

# Diagnostic biologique de la tuberculose latente : quelques données chez les immunodéprimés

Dr D. Monnier  
Service d'Immunologie Thérapie Cellulaire et  
Hématopoïèse (ITeCH)  
CHU de RENNES

# Données épidémiologiques 2007

- Rapport OMS 2009 :

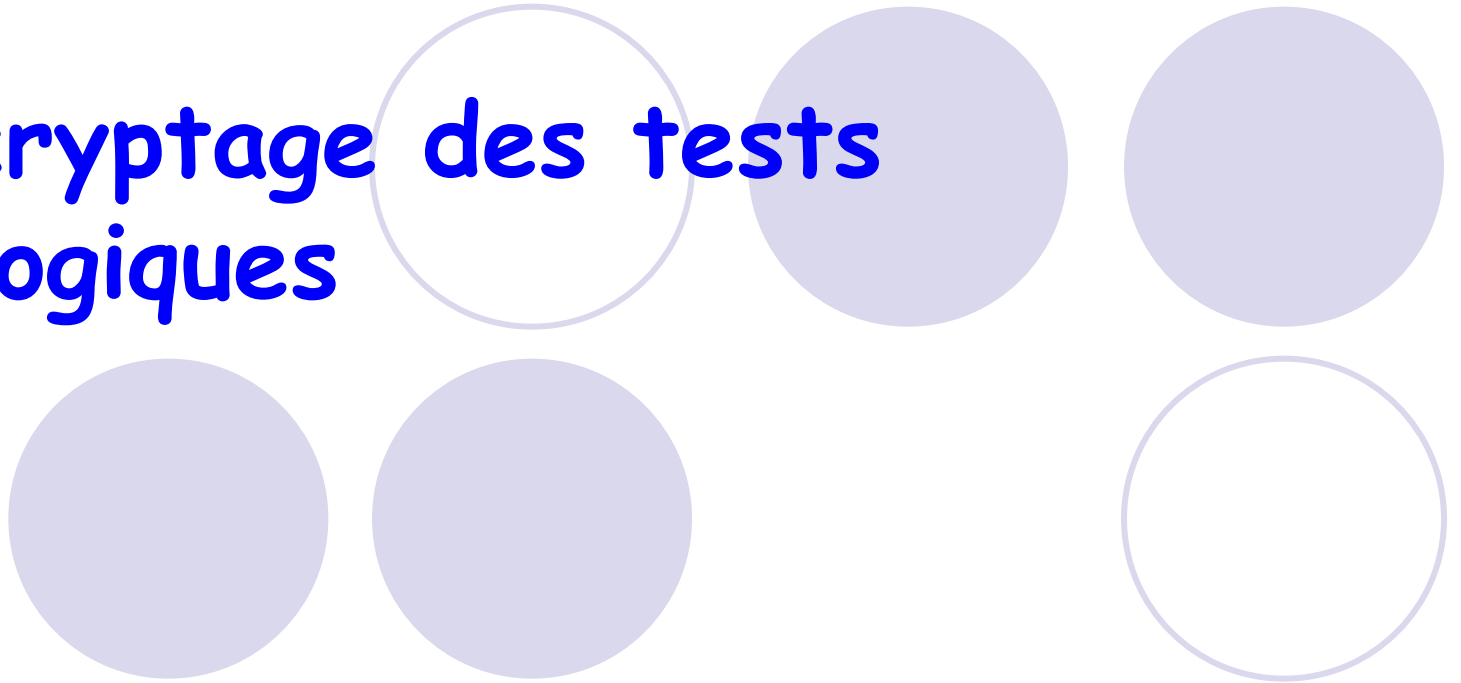
- Une des premières causes de mortalité infectieuse
  - 2 millions de décès/an
- 9,27 millions de cas de tuberculose active/an
- Incidence mondiale :  $139 / 10^5$  , tendance à la baisse

- 1/3 de la population mondiale serait infectée

- Situation épidémiologique en France :

- Nombre de cas déclarés : 5588
- Incidence (France entière) :  $8,9 / 10^5$  en  $\uparrow$
- Incidences variables selon les régions

# Décryptage des tests biologiques



# Tuberculose et IDR

- **Seul moyen diagnostique historique : IDR ou test de Mantoux**

Test cutané explorant l'hypersensibilité retardée induite par l'injection de tuberculine (200 antigènes différents)

○ Avantages ...

○ Et Inconvénients...

- Modalité technique, observateur dépendant
- Réactions croisées (BCG ou infection à autres mycobactéries)
  - 65% des IDR positives en France sont liés à la vaccination
- Sensibilité 75%
- Spécificité 35 à 100% selon population testée

# Nouveaux tests biologiques

- **Test T-SPOT.TB  
(Oxford Immunotec)**

\* Se : 86%-93% ; Sp : 86%-100%  
(Population vaccinée)



- **Test QuantiFERON-TB  
(Cellestis)**

\* Se : 63%-78% ; Sp : 94%-98%  
(Population vaccinée)



**Mais ... ne permettent pas de différencier  
tuberculose maladie et tuberculose infection  
latente**

\* Pai et al, Annals of Internal Medicine, 2008

# Principes des tests biologiques

## Les antigènes utilisés ESAT6 CFP10 TB7.7

- Antigènes recombinants
- Spécifiques de mycobactérium tuberculosis
  - Codés par les Régions de Différence (RD)
  - ESAT 6 (*early secretory antigenic target protéin 6*) et CFP10 (*culture filtrate protéin 10*) codées par le gène RD1
  - ajout de TB7.7 codé par gène RD11 (Tuberculose 7.7) dans les kits de Cellestis (QuantiFERON)
- Facteur de virulence
- Ces protéines sont des cibles majeures de la réponse immune cellulaire T et de la synthèse d'INF  $\gamma$  (1)

(1) Andersen P, Munk ME, Pollc JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnostic of tuberculosis. Lancet 2000; 356:1099-104.

# Principes des tests biologiques

## Les antigènes utilisés ESAT6 CFP10

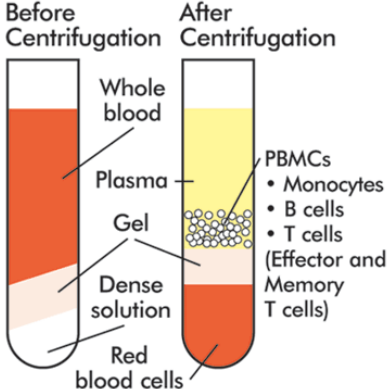
### TB7.7

Strain tested	Antigens	
	ESAT-6	CFP 10
<b>Tuberculosis complex</b>		
<i>M tuberculosis</i>	+	+
<i>M africanum</i>	+	+
<i>M bovis</i>	+	+
<u>BCG substrain</u>		
Pasteur	-	-
<b>Environmental strains</b>		
<i>M avium</i>	-	-
<i>M kansasii</i>	+	+
<i>M marinum</i>	+	+
<i>M szulgai</i>	+	+

(1) Andersen P, et al. Lancet 2000; 356:1099-104.

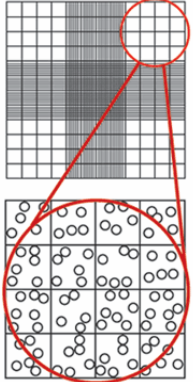
# Test T-SPOT.TB (Oxford Immunotec)

**Step 1** Collect the blood sample in a Cell Preparation Tube and centrifuge to separate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)



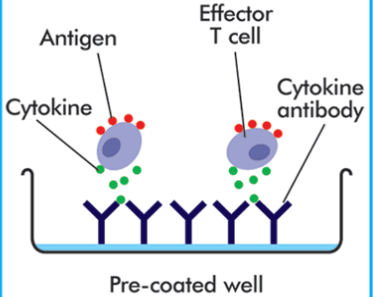
The diagram shows two test tubes. The left tube, labeled 'Before Centrifugation', contains 'Whole blood' (red), 'Plasma' (yellow), and 'Red blood cells' (orange) at the bottom. The right tube, labeled 'After Centrifugation', shows the components separated: 'Red blood cells' at the bottom, a 'Gel' layer, a 'Dense solution' layer, and 'PBMCs' (Peripheral Blood Mononuclear Cells) in the middle. The PBMCs are listed as: Monocytes, B cells, and T cells (Effector and Memory T cells).

**Step 2** Wash and count the PBMCs using a microscope and counting chamber or simply run them on a haematology analyser



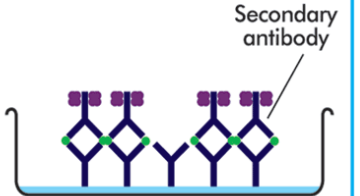
The diagram shows a grid used for counting cells. A red circle highlights a specific area of the grid, and a red line connects it to a magnified view of that area, showing individual cells being counted.

**Step 3** Add PBMCs to wells with antigens and incubate overnight (37°C, CO<sub>2</sub>)




The diagram shows a 'Pre-coated well' with Y-shaped receptors on the surface. An 'Effector T cell' is shown interacting with an 'Antigen' (represented by a red dot) and a 'Cytokine' (represented by a green dot). The 'Cytokine antibody' is also shown interacting with the cytokine.

**Step 4** Wash and add secondary antibody



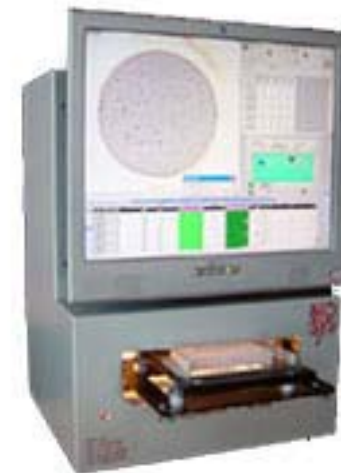
The diagram shows the 'Secondary antibody' (represented by purple Y-shapes) binding to the 'Cytokine antibody' (represented by green Y-shapes) that is already bound to the 'Cytokine' (represented by green dots).

**Step 5** Wash and add substrate



The diagram shows the 'Substrate' (represented by blue dots) binding to the 'Secondary antibody' (represented by purple Y-shapes) that is already bound to the 'Cytokine antibody' (represented by green Y-shapes) and the 'Cytokine' (represented by green dots).

# RESULTATS / INTERPRETATIONS

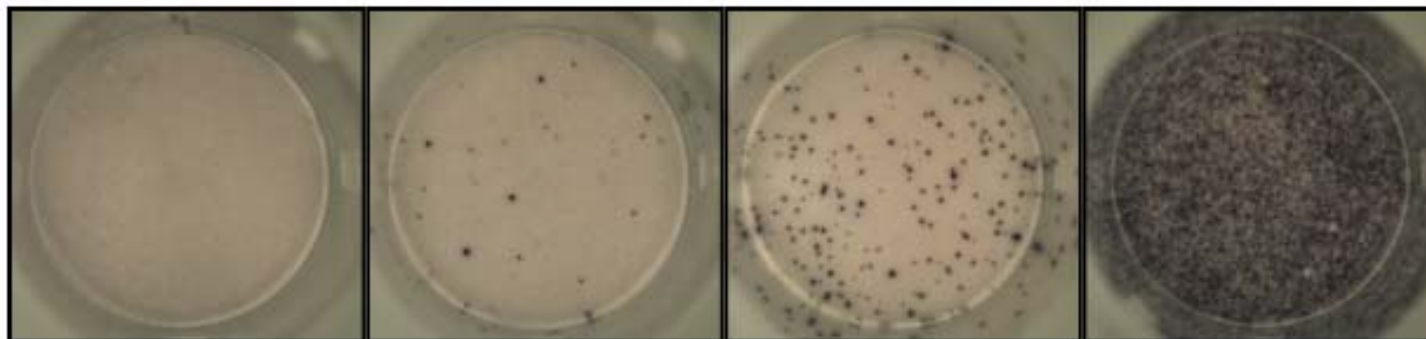


**Contrôle  
négatif  
Milieu seul**

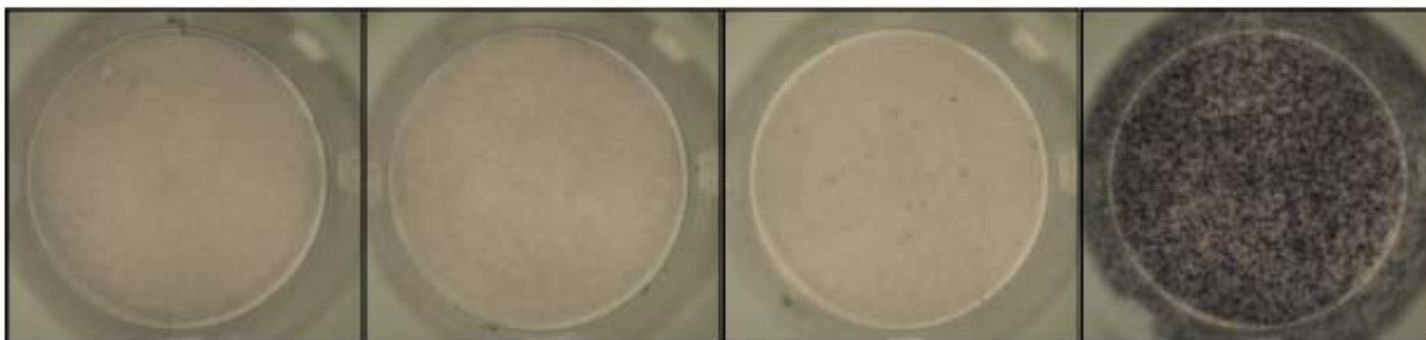
**Panel A  
ESAT-6**

**Panel B  
CFP-10**

**Contrôle  
positif  
mitogène**



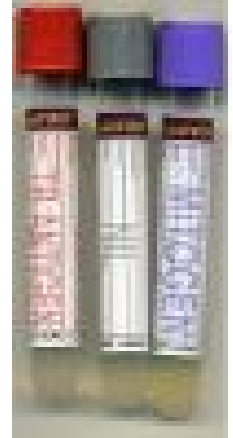
**Patient réactif**



**Patient non réactif**

# Test QuantiFERON-TB (Cellestis)

- Prélèvement sur 3 tubes de 1 mL de sang total
  - Tube contrôle sans stimulant
  - Tube test contenant les 3 peptides ESAT6, CFP-10, TB7.7
  - Tube témoin contenant un mitogène PHA
- 16 à 24 h d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>
- Centrifugation et congélation du plasma
- Dosage de l'IFN $\gamma$  par méthode ELISA



# Avantages et inconvénients relatifs des 2 techniques

## T-Spot TB

### Avantages:

- Meilleure sensibilité théorique, surtout chez les patients lymphopéniques
- Permet de différencier la réponse aux différents antigènes (panel A et B)

### Inconvénients

- Nécessite une structure pour la culture cellulaire et un lecteur de plaque Elispot
- Nécessite une expertise technique et biologique spécialisée

## QuantiFERON-Gold

### Avantages:

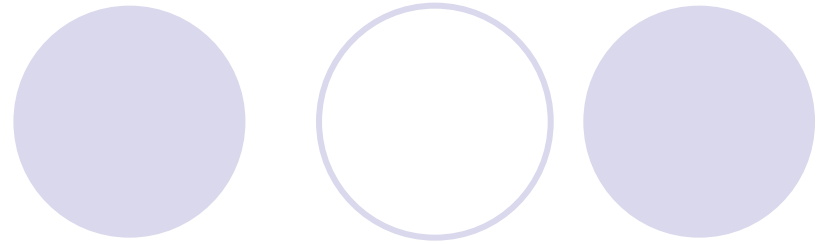
- Possibilité de réaliser les dosages par série en différé (congélation)
- Faible volume de sang 3ml
- Nécessite peu d'expertise technique

### Inconvénients:

- Délai acheminement obligatoirement inférieur à 8h

# Tests biologiques

## Avantages



- Test très spécifique
  - Croisent seulement avec *M.Kansasii*, *M.Szulgai* et *M.Marinum*
    - Seul cas entraînant confusion: mycobactériose pulmonaire à *M.Kansasii*.
  - Pas de réactivité croisée avec le BCG
- Rapide
  - Simple prise de sang
  - Pas de seconde visite
  - Résultats obtenu en moins de 48h
- Interprétation facile
  - Reproductibilité des tests
  - Suivi ou contrôle sur 2<sup>ème</sup> prélèvement possible : Pas de stimulation *in vivo* des réponses immunes (effet «booster» de l'IDR)
  - Non observateur dépendant

# Tests biologiques

## Limites

- Coût
- Analyse non remboursée
- Délai d'acheminement des prélèvements <8h
- En cours de validation pour certaines populations
  - Enfants <15ans (1 et 2)
  - Co-infections par le VIH
  - Patients traités par immunosuppresseur

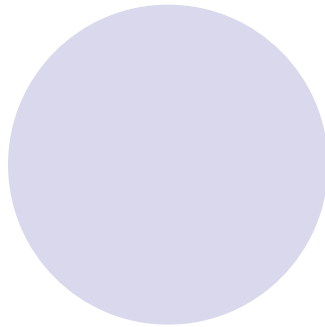
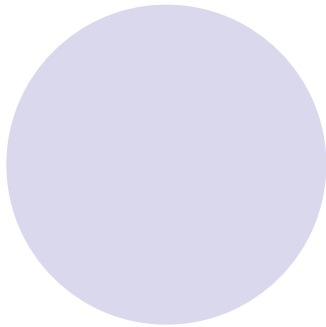
(1) Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with *Mycobacterium* in children. *Thorax* 2006;61:616-20.

(2) Nicol MP, Pienaar D, Wood K, Eley B, Wilkinson RJ, Henderson H, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring therapy. *Clin Infect Dis* 2005;40(9):1301-8.

# Indications retenues en France

- 4 indications retenues par la Haute Autorité de Santé dans un rapport de décembre 2006 :
    - Diagnostic de tuberculose infection latente chez les adultes de plus de 15 ans
    - Embauche de professionnel de santé ou travaillant dans des services à risque
    - Aide au diagnostic des formes extra-pulmonaires
    - Avant mise en route d'un traitement par anti-TNF $\alpha$
- Ces tests trouvent leur place en remplacement de l'IDR dans ces 4 indications.

**Données disponibles chez les  
immunodéprimés**

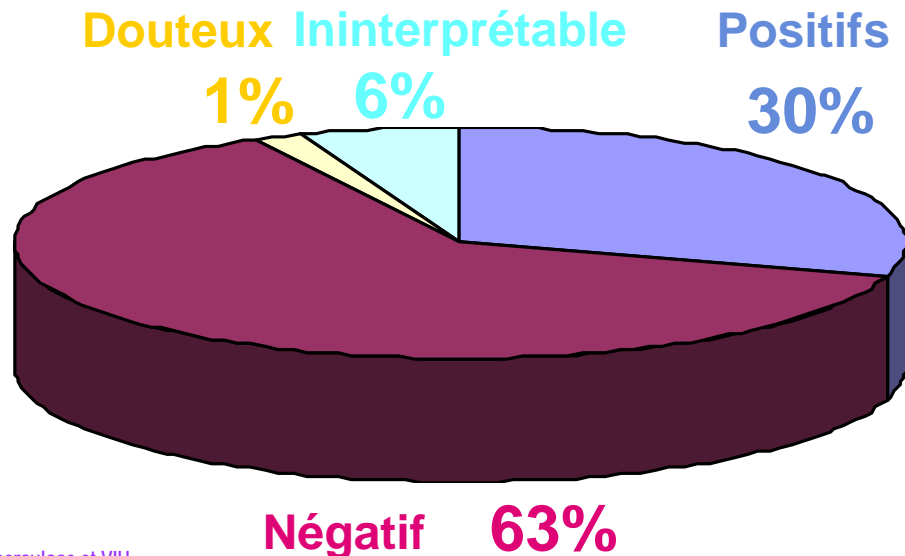


# Notre expérience chez les sujets HIV (1)

- **Maladies infectieuses : 67 T-Spot.TB réalisés entre 20/10/2008 et 4/09/2009 dont 36 (54%) chez sujets HIV+**

- 42 Négatifs
- 20 Positifs
- 1 Douteux (non HIV)
- 4 Ininterprétables dont 3 VIH+

1/3 : profonde lymphopénie  
2/3 : bruit de fond trop élevé,  
1 a été contrôlé et rendu négatif



# Notre expérience chez les sujets HIV (2)

- Nombre de Ly T CD4+ chez les 36 sujets HIV+

	Nombre de test	Nombre d'ininterprétables
Pas de données	7	0
TCD4+<50/ $\mu$ L	6	2
50<TCD4+<100/ $\mu$ L	3	0
100<TCD4+<200/ $\mu$ L	6	0
TCD4+>200/ $\mu$ L	14	1 (contrôlé négatif)

- La lymphopénie TCD4 seule ne semble pas responsable d'une forte augmentation des tests ininterprétables en technique elispot
- **MAIS** quelle est la valeur clinique du résultat des tests biologiques chez les sujets HIV lymphopéniques ?

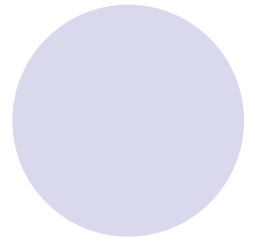
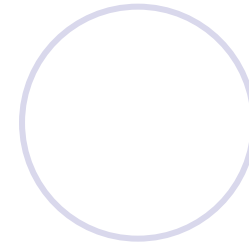
# Extraits de la littérature

Auteurs / revue	Année	Population étudiée	Tests utilisés	Conclusions
<i>Rangaka et al</i> AJRCCM	2007	Afrique du sud 160 Adultes HIV + et -	Quantiféron T-SPOT.TB IDR	IDR moins sensible chez HIV+ IGRAs non affectés Taux de T-SPOT.TB + supérieur chez sujet très lymphopénique
<i>Lawn et al</i> BMC Inf Dis	08/2007	Afrique du sud 40 Adultes HIV+	T-SPOT.TB IDR	IDR en défaut si TCD4<100/μL T-SPOT.TB indépendant du taux de TCD4
<i>Karamet et al</i> Plos ONE	01/2008	Sénégal 285 HIV+	T-SPOT.TB IDR	T-SPOT.TB donne un taux supérieur de résultats positifs mais ce taux diminue avec l'immunodépression
<i>Stéphan et al</i> AIDS	9/2008	Allemagne 286 HIV+	Quantiféron T-SPOT.TB IDR	Se IGRAs > Se IDR chez les immunodéprimés Faible corrélation des résultats entre les 3 tests Contrairement au T-SPOT.TB le Quantiféron dépend du taux de TCD4
<i>Talati et al</i> BMC Inf Dis	2/2009	USA 336 HIV+	Quantiféron T-SPOT.TB IDR	Mauvaise concordance des résultats entre les 3 tests IGRAs ne dépendent pas du taux de CD4 Taux de T-SPOT.TB + et indéterminé supérieur Corrélation entre les T-SPOT.TB + et une histoire d'ITL
<i>Kabeer et al</i> Plos ONE	05/2009	Inde 105 HIV+/TB+	Quantiféron IDR	Nombre de Quantiféron indéterminé plus élevé si TCD4<200/μL Quantiféron plus sensible que l'IDR
<i>Jiang et al</i> BMC Immunol	05/2009	Chine 102 HIV+	T-SPOT.TB IDR	T-SPOT.TB plus sensible que l'IDR si TCD4<500/μL T-SPOT.TB est indépendant du taux de TCD4
<i>Richeldi et al</i> Chest	07/2009	Italie 120 tx foie 116 HIV+ 95 oncohémato	Quantiféron T-SPOT.TB IDR	IGRAs sont plus souvent positifs que l'IDR Nombre supérieur d'ininterprétables avec quantiféron
<i>Leidl et al</i> Eur Respir Jo	07/2009	Ouganda 128 HIV+	Quantiféron T-SPOT.TB IDR	T-SPOT.TB indépendant du taux de TCD4

# Conclusion (1)

- **Conflicting results ...**
- Pas de gold standard pour le diagnostic de la tuberculose latente
- Très mauvaise corrélation entre les 3 tests (IDR et IGRAs) dans cette population
- Tests biologiques sont plus sensibles que l'IDR chez les patients dont  $TCD4 < 500/\mu L$
- Résultats du T-SPOT. *TB* semblent
  - indépendants du nombre de TCD4
  - corrélés à la notion d'antécédent d'infection tuberculeuse latente
- Plusieurs études conseillent l'utilisation du T-SPOT. *TB* plutôt que du Quantiféron chez ces patients
- **Encore trop peu de données pour constituer des guidelines cliniques**

# Conclusion (2)



- Etude française en cours IGRAVIH/SENSIGRA comparant IDR / Quantiféron / T-SPOT.TB
  - 1390 patients : Intérêt des tests biologiques dans le dépistage de la tuberculose chez les patients VIH
  - 225 patients : Intérêt des tests biologiques chez les patients VIH dont les Ly TCD4<200/mm<sup>3</sup> atteints d'une tuberculose prouvée
- Premiers résultats fin 2010
- To be continued ...

