


 **UTILIDAD DE LAS TÉCNICAS *IN VITRO* DE DETECCIÓN DE IFN- γ PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS LATENTE EN ENFERMOS REUMÁTICOS CANDIDATOS A ANTI-TNF α .**


Autora: Sonia Mínguez Blasco

Directora: Lourdes Mateo Soria
Reumatología-HTGIIP

 **Introducción**

- o Los tratamientos biológicos y enfermedades inflamatorias crónicas agresivas.
- o Anticuerpos anti-TNF α :
 - Aumento del riesgo de infecciones.
 - TNF en formación del granuloma.
- o BIOBADASER:
 - Incidencia de TBC activa 20 veces mayor que en población general española.
 - ↓78% tras 2002. Recomendaciones de la SER.

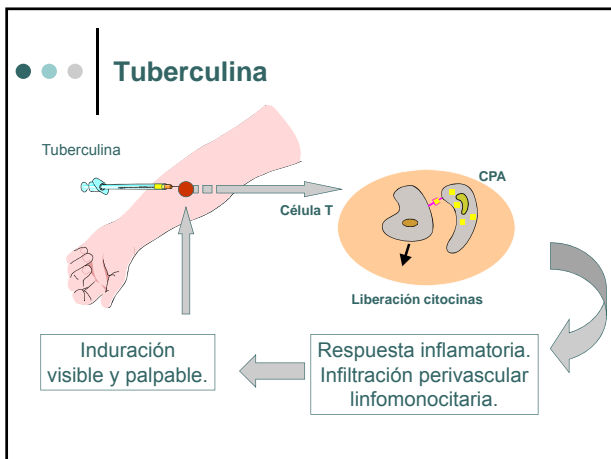
Carmona L et al. Arthritis Rheum. 2005 Jun;52(6):1766-72.

 **Recomendaciones SER:**

- o La detección de la infección latente por tuberculosis es obligatoria antes de iniciar un anti-TNF.
 - Tuberculina + booster
 - Rx tórax

● ● ● **Tuberculina**

- Prueba de intradermoreacción.
- Evalúa la hipersensibilidad retardada que determinados compuestos antigénicos del bacilo provocan en el infectado.
- La tuberculina está constituida por con derivado proteico purificado (PPD) que se obtiene del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* esterilizado y concentrado.



● ● ● **Tuberculina**

Baja Especificidad

- El PPD es una mezcla compleja de antígenos.
- Más de 200 de estos constituyentes proteicos del son compartidos por micobacterias ambientales y por el bacilo vacunal (**BCG**) (cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis*).
- Falsos positivos tras efecto booster.

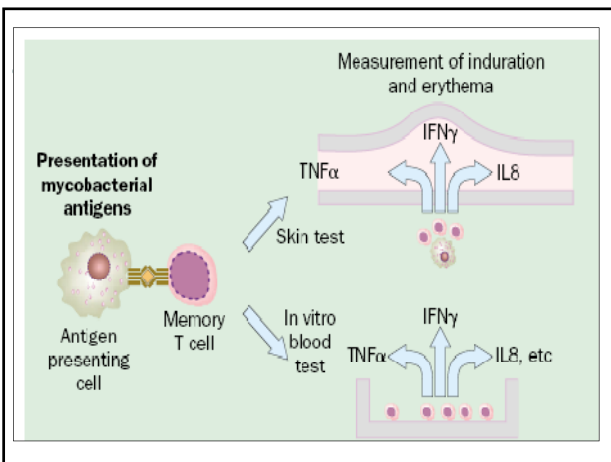
● ● ● | **Tuberculina**

Baja Sensibilidad

- Falta de respuesta en pacientes con alteraciones de la inmunidad celular.

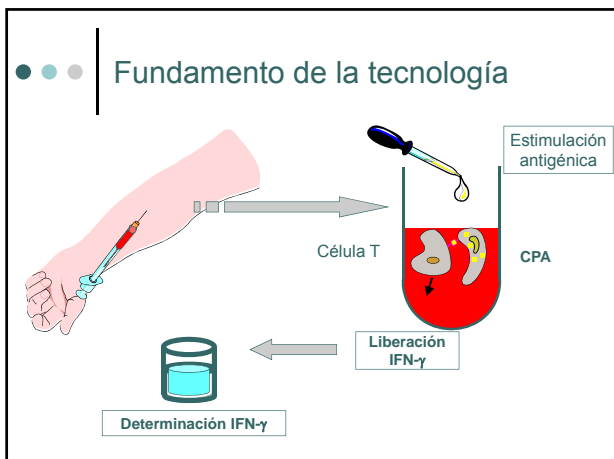
Problemas logísticos

- Errores en la administración y subjetividad en la interpretación de los resultados.
- Visita de lectura. Pérdida horas laborales.
- Pacientes que no vuelven a la lectura.
- Conmoción social.



● ● ● | **IGRA:**
Interferon-Gamma Released Assay

- Se evidencia *in vitro* la presencia en sangre de células T sensibilizadas mediante el estímulo con antígenos específicos mediante detección de $IFN-\gamma$.
- La respuesta predominante del hospedador frente a *Mycobacterium tuberculosis* consiste en la liberación de $IFN-\gamma$ por parte de las células T para la activación de los macrófagos.



Fundamento de la tecnología

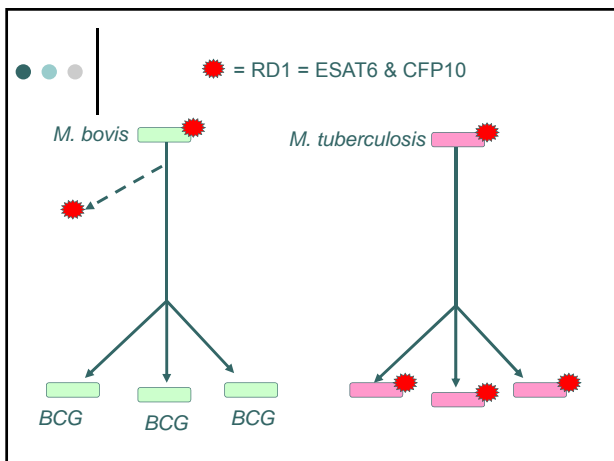
- o Identificación de segmentos del genoma de *M.tuberculosis* no presentes en las cepas de *M.bovis* (BCG) ni en la mayoría de micobacterias ambientales*:

RD1:

- ESAT-6 (6-kD *M.tuberculosis* early-secreted antigenic target protein.)
- CFP-10 (culture filtrate protein)

RD11: TB7.7

*Excepto *M. Kansassi*, *M.marinum* y *M.szulgai*.



● ● ● **Test comercializados:**

- **Inmunoabsorción**
QuantiFERON-TB Gold In Tube (QFN-G-IT)
(Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia)
- **Inmunospot**
T-SPOT.TB (Oxford Immunotecm Abington, UK)

● ● ● **ELISPOT**

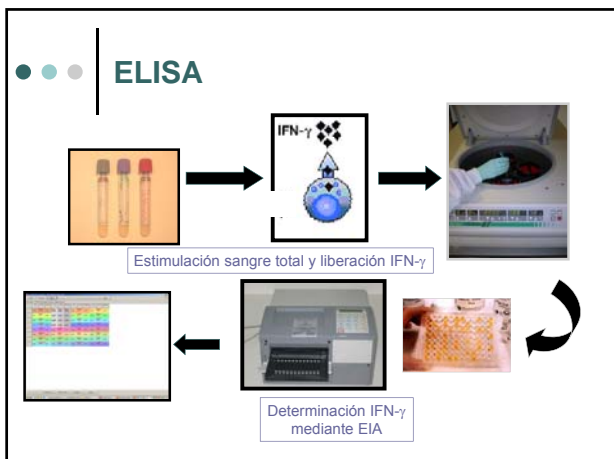
Separación y contaje celular

Determinación IFN- γ mediante ELISPOT

● ● ● **ELISPOT**

CONTROL NEGATIVO CONTROL POSITIVO

RESULTADO NEGATIVO RESULTADO POSITIVO



● ● ● IGRAs

Ventajas:

- Mayor especificidad.
- Incluye control positivo y control negativo.
- Elimina visitas al hospital.
- Elimina la subjetividad de la tuberculina y la estigmatización social.

Inconvenientes:

- Resultados indeterminados.
- Coste

● ● ● Objetivo:

- Determinar la utilidad de las técnicas de detección de IFN- γ en sangre para la detección de la infección tuberculosa en comparación con la prueba de la tuberculina en los enfermos que van a iniciar tratamiento con anti-TNF.

● ● ● **Objetivos secundarios**

- Determinar el efecto de los DMARD y los corticoides en el resultado de la tuberculina y las técnicas *in vitro*.
- Investigar la influencia de la infección previa por MNT en los resultados discordantes (PPD+/IGRA-).

● ● ● **Material y métodos**

- 59 pacientes con reumatismo inflamatorio candidatos a anti-TNF (enero 2008-enero 2010).
- 6 exclusiones:
 - 1 paciente con anti-TNF
 - 3 PPD desconocido
 - 1 TBC pulmonar activa
 - 1 enf. no tributaria de anti-TNF
- Grupo control: 35 pacientes no inmunodeprimidos con infec. latente por TBC (PPD y/o 1 IGRA).

● ● ● **Material y métodos**

- Prueba de la tuberculina (PPD):
 - Método Mantoux
 - Lectura 48-72h: positivo > 5 mm
 - Si 1ºPPD negativo → *Booster* a los 7-10 días.
- Radiografía de tórax.



● ● ● **Material y métodos**

- *Técnicas in vitro* (IGRAs):
 - determinación de la producción de IFN- γ en los sobrenadantes mediante EIA (QFN) y ELISPOT.
- *Ex vivo* ELISPOT en casos PPD + / IGRAs –
 - Sensitinas de *M. avium*, *M. xenopi*, *M. gordonae*

● ● ● **Material y métodos**

- Profilaxis para TBC:
 - PPD y/o uno de los IGRAs positivos
 - Isoniacida (5 mg/kg/día) durante 9 meses.

● ● ● **Material y métodos**

- Análisis estadístico:
 - Análisis descriptivo
 - Análisis de la concordancia (kappa de Cohen):
>0,60 excelente, 0.41-0,60 buena-moderada, < 0,40 pobre.
 - U de Mann-Whitney
 - Kruskal-Wallis
 - Test de correlación de Sperman
 - $P < 0,05$

Resultados

- o 53 enfermos (18 V/ 35 M)
- o Media de edad de 49,6±13,0 años
- o Reumatismos:

AR 18	SAPHO 4
EA 13	LES 2
A. Pso 9	Esp. Indif 1
A. Seronegativa 3	Esp. EII 1

- o Tiempo medio de evolución de la enfermedad de 8,8±8,3 años.
- o La AR fue seropositiva en todos los casos y 15 /18 eran erosivas.

Resultados

- o 39 enfermos DMARD previos → 29 uno y 8 dos.
- o Otros inmunosupresores:
 - 1 LES con CFS y AZA,
 - 1 AR con vasculitis crioglobulinémica con MCF,
 - 3 pacientes con anti-IL-1.
- o 24 pacientes (45,3%) corticoides sistémicos. Dosis media 9,1±11,9 mg/día.
- o Historia epidemiológica:
 - Estado vacunal conocido en 3 sujetos.
 - 2 pac. historia sugestiva de TBC.
 - 3 pac. contacto con casos de TBC.

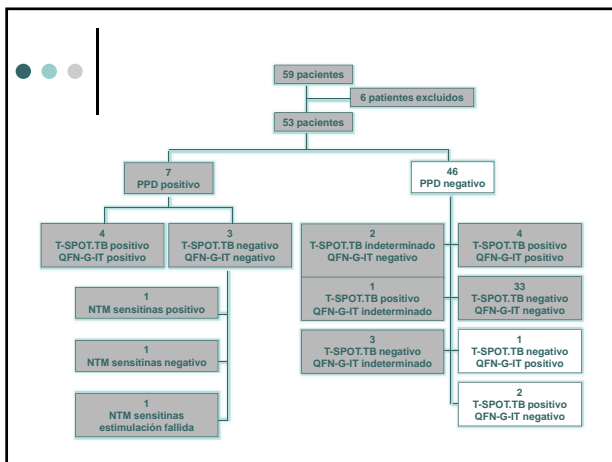
Resultados

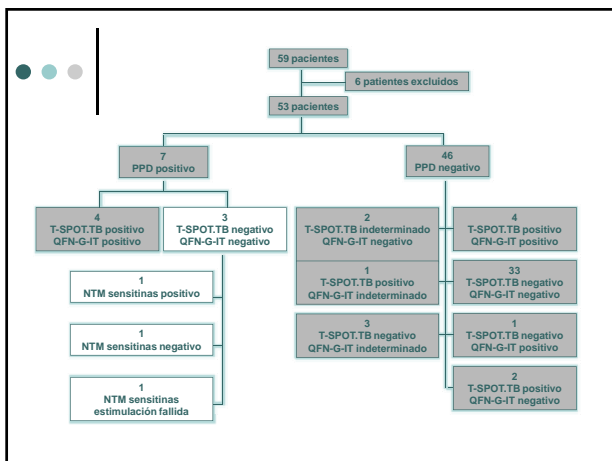
- o Total PPD (+) 7 casos (13.2%)
 - 1ºPPD (+) en 3 casos
 - Booster (+) en 4 casos
- o T-SPOT (+) en 11 casos (20,8%)
- o QFN (+) en 9 (17%)
- o No diferencias significativas en nº de resultados positivos:
 - QFN/T-SPOT p=0,675
 - QFN/PPD p=0,727
 - T-SPOT/PPD p=0,334

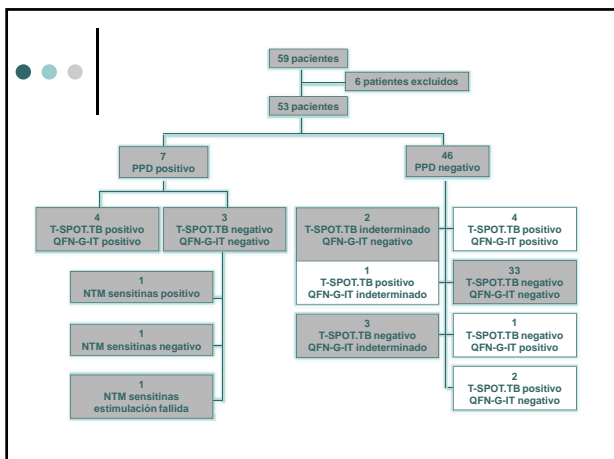
Resultados

- Indeterminados:
 - QFN 4 (7,5%)
 - T-SPOT 2 (3,8%)
- Concordancia:
 - T-Spot/QTF 0,57
 - PPD/T-Spot 0,33
 - PPD/QTF 0,40

	PPD	T-Spot	QTF
Positivo	7	11	9
Negativo	46	40	40
Indeterminado	0	2	4
Perdidos	0	0	0
	PPD/T-Spot	PPD/QTF	T-Spot/QTF
Kappa de Cohen	0,33	0,40	0,57







Resultados

- o Profilaxis para TBC en 15 pacientes:
 - 7 (13,2%) con PPD (+): 4 en 1º PPD + 3 boosters
 - 8 (15%) con PPD (-) / IGRA (+).

Resultados

- o El nº de PPD, QFN y T.SPOT positivos no afectado por tomar DMARD ni corticoides en el momento de la prueba ni durante la enfermedad.
- o No asociación corticoides-IGRA indeterminado.
- o No correlación entre dosis de corticoide y cantidad de INF-γ ni nº cel T estimuladas.

● ● ● **Resultados**

- No diferencias significativas entre el n° de células estimuladas ni de INF- γ liberado entre el grupo de estudio y el grupo control.

The figure consists of two dot plots. The left plot shows 'Responde: CD1 T cells per million PBMC' on the y-axis (0 to 200) for 'Control grupo' and 'Rheumatoid patients' on the x-axis. A horizontal line indicates the mean for each group, with a p-value of 0.401. The right plot shows 'IFN-gamma release in QFT-GIT (AU/ml)' on the y-axis (0 to 25) for the same groups, with a p-value of 0.232. Both plots show individual data points as dots and horizontal lines for the mean and standard deviation.

● ● ● **Discusión**

QFN ó TSPOT vs PPD

- Matulis G et al. *Rhem Dis* 2008;67:84-90.
- Vassilopoulos D et al. *J Rheumatol* 2008;35:1271-76.
- Ponce de Leon et al. *J Rheumatol* 2008;35:776-81.
- Greenberg JD et al. *J Rheumatol* 2008;35:770-75.
- Soborg B et al. *J Rheumatol* 2009;36:1876-84.
- Young E et al. *BMC Infect Dis* 2009;9:207.
- Giralanda S et al. *Clin Rheumatol* 2010;29(10):1135-41.

● ● ● **Discusión**

QFN y TSPOT vs PPD

- Martin J et al. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:181-85
- Kleinert S et al. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:782-84.
- Bocchino M et al. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 2:250-54

	Minguez S.	Martin J.	Kleinert S.	Bocchino M.
Pais	España	Irlanda	Alemania	Italia
Inciden.TBC	Baja	Baja	Baja	Baja
T. vacunación	?	82%	?	2,8%
n	53	150 (72)	90	69 (44 reuma)
PPD+ (%)	13,2	27,8	11,1	26
QFN+ (%)	17	7,1	8,9	31,8
TSPOT+ (%)	20,8	9,8	7,8	30,4
Kappa	QFN/TSP OT	0,57	(98,4%)	-
	PPD/QFN	0,40	-	0,26
	PPD/TSP OT	0,33	-	0,21
Indet. (%)	QFN	7,5	2,8	17,8
	TSPOT	3,8	4,7	3,3
Asoc. FR TBC	-	Sí con IGRAs	Sí IGRAs, No PPD	Sí con IGRAs
Asoc. cortis	No	No	-	-

	Minguez S.	Martin J.	Kleinert S.	Bocchino M.
Pais	España	Irlanda	Alemania	Italia
Inciden.TBC	Baja	Baja	Baja	Baja
T. vacunación	?	82%	?	2,8%
n	53	150 (72)	90	69 (44 reuma)
PPD+ (%)	13,2	27,8	11,1	26
QFN+ (%)	17	7,1	8,9	31,8
TSPOT+ (%)	20,8	9,8	7,8	30,4
Kappa	QFN/TSP OT	0,57	(98,4%)	-
	PPD/QFN	0,40	-	0,26
	PPD/TSP OT	0,33	-	0,21
Indet. (%)	QFN	7,5	2,8	17,8
	TSPOT	3,8	4,7	3,3
Asoc. FR TBC	-	Sí con IGRAs	Sí IGRAs, No PPD	Sí con IGRAs
Asoc. cortis	No	No	-	-

	Minguez S.	Martin J.	Kleinert S.	Bocchino M.
Pais	España	Irlanda	Alemania	Italia
Inciden.TBC	Baja	Baja	Baja	Baja
T. vacunación	?	82%	?	2,8%
n	53	150 (72)	90	69 (44 reuma)
PPD+ (%)	13,2	27,8	11,1	26
QFN+ (%)	17	7,1	8,9	31,8
TSPOT+ (%)	20,8	9,8	7,8	30,4
Kappa	QFN/TSP OT	0,57	(98,4%)	-
	PPD/QFN	0,40	-	0,26
	PPD/TSP OT	0,33	-	0,21
Indet. (%)	QFN	7,5	2,8	17,8
	TSPOT	3,8	4,7	3,3
Asoc. FR TBC	-	Sí con IGRAs	Sí IGRAs, No PPD	Sí con IGRAs
Asoc. cortis	No	No	-	-

	Minguez S.	Martin J.	Kleinert S.	Bocchino M.
Pais	España	Irlanda	Alemania	Italia
Inciden.TBC	Baja	Baja	Baja	Baja
T. vacunación	?	82%	?	2,8%
n	53	150 (72)	90	69 (44 reuma)
PPD+ (%)	13,2	27,8	11,1	26
QFN+ (%)	17	7,1	8,9	31,8
TSPOT+ (%)	20,8	9,8	7,8	30,4
Kappa	QFN/TSPOT	0,57	(98,4%)	-
	PPD/QFN	0,40	-	0,26
	PPD/TSPOT	0,33	-	0,21
Indet. (%)	QFN	7,5	2,8	17,8
	TSPOT	3,8	4,7	3,3
Asoc. FR TBC	-	Sí con IGRAs	Sí IGRAs, No PPD	Sí con IGRAs
Asoc. cortis	No	No	-	-

	Minguez S.	Martin J.	Kleinert S.	Bocchino M.
Pais	España	Irlanda	Alemania	Italia
Inciden.TBC	Baja	Baja	Baja	Baja
T. vacunación	?	82%	?	2,8%
n	53	150 (72)	90	69 (44 reuma)
PPD+ (%)	13,2	27,8	11,1	26
QFN+ (%)	17	7,1	8,9	31,8
TSPOT+ (%)	20,8	9,8	7,8	30,4
Kappa	QFN/TSPOT	0,57	(98,4%)	-
	PPD/QFN	0,40	-	0,26
	PPD/TSPOT	0,33	-	0,21
Indet. (%)	QFN	7,5	2,8	17,8
	TSPOT	3,8	4,7	3,3
Asoc. FR TBC	-	Sí con IGRAs	Sí IGRAs, No PPD	Sí con IGRAs
Asoc. cortis	No	No	-	-

Conclusiones

1. La detección de tuberculosis latente en los pacientes reumáticos es superior con las técnicas de IFN- γ que con la tuberculina, incluso cuando se realizan 2 determinaciones de la misma.
2. Los IGRAs permiten detectar PPD falsos positivos: vacunación con BCG e infección por MNT.
3. Los IGRAs permiten identificar falsos negativos mediante un control positivo/negativo que permite detectar sujetos anérgicos.

● ● ● | **Conclusiones**

4. Buena concordancia entre los 2 IGRAs. ELISPOT menos resultados indeterminados.
5. Los IGRAs tienen una mejor relación coste-efectividad.
6. Dificil interpretación de los IGRA+/PPD- en pacientes sin factores de riesgo de tuberculosis.

● ● ● | **Conclusiones**

7. Son necesarios estudios con seguimiento a largo plazo para determinar el valor predictivo positivo real de los IGRAs para el desarrollo de una tuberculosis activa.

● ● ● |

GRACIAS.
