

## Immunodiagnóstico por interferón gamma (IFN- $\Gamma$ ) de TBC latente

Adames-Mitre, M.M<sup>1</sup>, Pimentel, Y<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Caja de Seguro Social, Complejo Hospitalario Dr. Arnulfo Arias Madrid, Panamá.

Email: [adames.manuel0@gmail.com](mailto:adames.manuel0@gmail.com)

### RESUMEN

La prueba de tuberculina (PPD) detecta tuberculosis latente y activa. Nuevas pruebas, como la medición de IFN- $\gamma$  específico para *M. tuberculosis* ayudan a su diagnóstico y cuantifica la respuesta de los linfocitos T efector de memoria, específicos. Este estudio evalúa dos poblaciones: adultos saludables para obtener valores de referencia y pacientes infectados con el virus de VIH-1 (PVVIH) en riesgo de desarrollar tuberculosis latente y a ambos grupos se les realizó la PPD. La población de referencia fue de 49 voluntarios saludable, todos con PPD negativa < 15 mm en el área de la induración y con una concentración de IFN- $\gamma$  de 0.004 UI/mL (0.16 pg/mL) a 0.444 UI/mL (17.76 pg/mL). La población de 45 PVVIH fue positiva en un 4 % para la PPD (2/45) y negativos 96 % (43/45). Ambos pacientes positivo para la PPD, también fueron positivos para IFN- $\gamma$ , 100 % (2/2). De los 43 pacientes con la PPD negativa, cuatro fueron positivos para IFN- $\gamma$  9 % (4/43) y 39 fueron negativos 91 % (39/43) para ambas pruebas. La sensibilidad obtenida para producción de IFN- $\gamma$  fue de 99% y la especificidad de 91 %. Se determinó los valores normales para esta población entre 0.16 – 17.76 pg/mL. El IFN- $\gamma$  específico para *M. tuberculosis* fue positivo en un 9 % de las personas infectadas por el VIH que tenían la prueba de PPD negativa.

**Palabras clave:** tuberculina, interferón gamma, tuberculosis latente.

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis una de las causas más importantes de muerte de los pacientes infectados con VIH, esto se relaciona con el incremento del riesgo de desarrollar tuberculosis por la disminución de los TCD4. Esta investigación hace un estudio: Analítico, descriptivo y transversal con poblaciones a las que se les solicito consentimiento informado de adultos saludables para obtener valores de referencia y PVVIH en riesgo de desarrollo de tuberculosis latente enfocándose en determinar la producción de IFN- $\gamma$  *in vitro* en respuesta a antígenos específicos para *M. tuberculosis* en pacientes VIH positivos

## MATERIALES Y MÉTODO

**Reactivos y Materiales:** Utilizamos un ensayo de IFN- $\gamma$  *in vitro* que mide en sangre total la reacción a los antígenos peptídicos ESAT-6, CFP-10 y TB7.7 (p4) específicos para *M. tuberculosis* (QuantiFERON-TB Gold QTF-G de Cellestis, a QIAGEN, Australia) y una Prueba de tuberculina (PPD) proporcionada por MINSA (OMS-OPS). **Recolección y manipulación de muestras:** Se recogió de cada sujeto 1 ml de sangre por punción venosa directamente en cada tubo (mitógeno, antígeno y nulo). Los tubos se incubaron a 37°C entre 16 y 24 horas, luego se centrifugaron 15 minutos a 2500 RCF (g) y se recolecto el sobrenadante.

**Procedimiento análisis de muestras:** Todas las muestras de plasma y reactivos, se atemperaron antes de usar excepto el concentrado de conjugado 100X, que se utilizó a temperatura ambiente (22°C  $\pm$  5°C). Para el estándar liofilizado del kit se añadió el volumen de agua destilada indicado y se mezcló suavemente para lograr así una solubilización completa con una concentración de 8 UI/ml. Los estándares se analizaron por duplicado. Se procedió a medir la densidad óptica (DO) de cada pocillo a los 5 minutos de detener la reacción mediante un lector de microplacas equipado con un filtro de 450nm y con un filtro de referencia de 620nm. Los resultados se calcularon utilizando esos valores de DO.

*Cálculos e interpretación de los resultados del ensayo:* Para la generación de curva estándar se utilizó una hoja de cálculo en el programa EXCEL. Se calculó coeficiente de variación (%CV) de los estándares y el coeficiente de correlación (r) de la curva estándar, entre otras variables con un valor de confianza de 99,9 % y 3 % de error. Los resultados se presentan en UI/ml y su equivalente en pg/ml basados en estudios donde se relaciona ambas unidades y señalan que las concentraciones en UI/ml pueden convertirse a pg/ml multiplicando por 40pg/UI.

## RESULTADOS

*Interpretación de los resultados:* Negativos: Aquellos pacientes cuya medición de la absorbancia de la muestra del antígeno menos a medición de la absorbancia de la muestra nula resulte ser  $< 0,35$  o  $> 0,35$  y  $< 25$  % del valor del tubo nulo nos indican una infección por M. tuberculosis improbable, es decir IFN- $\gamma$  negativo.

Positivos: Aquellos pacientes cuya medición de la absorbancia de la muestra del antígeno menos a medición de la absorbancia de la muestra nula resulte ser  $\geq 0,35$  y  $\geq 25$  % del valor del tubo blanco nos indican una infección por M. tuberculosis probable, es decir IFN- $\gamma$  positivo. El análisis estadístico se realizó mediante el programa OPENEPI y el programa EPINFO 7.0. Se calculó la sensibilidad, especificidad, precisión diagnóstica, valor predictivo negativo y valor predictivo positivo.

La población de referencia fue de 49 voluntarios saludable que aceptaron firmar el consentimiento informado cuyas edades fueron entre 19 - 22 años. De estos el 31% (15/49) fueron masculinos y el 69 % (34/49) femeninos. Todos PPD negativo ( $< 15$  mm en el área de la induración).

La concentración de IFN- $\gamma$  de la población saludable fue de 0.004 UI/ml (0.16 pg/mL) a 0.444 UI/mL (17.76 pg/mL). Las concentraciones en hombres fue de 0.004 UI/ml (0.16 pg/ml) y 0.379 UI/mL (15.16 pg/ml), x: 0.088 (3.52 pg/mL) UI/mL y en mujeres de 0.020 (0.8 pg/ml) UI/ml y 0.444 UI/mL (17.76 pg/mL) x: 0.089 UI/mL (3.56 pg/mL)

Para la población de PVVIH los vacunados con BCG (44/45) que obtuvieron resultados PPD negativa fueron 94 % (42/45). Ambas pruebas BCG y PPD positiva se obtuvieron 2 pacientes es decir 4 %. Solo un paciente obtuvo con BCG negativa y PPD negativa 2 %. No se obtuvo ningún paciente BCG negativo con PPD positiva.

La distribución de acuerdo al IFN- $\gamma$ , muestra que la edad promedio se encuentra para esta prueba positiva entre 47 años y 42 para la negativa, con una proporción hombre-mujer de 3:2 (3/2) para los resultados positivos y 1.6:1 (25/15) para los negativos. Entre los 44 pacientes vacunado con BCG 14 % (6/44) fueron IFN- $\gamma$  positivo y el 87 % (38/44) fueron negativos a IFN- $\gamma$ . El único paciente BCG negativo fue también negativo para el FN- $\gamma$ .

La distribución de acuerdo al resultado de la prueba PPD muestra que la edad promedio para la prueba positiva está en 48 años y 42 para la prueba negativa. Con una proporción hombre-mujer de 1:1 para los resultados positivos y 1.6:1 (28/18) para los negativos.

Los promedios de IFN- $\gamma$  para PPD positivos fue 5.66 UI/ml (226 pg/mL) y 0.24 UI/mL (9,6 pg/mL) para la PPD negativa. El promedio de linfocitos TCD4 para la PPD positiva fue de 295 células/ $\mu$ L y para la PPD negativa fue de 564 células/ $\mu$ L. Para los linfocitos TCD8 el promedio fue 562 y 883 células/ $\mu$ L para PPD positiva y PPD negativa respectivamente.

Del total de pacientes tenemos que el 87 % (39/45) obtuvieron resultados negativos en IFN- $\gamma$  y PPD. No se obtuvo ningún caso de PPD positiva con IFN- $\gamma$  negativo. El 9 % (4/45) de las PPD negativa fueron IFN- $\gamma$  positivo y 4 % (2/45) de las PPD positiva fueron IFN- $\gamma$  positivo.

Este estudio obtuvo una sensibilidad de 99 % y la especificidad fue de 91%. El valor predictivo positivo fue de 33 %, es decir que si la prueba de IFN- $\gamma$  es positiva, la probabilidad estimada de que un individuo tenga realmente tuberculosis latente es 33 %.

El valor predictivo negativo fue de 99 % es decir que si la prueba tiene un resultado negativo la probabilidad estimada de que no padezca tuberculosis latente es de 99 %. La precisión diagnóstica obtenida fue de 91 %. El índice kappa obtenido fue de  $\kappa$ : 0,46. La concordancia

observada entre ambas pruebas de PPD e IFN- $\gamma$  fue 96 % (43/45) es 46 % mayor que la concordancia esperada por el azar según esta prueba.

## DISCUSIÓN

En Panamá este mismo año el número de PVVIH y tuberculosis fue de 1 600 y de pacientes con VIH y tuberculosis fue de 224 con un aumento desde el año 2005 de 86 % al 96 % en el 2012 (World Health Organization, 2013).

Los valores encontrados en los 49 voluntarios sanos van desde 0.004 UI/ml hasta 0,444 UI/mL, con un promedio de 0,088 y un coeficiente de variación de 0,6 %. Estudios consideran la división entre positivos y negativos en 0.35 UI/ml sugerido en el inserto de la prueba. Otros estudios señalan valores de IFN-  $\gamma$  con promedios de 0.91 UI/mL en personal militar con resultados de PPD < 15 m. Sin embargo otros describen en pacientes COMBE positivos que fueron considerados negativos con concentraciones de 0,02 UI/mL.

El estudio observó que en un 4 % (2/44) para los pacientes vacunados positiva con PPD positiva, un 94 % (42/45) obtuvieron resultados PPD negativa en contraste con. Es decir, los porcentajes obtenidos de pacientes para ambas pruebas son de un 13 % (6/44) para IFN- y un 4 % (2/44). Para la prueba de PPD no se muestra en nuestro estudio que la vacunación sea interferente o cause falsos positivos en estas pruebas. Además hubo 2 % (1/44) de pacientes con BCG negativa y PPD negativa y no se obtuvo ningún paciente BCG negativo con PPD positiva.

Los promedios de IFN- $\gamma$  para PPD positivos fue 5,66 UI/mL y 0.24 UI/mL para la PPD negativa, mostrando un aumento de la concentración entre los pacientes positivos y una concentración dentro de los valores considerados negativos para población saludable. Esto nos sugiere que el IFN- $\gamma$  puede ser considerado como alternativa para la detección de LTB y en la prevención del desarrollo de tuberculosis activa en la población de riesgo como son los PVVIH en nuestro país.

La especificidad calculada para la prueba de IFN- $\gamma$  fue de 91 % con una sensibilidad de 99 % comparada con la prueba de PPD, se considera que a medida que ambos índices se acercan al 100 % la prueba es más eficaz, es decir que la prueba de IFN- $\gamma$  tiene alta sensibilidad y

especificidad ya que detecta el 99 % de los enfermos y con una alta capacidad de identificar los individuos sanos. Existe un ámbito amplio de resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad entre ambas pruebas según los estudios. Algunos de ellos muestran la sensibilidad para la prueba de IFN- $\gamma$  (64- 91 %) comparado con la de PPD (25 – 85 %).

El valor predictivo positivo fue de 33 % y valor predictivo negativo fue de 99 % Investigaciones han señalado que el valor predictivo de los estas pruebas en personas infectadas con el VIH muestran que tienen escaso valor predictivo positivo, pero un alto valor predictivo negativo para la tuberculosis activa. Otros estudios proponen el uso de ambas pruebas y así aumentar el valor predictivo, comparado si se utilizan por separado.

La precisión diagnóstica obtenida fue de 91 %. Esto significa que del porcentaje de pacientes captados como verdaderos positivos el 91 % es preciso en el diagnóstico.

El índice kappa obtenido fue de  $\kappa$ : 0,46, se considera bueno concordancia. La concordancia observada entre ambas pruebas de PPD e IFN- $\gamma$  fue 96 % (43/45) es decir 46 % mayor que la concordancia esperada por el azar según la prueba kappa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Chkhartishvili N, Kempker RR, Dvali N, Abashidze L, Sharavdze L, Gabunia P, et al . Poor agreement between interferon-gamma release assays and the tuberculin skin test among HIV-infected individuals in the country of Georgia. BMC Infectious Dis. 2013; 1-7(13): 513. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/13/513>
2. Metcalfe JZ, Cattamanchi A, McCulloch CE, Lew JD, Ha NP, Graviss EA. Test variability of the QuantiFERON-TB gold in-tube assay in clinical practice. Am J Resp Crit Care Med. 2013;187(2), 206–11. doi:10.1164/rccm.201203-0430OC
3. Sultan B, Benn P, Mahungu T, Young M, Mercey D, Morris-Jones S, et al. Comparison of two interferon-gamma release assays (QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB) in testing for latent tuberculosis infection among HIV-infected adults. Int J STD IDS. 2013; 24(10), 775–9. doi:10.1177/0956462413486459

4. Takenami I, Finkmoore B, Machado A Jr, Emodi K, Riley LW, Arruda S. Levels of interferon-gamma increase after treatment for latent tuberculosis infection in a high-transmission setting. *Pulm Med.*2012; 2012, 757152. doi:10.1155/2012/757152
5. Trajman A, Steffen RE, Menzies D.. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. *Pulm Med.* 2013; 2013, 601737. doi:10.1155/2013/601737

