

4ª Mesa Redonda: Tuberculosis pulmonar: estado actual

APORTACIÓN DE LOS IGRA (TEST DE INTERFERON GAMMA) EN TUBERCULOSIS

E. Pérez Escolano¹, J. Gutiérrez Rodríguez².

¹ Unidad Clínica de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Hospital de Jerez de la Frontera, ² Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

elviraperez@terra.es

La tuberculosis (TB) es una pandemia que sigue cobrándose anualmente cerca de 2 millones de vidas, con una incidencia de más de 9 millones de nuevos casos al año. Además se estima que un tercio de la población mundial alberga la infección tuberculosa latente (ITBL) de la que puede surgir en cualquier momento la enfermedad activa y transmisible. La estrategia de la OMS Alto a la Tuberculosis (*Stop TB*) en el Plan Mundial TB 2011-2015 renueva esfuerzos con nuevos enfoques y herramientas para conseguir en el año 2015 reducir la prevalencia de muertes por TB en un 50% comparado con los datos de 1990, hasta eliminar la TB como un problema de salud pública en el año 2050 (incidencia menor a 1 caso anual por 1 millón de habitantes de forma global). Su estrategia se basa prioritariamente en conseguir un diagnóstico precoz, con nuevos métodos diagnósticos más eficaces y rápidos, y en el manejo adecuado de fármacos para conseguir la curación de los casos. Con respecto a la ITBL, considera de nuevo la reducción del reservorio de infectados vigilando y tratando a contactos de TB, poblaciones vulnerables, especialmente a infectados por el VIH, trabajadores sanitarios y personas pertenecientes a otras colectividades. También recomienda intensificar la actividad investigadora para conseguir terapias de la infección más cortas con nuevas drogas¹. Por ello, un paso importante para conseguir la meta planteada es la introducción de nuevos métodos diagnósticos más precisos para identificar la ITBL que permitan ofrecer de manera más fiable terapias preventivas para detener la progresión a TB y así evitar la transmisión de *M. tuberculosis* (MT)².

La ITBL hasta fechas recientes se ha identificado exclusivamente mediante la prueba cutánea de la tuberculina (PT), evaluada ampliamente en cuanto a potencialidad y limitaciones para la prevención de la tuberculosis³. Sin embargo la PT no discrimina entre infección potencial por MT y vacunación previa

con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), o la posible infección por micobacterias no tuberculosas (MNT). Existen actualmente nuevas técnicas diagnósticas, basadas en la cuantificación in vitro de la respuesta inmune celular específica frente a MT, que han generado fundadas expectativas en el diagnóstico de la ITBL. Estas técnicas, denominadas en su conjunto determinaciones de la liberación de interferon gamma (Interferon Gamma Release Assays: IGRA), se basan en el principio de que las células T (CT) sensibilizadas de los individuos con infección y enfermedad tuberculosa producen interferón gamma (IFN- γ) al reencontrarse con los antígenos de MT⁴. Los antígenos que utilizan los IGRA son expresadas por bacilos metabólicamente activos y viables^{5,6} procedentes casi exclusivamente del complejo *M. tuberculosis*, con la excepción de *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* y *M. riyadhense*, y que están ausentes en la BCG y en la mayoría de las MNT⁷ lo que les confiere una elevada especificidad.

Uno de estos métodos comercializados es QuantiFERON®-TB Gold In-Tube (QFT-GIT), (Cellestis Ltd., Carnegie, Australia) aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en octubre 2007 y siendo ya la tercera generación de esta técnica, utiliza los antígenos micobacterianos *early secreted antigenic target 6* (ESAT-6), *culture filtrate protein 10* (CFP-10), codificados en la región genómica RD1 de MT, y el antígeno Rv2654 (TB7.7) codificado en la RD11. Tras la estimulación in vitro de los linfocitos con estos antígenos, las células T efectoras circulantes contenidas en un mililitro de sangre total producen liberación de IFN- γ que es cuantificable en el sobrenadante mediante técnica de inmunoensayo (*enzyme-linked immunosorbent assay*: ELISA)⁸.

El otro método comercializado, T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec Ltd., Abingdon, Reino Unido), aprobado por la FDA en julio 2008, utiliza los antígenos ESAT-6 y CFP-10 y determina la proporción de linfocitos T que liberan IFN- γ mediante captura y presentación en forma de manchas o "spots", utilizando técnica de inmunospot (*enzyme-linked immunospot*: ELISPOT)⁹. Concretamente, la diferencia básica entre ambos indicadores de infección TB es que ELISA mide la producción total de IFN- γ y ELISPOT mide el número de células productoras de IFN- γ a partir de un total de $2,5 \times 10^5$ de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por Peripheral Blood Mononuclear Cells).

Ambos ensayos incuban las muestras sanguíneas en contacto con los antígenos durante 16-24 horas y compa-

ran los resultados con un control negativo y un control positivo. El control negativo permite evaluar la reactividad inespecífica. Además disponen de un control con un mitógeno (la lectina fitohemaglutinina) para evaluar la capacidad de respuesta general de los linfocitos T. Una respuesta del mitógeno ausente califica el resultado como "indeterminado", ofreciendo información relevante en pacientes inmunocomprometidos¹⁰. Los puntos de corte proporcionados por los fabricantes son los recomendados para indicar un resultado de la prueba positivo, negativo o indeterminado.

La ventaja del T-Spot®.TB frente al QFT-GIT es el uso de una cantidad estándar y conocida de células viables durante el estímulo (2,5 x 10⁵ PBMC) frente a una cantidad indeterminada de linfocitos contenidos en un mililitro de sangre en el caso del QFT-GIT. Al estar menos afectada la técnica por el número de linfocitos CD4 disminuye el número de falsos negativos cuando se analizan muestras de individuos inmunodeprimidos con T-Spot®.TB¹¹⁻¹³. La principal ventaja del QFT-GIT frente al T-Spot®.TB es logística, en la obtención, transporte y manipulación de la muestra. Por ser una técnica menos compleja, que no requiere mucho entrenamiento para desarrollarla, el ahorro de recursos humanos se ve reflejado en un coste menor. Con respecto a la PT los IGRA ofrecen de forma operativa ventajas con respecto a objetividad en los resultados, se necesita una sola visita del paciente, pueden discriminar respuestas negativas y anergia, y además carecen de efecto de empuje o booster secundario a la repetición de la PT, presentando en la población vacunada una menor interferencia en los resultados que la PT. Sin embargo, el alto coste de estos nuevos métodos es su principal inconveniente, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde se encuentran la mayoría de los pacientes infectados, aunque su implantación podría representar un ahorro de los costes al disminuir los falsos positivos de la PT y como consecuencia radiografías, visitas médicas y tratamientos de la ITBL innecesarios.

SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD

Para evaluar la sensibilidad y la especificidad de los IGRA existe el inconveniente de la ausencia de una prueba estándar de referencia para el diagnóstico de la ITBL, por lo que para solventar este problema se han usado distintas estrategias. Con respecto a la determinación de la sensibilidad de estos tests se han evaluado por una parte a pacientes con TB activa y por otra a los contactos de enfermos TB estratificados según

el grado de exposición, comparando los resultados de ambas técnicas: IGRA en sus distintas versiones y PT. Para determinar la especificidad los estudios se realizan en países de baja prevalencia y en entornos sin riesgo de ITBL o TB anterior.

Sensibilidad

En un metanálisis reciente¹⁴ en el que se analizan los IGRA en el diagnóstico de la TB activa la sensibilidad combinada de la PT fue de 65% (IC 95%: 61-68%) para todos los pacientes con TB (confirmados y no confirmados por cultivo). Cuando se evaluó solamente a los pacientes con cultivo de TB confirmado, la sensibilidad combinada fue de 68% (IC 95%: 63-72%). La sensibilidad combinada del QFT-GIT fue del 80% (IC 95%: 75-84%) para todos los pacientes con TB (confirmados y no confirmados por cultivo). La sensibilidad combinada fue del 81% (IC 95%: 78-84%) para todos los pacientes con TB confirmada por cultivo. La sensibilidad combinada para T-SPOT®.TB fue del 81% (IC 95%: 78-84%) para todos los pacientes con TB (confirmados y no confirmado por cultivo). La sensibilidad combinada del T-SPOT®.TB fue del 92% (IC 95%: 90-93%) cuando los pacientes con cultivo confirmado de TB se evaluaron de forma independiente.

Aunque la sensibilidad diagnóstica de ambos IGRA fue mayor que la de la PT para el diagnóstico de TB activa, es demasiado baja para apoyar su uso como prueba diagnóstica por si sola en la enfermedad TB. Puede que esta baja sensibilidad sea debida en parte a la heterogeneidad de los distintos estudios (tuberculosis avanzada, comorbilidad, países con diferentes endemia, etc.).

En otro metanálisis anterior¹⁵ se analizó la sensibilidad utilizando un gradiente de exposición de los contactos como indicador de la probabilidad de ITBL. Se compararon IGRA y PT en 10 estudios, obteniendo que la prevalencia de ambos tests positivos fue mayor en los grupos más expuestos. En los grupos menos expuestos y donde las poblaciones habían sido vacunadas con BCG a edades avanzadas (2 estudios), la prevalencia de resultados positivos en la PT fue mayor que en los IGRA. En un estudio, la prevalencia estimada de ITBL fue del 30% en el grupo menos expuesto, sin embargo, sólo el 4% tuvo un resultado positivo en el IGRA.

Especificidad

La especificidad fue definida como el número de verdaderos negativos dividido por la suma de verdaderos

negativos y falsos positivos. Es por tanto, la capacidad de medición exacta de la prueba para detectar a los sujetos libres de ITBL, independientemente de su estado de vacunación con BCG.

De los estudios publicados¹⁶, sólo 4 evaluaron la especificidad con las pruebas QFT-GIT y/o T-SPOT®. TB, cumpliendo los criterios de inclusión con resultados válidos para los IGRA un total de 346 sujetos. La especificidad de los IGRA osciló entre 98% (IC 95%: 86,8-99,9%) para el T-SPOT®.TB y el 100% (IC 95%: 97,6-100%) para la prueba QFT-GIT, con estimaciones de especificidad en los cuatro estudios del 99,4% (IC 95%: 97,9-99,9%). En los datos que pudieron ser analizados, se encontró que la especificidad de la PT osciló entre el 55% (IC 95%: 38,5- 70,7) y el 95% (IC 95%: 87,7-97,2%). con una especificidad agrupada del 88,7% (IC 95%: 84,6-92,0). Al comparar los resultados de los IGRA con la PT, sólo unos pocos sujetos no expuestos a MT tuvieron un resultado positivo con IGRA en comparación con la PT, en particular en las personas vacunadas con BCG o con infección por MNT confirmada.

La especificidad agrupada (99,4%, IC 95%: 97,8-99,9%) del QFT-GIT en grupos de población de bajo riesgo fue claramente superior a la especificidad agrupada para la PT (88,7%, IC 95%: 84,6-92,0%). Estos resultados sugieren que los IGRA son más ciertos que la PT para identificar correctamente a las personas no infectadas por MT. Sin embargo, las estimaciones deben interpretarse con precaución debido al bajo número de estudios incluidos.

VALOR PREDICTIVO

Sólo han sido publicados hasta la fecha 6 estudios que evalúan el valor predictivo de los IGRA, surgidos a raíz de estudios longitudinales recientes.

Valor predictivo positivo

El valor predictivo positivo (VPP) se define como la proporción de sujetos con resultados de IGRA positivos que, tras un seguimiento, desarrollan la enfermedad TB. Cuatro estudios investigaron la probabilidad de desarrollar enfermedad TB tras obtener un IGRA positivo, dos fueron estudios de cribado entre personas VIH-positivas, mientras que otros dos consistieron en investigaciones de contactos con sujetos autóctonos e inmigrantes en Alemania y Holanda. La tasa de progresión a enfermedad tuberculosa entre los sujetos que resultaron positivos para la ITBL y que se negaron al tratamiento preventivo, varió desde 2,3-3,3% para la

PT, a 2,8-14,3% para el QFT-GIT y a 3,3-10% para T-SPOT®.TB.

Ambos IGRA mostraron un VPP similar, con rangos ligeramente mayores que la PT (QFT-GIT: 2,8-14,3%; T-SPOT®.TB: 3,3-10% y PT: 2,3-3,3%). Las tasas de progresión a los 2 años de seguimiento fueron superiores (8, 10 y 15%) que las notificadas para la PT^{17, 18, 19}. Todo ello sugiere que los IGRA tienen un mayor VPP para el desarrollo de la enfermedad TB que la PT.

No obstante los estudios sobre el VPP de los IGRA son escasos, frecuentemente varían en los diseños y se basan en observaciones empíricas de los sujetos que rechazan el tratamiento de ITBL. Por ello son necesarios estudios adicionales más amplios con nuevos biomarcadores y que incluyan grupos con mayor riesgo de progresión de TB, especialmente en niños y en inmunocomprometidos.

Valor predictivo negativo

El valor predictivo negativo (VPN) se define como la proporción de personas evaluadas para ITBL con IGRA negativos que no progresarán a TB activa tras un seguimiento y siempre que no tengan una nueva exposición a MT. En 5 estudios realizados en países de baja incidencia de TB el VPN fue alto, aunque se incluyeron los sujetos con mayor riesgo de desarrollar TB. Para estos cinco estudios, el VPN agrupado para el QFT-GIT fue del 99,8% (IC 95%: 99,4-100%, 3 personas contrajeron TB entre los 1.442 negativos) y 97,8% (IC 95%: 94,5-99,4%) para el T-SPOT®.TB (4 personas contrajeron TB entre los 182 negativos). Por el contrario, el VPN de un estudio realizado en Tailandia²², un país de endemia intermedia, fue de 88% (IC 95%: 63,6-98,5%).

En la mayoría de los estudios, no fue posible comparar las estimaciones de los resultados del VPN para los IGRA y la PT^{17, 19, 20-22}. Sólo un estudio realizó un seguimiento exhaustivo que incluyó PT e IGRA negativos¹⁸ en contactos estrechos de enfermos TB en el que una de las 354 personas PT negativa desarrolló TB, resultando un VNP de la PT del 99,7% (IC 95%: 98,5-100%) en comparación con 100% del QFT-GIT (IC 95%: 99,4-100%).

Los estudios longitudinales de VPN, en su mayoría en adultos inmunocompetentes con riesgo de ITBL de países con baja prevalencia, sugieren que se puede estar razonablemente seguro de que, cuando un IGRA tiene un resultado negativo, la probabilidad de un

resultado falso negativo es baja. VPN altos se encuentran tanto para QFT-GIT como para T-SPOT®.TB. Esto indica que un individuo con IGRA negativo no desarrollará TB en el futuro muy probablemente. Sin embargo, una limitación de estos estudios fue el escaso número de personas incluidas, la corta duración del seguimiento y el hecho de que estudios similares no han sido realizados en países de alta endemicidad.

NUEVOS CAMPOS EN LOS IGRA

Recientemente se han obtenido nuevos hallazgos en el campo de investigación de los IGRA. Con los datos disponibles en la actualidad es difícil interpretar su potencial valor clínico, por lo que son necesarios más estudios longitudinales para validar su utilidad y confirmar las expectativas.

Se considera que los IGRA pueden reflejar con mayor sensibilidad la dinámica de la inmunidad en la infección, con una fluctuación del nivel de IFN- γ por encima y por debajo del punto de corte a lo largo del tiempo²³. También en un estudio se sugiere que en los casos con valores de IGRA elevados en el momento de la infección existe un mayor riesgo de desarrollar TB²⁴. Los IGRA también han sido evaluados para el diagnóstico de TB activa probados directamente en líquidos extra-sanguíneos procedentes del lugar de la infección, incluyendo el líquido de lavado broncoalveolar (BAL), derrame pleural y líquido cefalorraquídeo²⁵. Hasta ahora la precisión para el diagnóstico de la TB en compartimentos distintos de sangre no ha sido sistemáticamente evaluada. Pero en un trabajo reciente²⁶ con T-SPOT®.TB empleando linfocitos de BAL tuvo una sensibilidad y especificidad del 91% y 80%, respectivamente, siendo mucho más sensible que las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos específicos de MT para el diagnóstico rápido de la TB pulmonar con baciloscopia de esputo negativa.

También estudios recientes con otras citoquinas encuentran una respuesta igual o mejor a la del IFN- γ , y podrían ser utilizadas solas o asociadas a este. Interferón-inducible proteína (IP)-10 y proteína quimiotáctica (MCP)-2 se han propuesto como biomarcadores para el diagnóstico²⁷, mientras que interleucina (IL)-10, IL-6, IP-10 y MCP-1 podrían ser útiles en el seguimiento de pacientes con enfermedad tuberculosa^{28,29}, y además un nuevo estudio muestra que IP-10 podría ser un buen biomarcador para el diagnóstico de ITBL en niños³⁰.

RECOMENDACIONES DE USO DE LOS IGRA

Los diferentes países que actualmente utilizan los IGRA han publicado normas locales de uso que consideran 3 opciones: reemplazar la PT por los IGRA (en los casos de terapia anti-TNF- γ , en Suiza y Alemania), usar indistintamente ambas técnicas (EE.UU.) o utilizar primero la PT y después los IGRA (*two steps*) (Reino Unido, Canadá, España)³¹⁻³⁶. En general, la estrategia *two steps* es la más recomendada en especial en contactos vacunados con BCG; los IGRA son preferidos en los pacientes candidatos a recibir tratamientos biológicos; algunas normativas son aún cautelosas en utilizar los IGRA en niños pequeños; pocas los recomiendan para descartar TB activa, aunque algunas sí lo indican como test complementario, de especial valor en niños.

CONCLUSIONES

1. La sensibilidad de los IGRA es superior a la de la PT en pacientes con tuberculosis activa. En inmunodeprimidos T-SPOT®.TB es más sensible que QFT-GIT y la PT.
2. Los IGRA tienen una alta especificidad (QFT-GIT más específico que T-SPOT®.TB), superior a la PT y no se ven afectados por la vacunación con BCG.
3. Los IGRA se correlacionan bien con el riesgo de exposición en los países de baja endemicidad.
4. Al igual que la PT, los IGRA no diferencian la ITBL de la enfermedad activa.
5. Los estudios sugieren que tienen un mayor VPP para el desarrollo de enfermedad que la PT y un alto VPN en pacientes inmunocompetentes. En inmunodeprimidos y niños la sensibilidad de los IGRA es menor y el VPP y VPN está por establecerse.
6. IFN- γ es el biomarcador más evaluado, pero se están valorando nuevos antígenos que se correlacionen mejor con la ITBL, la enfermedad tuberculosa y con la respuesta al tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO 2010. The Global Plan to Stop Tuberculosis 2011-2015 [citado 3 Ene. 2011]; Available from: http://www.stoptb.org/assets/documents/global/plan/TB_GlobalPlanToStopTB2011-2015.pdf.
2. Leung CC, Rieder HL, Lange C, Yew WW. Treatment of latent infection with M. tuberculosis: Update 2010. Eur Respi J. 2010; (in press).
3. American Thoracic Society, Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and

- treatment of latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S221-47.
4. Lalvani A. Diagnosing tuberculosis infection in the 21st century: new tools to tackle and old enemy. *Chest*. 2007; 131: 1898-1906.
 5. Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson KA, Whelan A, Deeks JJ, et al. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet*. 2001; 357: 2017-21.
 6. Lalvani A, Nagvenkar P, Udawadia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, et al. Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis*. 2001; 183: 469-77.
 7. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008; 149: 177-84.
 8. Cellestis. Quantiferon®-TB Gold. 2009 [citado 3 Ene. 2011]; Available from: <http://www.cellestis.com/>.
 9. Oxford Immunotec. T-Spot®.TB. 2009 [citado 3 Ene. 2011]; Available from: <http://www.oxfordimmunotec.com/>.
 10. Beffa P, Zellweger A, Janssens JP, Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Indeterminate results of T-SPOT. TB performed under routine field conditions. *Eur Respir J*. 2008; 31: 842-6.
 11. Rangaka MX, Diwakar L, Seldon R, van Cutsem G, Meintjes GA, Morroni C, et al. Clinical, immunological, and epidemiological importance of antituberculosis T cell responses in HIV-infected Africans. *Clin Infect Dis*. 2007; (5) 44: 1639-46.
 12. Stephan C, Wolf T, Goetsch U, Bellinger O, Nisius G, Oremek G, et al. Comparing QuantiFERON-tuberculosis gold, T-SPOT tuberculosis and tuberculin skin test in HIV-infected individuals from a low prevalence tuberculosis country. *AIDS*. 2008; 22: 2471-9.
 13. Lalvani A, Pareek M. Determinaciones de la liberación de interferón gamma: principios y práctica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 245-52.
 14. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37: 100-11.
 15. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: new tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendations for research. *Ann Intern Med*. 2007; 146: 340-54.
 16. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J*. 2011; 37: 88-99.
 17. Aichelburg MC, Rieger A, Breitenecker F, Pfistershammer K, Tittes J, Eltz S, et al. Detection and prediction of active tuberculosis disease by a whole-blood interferon- γ release assay in HIV-1-infected individuals. *Clin Infect Dis*. 2009; 48: 954-62.
 18. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN- γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 177: 1164-70.
 19. Clark SA, Martin SL, Pozniak A, Steel A, Ward B, Dunning J, et al. Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease. *Clin Exp Immunol*. 2007; 150: 238-44.
 20. Kik SV, Franken WP, Mensen M, Cobelens FG, Kämpf M, Arend SM, et al. Predictive value for progression to tuberculosis by IGRA and TST in immigrant contacts. *Eur Respir J*. 2010; 35: 1346-53.
 21. Silverman MS, Reynolds D, Kavsak PA, Garay J, Daly A, Davis I. Use of an interferon- γ based assay to assess bladder cancer patients treated with intravesical BCG and exposed to tuberculosis. *Clin Biochem*. 2007; 40: 913-15.
 22. Lee SS, Chou KJ, Su IJ, Chen YS, Fang HC, Huang TS, et al. High prevalence of latent tuberculosis infection in patients in end-stage renal disease on hemodialysis: comparison of QuantiFERON-TB GOLD, ELISPOT, and tuberculin skin test. *Infection*. 2009; 37: 96-102.
 23. Andersen P, Doherty TM, Pai M, Welding K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol. Med*. 2007; 13: 75-82.
 24. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. 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.
 25. Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology*. 2010; 15: 220-40.
 26. Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, Goletti D, Domínguez Benítez JA, Losi M, et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a Tuberculosis Network European Trialsgroup Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2009; 180: 666-73.
 27. Ruhwald M, Bjerregaard-Andersen M, Rabna P, Eugen-Olsen J, Ravn P. IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, and IL-1RA hold promise as biomarkers for infection with M. tuberculosis in a whole blood based T-cell assay. *BMC research notes*. 2009; 2: 19.

28. Djoba Siawaya JF, Beyers N, van Helden P, Walzl G. Differential cytokine secretion and early treatment response in patients with pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 2009; 156: 69-77.
29. Djoba Siawaya JF, Chegou NN, van den Heuvel MM, Diacon AH, Beyers N, van Helden P, et al. Differential cytokine/chemokines and KL-6 profiles in patients with different forms of tuberculosis. *Cytokine.* 2009; 47: 132-6.
30. Lighter J, Rigaud M, Huie M, Peng CH, Pollack H. Chemokine IP-10: an adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009; 13: 731-6.
31. Beglinger C, Dudler J, Mottet C, Nicod L, Seibold F, Villiger PM, Zellweger JP. Screening for tuberculosis infection before the initiation of an anti-TNF-alpha therapy. *Swiss Med Wkly.* 2007; 137: 620-2.
32. Diel R, Hauer B, Loddenkemper R, Manger B, Krüger K. Recommendations for tuberculosis screening before initiation of TNF-alpha-inhibitor treatment in rheumatic diseases. *Pneumologie.* 2009; 63: 329-34.
33. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis infection - United States. *MMWR Recomm Rep.* 2010; 59: (No. RR-5): 1-25.
34. Royal College of Physicians. Tuberculosis: national clinical guidelines for diagnosis, management, prevention, and control. London: Royal College of Physicians; 2006. Acceso: www.nice.org.uk.
35. Canadian Tuberculosis Committee. Recommendations on Interferon Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection-2010 Update. An Advisory Committee Statement (ACS). *Can Commun Dis Rep.* 2010; 36 (ACS-5): 1-21.
36. Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Cayla J, Dominguez JA, et al. Diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis. *ArchBronconeumol.* 2008; 44: 551-66.

NOVEDADES DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EN TUBERCULOSIS

J. Aznar Martín.

Servicio de Microbiología. Instituto de Biomedicina de Sevilla. Hospital Universitario Virgen del Rocío CSIC/Universidad de Sevilla. Sevilla.

javier.aznar.sspa@juntadeandalucia.es

La tuberculosis continúa siendo uno de los principales problemas de salud de la humanidad. A partir de la segunda mitad de la década de los ochenta, la tenden-

cia progresivamente decreciente de esta enfermedad se quiebra y se produce un incremento de los casos de tuberculosis en todo el mundo ¹.

Así, la OMS estimó en 1990 que *Mycobacterium tuberculosis* causaba 7,5 millones de casos y 2,5 millones de muertes a nivel mundial, calculándose 90 millones de nuevos casos y 30 millones de muertes a lo largo de la década 1990-1999 si no se adoptaban las medidas correctoras. Sin embargo, en 2002 esta estimación aumentó a 8,8 millones de casos, por lo que el control global de la tuberculosis está lejos de alcanzarse, a pesar de los avances producidos en la última década en los métodos diagnósticos, especialmente en los países subdesarrollados. Estos avances se plantearon para el año 2005, para cumplir un doble objetivo: a) diagnosticar el mayor número de casos en el menor tiempo posible y b) detectar precozmente las resistencias².

En los países del primer mundo se pueden cumplir teóricamente estos objetivos de detectar, identificar y conocer la sensibilidad a rifampicina e isoniazida en la mayoría de los casos de tuberculosis pulmonar con baciloscopia positiva en menos de 24 horas. La lentitud y complejidad de los métodos diagnósticos, especialmente para la detección de cepas multirresistentes (500.000 pacientes) y en los pacientes coinfectados por el VIH (1,37 millones), donde la enfermedad tuberculosa con baciloscopia negativa se da en una alta proporción de los casos, unidas a la falta de accesibilidad a los mismos en los países subdesarrollados, son las principales causas del fracaso en el control global de la misma. El retraso en el reconocimiento de las situaciones anteriores y en su tratamiento conlleva un incremento de mortalidad, de resistencias secundarias y mantenimiento de la transmisión activa de la enfermedad ³.

DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

Los métodos directos del diagnóstico los podemos agrupar en métodos convencionales y moleculares.

1. Métodos convencionales.

El diagnóstico microbiológico convencional de la tuberculosis es un proceso que incluye los siguientes procedimientos:

- Recogida, transporte y procesamiento adecuados de la muestra.
- Homogeneización y descontaminación de la muestra cuando sea necesario, mediante tratamientos como N-acetil-Cisteína e hidróxido sódico o lauril sulfato entre otros.

- Visualización de los microorganismos mediante tinciones tradicionales como *Ziehl-Neelsen*, *Kinyoun* o tinciones fluorescentes como *Rodamina-Auramina*.
- Aislamiento e identificación de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos.

El desarrollo de sistemas automatizados o semiautomatizados para el aislamiento de *M. tuberculosis* basados en la combinación de medios líquidos de cultivo y de distintos sistemas para la detección del crecimiento como BACTEC460TB, MGIT 960, ESP y MB/Bac Alert, ha permitido disminuir el tiempo de aislamiento de 18-24 días del Lowestein-Jenssen con Piruvato (LJ) a los 5-14 días del MGIT a partir de una muestra clínica. Los métodos fenotípicos admitidos y más utilizados para la determinación de sensibilidad de *M. tuberculosis* a los antimicrobianos son: el método de dilución en agar y en caldo (sistema MGIT) que se basan en el método de las proporciones y emplean una única (a veces dos o tres) concentración crítica. El sistema MGIT permite la determinación de sensibilidad frente a los fármacos de primera y segunda línea, obteniéndose los resultados en tres a ocho días⁴.

La identificación de las cepas del complejo tuberculosis *M. tuberculosis* a partir del cultivo ha quedado reducido a un período de minutos a horas, bien mediante la detección de antígenos por inmunocromatografía o mediante técnicas moleculares. La eficacia [sensibilidad (97-100%), especificidad (100%) y valores predictivos positivo (100%) y negativo (92-100%)] de la identificación mediante la inmunocromatografía con anticuerpos monoclonales frente a la proteína 64 de *M. tuberculosis* nos proporciona un método rápido (15 minutos) y sencillo para la identificación de las cepas del Complejo Tuberculosis aisladas en medios líquidos⁵.

El primer método molecular aplicado a la identificación de las micobacterias ha sido la hibridación con sondas específicas del rARN (AccuProbe®)⁶. Es un método rápido (1-2 horas), pero sólo identifica a los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium-intracellulare* y cuatro especies *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* y *M. goodii*. Además, han existido problemas de especificidad con la sonda de *M. kansasii* y *M. intracellulare*⁷.

En la actualidad las técnicas de amplificación e hibridación con sondas específicas han permitido, en un período de tiempo de 2-4 horas, identificar más de 30 especies diferentes de micobacterias de interés clínico. GenoType® MTBC permite diferenciar las 5 especies del Complejo Tuberculosis, INNO-LiPA

MYCOBACTERIA v 2 permite identificar 16 especies mientras que GenoType® Mycobacterium CM y GenoType® Mycobacterium AS permiten identificar 31 especies diferentes y el complejo *M. tuberculosis*⁷⁻⁹. Recientemente se han incorporado dos nuevas técnicas para la identificación de las micobacterias a partir de cultivo en medio sólido y/o líquido: Espectrofotometría de masas mediante MALDI-TOF y la Pirosecuenciación^{7,10}. La tecnología MALDI-TOF permite obtener un perfil proteico (espectro) específico de cada especie de micobacterias en pocos minutos. Se ha validado con el estudio de 311 cepas, de 31 especies diferentes y los cuatro complejos, todas ellas crecidas a partir de LJ y MGIT. Se ha obtenido la identificación correcta en el 97% de las cepas crecidas en LJ y del 77% en MGIT al compararlo con la identificación realizada mediante tres técnicas moleculares de secuenciación de los genes *hsp65*, *rpoB* o *sodA* y Exact Tandem Repeat D¹⁰.

2. Métodos moleculares

Estos métodos se han utilizado tanto para el diagnóstico directo en muestras clínicas mediante la detección de ácidos nucleicos, como para la detección de genes de resistencia en cepas aisladas y más recientemente en muestras clínicas. Estas técnicas teóricamente satisfacen los dos objetivos previos del CDC para el control de la tuberculosis, el diagnóstico rápido de la misma y la detección precoz de las resistencias. Se han aplicado diferentes técnicas de amplificación a la detección de *M. tuberculosis* en muestras clínicas como son la PCR, amplificación ARNr, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), NASBA, reacción de la ligasa y de la Q-β replicasa. Varios son los sistemas comerciales utilizados: AMPLICOR MTB, AMPLIFICACIÓN MTD, LcxMTB, ProbeTec (BD) GTMD.

En general, su rendimiento global es superior al cultivo en cuanto a sensibilidad y especificidad en un 10-20%, aportando una gran rapidez al diagnóstico¹¹⁻¹⁴. Estos sistemas son globalmente similares en su rendimiento, con una sensibilidad cercana al 90% (85-100%) y especificidad del 98%-100% en muestras respiratorias y con cifras inferiores en muestras extrapulmonares. Estas cifras son incluso superiores en muestras respiratorias con baciloscopia positiva ya que este tipo de muestra contienen casi siempre *M. tuberculosis*. Esto unido a un tiempo de respuesta de algunas horas, y la posibilidad de conocer el resultado del paciente en un solo día, debieran cambiar totalmente las pautas de manejo y tratamiento del paciente con sospecha de tuberculo-

sis¹¹⁻¹⁴. Estas técnicas poseen un valor predictivo negativo (>99%) tan elevado que pueden utilizarse como técnicas de discriminación negativa, aunque se detectan algunos falsos negativos por la presencia de distintos inhibidores en las muestras clínicas¹⁴.

En una revisión y metaanálisis reciente, la especificidad del AMPLICOR MTB en muestras respiratorias varía del 93-100%, mientras que la sensibilidad oscila entre 83 al 96,7% para cualquier tipo de muestra, al 90-100% en muestras baciloscopia positivas y del 50-95,9% en las negativas. Sin embargo, en estas mismas situaciones, pero para muestras extrapulmonares, los valores de sensibilidad varían del 27,3-85%, 87,5-100% y del 17,2-70,8%¹¹. Se han obtenidos valores similares con las diferentes técnicas de detección de ácidos nucleicos, y en las más recientes el rendimiento es ligeramente superior, pero sin olvidar que la rentabilidad de todas ellas está en relación directa con el grado de sospecha por parte del clínico que atiende al paciente¹⁵.

El conocimiento de los genes implicados en la resistencia a los antituberculosos como: *rpoB* para rifampicina, *katG*, *inhA*, *ahpC* y *kasA* para isoniácida, *rpsL* para estreptomycin, *pncA* para pirazinamida y en el *gyrA* para quinolonas y de las mutaciones que codifican resistencia ha permitido desarrollar métodos moleculares aplicables para la detección de los mismos en cepas aisladas¹⁶⁻²² y más recientemente directamente en muestras clínicas, de forma que el diagnóstico y algunos datos de sensibilidad se pueden obtener en un período de 2-4 horas^{23,24}. El sistema Genotype MTDR Plus y 2ª línea, permiten la identificación de *M. tuberculosis* y detectan las mutaciones en los genes que codifican la resistencia a rifampicina, isoniácida, etambutol, quinolonas, amikacina, kanamicina y capreomicina²⁵. Finalmente, se ha valorado la eficacia del sistema GeneXpert MTB/RIF capaz de identificar en muestras clínicas a *M. tuberculosis* y las mutaciones en el gen *rpoB* que codifican la resistencia a rifampicina, en 1.730 pacientes en 5 centros diferentes de cuatro países con una alta prevalencia de tuberculosis y con tasas de resistencia elevadas. Este sistema identificó a más del 97% de los pacientes con tuberculosis con cultivo positivo, incluyendo al 90% de los pacientes con baciloscopia negativa. Así mismo, identificó correctamente al 97,6% de los pacientes con cepas resistentes a rifampicina y al 98,1% de los pacientes con cepas sensibles. Las principales ventajas de este sistema son su facilidad de manejo, su seguridad al utilizar un solo dispositivo cerrado donde se realiza la extracción, amplificación y detección de los ácidos nucleicos y su rapidez <2 horas²⁴.

En resumen, la rentabilidad y eficacia así como la implementación de los nuevos métodos diagnósticos deben analizarse en el contexto clínico del paciente, debiendo existir una amplia y continua comunicación entre el clínico y el microbiólogo, especialmente en el análisis de los resultados discrepantes y para la utilización más eficaz de los diferentes métodos diagnósticos, especialmente de los métodos moleculares. La colaboración de ambos permitiría reducir el tiempo medio de confirmación por el laboratorio del 75% de los casos de tuberculosis de 21 días en 1996 a 2 días para el año 2010, como ya se planteó el Departamento de Salud de USA en el año 2000²⁶, e incluso este período podría acortarse.

EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DE LA TUBERCULOSIS

La aplicación de las técnicas de biología molecular ha posibilitado la caracterización de las cepas circulantes en una población y profundizar en la epidemiología y la dinámica de transmisión de la tuberculosis, así como de su patogenia e historia natural²⁷.

Se han descrito múltiples loci genéticos como dianas a emplear en estos estudios, aunque son tres los marcadores epidemiológicos más utilizados: secuencias de inserción como IS6110, secuencias cortas repetidas sin función fenotípica conocida [DR (*spoligotyping*)] y secuencias interesparadoras repetidas en tandem en número variable (MIRU-VNTRs).

Las indicaciones de estos métodos son:

- Detectar contaminaciones cruzadas en el laboratorio y/o toma de muestras.
- Conocer la historia natural de la infección y discriminar entre transmisión reciente y reactivación así como identificar reinfecciones exógenas.
- Investigación de brotes nosocomiales e instituciones cerradas y modelo de transmisión en una comunidad¹²⁻¹⁹.
- Detección de brotes no detectables por la epidemiología convencional.
- Establecer relaciones filogenéticas en las cepas aisladas²⁸⁻³¹.

El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción de la IS6110 (RFLP) es el método de referencia para estudios epidemiológicos, aunque su utilidad se ve limitada en las cepas de *M. tuberculosis* que carecen de dicha IS o poseen un número de copias inferior a cinco³²⁻³³. En estas circunstancias así como para la tipificación de *M. bovis* se debe utilizar el *spoligotyping* que en ocasiones es necesario utilizar en combinación con la técnica estándar de RFLP IS6110 y/ O MIRUs^{10,11}.

En la actualidad, la técnica que va a sustituir a los RFLPs es la utilización de MIRUs utilizando como dianas 12 ó 15 loci, ya que es más fácil de realizar y nos provee de un número de identificación para su integración en las bases de datos internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Raviglione MC, Snider Jr DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-226.
2. Doern GV. Diagnostic mycobacteriology: where are we today? *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1.873-1.876.
3. Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing: WHO report. Geneva WHO, 2009. (WHO/HTM/TB/2009.411).
4. Zapata P, Arbeola M and Aznar J. Evaluation of Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from clinical specimens. *Clin Microbiol Infect*; 1999, 5: 227-230.
5. Ismail NA, Baba K, Pombo D and Hoosen AA. Use of an immunochromatographic kit for the rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from broth cultures. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13: 1045-1047.
6. Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frebault V, Lecossier D, Raugier J, Bocart D et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification DNA. *Mol Microbiol* 1989;3: 843-849.
7. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, Dauphin B, Carbonelle E et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by Matrix-Assisted Laser desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4481-4486.
8. Richter E, Weizenegger M, Fahr AM and Rüscher-Gerdes S. Usefulness of the GenoType MTBC assay for differentiating species of the Mycobacterium tuberculosis complex cultures obtained from a clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004;42: 4303-4306.
9. Russo C, Tortoli E and Menichella D. Evaluation of the new GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 2006;44: 334-339.
10. Bao JR, Master RN, Schwab DA and Clark RB. Identification of acid-fast bacilli using pyrosequencing analysis. *Diag Microbiol Infect Dis* 2010; 67: 234-238.
11. Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5355-5365.
12. Bonington A, Strang JJ, Klapper PE, Hood SV, Rubombora W, Penny M, et al. Use of Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1251-1254.
13. Franco-Alvarez de Luna F, Ruiz P, Gutierrez J, Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct Assay for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3025-3027.
14. Noordhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicentre quality control study for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 295-301.
15. Catanzaro A, Perry S, Claridge JE, Dunbar S, Goodnight-White S et al. The role of clinical suspicion in evaluating a new diagnostic test for active tuberculosis: results of a multicenter prospective trial. *JAMA* 2000; 283: 639-645.
16. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: Molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 496-514.
17. Telenti A, Honoré N, Bernasconi C, March J, Ortega A, Heym B et al. Genotypic assessment of isoniazid and rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a blind study at reference laboratory level. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 719-723.
18. Piateck AS, Telenti A, Murray MG, El-Hajj H, Jacobs WR, Kramer FR et al. Genotypic analysis of Mycobacterium tuberculosis in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chem* 2000; 44: 103-110.
19. Torres MJ, Criado A, González N, Aznar J and Palomares PJ. Molecular analysis of rifampin and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis in Seville, Spain. *Tuber Lung Dis* 1999;79: 187-190.
20. González N, Torres MJ, Palomares JC, and Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in Seville, Spain. 2001. *Int Tuberc Lung Dis* 1999; 79: 187-190.
21. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, and Aznar J. Use of real-time PCR and fluorometry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3194-3199.
22. Yao C, Zhu T, Li Y, Zhang L, Zhang B, Huang J et al. Detection of rpoB, katG and inhA gene mutations in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates from Chongqing as determined by microarray. *Clin Microbiol Infect* 2010; 1639-1643.
23. Ruiz M, Torres MJ, Llanos AC, Arroyo A, Palomares JC, Aznar J. Direct detection of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis in auramine-rhodamine positive sputum specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42: 1585-1589.

24. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nichol MP, Shenai S et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *New Engl J Med* 2010; 363: 1005-1015.
25. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E and Niemann S. Use of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3699-3703.
26. US Department of Health and Human Services. Healthy people 2010-understanding and improving health (conference edition, in 2 volumes). Washington, DC: US Department of Health and Human Services, 2000.
27. Van Emden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
28. Aznar J, Safi H, Palomares JC. Falso brote de tuberculosis por contaminación en las muestras en un laboratorio de micobacteriología: confirmación por técnicas moleculares. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15: 144 -146.
29. Aznar J, Safi H, Romero J, Alejo A, Gracia A, Palomares JC. Nosocomial transmission of tuberculosis infection in pediatrics wards. *Pediatr Infect Dis* 1995; 14: 44-48.
30. Safi H, Aznar J, and Palomares JC. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated during a 3-year period (1993 to 1995) in Seville, Spain. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2472-2476.
31. Aznar J, Safi H, Conejo MC, and Palomares JC. Molecular epidemiology of tuberculosis in a prison facility in Seville: a 3-year study (1993-95). *Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 3: 586-588.
32. Gortázar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, De la Fuente J et al. Bovine tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian Lynx Strongholds. *PLoS ONE* 2008; e2776.doi: 10.1371/journal.pone.0002776.
33. Martín-Hernando MP, Torres MJ, Aznar J, Negro JJ, Garcia A, Gortazar C. Distribution of lesions in Red and Fallow deer in naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *J Comp Pathol* 2010;142: 43-50.