

ARTICOL DIN *EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL*

Testele de detectare a Interferonului- γ eliberat pentru diagnosticul tuberculozei active: sensibile sau prostesti?*

C. Lange¹, M. Pai², F. Drobniewski³, G.B. Migliori⁴

¹ Division of Clinical Infections, Research Center Borstel, Borstel, Germany

² Dept of Epidemiology and Biostatistics, McGill University, Montreal, QC, Canada

³ Institute for Cell and Molecular Sciences, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary College, London, UK

⁴ WHO Collaborating Centre for TB and Lung Diseases, Fondazione S. Maugeri, Care and Research Institute, Tradate, Italy

Diagnosticul de tuberculoză activă (TB) este confirmat prin izolarea prin cultură a *Mycobacterium tuberculosis* din speci-mene umane¹. Deoarece creșterea *M. tuberculosis* pe mediile de cultură poate dura în medie ≥ 2 săptămâni, clinicienii sunt nevoiți să se bazeze și pe alte metode de diagnostic rapid al TB pulmonare, pentru a justifica decizia de începere a trata-mentului la un anumit pacient. Această decizie poate fi difi-cilă mai ales în cazul copiilor, ea bazându-se pe mai multe criterii:

- istoricul medical și epidemiologia locală a bolii;
- radiografia toracică;
- examenul microscopic pentru detectarea bacililor acid-alcoolo-rezistenți (BAAR);
- amplificarea acizilor nucleici ai *M. tuberculosis* din spe-cimenele biologice prelevate;
- detectarea răspunsului imun specific anti-micobacterian prin testul cutanat la tuberculină (IDR la PPD);
- teste de evaluare a interferonului gamma (IFN- γ) elibe-rat (IFN- γ release assays – IGRA). Mai mult, au fost pro-puse mai multe scoruri pentru diagnosticul TB la copii atunci când lipsește confirmarea bacteriologică. În timp ce testele serologice bazate pe detectarea anticorpilor nu s-au dovedit utile², se dezvoltă în mod constant noi metode pentru diagnosticul TB³.

IGRA, disponibile comercial sub denumirea de Quanti-FERON-TB-Gold® In Tube (QFT-GIT) test (Cellestis, Carnegie, Australia) și T-SPOT.TB® test (Oxford Immunotec, Abingdon, UK) s-au impus deja în multe țări ca mijloace mo-derne pentru imunodiagnosticul infecției TB latente (LTBI). În contrast cu amestecul de antigene prezent în derivatul pro-teic purificat utilizat *in vivo* prin IDR la PPD, IGRA detectează răspunsul imun cu memorie față de un număr limitat de pep-tide specifice RD1 din partea celulelor mononucleare din sân-gele periferic (PBMC) *ex vivo*. Genele care codifică proteinele RD1 lipsesc din tulpina vaccinală de bacili Calmette-Guerin

(BCG). În consecință, la contactii recentii ai unor cazuri con-tagioase de TB, vaccinați BCG, rezultatele IGRA corelează mai bine cu expunerea la *M. tuberculosis* decât IDR la PPD^{4,8}. De aceea, este plauzibil ca IGRA să fie superioare IDR la PPD în precizarea dezvoltării TB active la contactii recentii ai unor cazuri contagioase de TB, vaccinați BCG. Un studiu prospec-tiv care a evaluat valoarea predictivă a IGRA în dezvoltarea TB active în rândul contactilor pacienților cu TB a sugerat superioritatea acestora în fața IDR la PPD⁹, deși efectul a fost mai puțin pronunțat într-un alt studiu la copii¹⁰, iar un alt studiu cu teste IGRA in-house din Gambia¹¹ nu a evidențiat o diferență semnificativă în valoarea predictivă.

Rolul IGRA în diagnosticul TB active este mai puțin clar, mai ales la copii. În 10-15% din copii¹² și $\approx 50\%$ dintre adulții cu TB activă¹³ (cu BAAR pozitiv în examenul de spută), imu-nodiagnosticul prin IDR la PPD sau IGRA nu este necesar. În aceste situații testele moleculare de amplificare a acizilor nucleici (NAAT) pot fi utilizate pentru identificarea rapidă a *M. tuberculosis* (în contrast cu micobacteriile nontuberculoase) și oferă informații utile privind rezistența la rifampicină¹⁴. Imunodiagnosticul poate avea o oarecare utilitate în cazurile la care examenul microscopic al sputei suspecțiilor de TB este BAAR negativ, eventual și NAAT, acolo unde sunt disponi-bile. În aceste cazuri (frecvente în special la copii), rezultatele pozitive ale IGRA și/sau ale IDR la PPD au o valoare limitată, deoarece nu pot distinge între TB activă și infecția TB latentă.

Kampmann și colab.¹⁵ au subliniat în studiul lor inabili-tatea IGRA de a separa TB activă de infecția TB latentă, atât la adulți, cât și la copii. O cohortă de 209 copii din UK a fost investigată prin 2 teste comerciale IGRA, efectuate în para-lel cu IDR la PPD, pentru diagnosticul prezumptiv de infecție TB latentă (n=118) sau TB activă (n=91). Nici prezența unui test IGRA pozitiv, nici magnitudinea răspunsului imun eva-luat în acest fel (IFN- γ în UI/ml în testul ELISA, respectiv numărul de celule formatoare de pete per 250.000 PBMC în

* Articol tradus din Eur Respir J, Jun 2009; 33: 1250 – 1253, Reference PM077-2009-2010/4.11.2009

Disclaimer of ERS: „This Romanian translation has not been reviewed by ERS prior to publication, therefore the ERS may not be responsible for any errors, omissions or inaccuracies, or for any consequences arising there from, in the Romanian content“. Traducere în limba română: Dr. Anca Macri.

testul ELISPOT) nu au fost capabile să discrimineze între TB activă și infecția TB.

De ce IGRA nu pot distinge între TB activă și infecția TB latentă?

Răspunsul stă probabil în limitele utilizării sângelui periferic pentru aceste teste. Testele IGRA au fost concepute pentru a măsura producția de IFN- γ de către celulele sanguine periferice, predominant de către un subgrup distinct de limfocite T. Oricum, doar 2-5% din totalul limfocitelor corpului uman circulă în sânge¹⁶. Numărul celulelor T efectoare cu memorie (populația de celule care reprezintă cel mai probabil sursa predominantă a producției precoce de IFN- γ ca urmare a contactului *ex vivo* în IGRA) este foarte redus în sângele periferic. În TB activă, celulele T cu memorie care se transformă în celule T efectoare cu memorie sunt recrutate la locul infecției¹⁷. Astfel, testele de identificare a celulelor T efectoare cu memorie în rândul celulelor mononucleare din sângele periferic (PBMC) pot numai să ofere informații indirecte despre activarea sistemului imun în boala activă. În consecință, testele IGRA efectuate pe celulele mononucleare din compartimentele infectate ar oferi o discriminare mai bună decât testele efectuate doar pe PBMC între TB activă și infecția TB latentă. Într-adevăr, limfocitele T specifice împotriva *M. tuberculosis* au fost identificate în număr crescut atât la persoane imunocompetente cât și la cele imunodeprimite, între limfocitele din lichidul de LBA, revărsatele pleurale sau pericardice, lichidele de ascită și lichidul cefalorahidian la pacienți cu TB pulmonară BAAR negativă în spută și cei cu TB pleurală, peritoneală, pericardică și meningea¹⁸⁻²⁶. Oricum, datele din literatură sunt sărace: studii cu număr relativ mic de cazuri sau cazuri clinice izolate. Sunt necesare studii ample prospective pentru evaluarea testelor IGRA din BAL pentru a distinge între TB activă și infecția TB latentă în cazul suspexilor de TB pulmonară cu BAAR absent la examenul microscopic al sputei.

Au testele IGRA vreun rol în diagnosticul TB active?

Testele imune ca IGRA și IDR la PPD nu detectează în mod direct *M. tuberculosis*, ci indică răspunsul imun celular la sensibilizarea recentă sau îndepărtată la *M. tuberculosis*²⁷. Deoarece IGRA nu pot diferenția TB activă de infecția TB latentă, un rezultat IGRA pozitiv nu indică neapărat TB activă (afirmație aproape întotdeauna adevărată pentru locurile cu prevalență ridicată a TB). Mai mult decât atât, un rezultat negativ izolat la un test IGRA nu poate exclude boala activă la un individ suspectat de TB; această afirmație este valabilă și pentru IDR la PPD. Aceasta din cauză că IGRA, ca și IDR la PPD, nu detectează toate cazurile de TB activă confirmate prin cultură; meta-analizele sugerează că IGRA au o sensibilitate de \approx 70-90% în TB activă (testele ELISPOT au o sensibilitate mai mare decât cele ELISA), iar sensibilitatea poate fi mai joasă în locurile cu incidență ridicată a TB^{28,29}. Oricum, meta-analizele referitoare la sensibilitatea testelor IGRA sunt bazate în special pe studii efectuate la adult.

Kampmann și colab.¹⁵ au raportat o sensibilitate de 83% a IDR la PPD în TB activă, comparativ cu 80% pentru QFT-GIT și 58% pentru T-SPOT.TB. În timp ce rezultatele pentru sensibilitate IDR la PPD și QFT-GIT sunt comparabile cu rezul-

tatele unor meta-analize anterioare, sensibilitatea raportată pentru T-SPOT.TB (58%) este substanțial mai joasă decât în alte estimări anterioare. În fața acestei situații trebuie avute în vedere posibile erori tehnice și probleme de manipulare a speciemenelor, însă testele au fost efectuate cu control potrivit; pot fi incriminate motive imunofiziologice ca explicație pentru sensibilitatea mai joasă a T-SPOT.TB la copii, după cum sugerează Kampmann și colab.¹⁵

Acest studiu¹⁵ confirmă o dată în plus nevoia de a fi prudenți în excluderea TB active pe baza unui rezultat negativ la un test IGRA. De asemenea, pune problema dacă situația se ameliorează în cazul utilizării concomitente a IDR la PPD și a IGRA: valoarea predictivă negativă pentru infecția cu *M. tuberculosis* este $>$ 95% în cazul în care atât IDR la PPD, cât și IGRA sunt negative^{30,31}. Astfel, combinația dintre cele două rezultate negative aproape exclude diagnosticul atât de infecție TB latentă, cât și de TB activă la indivizii imunocompetenți. Kampmann și colab.¹⁵ au lărgit astfel cunoștințele noastre în domeniu, cu utilitate practică în special în cazul copiilor evaluați pentru TB activă. Este esențială respectarea unei tehnici adecvate, cu probe de control care să detecteze eventuale manipulări incorecte ale probelor biologice ce ar putea conduce la rezultate fals negative.

Așa cum s-a sugerat anterior, în diagnosticul TB active, rezultatele pozitive ale IGRA și IDR-PPD vor fi de cea mai mare valoare acolo unde probabilitatea pre-test de TB activă este mare și probabilitatea pre-test de infecție latentă TB este joasă. Acest fapt se aplică cel mai bine la persoanele cu manifestări clinice de TB activă cărora le lipsesc factorii de risc de expunere anterioară la *M. tuberculosis*³². În mod cert, această situație nu se aplică indivizilor din țări cu o incidență ridicată a TB.

Care sunt dovezile curente pentru utilizarea IGRA în practica clinică?

Ar putea fi două situații în care IGRA să aibă o valoare clinică adițională față de IDR-PPD: la cei vaccinați BCG după vârsta de sugăr și la cei revaccinați BCG. În aceste cazuri IGRA sunt superioare IDR la PPD pentru că este puțin probabil să fie fals pozitive. Memoria imună identificată de IGRA corelează probabil mai bine cu riscul de dezvoltare de TB activă, deși efectul nu este la fel de convingător la copii și la cei nevaccinați BCG. Pentru diagnosticul TB active la persoane imunocompetente, un rezultat combinat negativ, atât al IGRA, cât și al IDR-PPD ar servi ca instrument de excludere al bolii cu foarte mare specificitate. Pentru adulți, în contrast cu copiii, sunt disponibile teste diagnostice moleculare rapide pentru detectarea *M. tuberculosis* și screening al multidrog rezistenței, așa încât așteptarea citirii rezultatului IDR-PPD complementar rezultatului IGRA poate reprezenta în realitate o strategie mai puțin eficientă în diagnosticul TB active.

Cunoștințele noastre despre valorile predictive pozitivă și negativă ale testelor IGRA în diagnosticul TB active în rândul populațiilor vulnerabile imunodeprimite (ex. infecție HIV, insuficiență renală cronică, transplant de organ sau de măduvă, tratament cu agenți anti-TNF) sunt încă foarte limitate. Rezultatele unor studii cross-sectionale pe cohorte³³⁻³⁵ sugerează că frecvența răspunsului imun pozitiv la IGRA este mai mare decât a celui la IDR-PPD la pacienții cu imunosupresie severă, însă din nefericire lipsesc date din studii longitudinale despre incidența TB în rândul celor care fuseseră testați. În final

rămâne încă neclar dacă testele IGRA au o valoare predictivă mai bună decât IDR-PPD în țările cu incidență ridicată a TB.

În concluzie, până în momentul actual, *nici unul dintre testele bazate pe răspunsul imun (IDR-PPD, IGRA din sângele periferic, dozarea anticorpilor circulanți) nu poate înlocui testele convenționale precum examenul microscopic, cultura și testele de amplificare a acizilor nucleici în diagnosticul TB active.* În contrast, imunodiagnosticul local prin BAL-ELISPOT³⁶ sau analiza sortării celulelor fluorescent-activate (FACS)²³ reprezintă metode promițătoare, în curs de evaluare, pentru a distinge infecția TB latentă de TB activă în cazul suspecților de TB pulmonară cu rezultate negative ale examenului microscopic și al testelor de amplificare genică. Această abordare pare cea mai potrivită pentru a putea lua o decizie rapidă privind inițierea tratamentului anti-TB în locuri în care se practică de rutină fibrobronhoscopie pacienților cu examen microscopic negativ și care dispun de tehnologie pentru ELISPOT și/sau FACS. Cu toate acestea, identificarea speciei micobacteriene, ca și testarea sensibilității la tuberculostatice nu este posibilă pe baza testelor imunologice.

Până ce vor fi identificați biomarkeri imunologici adecvați, gold-standard-ul în diagnosticul TB active continuă să fie detectarea directă, izolarea sau amplificarea ADN-ului *M. tuberculosis* din speciile clinice.

Bibliografie

- Migliori GB, Raviglione MC, Schaberg T, et al. Tuberculosis management in Europe. Task Force of the European Respiratory Society (ERS), the World Health Organisation (WHO) and the International Union against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD) Europe Region. *Eur Respir J* 1999;14:978–992.
- Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, et al. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:260–276.
- Pai M, O'Brien R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects. *Semin Respir Crit Care Med* 2008;29:560–568.
- Diel R, Nienhaus A, Lange C, et al. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res* 2006;7:77.
- Ewer K, Deeks J, Alvarez L, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003;361:1168–1173.
- Kang YA, Lee HW, Yoon HI, et al. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *JAMA* 2005;293:2756–2761.
- Diel R, Ernst M, Döscher G, et al. Avoiding the effect of BCG-vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. *Eur Respir J* 2006;28:16–23.
- Drobniewski F, Balabanova Y, Zakamova E, et al. Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. *PLoS Med* 2007;4:e55.
- Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, et al. Predictive value of a whole blood IFN- assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1164–1170.
- Bakir M, Millington KA, Soysal A, et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon- biomarker in children with tuberculosis contact. *Ann Intern Med* 2008;149:777–787.
- Hill PC, Jackson-Sillah DJ, Fox A, et al. Incidence of tuberculosis and the predictive value of ELISPOT and Mantoux tests in Gambian case contacts. *PLoS ONE* 2008;3:e1379.
- Newton SM, Brent AJ, Anderson S, et al. Paediatric tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 2008;8:498–510.
- Daniel TM. The rapid diagnosis of tuberculosis: a selective review. *J Lab Clin Med* 1990;116:277–282.
- Sam IC, Drobniewski F, More P, et al. *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance, United Kingdom. *Emerg Infect Dis* 2006;12:752–759.
- Kampmann B, Whittaker E, Williams A, et al. Interferon- release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J* 2009; 33: 1371–1379
- Westermann J, Pabst R. Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Invest* 1992;70:539–544.
- Jafari C, Lange C. Sutton's Law: local immunodiagnosis of tuberculosis. *Infection* 2008;36:510–514.
- Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1048–1054.
- Jafari C, Ernst M, Strassburg A, et al. Local immunodiagnosis of pulmonary tuberculosis by enzyme-linked immunospot. *Eur Respir J* 2008;31:261–265.
- Losi M, Bossink A, Codecasa L, et al. Use of a T-cell interferon- release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 2007;30:1173–1179.
- Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, et al. Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T-cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005;40:184–187.
- Lange C, Hellmich B, Ernst M, et al. Rapid immunodiagnosis of tuberculosis in a woman receiving anti-TNF therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:528–534.
- Strassburg A, Jafari C, Ernst M, et al. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-linked immunospot assay in an immunocompromised host. *Eur Respir J* 2008;31:1132–1135.
- Thomas MM, Hinks TS, Raghuraman S, et al. Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* meningitis by enumeration of cerebrospinal fluid antigen-specific T-cells. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:651–657.
- Köesters K, Nau R, Bossink A, et al. Rapid diagnosis of CNS tuberculosis by a T-cell interferon- release assay on cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Infection* 2008;36:597–600.
- Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, et al. Recruitment of *Mycobacterium tuberculosis* specific CD4+T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis. *J Intern Med* 2009;265:163–168.
- Mack U, Migliori GB, Sester M, et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*? A TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2009;33:956–973.
- 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;146:340–354.
- Pai M, Zwering A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008;149:177–184.
- Dosanji DP, Hinks TS, Innes JA, et al. Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Ann Intern Med* 2008; 148:325–336.
- Goletti D, Stefania C, Butera O, et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study. *PLoS ONE* 2008;3:e3417.
- Menzies D. Using tests for latent tuberculosis infection to diagnose active tuberculosis: can we eat our cake and have it too?. *Ann Intern Med* 2008; 148:398–399.
- Stephan C, Wolf T, Goetsch U, 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;22:2471–2479.
- Rangaka MX, Wilkinson KA, Seldon R, et al. Effect of HIV-1 infection on T-cell-based and skin test detection of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:514–520.
- Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, et al. Comparison of an interferon-gamma assay with tuberculin skin testing for detection of tuberculosis (TB) infection in patients with rheumatoid arthritis in a TB-endemic population. *J Rheumatol* 2008;35:776–781.
- Jafari C, Thijsen S, Bossink A, et al. Comparison of BAL ELISPOT and NAT for the diagnosis of smear-negative tuberculosis—a TBNET study. *Eur Respir J* 2008;32: Suppl. 52 1