

## Avantages et limites des tests sanguins in vitro lymphocytes T/interféron gamma comparativement au test intradermique à la tuberculine pour le diagnostic de tuberculose

### Advantages and drawbacks of in vitro Interferon- $\gamma$ /T cell assays compared to the Mantoux test for the diagnosis of tuberculosis

J.-L. Herrmann<sup>a,b,\*</sup>, N. Simonney<sup>a</sup>, P.-H. Lagrange<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Service de microbiologie, hôpital Saint-Louis, Paris, France

<sup>b</sup> Service de microbiologie, hôpital Raymond-Poincaré, 10, boulevard Raymond-Poincaré, 92380 Garches, France

Disponible sur internet le 05 octobre 2006

#### Résumé

Le développement de tests sanguins in vitro, mesurant la réponse d'hypersensibilité retardée observée à l'issue d'un contage tuberculeux, va progressivement modifier le diagnostic de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. Ces tests sanguins (Quantiferon TB Gold<sup>TM</sup>, Cellestis, Australia ; T-SPOT.TB<sup>TM</sup>, Oxford Immunotec, United Kingdom) utilisent des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* complex : ESAT-6 et CFP-10, comparativement à l'intradermoréaction à la tuberculine (IDR) qui est un mélange complexe de plus de 200 antigènes mycobactériens. ESAT-6 et CFP-10 sont absents de toutes les souches vaccinales de BCG utilisées dans le monde. Une amélioration significative de la spécificité de ces tests, associée à une sensibilité identique ou supérieure vis-à-vis de l'IDR, dans le diagnostic de la tuberculose–infection feront que ces tests sanguins remplaceront dans le futur l'IDR.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

The development of in vitro blood tests that measure the delayed hypersensitivity reaction developed after contact with *Mycobacterium tuberculosis* will change progressively the diagnosis of *M. tuberculosis* infection. These blood assays (Quantiferon TB Gold<sup>TM</sup>, Cellestis, Australia; T-SPOT.TB<sup>TM</sup>, Oxford Immunotec, United Kingdom) use specific, complex *M. tuberculosis* antigens (ESAT-6 and CFP-10), whereas the intradermal Mantoux test is done with tuberculin, a complex mixture of more than 200 antigens. ESAT-6 and CFP-10 are absent from all the BCG vaccine strains used throughout the world. Significant improvement in the specificity with equivalent or increased sensitivity of the in vitro tests compared to the Mantoux test will lead eventually to replacement of the latter.

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Tuberculose ; Diagnostic ; Test cellulaire T-interféron gamma ; Quantiferon TB Gold ; T-SPOT.TB

**Keywords:** Tuberculosis; Diagnosis; Mantoux test; T cell assays; Interferon- $\gamma$ ; Quantiferon TB Gold; T-SPOT.TB

#### 1. Introduction

La clé du contrôle de la tuberculose est la mise en évidence des sujets infectés par *Mycobacterium tuberculosis*, à risque de

développer une tuberculose active [1]. En effet, cette stratégie est efficace, car un traitement préventif des sujets infectés non malades diminue le risque de progression vers une tuberculose active ou tuberculose–maladie de près de 90 % [2]. Deux nouveaux tests sanguins : le Quantiferon TB gold<sup>TM</sup> (QF-TB Gold, Cellestis, Carnegie, Australie) et le T-SPOT.TB<sup>TM</sup> (Oxford Immunotec, Abingdon, Angleterre) permettent dorénavant d'être précis dans le diagnostic d'un contage tuberculeux chez

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [jean-louis.herrmann@rpc.aphp.fr](mailto:jean-louis.herrmann@rpc.aphp.fr) (J.-L. Herrmann).

les sujets, même vaccinés par la souche vaccinale BCG de *Mycobacterium bovis*. La mise au point et le développement commercial de ces deux tests ont bénéficié des résultats obtenus par l'étude des génomes de mycobactéries pathogènes ou non pathogènes [3]. Les deux tests utilisent des antigènes codés par une région unique du génome, appelée région de différence 1 (RD1), absente de toutes les souches vaccinales, de la plupart des mycobactéries non tuberculeuses (MNT) à l'exception de *M. kansasii*, *M. marinum* et *M. szulgai*, mais présentes dans tous les isolats cliniques de *M. tuberculosis* [3]. Les protéines : ESAT-6 (*early secretory antigenic target protein 6*) et CFP-10 (*culture filtrate protein 10*) sont des cibles majeures de la réponse immune avec réponse cellulaire T et synthèse d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) participant à la réponse protectrice chez les sujets infectés [4]. Chaque test possède des spécificités techniques très différentes, et des sensibilités et spécificités très semblables que nous détaillerons au cours de ce chapitre. Trois éléments essentiels doivent être rappelés et gardés en mémoire :

- il n'existe pas de *gold standard* de la tuberculose–infection, donc aucun outil diagnostique de référence contre lequel ces tests peuvent être étalonnés ;
- en cas de positivité, ils ne sont en aucun cas des indicateurs de protection, ou d'évolution vers la tuberculose–maladie ;
- ils ne différencient pas, en cas de positivité la tuberculose–maladie de la tuberculose–infection. Seules l'exclusion, ou la mise en évidence de signes cliniques permettront de faire la différence entre les deux états cliniques.

## 2. Description des nouveaux tests

Les deux tests sont réalisés à partir d'un prélèvement sanguin. Ils mesurent la réactivité des lymphocytes thymodépendants circulants mis en culture en présence d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*. Mais ils diffèrent ensuite sur le plan du concept de la méthode et de la technique réalisée.

QF-TB Gold est un test réalisé sur sang total. Trois tubes fournis par le laboratoire sont utilisés :

- un premier ne contenant aucun antigène et servant de contrôle négatif ;
- un deuxième tube contenant de la phytohématagglutinine (PHA) jouant un rôle de contrôle interne de la réaction d'activation des lymphocytes T ;
- un troisième tube contenant les antigènes spécifiques ESAT-6 ; CFP-10 ainsi que Tb7.7, antigène également codé par la région RD1.

Trois millilitres de sang (1 ml par tube) seront nécessaires. À l'issue du prélèvement, les tubes sont adressés au laboratoire à température ambiante dans un délai maximum de 12 heures. Les trois tubes sont directement mis à incuber dans une étuve à 37 °C pendant 18 heures. À l'issue de cette incubation les tubes sont centrifugés et le surnageant (représenté en fait par le plasma) sera utilisé pour le dosage de l'IFN- $\gamma$  par une méthode immunoenzymatique (Elisa), IFN- $\gamma$  libéré dans le sur-

nageant après activation des lymphocytes T au contact des antigènes présents dans le tube.

Le T-SPOT.TB nécessite 10 ml de sang complet prélevé dans un tube spécial fourni par le laboratoire (Vacutainer CPT). Idéalement, le tube doit être adressé le plus rapidement possible au laboratoire (ne pas dépasser six heures). Le tube contient une solution dense et un gel permettant, après centrifugation, la séparation des cellules mononucléées circulantes (monocytes, les lymphocytes B et T effectrices et mémoires). Les cellules sont lavées, puis comptées sur cellule Malassez ou à l'aide d'un automate d'hématologie. Les cellules sont ensuite incubées en présence ou en absence d'antigènes ESAT-6 et CFP-10, et en présence de PHA (contrôle interne) pendant 18 heures. Plusieurs lavages sont réalisés à l'issue de cette incubation avant d'ajouter un anticorps anti-IFN- $\gamma$ . Chaque cellule qui formera un spot après ajout du substrat, représente un lymphocyte T produisant à sa périphérie de l'IFN- $\gamma$ . La technique ainsi décrite s'appelle ELISPOT et consiste à énumérer tous les spots formés à l'issue de l'incubation des cellules mononucléées circulantes avec les antigènes spécifiques. Cette lecture est réalisée manuellement à l'aide d'un microscope, ou à l'aide d'automates ELISPOT plutôt disponibles dans les laboratoires d'immunologie.

Chaque test présente des caractéristiques propres. Une approche plus complexe pour le T-SPOT.TB, comparativement au QF-TB Gold est observée, avec purification préalable des lymphocytes T. QF-TB Gold est beaucoup plus adapté aux enquêtes sur le terrain, notamment dans les pays d'endémie tuberculeuse. Une meilleure sensibilité devrait être logiquement attribuée au T-SPOT.TB car la mesure de l'IFN- $\gamma$  produit au contact des lymphocytes T est plus sensible que la mesure de l'IFN- $\gamma$  libéré dans le plasma [5]. Nous verrons ci-après qu'il est difficile d'établir une différence en l'absence de *gold standard*. Une autre différence notable est la concentration du mitogène (la PHA) utilisée dans chacun des tests, et qui intervient comme contrôle interne de la réaction. Cette concentration est inférieure dans le test QF-TB Gold, donnant donc une valeur plus exacte du degré d'immunocompétence des sujets testés (Lagrange, résultats non publiés). Cela explique le plus grand nombre de résultats indéterminés avec QF-TB Gold comparativement au T-SPOT.TB. En tout cas, les différences de résultats observés peuvent être liées aux caractéristiques techniques des deux tests sanguins.

## 3. Quelles indications pour ces tests sanguins ?

Seul le test Quantiféron TB a été pour l'instant approuvé, par la Federal Drug Administration (FDA). Le Center for Disease Control (CDCAtlanta, États-Unis) a proposé d'utiliser le test QF-TB en remplacement de l'intradermoréaction (IDR), pour le diagnostic de tuberculose–infection [6]. Si le résultat du test est positif, le patient est rapidement pris en charge, de manière similaire à une IDR positive. Les recommandations anglaises sont différentes car elles utilisent une stratégie en deux étapes (National Collaborating Center for Chronic Conditions, et National Institute for Health and Clinical Excellence

2006) : réalisation d'un test sanguin chez tout sujet présentant une IDR positive. L'inconvénient majeur est l'absence de détection des sujets IDR négative mais tests sanguins IFN- $\gamma$  positifs. Une stratégie similaire a été mise en place en Suisse (Ligue Pulmonaire Suisse, 2005). La haute Autorité de santé (Paris, France) a récemment posé le problème des indications des tests *in vitro* IFN- $\gamma$ . Le remplacement de l'IDR par ces tests serait la règle ; avec trois indications précises :

- dépistage du contage tuberculeux ;
- dépistage des personnels de santé,
- et patients mis sous immunosuppresseurs comme les anti-TNF.

Les deux tests présentent un marquage CE mais ne sont pas encore inscrits à la nomenclature des actes de biologie médicale. Les indications comme les sujets jeunes, les patients VIH (+) ou autre immunosuppression font l'objet d'études afin de préciser l'efficacité de ces tests dans ces populations.

#### 4. Sensibilité–spécificité respective de chacun des tests

Les performances des tests sanguins de détection de l'interféron gamma restent difficiles à évaluer. Il n'existe pas de *gold standard* permettant le diagnostic de tuberculose–infection. La comparaison des résultats des tests entre eux, ou avec ceux de l'IDR n'est pas satisfaisante au vu des propres limites de l'IDR notamment [5,7 et références incluses].

##### 4.1. L'IDR

L'IDR, ou test de Mantoux, est un test cutané explorant l'hypersensibilité retardée induite par l'injection de tuberculine, extrait antigénique composés de plus de 200 antigènes différents, préparée à partir d'une culture de *M. tuberculosis*. L'IDR présente différents inconvénients [8]. Outre les modalités techniques d'injection qui entraînent une variabilité des résultats, l'existence de réaction croisée positive chez les sujets vaccinés ou chez les sujets présentant des infections à mycobactéries non tuberculeuses (MNT) représente l'inconvénient majeur de l'IDR [8]. Un algorithme décisionnel est nécessaire selon l'origine géographique, l'âge du sujet, son statut vaccinal et la source de contamination. Chez les patients présentant une tuberculose–maladie la sensibilité de l'IDR varie entre 75–90 %. Dix à vingt-cinq pour cent des adultes présentant une tuberculose–maladie ont une IDR faussement négative. Ce pourcentage est de l'ordre de 10 % chez les enfants immunocompétents. Les valeurs sont plus faibles chez les sujets présentant des tuberculoses–maladies sévères, ou en fonction de l'immunodépression sous jacente. La spécificité du test cutané varie entre 35 et 100 %, selon les populations testées. Par exemple, 65 % des IDR positives en France sont liés à une vaccination par le BCG.

##### 4.2. Tests sanguins versus IDR

Les premières études réalisées avec les tests sanguins ont utilisé la tuberculine comme préparation antigénique pour activer les lymphocytes T circulants. Les résultats étaient tout à fait concordants avec ceux obtenus avec l'IDR. Les mêmes défauts (faible spécificité) que ceux décrits pour l'IDR étaient retrouvés, à l'exception des variabilités techniques et de préparation de l'antigène. Ils démontraient ainsi de la mise en place possible d'un diagnostic *in vitro* de la tuberculose–infection, ou maladie.

Depuis maintenant cinq ans, les tests sanguins utilisent les antigènes spécifiques ESAT-6 et CFP-10 codés par la RD1 ; spécifiques de *M. tuberculosis* complex. Une augmentation notoire de la spécificité a été observée, par rapport à l'utilisation de la tuberculine, avec absence d'interférence d'une vaccination préalable par le BCG [5,7 et références incluses].

##### 4.2.1. Dans la TB-maladie

Plusieurs revues récentes ont fait le bilan de ces cinq années de travaux publiés et relatifs à l'utilisation de ces tests sanguins [5,7]. La spécificité calculée est identique pour les deux tests (89 à 100 %). Il existe des arguments expliquant une valeur de spécificité inférieure à 100 %. L'analyse précise des populations témoins a montré que ceux qui présentaient un test IFN- $\gamma$  positif, avaient des facteurs de risque de contage tuberculeux plus nombreux que les témoins ayant une réponse IFN- $\gamma$  négative [9]. De même, la sensibilité calculée pour les deux tests est identique, égale ou supérieure à celle de l'IDR. Deux études récentes ont comparé les deux tests entre eux [10,11]. La limite de cette comparaison reste l'absence de méthode étalon pour définir chacune des populations. Dans le cadre de la tuberculose–maladie, les résultats de la culture et/ou le diagnostic clinique, radiologique et l'évolution favorable sous traitement étaient considérés comme *gold standard*. Lee et al. montrent des résultats similaires entre les deux tests, insistant surtout sur l'importance de bien définir les valeurs seuils de positivité pour chacun des tests [11]. Ferrara et al. montrent, en revanche, une meilleure sensibilité du T-SPOT.TB, mais une meilleure spécificité du QF-TB Gold [10]. Un nombre plus important de résultats indéterminés (absence de positivité de la réponse avec la PHA) était observé dans les deux études pour le QF-TB Gold comparativement au T-SPOT.TB notamment chez les sujets immunodéprimés et les sujets d'âge inférieur à 5 ans [10–13]. Une étude est en cours au laboratoire, en association avec plusieurs hôpitaux pédiatriques de Paris et région parisienne, afin d'évaluer les performances du QF-TB Gold chez l'enfant pour le diagnostic de tuberculose–maladie.

##### 4.1.2. Dans la tuberculose–infection

L'évaluation des valeurs de sensibilité des deux tests est délicate, du fait de l'absence de *gold standard*. Les valeurs sont calculées sur la base des réponses positives ou négatives obtenues chez des sujets témoins sans risque d'avoir été infectés par *M. tuberculosis*. Ces tests ne donnent, en l'état actuel des connaissances, aucune indication sur l'ancienneté de la

tuberculose–infection ou du contagement tuberculeux, d'où la difficulté de définir une vraie population témoin. Ils ne préjugent pas non plus de l'évolution vers la tuberculose–maladie. De même, les valeurs de spécificité sont en fait liées à la définition de la population étudiée. Dans toutes les études publiées, elles étaient supérieures à celle obtenue par l'IDR, confirmant l'indication de remplacement de l'IDR par les tests sanguins, comme cela est proposé par la FDA aux États-Unis [6].

## 5. Avantages et limites des tests sanguins

### 5.1. Avantages

Ces tests ont démontré, grâce à l'emploi d'antigènes spécifiques de *M. tuberculosis*, d'une meilleure spécificité et d'une meilleure sensibilité. Ils sont également rapides (résultat obtenu en moins de 24 heures), ne dépendent d'aucun observateur et produisent des résultats quantitatifs et objectifs. Ils possèdent un contrôle interne, permettant d'évaluer l'immunocompétence du sujet, ou sa réponse T non spécifique. Comme cité précédemment, la concentration du mitogène PHA diffère entre les deux tests, permettant de préciser que QF-TB Gold définit mieux l'immunocompétence du sujet testé. Enfin, ces tests ne nécessitent pas une seconde visite, sauf en cas de positivité pour une réévaluation du patient, et peuvent permettre de suivre l'efficacité du traitement prophylactique ou curatif administré.

### 5.2. Limites

Les inconvénients sont liés principalement à la nature des antigènes utilisés. ESAT-6 et CFP-10 sont produits par deux autres mycobactéries pathogènes : *M. kansasii* et *M. marinum*. Seule une confusion peut être observée avec une mycobactériose pulmonaire à *M. kansasii*, comme cela a été observé dans certaines populations témoins. De plus, ces tests ne discriminent pas entre la tuberculose–maladie et la tuberculose–infection. Il est essentiel de définir la tuberculose–infection sur la base de l'exclusion de la tuberculose–maladie, avec absence totale de signes cliniques, en cas de positivité de ces tests. D'autre part, un contrôle devra être réalisé à l'instar de ce qui est préconisé aux États-Unis. En effet, aucun test n'a réellement été étudié sur le plan cinétique (à l'instar de l'étude réalisée au laboratoire chez les enfants) i.e. déterminer l'évolution de la réponse en absence de traitement chez les sujets détectés positifs.

Ces tests ont également des impératifs biologiques, notamment le délai d'acheminement pour le T-SPOT.TB comme décrit précédemment. Ils n'ont pas encore été validés dans trois populations : les enfants [12,13] ; les sujets co-infectés par le VIH, et les patients mis sous immunosuppresseurs notamment sous anti-TNF. Enfin, le coût des tests peut représenter leur inconvénient majeur. Mais celui-ci doit être comparé aux différents aspects de l'IDR : réalisation technique, seconde visite, et chimio prophylaxie en excès du fait d'une

spécificité médiocre. Le coût de l'IDR a été évalué aux États-Unis entre 41–363 US dollars pour les centres hospitaliers, et 176 à 264 US dollars pour les centres de santé [14]. Cela est à comparer aux 25 € par test pour le QF-TB Gold auquel doit être ajoutée la visite du clinicien et le coût du prélèvement.

D'autre part, une réduction des coûts, obtenue déjà par la visite et un test biologique, pourrait être renforcée par la mise en place d'un dépistage actif des personnes à haut risque de développer une tuberculose–maladie. Selon les dernières données françaises, les populations issues de l'immigration à partir des pays à forte endémie tuberculeuse représentaient près de 44 % des cas de tuberculoses déclarées. Ce pourcentage était de 62 % pour les tranches d'âge de 15 à 39 ans, donnant une incidence 13 fois supérieure à celles des populations du même âge nées en France [15]. Des chiffres similaires sont retrouvés aux États-Unis, en Angleterre, et en Australie. D'où les recommandations américaines qui prônent principalement le dépistage des sujets à haut risque d'infection ancienne ou récente afin de leur proposer une chimiothérapie antituberculeuse.

## 6. Conclusions

Même si le nombre de sujets testés avec les tests sanguins in vitro est aujourd'hui encore très inférieur au nombre de sujets ayant reçu une IDR, les résultats obtenus démontrent d'une plus grande précision de la réponse, qu'elle soit positive ou négative. Leur domaine de prédilection est aujourd'hui le diagnostic de la tuberculose–infection, où ils remplaceront dans le futur l'IDR. Plusieurs questions restent néanmoins posées :

- quelle est l'évolution des réponses positives avec ou sans traitement ?
- Comment résoudre le problème des réponses indéterminées ?
- Comment différencier tuberculose–infection de tuberculose–maladie ? Quelle est leur efficacité dans les populations présentant des tuberculoses paucibacillaires comme chez l'enfant, ou dans les formes sévères souvent IDR négative ?

## Références

- [1] American Thoracic Society. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161: S221–47.
- [2] Ferebee SH. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. *Adv Tuberc Res* 1969;17:29–106.
- [3] Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(6): 3684–9.
- [4] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000;356:1099–104.
- [5] Richeldi L. An update on the diagnosis of Tuberculosis Infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* Published Online June 23 2006 as doi:10.1164/rccm.200509-1516PP.
- [6] Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchok B, Vernon A. Guidelines for using the Quantiferon -TB test for detecting *Mycobacte-*

- rium tuberculosis* infection, United States. MMWR Recomm Rep 2005; 54:49–55.
- [7] Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004;4(12):761–76.
- [8] Huebner RE, Schein MF, Bass Jr. JB. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993;17:968–75.
- [9] Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, et al. Prospective evaluation of whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Immunol Lab* 2005;12: 491–6.
- [10] Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Ravarsi P, Piro R, Meacci M, et al. Use of routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 2006;367:1328–34.
- [11] Lee JY, Choi HL, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, et al. Comparison of two commercial interferon g assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 2006;28:24–30.
- [12] 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.
- [13] Nicol MP, Pienaar D, Wood K, Eley B, Wilkinson RJ, Henderson H, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10 and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring therapy. *Clin Infect Dis* 2005;40(9):1301–8.
- [14] Lambert L, Rajbhandary S, Dirksen A, Smith E, Skovgaard LT, Cook S, et al. Costs of implementing and maintaining a tuberculin skin test program in hospitals and health departments. *Infect Control Hops Epidemic* 2003;24:814–20.
- [15] Che D, Bitar D. Les cas de tuberculose en France en 2003. *Bull Epidemiol Hebd* 2005;17:66–9.