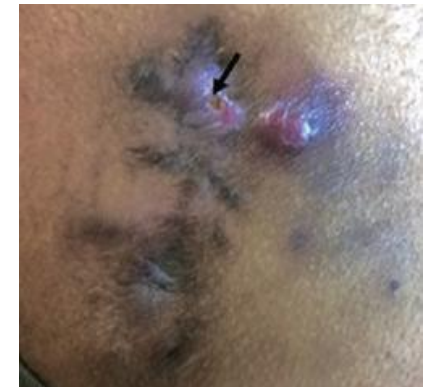
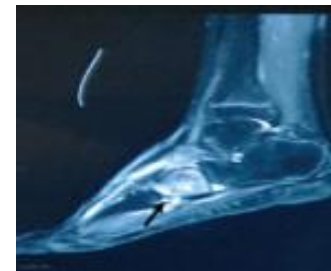
NTM – Symptomatologie

- ” Vague et non spécifique
 - ” T° , sueurs nocturnes
 - ” Pertes d’appétit, pertes de poids, pertes d’énergie



- ” Eventail large de manifestations
 - ~ symptômes liés au site infecté

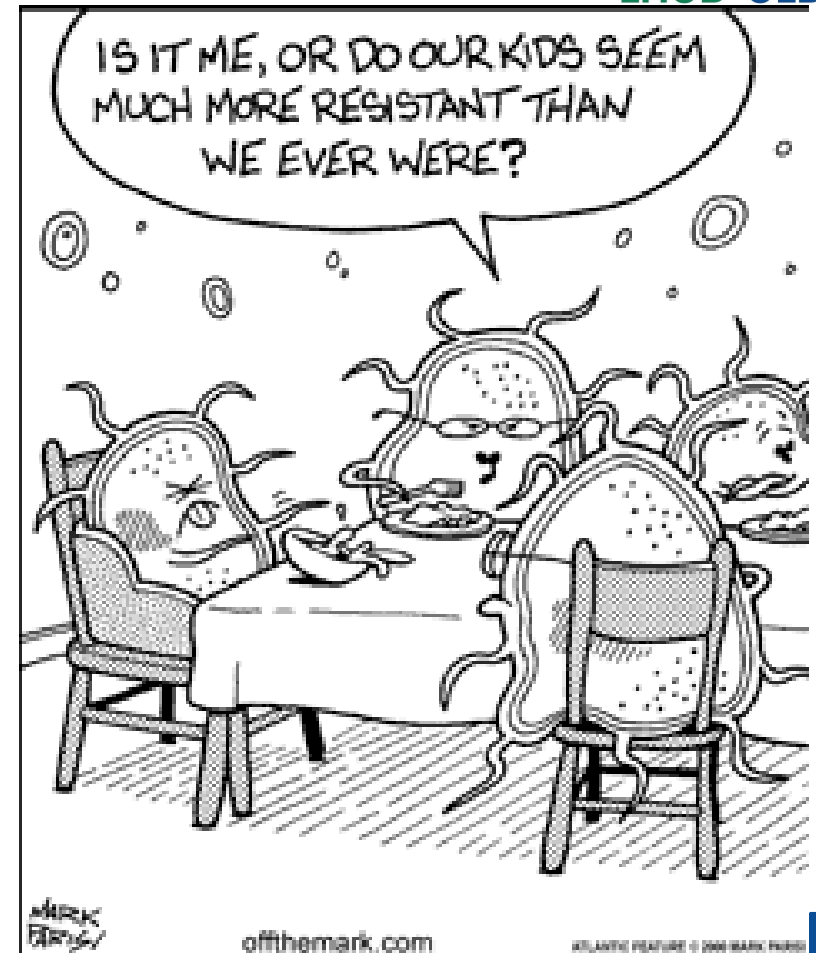
- ” Par ex.
 - ” toux, dyspnée , hémoptysie
 - ” rash
 - ” ...



NTM – Traitement (ex.)

- “ MAC pulmonaire
 - “ Multiple AB
 - “ Clari/azithro + Rifampicine + Ethambutol
 - “ (+ cipro + amika + clofazimine)
 - “ Souvent 12-18 mois (ou +)
 - “ 12 mois de Culture –
 - “ Résection pulmonaire
 - “ Si localisé
 - “ Chez les jeunes

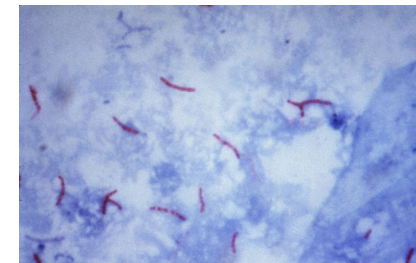
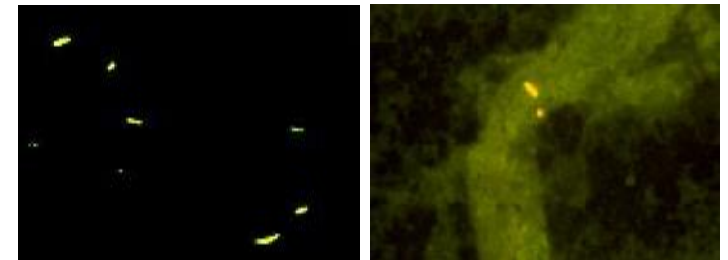
- “ NTM cutanée (ulcère de Buruli)
 - “ Rif + clarithro/moxiflo – 8 semaines



Mycobactéries - Laboratoires

“ Examen Microscopique

- “ Rapide
- “ Mais sensibilité basse (22-80%)
 - “ Enfants (7-20%)
- “ PPV >90%
- “ ↑ Sensibilité
 - “ >5 ml échantillon
 - “ 2-3 échantillons successifs
 - “ tôt le matin
 - “ >10⁴ germes/ml
 - “ coloration fluorescence > Ziehl
 - “ expertise MLT



Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review

KR Steingart, M Henry, V Ng, PC Hopewell, A Ramsay, J Cunningham, R Urbanczik, M Perkins, MA Aziz, and M Pai.

Review published: 2006.

Mycobactéries - Laboratoires

” Diagnostic Moléculaire

” Spécifique *MTBc*

- ” Sens 10^{2-3} germes/ml
- ” Prix +++
- ” Critères de remboursement (BE)
- ” En batch vs Cartouche (style Xpert)
- ” ! Faux+ : ATCD (années/mois)

” NTM

- ” Approche multi-Step en 2 étapes

” Recherche de résistance spécifique (souches > Echantillon)

” Echantillons ↔ Souches (WGS)

Mycobactéries - Laboratoires

” Culture

- ” Gold standard
- ” Détecte (10^1 -) 10^2 germes/ml
- ” Test le plus sensible du laboratoire
 - ” Enfants: sensibilité plus basse (30-50%)
- ” Très lente (semaines)
 - ” 15-20h per division

- ” Culture + nécessaire pour
 - ” identification
 - ” antibiogramme
 - ” BK-othèque

Mycobactéries - Laboratoires



” Culture

” Problèmes de contamination

- ” procédure de décontamination
- ” inhibiteurs de croissances pour les bactéries classiques
- ” + Problématique spécifique pour CF

Our results reiterate the importance of specimen decontamination, without which the contamination rate may reach unacceptable levels and lead to culture loss and poor isolation rates. Our findings suggest that a small reduction in culture contamination does not justify the large loss of positive cultures when a higher final concentration of NaOH is used in the laboratory for sputum processing. Strategies to develop and refine selective antibiotic supplements to add to specimens or culture media to control overgrowth by mouth flora without damaging mycobacterial species may ultimately be necessary.

INT J TUBERC LUNG DIS 13(12):1572–1575
© 2009 The Union

TECHNICAL NOTE

Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture

R. L. Peres,* E. L. Maciel,* C. G. Morais,* F. C. K. Ribeiro,* S. A. Vinhas,* C. Pinheiro,* R. Dietze,* J. L. Johnson,† K. Eisenach,† M. Palaci*

Journal of Medical Microbiology (2008), 57, 1094–1098

DOI 10.1099/jmm.0.2008/001339-0

Asmar and Drancourt *BMC Microbiology* (2015) 15:155
DOI 10.1186/s12866-015-0479-4



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Novel hypertonic saline–sodium hydroxide (HS–SH) method for decontamination and concentration of sputum samples for *Mycobacterium tuberculosis* microscopy and culture

Chlorhexidine decontamination of sputum for culturing *Mycobacterium tuberculosis*



Shady Asmar¹ and Michel Drancourt^{1,2*}

Mycobactéries - Laboratoires

” Milieu liquide

- ” Ex. MGIT
- ” automatisé
- ” cocktail d’AB
- ” plus cher



” Milieu solide

- ” Ex. Löwenstein-Jensen (LJ)
- ” vert de malachite
- ” colonies typiques
- ” bon marché



Growth requirements

- low doubling time in culture media reduces the ability to identify these organisms in clinical and environmental samples
- Special media required to grow many of the NTM species, therefore not identified in routine laboratory cultures
- Antibiotic and disinfectant resistance

Mycobactéries - Laboratoires

2021-2022	Nombre de cultures positives au LHUB-ULB
MTBc	1660
Myco bovis	7
Myco BCG	3
Myco avium	29
Myco complexe chelona	17
Myco chimaera	82
Myco fortuit	4
Myco gordon	37
Myco intracel	13
Myco kansas	11
Myco kuman	1
Myco mantenii	1
Myco mucogen	1
Myco scroful	1
Myco sherris	1
Myco xenopi	68

Mycobactéries - Laboratoires


“ Rapid Growing Mycobacteria (RGM) medium



Journal of Cystic Fibrosis 15 (2016) 186–191



Original Article

A novel culture medium for isolation of rapidly-growing mycobacteria from the sputum of patients with cystic fibrosis  CrossMark

Clair L. Preece ^{a,b}, Audrey Perry ^a, Bethany Gray ^a, Dervla T. Kenna ^c, Amanda L. Jones ^b,
Stephen P. Cummings ^b, Ali Robb ^a, Matthew F. Thomas ^d, Malcolm Brodrie ^d,
Christopher J. O'Brien ^d, Stephen J. Bourke ^c, John D. Perry ^{a,b,*}

^a Microbiology Department, Freeman Hospital, Newcastle upon Tyne NE7 7DN, UK

^b Faculty of Health and Life Sciences, Northumbria University, Newcastle upon Tyne NE1 8ST, UK

^c Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections Reference Unit, Public Health England, London, UK

^d Paediatric Respiratory Unit, Great North Children's Hospital, Newcastle upon Tyne NE1 4LP, UK

^e Adult Cystic Fibrosis Centre, Royal Victoria Infirmary, Newcastle upon Tyne NE1 4LP, UK

Received 16 February 2015; revised 1 May 2015; accepted 2 May 2015

Available online 20 May 2015

Mycobactéries - Laboratoires

” Commercialisé par bioMérieux: NTMElite®

” RGM & NTMElite®

” Détection NTM respiratoire (chez CF)

” Multiples études, bon résultats

” Utilisation en dehors du L3



- Stephenson D, et al. (Freeman Hospital). **An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation.** BMC Pulmonary Medicine (2019). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30665395/>
- Brown-Elliott BA, et al. **Evaluation of a novel rapidly-growing mycobacteria medium for isolation of Mycobacterium abscessus complex from respiratory specimens from patients with bronchiectasis.** Heliyon, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6820269/>
- Rotcheewaphan S, et al (NIH). **Performance of RGM Medium for Isolation of Non Tuberculous Mycobacteria from Respiratory Specimens from Non-Cystic Fibrosis Patients.** Journal of Clinical Microbiology. February 2019 Volume 57 Issue 2. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355514/>
- Scohy A, et al. **Comparison of the RGM medium and the mycobacterial growth indicator tube automated system for isolation of non-tuberculous mycobacteria from sputum samples of cystic fibrosis in Belgium.** J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. 2018. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31720403/>
- Plongla R, et al. (Chapel Hill NC). **Evaluation of RGM Medium for Isolation of Non Tuberculous Mycobacteria from Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis in the United States.** Journal of Clinical Microbiology. May 2017 Volume 55 Issue 5. 1469-1477. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28228494/>
- Eltringham I, et al. **Comparison of mycobacterial growth indicator tube with culture on RGM selective agar for detection of mycobacteria in sputum samples from patients with cystic fibrosis.** Journal of Clinical Microbiology, 2016 August. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4963527/>
- Preece CL, et al. (Freeman Hospital). **Evaluation of Various Culture Media for Detection of Rapidly Growing Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis.** Journal of Clinical Microbiology. July 2016 Volume 54 Number 7. 1797-1803. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27098962/>
- Preece CL, et al. (Freeman Hospital). **A novel culture medium for isolation of rapidly-growing mycobacteria from the sputum of patients with cystic fibrosis.** Journal of Cystic Fibrosis 15 (2016) 186-191. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26002312/>

Mycobactéries - Laboratoires

” Commercialisé par bioMérieux: NTMElite®

” RGM & NTMElite®

” Détection NTM respiratoire (chez CF)

” Multiples études, bon résultats

” Utilisation en dehors du L3



NTM Elite agar

Isolement sélectif de Mycobactéries Non-Tuberculeuses (MNT)

NTM Elite agar est un milieu sélectif innovant pour le dépistage et une aide au diagnostic par l'isolement de colonies de mycobactéries non tuberculeuses à partir d'échantillons respiratoires y compris des échantillons de patients atteints de mucoviscidose

- Fertilité et sélectivité élevées
- Pas de phase de décontamination
- Utilisable en routine dans les laboratoires de microbiologie

Quid des échantillons non respiratoires ?

Quid des populations non mucoviscidosiques ?

Etude préliminaire LHUB-ULB: NTMElite



“ 10 souches NTM congelées

“ *M.abcessus*,

“ *M.xenopi* (2x)

“ *M.gordonae*

“ *M.intracellulare*

“ *M.chimerae* (2x)

“ *M.avium*

“ *M.fortuitum*

“ *M.marinum*

“ 9x récupérer OK

“ *M. fortuitum* non récupérer, non plus avec culture classique ~ souche morte

Etude préliminaire LHUB-ULB: NTMElite

” Autres souches, non NTM

- | | |
|-------------------------------------|--|
| ” MRSA et <i>E. faecium</i> | pas de croissance |
| ” Candida | pas de croissance , sauf <i>C.glabrata</i> |
| ” <i>Burkholderia sp</i> | croissance |
| ” <i>Pseudomonas aeruginosa</i> BMR | croissance si AZM Résistant |
| ” <i>Achromobacter sp.</i> | croissance |
| ” <i>Pandorea pnomenusa</i> | croissance |
| ” <i>Inquilinus limosus</i> | croissance |
| ” <i>Nocardia sp.</i> | croissance |

→ Pathogènes retrouvé chez CF -> utile 

Etude LHUB-ULB

- “ Avril- décembre 2021
- “ Toute échantillon non respiratoire soumis au laboratoire pour une recherche de mycobactéries
 - + les LBAs + biopsie pulmonaire (car prél. noble)
- “ Encensement NTMElite®
 - “ 35°C
 - “ Instruction du fournisseur
 - “ 28 jours
- “ Comparer avec la routine Mycobactérie (ED, MGIT, LJ, ev NAT)
- “ ID par spectrométrie de mass (MaldiTof) et confirmation par le CNR

Etude LHUB-ULB

” 1769 échantillons

” 17 NTM+

” Recovery rate 0,96%

	#	+
Brocheo-alveolar washing (BAL)	711	5
Lung biopsy	46	2
Pleural effusion	274	
Oto-rhino-larynx	27	
Abscess/nodule/granuloma/cyst/lymph node	282	
Soft tissue	62	2
Conjunctiva/cornea	14	
Bone and articulation	58	2
Cardiovascular system	36	
Neurological system	68	
Abdominal/Digestive tract	127	
Stool	44	6
Urogenital tract	5	
Other (Non identified biopsy)	15	
	1769	17

Etude LHUB-ULB



“ 17 NTM

- “ 9 par culture classique et par NTMElite
- “ 3 par culture classique uniquement
- “ 5 par NTM Elite uniquement

“ 32 NTMElite + pour autre germes

	NTM +	NTM -	
NTMElite +	15	32	49
NTMElite -	2	1720	1720
	17	1752	1769

Performance
du NTMElite
pour les NTM

Sens 88.24%
Spec 98,17%
PPV 31,91%
NPV 99,88%

	Growth on NTM Elite agar	Growth on routine method media
NTM growth	9	9
	5	0
	0	3
growth/ #POS recovered	14/17	12/17

Etude LHUB-ULB (LBA – biop. pulm.)

” 7 NTM

- ” par culture classique et par NTMElite
- ” par culture classique uniquement
- ” par NTM Elite uniquement

” 16 NTMElite + pour autre germes

Performance
du NTMElite
pour les NTM

Sens	71,43%
Spec	97,87%
PPV	23,81%
NPV	99,73%

	NTM +	NTM -	
NTMElite +	5	16	21
NTMElite -	2	734	736
	7	750	757

Etude LHUB-ULB (non respiratoire)

” 10 NTM

- ” par culture classique et par NTMElite
- ” par culture classique uniquement
- ” par NTM Elite uniquement

” 16 NTMElite + pour autre germes

Performance
du NTMElite
pour les NTM

Sens 100%
Spec 98,40%
PPV 38,46%
NPV 100%

	NTM +	NTM -	
NTMElite +	10	16	26
NTMElite -	0	986	986
	10	1002	1012

Evaluation du NTMElite pour le screening respiratoire des patients mucoviscidosiques

“ 4 NTM

- “ par culture classique et par NTMElite
- “ par culture classique uniquement
- “ par NTM Elite uniquement

“ 8* NTMElite + pour autre germes

Sens 100%
Spec 82,22%
PPV 33,33%
NPV 100%

Performance
du NTMElite
pour les NTM

	NTM +	NTM -	
NTMElite +	4	8*	12
NTMElite -	0	37	37
	4	45	49

* Dont 2 *Burkholderia*
1 *Achromobacter*



Evaluation du NTMElite: Limites de l'étude

- ” Période 2^e (et 3^e) vague(s) COVID
 - ” Activité
 - ” Pathologie
- ” Pas ciblé
 - ” Type de prélèvement
 - ” Intérêt
 - ” Demandes non justifiées ?
 - ” Clinique
 - ” Pas de concertation avec les infectiologues

Conclusions

- ” TAT NTMElite > culture classique

- ” Utilité du NTMElite pour les prélèvements non respiratoires
 - ” Très bonne sensibilité et Spécificité
 - ” Mais PPV très bas
 - ” NPV élevée

- ” Utilité du NTMElite pour les prélèvements respiratoires
 - ” CF: Sens OK Spec ± PPV faible
 - ” LBA/biopsie: Sens ± Spec OK PPV faible
 - ” NPV élevée