

MESA: Novedades en microbiología

Moderadores: **Griselda Tudó.** *Hospital Clínic-ISGLOBAL. Barcelona.*

Fernando Alcaide. *Hospital Universitari de Bellvitge. L'hospitalet de Llobregat. Barcelona.*

GeneXpert MTB Ultra

Daniela M Cirillo

San Raffaele Scientific Institute. Milano.

Correspondencia:

Daniela M Cirillo

E-mail: cirillo.daniela@hsr.it

The development of better tests for the rapid diagnosis of TB and drug resistant TB is critical for achieving the End TB Strategy targets set out by the World Health Organization. Next generation molecular tests need to be more sensitive to detect *M. tuberculosis* in paucibacillary samples and to have a high Negative Predictive Value to prevent unnecessary anti-TB treatment. The Xpert MTB/RIF Ultra assay has been developed by Cepheid as an advanced version of the Xpert MTB/RIF assay with better TB detection capacity and more reliable identification of Rifampicin resistance.

Here, we present the preliminary results of an ongoing study on the use of Xpert MTB/RIF Ultra assay as part of a multi-step intervention for the screening of active TB among migrants in Italy. Our data indicate that the estimated incidence rate of TB among asylum seekers is higher to what has been previously reported in literature. This preliminary set of data shows that Xpert MTB/RIF Ultra assay increases the TB detection rate as compared to the previous version of the test but it also detects MTB DNA at "Trace" level in culture negative specimens. More data is needed on how to interpret a positive "Trace" call and its clinical implications.

Quantiferon Plus: la opinión del microbiólogo

M. Teresa Tórtola Fernández

Unidad de Tuberculosis y Micobacteriosis. Servicio de Neumología. Hospital General de Gran Canaria "Dr. Negrín". Las Palmas de Gran Canaria.

Correspondencia:

M. Teresa Tórtola Fernández

E-mail: ttortola@vhebron.net

La tuberculosis sigue siendo un problema de salud mundial. En el año 2016 se declararon 6,3 millones de nuevos casos de tuberculosis (TB) y se estima que 1.700 millones de personas están infectadas por *Mycobacterium tuberculosis*¹.

Para un buen control de la tuberculosis es fundamental la prevención de nuevas infecciones por *M. tuberculosis* (MTB) y su progresión a TB. En los países con baja incidencia de TB, la reactivación representa alrededor del 80% de los nuevos casos

de enfermedad. De ahí la importancia de la detección de la infección tuberculosa latente (ITBL).

La ITBL se define como un estado de respuesta inmunitaria persistente a antígenos de MTB adquiridos con anterioridad que no se acompaña de manifestaciones clínicas de TB activa¹. Actualmente no existe ninguna prueba que permita detectar directamente la infección por MTB por lo que el diagnóstico de la ITBL se efectúa de forma indirecta a través de la detección de una respuesta inmunitaria celular (CMI) específica frente a antígenos de MTB en ausencia de datos clínicos sugestivos de enfermedad. Además, no hay un *gold standard* para la detección de la ITBL. En la actualidad se disponen de dos pruebas para la detección de la ITBL, la prueba cutánea de la tuberculina (PT) o prueba del Mantoux o PPD (derivado proteico purificado) y la determinación de la liberación de interferón gamma (IGRA, siglas en inglés). Una de las diferencias entre ambas pruebas es que mientras el PPD es una prueba *in vivo*, el IGRA es *in vitro*. En ambas pruebas, los linfocitos T previamente sensibilizados por los antígenos micobacterianos producen citoquinas inflamatorias².

La PT se realiza inyectando 0,1 ml de PPD en la cara anterior del antebrazo. La lectura de la reacción que produce una induración se realiza a las 48-72 horas de su inoculación y debe ser realizado por personal con experiencia en su interpretación. Una de las mayores desventajas de la PT, además de las dos visitas del paciente y la subjetividad de la lectura es su falta de especificidad dado que muchas proteínas que forman parte del PPD son compartidas por otras micobacterias como *M. bovis* BCG.

Con la prueba del IGRA se detecta el IFN- γ producido por linfocitos-T en respuesta a antígenos específicos de MTB. Los IGRAs disponibles comercialmente son: T-SPOT®.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Reino Unido), QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) (Qiagen, Hilden, Alemania) y el QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus). Los antígenos específicos contenidos en la prueba T-SPOT®.TB son ESAT-6 y CFP-10, ambos antígenos están codificados en la región de diferencia 1 (RD1) del genoma de MTB y que está ausente de cualquier cepa vacunal de *M. bovis* BCG. En la prueba QFT-GIT el tubo que contiene los antígenos de

MTB además de los antígenos ya mencionados utiliza TB 7,7 que se encuentra en otra región de diferencia. La prueba QFT-Plus tiene dos tubos que contienen antígenos, el tubo TB1 contiene los antígenos ESAT-6 y CFP-10 y detectaría la CMI de los linfocitos T CD4+ helper mientras que el tubo TB2 contiene antígenos peptídicos que inducen la CMI de los linfocitos T citotóxicos CD8+³.

Una de las poblaciones que se beneficiarían de la utilización de los IGRAs son las que han sido vacunadas con BCG. Los IGRAs tienen una especificidad para el diagnóstico de ITBL >95% en lugares con baja incidencia de TB, y la especificidad no se ve afectada por la vacuna BCG. Mientras que la PT es igualmente alta en poblaciones no vacunadas con BCG (97%) siendo la especificidad mucho más baja (\approx 60%) en las poblaciones donde se administra BCG⁴.

Debido a los múltiples pasos involucrados en los IGRAs, el error se puede introducir en cualquier momento durante la prueba. En los últimos años, los estudios han identificado y caracterizado diversas fuentes de variabilidad. La mayoría de estos estudios han investigado la variabilidad en el ensayo QFT-GIT porque es más ampliamente utilizado que la prueba T-SPOT.TB. Estas fuentes de variabilidad serían preanalíticas, analíticas, de fabricación e inmunológicas⁵.

Bibliografía

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2017
2. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000 Sep 23;356(9235):1099-104.
3. Qiagen. QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) ELISA Package Insert. [http://193.191.178.147/Mithras/Analyses.nsf/ecbed47964dbd5b-9c1256cc6003eb951/ff0aad58d735eb9c12575c20036a11b/\\$FILE/Quantiferon%20TB%20Gold%20Plus.pdf](http://193.191.178.147/Mithras/Analyses.nsf/ecbed47964dbd5b-9c1256cc6003eb951/ff0aad58d735eb9c12575c20036a11b/$FILE/Quantiferon%20TB%20Gold%20Plus.pdf)
4. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Dowdy DW, Dheda K, Banaei N. Gamma interferon release assays for detection of Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Jan; 27(1):3-20.
5. Banaei N, Gaur RL, Pai M. Interferon Gamma Release Assays for Latent Tuberculosis: What Are the Sources of Variability? *J Clin Microbiol*. 2016 Apr; 54(4):845-50.

Quantiferon Plus: la opinión del clínico

Miguel Santín

Hospital Universitario de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona.

Correspondencia:

Miguel Santín

E-mail: msantin@bellvitgehospital.cat

Quantiferon®-TB Gold Plus (QFT-Plus), la última versión de QuantiFERON®-TB Gold incorpora un segundo tubo con antígenos (Ags) de *Mycobacterium tuberculosis*, diseñado para detectar la actividad de las células CD8⁺. El tubo 1 (TB1) contiene péptidos de los ESAT-6 y CFP-10 que son reconocidos por las células CD4⁺, mientras que el tubo 2 (TB2) contiene péptidos más cortos, que además de la respuesta de los CD4⁺ también inducen la respuesta de las células CD8⁺. La producción de IFN- γ en el TB2 es superior a la del TB1, diferencia que se asume es debida a la actividad adicional de las células CD8⁺ no detectada en el TB1.

Desde un punto de vista clínico, la introducción de QFT-Plus supondría una mejoría de su sensibilidad, lo cual podría ser de especial relevancia en pacientes inmunodeprimidos. Curiosamente, la evidencia publicada previa a su aprobación era nula, pero incluso tras 1 año de haberse implantado su uso en España, sigue siendo escasa. Únicamente tres estudios han comparado frente a frente QFT-Plus con su antecesor QuantiFERON®-TB Gold In-tube (QFT-GIT)¹⁻³. La sensibilidad osciló entre 90% y 95% para QFT-Plus y entre 88% y 95% para QFT-GIT (89,5%)¹. En cuanto a pacientes inmunodeprimidos, QFT-Plus fue evaluado en 108 pacientes con TB en Zambia, entre los cuales el 63% estaban

infectados por el VIH⁴. QuantiFERON®-TB Gold Plus fue positivo en un 85% de los VIH-positivo y en el 80% de los VIH-negativo. Sin embargo, la inmunosupresión avanzada, medida por CD4 <100 cels./ μ L se asoció con un resultado negativo de la prueba. La especificidad, se evaluó en dos estudios, en poblaciones con muy bajo riesgo de infección, y como era de esperar, fue cercana similar a la descrita para QFT-GIT^{2,5}. La Tabla muestra los resultados de sensibilidad y especificidad para QFT-Plus obtenidos en diferentes estudios.

Sin embargo, más allá de los resultados de precisión diagnóstica, la cual se parece ser similar a la de QFT-GIT, la posibilidad de medir la respuesta CD8⁺ abre la posibilidad de nuevas aplicaciones del QFT-Plus. Además de los CD4⁺, hay evidencia de que las células CD8⁺ tienen un papel central en el control de TB activa mediante la producción de IFN- γ y otros factores activadores de los macrófagos y la acción lítica directa sobre los bacilos intracelulares. Dado que la respuesta CD8⁺ se relaciona con la carga bacilar –a más carga bacilar, mayor respuesta CD8⁺–, y con infección reciente, y que esta disminuye con el tratamiento específico, mientras que la respuesta CD4⁺, no, medir esta respuesta mediante la cuantificación de IFN- γ en el tubo TB2 de

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad de QFT-Plus y QFT-GIT.

Estudios País (año)	N	Sensibilidad		Especificidad	
		QFT-Plus	QFT-GIT	QFT-Plus	QFT-GIT
Barcellini Europa (2016)	119 TB* 106 Bajo riesgo	85,7%	--	97,2%	--
Hoffmann Alemania (2016)	24 TB Confirmada 33 TB No confirmada	95%	95%	--	--
Yi Japón (2016)	162 TB* 212 Bajo riesgo	91,1%	93,6%	97,6%	98,6%
Petruccioli Italia (2017)	69 TB 19 Bajo riesgo	90%	88%	100%	100%
Felisinghe Zambia (2017)	68 VIH (+) con TB* 40 VIH (-) con TB*	85%	--	--	--
		80%	--	--	--

*TB confirmada

QFT-Plus podría ser de utilidad para distinguir infección latente de TB activa, predecir el desarrollo de TB activa y monitorizar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, por ahora estamos en un terreno puramente especulativo, ya que ni siquiera las diferencias citadas entre TB activa e infección latente han sido demostradas de manera consistente, y por supuesto no se han evaluado en la clínica en estudios apropiados. Por otra parte, parece difícil que únicamente con medir la respuesta específica CD8⁺ mediante únicamente IFN- γ , sin estudiar el perfil de respuesta mediante otras citoquinas de respuesta Th1 (TNF- α , IL-2, IL-1ra, ...) se pueda diferenciar TB activa de infección latente.

En conclusión, con los datos disponibles, QFT-Plus no parece ofrecer mejoras con respecto a su antecesor QFT-GIT para su aplicación en la práctica clínica, pero sí que tiene potenciales ventajas derivadas de la medición de la respuesta CD8⁺, además de la CD4⁺. Lo que tardan en despejarse estas incógnitas dependerá de lo acertados que estemos a la hora de diseñar estudios clínicos adecuados para dar respuesta a las mismas.

Bibliografía

1. Hoffmann H, Avsar K, Göres R, Mavi S-C, Hofmann-Thiel S. Equal sensitivity of the new generation QuantiFERON-TB Gold plus in direct comparison with the previous test version QuantiFERON-TB Gold IT. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:701-3.
2. Yi L, Sasaki Y, Nagai H, Ishikawa S, Takamori M, Sakashita K, *et al.* Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus for Detection of Mycobacterium tuberculosis infection in Japan. *Scientific Reports.* | 6:30617 | DOI: 10.1038/srep30617.
3. Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, Cuzzi G, Cirillo DM, Palmieri F, Ippolito G, Goletti D. Analytical evaluation of QuantiFERON- Plus and QuantiFERON-Gold In-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis.* 2017;106:38-43.
4. Telisinghe L, Amofa-Sekyi M, Maluzi K, Kaluba-Milimo D, Cheeba-Lengwe M, Chiwele K, *et al.* The sensitivity of the QuantiFERON-TB Gold Plus assay in Zambian adults with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2017;21:690-6.
5. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Luigi Codecasa L, Cugnata F, *et al.* First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J* 2016;47:1587-90.

Perfil metabólico en TB. Estudio TBNet

José Domínguez

Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona.

Correspondencia:

José Domínguez

E-mail: jadomb@gmail.com

Un factor esencial en el control de la expansión de la TB radica en la capacidad de diagnosticar la enfermedad en sus primeras fases. Los métodos microbiológicos de referencia en el diagnóstico de la TB son el examen microscópico, el cultivo y el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, las técnicas de examen microscópico presentan una baja sensibilidad (aproximadamente un 50%) y las técnicas de cultivo en medio sólido son lentas, requiriendo períodos de incubación de hasta dos meses. Además, se calcula que entre un 10% y un 20% de los casos no se consigue aislar el microorganismo. Por otro lado, aunque las técnicas basadas de PCR para la amplificación genética proveen resultados rápidos, requieren personal especializado y un laboratorio suficientemente equipado.

Son necesarios nuevos métodos alternativos para mejorar el control y el diagnóstico de la TB. En este sentido, se necesitan nuevos biomarcadores para poder explorar la biología de la respuesta inmune durante la infección tuberculosa, entender los mecanismos de transición de infección a enfermedad, y poder diagnosticar a las personas enfermas.

La metabolómica permite estudiar moléculas de bajo peso molecular o metabolitos presentes en los fluidos o en los diferentes tejidos biológicos. Los metabolitos son los productos finales de los procesos de regulación celular, por lo que el estudio de los niveles de éstos puede identificarse como una respuesta de los sistemas biológicos ante cambios genéticos o ambientales. El conjunto de todos estos metabolitos constituyen el metaboloma

de un individuo. Cambios en el metabolismo debido a un estrés interno o bien externo (infecciones) puede causar cambios en las reacciones químicas implicadas en la incorporación o liberación de estos metabolitos por parte de la célula¹.

A través de la Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) podemos obtener un perfil metabólico de la muestra biológica analizada, una "huella" específica para cada situación patológica, que nos permitirá la identificación de patrones metabólicos específicos útiles para el diagnóstico o para la monitorización de la evolución de la enfermedad. Esta técnica ya ha sido utilizada para la discriminación y diagnóstico de múltiples enfermedades, desde enfermedades cancerígenas, cardiovasculares o neurológicas, así como artritis, diabetes y desórdenes gastroduodenales².

En el campo de las infecciones respiratorias, estudios recientes han demostrado que el análisis de los metabolitos en orina permite discriminar entre diferentes etiologías. En modelos animales³, se observaron en orina patrones diferentes de metabolitos en infecciones respiratorias por *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

En estudios clínicos realizados con pacientes⁴, se ha observado como los patrones de metabolitos excretados en orina son diferentes entre pacientes diagnosticados de infecciones respiratorias por *S. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *S. aureus*, *Coxiella burnetti*, *Haemophilus influenzae*, y *Mycoplasma pneumoniae*. En un estudio reciente⁵, se evaluó el perfil metabolómico en plasma y orina de pacientes pediátricos diagnosticados de neumonía, observando perfiles metabólicos que claramente discriminaban entre aquellos pacientes con neumonía y los controles.

En nuestra experiencia, es posible identificar en orina mediante RMN, perfiles metabolómicos específicos en pacientes con tuberculosis, distinguiéndolos de los perfiles que podemos

encontrar en individuos sanos, pacientes con otras infecciones respiratorias y pacientes con otras afectaciones pulmonares. Nuestros resultados preliminares también evidencian que es posible detectar patrones específicos en pacientes pediátricos. Además, una técnica de estas características podría ser de utilidad en la monitorización de la respuesta al tratamiento antituberculoso.

Agradecimientos

La investigación ha sido financiada por: (i) el Instituto de Salud Carlos III (PI 13/01546 and PI16/01912), integrado en el Plan Nacional de I+D+I y cofinanciado por el ISCIII-Subdirección General de Evaluación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); (ii) Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR); (iii) Programa CERCA / Generalitat de Catalunya; y (iv) Fundación para Innovación y la Prospectiva en Salud en España (FIPSE)

Bibliografía

1. Oresic M, Vidal-Puig A, Hannien V. Metabolomic approaches to phenotype characterization and applications to complex diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2006;6:575-85.
2. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics.* 2011.
3. Slupsky CM, Cheyesh A, Chao DV, Fu H, Rankin KN, Marrie TJ, et al. *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* pneumonia induce distinct metabolic responses. *J Proteome Res.* 2009;8:3029-36.
4. Slupsky CM, Rankin KN, Fu H, Chang D, Rowe BH, Charles PG, et al. Pneumococcal pneumonia: potential for diagnosis through a urinary metabolic profile. *J Proteome Res.* 2009;8:5550-8.
5. Atzei A, Atzori L, Moretti C, Barberini L, Noto A, Ottonello G, et al. Metabolomics in paediatric respiratory diseases and bronchiolitis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24 Suppl 2:59-62.