

REUNIÓN DE PRIMAVERA DE LA SCCALP

Mesa Redonda: Diagnóstico clínico en Pediatría

Diagnóstico de infección tuberculosa. Papel de los IGRAs

J.J. PALACIOS GUTIÉRREZ

Unidad de Referencia Regional de Micobacterias. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

INTRODUCCIÓN

El factor esencial para el control de la tuberculosis (TB) es el diagnóstico de la enfermedad en sus primeras etapas y el tratamiento correcto de los pacientes. Sin embargo, para poder controlar realmente la TB es necesario, además, identificar y tratar a los individuos infectados antes de que progresen hacia enfermedad y se conviertan en fuente de contagio. La prueba de la tuberculina (PT) es la herramienta clásica para el diagnóstico de la infección tuberculosa; pone de manifiesto un estado de hipersensibilidad retardada del organismo frente a la inyección de un derivado proteico purificado (PPD). El principal inconveniente de la PT radica en que la mayoría de proteínas presentes en el PPD no son específicas de *M. tuberculosis* sino que las comparte con otras micobacterias no tuberculosas (MNT). Esto conlleva una disminución en la especificidad de la prueba, ya que individuos sensibilizados por exposición previa a MNT o vacunados con BCG pueden dar falsos positivos.

La técnica de Mantoux consiste en la inyección intradérmica con aguja del calibre 27 en la cara anterior del antebrazo de 2 unidades de tuberculina PPD RT-23 (0,1 ml), en una zona donde no existan lesiones cutáneas. Debe producirse una pápula de 6-10 mm de diámetro en el momento de la inyección para que la técnica sea correcta. A las 72 horas de la inyección se realiza la lectura midiendo el diámetro transversal de la induración según el eje longitudinal del antebrazo. El resultado se registra en milímetros.

Según SEPAR (Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica) se considera positiva una induración ≥ 5 mm en personas no vacunadas; en personas vacunadas con BCG

se tienen en cuenta determinadas condiciones clínicas, considerando PT positiva con diámetro ≥ 5 mm si además de vacunados son convivientes o mantienen contactos frecuentes con pacientes bacilíferos, si presentan radiografía de tórax con lesiones sugestivas de tuberculosis antiguas y que nunca hubieran sido tratados, si están infectados por VIH o si son enfermos de neumonosis. En el resto de vacunados con BCG, se considera infección y no reacción secundaria a la vacuna si el tamaño de la induración es > 15 mm.

Cuando se trata de un estudio de contactos la interpretación se simplifica bastante ya que no se debe tener en cuenta el antecedente vacunal y habrá que considerar una induración ≥ 5 mm como indicativa de infección tuberculosa.

Existen determinadas circunstancias clínicas bien conocidas que pueden provocar tanto falsos positivos como falsos negativos de la prueba.

En algunos individuos, fundamentalmente en personas mayores infectadas años antes, o en personas vacunadas en la infancia, una primera prueba de la tuberculina puede ser negativa y cuando se repite 7-10 días después hacerse positiva (fenómeno *booster*). Se considera que el resultado definitivo de la prueba es el de la segunda lectura.

NUEVAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO *IN VITRO* DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA

En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos diagnósticos basados en la cuantificación *in vitro* de la respuesta inmune celular. Estos métodos, denominados genéricamente con el acrónimo IGRAs (*Interferon-Gamma-Release*

Correo electrónico: juanjose.palacios@sespa.princast.es

© 2011 Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León
 Éste es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de la licencia Reconocimiento-No Comercial de Creative Commons (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5/es/>), la cual permite su uso, distribución y reproducción por cualquier medio para fines no comerciales, siempre que se cite el trabajo original.

se Assays) detectan la liberación de interferón-gamma por las células T sensibilizadas en respuesta a diferentes antígenos micobacterianos. El interferón-gamma es una molécula importante para el control de la infección tuberculosa, su participación es imprescindible en la respuesta inmune protectora frente a dicho microorganismo. Esta citoquina, producida por los linfocitos T CD4+, CD8+ y NK, activa a los macrófagos infectados con la consiguiente liberación de IL-1 y TNF- α , que limitan el crecimiento y multiplicación de las micobacterias. Los individuos con deficiencias en los receptores o en los genes que codifican la síntesis de esta molécula son más susceptibles de padecer infecciones micobacterianas con mayor frecuencia y de mayor gravedad.

Los principales antígenos utilizados son ESAT-6 (*Early Secreted Antigenic Target-6*) y CFP-10 (*Culture Filtrate Protein-10*). Estas dos moléculas son péptidos sintéticos que están codificados por la región de diferencia 1 (RD1) del genoma del *M. tuberculosis*. Estos antígenos están ausentes en *M. bovis* BCG y en la mayoría de las MNT (excepto *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*).

Existen dos técnicas comercializadas para el diagnóstico *in vitro* de la infección tuberculosa: el T-SPOT.TB (Oxford Immunotec®, Oxford, UK) y el QuantiFERON-TB-Gold In Tube (Cellestis®, Victoria, Australia), esta última incorpora un tercer antígeno, el TB 7.7 codificado por la región de diferencia RD11.

Realización e interpretación de las pruebas

1. QuantiFERON-TB-Gold In Tube: para realizar la prueba se emplean 3 tubos específicos que se sirven con el kit de reactivos (uno de los tubos incluye los antígenos tuberculosos específicos ESAT-6, CFP-10, TB 7.7 –tubo problema–, otro contiene fitohemaglutinina –tubo control positivo– y el tercero no contiene reactivos –tubo control negativo–). Se precisan en total 3 ml de sangre (1 ml por tubo) y la sangre es extraída directamente en los propios tubos. Posteriormente, y previa agitación de los tubos, se lleva a cabo la incubación de los mismos durante 18-22 h en estufa a 37°C, tras lo cual los tubos se centrifugan y el plasma obtenido se emplea para realizar el ensayo inmunoenzimático que permite detectar y cuantificar el interferón gamma liberado por los linfocitos del paciente. Este paso puede ser realizado de manera manual o totalmente automatizado. El plasma también puede ser almacenado lo que permite al laboratorio diferir la realización de la prueba y organizar la carga de trabajo. La técnica emplea software específico para la emisión de los resultados.
2. T-SPOT.TB: para realizar la prueba se emplean 8-10 ml de sangre heparinizada. En el laboratorio, y siguiendo

las indicaciones del fabricante, debe separarse la capa mononuclear, que tras los lavados oportunos y un posterior recuento de las células presentes, permitirá ajustar el número de células a una cantidad de 250.000 células/ml. Esta cantidad de células será la que se utilizará como inóculo para interactuar con los antígenos micobacterianos (consta de una placa con 4 pocillos, 2 contendrán los antígenos ESAT-6 y CFP-10, y los otros 2 se destinarán a control positivo y negativo respectivamente). La placa se incubará 18-22 h a 37°C en estufa de CO₂, tras lo cual se procede a realizar el *immunospot* que permite cuantificar el número de células productoras de interferón (lo que se evidencia como número de manchas o *spots*). Cada mancha representa la huella de un linfocito T individual secretor de interferón. Un algoritmo de interpretación facilitado por el fabricante facilita la emisión de los resultados.

Técnicamente, T-SPOT.TB, requiere más sangre, mayor tiempo de preparación y es más laborioso de realizar que QuantiFERON-TB-Gold In Tube, y además no permite trabajar con las muestras de manera diferida. QuantiFERON-TB Gold In-tube parece más recomendable para el ámbito extra-hospitalario y para estudios de contactos más o menos numerosos. T-SPOT.TB parece más recomendable para el ámbito hospitalario, especialmente en pacientes con inmunodepresión, o en valoraciones previas a terapias con inmunosupresores en general y anti-TNF en particular; aunque, probablemente, en estos casos, lo más recomendable sea la realización simultánea de ambos IGRAs.

Ventaja de las técnicas de determinación de IGRAs sobre la prueba de la tuberculina

Las nuevas técnicas de diagnóstico *in vitro* de la infección tuberculosa ofrecen importantes ventajas sobre la PT: no presentan interferencias con la vacuna BCG; se evita la subjetividad de la interpretación; evitan la visita de lectura; incorporan un control positivo que proporciona valiosa información a la hora de interpretar una prueba, aparentemente negativa, como verdadera negativa o indeterminada como resultado de errores técnicos o por la inmunodepresión.

Sensibilidad y especificidad

En ausencia de una auténtica prueba de referencia para el diagnóstico de la infección tuberculosa es difícil establecer la sensibilidad y especificidad de estas nuevas técnicas diagnósticas.

Para solventar el problema de la sensibilidad se han utilizado tres estrategias: 1) Evaluar a los pacientes que tienen una tuberculosis activa y por lo tanto deben estar infecta-

TABLA I. RECOMENDACIONES DE USO DE IGRAS DE LOS CENTERS FOR DISEASES CONTROL⁽²⁾.

- **Se pueden emplear en todos los casos** en los que la prueba de la tuberculina está actualmente recomendada.
- Deberán **utilizarse en lugar** de la prueba de la tuberculina y **no además** de ella.
- **No se recomienda usar solamente** IGRAs para excluir LTBI en:
 - Inmunodeprimidos.
 - Niños menores de 5 años de edad.
 - Pacientes que van a ser tratados con antagonistas TNF- α .

dos; 2) Evaluar a los individuos que han estado en contacto con pacientes tuberculosos y estratificarlos en función del grado de exposición; y 3) Analizar la concordancia entre las pruebas de determinación de IGRAs y la prueba de la tuberculina.

La bibliografía relacionada con los IGRAs es muy extensa y variada, pero un reciente meta-análisis¹ nos permite una aproximación al rendimiento de esta metodología diagnóstica. De los trabajos incluidos se puede inferir una cifra de sensibilidad del 87,5% para T-SPOT.TB; del 74-84% para QuantiFERON-TB-Gold In Tube; y del 70% para la prueba de la tuberculina. En cuanto a la especificidad, 99% para QuantiFERON-TB-Gold In Tube y 86% para T-SPOT.TB.

NORMATIVAS

Las diferentes normativas en lo que se refiere al uso de IGRAs dependen de cada país, así por ejemplo, los CDC (Centers for Diseases Control) en EEUU recomiendan sustituir la prueba de la tuberculina por los IGRAs en todos los casos. Por el contrario en el Reino Unido, *The National Institute of Health and Clinical Excellence* (NICE) recomienda el uso de los IGRAs en combinación con la prueba de la tuberculina, pero sólo en aquellos casos en los que la tuberculina haya sido positiva. En las tablas I y II presentamos un extracto de algunas recomendaciones de uso de distintas instituciones.

Discordancias en los resultados y posibilidades futuras

El estudio de los resultados discordantes entre la tuberculina y los IGRAs, y de los IGRAs entre sí, sin duda requiere una atención especial. Además de las discordancias entre tuberculina e IGRAs atribuibles a la infección por MNT, se ha sugerido que también podrían guardar relación con la detección de la infección remota *versus* reciente. El formato actual de los IGRAs se basa en una estimulación de las célu-

TABLA II. RECOMENDACIONES DE USO DE IGRAS DEL CANADA COMMUNICABLE DISEASE REPORT⁽³⁾.

- **IGRAs y tuberculina no permiten distinguir** entre LTBI y enfermedad activa
- **IGRAs** presentan una **elevada especificidad en vacunados** 93-99%, son más consistentes los estudios con QFT que con T-SPOT.TB (derivan de la experiencia con la versión ELISPOT)
- **Tuberculina especificidad alta** (aprox. 97%) en **no vacunados** y es **variable o baja** (aprox.60%) en **vacunados**
- **IGRAs sensibilidad en TBC activa 75-90%** (QFT aprox. 75-80%, T-SPOT.TB aprox. 90%), tuberculina similar a QFT inferior a T-SPOT.TB
- Existen **pocos estudios**, y son **muy heterogéneos**, sobre **sensibilidad IGRAs en inmunodeprimidos**, T-SPOT.TB parece superar a la tuberculina
- **IGRAs en estudio de contactos** se correlacionan bien con otros marcadores pero **no necesariamente mejor que la tuberculina en todas las poblaciones**
- **IGRAs se correlacionan mejor que la tuberculina** en poblaciones con **incidencia baja + BCG**
- Siempre se encontrarán **casos con discordancias entre IGRAs y tuberculina** pero **no siempre podrán ser explicadas**. Parecen reducirse cuando se modifican los puntos de corte
- **Discordancias significativas en personal sanitario tuberculina+,IGRAs-**
- **IGRAs en < 18 años sensibilidad en TBC activa variable** T-SPOT.TB parece superior a QFT
- **Discordancias frecuentes en niños tuberculina+,IGRAs-**
- **IGRAs están descritas conversiones y reversiones**, su **valor pronóstico se desconoce**
- En la actualidad **se desconoce el valor predictivo de IGRAs**, los **resultados** de los 3 estudios publicados **no son consistentes**.

las de corta duración (18 h) con los antígenos micobacterianos. Por lo tanto, se considera que estas técnicas únicamente detectan infección tuberculosa recientemente adquirida. La producción del interferón-gamma por las células T memoria podría ser detectado por técnicas *in vitro* tras períodos de incubación mayores. Poder identificar los individuos recientemente infectados tiene una gran trascendencia en la práctica clínica, ya que son los que tienen un riesgo mayor de progresión hacia enfermedad. Algunos estudios en inmunodeprimidos, y también en población pediátrica, han mostrado que cuando existe discordancia entre los IGRAs, esta discordancia tiene una correlación negativa entre el número de células T que responden y la cantidad de interferón-gamma producido. Es decir, que presentan muchas células T reactivas, pero que producen una muy pequeña cantidad de interferón-gamma. Otro aspecto a tener en cuenta es que la infección por *M. tuberculosis* debería ser contemplada como

un espectro continuo, que va desde una situación de eliminación total de la micobacteria por la respuesta inmune, pasando por una situación de TB subclínica, hasta una enfermedad tuberculosa establecida, por lo que la designación convencional de infección o enfermedad tuberculosa en realidad corresponde a diferentes regiones de heterogeneidad biológica que se solapan parcialmente. Aún no está suficientemente estudiada la respuesta inmune mediada por células T frente a antígenos de persistencia de *M. tuberculosis*, especialmente en el contexto de la latencia y de la protección contra la progresión hacia la enfermedad tuberculosa. Durante la latencia *M. tuberculosis* está sometido a una privación de nutrientes y oxígeno, y como parte de su respuesta adaptativa expresa una serie de proteínas que están codificadas en genes relacionados con la latencia, denominados de forma conjunta como *Dormancy-related (DosR) antigens*. Estos antígenos inducen en las células T humanas la expresión de citoquinas y de algunos factores ligados a la resucitación (*resuscitation-promoting factors* y *resuscitation-associated protein*). Las funciones de muchas de estas proteínas no están todavía totalmente caracterizadas. También se han

descrito que algunos antígenos relacionados con latencia son más frecuentemente reconocidos por individuos infectados que por pacientes con TB activa. Por lo tanto, son necesarios nuevos antígenos de latencia que exploren la biología de la respuesta inmune durante la infección, que permitan caracterizar la respuesta protectora, identificando infección remota y reciente, y que permitan diferenciar entre infección y enfermedad tuberculosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active tuberculosis-a meta-analysis. *Chest*. 2010; 137: 952-968.
2. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection. *Morbidity and Mortality Weekly Report MMWR*. June 25, 2010/Vol. 59/No. RR-5.
3. Recommendations on Interferon Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection-2010 Update. *Canada Communicable Disease Report CCDR*. June 2010, volume 36, ACS-5.