

## Diagnostic de la tuberculose par immunocapture du bacille tuberculeux (sur billes magnétiques)

Rabe O<sup>1</sup>, Chanteau S<sup>1</sup>, Marchal G<sup>2</sup>, Rasolofo Razanamparany V<sup>1</sup>

**RESUME** : La tuberculose est responsable d'une morbidité et d'une mortalité importantes dans le monde. Le manque de sensibilité de la microscopie, principale méthode de diagnostic, et le délai de plusieurs semaines requis par la culture ont conduit à rechercher un test diagnostique rapide, sensible et simple. Cette étude rapporte la mise au point d'un test d'enrichissement en BK dans les échantillons cliniques par immunocapture des billes magnétiques marquées avec un anticorps polyclonal dirigé contre *Mycobacterium tuberculosis*. Quand les bacilles piégés sont révélés par la microscopie, le test n'est pas plus sensible que la microscopie classique. Par contre, quand les bacilles piégés sont révélés à l'aide d'un anticorps monoclonal biotinylé anti-APA (antigène spécifique mais minoritaire sécrété par le BK) dans le système streptavidine-peroxydase, le test s'est avéré plus sensible que la lecture au microscope. Ces résultats incitent à mettre au point un système pouvant être utilisé sur le terrain, comme le test bandelette, en s'attachant à détecter des antigènes majoritaires même s'ils sont moins spécifiques de *M. tuberculosis*.

**Mots-clés** : *Mycobacterium tuberculosis* - Immunocapture - Billes magnétiques - Antigène - Madagascar.

**ABSTRACT** : "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by use of immunocapture technique" : Tuberculosis is worldwide considered as a major health problem with high morbidity and mortality rates. Diagnosis of tuberculosis can be problematic. Microscopy, as the basic diagnostic method, stands inadequately alone due to a low sensitivity, and culture suffers from being time-consuming. A rapid, sensitive and simple diagnostic test, applicable in the field is therefore highly needed. A diagnostic method for the detection of *M. tuberculosis* by immunocapture technique has been developed using magnetic beads coated with polyclonal anti-*M. tuberculosis*. The detection of captured bacilli using biotinylated anti-APA monoclonal antibody (APA is a minor secreted antigen) was found more sensitive than microscopy. The results suggest that the development of a rapid strip test to detect major antigen could be a useful tool for the control of tuberculosis.

**Key-words** : *Mycobacterium tuberculosis* - Immunomagnetic capture - Magnetic beads - Antigen - Madagascar.

### INTRODUCTION

La diminution de l'incidence de la tuberculose dans les pays en voie de développement (PVD) devra certainement passer par le développement de nouveaux vaccins, de nouveaux tests rapides de diagnostic et de nouveaux antibiotiques utilisables en schémas courts de traitement. Actuellement, les moyens essentiels pour lutter contre la tuberculose sont le dépistage et le traitement des malades sources d'infection, pour interrompre la chaîne de transmission du bacille.

Comme dans la plupart des PVD, la principale méthode utilisée par le Programme National Tuberculose (PNT) pour le dépistage des malades à Madagascar est la microscopie. La microscopie est certes rapide et peu coûteuse, mais elle est peu

sensible (>10<sup>4</sup> bacilles par millilitre d'expectorations) [1]. Elle ne permet pas de détecter les tuberculoses pulmonaires paucibacillaires le jour de l'examen, ni les tuberculoses extrapulmonaires (TEP). La culture, longue et fastidieuse, n'est pratiquée que dans des laboratoires bien équipés. Le délai dans l'obtention du résultat fait aussi que des malades sont perdus de vue. Si certaines formes de TEP, comme la tuberculose pleurale, peuvent guérir spontanément, et sont d'évolution lente, il existe des formes graves de TEP, comme la miliaire ou la méningite tuberculeuse, mortelles sans traitement, pour lesquelles un diagnostic biologique rapide serait d'une grande utilité.

De nombreux efforts ont été développés dans le monde pour améliorer le diagnostic moléculaire ou sérologique (recherche d'anticorps de la tuberculose) [2,3].

Les résultats obtenus par les différentes équipes sont très controversés, et à l'heure actuelle, aucun

<sup>1</sup> Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274 - 101 Antananarivo - Madagascar.

<sup>2</sup> Unité Physiopathologie de l'infection. Institut Pasteur à Paris, 25, rue du Dr Roux - 75724 Paris cedex 15 - France.

test ne peut être recommandé aux PNT. Les tests de détection d'antigènes sécrétés par *M. tuberculosis* dans les échantillons biologiques n'ont jusqu'à présent pas atteint une sensibilité satisfaisante pour le diagnostic. C'est le cas de l'antigène sécrété APA ("alanine-proline rich antigen") [4], dont la sensibilité n'est que de 40% pour une spécificité de 95,6% [5].

La séparation immunomagnétique est une technique couramment utilisée pour l'isolement de micro-organismes à partir des eaux, du sol ou des aliments [6,7,8]. Couplée à une PCR, cette technique a été utilisée pour la détection de *M. avium* et de *M. ulcerans* à partir de selles ou d'eaux [9,10]. Elle a également permis l'enrichissement en *M. tuberculosis* de liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients atteints de méningite tuberculeuse, avant leur mise en culture [11]. Cette séparation immunomagnétique a été appliquée ici à l'immunocapture de *M. tuberculosis* ou de ses antigènes dans les crachats ou les produits pathologiques de TEP. La détection des antigènes, des bacilles, a été effectuée dans un second temps par un anticorps monoclonal spécifique.

## MATERIELS ET METHODES

La souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv provient de l'Institut Pasteur de Paris, la souche *Escherichia coli* du Laboratoire d'Hygiène des Aliments et de l'Environnement, *Yersinia pestis* du Laboratoire de la Peste et *Proteus mirabilis* du Centre de Biologie Clinique de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM).

Les échantillons pulmonaires (crachats) et extra-pulmonaires proviennent de prélèvements reçus au Laboratoire des mycobactéries de l'IPM : 8 crachats de tuberculeux pulmonaires et 9 échantillons cliniques de tuberculeux extra-pulmonaires (liquides pleuraux, biopsies pleurales, biopsies osseuses, LCR, pus ganglionnaires) tous positifs à la culture, et 4 prélèvements (crachat, biopsie pleurale, LCR, pus) de sujets non tuberculeux, bien sûr négatifs à la culture.

Le sérum polyclonal anti-BK de lapin a été obtenu par immunisation d'un lapin avec la souche H37Rv inactivée par la chaleur. L'anticorps monoclonal de souris 1319 [12] dirigé contre l'antigène APA a été marqué à la biotine (biotinamidocaproate-N-hydroxy-sulfosuccinimide ester) à l'aide du kit de biotinylation ImmunoProbe™ (Sigma BK-101).

Pour la technique d'immunocapture du bacille tuberculeux (BK) sur billes magnétiques, il a été procédé comme suit : les anticorps IgG ont été partiellement purifiés à partir du sérum polyclonal

de lapin anti-BK, par deux précipitations successives avec 25% puis 40% de sulfate d'ammonium [13]. Puis, ils ont été fixés, soit directement sur des billes magnétiques activées (Dynabeads® M-450), soit sur des billes magnétiques préalablement marquées avec un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (Dynabeads® M-280) selon les instructions du fournisseur (DynaL®). Les billes marquées avec l'anticorps anti-BK ont ensuite été rincées avec une solution de PBS/0,1% BSA (PB), et finalement reprises à la concentration de 4 à 7,10<sup>8</sup> billes par ml de tampon PB contenant 0,02% d'azide. Les billes ainsi marquées sont utilisées pour l'immunocapture des bacilles ou des antigènes dans les prélèvements biologiques.

Avant l'immunocapture, 900 µl d'échantillon biologique sont fluidifiés pendant 20 mn sous agitation à température ambiante, en présence de 100 µl de tampon 10x PBS/1% BSA/1% Tween 20 (pour une immunocapture avec les billes M-450) ou de tampon 10x PBS/1% Tween 20 (pour les billes M-280). Puis 2,10<sup>6</sup> billes M-450 ou M-280 marquées avec l'anticorps de lapin sont ajoutées et le mélange est incubé pendant 1 heure sous agitation rotative constante à température ambiante. Les complexes billes-bacilles sont ensuite capturés à l'aide d'un portoir aimanté, rincés avec un tampon PBS /0,1% BSA /0,1% Tween 20, et repris dans 200 µl de tampon PB. La présence des bacilles est ensuite détectée soit par la microscopie après coloration de Ziehl-Neelsen, soit avec l'anticorps monoclonal 1319 biotinylé dans le système streptavidine-peroxydase. Chaque échantillon est alors testé en parallèle avec des billes marquées et non marquées (n'ayant pas fixé d'anticorps de lapin), et les résultats sont exprimés en différence de densité optique (DDO) à 492 nm entre les deux sortes de billes.

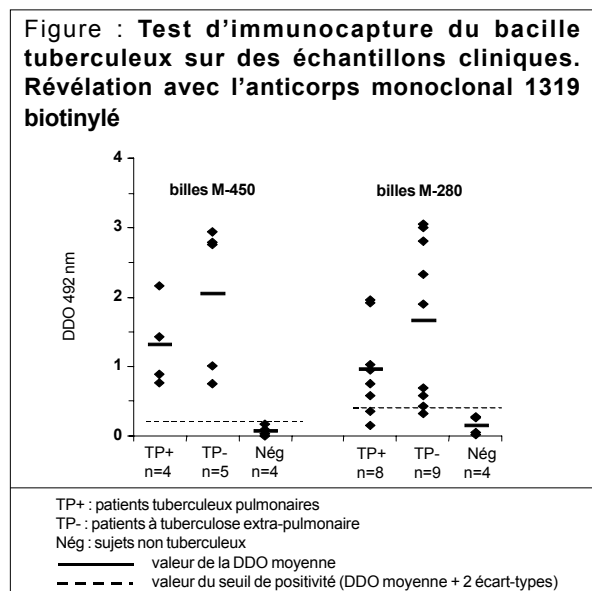
## RESULTATS

Le test d'immunocapture avec révélation par coloration de Ziehl-Neelsen a été testée sur des crachats provenant de patients tuberculeux pulmonaires et des prélèvements pathologiques de tuberculeux extra-pulmonaires. Bien qu'avec les crachats, la présence de bacilles piégés à la surface des billes ait été révélée, le nombre de bacilles observés n'est pas corrélé avec les résultats de la microscopie classique, quel que soit le type de billes utilisées. Des résultats obtenus avec les prélèvements extra-pulmonaires étant semblables, cette technique a été écartée.

BSA : Serum Albumine Bovine  
PBS : Tampon phosphate salin, pH 7,4  
PBS 10X : Tampon phosphate salin, pH 7,4, 10 fois concentré

La technique d'immunocapture avec révélation avec l'anticorps monoclonal 1319 a d'abord été testée sur des suspensions de colonies de H37Rv comme témoin positif, et des colonies d'*E. coli*, de *Y. pestis* et de *P. mirabilis* comme témoins négatifs. La concentration des suspensions bactériennes a été ajustée par opacimétrie avec la solution de référence BCG-opacimétrie à 1 mg/ml (Sanofi Diagnostics Pasteur). Quel que soit le type de billes utilisées, Dynabeads M-450 ou M-280, la réponse est significativement plus élevée avec la suspension de H37Rv qu'avec les autres bactéries, la réponse est proportionnelle à la concentration de H37Rv.

Le test a été aussi évalué avec des prélèvements de tuberculeux confirmés (crachat, liquide pleural, biopsie pleurale, biopsie osseuse, LCR, pus) et de non tuberculeux (Figure). La DDO moyenne est significativement plus élevée chez les tuberculeux que chez les non tuberculeux, que l'on utilise les billes M-450 ( $1,721 \pm 0,937$  versus  $0,071 \pm 0,068$ ;  $p = 0,005$ ) ou les billes M-280 ( $1,34 \pm 1$  versus  $0,150 \pm 0,14$ ;  $p = 0,004$ ). Si l'on fixe le seuil de positivité à DDO moyenne + 2SD, les 4 prélèvements provenant de sujets non tuberculeux sont négatifs avec les deux types de billes. Pour les prélèvements provenant de sujets tuberculeux, on trouve une sensibilité de 100% (9+/9) avec les billes M-450 et de 76% (13+/17) avec les billes M-280 (Figure).



## DISCUSSION

L'antigène APA représente environ 2% des protéines sécrétées par le bacille *M. tuberculosis* au cours de la culture et environ 0,1% de la masse des bacilles eux-mêmes [4]. La recherche de cet antigène dans les échantillons biologiques provenant de patients tuberculeux par la technique ELISA

s'est révélée peu sensible, probablement à cause du faible taux d'antigène présent dans les produits biologiques [5]. La technique d'immunocapture de bacilles sur billes magnétiques, décrite rapidement ici, a permis de concentrer les antigènes et les bacilles présents dans les échantillons, et donc de les rendre plus faciles à détecter, en particulier dans les prélèvements paucibacillaires.

L'immunocapture avec révélation par la microscopie, moins sensible et plus fastidieuse que l'examen direct des crachats par la bacilloscopie classique, a été écartée. Par contre, le système de révélation avec l'anticorps monoclonal anti-APA est beaucoup plus sensible, surtout avec les billes M-450 (fixation covalente des anticorps sur les billes). Il n'a pas été possible de déterminer si les billes marquées avec l'anticorps polyclonal de lapin capturaient le bacille entier et/ou des molécules d'antigène APA excrétées, révélées ensuite par l'anticorps monoclonal. Toutefois, les résultats obtenus confirment la possibilité de mettre en évidence un antigène minoritaire comme l'antigène APA dans les produits pathologiques, qu'il soit à la surface des bacilles ou libre. Cette technique est encore lourde à mettre en œuvre et ne peut pas être utilisée à grande échelle. Elle n'est pas applicable dans les laboratoires périphériques. Elle indique cependant qu'une mise au point d'un test rapide de détection des antigènes de *M. tuberculosis* est possible. Des systèmes plus pratiques utilisant l'ELISA classique ou des bandelettes immunochromatographiques devraient être envisagés. La mise en évidence d'autres antigènes, sécrétés en plus grande quantité par *M. tuberculosis*, permettrait d'augmenter la sensibilité de cette méthode.

## REFERENCES

- 1- **Toman K.** Dépistage et chimiothérapie de la tuberculose : questions et réponses. Paris : Masson, 1980 : 255p.
- 2- **Daniel TM, Debanne SM.** The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1996; **135** : 1137-1151.
- 3- **Grange JM.** The humoral immune response in tuberculosis : its nature, biological role and diagnosis usefulness. *Adv Tuberc Res* 1984; **21** : 1-78.
- 4- **Laqueyrie A, Militzer P, Romain F, Eiglmeier K, Cole S, Marchal G.** Cloning, sequencing, and expression of the *apa* gene coding for the *Mycobacterium tuberculosis* 45/47-Kilodalton secreted antigen complex. *Infect Immun* 1995; **63** : 4003-4010.
- 5- **Chanteau S, Rasolof V, Rasolonavalona T, Ramarokoto H, Horn C, Aurégan G, Marchal G.** 45/47 kilodalton (APA) antigen capture and antibody detection assays for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; **4** : 377-383.

- 6- **Porter J, Mobbs K, Hart AC, Saunders JR, Pickup RW, Edwards C.** Detection, distribution and probable fate of *Escherichia coli* O157 from asymptomatic cattle on a dairy farm. *J Applied Microbiol* 1997; **83** : 297-306.
  - 7- **Blake MR, Weimer BC.** Immunomagnetic detection of *Bacillus stearothermophilus* spore in food and environmental samples. *Applied Envir Microbiol* 1997; **63** : 1643-1646.
  - 8- **Deng MQ, Cliver DO, Mariam TW.** Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Applied Envir Microbiol* 1997; **63** : 3134-3138.
  - 9- **Li Z, Bai GH, von Reyn CF, Marino P, Brennan MJ, Gine N, Morris SL.** Rapid detection of *Mycobacterium avium* in stools samples from AIDS patients by immunomagnetic PCR. *J Clin Microbiol* 1996; **34** : 1903-1907.
  - 10- **Roberts B, Hirst R.** Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Mycobacterium ulcerans*. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 2709-2711.
  - 11- **Mazurek GH, Reddy V, Murphy D, Ansari T.** Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in cerebrospinal fluid following immunomagnetic enrichment. *J Clin Microbiol* 1996; **34** : 450-453.
  - 12- **Horn C, Pescher P, Romain F, Marchal G.** Characterization of murine monoclonal antibodies specific for the 45/47 kDa antigen complex (APA) of *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* and BCG. *J Immunol Methods* 1996; **197** : 151-159.
  - 13- **Dawson RMC, Elliott WH.** Purification procedures : bulk methods. In : Dawson RMC, Elliott WH, Elliott DC, Jones KM. Data for Biochemecal Research. London : Oxford University Press, 1969 : 290-295.
-