

TESTS IMMUNOLOGIQUES: Expression et interprétation des résultats

Catherine Farnarier
Laboratoire d'Immunologie
Hôpital de la Conception
CHU Marseille

La tuberculose est la première cause mondiale de mortalité infectieuse.

3 millions de décès par an

1/3 de la planète est infecté
dans 90% des cas infection latente qui
évoluera dans 10% des cas en
tuberculose active

En France depuis 1997 10/100 000/an

“”

Recherche de l'infection tuberculeuse latente

Intérrogatoire
Image radiologique
l'IDR à la Tuberculine

Les limites de l'DR

Faible spécificité

- Réaction croisée avec le BCG
- Mycobactéries non tuberculeuses (NTM)

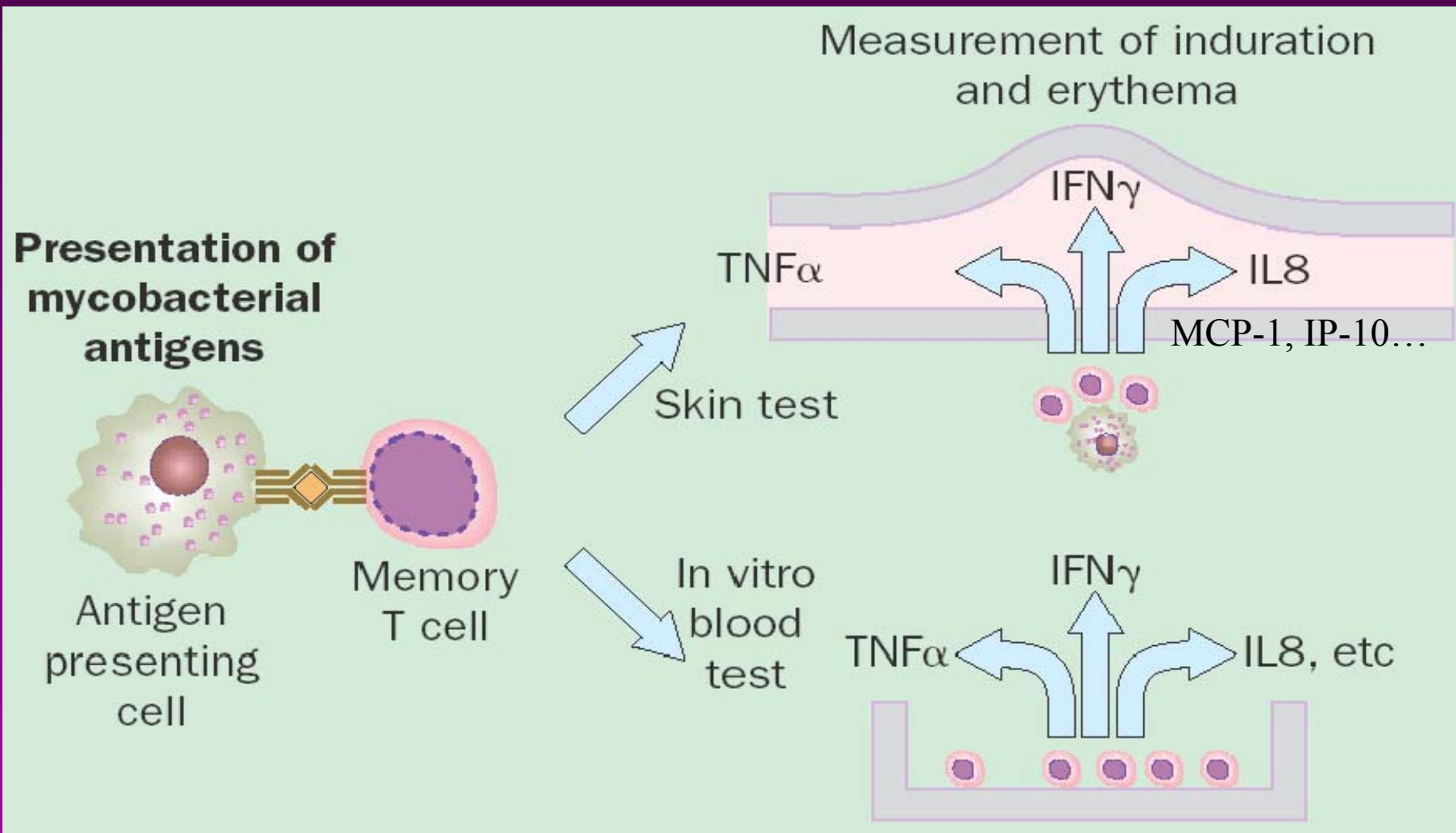
Sensibilité moyenne

Effet “Booster”

Réalisation pratique

- Injection
- Nécessité de 2 visites
- Subjectivité

La réaction immunitaire



Sélection d'antigènes spécifiques

Antigènes
spécifiques de *M.*
tuberculosis



Codage par les
gènes de la région
RD-1



Specificité d' ESAT-6 (early secreted antigen target 6) et de CFP-10 (culture filtrate protein 10)

Complex Tuberculosis	Antigènes		Mycobactéries non -TB	Antigènes	
	ESAT	CFP		ESAT	CFP
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	-	-
montreal	-	-	M marinum	+	+
pasteur	-	-	M oenavense	-	-
			M scrofulaceum	-	-
			M smegmatis	-	-
			M szulgai	+	+
			M terrae	-	-
			M vaccae	-	-
			M xenopi	-	-

Antigènes spécifiques de la TB: ESAT-6, CFP-10 et TB 7.7

- Induisent la sécrétion d' IFN- γ
- Identifiés par immunologie, biologie moléculaire

ESAT-6 & CFP-10

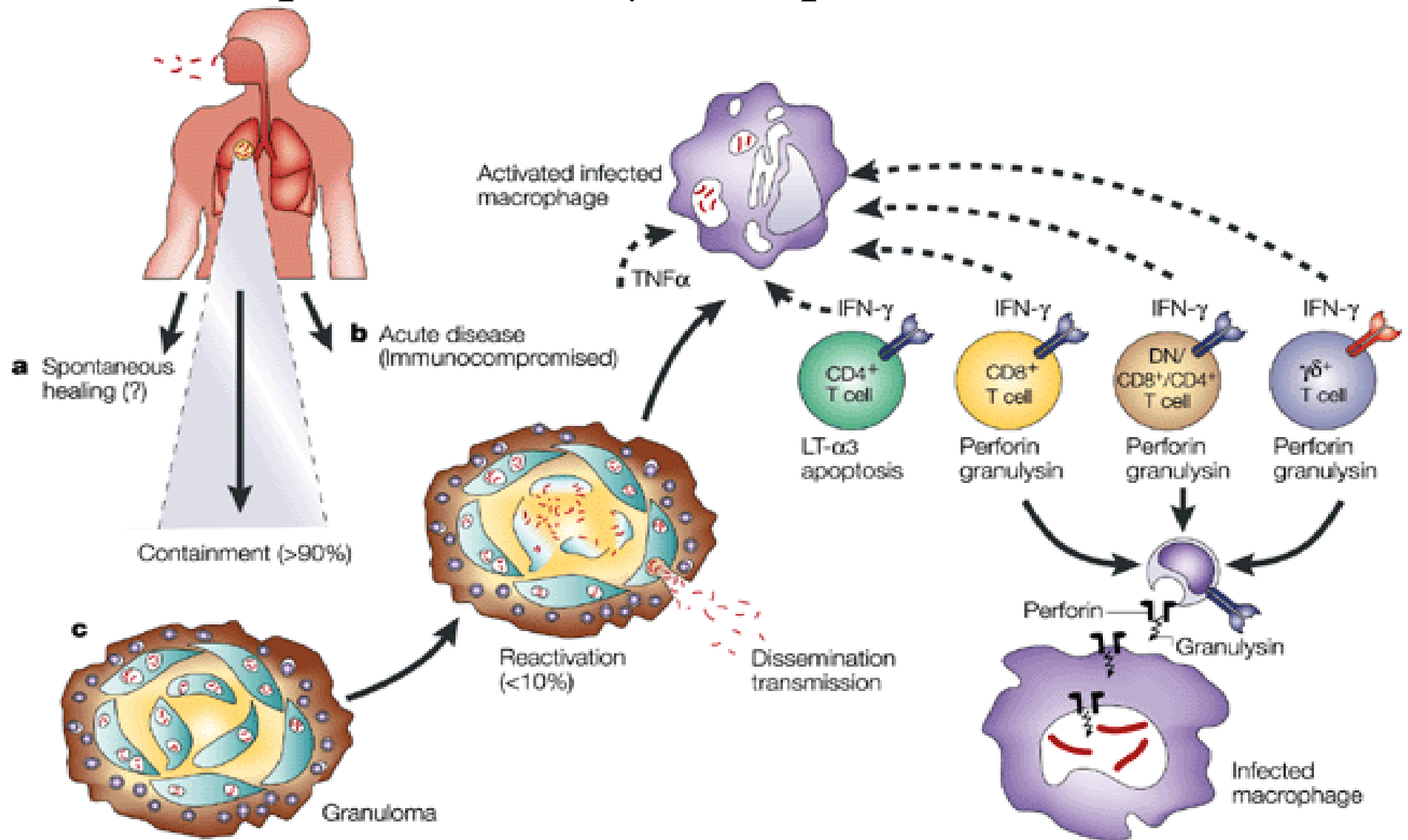
- ESAT-6: 7 overlapping peptide sequences

MTEQQMNFAGIEAAASAIQG
GIEAAASAIQGNVTS
SAIQGNVTSIHSLDEGKQSLTKLA
EGKQSLTKLAAAWGSGSEAYQG.VQ
SGSEAYQG.VQKWDATATELNNALQ
TATELNNALQNLARTISEAGQAMAS
NLARTISEAGQAMASTEENVTGMFA

- CFP-10: 6 overlapping peptide sequences

MAEMKTDAAATLAQEAGNFERISGDL
GNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQ
DQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAV
AAGTAAQAAVRFQEAANKQKQELD
AANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSR
IRQAGVQYSRADEEQ.QALSSQM.GF

T Cells produce IFN- γ in response to TB infection



Mesure de l'IFN- γ

- Littérature démontrant le rôle important de l'IFN- γ dans l'infection tuberculeuse
- La production d'IFN- γ témoigne de la réponse cellulaire médiée en particulier par les lymphocytes T lorsqu'ils sont stimulés par des antigènes
- Sécrété, mesurable et stable
- Dans la plupart des cas, absent de la circulation

IGRAs TESTS commerciaux

T SPOT-TB

(Oxford Immunotec)

HOW TO USE T-SPOT.TB

Using **T-SPOT.TB** couldn't be simpler. Follow these six easy steps:

<p>Step 1</p>	<p>Collect the blood sample in a Cell Preparation Tube and centrifuge to separate Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)</p>																					
<p>Step 2</p>	<p>Wash and count the PBMCs using a microscope and counting chamber or simply run them on a hematology analyser</p>																					
<p>Step 3</p>	<p>Add PBMCs to wells with antigens and incubate overnight (37°C, CO₂)</p>																					
<p>Step 4</p>	<p>Wash and add secondary antibody</p>																					
<p>Step 5</p>	<p>Wash and add substrate</p>																					
<p>Step 6</p>	<p>Count spots One spot = one T cell</p>	<table border="0"> <tr> <td></td> <td>Reactive</td> <td></td> <td>Non Reactive</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Nil Control</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Panel A antigen</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Panel B antigen</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Positive Control</td> <td></td> </tr> </table>		Reactive		Non Reactive			Nil Control				Panel A antigen				Panel B antigen				Positive Control	
	Reactive		Non Reactive																			
		Nil Control																				
		Panel A antigen																				
		Panel B antigen																				
		Positive Control																				

-PanelA:ESAT-6

-PanelB:CFP-10

Expression des résultats

Validation du test

Control négatif < 10spots

Control positif > 20spots

Réponse spécifique positive

Δ (Antigène - négatif) > 6spots

au moins égale à 2 fois le témoin négatif

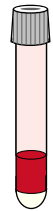
Réponse indéterminée

Contrôle négatif > 10spots

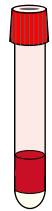
Contrôle positif < 20spots

QuantiFERON®-TB Gold IT

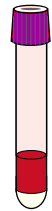
Etape 1: incubation sur sang total hépariné



Nil
Control

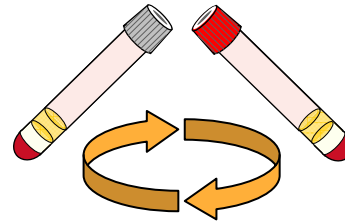


ESAT-6
CFP-10



Mitogen
Control

1. 1mL de sang (X3) et incubation à 37°C pdt 16-24 h.

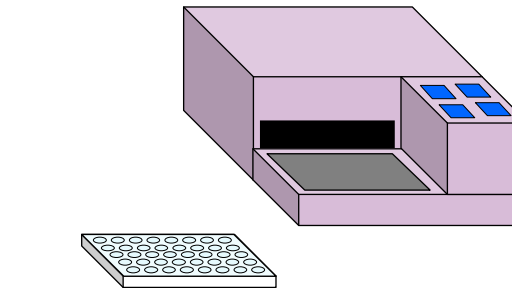
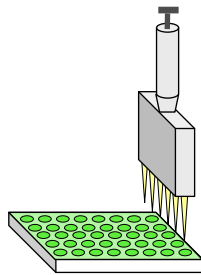


2. Centrifugation pdt 15 minutes.

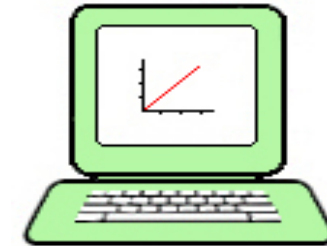
IFN- γ stable à 4° pdt au moins 8 semaines.

Etape 2: Dosage ELISA de l'IFN- γ

3. Plasma +conjugué. Incubation 2H à température ambiante.



4. Lavage puis addition du substrat. Lecture des DO après 30mn.



5. Calcul et impression des résultats

L'étape ELISA est facilement automatisable sur les appareils existants au laboratoire.





QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Run Date: mercredi 6 février 2008
Operator: ml
Run Number: 9
Kit Batch Number: 0594-50241

Std	Conc	% CV	QC Result
S1	4,00	1,1	PASS
S2	1,00	0,2	PASS
S3	0,25	N/A	PASS
S4	0,00	N/A	PASS

Intercept: -1,2031 Slope: 0,8823 Correlation Coefficient: 1,00 (PASS)

Raw Data (OD)

	1	2	3	4	5	6
A	<u>1,047</u>	0,017	3,000	0,064	0,104	3,000
B	<u>0,290</u>	0,016	0,030	0,336	0,102	0,025
C	<u>0,066</u>	0,016	2,439	0,019	1,881	0,036
D	<u>0,019</u>	0,018	1,246	0,127	0,017	2,292
E	<u>1,031</u>	0,019	0,068	3,000	0,861	N/S
F	<u>0,209</u>	2,615	0,114	0,499	0,753	N/S
G	<u>0,094</u>	0,118	3,000	1,528	0,023	N/S
H	<u>0,030</u>	0,469	0,023	1,910	0,020	N/S

Résultats du test

Tube négatif	seuil < 8 UI/ml
Tube positif	différence entre positif et négatif $> 0,5$ UI/ml
Tube Ag TB	différence entre TB et négatif $< \underline{0,35}$ UI/ml

Test négatif

Tube négatif	seuil < 8 UI/ml
Tube positif	différence entre positif et négatif $> 0,5$ UI/ml
Tube Ag TB	différence entre TB et négatif $> 0,35$ UI/ml

Infection probable à Mycobactérie du complexe tuberculosis

Tests indéterminés

-Tube négatif

seuil >8 UI/ml

-Tube positif

différence entre positif et négatif $< 0,5$ UI/ml

Tube Ag TB

différence entre TB et négatif $< 0,35$ UI/ml



QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Results

Run Date: mercredi 6 février 2008
Operator: ml
Run Number: 9
Kit Batch Number: 0594-50241

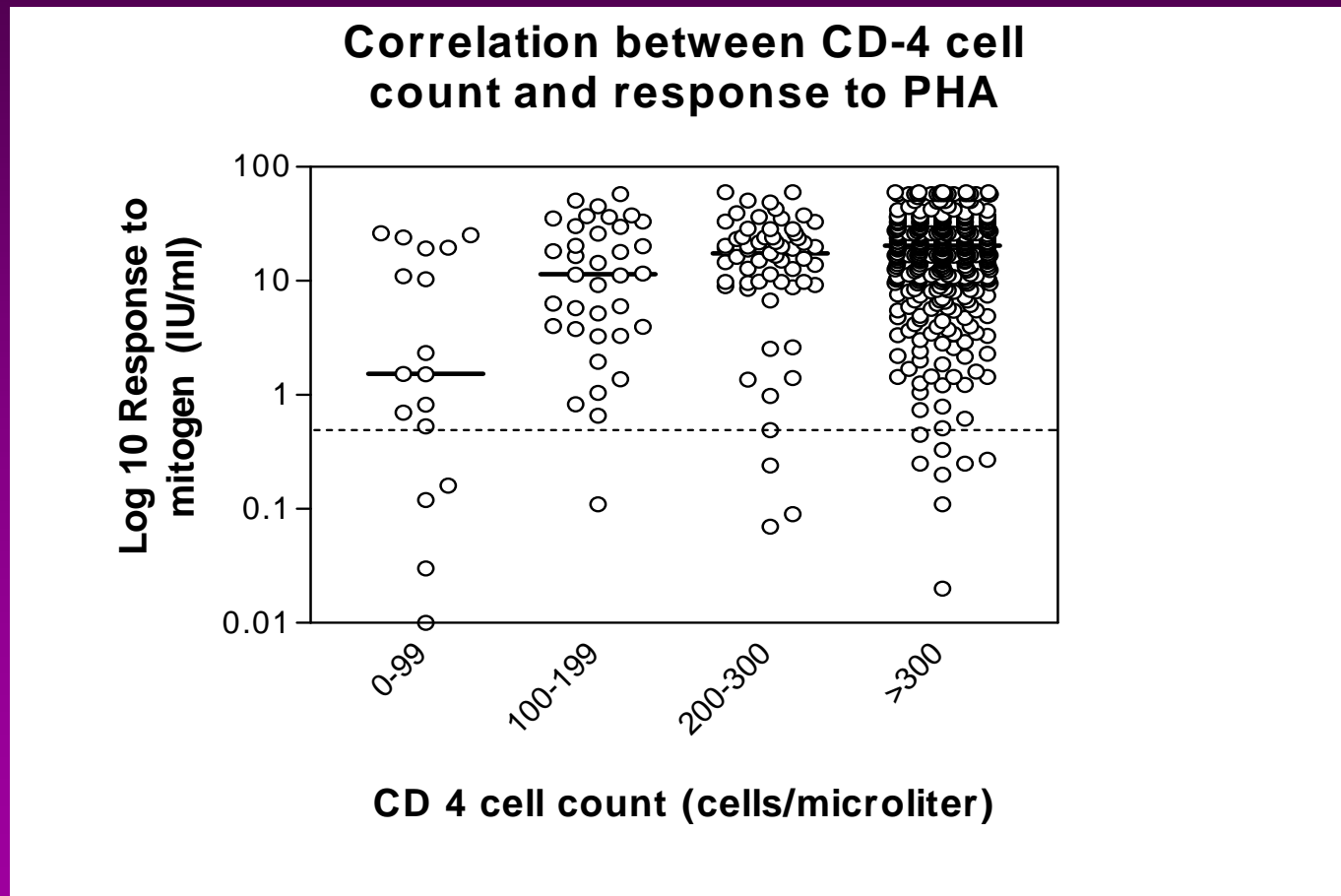
Valid ELISA test run.

Results						
Subject ID	NI	TB Ag	Mitogen	TB Ag- NI	Mitogen- NI	Result
ID 1	0,04	0,04	0,04	0,00	0,00	INDETERMINATE
ID 2	0,04	0,04	11,62	0,00	11,58	NEGATIVE
ID 3	0,35	1,66	13,56	1,31	13,23	POSITIVE
ID 4	0,07	10,74	5,02	10,67	4,95	POSITIVE
ID 5	0,23	0,33	13,58	0,10	13,35	NEGATIVE
ID 6	0,05	0,17	1,14	0,12	1,09	NEGATIVE
ID 7	0,04	0,36	13,58	0,34	13,54	NEGATIVE
ID 8	1,78	6,32	8,14	4,54	6,36	POSITIVE
ID 9	0,30	0,29	8,00	-0,01	7,70	NEGATIVE
ID 10	0,04	3,30	2,64	3,26	2,60	POSITIVE
ID 11	0,06	0,05	13,56	-0,01	13,52	NEGATIVE
ID 12	0,06	0,09	10,01	0,03	9,95	NEGATIVE

Tube mitogène et résultats indéterminés

- Contrôle Mitogène: concentration faible
 - *Indication de la compétence immunitaire du patient.*
 - *Validation de la conservation des prélèvements avant incubation et de la manipulation.*
- Résultat indéterminé: (i-e pas de réponse sur tube Mitogène):
 - *Riche d'enseignement – ce n'est pas seulement un contrôle positif.*

IFN- γ tube mitogène vs taux de CD4



Notre expérience sur 6 mois

162 tests ont été réalisés: 156 patients

- 110 négatifs (70,5%) 2 patients ont été contrôlés
- 35 positifs (22,4%) 2 patients ont été contrôlés
- 11 indéterminés (7%) 1 patiente revue 3 fois

CONCLUSION (1)

Mise en œuvre des 2 tests

T SPOT -TB

réservé à des laboratoires faisant de la culture cellulaire,

nécessité de la prise en charge tout de suite de l'analyse du début jusqu'à la fin de la révélation

QFT gold IT

réalisation pratique possibilité d'accumuler les échantillons

ne nécessitant pas de matériel dédié

CONCLUSION (2)

Comparaison IDR et tests IGRA

		Spécificité (95% IC)		Sensibilité (95% IC)	
IDR	totalité	0,66	TB active	0,71	Pédiat.0,55 Adult.0,73
	non vac.	0,98			
	vac.	0,56			
QFT-TB Gold	totalité	0,97	TB active	0,76	Pédiat.0,66 Adult.0,76
	non vac.	1			
	vac.	0,96			
T-Spot.TB	totalité	0,92	TB active	0,88	Pédiat.0,62 Adult.0,92

Predictive value of a whole blood IFN-g assay for development of active TB disease (R. Diel et al 2008)

- 601 personnes exposées à des sujets ayant une TB active suivi 2ans

IDR + > à 5mm : 243/601 (40,4%)

QFT + : 66/601 (11%)

- Sujets ayant refusé le TRT et développant une TB active

QFT+ (41/66) 6 sujets (14,6%)

IDR+ (219/ 243) 5 sujets (2,5%)

IDR- 1 sujet

Les attentes

Une évaluation multicentrique des 2 tests commercialisés à l'heure actuelle: sensibilité, spécificité

- dans l'infection tuberculeuse latente
- dans le suivi de l'efficacité du traitement anti-tuberculeux

Une évaluation de ces tests en pédiatrie

Résultat du QFT-Gold chez patients sous traitement immunosuppresseur

- 142 patients sous divers traitements incluant anti-TNF- α , corticoïdes...
- 8/142 (6%) avec un résultat indéterminé en QFT
- Réactivité vis à vis du Mitogène chez patients sous différents traitements:
 - Faible réponse d' IFN- γ sous traitement anti TNF(Infliximab)
 - D'autres traitements n'ont pas ou peu d'effet
 - BCG uniquement associé avec IDR positive

Matulis et al. American College of Rheumatology, San Diego, CA. November 2005



Comparaison entre IDR et QFT-TB Gold dans les maladies rhumatismales

B. Soborg et al, ACR 2007

Cohorte 198 patients sous DMARD et /ou anti-TNF
étude sur 2 ans

IDR	QFT	Patients	Radiol.
neg	neg	133 (67%)	5+
pos	neg	37 (19%)	
neg	pos	9 (5%)	
pos	pos	10 (5%)	1+
pos	ind	1	
neg	ind	8	