

# Diagnostic de la tuberculose pulmonaire : évaluation du test «TB IgA EIA » au Maroc

L. Baassi,<sup>1</sup> L. El Fenniri,<sup>1</sup> J. Bourkkadi,<sup>2</sup> C. Benjaloun,<sup>2</sup> I. Cherkaoui,<sup>1</sup> G. El Iraki,<sup>2</sup> F. Benkouka,<sup>3</sup> A. Benjouad<sup>3</sup> et R. El Aouad<sup>1</sup>

تقييم اختبار المقايسة الإنزيمية المناعية للغلوبولين المناعي A للسسل الرئوي في المغرب العربي باسي، ليلى الفنيري، جمال الدين بورقادي، شكيب بن جلون، عماد الشرقاوي، الغالي العراقي، فاطمة بنكوكة، عزيز بن جواد، رجاء العواد

الخلاصة: قام الباحث في مرتبتين مختلفتين بتحليل دُفعتين من دُفعات المقايسة الإنزيمية المناعية للغلوبولين المناعي السلي A (تحرّي الغلوبولين المناعي A بدلالة المستضد P90 للمتطفرة السلية) في مرضى السسل الرئوي. ففي المرة الأولى تم أخذ أمصال من 345 مريضاً بالسسل الرئوي، ومن 18 من الأصحاء، و28 من المخالطين لمرضى السسل، و16 من المصابين بأمراض أخرى غير السسل. أما في المرة الثانية، فتم أخذ الأمصال من 302 من مرضى السسل الرئوي، ومن 60 من الأصحاء، و21 من المخالطين لمرضى السسل الرئوي، و18 من المصابين بأمراض أخرى غير السسل. وقد بينت الدراسة أن عيارات الغلوبولين المناعي A بدلالة المستضد P90 كانت أعلى بدرجة يُعتدُّ بها إحصائياً في مجموعة التحليل الثانية، بالمقارنة مع المجموعة الأولى ( $P < 0.05$ ). وكانت الحساسية في مجموعة التحليل الثانية، 78,8% عند نقطة الفاصل 0,340، في حين كانت الحساسية 75,9% في الدفعة الأولى عند نقطة الفاصل 0,1. وبلغت نسبة النوعية 50% للدفعة الأولى، و70,7% للدفعة الثانية. وتبين مما سبق أن حساسية المقايسة الإنزيمية المناعية للغلوبولين المناعي A السلي غير كافية لتشخيص السسل الرئوي بدرجة موثوقة.

**RÉSUMÉ** Nous avons analysé en deux temps des lots du test « TB IgA EIA » chez des patients présentant une tuberculose pulmonaire (TBp) : 345 sérums de patients TBp, 18 sérums de sujets sains (SS), 28 sérums de sujets en contact avec des patients tuberculeux (SC) et 16 sérums de patients présentant une pathologie respiratoire autre que la tuberculose (N-TB) ont été testés avec les premiers lots (première évaluation), et 302 TBp, 60 SS, 21 SC et 18 N-TB avec des lots plus récents (seconde évaluation). Les titres des IgA anti-p90 avec les lots de la seconde évaluation étaient significativement plus élevés qu'avec ceux de la première évaluation. Avec les lots de la seconde évaluation, la sensibilité était de 78,8 % alors qu'avec les lots de la première évaluation, la sensibilité était de 75,9 %. La spécificité pour les lots de la première et de la seconde évaluation était respectivement de 50 % et 70,7 %. La sensibilité de test ce reste non satisfaisante pour établir le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

## Diagnosis of pulmonary tuberculosis: evaluation of the TB IgA EIA assay in Morocco

**ABSTRACT** We analysed 2 evaluation lots of the TB IgA EIA test in pulmonary tuberculosis patients (TBp). Sera were obtained from 345 TBp, 18 healthy subjects (HS), 28 subjects in contact with tuberculous patients (CS) and 16 non-tuberculous lung disease patients (N TB) for the first evaluation lots and 302 TBp, 60 HS, 21 CS and 18 N-TB for the second. IgA titres against p-90 antigen with the second evaluation lot were significantly higher than the first evaluation lot. With the second evaluation lots, the sensitivity was 78.8% whereas with the first evaluation lot, the sensitivity was 75.9%. Specificity for the first and second evaluation lots was 50% and 70.7% respectively. The sensitivity of this test is still not satisfactory to establish pulmonary tuberculosis diagnosis.

<sup>1</sup>Département d'Immunologie-Virologie, Institut national d'Hygiène, Rabat (Maroc) (Correspondance à adresser à L. Baassi : baassi\_larbi@yahoo.fr).

<sup>2</sup>Hôpital My Youssef, Rabat (Maroc).

<sup>3</sup>Université Mohammed V, Faculté, des sciences, Rabat (Maroc).

Reçu : 07/01/03 ; accepté : 14/06/05

## Introduction

La tuberculose constitue un problème majeur de santé publique dans le monde et surtout dans les pays en développement. Au Maroc, bien que le taux de mortalité de la tuberculose ne soit pas un bon indicateur pour juger de l'ampleur des problèmes inhérents au diagnostic et à la conduite du traitement, ce taux est estimé à 4 pour 100 000 habitants par an. Le taux de létalité, bien qu'il ait diminué de manière significative ces dernières années, reste élevé : moins de 2,5 % pour l'ensemble du pays, avec des variations relativement importantes allant de 1 % à 9 % selon les provinces. Aussi bien les femmes que les hommes sont touchés par cette maladie ; tous les groupes d'âge sont concernés, et plus particulièrement les adultes jeunes. En effet, 70 % des tuberculeux ont un âge compris entre 15 et 45 ans, c'est-à-dire la tranche d'âge la plus productive de la population, d'où le risque de perte de potentialité sur le plan économique et social.

Depuis l'identification en 1982 de l'Ag p90 commun à *Mycobacterium tuberculosis* et *M. bovis* (BCG) et la découverte de son implication dans la réponse immune humorale antituberculeuse par Das et coll. [1], peu d'études ont été faites sur l'évaluation de cet antigène dans le diagnostic de la tuberculose. Des taux élevés d'anticorps de type IgG anti-p90 ont été observés chez des patients tuberculeux et des lépreux, les IgM elles semblent être spécifiques aux formes lépromateuses. Cependant les anticorps de type IgA anti-p90 sont spécifiques des tuberculeux [2].

Dans cette étude, nous proposons d'évaluer un test commercial basé sur la technique immunoenzymatique (ELISA) qui détecte des anticorps (IgA) anti-p90 pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire.

## Méthodes

### Technique utilisée

La technique utilisée est basée sur la détection de l'isotype A des anticorps anti-p90 (composant antigénique de *Mycobacterium tuberculosis*). Il s'agit en effet d'un test immunoenzymatique sur phase solide (TB IgA EIA, Kreatech, Amsterdam, Hollande) ; les échantillons sont répartis dans les cupules des plaques de microtitration sensibilisées par l'Ag p90, les complexes antigènes-anticorps formés sont ensuite incubés avec des anticorps anti-alphaglobulines humaines couplés à la peroxydase. Après lavage, une solution de tétraméthylebenzidine (TMB) contenant du peroxyde d'hydrogène est ensuite additionnée. Une couleur se développe lors de la réaction de la peroxydase avec le TMB ; son intensité appréciée au spectrophotomètre (densité optique [DO] à 450) est proportionnelle à la concentration des anticorps spécifiques anti-p90 éventuellement présents dans l'échantillon.

### Patients et sujets témoins

L'étude inclut des patients qui présentent une tuberculose pulmonaire (TbP), bactériologiquement confirmée, de la région du Nord du Maroc (Fès, Méknès, Tétouan, Rabat-Salé, Tanger, El Hoceima, Kenitra, Sidi Kacem, Oujda, Taza et Nador).

Cette étude a été faite en deux parties :

- dans un premier temps, 345 sérums de patients TbP, 18 sérums de sujets sains (SS), 28 sérums de sujets contacts (SC) (personnel travaillant dans les services de tuberculose de l'hôpital My Youssef) et 16 sérums de patients qui présentent une pathologie respiratoire autre que la tuberculose (N-TB) (sarcoïdose, tumeurs) sont testés avec les premiers lots du test « TB IgA EIA » (lot I : 9601, lot II : 9602 et lot III : 9702). C'est ce que

nous appellerons première évaluation (Tableau 1).

- Dans un second temps, 302 TBp, 60 SS, 21 SC et 18 N-TB sont testés avec des lots plus récents du test « TB IgA EIA » (lot IV : 9706 et lot V : 9707). C'est la seconde évaluation (Tableau 2).

### Exploitation et analyse des données

La saisie et l'exploitation des données ont été faites sur le logiciel Epi Info, les comparaisons des moyennes des DO entre les différents groupes ont dû faire appel à l'analyse de la variance lorsque les conditions de validité étaient réunies. À défaut, il a été utilisé des tests non paramétriques (Kruskal et Wallis) sur logiciel SAS. Les valeurs seuil sont déterminées par la courbe de la sensibilité en fonction de 100 % - spécificité : courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*).

Tableau 1 Caractéristiques du groupe inclus dans la première évaluation

Groupe	Effectif Nbre	Âge moyen (extrêmes) (ans)	Sex ratio (H/F)
TBpM+	320	34 (10-95)	2,0
TBpM-	25	29 (12-55)	0,9
TBp	345	34 (10-95)	1,8
SS	18	33 (25-43)	0,5
SC	28	38 (32-43)	2,1
N-TB	16	36 (26-46)	1,6
Groupe témoin	62	36 (25-46)	1,3

TBpM+ = tuberculose pulmonaire à microscopie positive ; TBpM- = tuberculose pulmonaire à microscopie négative ; TBp = tuberculose pulmonaire ; SS = sujets sains ; SC = sujets contacts ; N-TB = patients à pathologie pulmonaire autre que la tuberculose ; groupe témoin = SS, SC et N-TB ; H/F = homme/femme.

Tableau 2 Caractéristiques du groupe inclus dans la seconde évaluation

Groupe	Effectif Nbre	Âge moyen (extrêmes)	Sex ratio (H/F)
TBpM+	288	35 (10-95)	1,8
TBpM-	14	29 (12-55)	1,3
TBp	302	34 (10-95)	1,8
SS	60	32 (21-47)	2,2
SC	21	39 (32-46)	1,3
N-TB	18	36 (26-43)	1,6
Groupe témoin	99	34 (21-47)	1,0

TBpM+ = tuberculose pulmonaire à microscopie positive ; TBpM- = tuberculose pulmonaire à microscopie négative ; TBp = tuberculose pulmonaire ; SS = sujets sains ; SC = sujets contacts ; N-TB = patients à pathologie pulmonaire autre que la tuberculose ; groupe témoin = SS, SC et N-TB ; H/F = homme/femme.

## Résultats

### Première évaluation

Les titres moyens des anticorps anti-p90 dans le groupe témoin sont de l'ordre de 0,07 (E.T. 0,03), 0,28 (E.T. 0,34), 0,21 (E.T. 0,25) en DO pour les sujets sains, les sujets contacts et les patients présentant une pathologie pulmonaire autre que la tuberculose, respectivement (Tableau 3). L'analyse statistique n'a pas montré de différence significative entre le titre moyen d'anticorps anti-p90 des SC et celui des N-TB ( $p = 0,75$ ) ; par contre le titre moyen d'anticorps anti-p90 pour l'ensemble des SC et des N-TB (0,26 [E.T. 0,31]) est significativement plus élevé par rapport à celui des SS ( $p < 0,05$ ).

Les patients à tuberculose pulmonaire (TBp) montrent un titre moyen d'anticorps anti-p90 significativement plus élevé (0,45 [E.T. 0,63]) par rapport à l'ensemble des SC et des N-TB d'une part et à celui des SS d'autre part ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs,

Tableau 3 Résultats des titres moyens des anticorps anti-p90 par groupe

Groupe	Première évaluation		Seconde évaluation	
	DO moyenne (E.T.)	Nombre de positifs (%) (seuil = 0,100)	DO moyenne (E.T.)	Nombre de positifs (%) (seuil = 0,360)
TBpM+	0,46 (0,64)	246/320 (76,8)	1,10 (0,89)	229/288 (79,5)
TBpM-	0,29 (0,38)	16/25 (64,0)	0,75 (0,66)	9/14 (64,2)
TBp	0,45 (0,63)	262/345 (75,9)	1,09 (0,88)	238/302 (78,8)
SS	0,07 (0,03)	2/18 (11,1)	0,35 (0,32)	20/60 (33,3)
SC	0,28 (0,34)	20/28 (71,4)	0,42 (0,36)	5/21 (23,8)
N-TB	0,21 (0,25)	9/16 (56,2)	0,37 (0,34)	4/18 (22,2)
Groupe témoin	0,20 (0,27)	31/62 (50,0)	0,37 (0,33)	29/99 (29,2)

TBpM+ = tuberculose pulmonaire à microscopie positive ; TBpM- = tuberculose pulmonaire à microscopie négative ; TBp = tuberculose pulmonaire ; SS = sujets sains ; SC = sujets contacts ; N-TB = patients à pathologie pulmonaire autre que la tuberculose ; groupe témoin = SS, SC et N-TB ; DO = densité optique ; E.T. = écart type.

si on considère les patients à tuberculose pulmonaire uniquement, le titre moyen d'anticorps anti-p90 est plus élevé chez les patients à examen direct positif (TBpM+) que chez les patients à examen direct négatif (TBpM-), mais cette différence n'est pas statistiquement significative ( $p = 0,16$ ).

Les valeurs de sensibilité et de spécificité correspondantes à chaque valeur seuil des anticorps anti-p90 sont rapportées dans le tableau 4 et illustrées par la courbe ROC de la figure 1. Les résultats observés donnent une valeur seuil de 0,100 ; ainsi, 262 patients (246 TBpM+ et 16 TBpM-) sur les 345 TBp et 31 sujets (2 SS, 20 SC et 9 N-TB) sur les 62 sujets témoins testés sont positifs.

### Seconde évaluation

Les titres moyens des anticorps anti-p90 dans le groupe témoin sont de l'ordre de 0,35 (E.T. 0,32), 0,42 (E.T. 0,36), 0,37 (E.T. 0,34) pour les SS, les SC et les N-TB respectivement (Tableau 3). L'analyse statistique a montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les titres de ces sous-groupes du groupe témoin ( $p =$

0,75). D'autre part, les patients TBp présentent un titre moyen d'anticorps anti-p90 (1,09 [E.T. 0,88]) significativement plus élevé par rapport à celui du groupe témoin (0,37 [E.T. 0,33]) ( $p < 0,05$ ) ; en plus si on considère les patients à TBp uniquement, le titre moyen des anticorps anti-p90 est plus élevé chez les patients à TBpM+ que chez ceux à TBpM-, mais cette différence n'est pas statistiquement significative ( $p = 0,13$ ). Les valeurs de sensibilité et de spécificité correspondantes à chaque valeur seuil des anticorps anti-p90 sont rapportées dans le tableau 4 et illustrées par la courbe ROC de la figure 2. L'analyse de cette dernière a permis la détermination d'une valeur seuil de 0,360 ; ainsi, 238 patients (229 TBpM+ et 9 TBpM-) sur les 302 patients TBp et 29 sujets (20 SS, 5 SC et 4 N-TB) sur 99 sujets témoins sont positifs.

### Discussion

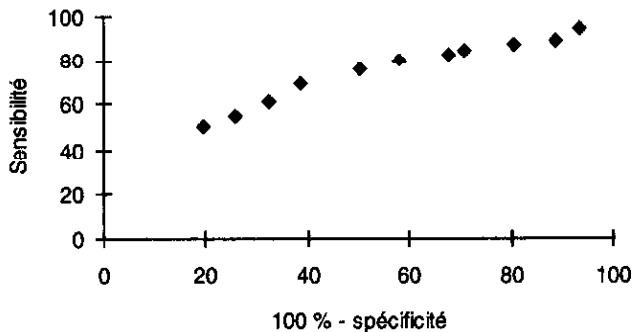
La comparaison des résultats des deux évaluations de cette étude a montré d'une manière générale une amélioration du test

**Tableau 4 Sensibilité et spécificité des IgA anti-p90 (IgA) à différentes valeurs seuil**

Valeur seuil	Première évaluation		Seconde évaluation		
	Sensibilité %	Spécificité %	Valeur seuil	Sensibilité %	Spécificité %
0,200	50,4	80,6	0,600	60,2	84,8
0,180	55,4	74,2	0,500	68,2	78,8
0,150	61,2	67,7	0,400	76,2	73,7
0,120	69,0	61,3	0,360	78,8	70,7
0,100	75,9	50,0	0,340	80,8	70,7
0,090	80,0	41,9	0,320	81,8	66,7
0,080	82,6	32,3	0,300	84,1	64,7
0,070	84,9	29,0	0,280	85,8	54,5
0,060	87,8	19,4	0,260	88,1	48,5
0,050	89,6	11,3	0,240	89,1	43,4
0,030	94,2	6,5	0,220	90,7	42,4
			0,200	93,0	38,4
			0,180	94,0	30,3

« TB IgA EIA ». En effet, les nouveaux lots que nous avons utilisés ont donné des titres d'anticorps IgA anti p-90 significativement élevés pour tous les groupes testés et permettent une meilleure différenciation entre le groupe des patients TBp d'une part et le

groupe des témoins d'autre part ( $p < 0,05$ ). En plus, le pourcentage des faux positifs et celui des faux négatifs ont diminué sensiblement de 50 % (31/62) à 29 % (29/99) et de 24 % (83/345) à 21 % (64/302), respectivement.



**Figure 1 Courbe ROC de la première évaluation**

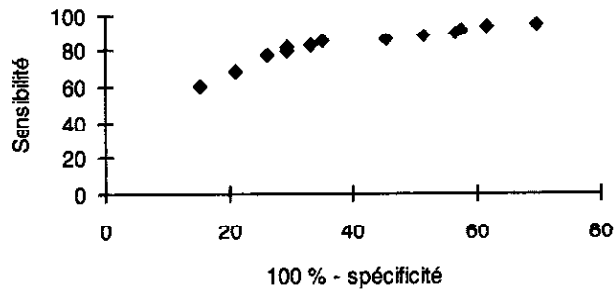


Figure 2 Courbe ROC de la seconde évaluation

D'autre part, la spécificité du test « TB IgA EIA » a été améliorée de 30 % pour atteindre 70 % dans les nouveaux lots. Cependant, cette spécificité reste toujours faible par rapport à celle obtenue par l'examen direct (99,8 %) [3,4].

Par ailleurs, la sensibilité du test « TB IgA EIA » chez les patients TBp augmente de 75,9 % (valeur prédictive positive = 89,4 %) pour la première évaluation à 78,8 % (valeur prédictive positive = 89,1 %) pour la seconde évaluation, mais cette différence n'est pas statistiquement significative ( $p = 0,38$ ). Ces résultats non satisfaisants obtenus avec la première évaluation sont dus probablement à un problème de production ou de stockage des réactifs.

En se basant sur les résultats obtenus avec la seconde évaluation, la sensibilité du test « TB IgA EIA » est élevée par rapport à celle rapportée par des études utilisant le même antigène : 70,4 % [5] et 62,5 % [6].

D'autres études utilisant l'antigène A60 (IgA), A60 (IgG) et A60 (IgM) rapportent des valeurs de sensibilité de 72,5 %, 88 % et 75 % respectivement [7,8].

D'autre part, la sensibilité chez les patients à TBpM+ est plus élevée que chez les patients à TBpM- (79,5 % contre 64,2 %). Ces résultats concordent avec ceux obtenus

avec d'autres études : 75 % (24/32) contre 67,8 % (38/56) rapportés par Alifano M. *et al.* 1997 [5]. D'autres études utilisant différents antigènes ont montré des résultats similaires : 74,3 % contre 69,2 % pour l'Ag A60 (IgA) et 77,1 % contre 65 % pour l'Ag A60 (IgG) [7]. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres études utilisant l'Ag 38 Kd (IgG) [9] et l'antigène 16 Kd rapporté par Verbon *et al.* [10]. La sensibilité élevée des tests sérologiques chez les patients à examen direct positif peut être expliquée par une exposition à une charge bactérienne importante [5,10].

Dans le groupe témoin et pour la valeur seuil choisie, les résultats montrent 29/99 faux positifs (20/60 chez les SS, 5/21 chez les SC et 4/18 chez les N-TB), ce qui nous donne une spécificité totale de 70,7 % du test « TB IgA EIA ». Ces résultats sont en désaccord avec les résultats (91,9 %) obtenus par l'équipe italienne utilisant le même antigène [5]. Une autre étude rapporte 93,9 % avec l'antigène A60 (IgA) [7].

En conclusion, malgré l'amélioration du test « TB IgA EIA » en termes de spécificité et de sensibilité, ces performances restent non satisfaisantes pour établir le diagnostic de la tuberculose pulmonaire dans la population marocaine.

### Références

1. Uhr JW, Finkelstein MS. The kinetics of antibody formation. *Progress in allergy*, 1967, 10:37-83.
2. Granfors K et al. Persistence of IgM, IgG and IgA class *Yersinia* antibodies in *Yersinia* arthritis. *Journal infectious diseases*. 1980, 141(4):424-9.
3. Aluoch JA et al. Study of case: finding for pulmonary tuberculosis in out patients complaining of a chronic cough at a distant hospital in Kenya. *American review of respiratory disease*. 1984. 129:215-20.
4. Lipsky BA et al. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. *Reviews of infectious diseases*, 1984, 6:214-22.
5. Alifano M et al. Evaluation of IgA-mediated humoral immune response against the mycobacterial antigen P-90 in diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest*, 1997, 111:601-5.
6. Chiang IH et al. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 1997, 156:906-11.
7. Alifano M et al. IgA immune response against the mycobacterial antigen A60 in patients with active pulmonary tuberculosis. *Respiration*, 1996, 63:292-7.
8. Gevaudan MJ et al. Serological response of tuberculosis patients to antigen 60 of BCG. *European journal of epidemiology*, 1992, 8(5):666-76.
9. Jackett PS et al. Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 1988, 26:2313-8.
10. Verbon A et al. Evaluation of different tests for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratios in serology. *American review of respiratory disease*, 1993, 148(2):378-84.
11. Das PK et al. Identification of mycobacterial antigens for ELISA serology in the diagnosis of leprosy and tuberculosis. *Acta leprologica*, 1989, 7(suppl. 1):117-20.
12. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in nuclear medicine*, 1978, 8:283-98.
13. Benjamin RG, Daniel TM. Serodiagnosis of tuberculosis using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of antibody to *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5. *American review respiratory disease*, 1982, 126:1013-6.
14. Das PK et al. The use of subcellular components of BCG for studying host-*Mycobacterium* interaction in relation to leprosy. *Annales d'immunologie*, 1982, 133D:41-59.
15. Morgan MA et al. Comparison of radiometric method (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. *Journal of clinical microbiology*, 1983, 18(2):384-8.
10. Blair EB, Brown G, Tull AI. Computer files and analyses of laboratory data from tuberculosis patients. II. Analyses of six years' data on sputum specimens. *American review of respiratory disease*, 1976, 113:427-32.