



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

www.em-consulte.com



SÉRIE « TUBERCULOSES ET MYCOBACTÉRIOSES »
coordonnée par François Xavier Blanc, Jean-Paul Janssens et Michel Underner

Nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose

New tests for the diagnosis of tuberculosis

B. Ninet^a, P. Roux-Lombard^b, J. Schrenzel^{a,c},
J.-P. Janssens^{d,*}

^a Laboratoire de bactériologie, service de médecine de laboratoire, hôpital cantonal universitaire, 4, rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Genève 4, Suisse

^b Laboratoire d'immunologie et d'allergologie clinique, service d'immunologie et d'allergologie et service de médecine de laboratoire, hôpital cantonal universitaire, 4, rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Genève 4, Suisse

^c Service des maladies infectieuses, hôpital cantonal universitaire, 4, rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Genève 4, Suisse

^d Service de pneumologie, centre antituberculeux, hôpital cantonal universitaire, 4, rue Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Genève 4, Suisse

Reçu le 16 juillet 2010 ; accepté le 14 décembre 2010

Disponible sur Internet le 25 mai 2011

MOTS CLÉS

Gamma interféron ;
PCR ;
Tuberculose ;
Diagnostic ;
Infection
Tuberculeuse latente

Résumé Au cours des dernières années, les techniques de biologie moléculaire sont devenues de plus en plus sensibles et rapides pour l'identification des tuberculoses des voies respiratoires, qu'elles soient positives ou non à l'examen microscopique direct. Les techniques d'amplification génique permettent aussi la détection rapide des résistances aux antituberculeux de première et deuxième ligne. La sensibilité de ces techniques pour des prélèvements d'origine non respiratoire reste à déterminer. Le diagnostic de l'infection tuberculeuse latente a aussi gagné en sensibilité, spécificité, et valeur prédictive positive, grâce aux tests au γ -interféron, qui tendent à remplacer – sauf pour les jeunes enfants – le test tuberculinique. Ces tests ont toutefois des limites qu'il est important de connaître, en particulier pour ce qui est de la distinction entre tuberculose active et latente, et de l'exclusion du diagnostic de tuberculose.

© 2011 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Nuclear Amplification
Assays;

Summary Over the last decade, molecular biology techniques for identifying mycobacteria in pulmonary secretions have become more and more sensitive and rapid, even in smear negative samples. Nuclear amplification techniques also allow the rapid detection of resistance to first or second line anti-tuberculous drugs. The sensitivity of these techniques for non respiratory

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : Beatrice.Ninet@hcuge.ch (B. Ninet), Pascale.Roux-Lombard@hcuge.ch (P. Roux-Lombard), Jacques.Schrenzel@hcuge.ch (J. Schrenzel), Jean-Paul.Janssens@hcuge.ch (J.-P. Janssens).

Tuberculosis;
Gamma Interferon
Assays;
Diagnosis;
Latent tuberculosis
Infection

samples is yet to be determined. The diagnosis of latent tuberculous infection (LTBI) has also increased in sensitivity, specificity and positive predictive value through the use of interferon- γ release assays (IGRAs), which are tending to replace the tuberculin skin test, except for children aged under five. These tests, however, do have limitations which are important for the clinician; especially their inability to distinguish active from latent tuberculosis and their inability, in most circumstances, to exclude a diagnosis of active TB.

© 2011 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les techniques mises à disposition des cliniciens au cours des dix dernières années sont en train de modifier radicalement l'approche diagnostique tant de l'infection tuberculeuse latente (ITL) que de l'infection tuberculeuse active (TB). Citons notamment les progrès faits dans l'identification précoce des souches de mycobactéries par amplification génique (PCR), l'identification précoce des résistances aux tuberculostatiques de première ligne par PCR, ou encore la contribution au diagnostic de l'ITL des tests au γ -interféron (IGRA).

La publication il y a six mois à peine de Boehme et al. [1], et la mise sur le marché d'une technologie permettant, en moins de deux heures, à partir d'expectorations, d'obtenir par PCR à la fois la confirmation de la présence de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) et celle de la présence éventuelle d'une mutation sur le gène *rpoB* signant la résistance à la rifampicine, et donc une très probable tuberculose multi-résistante (MDR), représentent un bond gigantesque pour le diagnostic rapide des TB, et des MDR. Il restera bien entendu à montrer que ces technologies sont compatibles financièrement avec les moyens à disposition dans les pays en voie de développement. Les tests mesurant la production de γ -interféron en réponse à des antigènes spécifiques de MTB (IGRA) ont aussi considérablement changé la prise en charge des personnes suspectes d'ITL, apportant une spécificité accrue et une amélioration de la valeur prédictive positive quant au développement ultérieur d'une infection active, réduisant les faux positifs et permettant donc un traitement de l'ITL mieux ciblé.

Ce travail a pour but de passer en revue les acquisitions récentes et les perspectives dans le domaine de l'approche diagnostique de la TB et de l'ITL dans des pays industrialisés.

Les avancées de la microscopie

Le diagnostic de la TB repose en premier lieu sur l'examen microscopique de l'échantillon à analyser. La microscopie à la recherche de bacilles acido-alcoolés résistants (BAAR) après coloration fluorescente (auramine) ou non (Ziehl-Neelsen) n'est pas la technique la plus sensible mais elle reste très rapide, peu onéreuse et assez spécifique dans les régions de haute incidence. Depuis 2007, l'OMS recommande de réduire le nombre d'échantillons respiratoires à examiner (expectorations spontanées) de trois à deux pour le dépistage des cas de TB pulmonaire, pour autant qu'un système de contrôle de qualité externe performant soit mis en place dans le laboratoire. En 2009, l'OMS a même proposé que

les deux examens microscopiques soient effectués la même journée.

Les développements techniques les plus récents l'ont été au niveau des microscopes fluorescents et des lampes *light-emitting diode* (LED) qui peuvent remplacer les lampes traditionnelles à vapeur de mercure ou les lampes halogènes. Les systèmes fluorescents augmentent la sensibilité de la détection de BAAR par rapport à la coloration de Ziehl-Neelsen. Les lampes LED offrent par ailleurs l'avantage d'un faible coût par rapport aux autres systèmes fluorescents et d'une durée de vie de plus de 50 000 heures.

En 2009, des chercheurs de l'université de Berkeley en Californie, ont mis au point une lentille qui transforme l'appareil photo d'un téléphone mobile normal (avec une résolution d'au moins 3,2 Megapixels) en un microscope portable assez puissant pour être utilisé sur le terrain: le *CellScope*. Un système de filtres bloque la lumière de fond et convertit la source de lumière – une simple LED – en un faisceau lumineux d'une longueur d'onde de 460 nm nécessaire pour exciter le colorant vert fluorescent dans l'échantillon. Ensuite, il est possible de prendre des photos des images fluorescentes de MTB.

Les nouveaux microscopes (fluorescents et à LED) sont plus sensibles pour la détection de BAAR que les microscopes traditionnels, et ce, à un moindre coût au long cours.

Détection des mycobactéries en culture

La culture reste l'étalon-or pour le diagnostic de TB. Cependant, le faible taux de répllication des mycobactéries implique une incubation de plusieurs semaines. La visualisation de colonies clairement reconnaissables peut être remplacée par d'autres méthodes de détection telles que: détection microscopique de colonies «immatures», détection de produits bactériens liés à la répllication cellulaire, ou utilisation de bactériophages comme marqueurs de la viabilité cellulaire. Ce sont les systèmes de cultures liquides automatisés introduits depuis une dizaine d'années, qui sont actuellement les plus performants. Ces cultures liquides réduisent considérablement le temps de détection par rapport aux cultures sur milieu solide: trois à quatre semaines avec les milieux solides traditionnels à l'œuf contre dix à 14 jours pour les échantillons microscopiquement positifs [2]. Différents systèmes automatisés non radioactifs en milieu liquide ont remplacé le tradition-

nel BACTEC 460TB (respirométrie radiométrique ; Becton Dickinson, New Jersey, États-Unis). Parmi ceux-ci, on peut citer le BACT/Alert 3D automatisé (Biomérieux, Craonne, France) et la méthode Mycobacterial Growth Indicator Tube (MGIT : Becton Dickinson). Le MGIT est basé sur la présence dans le tube d'un sel de ruthénium qui émet une fluorescence visible en lumière violette lorsque la pression partielle en oxygène diminue dans le tube, signant la croissance des micro-organismes. Ces systèmes en milieu liquide ont une sensibilité d'environ 10 % supérieure aux milieux solides [3]. La technique la plus performante pour la culture des mycobactéries reste la combinaison des milieux liquides et solides car certaines souches ne poussent qu'en milieu liquide et d'autres en milieu solide. Un autre atout des cultures en milieu liquide est de permettre de tester plus rapidement la sensibilité aux antituberculeux de première ligne [4] et plus récemment à certains antituberculeux de seconde ligne [5].

La détection de la résistance aux antituberculeux basée sur l'observation microscopique de la croissance des mycobactéries du « complexe tuberculosis » sous forme de « cordes » (Microscopic Observation Drug Susceptibility [MODS]) en milieu liquide dans lequel a été rajouté de l'isoniazide ou de la rifampicine est une méthode sensible développée récemment pour des pays à faible ressource financière [6,7]. Les avantages de cette méthode sont sa rapidité et surtout son très faible coût.

La capacité des mycobactériophages d'infecter et de se répliquer dans MTB a aussi été exploitée ces cinq dernières années dans des tests diagnostiques. Le mycobactériophage B29 peut être utilisé pour infecter des bacilles de MTB dans une expectoration pendant un court temps d'incubation. Après la période d'infection, un virucide est ajouté tuant les phages non internalisés. Les cellules infectées sont placées sur un tapis de mycobactéries à croissance rapide (*M. smegmatis*) qui après infection, produisent des plages de lyse indiquant la présence indirecte de MTB. L'avantage de cette méthode – commercialisée par Biotec Laboratories (Orléans, France) sous le nom *FAST Plaque TB assay* – est sa rapidité (quelques jours d'analyse au lieu de quelques semaines) et surtout sa facilité d'implémentation dans les pays à forte endémie de tuberculose [8].

- Les systèmes de culture en milieu liquide réduisent les délais et sont plus sensibles que les cultures traditionnelles.
- Les cultures en milieu liquide permettent de tester plus rapidement la sensibilité aux antituberculeux et de détecter une résistance aux antituberculeux.

Méthodes de biologie moléculaire

La mise en évidence de la tuberculose repose à présent en grande partie sur des méthodes de biologie moléculaire, soit directement à partir de l'échantillon clinique soit dès la positivité de la culture. La détection de mutations dans certains gènes conférant une résistance à des antituberculeux s'est aussi développée comme méthode d'identification rapide soit par séquençage soit par hybridation des acides nucléiques.

Détection directe de *Mycobacterium tuberculosis* et détermination de la résistance à la rifampicine

Les tests de détection des acides nucléiques sont très utilisés dans les laboratoires de routine à cause de la rapidité de détection de l'agent pathogène (quelques heures contre deux à trois semaines pour obtenir une culture positive). Des règles d'utilisation ont été publiées par le Centers for Disease Control (CDC) dès 1996 et réactualisées en 2000 et 2008. Actuellement de nombreux tests commerciaux sont disponibles : ils utilisent différentes techniques d'amplification dont les deux formats les plus connus sont la Polymerase Chain Reaction (PCR, Roche Applied Science, Meylan, France) et l'amplification isotherme (Transcription-mediated amplification, Gen-Probe, San Diego, CA, États-Unis et Strand-Displacement Amplification, Becton Dickinson). Ces tests ont une sensibilité supérieure à 95 % pour les échantillons microscopiquement positifs contre seulement 60 à 70 % pour les échantillons négatifs à l'examen microscopique. La détection des acides nucléiques augmente la spécificité diagnostique de la tuberculose ; toutefois, une sensibilité trop basse – en particulier pour les échantillons négatifs à l'examen microscopique – ne permet pas d'exclure une tuberculose en cas de test négatif [9].

Ces recommandations sont surtout valables pour les échantillons respiratoires ; la détection d'acides nucléiques dans les autres échantillons cliniques, en particulier les biopsies, peut être négative à cause de la présence d'inhibiteurs d'amplification. Ceux-ci doivent donc être systématiquement recherchés quel que soit le type d'échantillon et de méthode d'extraction des acides nucléiques. Enfin, les tests d'amplification des acides nucléiques commerciaux doivent être préférés aux tests développés dans le laboratoire à cause des résultats peu reproductibles de ces derniers.

FIND Diagnostics (Genève, Suisse), organisation pour le développement de nouveaux tests diagnostiques pour les pays en voie de développement, projette, pour les années 2020, la mise au point de la détection de fragments d'ADN de MTB excrétés dans les urines. L'urine est un échantillon plus homogène et plus facile à récolter qu'une expectoration, ces deux caractéristiques étant un atout important si elles sont liées à une méthode d'amplification très simple et sensible [10].

En effet, les méthodes d'amplification actuellement implémentées dans les laboratoires deviennent plus simples et plus rapides. Ainsi, Roche (Cobas Taqman, Roche Diagnostics, Meylan, France) a développé une PCR en temps réel [11] qui diminue de moitié le temps d'amplification et de détection des germes avec une automatisation partielle (deux heures au lieu de quatre).

Une méthode très prometteuse de PCR en temps réel (Xpert MTB/RIF, Cepheid, Sunnyvale, CA, États-Unis), permet d'établir à la fois la présence de MTB et d'une mutation du gène *rpoB* indiquant une résistance à la rifampicine en moins de deux heures. Cette technique, outre sa rapidité, semble avoir une sensibilité nettement plus élevée dans les échantillons négatifs à l'examen microscopique (72 %) que les méthodes PCR traditionnelles commercialisées [1,12,13]. Cette sensibilité diagnostique accrue provient, d'une part, de l'extraction des acides nucléiques effectuée

Tableau 1 Tuberculostatiques pour lesquels des gènes spécifiques de résistance ont été mis en évidence et peuvent être détectés par des techniques d'amplification nucléaire.

	Médicaments	Gène	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Antituberculeux primaires	Rifampicine ^a	rpoB	96	97
	Isoniazide ^a	inhA + katG	89	99
	Éthambutol	embB	50	n.d.
	Pyrazinamide	pncA	80	n.d.
Antituberculeux secondaires	Fluoroquinolones ^a	gyrA	82	97
	Kanamycine ^a	rrs + eis	87	97
	Amikacine ^a	rrs	88	99
	Capréomycine ^a	Rrs + tlyA	45	86

n.d. : données non disponibles.

^a Système commercial par hybridation reverse.

automatiquement dans la cartouche et, d'autre part, d'une deuxième amplification (nested-PCR).

Les mutations associées à la résistance à de nombreux traitements anti-tuberculeux ont été décrites depuis une dizaine d'années (Tableau 1). En particulier, 95 % des souches résistantes à la rifampicine montrent des mutations à l'intérieur d'une région de 81pb du gène rpoB. Plusieurs tests moléculaires ont été développés pour la détection de ces mutations, basés sur le recours à la PCR pour amplifier la séquence cible, puis d'une deuxième étape de séquençage ou d'hybridation pour détecter les mutations. Ainsi, les méthodes Line-probe basées sur des techniques d'hybridation reverse s'avèrent très fiables pour la détection des souches multi-résistantes à partir de cultures positives en mettant en évidence des mutations dans les gènes inhA ou katG pour l'isoniazide et dans le gène rpoB pour la rifampicine. Une des recommandations de l'OMS en 2008 est d'utiliser ces tests pour la détection rapide des souches multirésistantes dans les échantillons des patients microscopiquement positifs en utilisant le test GenoType MTDR (Hain Life Sciences, Nehren, Allemagne).

D'autres tests moléculaires (GenoType MTBDRsl, Hain Life Sciences) viennent d'être commercialisés pour détecter la résistance aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et à l'éthambutol. Un résumé des gènes connus impliqués dans les mécanismes de résistance aux antituberculeux primaires et secondaires est présenté dans le Tableau 1.

La biologie moléculaire à partir de cultures de mycobactéries n'est pas seulement utilisée pour la détection des gènes de résistances mais aussi pour identifier les différentes espèces de mycobactéries.

Identification des espèces de mycobactéries à partir de cultures positives

Le système GenoType MTBC (Hain Life Sciences) permet d'identifier les différentes espèces au sein du complexe MTB. Ce test est basé sur la mise en évidence de différences dans le gène gyrB (gyrase B) par amplification de l'ADN et hybridation du produit d'amplification avec des sondes spécifiques. Ce test a été d'un apport énorme pour les laboratoires de diagnostic car il a permis de passer d'une identification des espèces par tests biochimiques sur plusieurs semaines, avec parfois des difficultés

d'interprétation, à une méthode très fiable et réalisable en une journée [14]. D'autres tests basés sur le même principe permettent d'identifier les mycobactéries atypiques. Le séquençage du gène de l'ARNr16S est aussi une méthode très performante pour l'identification des mycobactéries atypiques. Cette technique a été largement validée et utilisée dans les laboratoires pouvant avoir accès à un séquenceur mais elle n'est parfois pas assez discriminante. Par exemple *M. kansasii* et *M. gastri* ont la même séquence du gène de l'ARNr 16S, le même problème étant retrouvé pour plusieurs espèces de mycobactéries à croissance rapide. Dans ce cas, les systèmes d'hybridation sont une valeur ajoutée car ils permettent l'identification précise des espèces.

- Les techniques de PCR, de PCR en temps réel et d'amplification isotherme sont rapides et sensibles, mais un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection.
- Des tests moléculaires ont été développés pour déceler des résistances à la rifampicine (mutations du gène rpoB) et à l'isoniazide (mutations des gènes inhA ou katG).
- D'autres tests viennent d'être commercialisés pour détecter la résistance aux fluoroquinolones, aux aminoglycosides et à l'éthambutol.
- Enfin, des tests moléculaires permettent d'identifier rapidement les différentes espèces au sein du complexe *Mycobacterium tuberculosis*.

Marqueurs biologiques

D'autres méthodes ne faisant pas appel à la biologie moléculaire, moins lourdes à mettre en place et moins coûteuses en instruments et personnel commencent à apparaître pour le diagnostic de la TB. Ces techniques profitent à la fois des progrès dans la connaissance de la biologie de MTB et de la découverte de nouvelles protéines cellulaires ou excrétées.

Deux marqueurs biologiques ont démontré leur utilité pour le diagnostic de la tuberculose, l'un pour la recherche de tuberculose directement chez le patient (le lipoa-

rabinomannane), l'autre pour l'identification rapide des mycobactéries du complexe MTB dès la positivité de la culture (Antigène MPT-64).

Le lipoarabinomannane est un glycolipide de haut poids moléculaire, résistant à la température, présent dans la paroi cellulaire des mycobactéries. Cette molécule n'est pas spécifique pour le complexe MTB mais plusieurs groupes ont montré la présence de concentrations mesurables de lipoarabinomannane dans les expectorations [15] ou dans les urines des patients atteints de tuberculose [16]. Des données préliminaires positives ainsi que l'avantage d'utiliser un simple test urinaire pour détecter une tuberculose ont rapidement conduit au développement d'un test Elisa commercial (Clearview TB, Inverness Medical Innovations, Waltham, MA, États-Unis). Des travaux récents ont montré des performances variables de cette approche et une sensibilité plus faible que celle espérée [17,18]. Ce test semblerait avoir une meilleure performance chez les patients VIH positifs avec une immunosuppression avancée [19].

Le seul test commercial de détection antigénique permettant de mettre en évidence spécifiquement les mycobactéries du complexe MTB utilise l'antigène MPT-64. Ce test est basé sur un dosage immuno-chromatographique conçu pour la détection qualitative à partir d'un tube de culture MGIT positif (BD MGIT Tbc Identification Test, BD diagnostics, Sparks, États-Unis). La protéine MPT-64 est sécrétée dans le milieu de culture et permet une confirmation de l'appartenance au complexe MTB avec une très bonne sensibilité et spécificité [20,21].

Quelques souches de *M. bovis* BCG ne produisent pas cet antigène MPT-64. L'exécution de ce test en 15 minutes, son coût plus faible que les méthodes moléculaires et l'emploi de techniciens peu spécialisés pour sa lecture en font néanmoins un outil très performant dans les laboratoires diagnostics actuels.

- Le dosage du lipoarabinomannane pour le diagnostic de tuberculose active chez le sujet immunocompétent n'a pas pour l'instant la sensibilité espérée.
- Un test détectant l'antigène MPT-64 permet d'identifier les mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* en culture.

Outils épidémiologiques

Les méthodes de typage sont utilisées pour étudier notamment les souches de bacilles tuberculeux chez un même patient (réinfection ou réactivation), la transmission d'une souche dans une communauté spécifique (prison, école, lieu de travail, groupe ethnique...), pour suivre la dispersion des souches au niveau de la population mondiale ou encore pour mettre en évidence une contamination croisée au laboratoire.

La technique de référence, bien que lourde à mettre en œuvre et lente (résultat disponible en une dizaine de jours) est la méthode Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Elle est basée sur une hybrida-

tion avec une sonde spécifique à la séquence d'insertion IS6110 qu'on retrouve en nombre de copies variables dans le génome de MTB. Cette hybridation se fait après avoir digéré le génome par une enzyme de restriction et après avoir séparé les fragments par électrophorèse [22]. Les avantages de cette méthode sont la stabilité des profils des souches étudiées au cours du temps et une discrimination suffisante, ce qui en fait un bon outil épidémiologique.

Les méthodes de typage ont pris un essor important avec l'utilisation de l'amplification génique à cause de leur rapidité et de leur facilité relative d'utilisation. Une des méthodes largement utilisées est le *spoligotyping* (Spacer Oligonucleotide Typing) basée sur le polymorphisme d'une séquence répétée de 36pb (Direct Repeat [DR]), séparée par des séquences variables de 35 à 41 pb. Ces séquences varient d'une souche à l'autre en nombre et en distance: les souches de la lignée Beijing par exemple, réputées plus virulentes et plus fréquemment multi-résistantes, pouvant être identifiées par cette méthode.

Une autre méthode de typage basée sur le polymorphisme génique d'éléments répétés (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* [MIRU]) est dérivée du séquençage complet de MTB H37Rv et de la mise en évidence de séquences répétées dans des régions spécifiques du génome. Son pouvoir discriminant est suffisant pour réaliser une étude épidémiologique [23]. Cette méthode est actuellement la plus performante car elle permet de typer toutes les souches, y compris celles ayant un faible nombre de copies IS6110. Elle est en plus assez simple à implémenter pour les laboratoires pratiquant les techniques de biologie moléculaire.

Dernièrement, une autre méthode commerciale de typage pour différentes bactéries (rep-PCR Diversilab, Bacterial Barcodes Inc, Biomérieux, Houston, TX, États-Unis) a aussi été évaluée pour MTB (rep-PCR Diversilab Mycobacterium Tuberculosis Typing kit). Cette technique amplifie les régions entre des séquences répétées non codantes du génome et les produits d'amplification sont analysés dans une puce où migre un gel à travers des micro-capillaires. La méthode sépare et analyse les fragments amplifiés de différentes tailles et d'intensités de fluorescence variable. Cette méthode a été utilisée avec succès dans notre laboratoire en parallèle avec un typage IS 6110-RFLP pour mettre en évidence une épidémie à Genève de 15 cas d'immigrés venant d'un même pays [24]. Cette étude était réalisée sur un nombre de souches assez faibles et une récente comparaison des techniques RFLP, MIRU et rep-PCR a démontré la supériorité de la technique MIRU comme outil de typage PCR par rapport à la rep-PCR [25].

- Différentes méthodes de typage permettent de discriminer les souches de bacilles tuberculeux.
- Il existe plusieurs méthodes, mais la meilleure actuellement est la *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units* (MIRU).

Tests basés sur la production de γ -interféron (tests IFN- γ) en réponse à des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (IGRA)

Principe des tests Interferon- γ Release Assays (IGRAs)

De nouveaux tests palliant en partie les limites du test cutané tuberculinique (TCT) ont été développés ces dernières années et ont rapidement pris de l'importance dans le dépistage de la tuberculose. Ces tests sanguins réalisés in vitro, mesurent la production d'IFN- γ après stimulation des lymphocytes par des antigènes spécifiques de MTB ; ils sont habituellement appelés « tests de production d'IFN- γ » ou « tests IFN- γ ». Au cours d'une infection par des mycobactéries, l'IFN- γ est d'abord produit par les cellules de l'immunité innée, principalement les « natural killers », puis en grande quantité par les lymphocytes T Th1 exprimant des récepteurs spécifiques pour des antigènes de mycobactéries. Ce sont ces lymphocytes T devenus « effecteurs » qui peuvent être réactivés in vitro par des antigènes de mycobactéries et produire des quantités importantes d'IFN- γ .

Seuls les lymphocytes préalablement exposés aux mêmes antigènes vont être stimulés, ce qui assure la spécificité pour MTB. En effet, les antigènes utilisés ([Early Secretory Target Protein 6 ESAT-6] et Culture Filtrate Protein 10 [CFP-10]) correspondent à des protéines codées dans une région particulière du génome des mycobactéries du « complexe tuberculosis » (MTB, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* et *M. canetti*). Cette région, appelée Region of Difference 1 (RD1) n'est pas partagée par la plupart des mycobactéries environnementales à l'exception de *M. szulgai*, *M. kansasii* et *M. marinum*, et surtout, elle est absente des souches atténuées de *M. bovis* utilisées pour la production de BCG.

Deux tests commerciaux ont été développés à partir de ce principe, avec des technologies un peu différentes. Le T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, UK) mesure le nombre de lymphocytes T sécrétant de l'IFN- γ en réponse aux antigènes ESAT-6 et CFP-10 par une technique appelée ELISPOT alors que le QuantiFERON-TB Gold (QFT ; Cellestis Ltd, Australie) mesure par Elisa la quantité totale d'IFN- γ produite en réponse à ces mêmes antigènes auxquels est ajouté un antigène supplémentaire des mycobactéries du complexe tuberculosis : le TB 7.7. Il existe plusieurs versions commerciales du test QFT, mais la plus répandue actuellement et la plus performante est le « QuantiFERON-TB Gold in-tube Assay ».

Certaines particularités méthodologiques ont des conséquences sur les résultats des tests. Ainsi, pour le T-SPOT.TB, les cellules mononuclées (lymphocytes et monocytes) du sang périphérique sont isolées, comptées et ajustées à une concentration prédéterminée avant d'être stimulées. Le test est donc moins influencé par le taux de lymphocytes circulants et donc a priori plus sensible en cas de lymphopénie.

Dans les deux tests, il y a un contrôle négatif (absence d'antigènes) et un contrôle positif (la phytohémagglutinine (PHA), qui stimule la production d'IFN- γ par tous les lymphocytes). Dans la majorité des cas, lorsque le résultat d'un test est « indéterminé », c'est parce que la réponse à ce contrôle positif est insuffisante, indiquant l'absence

de lymphocytes stimulables ou leur incapacité à produire de l'IFN- γ . Un tel résultat doit faire suspecter une cause d'immunodéficience : il est connu que les âges extrêmes, et les traitements immunosuppresseurs, en particulier les corticostéroïdes, sont associés à une augmentation de la fréquence de ces résultats « indéterminés » [26]. Il faut d'ailleurs noter que la concentration de PHA utilisé dans le T-SPOT.TB est supérieure à celle du QFT, ce qui pourrait expliquer le nombre un peu plus faible de résultats « indéterminés » rapporté avec le T-SPOT.TB. Pour les deux tests, le temps d'incubation recommandé en présence des antigènes est de 16 à 24 heures car en principe, dans ce délai, seuls les lymphocytes récemment sensibilisés sont capables de répondre en sécrétant de l'IFN- γ . Un temps d'incubation plus long permet la stimulation des cellules mémoires qui peuvent être le témoin d'une infection très ancienne [26,27].

Deux revues extensives détaillant les principes de ces tests, leurs avantages et inconvénients ont été publiées en 2007 dans la *Revue des Maladies Respiratoires* [28,29]. Elles montrent clairement que les tests IFN- γ sont au moins aussi sensibles que le TCT et nettement plus spécifiques puisqu'ils sont indépendants de la vaccination par le BCG. Elles soulignent aussi leurs limites, notamment chez les sujets immunodéprimés, ainsi que leur incapacité à faire la distinction entre ITL et TB.

Un certain nombre de nouvelles études ont été publiées depuis et ont permis de confirmer certaines de ces données mais aussi de mettre en évidence nouveaux aspects des tests IFN- γ .

Infection tuberculeuse latente (ITL)

Comparés au TCT, les données publiées concordent à démontrer que les tests IFN- γ sont nettement plus spécifiques et donc meilleurs prédicteurs d'une ITL que le TCT. La publication récente d'une méta-analyse incluant 38 études publiées entre 2004 et 2008 permet d'estimer les spécificités moyennes du QFT (96 %), du T-SPOT.TB (93 %) et du TCT (66 %) si l'on s'adresse à des populations à faible risque d'infection tuberculeuse [30,31]. Cela s'explique en grande partie par l'absence d'influence du BCG ou de l'exposition à des mycobactéries non tuberculeuses sur les tests IFN- γ .

Le principe des tests IFN- γ voudrait que le temps d'incubation préconisé permette de stimuler les lymphocytes T effecteurs récemment sensibilisés, mais pas les lymphocytes T à mémoire et donc de ne dépister que les sujets récemment exposés [27]. Cela serait un atout par rapport au TCT qui déclenche une stimulation intradermique prolongée pouvant activer des cellules mémoires toujours présentes malgré une élimination totale des mycobactéries. Toutefois, les résultats obtenus avec les tests IFN- γ ne sont pas tous convergents et difficiles à interpréter car les protocoles expérimentaux sont très différents. Certains travaux montrent qu'il est nécessaire d'incuber les lymphocytes cinq à 12 jours, donc nettement plus que la durée préconisée, pour observer une production d'IFN- γ après un traitement efficace, tendant ainsi à confirmer le rôle des cellules mémoires [32,33]. Au contraire, d'autres ont montré que des infections anciennes, remontant à plus de deux ans, voire même des infections latentes traitées, et théoriquement peu susceptibles de se réactiver, suffisent

à positiver les tests IFN- γ , même avec incubation courte. Ainsi, Dheda et al. trouvent que le taux de positivité du T-SPOT.TB décroît avec la durée du traitement (83 % avant quatre mois et 17 % au-delà). Cependant, même une incubation prolongée de cinq jours n'a pas permis de déclencher une production d'IFN- γ par les lymphocytes des sujets traités, ce qui tend à infirmer l'hypothèse de cellules mémoires. Par ailleurs, dans ce même travail, trois patients avaient encore un T-SPOT.TB positif 17 à 18 mois après la fin du traitement, suggérant que certains sujets conservent longtemps des lymphocytes effecteurs circulants [34].

Pour l'instant, même si un résultat de test IFN- γ positif est plutôt en faveur d'une infection récemment acquise, il ne permet pas d'exclure que cette infection remonte à plus de deux ans.

La sensibilité des tests IFN- γ pour l'ITL est très difficile à évaluer puisque par définition, on ne dispose d'aucun outil permettant une certitude diagnostique. Elle est donc estimée à partir de scores d'exposition ou en prenant les cas de TB comme marqueurs de substitution. Compte tenu de cette limitation, elle semble en général égale, voire légèrement supérieure à celle du TCT chez les patients adultes immunocompétents, avec un léger avantage en faveur du T-SPOT.TB sur le QFT. La méta-analyse de Pai et al. permet d'estimer la sensibilité du QFT à 78 %, celle du T-SPOT.TB à 90 % et celle du TCT à 77 % [30]. Certains auteurs émettent toutefois des réserves sur ces résultats en montrant notamment que la sensibilité du QFT peut être inférieure à celle du TCT dans un contrôle d'entourage après exposition.

En revanche, la sensibilité des tests IFN- γ semble nettement supérieure à celle du TCT chez les sujets immunosupprimés, quelle que soit la cause et l'intensité de cette immunosuppression. Ainsi, chez les sujets âgés de plus de 50 ans, la sensibilité du QFT pour une ITL est supérieure à celle du TCT [35].

En ce qui concerne les sujets infectés par le VIH, la plupart des études confirment la supériorité des tests IFN- γ par rapport au TCT, mais relèvent qu'ils sont toutefois moins sensibles que chez les sujets immunocompétents. Il existe des discordances importantes entre les résultats des deux tests IFN- γ , en particulier en raison de la plus grande dépendance du QFT au taux de lymphocytes T CD4+, puisque le T-SPOT.TB est ajusté pour la concentration de lymphocytes [36]. Dans une étude portant sur 590 patients séropositifs pour le VIH, la sensibilité du QFT est décrite comme satisfaisante si le compte de lymphocytes CD4+ est supérieur à 100 par millimètre cube [37].

Des résultats un peu différents ont été observés chez les patients hémodialysés. Une étude de notre groupe comparant les performances des deux tests IFN- γ a montré que dans cette population la concordance entre les deux tests IFN était modérée ($\kappa = 0,60$), mais que le QFT était deux fois plus sensible pour détecter une ITL [38].

Valeur prédictive quant au développement d'une infection tuberculeuse active (TB)

Le plus utile serait de pouvoir utiliser ces tests non seulement pour détecter une ITL, mais surtout pour prévoir quels sont les sujets à risque de développer une TB et donc susceptibles de bénéficier d'un traitement. Beaucoup de données existent pour les TCT, permettant d'évaluer

le risque de développer une TB en fonction du diamètre de l'induration, mais de telles informations restent encore très limitées pour les tests IFN- γ . Seules des études longitudinales peuvent répondre à cette question et elles sont encore peu nombreuses. Elles posent d'ailleurs un problème éthique puisqu'il est difficile de suivre des patients avec un test IFN- γ positif sans leur proposer un traitement.

Une étude menée en Allemagne portant sur 600 sujets immunocompétents et en grande majorité adultes, en contact rapproché avec des patients souffrant de TB et suivis pendant deux ans, a montré que 40 % d'entre eux étaient positifs pour le TCT (induration > 5 mm) et seulement 11 %, soit 66, positifs pour le QFT. Parmi ces derniers, 41 ont refusé le traitement prophylactique par isoniazide qui leur a été proposé et six d'entre eux (14,6 %) ont développé une TB active dans les deux ans. Parmi ces six patients, un avait un TCT négatif. Par ailleurs, seulement 2,3 % des sujets avec un TCT positif et non traités ont développé une TB. Ces résultats montrent donc que le QFT est au moins aussi sensible et beaucoup plus spécifique que le TCT pour identifier les sujets à risque de développer une TB après un contact récent [39]. Pour ce qui est des enfants et des adolescents, une étude un peu similaire a été menée en Turquie, mais en utilisant le T-SPOT.TB. Parmi 908 enfants étudiés, 550 (60,5 %) avaient un TCT positif et 381 (41,9 %) un T-SPOT.TB positif. La grande majorité de ces enfants a été traitée préventivement en suivant les recommandations en vigueur en Turquie. Parmi les non-traités, 3,6 % (3/83) de ceux ayant un TCT positif et 7,4 % (4/54) de ceux dont le T-SPOT.TB était positif, ont développé une TB, montrant donc également une meilleure valeur prédictive du T-SPOT.TB [40]. Enfin, dans une étude autrichienne portant sur une population de 830 patients infectés par le VIH, le QFT était positif dans 44 cas. Parmi ceux-ci, sept se sont révélés être des TB et ont été traités. Les 37 autres ont été suivis régulièrement sans traitement et trois (8,1 %) ont développé une TB. En outre, un nombre assez important de patients (47/830, soit 5,6 %) avaient un résultat « indéterminé » mais aucun d'entre eux n'a développé de TB par la suite [41]. Dans cette étude, seuls les patients positifs pour le QFT ont eu un TCT et seulement 73,8 % étaient positifs, confirmant la plus faible sensibilité du TCT dans cette population.

Ces études longitudinales et prospectives, bien qu'encore peu nombreuses, concordent donc pour montrer que les tests IFN- γ semblent supérieurs au TCT pour prédire l'évolution d'une ITL vers une TB et qu'en moyenne 10 % des sujets positifs développeront une maladie active dans les deux ans.

Infection tuberculeuse active (tuberculose maladie)

Les tests IFN- γ sont les témoins d'une infection par MTB et ne permettent donc pas de faire la distinction entre une ITL et une TB. Toutefois, puisqu'une TB est nécessairement précédée par une ITL (en dehors de rares formes rapidement évolutives, notamment chez le nourrisson), un test IFN- γ négatif devrait théoriquement exclure une TB. Différentes études qui ont évalué les performances des tests lors de TB aussi bien chez des adultes [42], que chez des enfants [43]

et des sujets âgés [44] ont montré que les deux tests IFN- γ (T-SPOT.TB et QFT) ont une sensibilité de l'ordre de 80 %, toujours supérieure à celle des TCT.

Récemment, une méta-analyse a inclus 124 études évaluant les performances des tests IFN- γ et des TCT dans des cas de TB confirmés par culture ou par PCR [45]. Elle permet d'établir une sensibilité moyenne de 81 % pour le QFT et de 88 % pour le T-SPOT.TB, alors que celle du TCT n'est que de 70 %. Si l'on restreint l'analyse aux pays développés, les sensibilités des tests augmentent et atteignent 84 % pour le QFT et 89 % pour le T-SPOT.TB. À l'inverse, la spécificité du QFT (99 %) est nettement supérieure à celle du T-SPOT.TB (86 %).

Une autre méta-analyse récente portant sur le taux de vraisemblance (*likelihood ratio*) conclut qu'aucun des deux tests IFN- γ ne peut confirmer une TB, mais que le T-SPOT.TB serait assez performant pour écarter le diagnostic de TB avec une probabilité de 90 %, notamment chez les sujets âgés [46]. Cependant, surtout dans les pays développés où l'incidence de TB est faible, aucun de ces tests n'a une sensibilité suffisante pour exclure une TB et plusieurs mises en garde ont été publiées à ce propos [47,48]. En effet, la morbidité et la mortalité d'une TB sont telles que même un faible pourcentage de patients faussement négatifs n'est pas acceptable.

Résultats quantitatifs des tests IFN

Les résultats des tests IFN- γ sont exprimés de façon qualitative (positifs ou négatifs) en fonction des valeurs obtenues et en utilisant les règles établies par les fournisseurs. Il a toutefois été suggéré que les valeurs quantitatives pourraient donner des résultats permettant une évaluation plus fine.

Ainsi, lors d'un contrôle d'entourage se pose parfois la question de distinguer entre les sujets contaminés, porteurs d'une ITL, et ceux ayant déjà une TB et nous nous sommes demandés si le nombre de spots comptés dans le T-SPOT.TB permettait de différencier ces deux situations. Notre étude a montré que le nombre de spots était plus élevé en cas de TB que lors d'ITL et qu'un seuil de 49 spots permettait de distinguer entre TB active et latente avec une sensibilité de 83 % et une spécificité de 74 %. Il y avait cependant beaucoup de recouvrement entre les valeurs quantitatives obtenues dans ces situations et les sensibilités et spécificités sont insuffisantes pour pouvoir utiliser ce test et cette valeur seuil comme facteur discriminant [49].

Nous avons également essayé d'évaluer si la modification du nombre de spots observée sur des tests pratiqués systématiquement au début et à la fin du traitement pouvait prédire l'évolution des patients. Une diminution du nombre de spots a été observée pour la majorité des cas (30/36), mais parmi les six patients pour lesquels le nombre de spots a augmentés, cinq ont eu une évolution favorable, sans complications. Un seul d'entre eux, âgé, a rechuté après 12 mois et est décédé. Il n'est donc pas possible de conclure qu'une augmentation du nombre de spots sous traitement est prédictive d'une évolution défavorable [50].

Points non résolus

Même si le très grand nombre de publications consacrées aux tests IFN- γ a apporté beaucoup d'informations, cer-

tains points restent encore problématiques et nécessitent de rester vigilants sur l'utilisation et l'interprétation de ces tests.

Tout d'abord, comme souligné par Blanc et al., la plupart des études disponibles ont été réalisées dans des populations sélectionnées qui ne sont pas vraiment représentatives de celles soumises au risque de tuberculose [29]. De plus, des différences selon les populations analysées ont été mises en évidence par une méta-analyse récente [46]. Cette revue montre que chez les adultes immunocompétents, le QFT est plus performant que le T-SPOT.TB pour confirmer une ITL dans les études d'origine japonaise alors que les tests sont équivalents dans les autres populations. Inversement, le T-SPOT.TB est plus performant pour exclure une ITL chez les sujets non japonais alors que les deux tests sont équivalents dans les études japonaises. Les auteurs soulignent ces différences mais ne proposent aucune explication. Cette revue confirme en outre la supériorité des tests IFN- γ sur les tests cutanés, quel que soit le diamètre d'induration retenu.

D'autres limitations dues à la variabilité intra- et inter-essais des tests IFN- γ ont été mises en évidence récemment. Ainsi, une étude finlandaise a montré que le coefficient de variation intra-essai est de 4,5 % avec le QFT et 17,5 % avec le T-Spot.TB. Le coefficient de variation inter-essai est beaucoup plus élevé et atteint 37,7 % avec le QFT et 24,9 % avec le T-SPOT.TB [51]. Il faut toutefois noter que la congélation/décongélation des cellules peut influencer les résultats et que cette procédure n'est pas recommandée pour les tests IFN- γ .

Une autre approche a consisté à tester les mêmes sujets à plusieurs reprises, à intervalles suffisamment rapprochés pour que la probabilité d'une infection par MTB entre les deux tests soit faible. Les résultats montrent qu'un nombre non négligeable de sujets change de statut entre les deux tests, c'est-à-dire deviennent positifs alors qu'ils étaient négatifs ou inversement (conversion et réversion). Ainsi, aux États-Unis, dans une zone de faible prévalence de TB, en trois semaines, sept sujets sur 117, soit 6 %, ont positivé ou réversé leur test avec le QFT et 7 % avec le T-Spot.TB [52]. Dans les zones de forte endémie, comme l'Inde ou l'Afrique du Sud, ces pourcentages atteignent jusqu'à 26 % [52,53]. Le « changement de statut » est d'autant plus fréquent que les résultats du test sont proches du seuil de positivité (*cut-off*) et tous les auteurs insistent sur la nécessité de définir une zone grise dans laquelle le résultat est douteux et doit être confirmé. Cette notion de zone grise a été reprise dans les recommandations les plus récentes du CDC.

Une autre limitation importante à connaître dans l'interprétation des résultats d'un test IFN- γ est le possible effet « rappel » d'un TCT préalable. Sur 13 études analysées par Van Zyl-Smit fin 2009 [54], cinq montrent qu'un TCT ne modifie pas le résultat du test IFN- γ alors que sept aboutissent à la conclusion inverse. Parmi ces dernières, on observe quelques cas de positivation chez des sujets antérieurement négatifs, mais surtout des augmentations de l'intensité de la réponse chez les sujets positifs. Cet effet « rappel » se manifeste trois jours après le TCT. Il semble maximal après trois semaines et peut se prolonger plusieurs semaines. Il ne dépend pas du résultat du TCT et peut se produire après un TCT positif ou négatif. Une de ces études

montre qu'un TCT préalable influence moins le T-SPOT.TB que le QFT, suggérant que l'antigène TB 7,7, présent uniquement dans ce dernier test, pourrait être responsable de l'effet «rappel» [55]. Toutefois, deux études ultérieures ne confirment pas cette observation et montrent que les deux tests IFN- γ sont sensibles à un TCT préalable [52,56]. Même si l'effet d'un TCT préalable reste encore controversé, ces observations pourraient remettre en cause le schéma d'évaluation en deux étapes (*two-step procedure*: TCT suivi d'un test IFN- γ en cas de positivité) mis en place dans certains pays.

Perspectives

Les tests IFN- γ actuels ne permettent donc pas de résoudre tous les problèmes diagnostiques liés à la tuberculose. Toutefois, les investigations se poursuivent pour palier leurs inconvénients et certaines voies semblent prometteuses. Ainsi, l'adjonction pendant la phase d'incubation de cytokines qui favorisent la survie des lymphocytes T telles que l'interleukine-7 ou l'interleukine-15, permettrait d'augmenter la production d'IFN- γ et ainsi d'améliorer la sensibilité des tests IFN- γ sans altérer leur spécificité [57]. Il est aussi possible de mesurer d'autres cytokines que l'IFN- γ après stimulation par les antigènes de MTB. Jusqu'à présent, les chimiokines pro-inflammatoires *IFN- γ inducible protein* (IP-10) et *monocyte chemotactic protein* (MCP-2) ont été évaluées parce qu'elles sont produites en réponse à l'IFN- γ , mais en quantité beaucoup plus importantes que celui-ci, et que leurs concentrations corrélaient bien avec celle de l'IFN- γ [58]. Les résultats ont toutefois été plutôt décevants: leur dosage en plus de celui de l'IFN- γ dans le test QuantiFERON augmente un peu la sensibilité du test, mais au détriment de sa spécificité et ne permet pas de mieux distinguer entre ITL et TB [59,60]. Une autre chimiokine, l'*IFN- γ inducible protein* (IP-10) a donné des résultats similaires à ceux du QFT classique en termes de sensibilité et de spécificité, mais semble en outre particulièrement sensible chez les jeunes enfants [60–62]. Son utilité reste à confirmer par de larges études cliniques.

Enfin, un groupe d'antigènes de MTB n'est exprimé que par les bactéries en phase de latence: utilisés dans le T-SPOT.TB, ils déclencheraient une production d'IFN- γ significativement plus importante lorsque les lymphocytes proviennent de sujets avec une ITL comparés à ceux avec une TB, permettant ainsi de mieux discriminer ces deux situations. [63,64].

- Les tests IFN- γ sont au moins aussi sensibles que le TCT, mais ils ne permettent pas de distinguer une infection tuberculeuse latente d'une tuberculose active, ni d'exclure une tuberculose.
- Les tests IGRA («tests de production d'IFN- γ » ou «tests IFN- γ ») ont l'avantage d'une spécificité accrue par rapport au TCT.
- Des études complémentaires restent nécessaires pour mieux préciser la place des tests IFN.

Conclusion

Les moyens diagnostiques apparus au cours de la dernière décennie (et en particulier la simplification des techniques de biologie moléculaire) permettent de raccourcir de façon spectaculaire la durée nécessaire pour la confirmation bactériologique d'un diagnostic de tuberculose et pour la détection d'une multirésistance. Toutefois, la confirmation bactériologique des atteintes paucibacillaires, en particulier extrathoraciques reste encore un défi pour le clinicien, même si de nouvelles approches sont prometteuses. De nouvelles techniques (lipoarabinomannane ou détection de fragments d'ADN urinaires, recours à de nouvelles cytokines ou à de nouveaux antigènes dans les tests immunologiques) sont prometteuses. Le diagnostic de l'ITL a quant à lui gagné en sensibilité, spécificité et valeur prédictive positive, permettant un choix plus adéquat des sujets traités pour ITL. Les tests IFN- γ ne permettent toujours pas de discriminer entre ITL et TB, ni d'exclure une TB à moins d'être dans une situation de faible probabilité chez un sujet immunocompétent.

POINTS ESSENTIELS

- Les tests d'amplification (PCR et amplification isotherme) sont rapides mais parfois peu sensibles (échantillons avec microscopie négative, atteintes extrapulmonaires).
- Une technique permettant d'obtenir par PCR, en moins de deux heures, à partir d'expectorations, à la fois la confirmation de l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* et la présence éventuelle d'une mutation sur le gène *rpoB* (donc d'une résistance à la rifampicine) a récemment été mise sur le marché. Elle semble plus sensible que les autres techniques PCR utilisées jusqu'à aujourd'hui.
- De nouveaux microscopes, plus performants, ont été commercialisés.
- On peut considérablement réduire les délais des cultures par de nouvelles techniques de culture en milieu liquide.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

- [1] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005–15.
- [2] Drobniwski FA, Caws M, Gibson A, et al. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:141–7.
- [3] Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004;42:2321–5.

- [4] Bergmann JS, Fish G, Woods GL. Evaluation of the BBL MGIT (Mycobacterial growth indicator tube) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to 4 primary antituberculous drugs. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:82–6.
- [5] Lin S, Desmond E, Bonato D, et al. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 2009;47:3630–4.
- [6] Brady M, Coronel J, Gilman R, et al. The MODS method for diagnosis of tuberculosis and multi-drug resistant tuberculosis. *J Vis Exp* 2008;11:845.
- [7] Zimic M, Velazco A, Comina G, et al. Development of low-cost inverted microscope to detect early growth of *Mycobacterium tuberculosis* in MODS culture. *PLoS One* 2010;5:e9577.
- [8] Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis* 2007;196(Suppl. 1):S15–27.
- [9] Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess* 2007;11:1–196.
- [10] Cannas A, Goletti D, Girardi E, et al. *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection in soluble fraction of urine from pulmonary tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:146–51.
- [11] Chandran SP, Kenneth J. Evaluation of COBAS TaqMan real time PCR assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* 2010;132:100–2.
- [12] Blakemore R, Story E, Helb D, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol* 2010;48:2495–501.
- [13] Helb D, Jones M, Story E, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol* 2010;48:229–37.
- [14] Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, et al. Evaluation of genotype MTBC assay for differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:2672–5.
- [15] Pereira Arias-Bouda L, Nguyen L, Ho L, et al. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples. *J Clin Microbiol* 2000;38:2278–83.
- [16] Boehme C, Molokova E, Minja F, et al. Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99:893–900.
- [17] Daley P, Michael JS, Hmar P, et al. Blinded evaluation of commercial urinary lipoarabinomannan for active tuberculosis: a pilot study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:989–95.
- [18] Mutetwa R, Boehme C, Dimairo M, et al. Diagnostic accuracy of commercial urinary lipoarabinomannan detection in African tuberculosis suspects and patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1253–9.
- [19] Lawn S, Edwards D, Kranzer K, et al. Urine lipoarabinomannan assay for tuberculosis screening before antiretroviral therapy diagnostic yield and association with immune reconstitution disease. *AIDS* 2009;23:1875–80.
- [20] Ismail NA, Baba K, Pombo D, et al. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1045–7.
- [21] Park M, Kim Y, Hwang S, et al. Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2009;47:481–4.
- [22] van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406–9.
- [23] Niobe-Eyangoh S, Kuaban C, Sorlin P, et al. Genetic biodiversity of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains from patients with pulmonary tuberculosis in Cameroon. *J Clin Microbiol* 2003;41:2547–53.
- [24] Tardin A, Dominice Dao M, Ninet B, et al. Tuberculosis cluster in an immigrant community: case identification issues and a trans-cultural perspective. *Trop Med Int Health* 2009;14:995–1002.
- [25] Masala S, Molicotti P, Bua A, et al. Molecular characterization of Sardinian *Mycobacterium tuberculosis* isolates by IS6110 restriction fragment length polymorphism, MIRU-VNTR and rep-PCR. *New Microbiol* 2010;33:155–62.
- [26] Beffa P, Zellweger A, Janssens JP, et al. Indeterminate test results of T-SPOT.TB performed under routine field conditions. *Eur Respir J* 2008;31:842–6.
- [27] Lalvani A. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *Clin Infect Dis* 2004;38:757–9.
- [28] Lagrange P, Simonney N, Herrmann J. Les nouveaux tests immunologiques dans le diagnostic de la tuberculose (TB or not TB). (New immunologic test for the diagnosis of tuberculosis: TB or not TB). *Rev Mal Respir* 2007;24:453–72.
- [29] Blanc P, Monodier P, Dubus J, et al. Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose (New diagnostic tests for tuberculosis). *Rev Mal Respir* 2007;24:441–52.
- [30] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Int Med* 2008;149:177–84.
- [31] Menzies D, Pai M, Comstock G, et al. new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Int Med* 2007;146:340–54.
- [32] Al-Attiyah R, Mustafa AS, Abal AT, et al. Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferon-gamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:249–56.
- [33] Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, et al. Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:1034–9.
- [34] Dheda K, Pooran A, Pai M, et al. Interpretation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific IFN-gamma release assays (T-SPOT.TB) and factors that may modulate test results. *J Infect* 2007;55:169–73.
- [35] Nienhaus A, Schablon A, Diel R. Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB infection-analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test. *PLoS One* 2008;3:e2665.
- [36] Stephan C, Wolf T, Goetsch U, et al. Comparing QuantiFERON-tuberculosis Gold. T-SPOT tuberculosis and tuberculin skin test in HIV-infected individuals from a low prevalence country. *AIDS* 2008;22:2471–9.
- [37] Brock I, Ruhwald M, Lundgren B, et al. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon-gamma test. *Respir Res* 2006;7:56.
- [38] Triverio PA, Bridevaux PO, Roux-Lombard P, et al. Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for detection of latent tuberculosis in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1952–6.
- [39] Diel R, Lodenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1164–70.
- [40] Bakir M, Millington KA, Soysal A, et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon-gamma biomarker in children with tuberculosis contact. *Ann Intern Med* 2008;149:777–87.
- [41] Aichelburg MC, Rieger A, Breitenacker F, et al. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood

- interferon-gamma release assay in HIV-1-infected individuals. *Clin Infect Dis* 2009;48:954–62.
- [42] Goletti D, Carrara S, Butera O, et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study. *PLoS One* 2008;3:e3417.
- [43] Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007;45:322–8.
- [44] Kobashi Y, Mouri K, Yagi S, et al. Clinical utility of the QuantiFERON TB-2G test for elderly patients with active tuberculosis. *Chest* 2008;133:1196–202.
- [45] Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a meta-analysis. *Chest* 2010;137:952–68.
- [46] Chang KC, Leung CC. Systematic review of interferon-gamma release assays in tuberculosis: focus on likelihood ratios. *Thorax* 2010;65:271–6.
- [47] Leung CC, Yew WW. Can the interferon-gamma release assay help diagnose active tuberculosis in the elderly? *Chest* 2008;134:471.
- [48] Janssens JP. Clinical utility of the interferon- γ release assay for elderly patients with active tuberculosis: a word of caution. *Chest* 2008;134:471–2.
- [49] Janssens JP, Roux-Lombard P, Perneger T, et al. Quantitative scoring of an interferon-gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. *Eur Respir J* 2007;30:722–8.
- [50] Bosshard V, Roux-Lombard P, Perneger T, et al. Do results of the T-SPOT. TB interferon-gamma release assay change after treatment of tuberculosis? *Respir Med* 2009;103:30–4.
- [51] Tuuminen T, Tavast E, Vaisanen R, et al. Assessment of Imprecision in gamma interferon release assays for the detection of exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:596–601.
- [52] van Zyl-Smit R, Pai M, Peprah K, et al. Within-subject variability and boosting of T-cell interferon-gamma responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:1–2.
- [53] Veerapathran A, Joshi R, Goswami K, et al. *PLoS One* 2008;3:e1850.
- [54] van zyl Smit R, Zwerling A, Dheda K, et al. Within-subject variability of interferon-g assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS One* 2009;4:e8517.
- [55] Naseer A, Naqvi S, Kampmann B. Evidence for boosting *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN-gamma responses at 6 weeks following tuberculin skin testing. *Eur Respir J* 2007;29:1282–3.
- [56] Belknap R, Feske M, Choung G, et al. Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Health Care Workers: Impact of recent Tuberculin Skin Test on the Interferon-gamma release assays (IGRAs). *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:A1011.
- [57] Calarota S, Otero M, Hermanstynke K, et al. Use of interleukin 15 to enhance interferon-gamma production by antigen-specific stimulated lymphocytes from Rhesus macaques. *J Immunol Methods* 2003;279:55–67.
- [58] Brice G, Graber N, Hoffman S, et al. Expression of the chemokine MIG is a sensitive and predictive marker for antigen-specific, genetically restricted IFN-gamma production and IFN-gamma secreting cells. *J Immunol Methods* 2001;257:55–69.
- [59] Ruhwald M, Bodmer T, Maier C, et al. Evaluating the potential of IP-10 and MCP-2 as biomarkers for the diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 2008;2008:6.
- [60] Whittaker E, Gordon A, Kampmann B. Is IP-10 a better biomarker for active and latent tuberculosis in children than IFN gamma? *PLoS One* 2008;3:e3901.
- [61] Lighter J, Rigaud M, Huie M, et al. Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:731–6.
- [62] Petrucci R, Abu A, Gurgel R, et al. Interferon gamma, interferon-gamma-induced-protein 10, and tuberculin responses of children at high risk of tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:1073–7.
- [63] Demissie A, Leyten E, Abebe M, et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:179–86.
- [64] Schuck S, Mueller H, Kunitz F, et al. Identification of T-cell antigens specific for latent tuberculosis infection. *PLoS One* 2009;4:e5590.