

TUBERCULOSE : QUID DES TESTS IN VITRO ?



Tests de libération d'Interféron γ (IGRA)

AFMP Dubrovnik, 2014

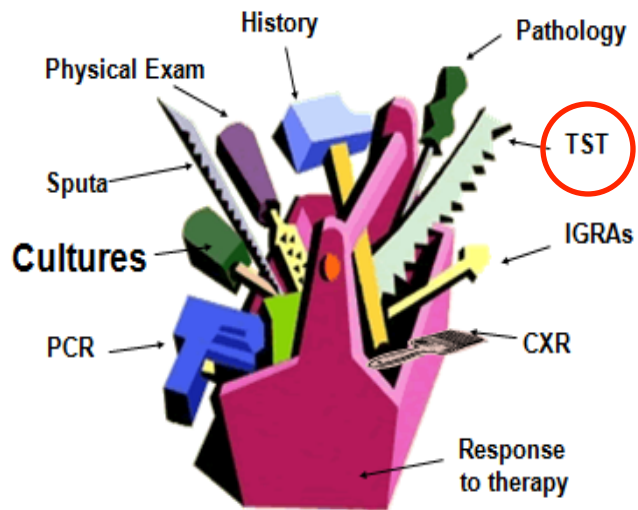
Françoise REY

Hôpital Nord, Marseille

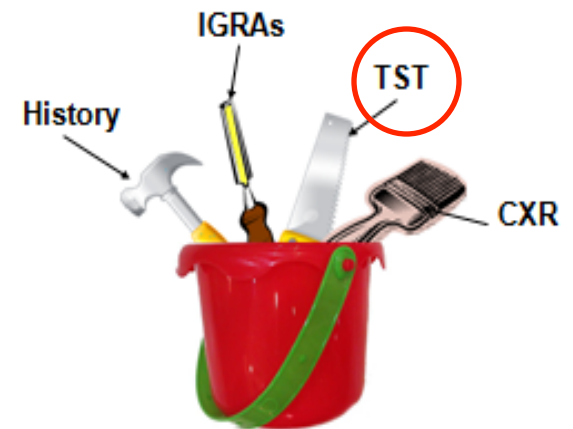
Je déclare n'avoir aucun conflit d'intérêt

Pourquoi des tests in vitro comme outil diagnostique supplémentaire de la TB

Tb latentes à risque de devenir actives
et relevant d'un traitement préventif

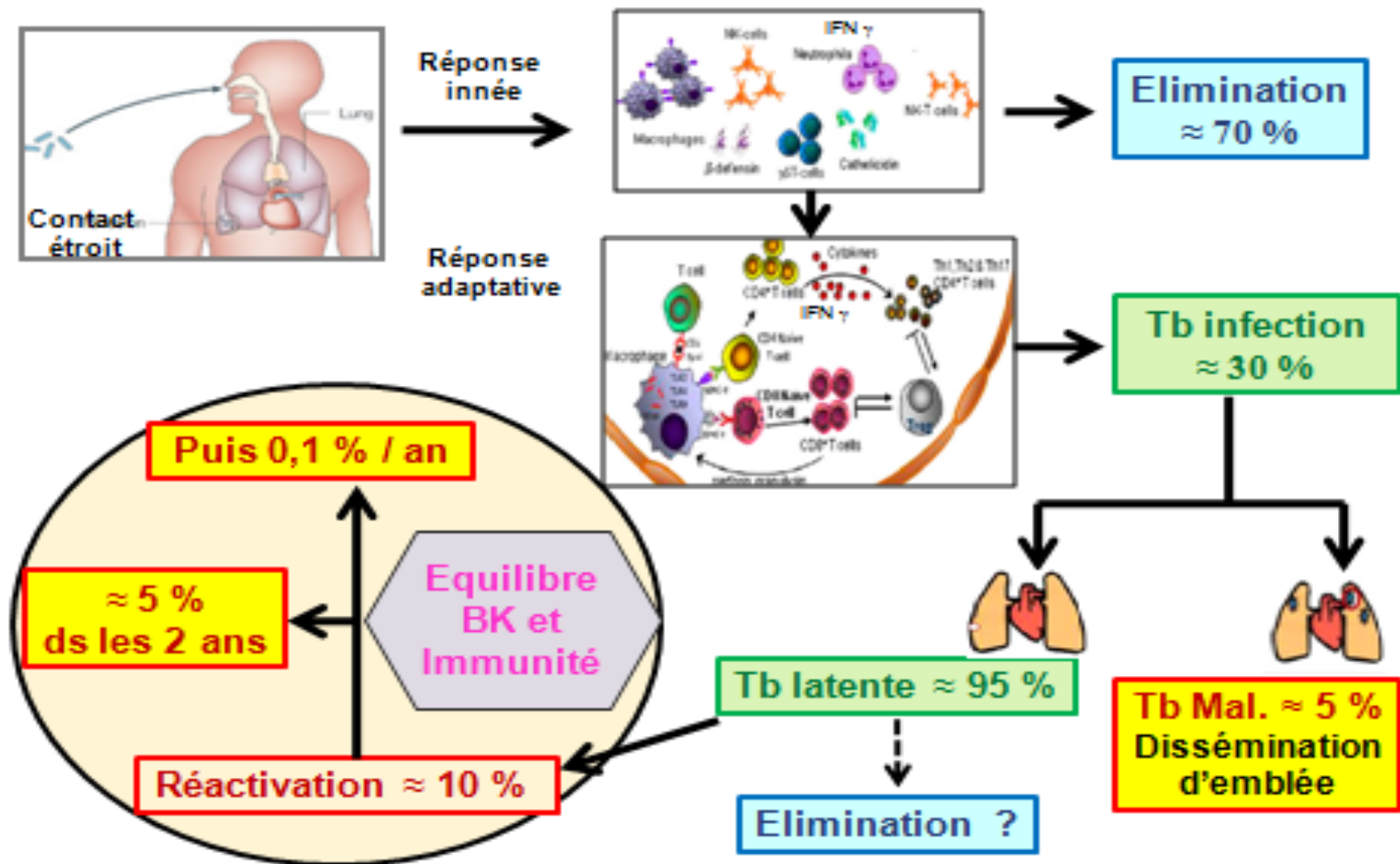


Tuberculose maladie
Gold standard = culture



Tuberculose latente
Pas de Gold standard

IGRA et histoire naturelle de la tuberculose

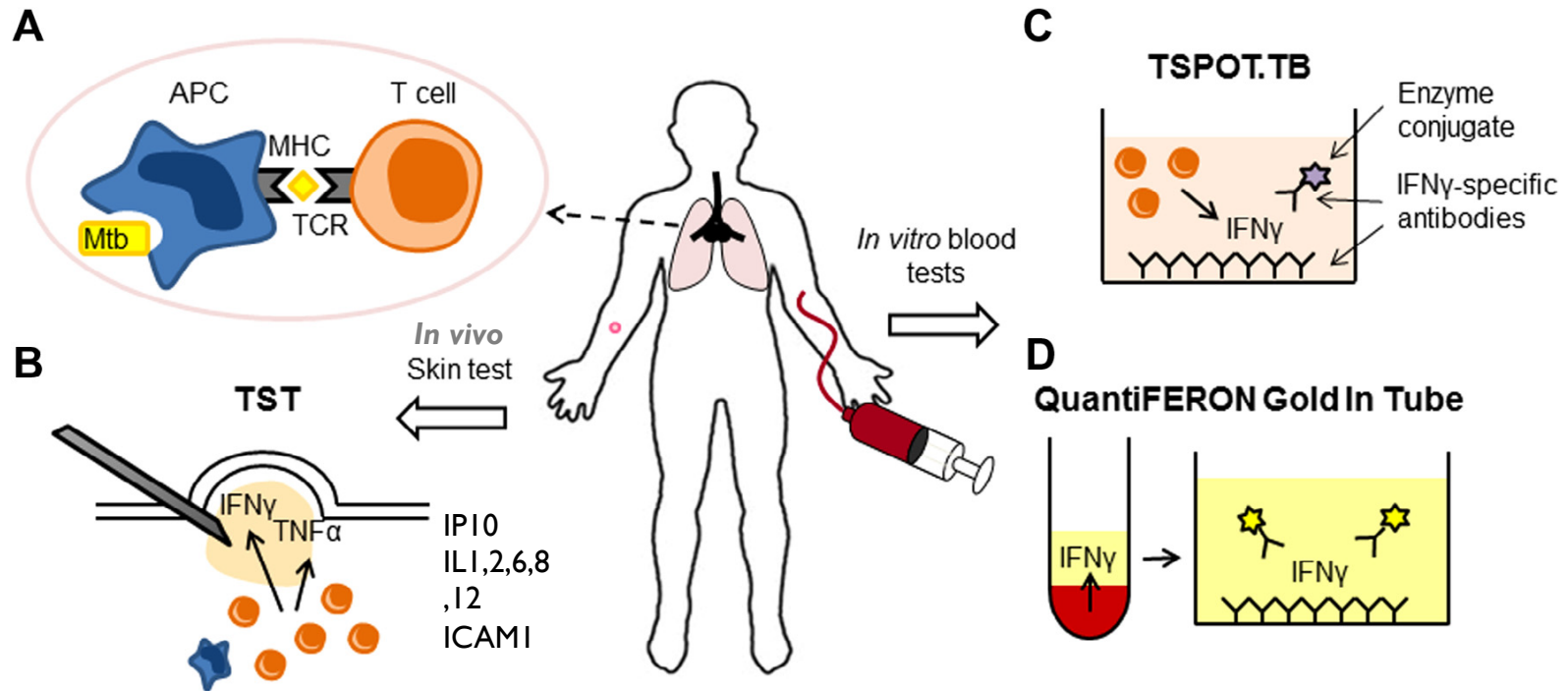


Enjeu : cibler les sujets à risque d'évoluer vers une tb active

Il existe des recommandations de trt des ITL récentes mais 9 trt / 10 sont inutiles

Bases immunologiques

TST et Test de libération d'IFN γ (IGRA)



Tuberculine

> 200 antigènes
(MT, BCG, MBA)

IGRA

ESAT-6
CFP-10
TB7.7

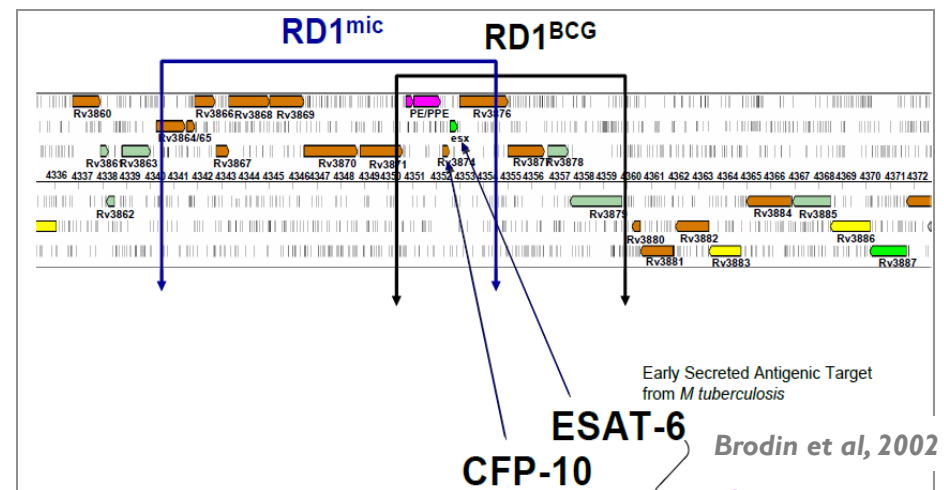
Génome des MBT :

Région RDI (région de virulence
et de différence)

Délétion dans souches de BCG

Sélection d'antigènes spécifiques des
MBT codés :

- par la région RDI (ESAT 6, CFP10)
- par RDII (Tb7,7 – QTF)



Complexe Tuberculosis	Antigènes				Mycobactéries non -Tb	Antigènes			
	ESAT 6	CFP 10	Tb 7,7	IDR		ESAT 6	CFP 10	Tb 7,7	IDR
M tuberculosis	+	+	+	+	M abcessus	-	-	-	+
M africanum	+	+	+	+	M avium	-	-	-	+
M Bovis	+	+	+	+	M branderi	-	-	-	+
Souches BCG				+	M celatum	-	-	-	+
Gothenburg	-	-	-	+	M chelonae	-	-	-	+
Moreau	-	-	-	+	M fortuitum	-	-	-	+
Tice	-	-	-	+	M gordonii	-	-	-	+
Tokyo	-	-	-	+	M intracellulare	-	-	-	+
Danish	-	-	-	+	M kansasii	+	+	-	+
Glaxo	-	-	-	+	M malmoense	-	-	-	+
Montréal	-	-	-	+	M marinum	+	+	-	+
Pasteur	-	-	-	+	M oenavense	-	-	-	+
					M scrofulaceum	-	-	-	+
					M smegmatis	-	-	-	+
					M szulgai	+	+	-	+
					M terrae	-	-	-	+
					M vaccae	-	-	-	+
					M xenopi	-	-	-	+

T-SPOT.TB® (Oxfordimmunotech)

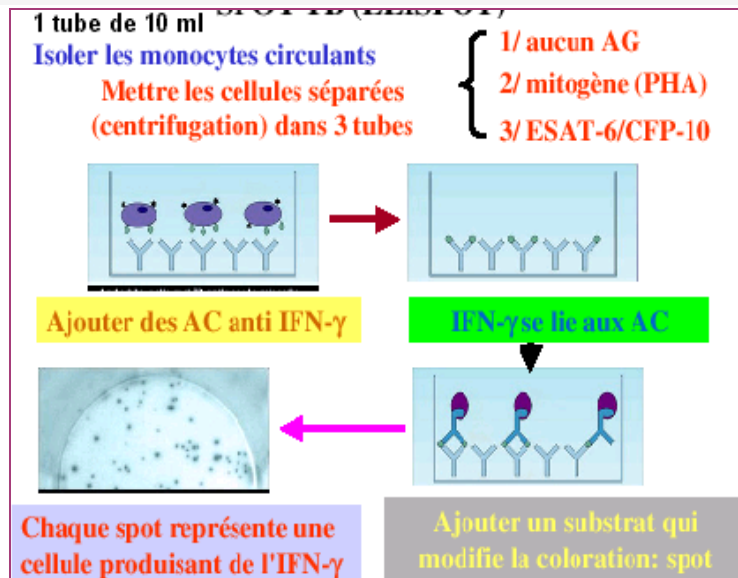
QUANTIFERON -TB Gold IT (QIAGEN)

Etape commune : Temps d'incubation 16-24 heures

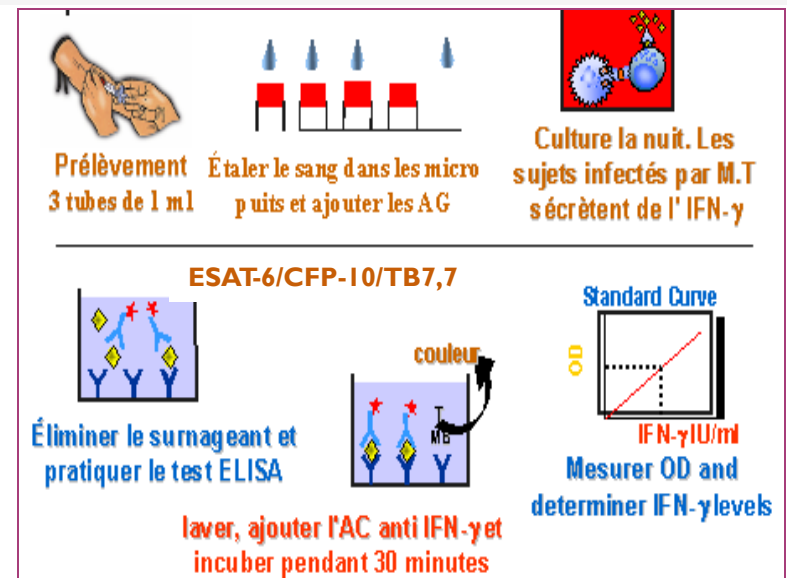
Seules les LT effectrices activées par un contact récent vont sécréter $\text{IFN-}\gamma$

Temps + long : Libération d' $\text{IFN-}\gamma$ par les cellules T mémoires (ancienne tuberculose maladie ou latente ?) - (TCT : stimulation de 72 heures)

3 Tubes : témoin négatif, témoin positif (mitogène PHA), tube avec Ag

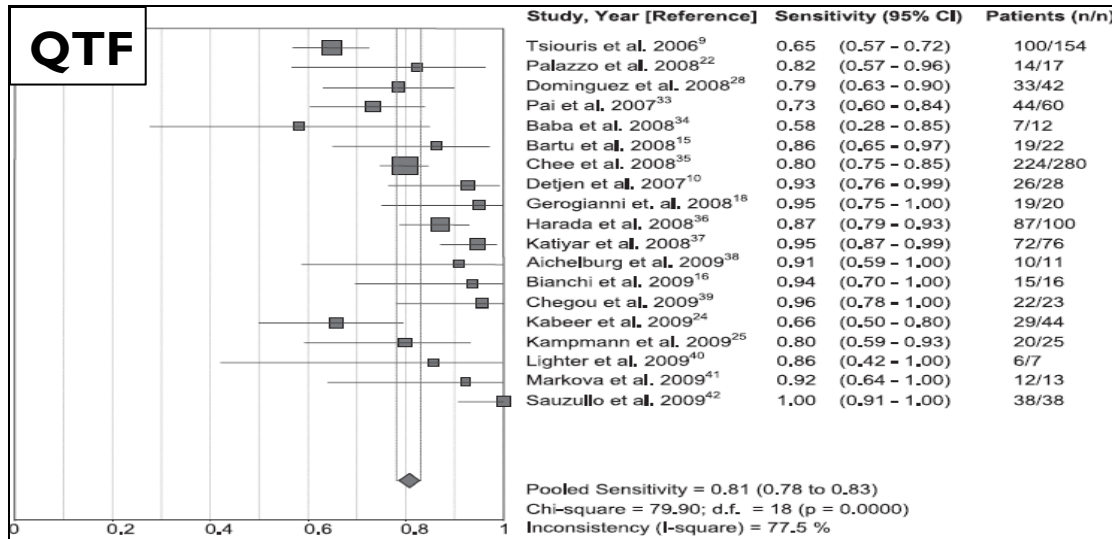


Nb de LT sécrétant l' $\text{IFN-}\gamma$ (SFC/ 10^6)
Seuil 6 SFC
Résultats qualitatif : + / - / ?



Dosage de l' $\text{IFN-}\gamma$ (UI/ml)
seuil 0,35 UI/ml
Résultats qualitatif : + / - / ?

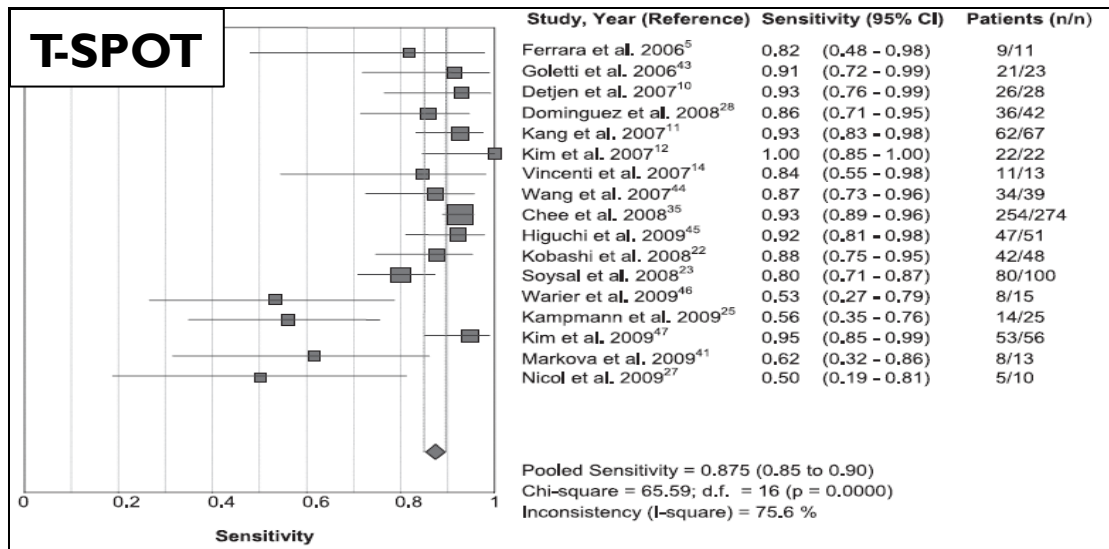
ITL : Sensibilité / Tb maladie (cultures positives)



19 études
Se : 81 % (58 à 100 %)

Pays développés : 13 études
 Se : 84 % (79 à 100 %)

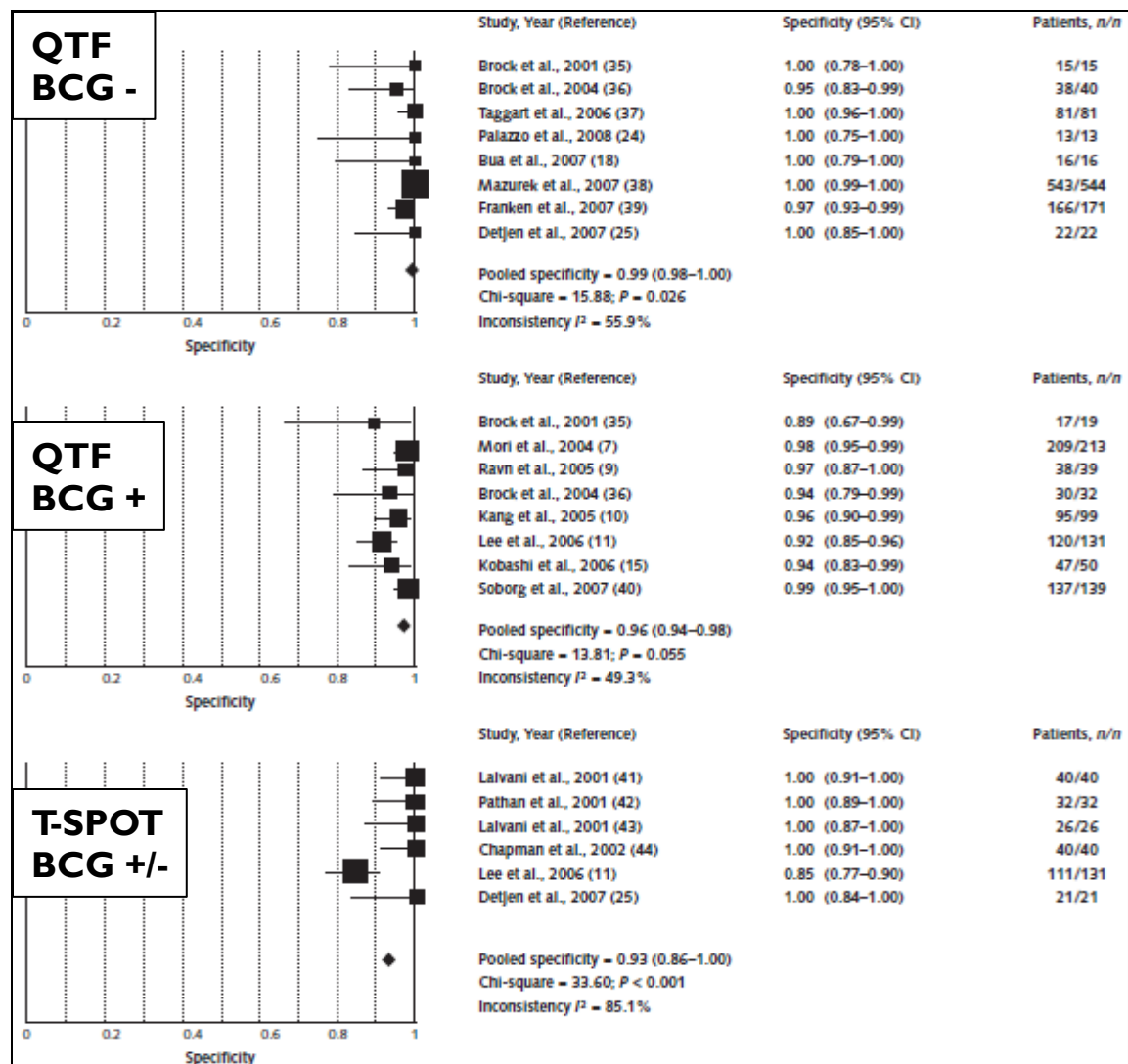
Pays EVD : 6 études
 Se : 74 % (58 à 96 %)



17 études
Se : 88 % (53 à 100 %)

TST **25 études : Se 70 % (25 à 90 %)**

ITL : Spécificité / population à faible risque



8 études
Sp : 99 % (95 à 100 %)

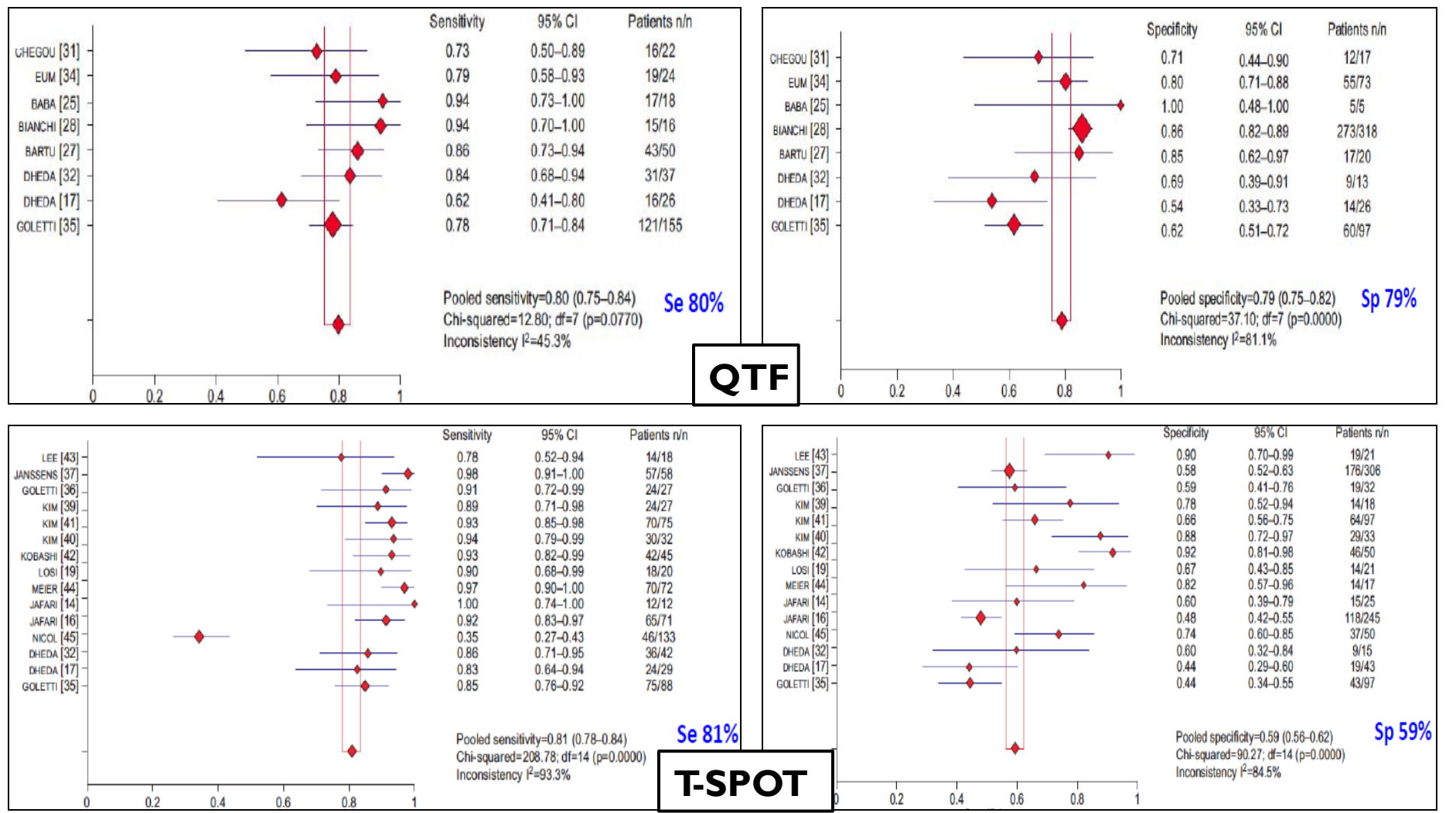
8 études
Sp : 96 % (89 à 99 %)

6 études
Sp : 93 % (85 à 100 %)

TST

6 études BCG - : Sp 97 % (93 à 100 %)
6 études BCG + : Sp 59 % (35 à 79 %)

Tuberculose maladie : 18 études, prélèvements sg



IDR : Se 65 %, Sp 75 %

Risque de progression vers une tuberculose maladie

Predictive Value of Interferon- γ Release Assays and Tuberculin Skin Testing for Progression From Latent TB Infection to Disease State. A Meta-analysis

Roland Diel , Robert Loddenkemper , Albert Nienhaus . CHEST 2012; 142(1):63–75

28 études

VPP et/ou VPN de progression

Tests IGRAs commercialisés : 23

Tests IGRAs « maisons » : 5

TST : 18

Zones d'endémie :

Elevée : 6

Intermédiaire : 12

Faible : 10

Durée de suivi : 12 à 46 mois

Populations :

Sujets contacts : 13

HIV : 5

Enfants/adolescents : 2

Demandeurs d'asile : 1

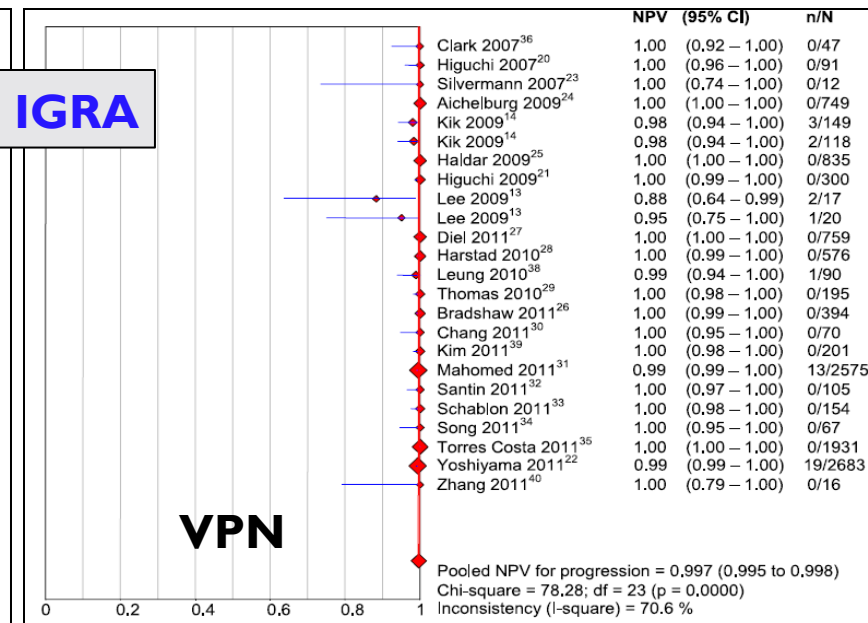
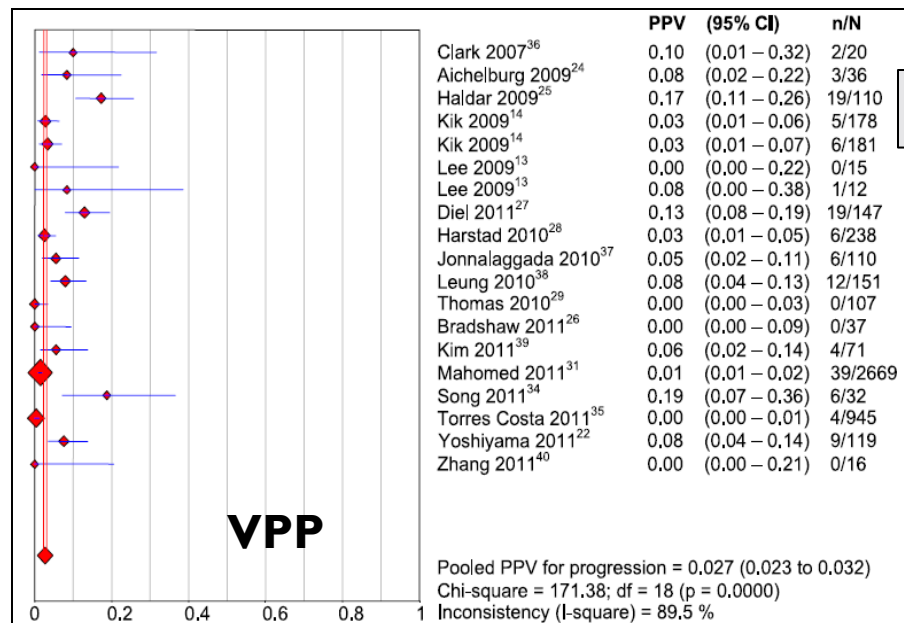
Silicose : 1

Insuf rénale/dialysés/transplantés rénaux : 3

Bilan pré anti-TNF : 1

Professions de santé : 2

VPP et VPN : IGRA commercialisés/TST (Diel, 2012)



19 études
5194 sujets inclus
141 tuberculoses
VPP : 2,7% (IC 95% 2,3-3,2)

P < 0,0001

16 études
8479 sujets inclus
124 tuberculoses
VPP : 1,5% (IC 95% 1,2-1,7)

TST

24 études
12154 sujets inclus
41 tuberculoses
VPN : 99,7% (IC 95% 99,5-99,8)

P < 0,01

17 études
8618 sujets inclus
52 tuberculoses
VPN : 99,4% (IC 95% 99,2-99,5)

Comparaison VPP IGRA/IDR chez les patients à haut risque

- **Contacts, HIV, demandeurs d'asile, dialysés, ...** (Diel, 2012)

IGRA

15 études
1436 IGRA +
98 tuberculoses
VPP : 6,8% (IC 95% 5,6-8,3)

$p < 0,0001$

TST

13 études
3391 IDR +
80 tuberculoses
VPP : 2,4% (IC 95% 1,9-2,9)

- **Sujets contacts, (E Bergot, Journées actualités IGRA, 20/03/2014)**

Auteur	Etudes, n	Test utilisé	Suivi (mois)	VPP	VPN
Higuchi et al, 2009	Japon	QFT-G	36	NA	0/300 100% (98-100)
Bradshaw et al, 2010	Irlande du Nord	QFT_GIT	36	0/37 0% (0-9,5)	0/394 100% (99,1-100)
Kik et al, 2010	Pays Bas	QFT-GIT	22	5/178 2,8% (0,9-6,4)	3/149 98% (94-100)
Kik et al, 2010	Pays Bas	T-SPOT	22	6/181 3,3% (1,2-7)	2/118 98,9% (94,2-99,6)
Yoshiyama et al, 2010	Japon	T-SPOT	21	9/119 7,6% (3,5-13,9)	19/2683 99,3% (98,9-99,6)
Diel et al, 2011	Allemagne	QFT-GIT	46	19/147 12,9% (8-19,4)	0/759 100% (99,6-100)
Bergot et al, 2012	France	QFT-GIT	20	1/51 1,96% (0-4,2)	1/526 99,8% (99,4-100)
Haldar et al, 2013	UK	QFT-GIT	717 j	14/112 12,5% (0-17,1)	6/601 99% (97,8-99,6)

VPP : 54/825
6,5 %

VPN : 31/5530
99,9 %

IGRA Indéterminés

- **2% à 20,3%** selon la population étudiée et le test utilisé
- Le plus souvent lié à la **production insuffisante d'interféron- γ dans le tube « mitogène »** (50,5 à 100%)
- **Facteurs associés**
 - Âge < 5ans, < 10 ans > 75 ans
 - Ethnies (non réponse du système immunitaire)
 - Carence en fer
 - Paludisme, infection helminthique
 - Taux de lymphocyte (CD4 < 100-200 mm³)
 - Immunodépression VIH, traitement Immunosupresseur

Variabilité des tests

➤ Intra-échantillons (Metcalf, Am J Respir Crit Care Med 2013)

TABLE 4. REPEATABILITY OF QFT-GIT TEST RESULTS STRATIFIED BY QUANTITATIVE TB RESPONSE

Baseline TB Response (IU/ml)	Total Subjects	Conversion, n (%) [*]	Reversion, n (%) [*]
All subjects	366	13/148 (9)	15/218 (7)
<0.25	106	1/106 (<1)	—
0.25–0.34	42	12/42 (27)	—
0.35–0.80	66	—	12/66 (18)
0.81–3	76	—	2/76 (3)
3.1–9.92	76	—	1/76 (1)

Mêmes échantillons, même laboratoire
9% de conversion, 7% de réversion

Variabilité du test

- Population totale : $\pm 0,6$ UI/ml
- Sujets entre 0,25 – 0,8 : $\pm 0,24$ UI/ml

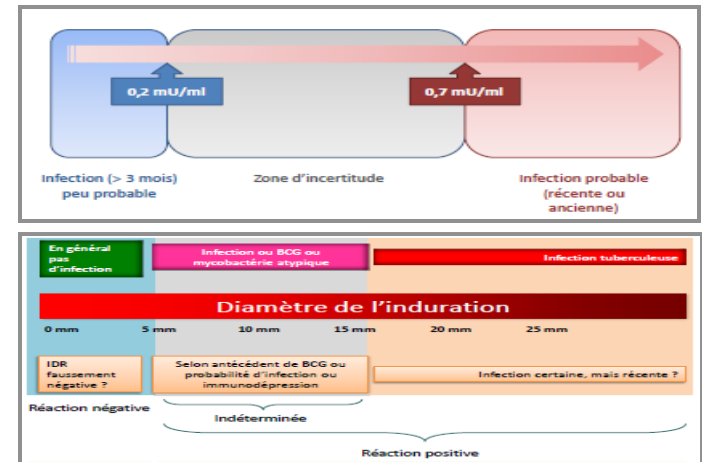
➤ Intra-sujets, dans le temps : 2 tests entre 1 à 12 mois

2 revues systématiques

- Taux de conversions : 1 à 14%
- Taux de reversions : 22 à 71 %

si résultat initial proche de la valeur seuil
(entre 0,2 et 0,7 UI/mL)

Swerling, 2012, Ringshausen, 2012



➤ Selon étapes pré-analytiques, inter laboratoires, boost

Whitworth 2014, Doberne 2011, Van Zyl Smit 2009

Effet booster de l'IDR ?

- 13 études
- Absence d'effet Boost : 6 études
 - IGRA fait entre 28 jours et 9 mois pour 4 études
 - 1 étude avec IGRA fait à 72 heures
- Effet Boost : 7 études
 - IGRA fait dans les 21 jours pour 5 études

Aucune influence si IGRA fait le jour de la lecture de l'IDR +++

Population particulière : Enfants (38 études)

Country		TST (34) (6439 efts)	QTF (31) (6183 efts)	T-SPOT.TB (14) (2518 efts)
High income (21)	Sensibilité	78 % (74-82)	79 % (75-82)	67 % (62-73)
	Spécificité	92 % (89-93)	97 % (96-98)	98 % (96-99)
Low income (17)	Sensibilité	67 % (64-70)	57 % (52-61)	61 % (57-65)
	Spécificité	90 % (87-92)	85 % (82-88)	93 % (87-96)
ID/HIV (11)	Sensibilité	54 % (49-59)	85 % (82-88)	93 % (87-96)
	Spécificité	97 % (92-99)	90 % (81-95)	Not evaluable

Sensibilité comparable TST/IGRA
Spécificité plus élevée dans les pays à haut revenu,
mais pas dans les pays à faible revenu
Intérêt chez les enfants infectés par le VIH

Méta-analyse Sollai, *BMC Infectious Diseases* 2014

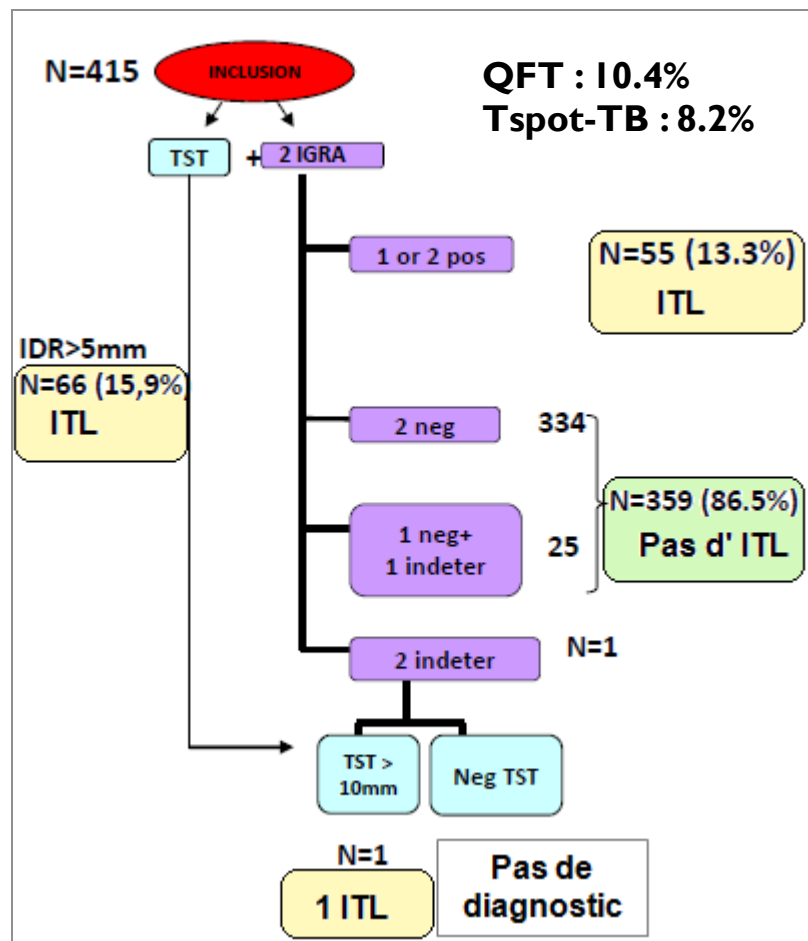
	Country	QTF	T-SPOT
Sensibilité	High burden	61 % (53-69)	65 % (54-74)
	Low/Int. burden	59 % (46-71)	69 % (47-99)
	Total	61 % (54-67)	65 % (56-74)
Spécificité	High burden	62 % (49-74)	73 % (54-85)
	Low/Int. burden	89 % (77-95)	61 % (44-81)
	Total	72 % (56-84)	70 % (55-82)
Indéterminés	High burden	12 %	7,7 %
	Low/Int. burden	6,4 %	3,5 %
	Total	8,2 %	5,9 %
CD4 < 200		11,6 %	11,4 %
CD4 ≥ 200		3,1 %	7,9 %
Incidence de TBM (3 études)	Test +	8,3 %	10 %
	Test -	0 %	0 %

6 études (suivi 19 à 36 mois): VPP 7,8 % (17/218) – VPN 99,3 % (8/1148)

Aichedelburg, Clark, jonnalagadda, Kim, santin, Zhang

Etude STIC IGRAVIH

Etude nationale prospective multicentrique les VIH naïfs – Suivi de 6 mois



	One positive IGRA N=55	2 IGRA negative or Indeterminate N=360	p (biv.)	p multiv
Origin from country of high TB burden, n(%)	39/55(70.9%)	174/359(48.5%)	0.0019	0.0041
CD4/mm3, n(%)				
<150	4/54 (7.4%)	22/354 (6.2%)	0.52	
150-350,	8/54 (14.8%)	82/354 (23.2%)		
350-500	14/54 (25.9%)	95/354 (26.8%)		
>500	28/54 (51.9%)	155/354(43.8%)		

Prévalence LTBI

IGRA+IDR: 13.5%

Suivi à 6 mois : 8 TBM

7/55 IGRA +
1/359 IGRA-

A suivre

Trt anti-TNF pour maladies inflammatoires chroniques

➤ **Revue de Lioté 2011**

- 15 ét. transversales (2000 pts mal. inflammatoires chroniques).
 - IGRA 2 fois plus souvent positifs que l'IDR.
 - Effet discordant sur le résultats des tests des trt IS
- 5 études longitudinales (1000 pts). Trt des IGRA +, suivi 1 à 2 ans
 - 3 TBM : 1 refus de trt, 1 trt, 1 non trt (test indéterminé et IDR -)
 - 0 TBM : Chez les 17 patients IDR + IGRA -, sans trt

➤ **Mariette 2012** : 429 patients dont 392 avec les 3 tests

- Positivité des tests
 - IDR >5mm : 35,2% (118)
 - 1 IGRA + : 16,8 % (66) (T-SPOT 15,2 % - QTF 9,9 %)
- Suivi à 1 an : pas de tuberculose
 - 52 patients IGRA + traités
 - 13 pts IGRA + non traités
 - 276 pts IGRA – non traités
 - 31 pts IGRA indéterminés non traités

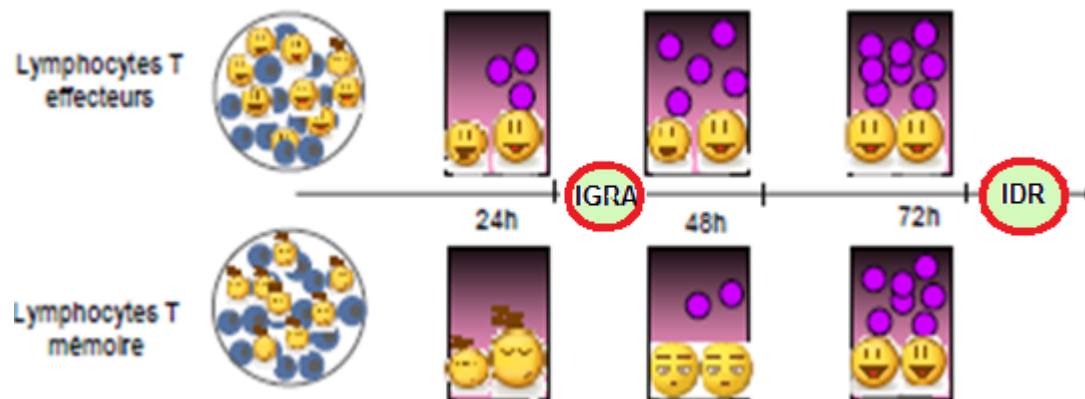
Concordance IGRA/IDR

Sujets contacts : 56 à 89 % selon le test utilisé et le seuil de l'IDR +/- vaccination BCG :

Plus élevé si le seuil IDR est de 15 mm

(Arend 2007, Diel 2011, Bergot 2011)

Mais IGRA et IDR n'explorent pas les mêmes choses



En résumé : signification d'un test IGRA

Positif	Négatif	Indéterminé
Sensibilisation préalable des LT effecteurs aux Ag spécifiques (ESAT-6, CFP-10, +/- TB 7.7)	Pas de sensibilisation préalable des LT effecteurs aux Ag spéc. (ESAT-6, CFP-10, +/- TB 7.7)	Production insuffisante d'IFN γ en présence de PHA : Contrôle positif inadéquat
Infection Tuberculeuse (ancienne ou récente ?) ou tuberculose maladie	Absence d'Infection Tuberculeuse	?
Faux positifs : – Infection à certaines MBA – Effet boost par IDR antérieure ?	Faux négatifs : – Ancienneté de l'infection (disparition de la réponse mémoire effectrice) – Non-réponse du système immunitaire aux Ag étudiés • Test trop précoce/ contagé • Modification des réponses mémoires spécifiques	Production d' IFN γ par cellules non stimulées in vitro : contrôle négatif inadéquat ?

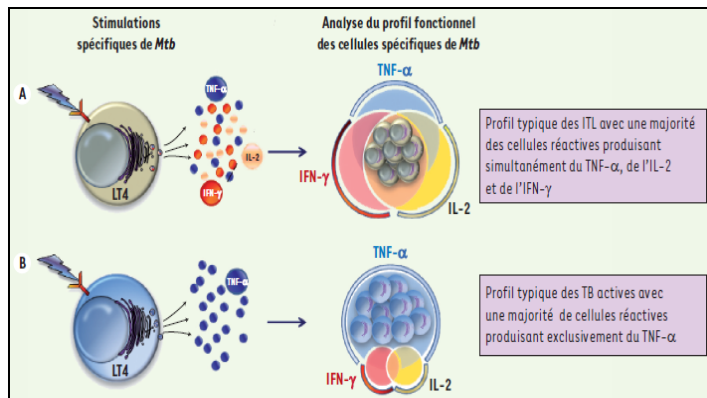
Perspectives (I) :Autres Ag ou cytokines pour différencier TBM et ITL

Antigènes	Cytokines	ITL	Tb M	Auteurs
HBHA	IFN γ	+	-	Hougardy 2007, Delogu 2011, Dessein 2013 ,Wyndhan 2014
Ag de latence				
Rv 2628	IFN γ	+ ITL ancienne - ITL récente	-	Goletti 2010
Rv 3407	IFN γ	+	-	Schuck 2009
Rv 2031	IFN γ	+	-	Demissie 2006
ESAT 6, CFP10, +/- TB 7,7	IP10 MCP-2 IL2	- - $\approx$	+ ou $\pm$ + ou $\pm$ $\approx$	Ruhwald 2008, 2011, Goletti 2011, Alsleben 2012,Wang 2012 ...
Epitopes RD1	IP10 MCP-2 IFN γ IL2	+ + - $\approx$	+ + + $\approx$	Goletti 2011
Ag multiples	Dosage multiple	Etudes discordantes		Frahin 2011, Chegou 2013
QTF ultra sensible	Disponible en France fin 2014 pour études cliniques			

Résultats pas toujours concordants, actuellement pas de validation

Perspectives (2) : Cytométrie de flux

Etude des profils fonctionnels des cellules T : signature immunologique différente selon ITL ou TBM



ITL : CD4 de type multifonctionnel (IFN, IL2, TNF α)

TBM : CD4 de type simple (TNF α)

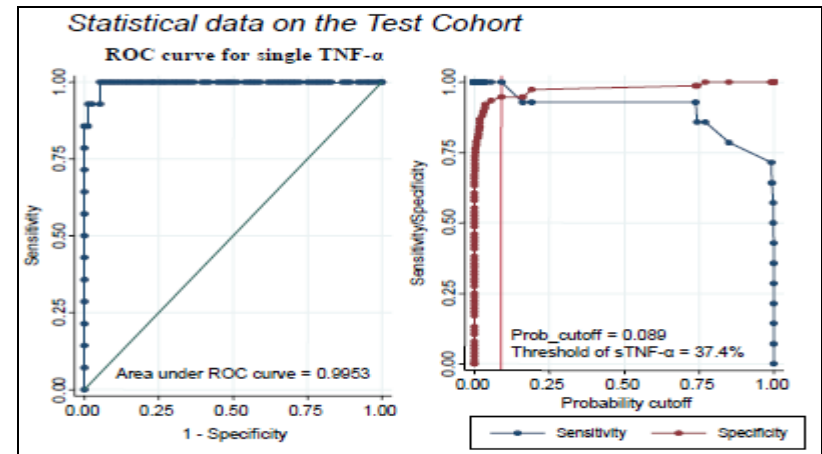
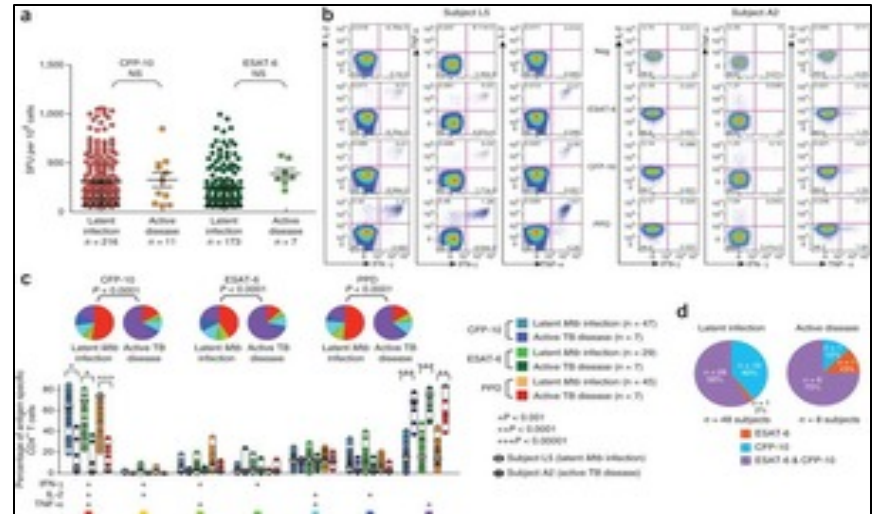
Sensibilité 66,7 % - Spécificité 92 %

CD4 + de type simple TNF α

Seuil de 34,7 %

> 34,7 % : prédiction d'une Tb active

< 34,7 % : prédiction d'une ITL



Indications proposées en France

Dépistage de l'ITL dans le but de la traiter

1 - Diagnostic de la tuberculose infection

- Enquête autour d'un cas
 - Sujet adulte
 - Enfant de plus de 5 ans
- Sujet VIH (indication préférentielle)
- Avant la mise sous anti-TNF (indication préférentielle)
- Personnel de santé à l'embauche si IDR ≥ 5 mm
- Enfants migrants de 5 à 15 ans

2 - Diagnostic de la tuberculose maladie

- Non recommandée chez l'adulte
- Aide possible chez l'enfant de moins de 5 ans

Toujours non remboursés

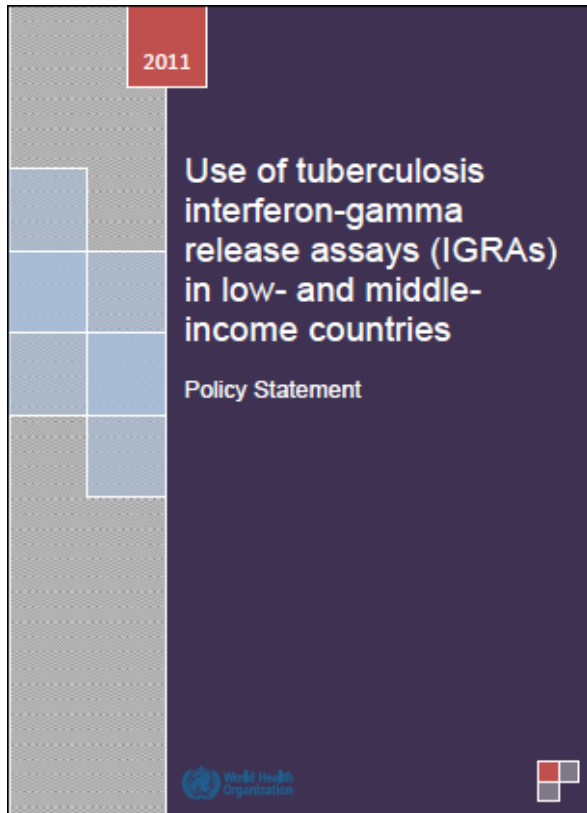
HCSP 2011

IGRA et coût/efficacité

Simulation enquête 100 cas contacts en France

	Stratégie QFT	Stratégie IDR
Nbre de tests positifs	21	53
Nbre de traitements	10	26
Nbre de radios	141	206
Coût tests	4 485 €	1 086 €
Coût traitement	3 237 €	8 280 €
Coût radio	2 967 €	4 318 €
Coût effets secondaires	4 €	5 €
Coût total	10 693 €	13 688 €
Coût par patient	107 €	137 €

Position de l'OMS

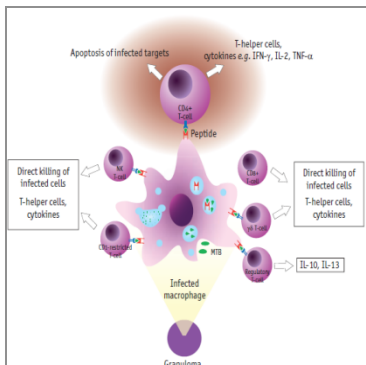
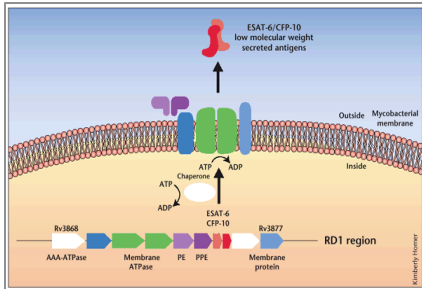


- “There is insufficient data and low quality evidence on the performance of IGRAs in low- and middle-income countries, typically those with a high TB and/or HIV burden
- IGRAs and the TST cannot accurately predict the risk of infected individuals developing active TB disease
- Neither IGRAs nor the TST should be used for the diagnosis of active TB disease
- IGRAs are more costly and technically complex to do than the TST.
- **Given comparable performance but increased cost, replacing the TST by IGRAs as a public health intervention in resource-constrained settings is not recommended”.**



Conclusion

- La tuberculose est une maladie vieille comme le monde dont on dispose d'un traitement curatif ...
- Développement de tests nouveaux par une meilleure connaissance du génome des MB et des réponses immunitaires
- **Performance IGRA > TST** mais
 - ✓ n'identifient pas
 - infection/maladie
 - infection récente/infection ancienne
 - les sujets à risque de progresser vers une tb active
 - ✓ réduisent le nombre de sujets relevant d'un trt préventif



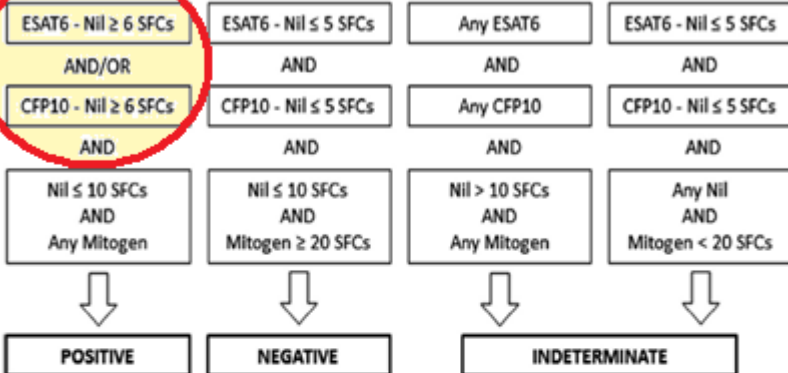
A suivre

TSPOT.TB

Interprétation des résultats

QTF

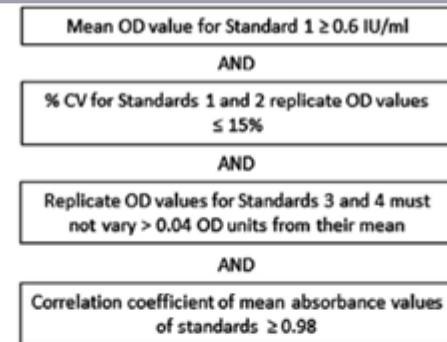
(a)



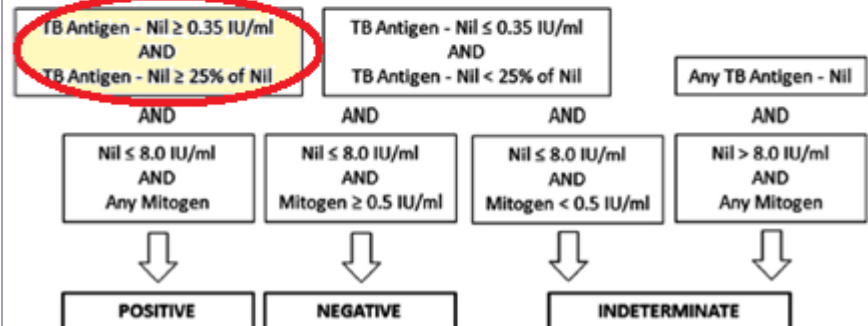
(b)



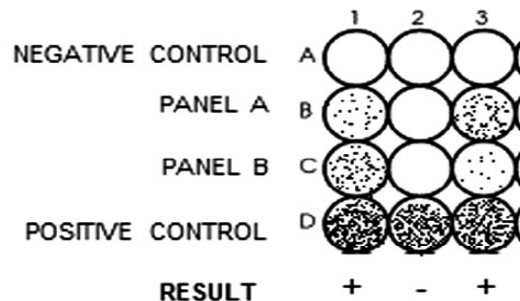
(a)



(b)

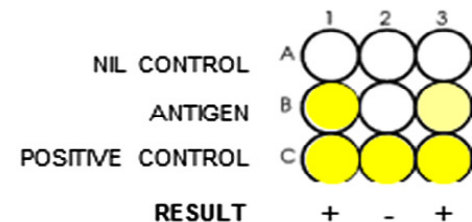


Result determination using ELISpot reader



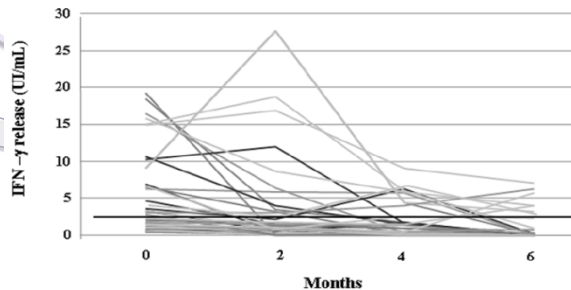
ELISA for quantification of plasma IFN γ levels

Result determination using ELISA reader



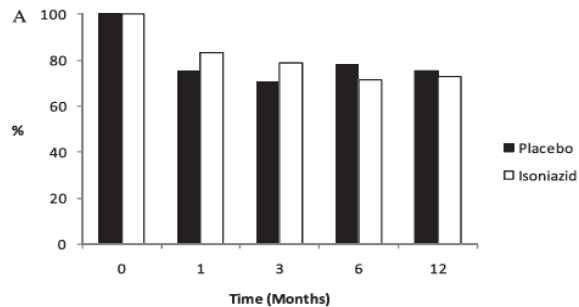
Effet des traitements

- Suivi de 38 patients sous trt anti-tb (*Sauzullo, PLoS ONE 2009*)



Diminution significative pendant le traitement (QTF)

- 1659 contacts : 189/211 avec une procédure complète INH ou placebo 6 mois (*Adetifa, Am J Respir Crit Care Med 2013*)



Diminution significative dans le temps chez les sujets traités mais absence de différence significative entre les deux bras (T-SPOT)

- Autres études : résultats disparates

Tuberculoses extra pulmonaires et échantillons extra-sanguins

Echantillons		Sensibilité	Spécificité
Sanguins 20 études	QTF (7 études)	72 %	82 %
	T-SPOT (13 études)	90 %	68 %
	TST (4 études)	59 %	71 %
Extra-sanguins 9 études (dont 3 LBA)	QTF (4 études)	48 %	82 %
	T-SPOT (7 études)	88 %	82 %

Méta-analyse de Fan, FEMS Immuno Med Microbio 2012
Méta-analyse de Sester, Eur Respir J 2011

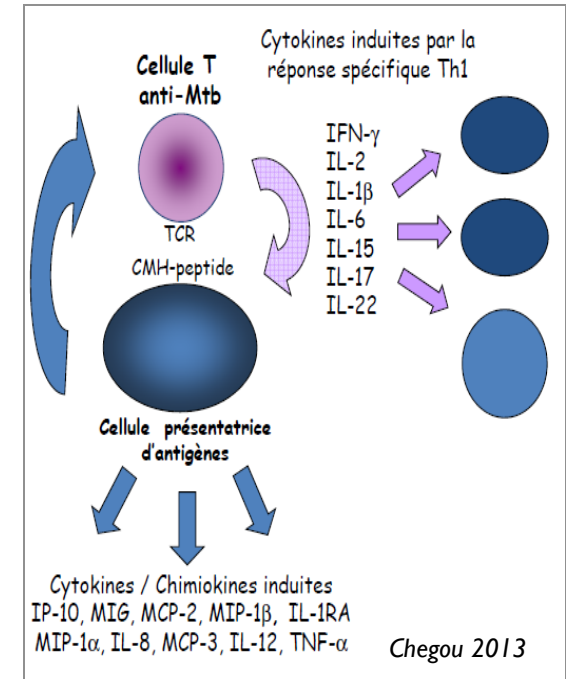
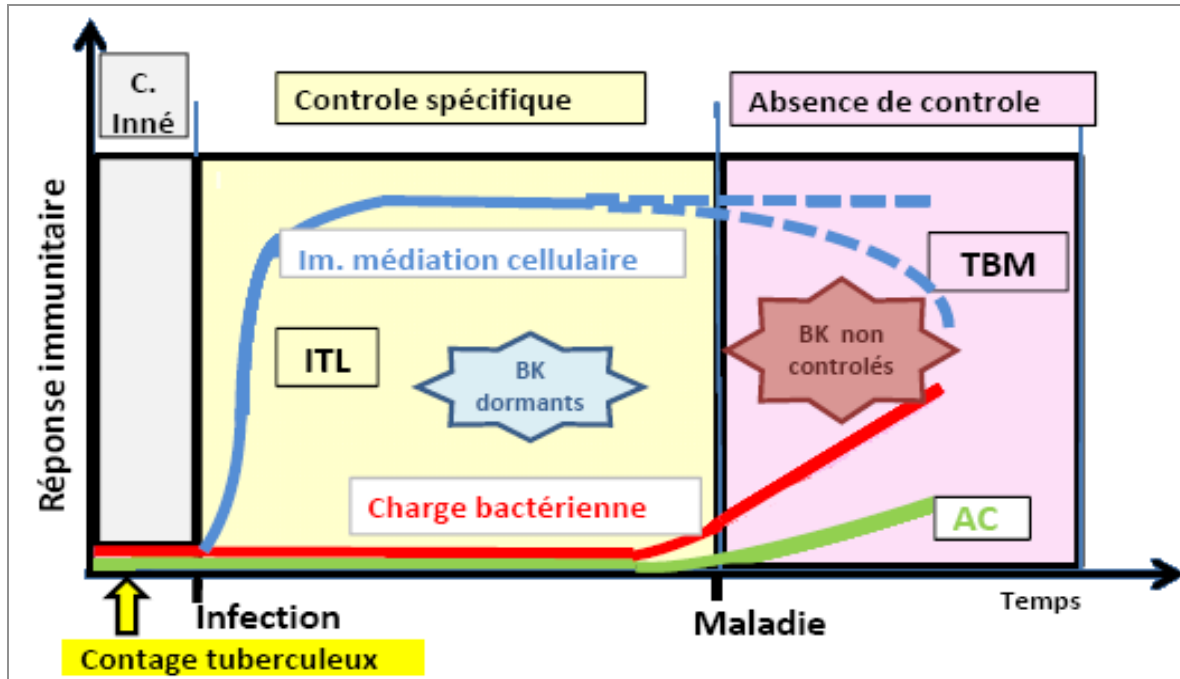
VPP & VPN des IGRA chez les sujets VIH

Auteur	Etudes, n	Test utilisé	Suivi (mois)	VPP	VPN
Aichelburg	Autriche	QFT-GIT	19	3/36 8,3% (1,8-22,5)	0/749 100% (99,6-100)
Clark	Angleterre	T-SPOT	24	2/20 10% (0,12-31,7)	0/47 100% (93,8-100)
Jonnalagadda	Kenya	T-SPOT	24	6/110 5,5% (2-11,5)	3/148 98% (94,2-99,6)
Kim	Corée du Sud	QFT-GIT	24	6/36 16,6%	5/83 94%
Santin	Espagne	QFT-GIT	20	NA	0/105 100% (98-100)
Zhang	Chine	TSPOT	36	0/16 0% (0-17,1)	0/16 100% (82,9-100)

17/218
7,8 %

8/1148
99,3 %

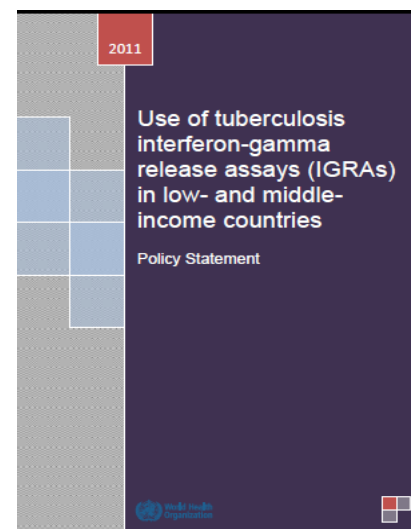
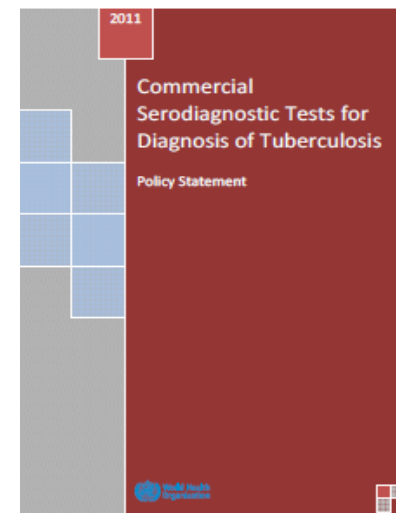
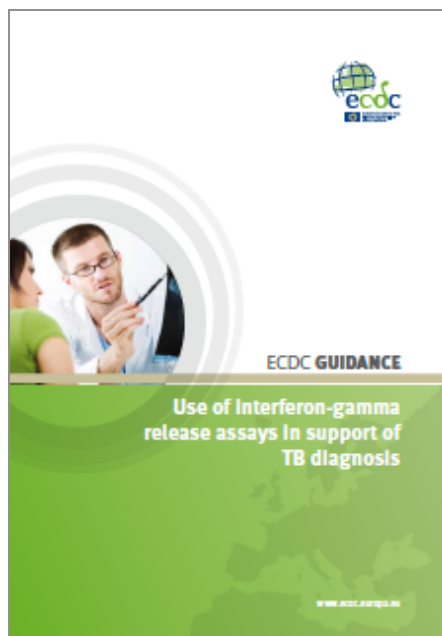
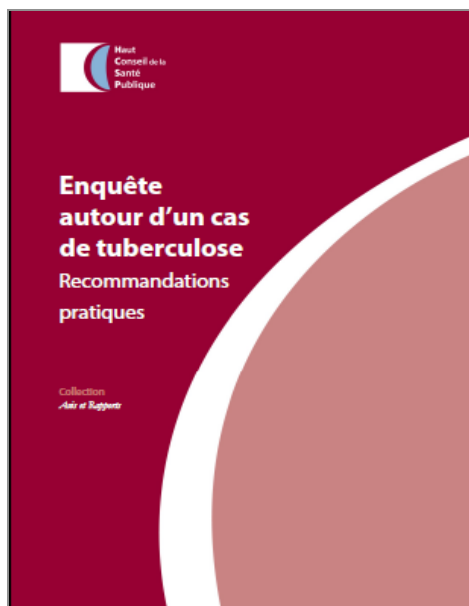
Perspectives : autres tests in vitro pour différencier ITL et TB active



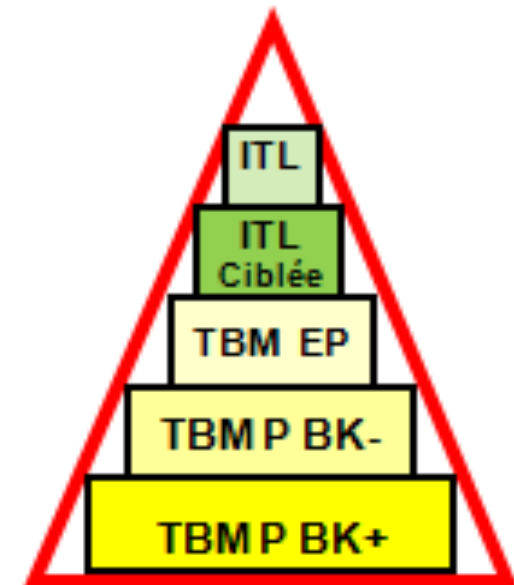
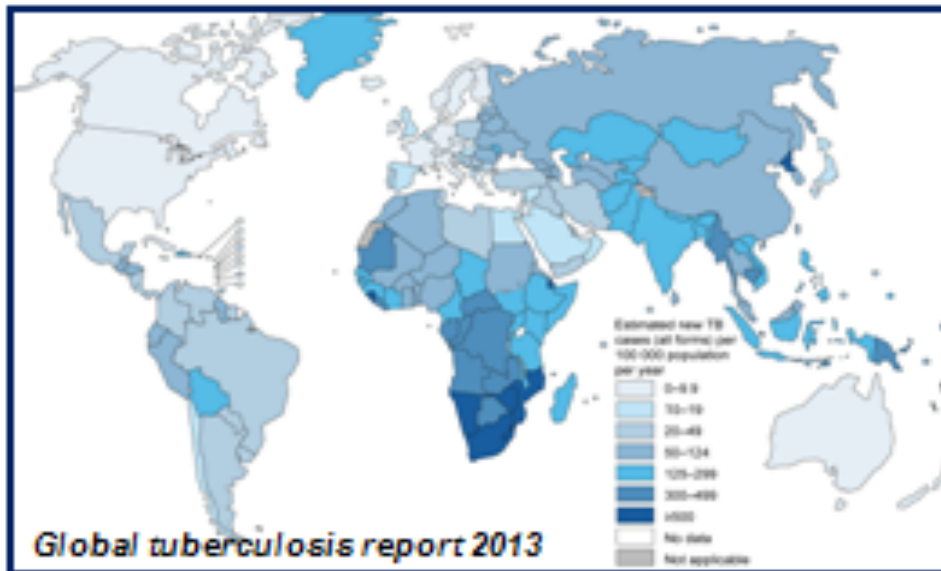
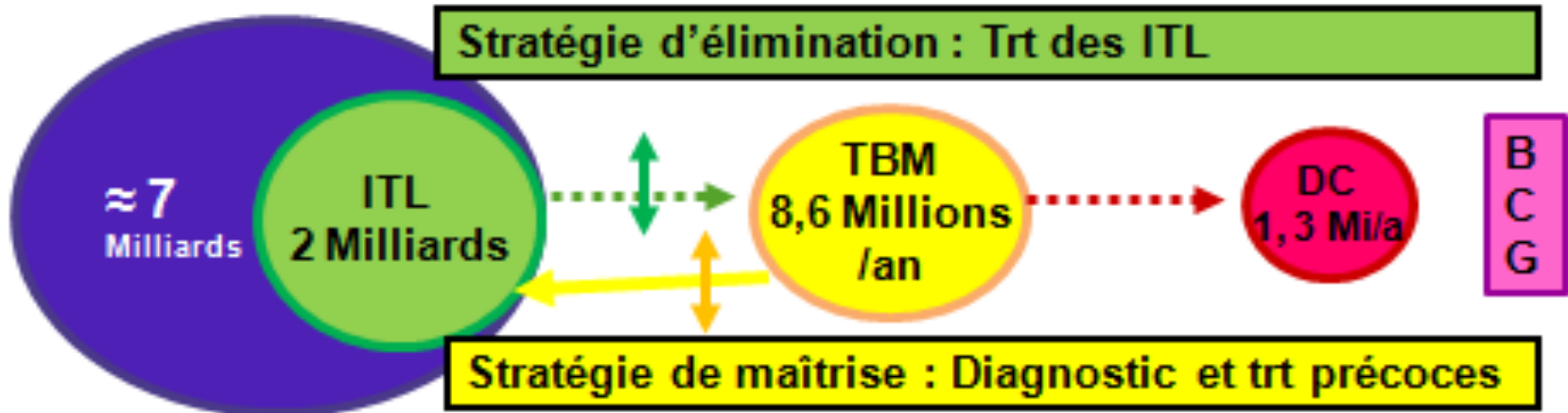
Basés sur les différences des réponses immunologiques en fonction de l'expression clinique de la tuberculose (latente ou active)

- différentes populations lymphocytaires, cytokines
- métabolisme particulier des BK dormants

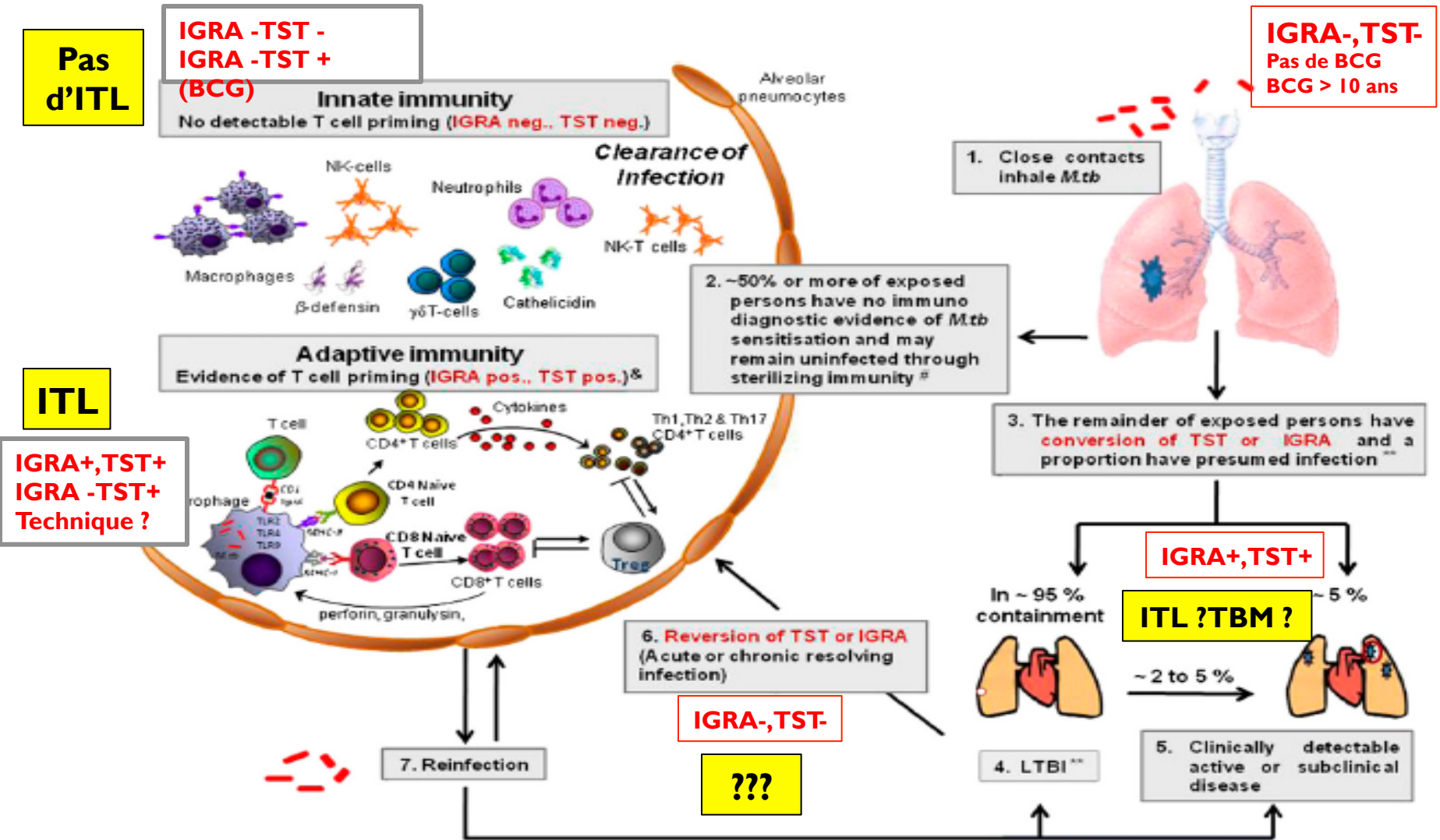
Biblio



Pourquoi des tests in vitro ?



Immuno-patho-diagnostic de la tuberculose



S. Schwander, *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183, 696–707
A. Lalvani, *Breathe*, 2009, 5, 302-309