

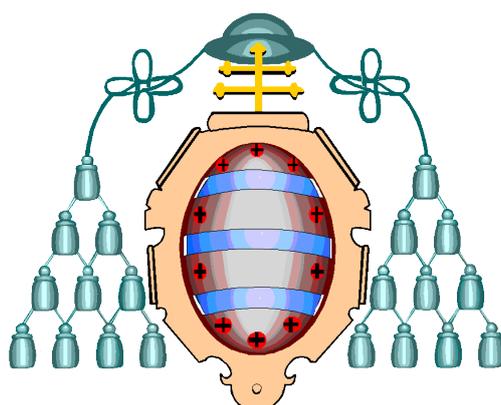
UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

***DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA MEDIANTE
IGRA (INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS) EN
ASTURIAS.***

PABLO ARGÜELLES MENÉNDEZ

OVIEDO, 2019



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

***DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN TUBERCULOSA MEDIANTE
IGRA (INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS) EN
ASTURIAS.***

PABLO ARGÜELLES MENÉNDEZ

OVIEDO, 2019



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis Doctoral	
Español: Diagnóstico de la infección tuberculosa latente mediante IGRA (Interferon Gamma Release Assays) en Asturias	Inglés: Diagnosis of the latent tuberculosis infection by IGRA (Interferon Gamma Release Assays) in Asturias

2.- Autor	
Nombre: PABLO ARGÜELLES MENÉNDEZ	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Línea de Investigación: ENFERMEDADES INFECCIOSAS	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Los ensayos basados en la liberación de IFN- γ (IGRA) detectan la respuesta de los linfocitos T frente a los antígenos ESAT-6 y CFP-10 que expresa *M. tuberculosis* y están ausentes en *M. bovis* BCG y en la mayoría de las micobacterias ambientales. Existen dos técnicas comerciales: QuantiFERON®-TB Gold (QTF) y T-SPOT®.TB. Los IGRA se han convertido en una herramienta diagnóstica con un gran impacto en la práctica clínica. Sin embargo, la experiencia recogida a menudo es contradictoria. Nuestro estudio analiza, a lo largo de 11 años, dos versiones diferentes de QTF (QTF In-Tube, agosto 2007-junio 2016, y QTF Plus, julio 2016-diciembre 2018) y una misma versión de T-SPOT.TB (2011-2018). En Asturias QTF es la prueba de elección para llevar a cabo el diagnóstico de infección tuberculosa. En el caso de personas inmunodeprimidas, candidatas a terapias biológicas, en menores de 5 años se recomienda realizar además T-SPOT.TB. En Asturias se ha producido un incremento de la demanda diagnóstica de las pruebas IGRA, principalmente en las edades medias de la vida. El porcentaje de infectados detectado por IGRA fue del 15,2%. El mayor número de indeterminados se registró en edades extremas. La comparación entre ambas versiones de QTF y T-SPOT.TB mostró una elevada concordancia (82,1% QTF-GIT/T-SPOT.TB y 89,3% QTF-Plus/T-SPOT.TB), siendo T-SPOT.TB la técnica IGRA con mayor número de positivos (15,6 y 18%, respectivamente frente a 13% QT-GIT y 16,7% QTF-Plus) pero también de indeterminados (9,6% vs. 5,8% QTF-GIT; y 3,8% vs. 1,9% QTF-Plus). Las discrepancias entre QTF y T-SPOT.TB se produjeron mayoritariamente en la zona de valores límite. En muestras positivas simultáneamente por QTF-Plus y T-SPOT.TB se evidenció una correlación entre los valores cuantitativos (UI/mL/nº de spots) obtenidos con cada IGRA. En QTF, la extensión del período de incubación hasta las 72h no inducía la liberación inespecífica de IFN- γ , sin embargo en T-SPOT.TB incrementaba significativamente el número de indeterminados y falsos negativos. El ajuste del número de células recomendado para la fase de incubación en T-SPOT.TB no resultó crítico en un rango superior de 2-7 veces el recomendado. Respecto a las lecturas individualizadas de los tubos TB1 y TB2 de la versión QTF-Plus, no se encontraron diferencias significativas entre las lecturas de los tubos TB1 y TB2 de QTF-Plus, aunque se observaron valores medios superiores en el TB2. Las discrepancias se encontraron en los rangos de lectura muy próximos al punto de corte. En el caso de las lecturas individualizadas de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de T-SPOT.TB, las coincidencias fueron máximas por encima de 30 spots en cualquiera de los pocillos, registrándose más positivos con CFP-10 que con ESAT-6. Un 11,5% de enfermos de tuberculosis estudiados presentaba IGRA persistentemente negativos. El índice de positividad IGRA en el personal sanitario de <45 años fue igual a la de la población general aunque la tasa de conversiones era el doble. Se identificaron 9 casos de conversiones IGRA en pacientes con terapias biológicas (0,44% vs. 0,5% población general), en 4 de ellos (44%) la conversión IGRA fue seguida del desarrollo de enfermedad tuberculosa primaria sin registrarse ningún caso hasta la fecha en población general. Teniendo en cuenta nuestros resultados, consideramos que en pacientes de riesgo es recomendable mantener en Asturias la estrategia de utilización combinada de dos IGRA y tuberculina ya que mejora la sensibilidad diagnóstica, mientras que en población general QTF-Plus parece reunir los requisitos para ser la herramienta diagnóstica más recomendable, complementada en casos puntuales con T-SPOT.TB.

RESUMEN (en Inglés)

Interferon gamma release assays (IGRA) detect T-Lymphocyte response when exposed to ESAT-6 and CFP-10 antigens expressing *M. tuberculosis* and absent in *M. bovis* BCG and most other non-tuberculous mycobacteria. There are two commercial techniques: QuantiFERON®-TB Gold (QTF) and T-SPOT®.TB. In recent years, IGRAs have become a diagnostic tool with a great clinical practice impact. However, experience published generates controversy. Our study analyzes, over 11 years, two different versions of QTF (QTF In-Tube, August 2007-June 2016, and QTF Plus, July 2016-December 2018) and the same version of T-SPOT.TB (2011 - 2018). In Asturias, QTF is the IGRA-test used for routine diagnosis of tuberculosis infection. In the case of immunosuppressed-patients, candidates for biological therapies, and children under 5 years old, T-SPOT.TB is also recommended. In Asturias there has been an increase in the diagnostic demand of IGRA studies, mainly in the middle ages of life. The percentage of infected detected by IGRA was 15.2%. The highest number of indeterminate results was recorded in extreme ages. Comparison between both versions of QTF and T-SPOT.TB showed high agreement (82.1% QTF-GIT / T-SPOT.TB and 89.3% QTF-Plus / T-SPOT.TB), being T-SPOT.TB the IGRA technique with the highest number of positives (15.6% and 18%, respectively compared to 13% QTF-GIT and 16.7% QTF-Plus) but also with a greater number of indeterminate results (9.6% vs. 5.8% QTF-GIT; and 3.8% vs. 1.9% QTF-Plus). Discrepancies between QTF and T-SPOT.TB occurred mostly in the gray zone. In positive samples by QTF-Plus and T-SPOT.TB a correlation between quantitative values (IU/mL / number of spots) obtained with each IGRA was evidenced. The extension of the incubation period until 72h did not induced nonspecific release of IFN- γ in QTF, but in T-SPOT.TB we observed a significant increase in the number of indeterminate and false-negative results. The adjustment of number of cells in T-SPOT.TB was not critical in a range 2-7 times greater than recommended. Individual value readings of the TB1 and TB2 tubes from the QTF-Plus do not showed significant differences, although higher mean values were observed in TB2. Discrepancies were found in values close to the cutoff point. In the case of T-SPOT.TB, when spots number was above 30 agreement between ESAT-6 and CFP-10 antigens was total, although CFP-10 registered more positives than ESAT-6. The 11.5% of tuberculosis patients studied were persistently IGRA-negative. The IGRA positivity index in health care workers <45 years old was similar to the general population, although the conversion rate was almost double. Nine cases of IGRA conversions were identified in patients with biological therapies (0.44% vs. 0.5% general population), in 4 of them (44%) the conversion was followed by the development of disease primary tuberculosis, while no cases have been recorded to date in the general population. Taking into account our results, we consider that in the risk patients combined use of two IGRA and tuberculin is the best strategy to improve diagnostic sensitivity, while in the general population QTF-Plus seems us most recommendable, supplemented in specific cases with T-SPOT.TB.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD

*a Mateo, que lleva la mitad
de su corta vida
preguntándose qué demonios
hago frente al ordenador
durante tantas horas,*

*y a Espe, por la increíble
paciencia de quien nació
impaciente*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin el trabajo de muchas personas a lo largo de estos años.

Excelentes profesionales entre los que debo citar a la especialista en Microbiología Ana Fernández Blázquez, su ayuda fue muy importante para el análisis de los datos del primer año de experiencia con QuantiFERON TB Gold Plus con los que elaboramos la comunicación “One-Year Experience with QuantiFERON-TB Gold Plus in Patients with Immunosuppressive Conditions”, presentada en el Congreso Internacional de la American Thoracic Society (ATS) en San Diego. Debo recordar a Fátima Abreu Salinas, Residente de Microbiología de 4º año, porque sobrellevó el peso de fusionar la base de datos IGRA del antiguo HUCA (Servolab) con la del nuevo HUCA (Gestlab) -dicho sea de paso, con una minuciosidad extrema- y además por el entusiasmo y buenas ideas para la comunicación “Simultaneous use of two interferon-gamma release assay (T-SPOT.TB and novel QuantiFERON-TB Gold Plus) for the diagnosis of latent tuberculosis infection in immunosuppressed patients” presentada en el European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) en Amsterdam. Sin olvidar a Cristian Castelló Abietar, también Residente de 4º año de Microbiología, que fue el encargado de defenderla -brillantemente-.

A María Dolores Pérez Hernández, del Servicio de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias, le debemos gran parte de la información relativa a los estudios de contactos, las alertas sanitarias, casos de Tuberculosis, etc.

La logística necesaria para poder llevar a cabo la realización de los estudios IGRA a la población asturiana se sustenta en el buen hacer cotidiano de todos los profesionales que integran la Red de Laboratorios de Microbiología del SESPA.

Especial recuerdo para el personal del Laboratorio del Instituto Nacional de Silicosis en el viejo HUCA, responsables de mi formación práctica en mi época de residente, que en su día se adaptaron sin problema y con gran afán a esta nueva metodología diagnóstica: Ángela, Ángeles, Isabel, Macarena, Totes y Zulima. Y también al conjunto actual de Técnicos del Laboratorio de Micobacterias del nuevo HUCA, que, con el mismo buen ánimo, soportan sobre sus hombros el importante incremento en el número de estudios IGRA: Marián, Marta, Mónica, Nacho, Ramón y Yoli.

Por último, agradecer al “alma mater” del proyecto, el Dr. Juanjo Palacios el darme la oportunidad de dar a conocer tan valiosa información.

ÍNDICE

GLOSARIO	XII
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	1
<hr/>	
ESTRUCTURA DEL BACILO	3
POBLACIONES BACILARES	6
RESPUESTA INMUNE A <i>M. TUBERCULOSIS</i>	7
INFECCIÓN LATENTE Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS	17
PRUEBAS DIAGNÓSTICAS	18
1. PRUEBA DE LA TUBERCULINA (PPD)	18
EFECTO <i>BOOSTER</i> .	21
REVERSION TUBERCULINA	22
CONVERSION TUBERCULINA	22
2. ENSAYOS BASADOS EN LA LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IGRA)	23
IGRA en población pediátrica	25
IGRA y VIH	26
IGRA y enfermedades inflamatorias	26
Fuentes de variabilidad de los IGRA	27
3. IGRA vs. TUBERCULINA	28
HIPÓTESIS	30
<hr/>	
OBJETIVOS	32
<hr/>	
MATERIAL Y MÉTODO	34
<hr/>	
LOGÍSTICA	35
PROCEDIMIENTO QUANTIFERON TB GOLD	36
PROCEDIMIENTO T-SPOT.TB	39
RESULTADOS	45
<hr/>	
1. EVOLUCIÓN DE LA DEMANDA DIAGNÓSTICA	46
2. RESULTADOS GLOBALES IGRA	47
2.1. QUANTIFERON TB Gold (In-Tube + Plus)	47
2.2. RESULTADOS QUANTIFERON TB GOLD IN-TUBE	48
2.3. RESULTADOS QUANTIFERON TB GOLD PLUS	51
2.4. RESULTADOS T-SPOT.TB	53
3. RESULTADOS COMPARATIVOS: QUANTIFERON vs. T-SPOT.TB	56
3.1. QTF TB GOLD IN-TUBE vs. T-SPOT.TB	58
3.2. QTF TB GOLD PLUS vs. T-SPOT.TB	60
4. RESULTADOS IGRA EN DIFERENTES CONTEXTOS	63

4.1	QUANTIFERON TB GOLD PLUS: LECTURAS INDIVIDUALIZADAS REGISTRADAS EN LOS TUBOS TB1 (ESTIMULACIÓN CD4+) Y TB2 (ESTIMULACIÓN CD8+)	63
4.2	QUANTIFERON TB GOLD PLUS: RESULTADOS POSITIVOS A EXPENSAS DE UNO DE LOS DOS TUBOS (TB1 O TB2)	64
4.3	T-SPOT.TB: RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS ESAT-6 Y CFP-10	65
4.4	T-SPOT.TB, RESULTADOS POSITIVOS A EXPENSAS SOLAMENTE DE UNO DE LOS DOS ANTÍGENOS (ESAT-6 o CFP-10)	66
4.5	RESULTADOS POSITIVOS AMBOS IGRA: CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS POR QUANTIFERON TB GOLD PLUS (UI/ML) Y T-SPOT.TB (Nº DE SPOTS)	67
4.6	CONVERSIONES / REVERSIONES / DISCREPANCIAS CUANDO EN UNO DE LOS DOS IGRA LOS CRITERIOS PARA VALIDAR LOS RESULTADOS SE ENCONTRABAN PRÓXIMOS A LOS LÍMITES O EN SITUACIONES NO ACLARADAS POR EL FABRICANTE	68
4.7	EFECTO DE LA SOBREINCUBACIÓN EN LOS RESULTADOS DE QTF Y T-SPOT.TB	68
4.8	EFECTO DEL AJUSTE DE CÉLULAS POR POCILLO EN T-SPOT.TB	70
4.9	IGRA RESULTADOS PERSONAL SANITARIO	70
4.10	IGRA EN ENFERMOS DE TUBERCULOSIS	72
4.11	ENFERMOS TB CON QTF PLUS POSITIVO, RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS TUBOS TB1 Y TB2	73
4.12	CONVERSIÓN IGRA Y DESARROLLO DE ENFERMEDAD	73
<u>DISCUSIÓN</u>		76
<u>CONCLUSIONES</u>		94
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>		99
<u>ANEXOS</u>		123

GLOSARIO

A

ADN: ácido desoxirribonucleico

APC: células presentadoras de antígeno

ART: terapia antirretroviral

B

BCG: *Bacille Calmette-Guérin*

C

CCAA: Comunidades Autónomas

C: citosina

CFP-10: *Culture Filtrate Protein 10*

CDC: Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades de EEUU

D

DC: células dendríticas

E

EEA: Espacio Económico Europeo

EEUU: Estados Unidos de América

ESAT-6: *Early Secretory Antigenic Target 6*

ELISPOT: *enzyme-linked immunospot assay*

ECDC: Centro Europeo para el Control y Prevención de las Enfermedades

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*

F

FDA: *Food and Drug Administration*

G

G: guanina

H

HUCA: Hospital Universitario Central de Asturias

I

IL: interleucina

IRNs: intermediarios reactivos de nitrógeno

IFN- γ : interferón- γ

IROs: intermediarios de oxígeno

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

IGRA: *Interferon Gamma Release Assay*

IMID: *immune-mediated inflammatory diseases*

ITL: Infección Tuberculosa Latente

M

M. tuberculosis: Mycobacterium tuberculosis

mAGP: ácido micólico arabinogalactano-peptidoglucano

MA: macrófagos alveolares

MCH: complejo de histocompatibilidad

N

NK: células *natural killer*

NTM: micobacterias no tuberculosas

L

LAM: lipoarabinomanano

O

OMS: Organización Mundial de la Salud

P

PRRs: *Pattern Recognition Receptor*

PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*

PT: prueba de la tuberculina

PPD: derivado proteínico purificado

PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells*

Q

QFT: QuantiFERON

R

RIC: respuesta inmune celular

S

SIDA: síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SP-A: proteínas surfactantes A

SP-D: proteínas surfactantes D

SEPAR: Sociedad de Neumología y Cirugía Torácica

SFU: *spot-forming units*

SESPA: Servicio de Salud del Principado de Asturias

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

T

TLRs: *Toll-like receptors*

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TB: tuberculosis

TB-R: cepas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*

TB-MR: cepas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*

U

UE: Unión Europea

URM: Unidad de Referencia Regional de Micobacterias

V

VPP: Valor predictivo positivo

VPN: Valor predictivo negativo

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo hoy en día un problema prioritario de salud pública a nivel mundial, es la enfermedad infecciosa que registra la mayor tasa de mortalidad y, a la vez, es una de las diez principales causas de muerte en la población en general.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que una cuarta parte de la población mundial habría desarrollado una Infección Tuberculosa Latente (ITL).

En el año 2017 se estima que a nivel mundial se registraron 10 millones de casos de TB (rango: 9,0–11,1 millones) y que 1,3 millones de personas murieron a causa de la TB (rango. 1,2–1,4 millones), con 300.000 muertes adicionales (rango: 266.000–335.000) en coinfectados por el VIH (virus de inmunodeficiencia humana) ¹.

En 2014, se informaron 58.008 casos de TB en la UE/EEA, con una incidencia media de 12,8 casos por 100.000 habitantes ². No obstante, siempre hay que ser precavidos con los datos numéricos ya que, aunque la TB es una enfermedad de declaración obligatoria, según algunas estimaciones la infradeclaración podría alcanzar el 30%.

En España, en 2016 se declararon 4.940 casos de TB (10,38 casos/100.000 habitantes), 118 casos eran importados; En cuanto a la localización, 3.382 fueron TB respiratorias (7,28 casos por 100.000 habitantes). Las tasas por Comunidades Autónomas (CCAA) oscilaron, entre las tasa más elevada a nivel peninsular registrada en Galicia con 20,78 (564 casos), y la más baja en Canarias con 5,36 (115 casos). Ceuta notificó 20 casos (tasa de 23,59) y Melilla notificó 15 casos (tasa de 17,75).

En en las últimas décadas en nuestro país se han producido cambios demográficos significativos, lo que explica que en algunas CCAA el 35–40% de los casos de TB se diagnostican en personas nacidas fuera de España.

Como era de esperar, el mayor número de casos de TB se produjo en hombres (2.987 casos, 62% del total), con una proporción hombre/mujer de 1,6. En mujeres la incidencia más elevada se registró en el grupo de edades entre 25 y 34 años, mientras que en hombres fueron los de edades superiores a 75 años,

seguido de los grupos de 35 a 54 años ³. El impacto de la coinfección con VIH fue del 6,2%.

Entre los factores que se citan para la ralentización en el descenso del número de casos de TB en países de ingresos medios-altos está la infección por el VIH con una clara concordancia de edades entre los grupos poblacionales de infectados ^{4,5}. A este escenario se unen el impacto de la inmigración ilegal de personas procedentes de países endémicos; el riesgo de expansión a nivel mundial de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes a uno o más fármacos que ya circulan en muchos países con elevadas tasas de incidencia; la generalización en el uso de los fármacos moduladores de la respuesta biológica en muchas patologías crónicas y que conlleva un mayor riesgo de desarrollar TB; y las continuas demoras en la implantación de un plan coordinado para el control de la tuberculosis en nuestro país ^{6,7}.

ESTRUCTURA DEL BACILO

La TB está causada por por *M. tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. canetti*, *M. microti*, *M. pinnipedi*). La familia *Mycobacteriaceae* (del orden *Actinomycetales*) incluye un único género *Mycobacterium*, que agrupa a un tipo de bacilos débilmente gram-positivos aerobios no esporulados de 0,2-0,6 x 1-10 µm. Su contenido de guanina y citosina (G+C) en el ADN (ácido desoxirribonucleico) es elevado, 62 a 70 moles por 100 ⁸. Aproximadamente el 25% del peso seco de la bacteria está constituido por los lípidos libres de las capas exteriores de la célula. Estos lípidos contienen ceras, micósidos específicos de especie (glucolípidos complejos y peptido-glucolípidos) y *cord factor* (6,6"-dimicolato de trehalosa) que se asocia al alineamiento en paralelo de las filas de bacilos, una de las características de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* (FIG 1).

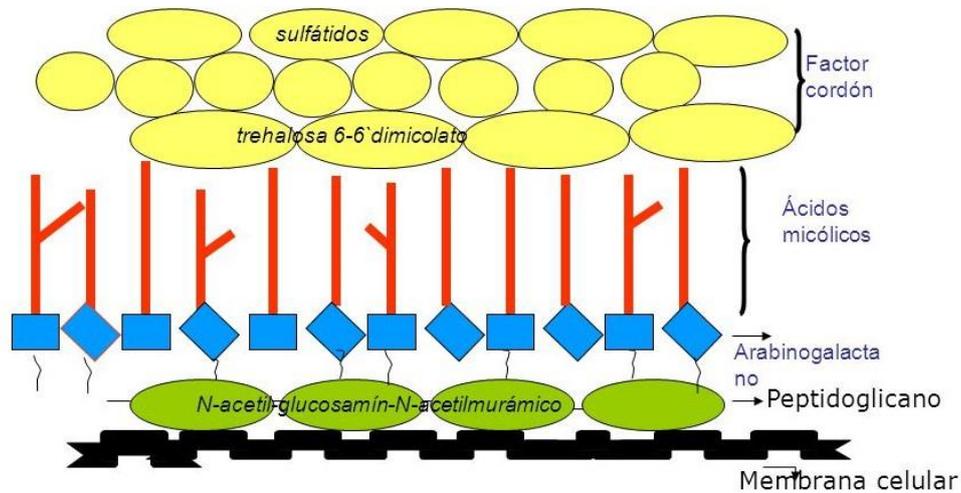


FIGURA 1.- Capas exteriores de la célula de *M. tuberculosis*. (slideserve.com)

Las cadenas peptídicas de la capa externa comprenden un 15% del peso de la pared celular y expresan antígenos relevantes de cara a la respuesta inmune celular.

La envoltura de *M. tuberculosis* es una estructura compleja, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática⁹. La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y sirve de protección contra múltiples factores externos (FIG 2). Entre los principales componentes se encuentran el ácido micólico y glicolípidos (responsables, junto con algunas proteínas, de las características antigénicas de la bacteria)^{9,10}. La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee un elevado contenido en lípidos (50-60%) que le confieren un carácter hidrofóbico y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática. Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos convencionales⁹ y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP). El esqueleto de peptidoglucano, relativamente uniforme en todas las especies de micobacterias, representa el elemento fundamental de la pared celular. La presencia de estos ácidos micólicos y de otros lípidos por fuera de la capa de peptidoglucano hace que las micobacterias sean ácido-alcohol-resistentes. La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los

fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la TB ⁹ (FIG 3).

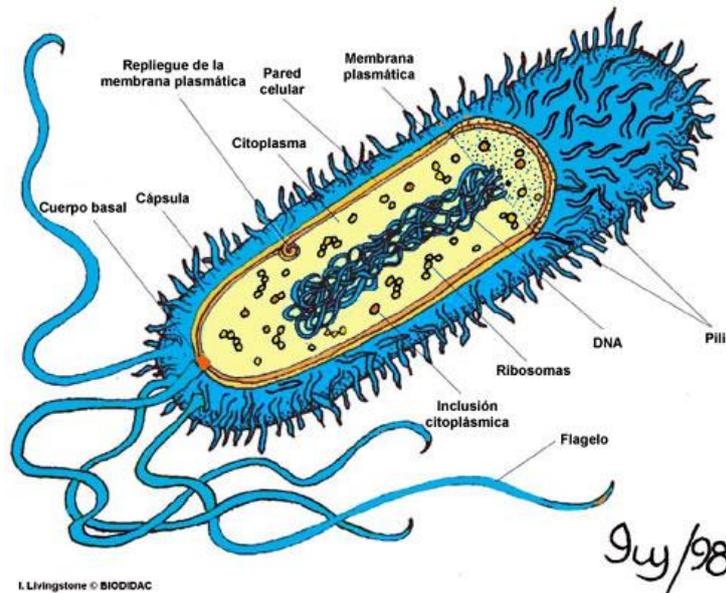


FIGURA 2.- Estructura de la envoltura de *M. tuberculosis* (Ilustración de Ivy Livingstone para BIODIDAC)

Las micobacterias tienen requerimientos nutricionales sencillos, tienen un crecimiento lento y se multiplican cada 12-24 horas. El aislamiento por cultivo de las especies de micobacterias de crecimiento rápido puede lograrse tras períodos cortos de incubación, en tres o pocos días más, pero las especies de crecimiento lento suelen requerir, por lo general, entre 2-8 semanas. Tienen elevada resistencia a los desinfectantes, pero son destruidos por la pasteurización y la esterilización al calor. Son resistentes a la congelación y desecación pueden sobrevivir durante largos períodos en superficies inanimadas, en esputos secos y en restos de líquidos corporales.

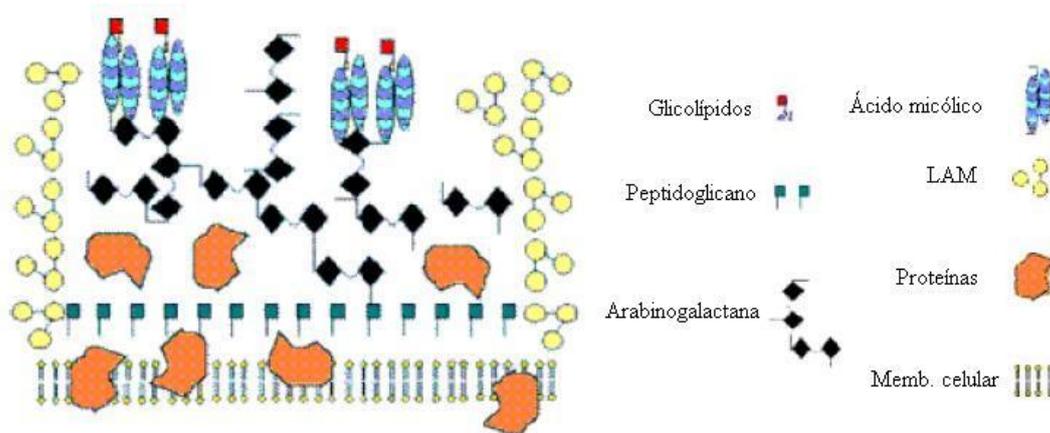


FIGURA 3.- Representación de la pared celular de *M. tuberculosis*. (Tomado de Gorocica P, Jiménez-Martínez M, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *M. tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev Inst Nal Enf Resp Mex volumen 18 - número 2 abril-junio 2005 páginas: 142-153)

POBLACIONES BACILARES

Según las características del medio en el que se encuentran los bacilos, se reconocen cuatro tipos de poblaciones bacilares ¹¹.

1. Población de micobacterias extracelulares en fase de metabolismo activo y en crecimiento continuo, localizadas en las paredes de las cavidades donde la fisiología del medio es óptima. Representan la mayoría de los bacilos y determinan la gravedad de la enfermedad, se diseminan fácilmente por vía bronquial y se eliminan en gran número al exterior por lo que son determinantes para el contagio de la enfermedad, entre ellos suele haber una proporción natural de mutantes resistentes a los fármacos, estos mutantes son los responsables de los fracasos del tratamiento cuando no se emplean pautas de tratamiento adecuadas, caso de las monoterapias encubiertas o de los tratamientos erráticos. El fármaco más eficaz frente a esta población es la isoniacida, por su acción bactericida.

2. Población de micobacterias en fase de inhibición ácida. Menos numerosa que la anterior, se encuentran en el interior de los macrófagos y su crecimiento es inhibido por el medio ácido en las células de las zonas inflamatorias o por la baja oxigenación del medio en el que se encuentran. No tienen actividad metabólica, motivo por el cual es difícil su eliminación por la acción de los fármacos. Constituyen junto a la población bacilar en fase de multiplicación

esporádica, la denominada población bacilar persistente, la cual es la principal fuente de recaídas bacteriológicas en el tratamiento de la TB. El fármaco más activo en este grupo es la pirazinamida, cuya actividad se incrementa con la acidificación del medio en el que actúa.

3. Poblacion de micobacterias en fase de multiplicación esporádica. Se reproducen en accesos de sólo unas horas de duración. Se localizan fundamentalmente en el caseum, donde el pH es neutro presentando ocasionalmente actividad metabólica que sólo dura unas horas. Los fármacos sólo pueden ejercer su acción durante estos cortos periodos metabólicos, que pueden no tener lugar durante todo el tratamiento. La rifampicina actúa selectivamente sobre esta población.

4. Poblacion de micobacterias persistente o totalmente durmiente. Permanece latente durante largos períodos de tiempo, carece de actividad metabólica, motivo por el que los fármacos no son eficaces frente a estos bacilos y solo podrían combatirse con los mecanismos de defensa del hospedador. Un razonamiento teórico situaría a esta población como una de las responsables de las recaídas en los pacientes con inmunodeficiencia severa.

El conocimiento de esta composición bacilar heterogénea en las lesiones tuberculosas propició el empleo de la estrategia de uso combinado de fármacos durante un largo período de tiempo para tratar la tuberculosis.

RESPUESTA INMUNE A *M. tuberculosis*

El *M. tuberculosis* ha desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta inmunitaria desarrollada por el hospedador. Las diferencias observadas entre las personas pueden ser explicadas por la eficiencia tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa.

La infección se transmite vía aérea, el mecanismo de entrada de *M. tuberculosis* es por inhalación de aerosoles que son eliminados por los enfermos bacilíferos al toser, estornudar o hablar y que contienen micobacterias, las gotitas más pequeñas (1-5 μm) son las más infectivas porque son capaces alcanzar la región alveolar y, además, pueden permanecer suspendidas en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo.

En el espacio alveolar los bacilos se encuentran con los mecanismos innatos de defensa ¹² (macrófagos alveolares -MA-, células dendríticas -DC-, neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y tipo II y mediadores solubles -mucina, lisozima, lactoferrina, etc.-), cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas y bacterias que entran a través del tracto respiratorio ^{13,14}. Los mediadores solubles son principalmente las proteínas surfactantes A (SP-A) y D (SP-D) que opsonizan al bacilo. La opsonización de *M. tuberculosis* por SP-A induce la fagocitosis por macrófagos, mientras que SP-D la reduce. SP-A induce la expresión de CD206 (receptor de manosa) en macrófagos, pero regula negativamente la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (IRNs), con un beneficio para el patógeno ¹⁶⁻¹⁸.

Los anticuerpos específicos pueden ser producidos contra *M. tuberculosis* por células B tipo 1 y 2 respectivamente. Los anticuerpos presentes en el moco opsonizan al bacilo e incrementan su fagocitosis por macrófagos vía receptores Fc. El componente C3b de complemento es liberado por las células alveolares tipo II, así como por macrófagos alveolares, los cuales contribuyen a la opsonización y fagocitosis de la micobacteria ^{19,20}.

Durante el primer contacto, los MA reconocen a la bacteria mediante una variedad de receptores superficiales e intracelulares (PRRs: *Pattern Recognition Receptor*) que detectan componentes bioquímicos microbianos, así, reconocen patrones moleculares del bacilo compartidos por grandes grupos de microorganismos (PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*), tales como receptores de desecho, receptores de manosa, CD14, CD44, DC-SIGN y receptores para opsoninas (receptores para proteínas surfactantes, receptores Fc y receptores de complemento) ²¹⁻²⁴.

Los PRRs mejor estudiados son los receptores tipo Toll (TLRs), 10 de los cuales han sido identificados en humanos ²⁵⁻²⁷. TLR-2 tiene un importante papel en el reconocimiento de *M. tuberculosis* en el pulmón. El reconocimiento de LAM (componente de la pared celular bacteriana) es mediado por receptores TLR2 (como un heterodímero con TLR6 ó TLR1) expresados en la membrana de macrófagos alveolares, al unirse inducen la producción de

moléculas como IL-1, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (NO) que directa o indirectamente contribuyen a la muerte de los microorganismos, activan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune innata ²⁸, además de inducir la activación de la respuesta adaptativa a través del reclutamiento de linfocitos T al sitio de lesión, activación de DC y producción de citocinas y quimiocinas ^{29,30}. Componentes del sobrenadante de cultivo de *M. tuberculosis* son reconocidos por TLR4, mientras que el ADN micobacteriano lo es por TLR9 ³¹⁻³³.

Los PAMPS desencadenan la activación de cascadas intracelulares que conduce a la actividad fagocítica de los MA que, si tiene éxito, resultará en que el microorganismo es completamente envuelto en vesículas citosólicas, los fagolisosomas.

Mientras que los macrófagos funcionan como la primera línea de defensa frente a la infección, las primeras interacciones con la bacteria favorecen a ésta. Así, los macrófagos son uno de los principales nichos celulares de replicación bacteriana durante la infección temprana y sirven como reservorios persistentes bacterianos en los granulomas del pulmón durante la infección crónica.

La estrategia de *M. tuberculosis* para entrar en los MA incluye su propia fagocitosis. a través de diferentes receptores presentes en la superficie de éstos, lo cual determina en parte la evolución temprana de la infección y la persistencia de la bacteria en el interior de la célula hospedadora ³⁴, de este modo interactúa con: 1) receptores para Fc, 2) receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) *Scavenger receptors* y 5) receptores para la proteína surfactante A. La interacción de la bacteria con el receptor C3 del complemento previene la producción de radicales libres de oxígeno y bloquea la maduración del fagosoma evitando la fusión con los lisosomas ³⁵.

La mayor parte de los componentes estructurales de las micobacterias son de naturaleza sacarídica, reconocidas por diversos receptores en los macrófagos y linfocitos T ³⁶. Algunas de estas estructuras son también responsables de inhibir o interferir los mecanismos microbicidas del macrófago infectado ³⁷.

Las citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α se producen en las etapas iniciales de la infección, atraen los neutrófilos, linfocitos y macrófagos para que fagociten los bacilos extracelulares, y además generan un foco inflamatorio. Los neutrófilos son las primeras células en llegar al sitio de multiplicación de los bacilos seguidos por las células *natural killer* (NK), pero son incapaces de eliminar directamente a *M. tuberculosis*. Juegan un papel defensivo, no solo como fagocitos no específicos, sino también secretando proteínas antibacterianas, principalmente la catelicidina LL-37^{38,39}. Las células NK son linfocitos innatos grandes y granulares de gran capacidad citolítica que actúan durante la infección temprana, especializados en reconocer y destruir células infectadas. Pueden también producir IFN- γ e IL-22⁴⁰, activan macrófagos, induciendo secreción de citocinas IL-12, IL-15 y IL-18, que activan células CD8+T^{41,42}.

Las células T toman parte en la activación y regulación de los macrófagos y, en consecuencia, en el control del crecimiento micobacteriano. En cuanto a la funcionalidad de los linfocitos T se identifican 2 tipos de respuestas colaboradoras: la Th1 (inmunidad celular o retardada) y la Th2 (inmunidad humoral).

Bajo la influencia de IL-12 secretada por los macrófagos, los linfocitos T CD4 específicos se transforman en linfocitos Th1, tras su activación secretan otras citocinas, principalmente interferón- γ (IFN- γ), el cual activará los macrófagos infectados, inducirá la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno y favorecerá la eliminación de la bacteria. La IL-4 promueve la transformación en células Th2. Esta división en 2 subtipos se basa en el panel de citocinas que éstos son capaces de secretar una vez activados, y con las que modulan a diversos tipos celulares. Se denomina Th1 a los linfocitos secretores de IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-18, TNF- α , RANTES, MCP-1, MIP-1 α e IL-816, y Th2 a los linfocitos que liberan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β (factor de crecimiento transformante β).

El control inmunológico de la infección con *M. tuberculosis* está basado en una respuesta caracterizada por la producción de citocinas y quimiocinas. Se atribuye un papel importante en el control del crecimiento del bacilo y la

prevención del daño al tejido pulmonar ⁴³ a la respuesta inmune de tipo celular Th1, mientras que la de células T cooperadoras tipo 2 (Th2) no se asocia con la resolución de la infección, pero si en el control del proceso inflamatorio que podría afectar al hospedador ⁴⁴⁻⁴⁷. La orientación hacia una respuesta inmune tipo Th1 o Th2, parece estar relacionada, con la naturaleza del ligando bacteriano y/o por la vía del receptor de entrada a la célula fagocítica. Las proteínas intracelulares son excelentes inductoras de TNF- α , IL-2 e IFN- γ , mientras que los polisacáridos inducen una respuesta de Th2, representada por IL-10. ^{48,49} secretada por los macrófagos. El balance mixto Th1/Th2 parece estar relacionado con el daño tisular producido por la respuesta inmunológica en la TB. Diversos signos clínicos como fiebre, pérdida de peso y daño tisular que expresan los pacientes con TB, recuerdan los efectos del TNF- α .

Una vez que las bacterias son fagocitadas, la mayoría se localizan en los fagosomas. En la fagocitosis convencional, los fagosomas se asocian a los lisosomas para degradar su contenido. Las micobacterias bloquean este proceso de fusión, el cual es un evento activo que depende de que las bacterias estén vivas, puesto que las bacterias muertas fagocitadas rápidamente ingresan al compartimento lisosomal ⁵⁰⁻⁵². La inhibición de la maduración fagosómica por la micobacteria puede ser revertida por citocinas como el IFN- γ y TNF α , los cuales también estimulan mecanismos microbicidas como la producción de radicales libres de oxígeno y óxido nítrico ⁵³.

Después de la captura del *M. tuberculosis* por los MA, puede ocurrir que la micobacteria sea destruida, en cuyo caso, es la inmunidad innata la respuesta inmunitaria más importante. No obstante, cuando la infección se establece, es la respuesta adaptativa, que se basa en el reconocimiento específico de antígenos por los diferentes tipos celulares que se activan y producen factores solubles como citocinas y quimiocinas, la que conduce el control de la infección.

La primera fase de la respuesta de las células T a *M. tuberculosis* no se inicia hasta pasados once a catorce días desde la infección. Los macrófagos fagocitan *M. tuberculosis* lo que no impide que se se replique en su interior, hasta que el macrófago muere y derrama antígenos de la micobacteria o

incluso bacilos intactos. Este ciclo continúa hasta que una DC fagocita la bacteria. Posteriormente a la fagocitosis, *M. tuberculosis* es incluida en un fagosoma para formar el fagolisosoma, donde es destruida por los mecanismos bactericidas y proteolíticos de los macrófagos con la consecuente generación de péptidos y otros antígenos.

Las DC, constituyen un puente entre la inmunidad innata y adaptiva, se activan y se transforman en células presentadoras de antígeno (APC), transportan a la bacteria hasta un nódulo linfático regional donde los antígenos micobacterianos de naturaleza proteica son acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo I (MCH I) y presentados por los macrófagos a linfocitos T CD8+, o bien, acoplados a moléculas del complejo de histocompatibilidad tipo II (MCH II) y presentados a los linfocitos T CD4+. Estas células T usan varios receptores, como TLRs, NODlike y C-type lectins, para este propósito, que reconocen antígenos bacterianos en la superficie de la DC infectada, iniciando la respuesta en el nodo linfático ⁵⁴. Se activarán y diferenciarán a células efectoras citotóxicas Tc1 o linfocitos secretores de IFN- γ T-helper (Th) tipo 1 respectivamente, abandonando el nódulo y migrando hacia el sitio de inflamación, dirigidas por citocinas y quemoquinas; allí realizan la actividad efectora de la inmunidad celular o participan en la inmunidad humoral por activación de linfocitos B específicos por el antígeno. Las células presentadoras de antígeno activadas liberan IL-12, citocina crítica para la expansión y diferenciación de las células T específicas de antígeno ⁵⁵.

Posteriormente, entre las semanas 2 y 4, se hace evidente la respuesta específica de las células T CD4+ y CD8+ ⁵⁶, las cuales, por medio de la producción de IFN- γ y el TNF- α , potencian los mecanismos efectores innatos. La segunda fase de la respuesta retardada ocurre después de que *M. tuberculosis* haya sido transportado al nodo linfático y la respuesta de las células T haya sido iniciada. A partir de este momento, el control de la infección se sustenta en la proliferación de células T específicas frente a los antígenos de *M. tuberculosis* y en la producción de citocinas proinflamatorias que mediarán en las reacciones de hipersensibilidad retardada que favorecen la migración de macrófagos, células T $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, células NK y fibroblastos al

pulmón. La producción de citocinas permite a los macrófagos infectados eliminar a *M. tuberculosis* o, al menos, contener su replicación ⁵⁷.

Las células T CD4+ tienen un rol fundamental en la defensa contra el *M. tuberculosis* durante la infección aguda y latente. En los humanos, la pérdida progresiva de las células T CD4+ es responsable de la TB entre las personas afectadas por el VIH ⁵⁸⁻⁶⁰. La función primaria efectora de las células T CD4+ es la producción de IFN- γ y otras citocinas, para activar a los macrófagos.

Si bien se pensaba que las células T CD4+ determinaban la respuesta inmune adaptativa en TB, hoy se sabe que otros subtipos de células T, incluyendo CD8+ y Th17 e incluso células B, participan en el proceso ^{38,61}. Las células CD8+ también son capaces de secretar IFN- γ e IL-4 y pueden jugar un papel en la regulación del balance de células Th1 y Th2 en los pulmones de pacientes con TB pulmonar. Las principales fuentes de IFN- γ son los linfocitos T y las células NK, aunque los macrófagos pueden constituir otra fuente importante de IFN- γ en la eliminación de tumores ⁶².

Aunque la producción de IFN- γ , por sí misma, es insuficiente para controlar la infección de *M. tuberculosis*, es necesario para la respuesta protectora. Es el mayor activador de macrófagos ⁶³, al inducir proteínas involucradas en la respuesta inmune, tales como: MHC I, MHC II, iNOS, p48, TAP 1, LAMP-2, etcétera. El IFN- γ induce la producción de intermediarios de oxígeno (IROs), IRNs, acidificación del fagosoma y fusión fagosomalisosoma, la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) para la producción de NO a partir de L-arginina como sustrato, la producción de α y β defensinas, la disminución del receptor de transferrina para reducir el hierro intracelular y, de esta manera, limitar el desarrollo de la micobacteria, aumento en las moléculas MHC I y MHC II y aumento en la capacidad para fagocitar e inducir la producción de IL-12 ^{64,65}.

Existe una relación entre la producción de IFN- γ y las manifestaciones clínicas de la enfermedad; cuanto más severa es la enfermedad, las células mononucleares de sangre periférica producen niveles más bajos de IFN- γ ⁶⁶, así, los niveles de IFN- γ están deprimidos en pacientes con TB activa ^{67,68}.

En la mayoría de los casos (90-95%) de infección por *M. tuberculosis*, el individuo permanece asintomático y no transmite la enfermedad. Sin embargo, siempre existirá la posibilidad de una reactivación de la infección latente, lo que puede suceder en diferentes contextos que alteran o debilitan la respuesta inmunitaria. *M. tuberculosis* persiste en el interior de los granulomas presentes en las personas infectadas. El granuloma está constituido por macrófagos y células gigantes, células T CD4+ y CD8, ⁶⁹ (imprescindibles para contener la infección y prevenir la reactivación), células B y fibroblastos que rodean la lesión (un área central de tejido pulmonar necrótico) ⁷⁰ y secretan proteínas de matriz extracelular que conforman una barrera física para combatir la diseminación de la micobacteria manteniéndola en un estado no replicativo de manera persistente ^{56,71-73}. La combinación de una lesión primaria granulomatosa en el pulmón con afectación del ganglio linfático hiliar dependiente es lo que se conoce como “complejo de Ghon” ⁷⁴. Se trata de lesiones dinámicas, con una parte de células que van muriendo, y otras nuevas que van incorporándose. Cuando se les impide entrar (p.ej. bloqueando la expresión de las moléculas de adhesión o cascadas de quemoquinas inflamatorias por administración de fármacos dirigidos al TNF- α), la estructura granulomatosa se desintegra provocando la diseminación de su contenido.

La formación del granuloma supone un intento de contención por parte del hospedador en respuesta a una infección que no puede erradicar, con presencia de bacterias “durmientes”, pero viables, residentes en él ^{41,75,76}. La adaptación a niveles bajos de oxígeno incrementa la capacidad de *M. tuberculosis* para persistir en el hospedador. Esta fase conforma la denominada infección “latente”.

Las terapias biológicas, de manera especial los anti-TNF- α , que se utilizan con éxito en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por el sistema inmune (como la artritis reumatoide, la psoriasis, la enfermedad de Crohn etc.) tienen efectos secundarios, entre los que destacan destacan las infecciones en general, y de manera muy especial la TB como consecuencia en muchos casos de la reactivación de una tuberculosis latente, lo que indirectamente confirma la importancia del TNF- α en la formación del granuloma ⁷⁷⁻⁸⁵. Sin embargo, el TNF- α también juega un papel paradójico en la

inmunopatología de la tuberculosis porque, mientras que el TNF α liberado en una localización en la que exista una respuesta predominantemente Th1 induce la activación macrofágica, cuando se libera en localizaciones con un balance mixto Th1/Th2 (con una alta concentración de IL4) entonces produce un daño tisular extenso ⁸⁶.

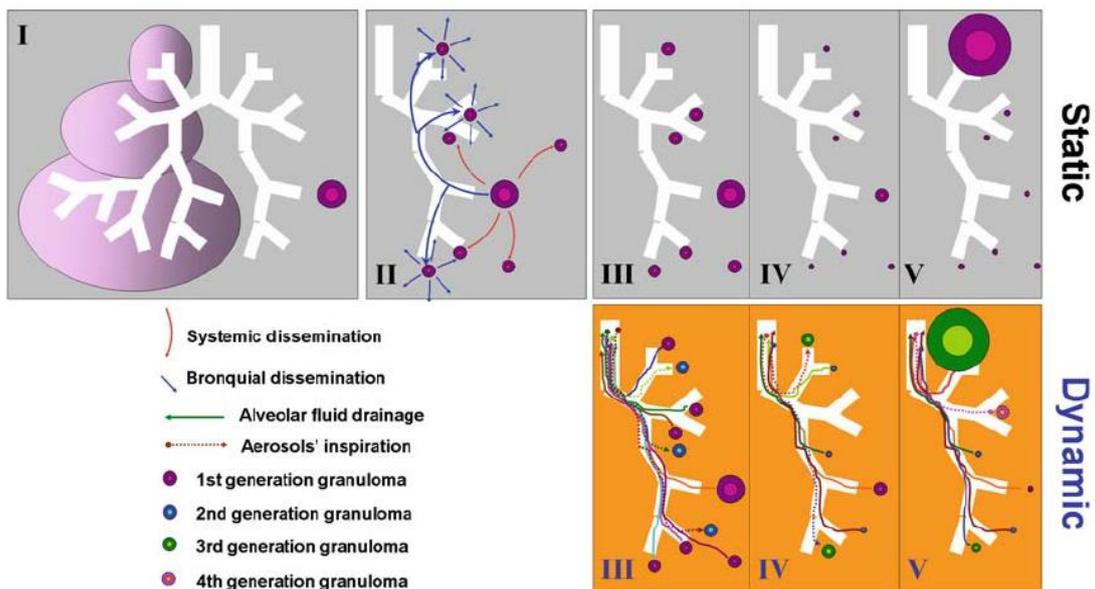
En resumen, una vez la bacteria en el pulmón, pueden desencadenarse cuatro escenarios: a) Una respuesta inicial del hospedador que permite eliminar a todos los bacilos de manera efectiva, ejemplo de inmunidad natural; b) el microorganismo logra superar las barreras de defensa y comienza a multiplicarse inmediatamente después de la infección, TB primaria; c) el bacilo penetra en el organismo provocando una respuesta del sistema inmune pero sin lograr su completa eliminación, infección tuberculosa latente ⁸⁷; y d) los bacilos latentes pueden romper el equilibrio que mantienen con el hospedador y provocar el desarrollo de la enfermedad activa , reactivación TB ⁸⁸.

La enfermedad tuberculosa es por tanto un estado que depende de la entrada y proliferación de los bacilos pero muy condicionado por la respuesta inmune del hospedador ^{38,41,89-90}.

TEORÍAS DE INFECCIÓN LATENTE

La latencia en la infección por *M. tuberculosis* es un término, definido por Amberson ⁹¹, como la presencia de cualquier lesión tuberculosa incapaz de producir síntomas que indiquen su presencia. Según la teoría clásica, en los casos en que la carga antigénica no es demasiado alta y la hipersensibilidad del huésped es buena el granuloma se resuelve y el tejido acaba cicatrizando. Pero cuando la carga bacilar es muy alta, puede dar lugar a una necrosis incompleta originando las cavernas tuberculosas, que albergan un alto contenido bacilar que puede diseminarse a otros órganos. En la mayoría de los casos, los linfocitos CD4 destruyen el 95% de los bacilos tuberculosos. La población bacilar restante, en el 90-95% de los casos acaba siendo destruida previa fibrosis y reabsorción del granuloma, y solo en un 5-10% de los casos (en población inmunocompetente) los bacilos quedan en estado durmiente dentro de los macrófagos generando la denominada tuberculosis latente ⁹².

Ahora, una nueva hipótesis, la Hipótesis Dinámica ^{93,94}, sostiene que las bacterias causantes de la TB, una vez están en el tejido pulmonar no permanecen quietas, sino que se reproducen, pasando a formar parte de los aerosoles que se generan en los pulmones de las personas infectadas, reinfectando nuevos puntos del tejido. Esto causa constantes lesiones que el pulmón envuelve con fibras de colágeno para intentar reducir la capacidad de las bacterias de moverse y producir reinfecciones que no son detectables con las radiografías de tórax. (FIG 4)



- (I) Lesión inicial.
- (II) Diseminación y generación de granulomas secundarios.
- (III) Contención de la enfermedad por la inmunidad específica.
- (IV) La lesión permanece en la zona de bacilos durmientes.
- (V) Estos tienen la capacidad de reactivarse mucho tiempo después.
- ó
- (IV) Reflujo constante de bacilos.
- (V) Generación de nuevos granulomas.

FIGURA 4.- Comparación entre la teoría clásica y la hipótesis dinámica. (Tomado de Cardona P J. A Dynamic Reinfection Hypothesis of Latent Tuberculosis Infection. Infection 37(2):80-6 April 2009)

Las personas infectadas que desarrollan la enfermedad lo hacen porque la reacción inflamatoria que su cuerpo genera contra las bacterias es muy intensa, lo que aumenta el tamaño de las lesiones tuberculosas. Así, la actual definición de ITL incluye diversos estadios de infección, incluyendo al paciente

que mantiene al *M. tuberculosis* en estadios de nula y/o baja replicación, lo que explicaría la continua producción de INF- γ en pacientes con ITL.

INFECCIÓN LATENTE Y CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

Aunque el diagnóstico y el tratamiento de la TB activa ocupan un lugar destacado en la lista de prioridades de los programas dirigidos al control de esta enfermedad en los países con una incidencia elevada de la misma, la ITL está adquiriendo una importancia creciente ⁹⁵.

La ITL se define como la situación clínica que se da en individuos que albergan bacilos viables de *M. tuberculosis* que, si bien no muestran ningún signo o síntoma clínico o de otro tipo que indique una enfermedad activa, tienen mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad activa a lo largo de su vida (aproximadamente un 10%.) El riesgo de progresión es especialmente elevado entre aquellos individuos recientemente infectados o con deterioro del sistema inmune.

La identificación y tratamiento de pacientes con enfermedad activa, así como de los contactos con alta probabilidad de desarrollar la enfermedad, es particularmente relevante en los programas de control de la TB especialmente en contextos de alta prevalencia de la enfermedad ⁹⁶.

En regiones con baja incidencia, como son los países desarrollados, la detección y tratamiento mediante terapia preventiva de individuos infectados por *M. tuberculosis*, con alto riesgo de reactivación de la enfermedad, es crucial para mantener bajo control la epidemia ⁹⁷.

El resurgimiento global de la infección por *M. tuberculosis* (TB) se debe en gran parte al impacto de la pandemia del VIH, que condiciona, junto a las condiciones socioeconómicas, su distribución geográfica. A ello se une la aparición, en los últimos años, de cepas resistentes (TB-R) y multirresistentes (TB-MR) a los agentes antimicrobianos. En 2017, fueron notificados 160.684 casos de TB-MR en todo el mundo, apenas la cuarta parte de los 558.000 que se estima la desarrollaron. La TB-MR es un problema especialmente grave en India, China, Federación Rusa, Pakistan, Nigeria, Filipinas, Indonesia, Ucrania, Myanmar y Mozambique ¹.

Todo ello subraya la necesidad de nuevas técnicas diagnósticas, junto a medidas de prevención y programáticas. No hay que olvidar que en el control de la tuberculosis influyen un conjunto de factores, entre los que destacan los recursos socioeconómicos, y el bienestar social que estos generan, que ha permitido a algunos países desarrollados reducir la tasa de incidencia de la tuberculosis significativamente, como es el caso de Holanda, Islandia o los Estados Unidos (EEUU).

PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

1. Prueba de la tuberculina (PPD)

La carencia de una prueba “patrón de oro” (*gold standard*) ha dificultado tradicionalmente el diagnóstico de ITL. Durante todo el siglo pasado y hasta muy recientemente la detección y diagnóstico de ITL ha estado basado en la prueba de la tuberculina (PT).

Las reacciones de hipersensibilidad retardada ya fueron descritas por Robert Koch. La infección tuberculosa produce una respuesta de hipersensibilidad retardada a ciertos componentes antigénicos de *M. tuberculosis*, que son los que se concentran en los purificados de cultivos, denominados tuberculinas. El aislamiento de éstos puede realizarse mediante precipitación, utilizando sulfato de amonio o ácido tricloroacético, obteniéndose pequeñas proteínas de menos de 10.000 Da, con algunos lípidos y polisacáridos.

En 1890, expuso los efectos de la tuberculina aplicada por vía intradérmica en pacientes con TB. Tiempo después, Escherich hizo referencia a una reacción local en el sitio de aplicación, a la que llamó “reacción a la punción”. En 1903, Nicolas Arthus describe un fenómeno que consistía en induración y necrosis local después de la aplicación intradérmica repetida de una sustancia extraña, que se debe a la formación y depósito de inmunocomplejos con activación del complemento ^{98,99}.

La técnica intradérmica actualmente en uso fue descrita en 1912 por Charles Mantoux, médico francés que desarrolló el trabajo de Koch y Clemens von Pirquetto ¹⁰⁰ para crear su test en 1907, ensayando con diferentes diluciones de tuberculina.

En 1939, Florence Seibert obtuvo una proteína purificada de la tuberculina “antigua”, a la que se denominó PPD (derivado proteínico purificado), obtenida tras el filtrado de cultivo de *M tuberculosis* esterilizado y concentrado ¹⁰¹.

En 1951, un producto más estandarizado nombrado PPD-S (derivado proteínico purificado preparado según el método descrito por Siebert), fue adoptado por la Organización Mundial de la Salud como tuberculina estándar, la cual se comercializó en Estados Unidos (¹⁰²).

En 1958, la OMS aprobó un nuevo derivado proteínico, el PPD RT-23, la tuberculina utilizada en Europa. En EEUU existen dos preparaciones, Aplisol y Tubersol, ambas con respuesta similar a la RT-23. Actualmente en España se usa la variante PPD RT-23 con Tween 80 como adsorbente. Dos unidades de tuberculina (UT) de este PPD equivalen a 5 UT del PPD utilizado en otros países.

La reacción a la inyección intracutánea de tuberculina es un ejemplo clásico de respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células (sobre todo linfocitos T) en la que el individuo infectado con el bacilo tuberculoso presenta, a las 48-72 horas de la inyección, vasodilatación local, edema, depósito de fibrina, y reclutamiento de otras células inflamatorias a la zona en la que aparece una induración.

La técnica del mantoux consiste en la inyección intradérmica de una dosis estándar de 2 unidades tuberculina PPD RT-23 con Tween 80 como adsorbente, en una zona donde no existan lesiones cutáneas. Tween 80 es un detergente añadido a la tuberculina para evitar adsorción sobre las superficies de cristal o plástico. En la actualidad todas las tuberculinas se fabrican y estandarizan con Tween 80. Se utiliza una jeringa graduada en centésimas de mililitro, con aguja fina de 25-27 G, de 10-12 mm de largo para la inyección en la dermis superficial, inoculando con el bisel hacia arriba. Puede realizarse en cualquier sitio, de forma convencional se aplica en la superficie flexora del antebrazo izquierdo, preferentemente en la unión del tercio superior con el tercio medio, ya que es una zona expuesta y las regiones proximales son más sensibles que las distales ^{103,104}. Convencionalmente, el test se realiza en el

brazo izquierdo para evitar errores en la lectura. No obstante, puede utilizarse el derecho, de haber alguna contraindicación en usar el izquierdo

La aguja debe ser visible a través de epidermis durante la inserción. Se inyecta lentamente la solución. Se irá produciendo una pequeña pápula de un diámetro de 6 a 10 mm que permanecerá durante unos 10-15 minutos para que la técnica sea correcta. Si no se forma esta pápula o desaparece inmediatamente tras la inyección, significa que la administración ha sido subcutánea y no intradérmica; debe entonces repetirse la prueba a unos 5 cm de la previa. Es extremadamente importante asegurarse de que el paciente es citado para leer la reacción al test. Asimismo, hay que instruir al paciente para mantener la zona limpia, descubierta y no frotar o rascar el área. La lectura se efectuará entre las 48-72 horas (rango 2-4 días) (FIG 5)



FIGURA 5.-Técnica del mantoux. (Fotografía de Greg Knobloch, fuente: Wikipedia)

Una reacción positiva a tuberculina PPD RT 23 SSI se define como una induración plana, irregular y ligeramente elevada con un diámetro de 6 mm como mínimo, rodeada por una zona de enrojecimiento más o menos definida. Se miden los milímetros de induración del diámetro transversal según el eje longitudinal del antebrazo, bien por palpación o con la ayuda de un bolígrafo (técnica de Sokal), y registrando la existencia, si la hubiera, de vesiculación o necrosis ¹⁰⁵, con una regla de plástico transparente y flexible ¹⁰⁶. Indica una respuesta del sistema inmunitario causada por uno o varios de los siguientes factores: a. Infección con complejo de *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* o *M. microti*); b. Infección con micobacterias no tuberculosas; c. Vacuna BCG (*Bacille Calmette-Guérin*) anterior. Los vacunados con BCG normalmente muestran reacción positiva a la tuberculina después de 4-8 semanas lo que resta especificidad a la prueba ^{107,108}.

No hay correlación entre el tamaño de la induración y la probabilidad de enfermedad tuberculosa activa, pero sí con el riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro ¹⁰⁹. En la lectura diagnóstica se tendrá en cuenta, no sólo el tamaño, sino también la situación clínica del individuo.

En España según la Sociedad de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) se considera positiva una induración: ¹¹⁰

- En personas no vacunadas ≥ 5 mm.
- En personas vacunadas con BCG se tienen en cuenta determinadas condiciones clínicas, considerando PT positiva con diámetro >5 mm, si además de vacunados son convivientes o mantienen contactos frecuentes con pacientes bacilíferos, portadores de radiología de tórax con lesiones sugestivas de TB antiguas y nunca tratados, infectados por VIH o silicóticos.
- En el resto de vacunados con BCG si el tamaño de la induración es >15 mm.

Se considera una PT de alto valor predictivo negativo de infección cuando el tamaño del diámetro de la induración es menor a los valores descritos previamente. No obstante, si en estos casos las personas están vacunadas con BCG o son mayores de 65 años, se les debe repetir la prueba a los 7-10 días (efecto Booster) y ese será el resultado que se acepte.

Cuando se trata de un estudio de contactos la interpretación se simplifica ya que no se debe tener en cuenta el antecedente vacunal y considerar una induración mayor de 5 mm como indicativa de infección tuberculosa.

Efecto *booster*.

En algunas personas que han sido infectadas con *M. tuberculosis*, la capacidad de reaccionar a tuberculina puede disminuir con el tiempo, así puede producirse un falso negativo o un valor débilmente positivo. Este fenómeno se debe a una respuesta inmunitaria disminuida (muy pocos linfocitos sensibilizados en circulación para producir una respuesta local significativa) en pacientes ancianos infectados años antes o en vacunados en la infancia, que puede evidenciarse con un segundo test de refuerzo (*boosted*). El efecto

Booster es máximo si el segundo test tiene lugar entre una y cinco semanas del primero, y puede ser observado hasta dos años después. El resultado definitivo de la prueba es el de la segunda lectura.

Reversion tuberculina

La reversión se define como el cambio a negativo tras un resultado positivo previo. Generalmente este fenómeno es poco común en individuos sanos, dándose en menos del 10%. La reversion es más frecuente en población de edad madura¹¹¹ (se estima 8% al año) cuando el Mantoux inicial es <14 mm cuando el resultado positivo se debía a un efecto Booster.

Conversion tuberculina

La conversión tuberculínica se define como el cambio (en un período de dos años) de la reactividad negativa a positiva o bien por un incremento de ≥ 10 mm sobre un resultado previo ¹¹².

Falsos positivos y negativos de la prueba de la tuberculina

Uno de los inconvenientes de la PT es su baja especificidad, la PPD incluye antígenos que no son exclusivos de *M. tuberculosis*, muchos son compartidos por micobacterias no tuberculosas (actualmente hay más de 170 especies descritas) y por *M. bovis* BCG, hecho que puede causar falsos positivos de PT por reactividad antigénica cruzada debida a la exposición a micobacterias ambientales o por vacunación previa con BCG ¹¹². Asimismo, existen circunstancias dependientes del individuo que pueden dar lugar a falsos negativos de la PT: infección viral concurrente; vacunaciones con virus vivos; situaciones de inmunosupresión o tratamiento con fármacos que disminuyan la respuesta inmunitaria; niños pequeños por inmadurez del sistema inmune. Existen otras situaciones, que a su vez podrían alterar la interpretación, como la mala conservación, una técnica inadecuada -tanto en la administración como en la lectura-. También presenta inconvenientes de otro tipo, como la variabilidad inter-prueba operador dependiente, o la necesidad de una segunda visita.

2. Ensayos basados en la liberación de Interferón gamma (IGRA)

Una de las principales prioridades para mejorar el control de la tuberculosis siempre ha sido disponer de una prueba más rápida y específica de ITL ¹¹³. La identificación de genes en *M. tuberculosis* que no están presentes en *M. bovis* BCG ni en la mayoría de micobacterias ambientales ofreció una oportunidad para el desarrollo de pruebas diagnósticas más específicas de infección tuberculosa ¹¹⁴.

Lalvani y colaboradores identificaron células T con respuesta específica frente a antígenos de *M. tuberculosis*¹¹⁵ ya que se sabía que la estimulación de células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMCs) por ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target 6*), diana de células T CD4, inducía la liberación *in vitro* de IFN- γ . Esta línea de investigación llevó al desarrollo de nuevos test basados en la detección del IFN- γ liberado por linfocitos T activados ¹¹⁶. Los ensayos basados en la liberación de IFN- γ (IGRA) detectan la respuesta inmune celular específica a antígenos que se expresan en *M. tuberculosis* (ESAT-6 y CFP-10 -*Culture Filtrate Protein 10*-, codificadas por la región RD-1, y TB7.7, codificado por el segmento RD11s), que incrementan significativamente la especificidad con respecto al PPD, pero están ausentes en BCG y la mayoría de las micobacterias ambientales no tuberculosas (excepto *M. kansasii*, *M. marinum* y *M. szulgai*) ¹¹⁷. Su implantación supuso una gran mejora en la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de TB ¹¹⁸⁻¹²⁰. Por otro lado, se evitaba la subjetividad de la interpretación, así como la visita de lectura, e incorporaban un control positivo que facilitaba la interpretación.

Se desarrollaron dos técnicas comerciales para el diagnóstico *in vitro* de la ITL: QuantiFERON[®]-TB (Cellestis Limited, Carnegie, Australia) y T-SPOT[®].TB (Oxford Immunotec Limited, Abingdon, UK)

La primera versión de QuantiFERON[®]-TB, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) en el año 2001, detectaba la liberación de IFN- γ en respuesta a PPD y medía el nivel de IFN- γ soluble en el sobrenadante producido en sangre total mediante ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*).

En el año 2004, la FDA aprobó la segunda versión, QuantiFERON® TB Gold, que utilizaba péptidos sintéticos que simulan antígenos más específicos, como son el ESAT-6 y CFP-10.

En 2007 la nueva generación, QuantiFERON®-TB Gold In Tube (QFT-GIT), incorporaba un tercer antígeno: el TB 7.7, y tubos especialmente diseñados para la muestra de sangre.

En 2016 se lanza la cuarta generación de Quantiferón, el QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus), aprobado por la FDA en junio de 2017. El ensayo QFT-Plus utiliza dos tubos diferentes de medición de antígeno TB: el tubo de medición de antígeno TB 1 (TB1) y el tubo de medición de antígeno TB 2 (TB2). Ambos tubos contienen antígenos peptídicos de los antígenos asociados al complejo *M. tuberculosis*, ESAT-6 y CFP-10. El tubo TB1 contiene péptidos de ESAT-6 y CFP-10 diseñados para generar respuesta inmune celular (RIC) a partir de linfocitos T cooperadores CD4+ y el tubo TB2, un conjunto adicional de péptidos cuya función es inducir respuestas RIC a partir de linfocitos T citotóxicos CD8+. Se ha descrito un aumento en la frecuencia de detección de linfocitos T CD8+ específicos para ESAT-6 y CFP-10 en sujetos con TB activa, en comparación con sujetos afectados por ITL, lo que puede estar relacionado con una exposición reciente al *M. tuberculosis* ¹²¹⁻¹²³. También se han detectado células T CD8+ específicas para *M. tuberculosis* productoras de IFN- γ y en sujetos con TB activa y coinfección por VIH ^{124,125}, así como en niños jóvenes con TB ¹²⁶.

Por otro lado, T-SPOT®.TB estimulaba PBMCs con ESAT-6 y CFP-10, separadamente, detectando el número de células efectoras T, CD4 y CD8 productoras de IFN- γ mediante ELISPOT, representadas como *spot-forming units* (SFU). Dos paneles separados de antígenos, que simulan las proteínas ESAT-6 y CFP10, permitían optimizar la sensibilidad del test.

La sensibilidad y la especificidad de estas técnicas diagnósticas son difíciles de establecer debido a la falta de una auténtica prueba de referencia. Dado que la transmisión aérea de *M. tuberculosis* viene determinada principalmente por la frecuencia, la duración y la proximidad del contacto con el individuo diagnosticado de enfermedad tuberculosa, para que una técnica sea

considerada más sensible y específica que la PT debería estar más estrechamente relacionada con el nivel de exposición y ser independiente del estado de vacunación con BCG ¹²⁸. Varios metaanálisis ¹²⁷ han demostrado que ambos IGRA son más específicos que la PT y, al menos, tan sensibles para detectar TB activa, especialmente en poblaciones que han recibido vacunación BCG. Además, T-SPOT.TB parece ser más sensible, pero menos específico que QFT-GIT. Sin embargo, solo estudios limitados comparan directamente QFT-GIT con T-SPOT.TB y la PT en los mismos individuos, sobre todo en casos de enfermedad tuberculosa, para monitorizar el efecto del tratamiento o en estudio de contactos. Por otra parte, a diferencia de la tuberculina, en el caso de los IGRA todavía no está demostrado que sirvan para predecir el riesgo de progresión a enfermedad) y/o para monitorizar respuesta al tratamiento.

IGRA en población pediátrica

La aportación de los IGRA al diagnóstico de la infección tuberculosa en población pediátrica es objeto de debate ¹²⁹. Algunos autores refieren una baja sensibilidad en niños ¹³⁰, pero este hallazgo no ha sido confirmado por otros ¹³¹. Por otro lado, representan una proporción creciente, y significativa, en el número total de casos ¹³² porque un 50% de los bebés no tratados y el 15% de niños con ITL desarrollarán la enfermedad en los 2 años siguientes tras la infección ¹³³.

En cuanto a la trascendencia de la localización geográfica, hay que decir que el estatus inmunológico del niño, asociado a condiciones comúnmente observadas en países subdesarrollados como malnutrición, infección por VIH, helmintiasis, influyen en el funcionamiento de los IGRA ¹³⁴⁻¹³⁵. En países desarrollados, los IGRA han mejorado el diagnóstico de TB en niños inmunocompetentes de más de 5 años (con una sensibilidad de 67-86%) pero, incluso en ellos, la interpretación puede ser dificultosa. Algunos autores sugieren el uso combinado de PT e IGRA, lo que incrementa la sensibilidad diagnóstica al 90%, aunque no hay consenso en el manejo de los resultados discordantes ¹³⁶⁻¹³⁷.

IGRA y VIH

Los individuos co-infectados con el VIH tienen un riesgo incrementado de progresión a TB activa estimada en un 5-10% por año ¹³⁵, y presentan porcentajes de reactivación del 20-30% en aquellos con PT positiva ¹³⁸⁻¹³⁹.

El riesgo de progresión a enfermedad, aunque es más reducido en quienes que reciben terapia antirretroviral (ART) ¹⁴⁰⁻¹⁴¹, es aún el doble que en la población general no infectada por el VIH, incluso en países con baja prevalencia de TB. Debido a la ausencia de *gold standard* para el diagnóstico de ITL, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunodeprimidos, se utiliza tanto PT como IGRA, solos o en combinación ¹⁴²⁻¹⁴³. En cuanto al rendimiento diagnóstico de IGRA en infectados por el VIH, una serie de estudios han añadido consistencia a la mayor sensibilidad de T-SPOT.TB sobre la PT. Uno de ellos encontró que el T-SPOT.TB era más sensible que la PT y se correlacionaba mejor con TB activa en pacientes infectados de VIH con recuentos de CD4 <200 cells/ μ L, incluso tras la introducción de ART combinada y entre aquellos que han recibido vacunación con BCG ¹⁴⁴⁻¹⁴⁶.

Varios estudios han evaluado los tests de IFN- γ en población infectada por VIH ¹⁴⁷⁻¹⁴⁸. De ellos, sólo unos pocos han comparado el rendimiento de ambos ensayos, T-SPOT.TB y QFT en la misma población VIH ^{147, 149-152}.

IGRA y enfermedades inflamatorias

En caso de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas (IMID -*immune-mediated inflammatory diseases*-), antes de iniciar el tratamiento con antagonistas del TNF- α (anti-TNF- α) se deben adoptar medidas para descartar la existencia de ITL, ya que se han descrito un número significativo de casos de TB tras la generalización en el uso de las terapias biológicas. En la mayoría de los casos la enfermedad se produce como consecuencia de la reactivación de una infección latente ¹⁵³. El TNF- α es una citocina proinflamatoria que juega un papel importante en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria, siendo los tratamientos anti- TNF- α efectivos para mantenerla bajo control. Los casos de TB en este tipo de pacientes suelen tener una localización extrapulmonar, con enfermedad diseminada en una cuarta parte de los casos, lo que se asocia con

inmunodepresión, esto nuevamente refuerza el papel que juega el TNF- α en la respuesta del hospedador frente a la TB ¹⁵⁴.

En los estudios publicados dos hasta la fecha se concluye que la concordancia entre la PT y los IGRA en el diagnóstico de ITL en las IMID es baja y que los resultados discordantes tienen su origen en la vacunación previa con BCG ¹⁵⁵. Basándose en la evidencia actual se puede concluir que, en pacientes con IMID que siguen un tratamiento inmunosupresor, la especificidad de los IGRA es mayor que la de la PT.

Fuentes de variabilidad de los IGRA

Las fuentes de variabilidad pueden ser clasificadas en preanalíticas, analíticas, postanalíticas, de fabricación, e inmunológicas¹⁵⁶.

Entre las preanalíticas, podemos considerar la variabilidad en el volumen de sangre, que a su vez depende de la tensión arterial en el momento de extracción de la sangre¹⁵⁷, la posición del tubo Vacutainer respecto de la zona de venopunción, y el efecto de la altitud; mala desinfección de la piel y del tapón de goma de los tubos; duración de la estimulación de las células T con los antígenos; la agitación de todos los tubos debe ser idéntica, si es excesiva en uno de ellos puede conducir a un falso positivo o a un falso negativo¹⁵⁸; demora entre extracción e incubación¹⁵⁹ puede disminuir significativamente la respuesta de células T ¹⁶⁰ (la utilidad del *T-Cell Xtend* reagent necesita más evidencias); el transporte de las muestras a baja temperatura ambiental puede influir negativamente, así, se obtiene mayor número de resultados indeterminados en otoño e invierno¹⁶¹.

Fuentes de variabilidad analíticas como el efecto matriz; imprecisión en el pipeteo; errores en los pasos de centrifugación, decantación, y lavado; imprecisión en la medida de la señal por el operador (p.ej. variabilidad en el conteo de manchas en TB-SPOT dependiendo del lector ¹⁶²) o el instrumento. La variabilidad es especialmente crítica cuando los resultados se acercan al punto de corte del ensayo de 0.35 IU/ml ¹⁶³⁻¹⁶⁷. Los errores de introducción o transcripción manual de datos constituyen la principal fuente de variabilidad postanalítica ¹⁶⁸. Defectos de fabricación: p. ej. antígenos defectuosos pueden dar lugar a falsos positivos. Fuentes de variabilidad inmunológicas: *in*

vivo vinculado al efecto booster de la TST ¹⁶⁹; *ex vivo* debida a la inmunomodulación por productos microbianos.

3. IGRA vs. Tuberculina

Las guías clínicas existentes no dan una respuesta unánime a las preguntas que surgen sobre cómo emplear ambos tests. La OMS por su parte nos da las siguientes directrices: en los países de ingresos medianos-altos, donde la incidencia estimada de TB es menor de 100 por 100 000 habitantes se deben utilizar los IGRA o la PT. Pero los IGRA no deben sustituir a la PT en los países de ingresos bajos, ni en los demás países de ingresos medianos, debido a que su utilidad es equivalente siendo el coste y complejidad técnica mayores. También hay que considerar la cobertura de la vacuna BCG que es la que inclina la elección hacia las estrategias que solo emplean los IGRA¹⁷⁰.

El Centro Europeo para el Control y Prevención de las Enfermedades (ECDC) indica que el uso simultáneo de PT e IGRA puede ser beneficioso en la detección de ITL en individuos inmunocomprometidos cuando se considera un tratamiento preventivo, en orden a maximizar la sensibilidad. Por otro lado, al igual que la tuberculina, los IGRA no son capaces de diferenciar ITL de TB activa y no aportan valor añadido al diagnóstico de enfermedad salvo en situaciones especiales: TB extrapulmonar, baciloscopias o cultivos negativos en niños, o diagnóstico diferencial de infección micobacterias no tuberculosas (NTM) ¹⁷¹.

El Centro para el Control y Prevención de las Enfermedades de EEUU (CDC) concluye que los IGRA son preferibles en grupos con bajas tasas de retorno para la visita de lectura de la PT, y en vacunados. La PT se prefiere en niños menores de 5 años. Pueden usarse indistintamente en estudios de contactos de personas de las que se sepa o sospeche que tienen TB activa y en su seguimiento. También para screening de trabajadores de la salud, aunque los IGRA tienen mayor riesgo de conversiones por falso positivo tras un resultado previo negativo. Emplear ambas pruebas puede ser útil tras un primer test negativo (PT o IGRA) en pacientes de alto riesgo de infección como VIH positivos, o niños menores de 5 años, o cuando existen signos clínicos de TB

activa, también en el caso de un test inicial positivo que requiera evidencia adicional para confirmar¹⁴¹.

En España, el Ministerio de Sanidad recomienda para el diagnóstico de ITL la realización de la PT en todos los casos. En caso de un positivo con vacunación BCG previa (especialmente en los quince años previos), o bien, un negativo en pacientes con inmunosupresión y en niños menores de 5 años, se debe considerar la realización de un IGRA, como prueba complementaria¹⁷².

En resumen, la conclusión general que podemos extraer de las guías clínicas es que, al no existir evidencias de que los IGRA sean superiores a la tuberculina, no es recomendable su utilización en países de alta incidencia y con recursos escasos. Es en países de baja incidencia donde la elevada especificidad de los IGRA aporta ventajas que refuerzan su inclusión en la práctica clínica.

Por otro lado, la mayoría de las guías se amparan en revisiones sistemáticas, que no suelen incluir sistemas de calificación transparentes (ej. GRADE) para su elaboración, incluyendo a menudo datos publicados obtenidos con procedimientos metodológicos de baja calidad.

En Asturias, sin embargo, la dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad, Gobierno del Principado de Asturias) publicó en 2015 una circular con las siguientes recomendaciones:

- Todo resultado positivo de PT en una persona vacunada debe ser confirmado con IGRA
- Todo resultado negativo de PT en una inmunodeprimidos, personas de edad avanzada o niños pequeños debe ser confirmado con IGRA.
- Cuando se requiere la máxima sensibilidad en la detección de ITL, como en los candidatos a recibir un tratamiento inmunosupresor deben realizarse QTF y TB-SPOT, más PT.
- En estudio de contactos se emplea en general el QTF, salvo que se trate de inmunodeprimidos (QTF y TB-SPOT, más PT) o niños menores de 5 años (QTF y TB-SPOT) ¹⁷³.

HIPÓTESIS

Hasta la fecha no disponemos de un método diagnóstico de la infección tuberculosa que pueda ser considerado como *gold standard*, lo que tenemos son herramientas diagnósticas que miden la sensibilización del hospedador frente a antígenos tuberculosos específicos, como es el caso de la clásica prueba de la tuberculina y de los nuevos IGRA.

A lo largo de la última década, los IGRA se han convertido en una herramienta diagnóstica con un gran impacto en la bibliografía médica y en la práctica clínica. No obstante, la experiencia recogida en la ingente cantidad de estudios publicados a menudo es contradictoria (con la dificultad añadida que representa la comparación entre estudios que recogen experiencias llevadas a cabo con versiones diferentes de este tipo de tecnología) y no existe un consenso generalizado sobre el lugar que deben ocupar en los diferentes protocolos diagnósticos.

En Asturias, los IGRA se incorporaron a los procedimientos diagnósticos en el año 2007, desde entonces su uso se ha ido generalizando, de manera muy especial a partir de mayo de 2015, cuando la Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad del Principado de Asturias) publicó la circular 04/2015 que actualizaba los procedimientos para el diagnóstico de la infección tuberculosa en nuestra comunidad. Los IGRA (QuantiFERON TB Gold In-Tube/Plus y T-SPOT.TB) se procesan de manera centralizada en la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias del Hospital Universitario Central de Asturias en coordinación con los laboratorios de Microbiología de las 8 Áreas Sanitarias del Servicio de Salud del Principado de Asturias (SESPA).

Por otra parte, en los últimos años, las terapias biológicas han revolucionado el abordaje terapéutico de diferentes patologías; aunque entre los riesgos inherentes a su administración destacan las enfermedades infecciosas y de manera especial la tuberculosis, una enfermedad tratable y prevenible.

Teniendo en cuenta lo comentado, nos planteamos conocer el impacto de las técnicas IGRA en diferentes contextos clínicos y en otras situaciones habituales en la práctica clínica en Asturias.

OBJETIVOS

- Conocer el impacto de las pruebas IGRA para el diagnóstico de la infección tuberculosa en Asturias, incidiendo en los aspectos más relevantes: evolución de la demanda diagnóstica; tasas de positividad en la población asturiana; etc.

- Comparar los resultados de QuantiFERON TB Gold In-Tube y QuantiFERON TB Gold Plus con los de T-SPOT.TB, principalmente en el contexto de pacientes inmunodeprimidos y candidatos a terapias biológicas.

- Analizar los resultados de las pruebas IGRA en diferentes contextos:
 - IGRA en personal sanitario.
 - IGRA y diagnóstico de tuberculosis activa.
 - Enfermos de tuberculosis QTF-Plus positivo, resultados individualizados de los tubos TB1 (estimulación CD4+) y TB2 (estimulación CD8+).
 - IGRA y monitorización del tratamiento antituberculoso.
 - Valor predictivo de las pruebas IGRA para identificar riesgo de progresión a la enfermedad activa.
 - IGRA en niños.
 - IGRA en personas VIH positivo.
 - IGRA en la monitorización de las terapias biológicas en las IMID.

MATERIAL Y MÉTODO

LOGÍSTICA

En Asturias, el diagnóstico de la infección tuberculosa mediante IGRA se realiza de manera centralizada en la Unidad de Referencia Regional de Micobacterias (URM) del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), en coordinación con los laboratorios de Microbiología de las 8 Áreas Sanitarias del SESPA. De los dos IGRA comercializados, QuantiFERON, es la prueba IGRA de elección para llevar a cabo el diagnóstico de infección tuberculosa en la población general y en la mayoría de contextos clínicos, tanto en los Servicios de Atención Primaria como en los de Atención Especializada. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, candidatos a terapias biológicas, y en niños menores de 5 años se recomienda realizar, además, y de manera simultánea, T-SPOT. TB, también por recomendación del laboratorio de Micobacterias en aquellos casos en que el resultado del QuantiFERON esté en la zona límite.

En el caso de la prueba QuantiFERON: La URM distribuye a todos los hospitales del SESPA los tubos específicamente diseñados para realizar la prueba QuantiFERON (3 tubos -Nil-Antigen-Mitogen- en la versión antigua QTF In-Tube, y 4 tubos -Nil-TB1-TB2-Mitogen- con la versión actual QTF Plus). En cada área sanitaria los laboratorios de Microbiología son los encargados de distribuir esos tubos a los diferentes puntos de extracción y/o Centros de Salud. Cada Laboratorio de Microbiología realiza el procesamiento inicial de las muestras (Recepción-Registro-Incubación-Centrifugado) y posteriormente los remite a la URM del HUCA para la realización de la segunda parte de la prueba, de esta forma los resultados suelen estar disponibles en el mismo día de su recepción o en el plazo máximo de 24h.

En el caso de la prueba T-SPOT.TB: La URM recibe las muestras de sangre recogidas en un tubo de heparina litio y los procesa, de manera completa, y a demanda, de lunes a jueves. Los resultados están disponibles en 48h.

PROCEDIMIENTO QuantiFERON TB Gold

QFT-GIT: Para realizar la prueba se emplea un kit de reactivos con 3 tubos específicos: el tubo problema (TB Antígeno) incluye los antígenos específicos ESAT-6, CFP-10, TB 7.7; el tubo control positivo (Mitógeno) contiene fitohemaglutinina (sirve de control del estado de inmunidad individual y de la correcta manipulación de las muestras e incubación) y el tubo control negativo (medición de nulos) no contiene reactivos. Se precisan en total 3 ml de sangre (1 ml por tubo) que se extrae directamente en los propios tubos. Posteriormente, y previa agitación de los tubos, se lleva a cabo la incubación de éstos durante 16-24 h en estufa a 37°C (después de la incubación, el plasma puede almacenarse varias semanas sin que afecte a los resultados). El plasma obtenido una vez centrifugados los tubos, se emplea para realizar el enzimoimmunoensayo (ELISA) que permite detectar y cuantificar el interferón gamma (IU/ml) liberado por los linfocitos del paciente. Este paso se realiza de forma totalmente automatizada. (FIG 6)



FIGURA 6.- Tubos específicos QTF-GIT e imagen del autoanalizador DS2.

El resultado de QTF-GIT se interpreta como Positivo, cuando la respuesta en el tubo con los antígenos (tubo *Antigen*) -una vez restado el valor del control negativo (tubo *Nil*)- es ≥ 0.35 IU/mL pero siempre que supere en $\geq 25\%$ el valor registrado en el tubo control negativo; Negativo, cuando la respuesta es < 0.35 IU/mL o cuando siendo > 0.35 representa $< 25\%$ del valor registrado en el tubo control negativo; Indeterminado, a) cuando el valor del control negativo es > 8 IU/mL lo que indica liberación inespecífica de interferón, o b) cuando la

respuesta en el tubo control positivo (tubo *Mitogen*) es <0.5 UI/mL lo que indica una producción insuficiente de interferón por falta de funcionalidad de los linfocitos (Figura 7).

La falta de respuesta en el tubo control positivo suele observarse en situaciones de linfopenia, por funcionalidad alterada de los linfocitos, por manejo inapropiado de las muestras que impida la mezcla correcta de la sangre con reactivos contenidos en los tubos, así como por añadir un volumen excesivo de sangre en los tubos¹⁷⁴.

cellestis
Version 2.50

QuantIFERON®-TB Gold In-Tube Results

Test Date: jueves 11 octubre 2007
Operator: delfi
Run Number: 1
Kit Batch Number: 50131

Valid ELISA test run.

Results Subject ID	Nil	TB Ag	Mitogen	TB Ag- Nil	Mitogen- Nil	Result
11275	0.10	0.11	20.33	0.01	20.23	NEGATIVE
11345	0.06	1.34	12.04	1.28	11.98	POSITIVE
11346	0.06	1.43	20.87	1.37	20.81	POSITIVE
11463	0.07	0.07	4.16	0.00	4.09	NEGATIVE
11464	0.10	0.12	9.04	0.02	8.94	NEGATIVE
11465	1.23	1.75	20.41	0.52	19.18	POSITIVE
11600	0.12	0.48	8.34	0.36	8.22	POSITIVE

FIGURA 7.- Ejemplo de informe de resultados QFT®-GIT.

QFT-Plus: Esta nueva versión de QTF consta de 4 tubos específicos (tubo control negativo, antígeno TB1, antígeno TB2 y mitógeno), se requiere 1 ml de sangre completa para cada uno de los tubos (4mL en total). El diseño de los tubos control negativo y positivo es idéntico al de la versión QTF-GIT. Solamente se diferencia en que el tubo TB1 contiene péptidos modificados (ESAT-6 y CFP-10, QTF-Plus no incluye TB 7.7) para estimular linfocitos CD4+ y el TB2 para estimular CD8+. El resto de pasos previos al enzimoimmunoensayo es idéntico a los de la versión QTF-GIT (metodología para la extracción de la sangre, agitación de los tubos, conservación de las muestras y envío al laboratorio, también las condiciones de incubación de los tubos) Los tubos para QFT-Plus deben incubarse a 37 °C lo antes posible durante las 16 horas posteriores a la extracción de la sangre. Tras el periodo de incubación comprendido entre 16 y 24 horas, se centrifugan los tubos, se retira el plasma y se mide la cantidad producida de IFN- γ (UI/ml) mediante el

método ELISA que en este caso emplea un pocillo extra por muestra, de tal modo que el rendimiento de la placa de 96 pocillos permite procesar 22 muestras y 4 estándares por duplicado. Puede emplearse el mismo autoanализador que con la versión QTF-GIT, solamente se requiere actualizar el software con las características de este ensayo) (FIG 8).



FIGURA 8.- Tubos específicos de QFT®-Plus.

La interpretación de los resultados también es similar a la versión QTF-GIT, aunque en este caso aplicando el algoritmo a cada tubo de antígeno (TB1 y TB2) por separado. Se considera que el resultado del ensayo QFT-Plus es positivo si el valor obtenido en cualquiera de los tubos TB1 y/o TB2 -una vez restado el valor del control negativo (tubo *Nil*)- es ≥ 0.35 UI/mL pero siempre que supere en $\geq 25\%$ el valor registrado en el tubo control negativo; Negativo, cuando la respuesta es < 0.35 UI/mL o cuando siendo > 0.35 representa $< 25\%$ del valor registrado en el tubo control negativo; Indeterminado, a) cuando el valor del control negativo es > 8 IU/mL lo que indica liberación inespecífica de interferón, o b) cuando la respuesta en el tubo control positivo (tubo *Mitogen*) es < 0.5 UI/mL lo que indica una producción insuficiente de interferón por falta de funcionalidad de los linfocitos ¹⁷⁵. (FIG 9)



Resultados del ensayo QuantiFERON®-TB Gold Plus

Fecha: Friday 1 February 2019
 Operador: Admin
 Número ciclo: 1
 Número lote: 1

Test ELISA válido

Resultados (IU/mL)								
ID del paciente	Cero	TB1	TB2	Mitógeno	TB1- Nil	TB2- Nil	Mitógeno- Cero	Resultado
219000574	0.03	0.02	0.03	8.38	-0.01	0.00	8.35	NEGATIVO
001145314	0.04	0.05	0.04	8.38	0.01	0.00	8.34	NEGATIVO
001145315	0.17	0.22	0.17	8.38	0.05	0.00	8.21	NEGATIVO
001145317	0.08	1.27	2.34	8.38	1.19	2.26	8.30	POSITIVO
001145323	0.02	0.54	0.35	8.38	0.52	0.33	8.36	POSITIVO
001145324	0.02	0.16	0.09	8.38	0.14	0.07	8.36	NEGATIVO
001145325	0.02	0.02	0.02	8.38	0.00	0.00	8.36	NEGATIVO
001145326	0.01	0.01	0.02	8.38	0.00	0.01	8.37	NEGATIVO
001145327	0.01	0.02	0.03	8.38	0.01	0.02	8.37	NEGATIVO
019015712	0.02	0.02	0.02	8.38	0.00	0.00	8.36	NEGATIVO
001145346	0.04	0.04	0.04	8.38	0.00	0.00	8.34	NEGATIVO
001145329	0.03	0.03	0.06	8.38	0.00	0.03	8.35	NEGATIVO
001145337	0.03	0.02	0.03	8.38	-0.01	0.00	8.35	NEGATIVO
001145342	0.14	0.09	0.10	8.38	-0.05	-0.04	8.24	NEGATIVO
001145356	0.04	0.03	0.06	8.38	-0.01	0.02	8.34	NEGATIVO
001145355	0.02	0.01	0.01	6.62	-0.01	-0.01	6.60	NEGATIVO
001145353	0.03	0.03	0.03	8.38	0.00	0.00	8.35	NEGATIVO
519001128	0.03	0.20	0.17	8.38	0.17	0.14	8.35	NEGATIVO
519001126	0.03	0.03	0.03	8.38	0.00	0.00	8.35	NEGATIVO
519001127	0.04	0.04	0.04	8.38	0.00	0.00	8.34	NEGATIVO
519001125	0.02	0.02	0.02	8.38	0.00	0.00	8.36	NEGATIVO
519001106	0.02	0.02	0.02	8.38	0.00	0.00	8.36	NEGATIVO

FIGURA 9.- Ejemplo de informe de resultados QFT®-Plus.

PROCEDIMIENTO T-SPOT.TB

El fundamento de la técnica se basa en separar la capa mononuclear (PBMCs) de una muestra de sangre periférica recogida en un tubo de heparina litio, que posteriormente se lavan para minimizar las posibles fuentes de interferencia. Asimismo, es necesario realizar un recuento de PBMCs presentes en la muestra para emplear finalmente un inóculo con un número estandarizado de células (250.000 por pocillo). La placa con las PBMCs y los antígenos (ESAT-6 y CFP-10, cada uno en un pocillo separado) así como los controles positivo y negativo se incuban a 37 °C en estufa de CO₂ durante 18-22h, para permitir la estimulación de todas las células T sensibilizadas presentes, tras lo cual se procede a realizar el inmunospot, que permite cuantificar el número de células productoras de interferón (efectoras). La citocina secretada es capturada por anticuerpos específicos sobre la membrana que forma la base del pocillo, eliminando las células y otros materiales no deseados mediante lavados. Se añade un segundo anticuerpo, conjugado con fosfatasa alcalina, dirigido a un epítipo diferente de la molécula que liga la citocina capturada a la superficie de

la membrana. Los conjugados no enlazados se eliminan con lavados. Se añade un sustrato soluble a cada pocillo al que un enzima disgrega para formar una mancha de precipitado insoluble, representando cada una de ellas la huella de un linfocito T individual secretor de interferón. (FIG 10)

Para realizar la prueba se emplean 8-10 ml de sangre heparinizada (el único tipo de tubo que puede usarse con el T-Cell Xtend reagent) que se almacena a temperatura ambiente (18-25°C) o a 10-25°C si se va a usar el T-Cell Xtend reagent.

Los tubos de 8mL se centrifugan a 1600g durante 28 minutos, y los de 4 mL a 1800g durante 30 minutos (a 18°C si se dispone de una centrífuga refrigerada).

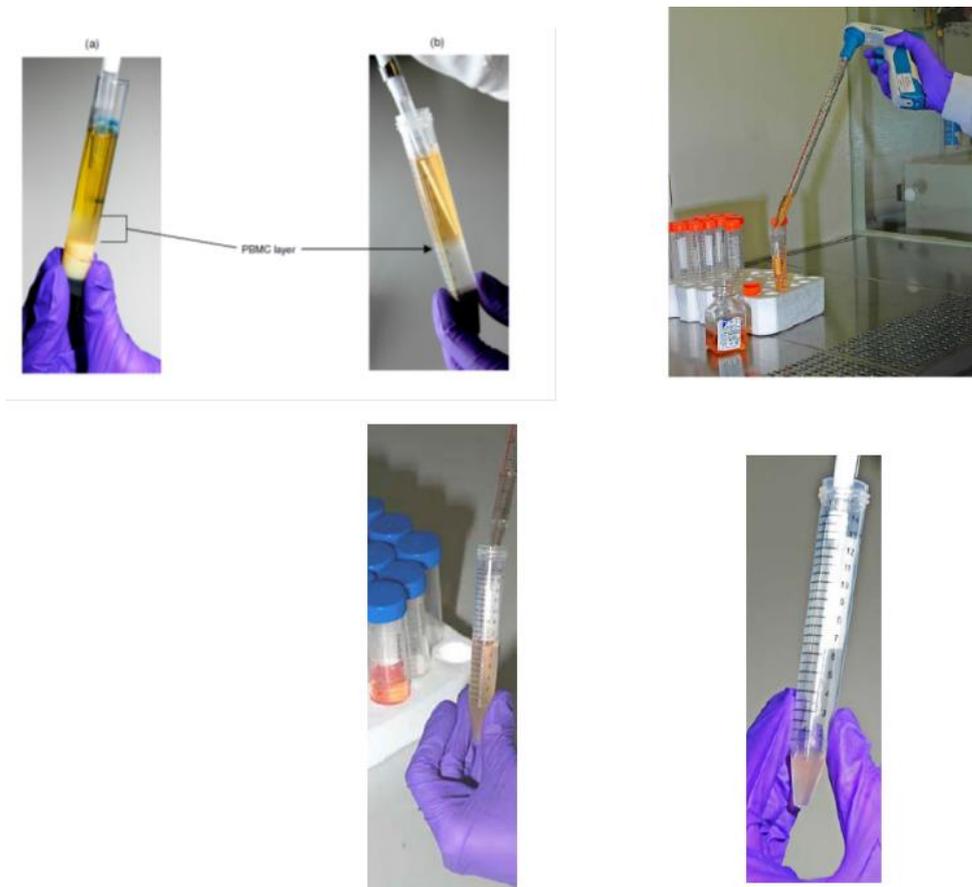


FIGURA 10.- Procedimiento de separación capa mononuclear de sangre periférica en T-SPOT®.TB.

Se diluye la sangre en el mismo volumen de RPMI 1640 medium. Se deposita la sangre diluida (2-3 volúmenes) sobre FICOLL-PAQUE PLUS (1 volumen) y se centrifuga a 1000g 22 minutos (temperatura de 18 a 25°C).

Si las muestras se han obtenido en las 8 a 32 horas previas, deben mezclarse con el T-Cell Xtend reagent antes de aplicarse en el FICOLL-PAQUE PLUS.

Se recoge la banda blanca de PBMCs con una pipeta y se transfieren 15mL a un tubo de centrifuga cónico. Se lleva a volumen a 10mL con medio de cultivo RPMI 1640 (o AIM V).

Se centrifuga a 600g 7 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1mL de RPMI 1640 (o AIM V).

Se lleva a volumen de 10mL con RPMI 1640 (o AIM V) y se centrifuga a 350g otros 7 minutos.

Finalmente, se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 0.7mL de AIM V.

T-SPOT.TB requiere 2.5×10^5 PBMCs viables en cada uno de los pocillos. El recuento se realiza en hemocitómetro de Neubauer. Para ello se mezclan 10 μ L de la suspensión de células y 40 μ L de solución azul tripán 0.4%.

La placa que incluye el kit contiene 96 pocillos, se utilizan 4 pocillos por muestra, a los que habrá que añadir:

1. Control negativo AIM V, 50 μ L de al primer pocillo, para detectar la respuesta celular inespecífica.
2. Panel A (ESAT-6), 50 μ L al segundo pocillo.
3. Panel B (CFP-10), 50 μ L al tercer pocillo.
4. Control Positivo (fitohemaglutinina -PHA-, activador policlonal), 50 μ L al cuarto pocillo, para confirmar la funcionalidad de los PBMCs.

En último lugar, se añaden a cada uno de los cuatro pocillos 100 μ L de la suspensión de células del paciente y se incuba a 37°C con 5% CO₂ durante 16-20 horas.

Tras esto, se vacían los pocillos decantando la placa.

Se añaden 200µL de solución tampón PBS a cada pocillo. Se descarga y se repiten los lavados con tampón PBS fresco tres veces más.

Se diluye 2,5µL de Conjugate Reagent 200x en 497,5µL de PBS para crear la solución de trabajo, y se añaden 50µL a cada pocillo. Se incuba a 2-8°C una hora.

Se descarta el conjugado y se lava cuatro veces con tampón PBS.

Después se añaden 50µL de Solución sustrato a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente 7 minutos protegido de la luz.

Se lava la placa con agua destilada o desionizada para detener la reacción. Se deja secar 4 horas a 37°C o toda la noche a temperatura ambiente.

Se cuentan las manchas (*spots*) presentes en cada pocillo que aparecerán teñidas de color azul oscuro o violáceo.

Control negativo (Nil Control): 0-9 manchas. Si ≥ 10 , es un resultado indeterminado que evidencia una liberación inespecífica de interferón gamma.

Control positivo ≥ 20 manchas. Si < 20 , es un resultado indeterminado (a menos que el Panel A o el Panel B sea positivo).

Si la diferencia entre Panel A menos Nil Control y Panel B menos Nil Control es 5, 6 ó 7 spots, el resultado debe ser considerado límite (*borderline*).

A pesar de que ESAT-6 y CFP-10 son antígenos ausentes de las cepas de BCG o *M. bovis* y de la mayoría de micobacterias ambientales, es posible que un resultado positivo pueda deberse a la infección con *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum* o *M. goodii*.

Test de resultado positivo: (Panel A menos Nil Control) y / o (Panel B menos Nil Control) ≥ 8 spots.

Test de resultado negativo: (Panel A menos Nil Control) y (Panel B menos Nil Control) ≤ 5 spots ¹⁷⁶. (FIG 11)

Realizar el ensayo T-SPOT.TB en sangre almacenada más de 8 horas puede implicar una disminución del recuento de manchas y un aumento de la inespecificidad. Esto se debe a que los granulocitos pueden activarse y

disminuir su densidad, causar estrés oxidativo a los linfocitos del lecho de PBMCs. Todo ello reduce la viabilidad de las células y, más específicamente, la capacidad de las células para liberar IFN- γ .

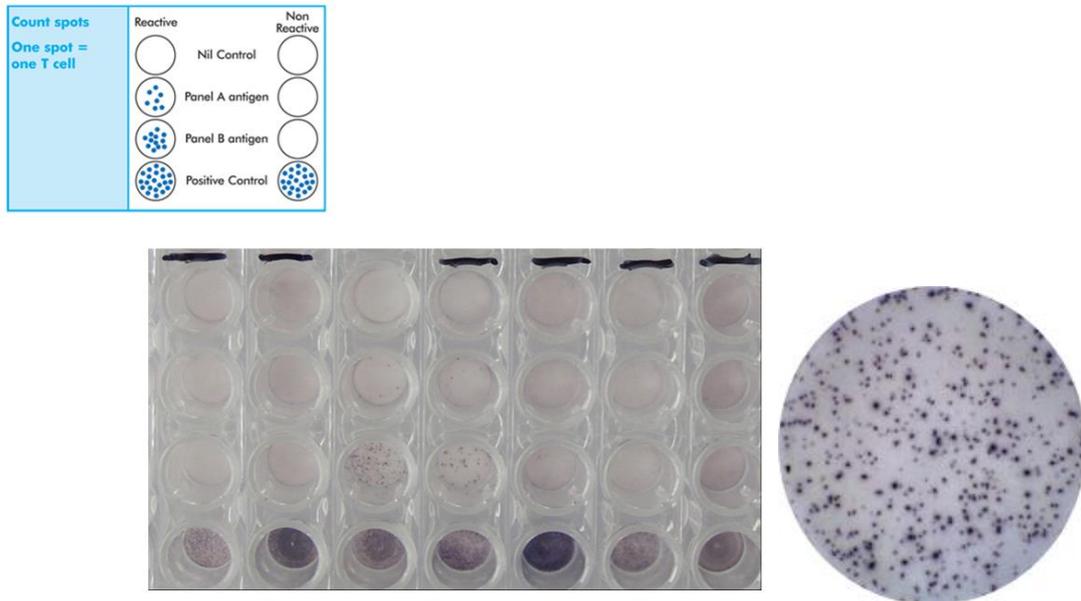


FIGURA 11.- Ejemplo de placa de resultados de T-SPOT[®].TB y de un pocillo con presencia de aproximadamente 100 spots. Cada columna de cuatro pocillos corresponde a una muestra diferente.

El reactivo T-Cell Xtend es un anticuerpo complejo que reconoce CD66b, un marcador de superficie celular específico de los granulocitos, que establece enlaces cruzados entre los granulocitos y los glóbulos rojos, lo que incrementa su densidad y sedimentan cuando se les aplica un gradiente de densidad. Se añade inmediatamente antes de comenzar el T-SPOT.TB, al eliminar los granulocitos no deseados de la muestra, permite prolongar el almacenamiento de las muestras hasta 32 horas ¹⁷⁷. (FIG 12)

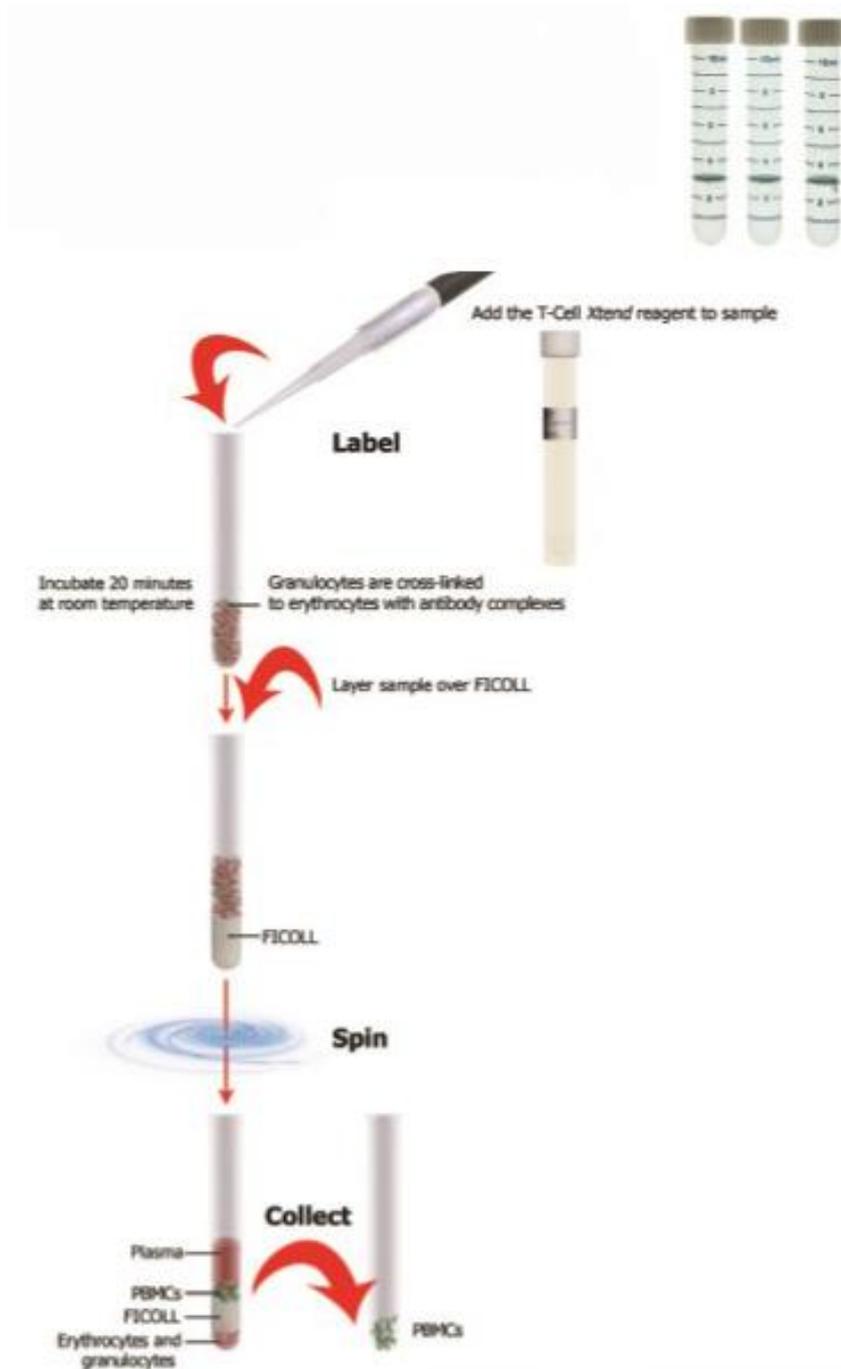


FIGURA 12.- Modificación T-Cell Xtend

RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN DE LA DEMANDA DIAGNÓSTICA

El primer IGRA comercializado en España fue QFT-GIT, en el año 2008 entró a formar parte de la cartera de Servicios de la URM, posteriormente, en el año 2010, se incluyó además T-SPOT.TB cuya comercialización en España se había demorado algo más que en otros países de nuestro entorno. Desde entonces la demanda diagnóstica ha ido en aumento en dos contextos claramente diferenciados, uno ligado al estudio de contactos en convivientes de enfermos de tuberculosis, y el otro, vinculado a personas con afecciones que debilitan el sistema inmunitario en diferentes contextos clínicos, bien directamente por la patología de base o como consecuencia de los tratamientos empleados para combatirlas. En cualquier caso, en el año 2014 se constató un punto de inflexión en la demanda como consecuencia del desabastecimiento de tuberculina que hubo en España a lo largo del mismo, y ya en 2015, en relación con la circular 04/2015 emitida por la Dirección General de Salud Pública (Consejería de Sanidad, Gobierno del Principado de Asturias) en la que se actualizaba el diagnóstico de la infección tuberculosa latente. Actualmente, el número de estudios IGRA supera los 7.000 estudios/año en el caso de QuantiFERON y algo más de 2.000 estudios/año en el caso de T-SPOT.TB. En la Figura 13 se muestra de manera gráfica la evolución de la demanda diagnóstica en Asturias.

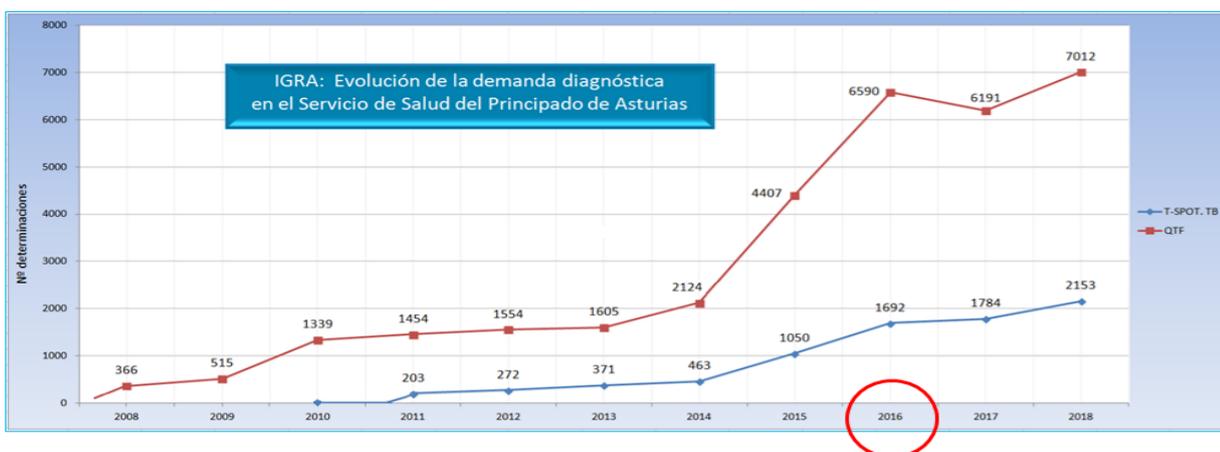


FIGURA 13.- Evolución de la demanda diagnóstica en el SESPA. Con el círculo rojo se indica el año en el que se produjo el cambio de versión de QTF.

2. RESULTADOS GLOBALES IGRA

En el caso del T-SPOT.TB, los resultados globales que se presentan se corresponden con una misma versión del producto y abarcan desde 2011 hasta 2018. En cambio, en el caso del QTF se utilizaron dos versiones distintas en dos períodos claramente definidos (QTF In-Tube, desde agosto de 2007 hasta junio de 2016, y QTF Plus, desde julio de 2016 hasta diciembre de 2018), por este motivo, primero se presentan los datos referentes a la demanda de manera conjunta, y a continuación se desglosan los resultados correspondientes a cada una de ellas por separado.

2.1. QUANTIFERON TB Gold (In-Tube + Plus)

Durante el periodo 2007-2018 se solicitaron 33.157 estudios de QTF (16.799 versión In-Tube y 16.358 versión Plus), 16.397 a mujeres (49,45%) y 16.760 a hombres (50,54%). En la Figura 14 se desglosan los estudios solicitados por grupos de edad. Como era de esperar, más de la mitad de las peticiones (57,34%) correspondían a personas en el tramo de edades medias de la vida (entre 35 y 64 años); 24,41% a menores de 34 años; y 18,22 a mayores de 65 años.

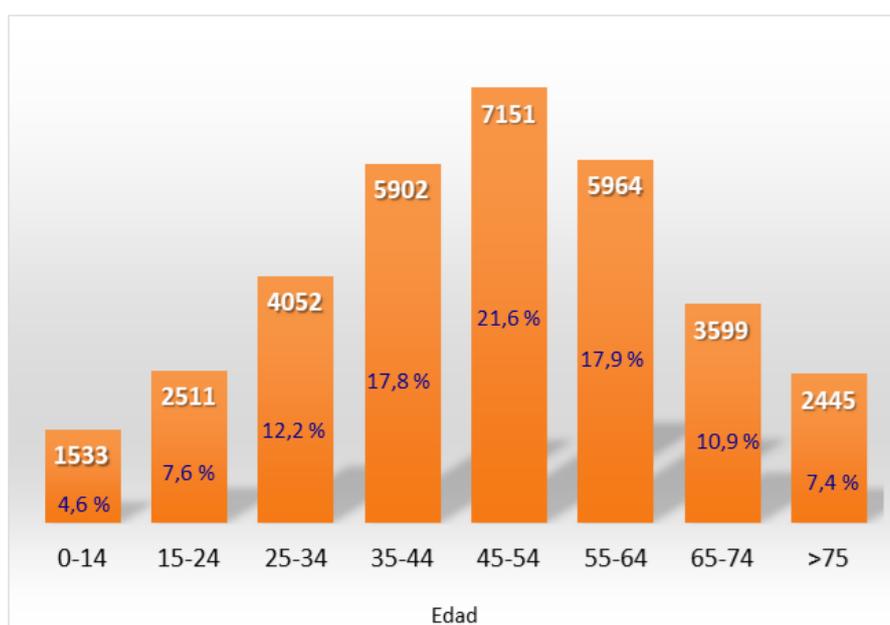


FIGURA 14.- Demanda QuantiFERON TB Gold (In-Tube + Plus) por rangos de edad.

En la Figura 15 se superponen los datos de la demanda de estudios IGRA (en conjunto y por rangos de edad) con los correspondientes a la pirámide de población de Asturias (por tramos de edad) a lo largo de los años objeto de estudio, para tratar de contextualizar mejor el impacto que representa esta tecnología en nuestra región.

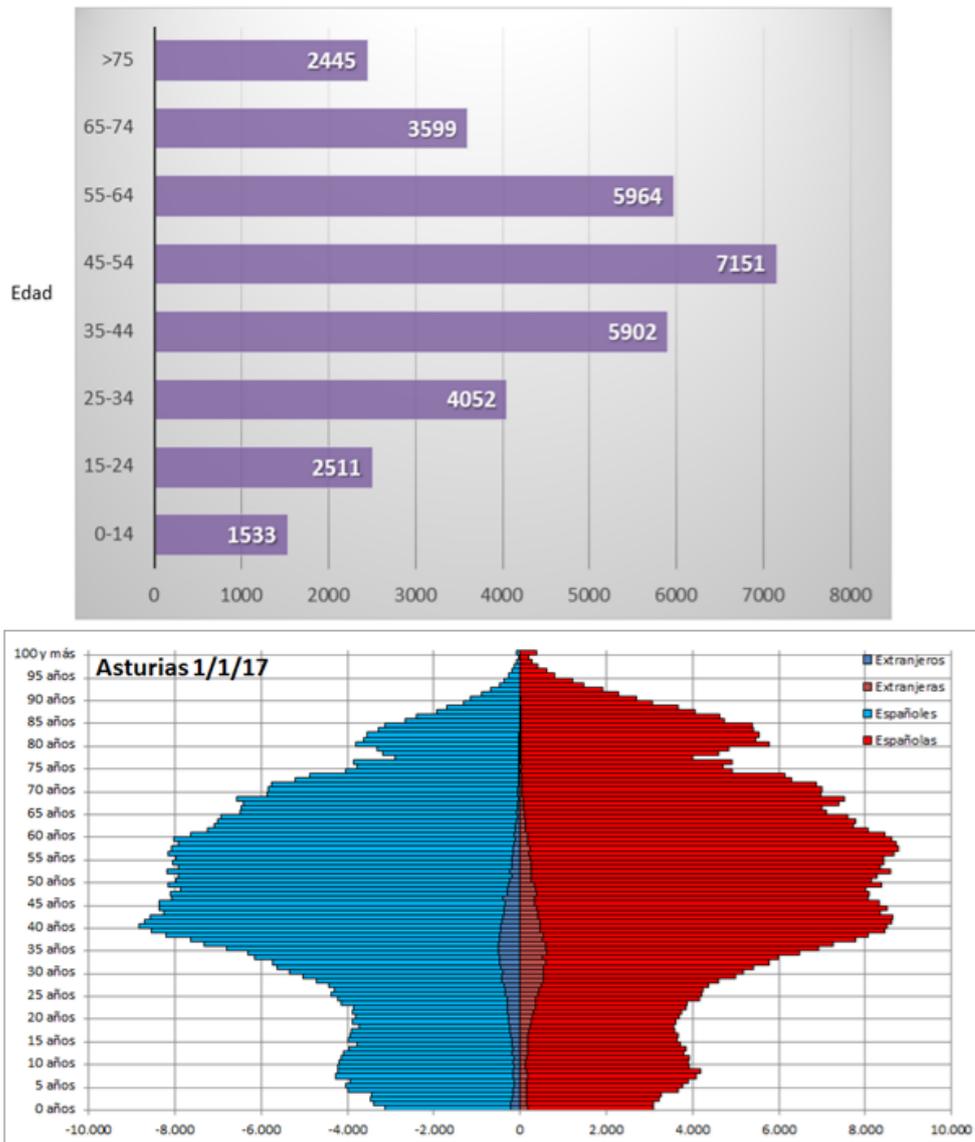


FIGURA 15.- Demanda QuantiFERON TB Gold (In-Tube + Plus) por rangos de edad en relación a la Pirámide de población de Asturias. (Wikipedia commons/Fuente INE)

2.2. RESULTADOS QUANTIFERON TB GOLD IN-TUBE

Desde junio de 2007 a junio de 2016 se realizaron 16.799 estudios, los resultados globales se muestran en la Figura 16.

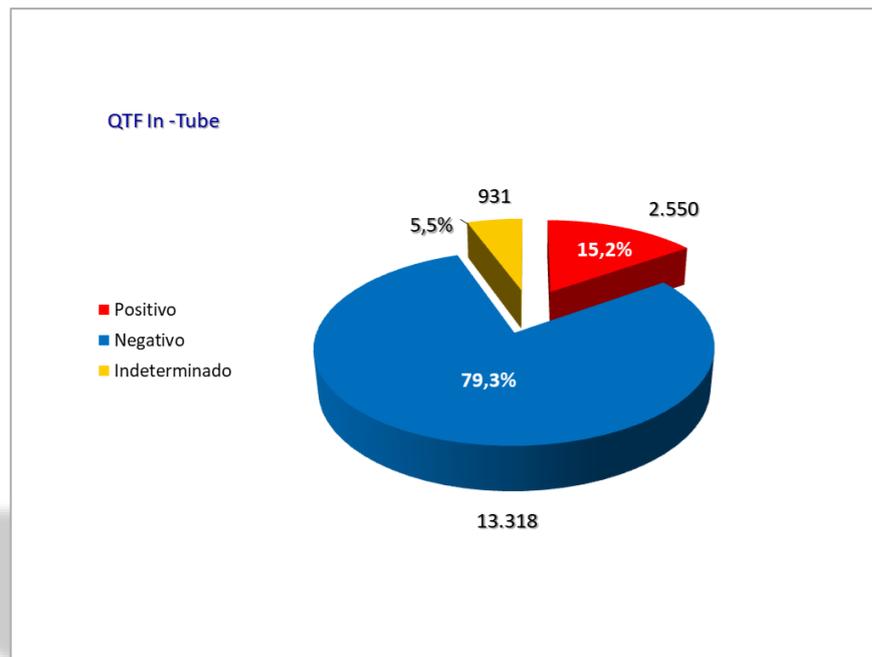


FIGURA 16.- Resultados globales QuantiFERON TB Gold In-Tube.

En la Tabla 1 y en la Figura 17 se presentan los resultados desglosados por rangos de edad. Puede observarse que el porcentaje de positivos se va incrementando con la edad, y supera el 20% en todos los tramos de edad por encima de los 55 años. Por el contrario, en menores de 34 años los porcentajes de positividad no alcanzaron el 10% en ninguno de los tramos. El menor índice de positividad se detectó en el tramo de edad de 15 a 24 años. En lo que se refiere a los resultados indeterminados, el mayor número de resultados indeterminados se produjo en los rangos de edades extremas: 16,13% en menores de 14 años y 9,20% en mayores de 75 años.

Resultados QuantiFERON TB In-Tube	n	%
0-14	657	
Positivo	54	8,21
Negativo	497	75,64
Indeterminado	106	16,13
15-24	1268	
Positivo	62	4,88
Negativo	1160	91,48
Indeterminado	46	3,62
25-34	2065	
Positivo	166	8,03
Negativo	1821	88,18
Indeterminado	78	3,77
35-44	2989	
Positivo	356	11,91
Negativo	2510	83,97
Indeterminado	123	4,11
45-54	3654	
Positivo	487	13,32
Negativo	2981	81,58
Indeterminado	186	5,09
55-64	3091	
Positivo	621	20,09
Negativo	2321	75,08
Indeterminado	149	4,82
65-74	1826	
Positivo	488	26,72
Negativo	1210	66,26
Indeterminado	128	7,00
>75	1249	
Positivo	316	25,30
Negativo	818	65,49
Indeterminado	115	9,20

TABLA 1.- Resultados QuantiFERON TB Gold In-Tube por rangos de edad.

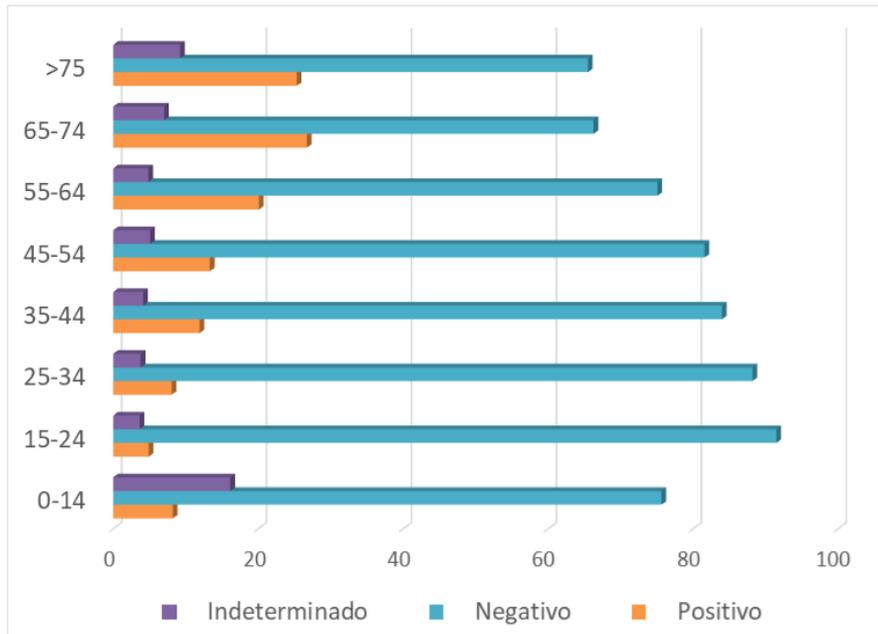


FIGURA 17.- Resultados porcentuales con QuantiFERON TB Gold In-Tube por rangos de edad.

2.3. RESULTADOS QUANTIFERON TB GOLD PLUS

Desde julio de 2016 a diciembre de 2018 se realizaron 16.358 estudios, los resultados globales se muestran en la Figura 18.

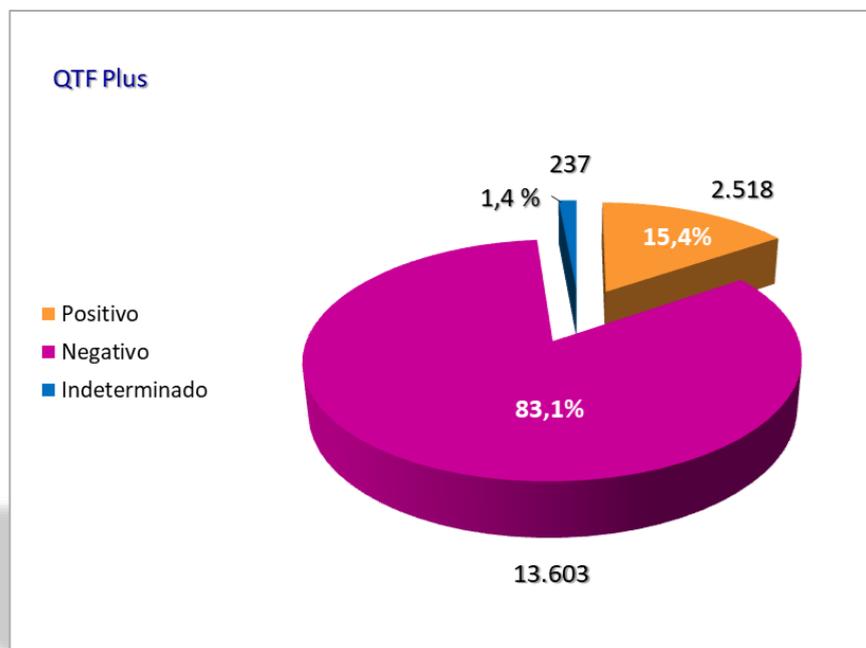


FIGURA 18.- Resultados globales QuantiFERON TB Gold Plus.

En la Tabla 2 y en la Figura 19 se presentan los resultados desglosados por rangos de edad. Al igual que ocurría con la versión In-Tube, el porcentaje de

positivos se incrementa con la edad, pero se observan algunas diferencias, el porcentaje de positivos supera el 30% en mayores de 65 años (un 6% más que con la versión In-Tube con un número total de estudios prácticamente idéntico). Además, se ampliaba hasta los 44 años los tramos de edad con porcentajes de positividad inferiores al 10% en todos ellos. El menor índice de positividad se detectó en el tramo de edad de 0 a 14 años (3,53%). En lo que se refiere a los resultados indeterminados, el número de resultados indeterminados se redujo significativamente, tanto numérica como porcentualmente, en todos los rangos de edad.

Resultados QuantiFERON TB Gold Plus	n	%
0-14	876	
Positivo	31	3,53
Negativo	823	93,94
Indeterminado	22	2,51
15-24	1243	
Positivo	87	6,99
Negativo	1148	92,35
Indeterminado	8	0,64
25-34	1987	
Positivo	138	6,94
Negativo	1839	92,55
Indeterminado	10	0,50
35-44	2913	
Positivo	291	9,98
Negativo	2603	89,35
Indeterminado	19	0,65
45-54	3497	
Positivo	482	13,78
Negativo	2969	84,90
Indeterminado	46	1,31
55-64	2873	
Positivo	531	18,48
Negativo	2298	79,98
Indeterminado	44	1,53
65-74	1773	
Positivo	578	32,60
Negativo	1152	64,97
Indeterminado	43	2,42
>75	1196	
Positivo	380	31,77
Negativo	771	64,46
Indeterminado	45	3,76

TABLA 2.- Resultados QuantiFERON TB Gold Plus por rangos de edad.

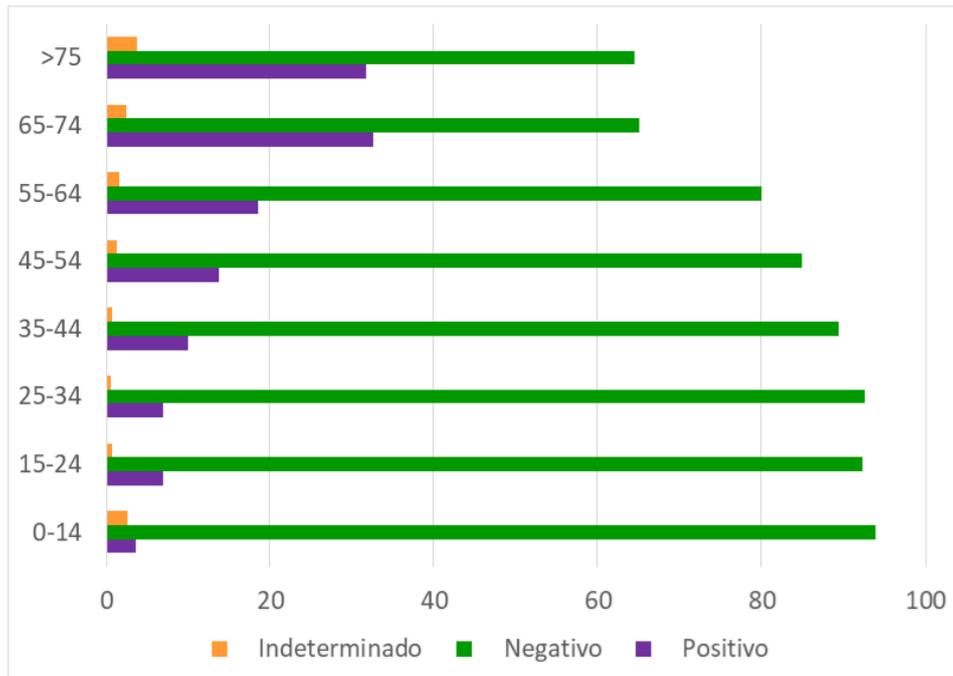


FIGURA 19.- Resultados porcentuales con QuantiFERON TB Gold Plus por rangos de edad.

2.4. RESULTADOS T-SPOT.TB

Durante el periodo 2011-2018 se solicitaron 7.988 estudios de T-SPOT.TB, 3.816 a mujeres (47,77%) y 4.172 a hombres (52,22%). En la Figura 20 se desglosan los estudios solicitados por rangos de edad. Como ocurría con QTF más de la mitad de las peticiones (60,97%) también correspondían a personas en el tramo de edades medias de la vida (entre 35 y 64 años); 19,84% a menores de 34 años; y 19,14% a mayores de 65 años.

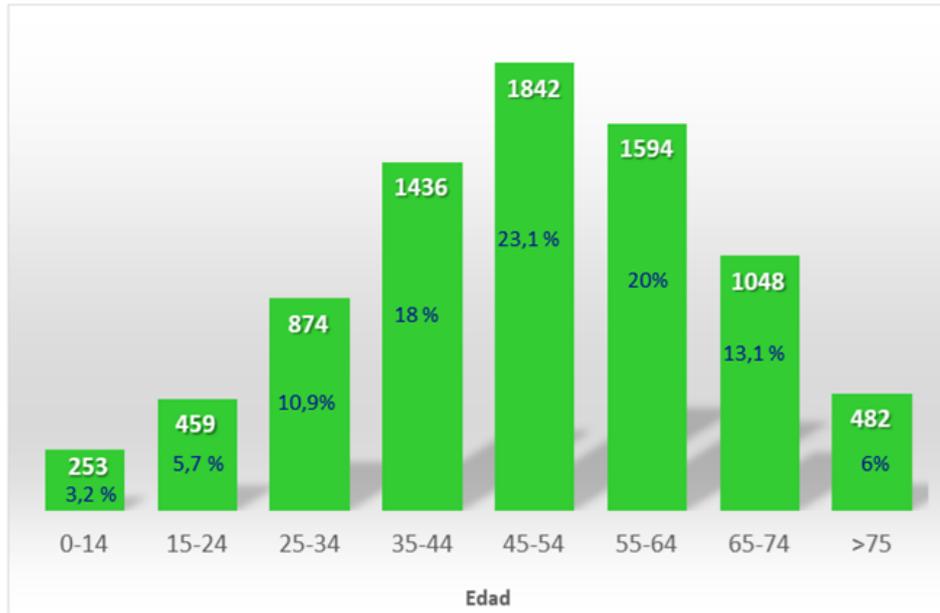


FIGURA 20.- Demanda T-SPOT. TB por grupo de edad.

En la Figura 21 se muestran los resultados globales.

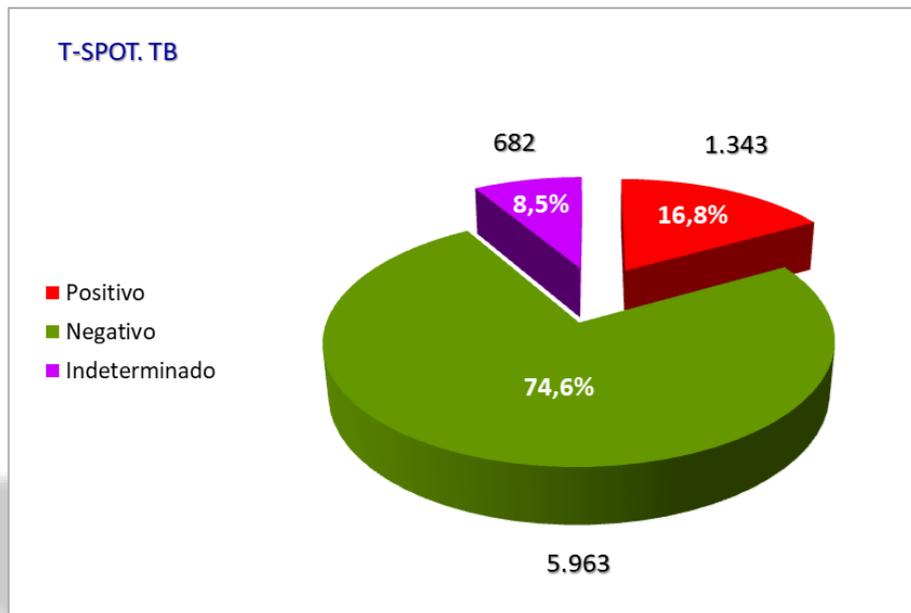


FIGURA 21.- Resultados globales T-SPOT. TB.

En la Tabla 3 y en la Figura 22 se muestran los resultados desglosados por rangos de edad, Al igual que ocurría con QTF, el porcentaje de positivos se incrementa con la edad, pero, al igual que ocurría con la versión QTF Plus, el porcentaje de positivos con T-SPOT.TB supera el 30% en mayores de 65 años,

y asimismo se ampliaba hasta los 44 años los tramos de edad con porcentajes de positividad inferiores al 10% en todos ellos. No obstante, el menor índice de positividad se detectó en el tramo de edad de 15 a 24 años (4,13%), en este caso como con la versión In-Tube. En lo que se refiere a los resultados indeterminados, su número era muy superior al registrado con cualquiera de las dos versiones de QTF, tanto numérica como porcentualmente en todos los rangos de edad, y de manera especial en los menores de 14 años.

Resultados T-SPOT.TB	n	%
0-14	253	
Positivo	16	6,32
Negativo	184	72,72
Indeterminado	53	20,94
15-24	459	
Positivo	19	4,13
Negativo	377	82,13
Indeterminado	63	13,72
25-34	874	
Positivo	71	8,12
Negativo	713	81,57
Indeterminado	90	10,29
35-44	1436	
Positivo	143	9,95
Negativo	1180	82,17
Indeterminado	113	7,86
45-54	1842	
Positivo	272	14,76
Negativo	1454	78,93
Indeterminado	116	6,29
55-64	1594	
Positivo	336	21,07
Negativo	1158	72,64
Indeterminado	100	6,27
65-74	1048	
Positivo	331	31,58
Negativo	629	60,01
Indeterminado	88	8,39
>75	482	
Positivo	155	32,15
Negativo	268	55,60
Indeterminado	59	12,24

TABLA 3.- Resultados T-SPOT.TB por rangos de edad.

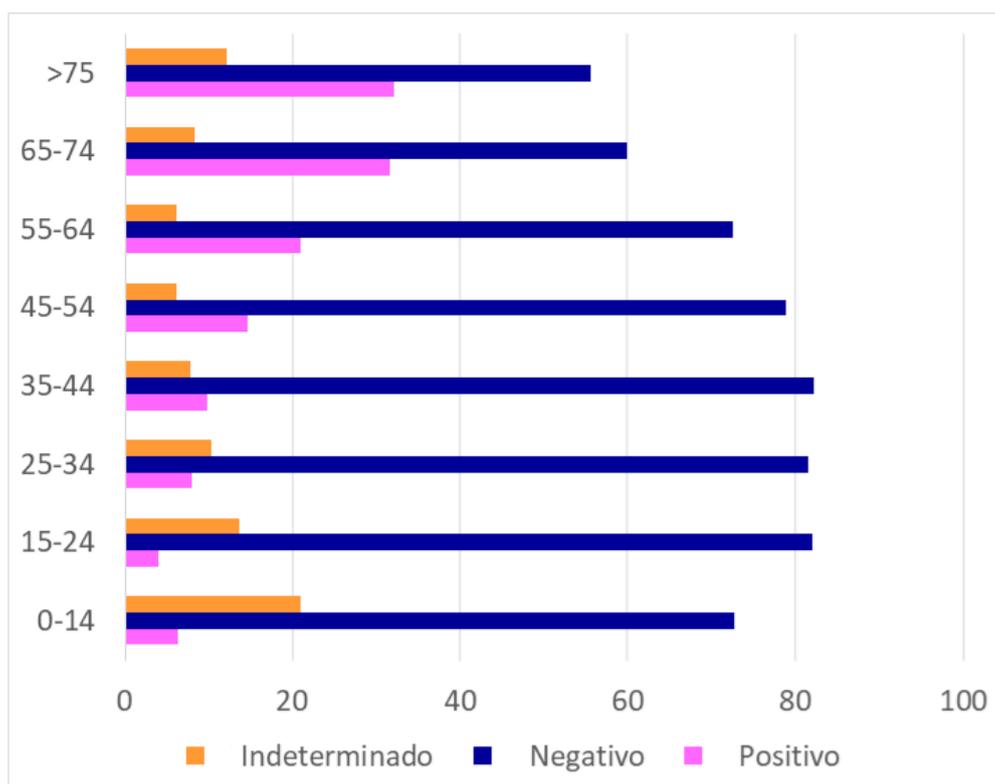


FIGURA 22.- Resultados porcentuales T-SPOT.TB por rangos de edad.

3. RESULTADOS COMPARATIVOS: QuantiFERON vs. T-SPOT.TB

En este apartado se comparan los resultados de QuantiFERON y T-SPOT.TB en aquellos pacientes a los que se les realizó ambos IGRA de manera simultánea y coincidente en el tiempo: Inmunodeprimidos, candidatos a terapias biológicas, y edad pediátrica (<5 años); entre 2011 y 2018 se estudiaron 6.619 pacientes.

Dos periodos diferenciados:

- 2011-junio 2016: T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold In-Tube
- Julio 2016-2018: T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold Plus

En la Tabla 4 se indican los servicios clínicos de procedencia de estos pacientes, así como la demanda diagnóstica generada por los mismos (número

de pacientes y porcentaje). En la figura 23 se representan de manera gráfica la carga de trabajo por servicio peticionario desglosada porcentualmente.

Servicio	Nº pacientes	%
Dermatología	411	6,20
Digestivo	2916	44,05
Hematología	1530	23,11
Neumología* y otros	820	12,38
Pediatría	200	3,02
Reumatología	742	11,21

*Interconsulta TB, pacientes de diferentes servicios

TABLA 4.- Demanda diagnóstica por Servicios en pacientes inmunodeprimidos, candidatos a terapias biológicas y en edad pediátrica, a los que se realizó de manera simultánea ambos IGRA.

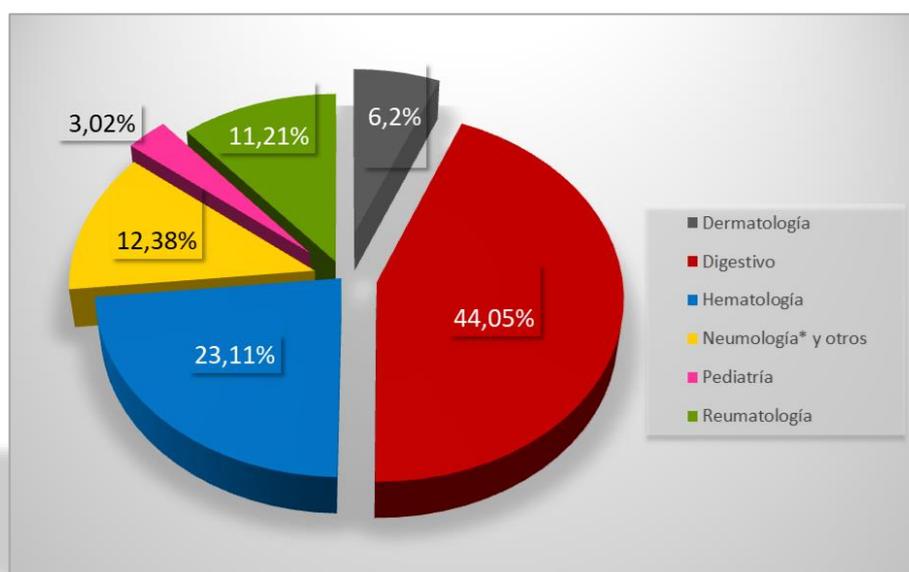


FIGURA 23.- Solicitud de estudios ambos IGRA. Porcentaje de pacientes por Servicios.

En los contextos clínicos descritos, a los pacientes con un primer resultado IGRA negativo suele incluirse en los protocolos de detección de infección tuberculosa que, con periodicidad anual, se llevan a cabo en diferentes servicios clínicos, esta estrategia diagnóstica se ha generalizado de manera significativa en los dos últimos años.

El porcentaje de pacientes VIH estudiados entre 2007 y 2018 oscilaba entre un 3- 4% del total.

3.1. QTF TB Gold In-Tube vs. T-SPOT.TB

Durante el período 2011-2016 se solicitaron 3.459 estudios IGRA. De manera global los resultados se presentan en la Figura 24, es reseñable que la cifra de infectados detectados por IGRA en este grupo de pacientes es inferior al 20%.

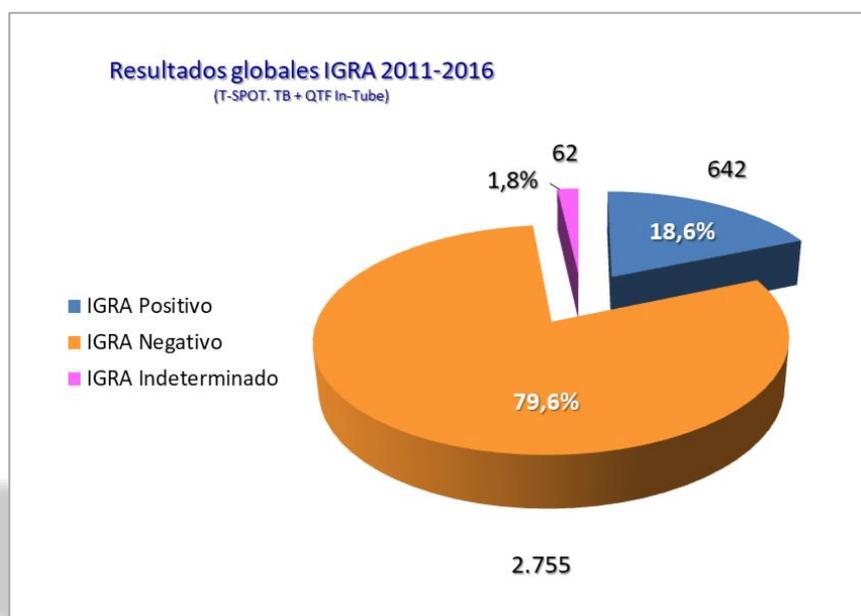


FIGURA 24.- Resultados globales IGRA 2011-2016 (T-SPOT.TB + QTF In-Tube).

En lo que se refiere a los resultados comparados entre T-SPOT. TB y QuantiFERON TB Gold In-Tube se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

		QTF TB Gold In-Tube			Total
		Positivo	Negativo	Indeterminado	T-SPOT. TB
T-SPOT. TB	Positivo	354	163	26	543
	Negativo	44	2.426	113	2.583
	Indeterminado	55	216	62	333
Total QTF TB Gold In-Tube		453	2.805	201	3.459

TABLA 5.- Resultados globales T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold In-Tube.

	QuantiFERON TB Gold In-Tube	T-SPOT. TB
Sensibilidad	0,80	0,94
Especificidad	1	1
VPP	1	1
VPN	0,94	0,98

TABLA 6.- T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold In-Tube. Sensibilidad, Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

CONCORDANCIAS

Los resultados entre ambos IGRA fueron concordantes en 2.842 muestras (82,16%), se desglosan en la Figura 25.

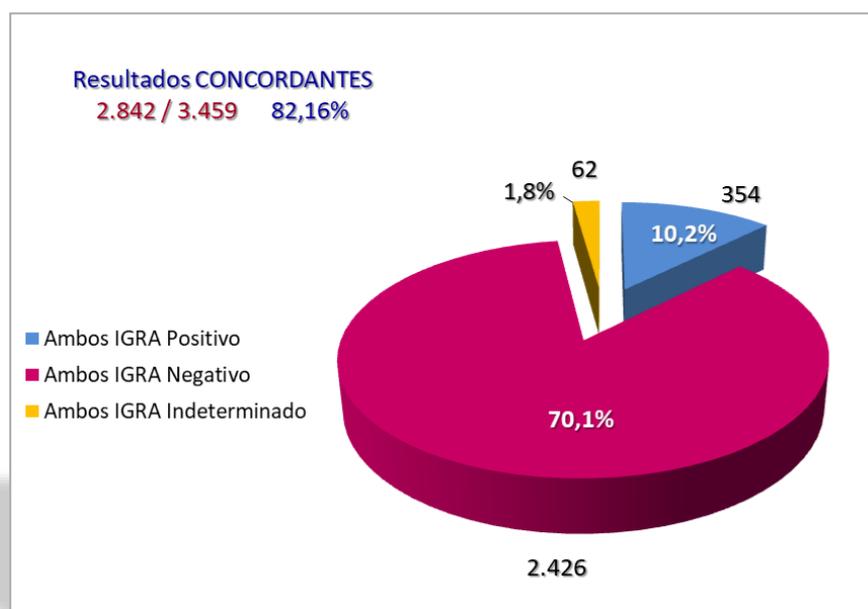


FIGURA 25.- Resultados CONCORDANTES entre T-SPOT.TB y QuantiFERON TB Gold In-Tube.

DISCREPANCIAS

Se produjeron discrepancias en 617 muestras (17,83%), en 410 de ellas (que suponen un 66,4% de las discrepancias y un 11,8% del total de muestras estudiadas) el resultado de uno de los dos IGRA no era interpretable (Resultado Indeterminado) por no cumplir el control positivo o negativo los criterios necesarios. Entre las discordancias es reseñable por un lado que el número de resultados positivos con T-SPOT.TB superaba al de QTF In-Tube en

una proporción de algo más de **4,6:1** y, por el otro, que el número de resultados indeterminados de T-SPOT.TB duplicaba a los de QTF In-Tube. Estos resultados evidencian que la realización simultánea de ambos IGRA en pacientes de riesgo, permite incrementar la sensibilidad diagnóstica pero, sobre todo, la obtención de un resultado final (positivo o negativo) con al menos uno de los dos IGRA. El desglose de resultados discrepantes se presenta en la Figura 26.

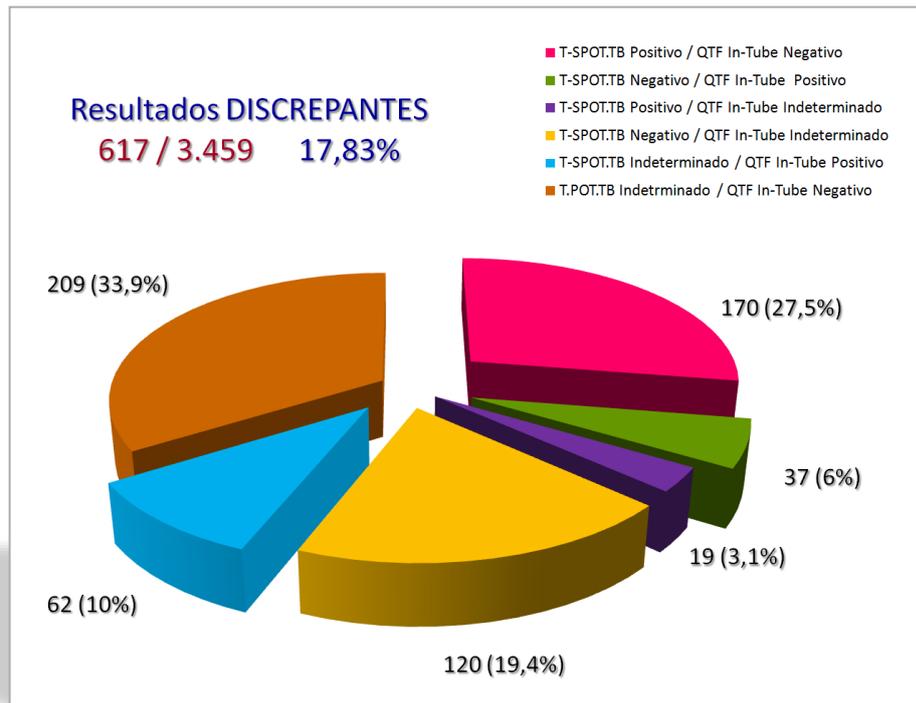


FIGURA 26.- Resultados DISCREPANTES entre T-SPOT.TB y QuantiFERON TB Gold In-Tube.

3.2. QTF TB Gold Plus vs. T-SPOT.TB

Durante el período 2016-2018 se solicitaron 3.160 estudios IGRA. De manera global los resultados se presentan en la Figura 27, la cifra de infectados detectados por IGRA en este grupo de pacientes era 20,7%, ligeramente superior a la observada durante el periodo anterior, y con menos resultados indeterminados, (0,4%).

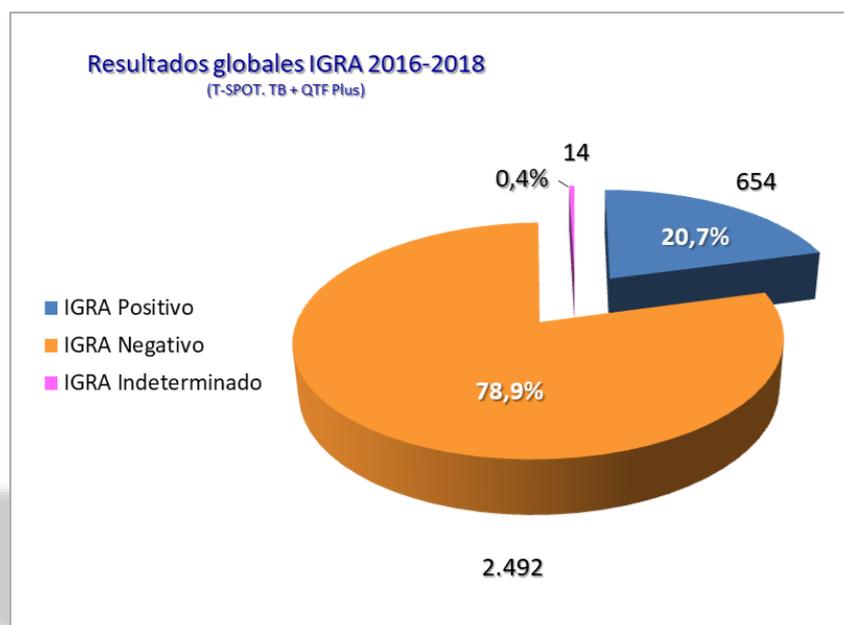


FIGURA 27.- Resultados globales IGRA 2016-2018 (T-SPOT.TB + QTF Plus).

Los resultados comparados entre T-SPOT. TB y QuantiFERON TB Gold Plus se muestran en la Tabla 6.

		QTF TB Gold Plus			Total
		Positivo	Negativo	Indeterminado	T-SPOT. TB
T-SPOT. TB	Positivo	445	117	7	569
	Negativo	65	2.365	40	2.470
	Indeterminado	20	87	14	121
Total QTF TB Gold Plus		530	2.569	61	3.160

TABLA 6.- Resultados globales T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold Plus.

	QuantiFERON TB Gold Plus	T-SPOT. TB
Sensibilidad	0,94	0,91
Especificidad	1	1
VPP	1	1
VPN	0,98	0,97

TABLA 7.- T-SPOT.TB vs. QTF TB Gold Plus. Sensibilidad, Especificidad, VPP: Valor predictivo positivo, VPN: Valor predictivo negativo.

CONCORDANCIAS

Los resultados entre ambos IGRA fueron concordantes en 2.824 muestras (89,36%), se desglosan en la Figura 28.

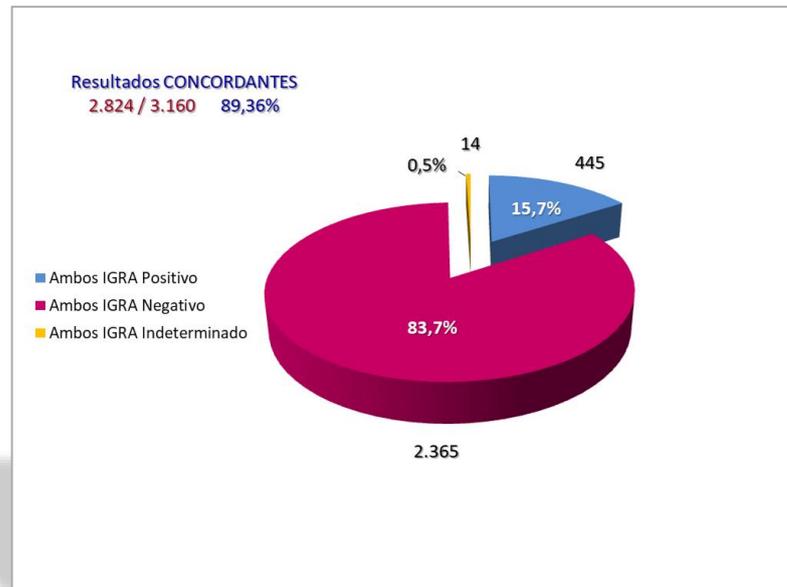


FIGURA 28.- Resultados CONCORDANTES entre T-SPOT.TB y QuantiFERON TB Gold Plus.

DISCREPANCIAS

Se produjeron discrepancias en 336 muestras (10,63%), en 154 de ellas (que suponen un 45,8% de las discrepancias y un 4,8% del total de muestras estudiadas) el resultado de uno de los dos IGRA no era interpretable (Resultado Indeterminado) por no cumplir el control positivo o negativo los criterios necesarios. Entre las discordancias, es reseñable que la diferencia en el número de resultados positivos a favor de T-SPOT.TB respecto a QTF Plus se redujo en comparación con los registrados con la versión QTF In-Tube siendo de **1,8:1**, así como que el número de resultados indeterminados de T-SPOT.TB seguía duplicando a los de QTF Plus, al igual que ocurría con la versión In-Tube. Esta nueva combinación de IGRA en pacientes de riesgo, permite incrementar en algo más del 10% las opciones de obtener un resultado final (positivo o negativo) con al menos uno de las dos IGRA, así como el número de positivos. El desglose de resultados discrepantes se presenta en la Figura 29.

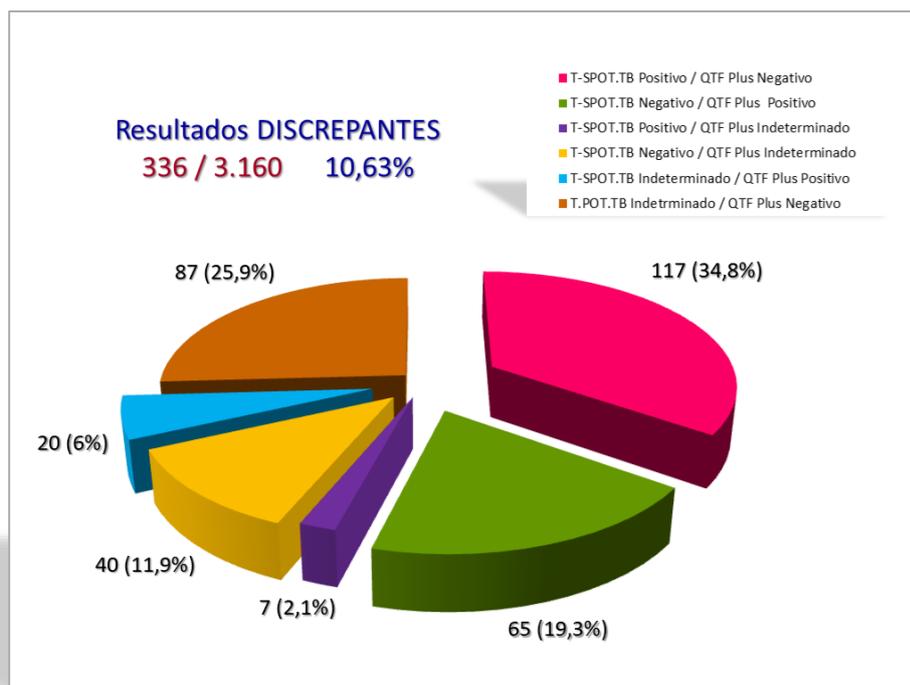


FIGURA 29.- Resultados DISCREPANTES entre T-SPOT.TB y QuantiFERON TB Gold Plus.

Finalmente, señalar que en el caso concreto de pacientes VIH-positivo, T-SPOT.TB fue la prueba IGRA más sensible, pero al igual que ocurría en otros pacientes con patologías diferentes, el que registraba un mayor número de resultados indeterminados, más del doble que con las dos versiones de QTF (GIT y Plus).

4. RESULTADOS IGRA EN DIFERENTES CONTEXTOS

4.1 QuantiFERON TB Gold Plus: LECTURAS INDIVIDUALIZADAS REGISTRADAS EN LOS TUBOS TB1 (ESTIMULACIÓN CD4+) Y TB2 (ESTIMULACIÓN CD8+)

Se incluyeron 16.121 muestras en la que había un resultado interpretable (se excluyeron 237 muestras con Resultado Indeterminado), se registraron las lecturas individualizadas en los tubos TB1 (contiene péptidos de ESAT-6 y CFP-10 diseñados para generar respuesta a partir de linfocitos T-*helper* CD4+) y TB2 (con un conjunto adicional de péptidos cuya función es inducir respuestas de linfocitos T-citotóxicos CD8+) de QuantiFERON TB Gold Plus.

En la mayoría de muestras con rangos de lectura inferiores a 0,11 y superiores a 0,46 las lecturas registradas en ambos tubos fueron muy similares, y las diferencias no afectaron a la interpretación final de la prueba como positiva o negativa; pero en los rangos de lectura comprendidos entre 0,12 y 0,45 las diferencias en las lecturas de los dos tubos además de ser más frecuentes, muchas veces resultaban críticas, porque implicaba que el resultado positivo lo era a expensas solamente de uno de los dos tubos. En la Tabla 8 aparecen diferentes rangos de lectura y en cada uno de ellos el número de muestras incluidas en el mismo, tanto en el caso del tubo TB1 como del TB2.

UI/mL	TB1	TB2
0-0,10	12.859	12.776
0,11-0,25	642	686
0,26-0,34	200	197
0,35-0,45	173	192
0,46-1	459	459
1,01-2	424	415
2,01-3	222	232
3,01-4	162	165
4,01-5	132	138
5,01-6	122	124
6,01-7	121	125
7,01-8	119	118
8,01-9	96	96
9,01-10	90	89
>10	300	309

TABLA 8.- QuantiFERON TB Gold Plus, lecturas individualizadas tubos TB1 y TB2 con resultado interpretable. Aparecen sombreadas en amarillo las casillas correspondientes al rango de lecturas anterior y posterior al valor crítico (Positivo $\geq 0,35$ UI/mL).

4.2 QuantiFERON TB Gold Plus: RESULTADOS POSITIVOS A EXPENSAS DE UNO DE LOS DOS TUBOS (TB1 O TB2)

Se registraron 2.518 muestras positivas (15,39%) con QuantiFERON TB Gold Plus entre un total de 16.358 estudios realizados. En 2.258 el resultado fue positivo en ambos tubos (89,7%). En 260 (10,3%) el resultado positivo fue a

expensas de uno de los dos tubos TB1 o TB2 (Figura 18); en 116 (44,6%) fue solo el tubo TB1 (CD4+), 98 tenían valores comprendidos entre 0,35-1 (84,5%); y en 144 (55,4%) fue solo el tubo TB2 (CD8+), 129 con valores comprendidos entre 0,35-1 (89,6%).

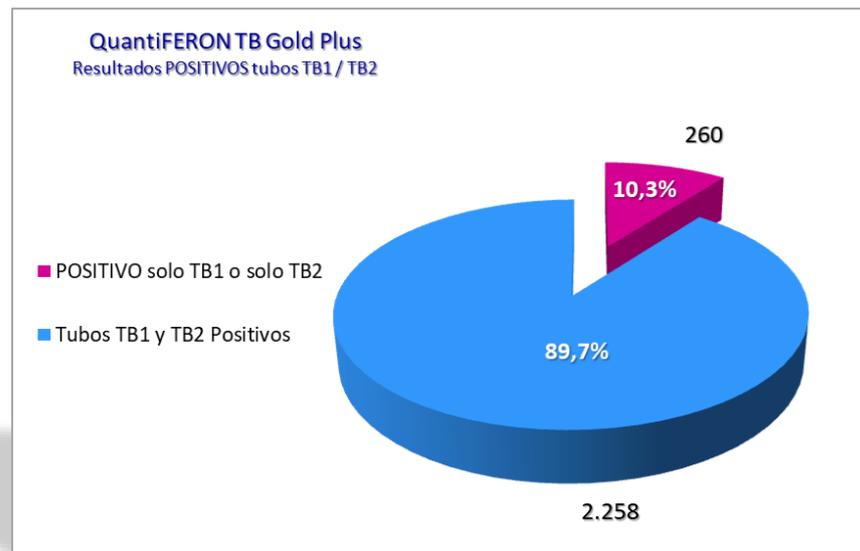


FIGURA 30.- QuantiFERON TB Gold Plus, positivos a expensas solamente de uno de los dos tubos.

4.3 T-SPOT.TB: RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS ESAT-6 y CFP-10

De manera sistemática, se llevó un registro individualizado del número de *spots* observados en los pocillos correspondientes a los antígenos ESAT-6 (panel A) y CFP-10 (panel B) en las 1.343 muestras T-SPOT.TB positivo. Los resultados se muestran desglosados en la Tabla 9, y representados de manera gráfica en la Figura 31. En conjunto, se registraron más positivos con CFP-10 que con ESAT-6. Las coincidencias en cuanto al criterio de positividad frente a uno y otro antígeno guardaban relación directa con los recuentos de *spots* altos, siendo la coincidencia máxima por encima de 30 *spots* en cualquiera de los pocillos, pero a partir de ese umbral, aunque no había muchas discrepancias respecto al criterio de positividad, los recuentos de *spots* podían diferir bastante.

Número de spots	ESAT-6	CFP-10
8-15	387	257
16-30	406	257
31-50	309	435
51-100	97	237
>100	19	40
TOTAL	1218	1226

(Positivo ≥ 8 , Negativo ≤ 4 , Límite 5-7)

TABLA 9.- T-SPOT. TB, número de *spots* visualizados (agrupados por rangos) en los pocillos ESAT-6 y CFP-10, en muestras con resultado interpretable.

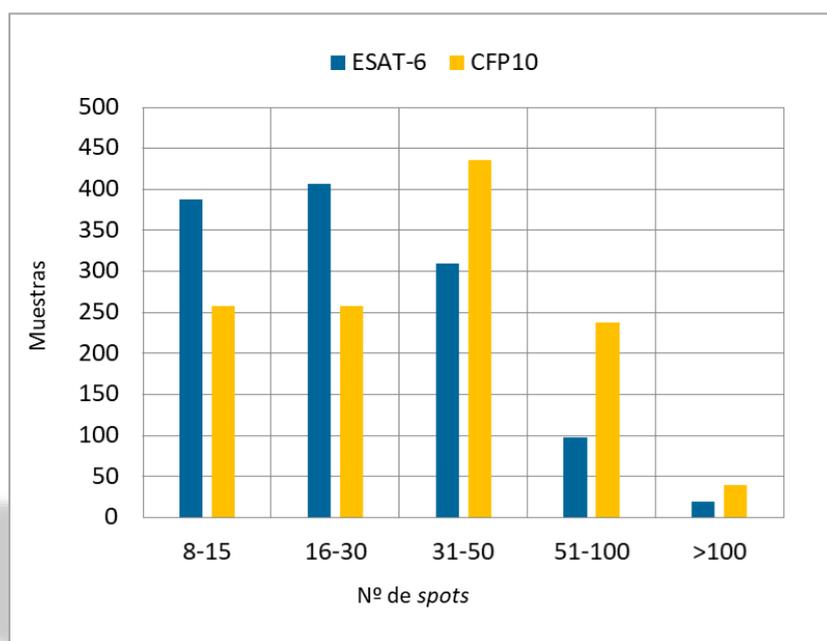


FIGURA 31.- T-SPOT. TB, número de muestras por rango de *spots* ESAT-6 y CFP-10.

4.4 T-SPOT.TB, RESULTADOS POSITIVOS A EXPENSAS SOLAMENTE DE UNO DE LOS DOS ANTÍGENOS (ESAT-6 o CFP-10)

Se registraron 1.343 muestras positivas (16,81%) con T-SPOT.TB entre un total de 7.988 estudios realizados. En 1.101 el resultado fue positivo en ambos antígenos (82%). En 242 (18%) el resultado positivo fue a expensas de uno de los dos pocillos ESAT-6 o CFP-10 (Figura 32); en 117 (48,3%) fue solo ESAT-6, 80 tenían recuentos comprendidos entre 8-20 *spots* (68,3%); y en 125 (51,7%) fue solo CFP-10, 22 con recuentos comprendidos entre 8-20 *spots* (17,6%).

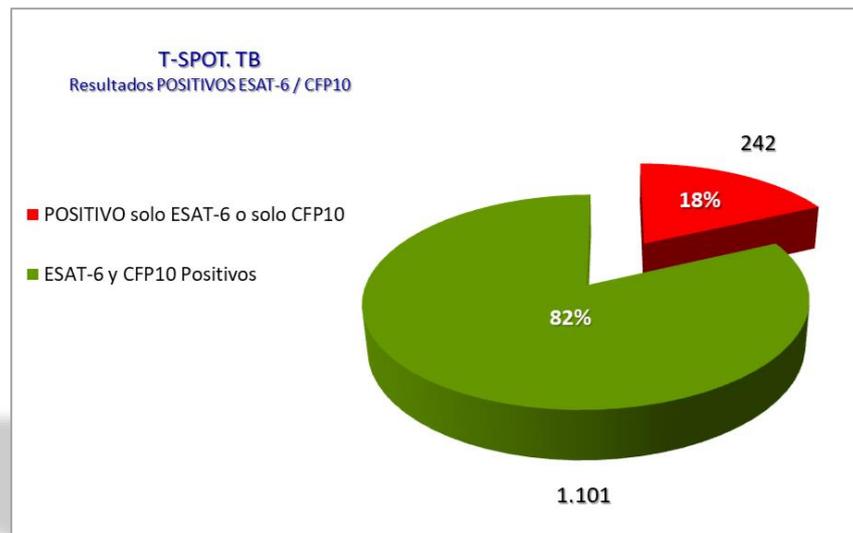


FIGURA 32.- T-SPOT. TB, positivos a expensas solamente de uno de los dos antígenos.

4.5 RESULTADOS POSITIVOS AMBOS IGRA: CORRELACIÓN ENTRE LOS VALORES OBTENIDOS POR QuantiFERON TB Gold Plus (UI/mL) Y T-SPOT.TB (nº de spots)

Se analizaron las muestras de pacientes en los que se había obtenido un resultado positivo coincidente en ambas pruebas IGRA para establecer una correlación entre los valores de los resultados de las mismas. Para ello, el número de *spots* contabilizado en T-SPOT.TB se subdividió en dos rangos de positividad:

- T-SPOT.TB de pacientes con un número de *spots* (en panel A y/o B) comprendido entre 8 y 30 se correlacionaron con:
 - ✓ Lecturas de QTF Plus comprendidas entre 0,35-1 UI/mL en el 100% de los casos.
 - ✓ Lecturas de QTF Plus comprendidas entre 1,01-5 UI/mL en el 52,38% de los casos.
(No había ningún caso con lecturas ≥ 5 UI/mL)
- T-SPOT.TB de pacientes con >30 *spots* (en panel A y/o B) se correlacionaron con:
 - ✓ Lecturas de QTF Plus comprendidas entre 1,01-5 UI/mL en el 47,62% de los casos.

- ✓ Lecturas de QTF Plus ≥ 5 UI/mL en el 100% de los casos.

4.6 CONVERSIONES / REVERSIONES / DISCREPANCIAS CUANDO EN UNO DE LOS DOS IGRA LOS CRITERIOS PARA VALIDAR LOS RESULTADOS SE ENCONTRABAN PRÓXIMOS A LOS LÍMITES O EN SITUACIONES NO ACLARADAS POR EL FABRICANTE

Resultados QuantiFERON cuando mitógeno $>0,50$ pero $<40\%$ de la media y T-SPOT.TB cuando <250.000 células pero el control positivo de esas muestras presentaba >20 spots.

- 62 de 75 pacientes con al menos uno de los IGRA “OK” (82,6%)
- 13 de 75 pacientes con los dos IGRA “no OK” (17,3%)
 - T-SPOT.TB <250.000 células: 31 muestras (41,3%)
 - 25 NEGATIVOS (2 fueron QTF POSITIVO)
 - 5 POSITIVOS
 - 1 INDETERMINADO
 - QuantiFERON Mitógeno $>0,5$ pero <4 UI/ml: 24 muestras (32%)
 - 22 NEGATIVOS (2 fueron T-SPOT.TB POSITIVO)
 - 2 POSITIVOS

4.7 EFECTO DE LA SOBREENCUBACIÓN EN LOS RESULTADOS DE QTF Y T-SPOT.TB

En el caso de QuantiFERON TB Gold Plus se procesaron “en paralelo” y por duplicado dos series completas de 4 tubos (NIL, TB1, TB2, MIT) a partir de 88 muestras de sangre extraídas en tubos de heparina lito. La sangre que se utilizó para inocular las dos series de tubos de QTF (1 mL por tubo) procedía de aquellas peticiones en las que se solicitaba realizar T-SPOT.TB, pero que no podía llevarse a cabo por ser remitidas al laboratorio los viernes, o las vísperas de festivo y que, salvo excepciones, suelen ser rechazadas al no poder completar su procesamiento ya que se precisan dos jornadas laborales consecutivas para ello. La única diferencia en el procesamiento de las dos

series radicaba en que una de ellas fue procesada de acuerdo a las indicaciones del fabricante, mientras que en la otra la incubación de los tubos se prolongó hasta las 72h (tres veces más del tiempo recomendado); el resto de pasos fue idéntico. Los resultados se presentan en la Tabla 10.

	Positivos	Negativos	Indeterminados
Serie 1	12	75	1
Serie 2-sobreincubación	13	74	1

TABLA 10.- Resultados QTF en series de dos muestras del mismo paciente, en las que una de las dos réplicas (serie 2) se prolongó el tiempo de incubación recomendado (hasta 72h).

Los resultados fueron idénticos en 87 muestras, y solamente en una se obtuvo un resultado discrepante. Esa muestra fue negativa (0,25 UI/mL) en las condiciones recomendadas, y positiva (0,45 UI/mL) en la serie con incubación prolongada. En ningún caso se encontraron diferencias en los resultados del tubo NIL, lo que evidencia que en el caso de QTF la incubación hasta 72h no parece inducir la liberación inespecífica de interferón gamma.

En el caso de T-SPOT.TB se procesaron “en paralelo” y por duplicado dos series de 4 pocillos cada una (control negativo, Panel A, Panel B, control positivo) a partir de 48 muestras de sangre extraídas en tubos de heparina litio. La única diferencia en el procesamiento de las dos series radicaba en que una de ellas fue procesada de acuerdo a las indicaciones del fabricante, mientras que en la otra la incubación de los pocillos se prolongó hasta las 72h (tres veces más del tiempo recomendado). El resto de pasos fue idéntico. Los resultados de las dos series aparecen reflejados en la Tabla 11.

	Positivos	Negativos	Indeterminados
Serie 1	5	41	2
Serie 2-sobreincubación	2	9	37

TABLA 11.- Resultados T-SPOT. TB en series de dos muestras del mismo paciente, en las que una de las dos réplicas (serie 2) se prolongó el tiempo de incubación recomendado (hasta 72h).

Los resultados fueron muy dispares, con un incremento significativo de resultados indeterminados por liberación inespecífica de interferón gamma en

el pocillo control negativo, lo que en el caso de T-SPOT.TB desaconseja prolongar el período de incubación, al menos hasta las 72h.

4.8 EFECTO DEL AJUSTE DE CÉLULAS POR POCILLO EN T-SPOT.TB

En T-SPOT.TB se recomienda ajustar el número de células que se inoculan a 250.000 ± 50.000 por pocillo. Con la intención de valorar el efecto que pudiera tener en los resultados la falta de precisión en el ajuste de células, a lo largo de un año, y en cada una de las tres tandas semanales de muestras procesadas rutinariamente se incluyó una réplica de una de las muestras de esas tandas, en esa replica los 4 pocillos llevaría en los 100 μ l de AIM-V el número de células obtenido a partir de la muestra de sangre sin realizar ajuste alguno. En total se duplicaron 150 muestras que se dividieron en dos series de acuerdo al número de células obtenido inicialmente: Serie-1 (entre 250.000-1.750.000) y Serie-2 (entre 1.750.000 y 2.500.000), los resultados de ambas series se recogen en las Tablas 12 y 13 respectivamente.

Células/pocillo	Positivos	Negativos	Indeterminados
250.000	14	83	5
250.000-1.750.000	14	83	5

TABLA 12.- Resultados en Serie 1 de T-SPOT-TB con y sin ajuste de células.

Células/pocillo	Positivos	Negativos	Indeterminados
250.000	5	40	3
1.750.000-2.500.000	3	36	9

TABLA 13.- Resultados en Serie 2 de T-SPOT-TB con y sin ajuste de células.

La concordancia de resultados fue total en muestras en las que las réplicas incorporaban un número de células entre 2 y 7 veces superior al recomendado. Aunque con cantidades mayores se incrementaron los indeterminados y también se produjeron falsos negativos.

4.9 IGRA RESULTADOS PERSONAL SANITARIO

Servicio de Prevención de Riesgos Laborales del HUCA, periodo 2016-2018. QuantiFERON TB Gold Plus es la prueba IGRA recomendada en el Principado de Asturias para este colectivo.

- Número de trabajadores estudiados: 1253
- ✓ Reconocimiento laboral rutinario: 1106 (88,26%)
- ✓ Reconocimiento post-exposición: 147 (11,73%)

Los resultados se muestran en la Figura 33.



FIGURA 33.- Resultados IGRA personal sanitario.

En la Tabla 14 y en la Figura 34 aparecen los resultados desglosados por rangos de edad. Es reseñable que el porcentaje global de positivos era muy inferior al de la población general, prácticamente la mitad, esas diferencias se observaban en todos los rangos de edad por debajo de 45 años, aunque por encima de esa edad se igualaban con los de la población general. Entre los 147 trabajadores estudiados post-exposición se detectaron 2 conversiones (1,36%).

Edad	QTF Positivo	QTF Negativo	TOTAL
<24	3 (2%)	147	150
25-34	13 (3,32%)	378	391
35-44	16 (5,40%)	280	296
45-54	37 (14,8%)	212	249
55-64	30 (18,86%)	129	159
≥65	2 (33,33%)	4	6

TABLA 14.- Resultados IGRA personal sanitario por rangos de edad.

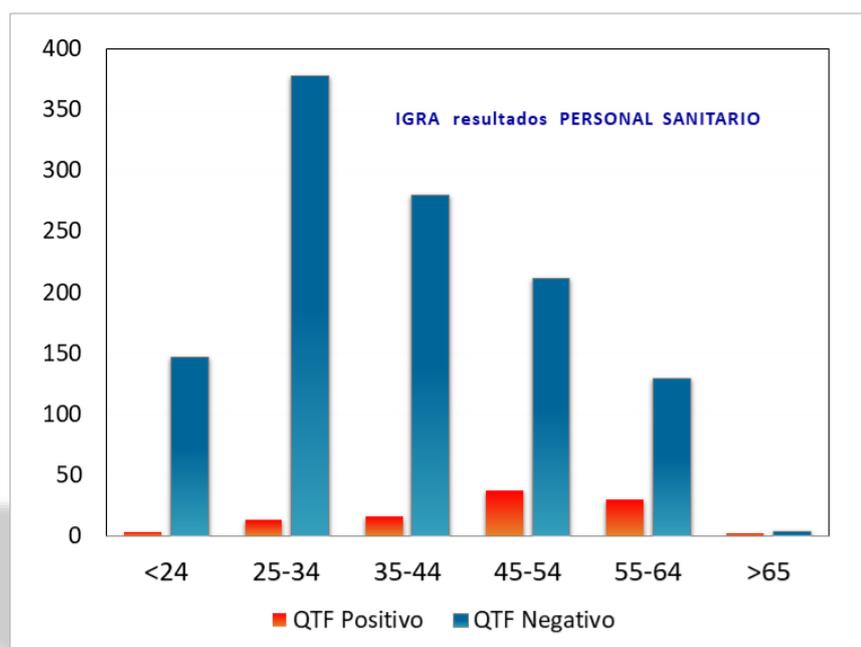


FIGURA 34.- Resultados IGRA personal sanitario por rangos de edad.

En algunos casos se incluyó también T-SPOT.TB por recomendación del propio Laboratorio, y condicionado por los resultados previos obtenidos con QTF Plus (Negativo “LÍMITE” y/o Negativo con un mitógeno <40% de la media “MITÓGENO BAJO”): 15 casos (Negativos 10, Positivos 5).

4.10 IGRA en ENFERMOS de TUBERCULOSIS

Resultados IGRA solamente en 96 enfermos TB (Tabla 15 y Figura 35), ya que no se solicitó IGRA a todos los pacientes diagnosticados de TB.

	Nº de pacientes	%
IGRA positivo*	83	86,4
IGRA negativo	11	11,5
IGRA indeterminado	2	2,1
Total pacientes	96	100

*4 conversiones IGRA

TABLA 15.- Resultados IGRA EN ENFERMOS-TB.

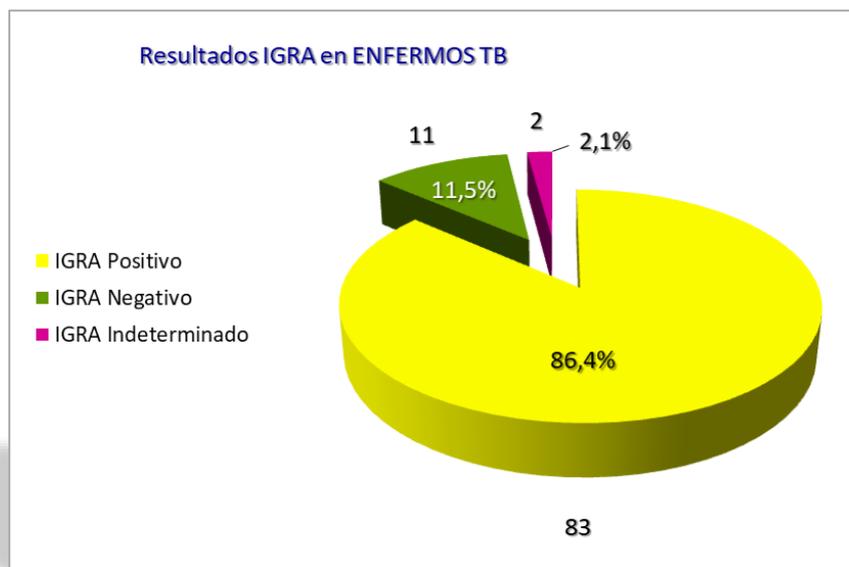


FIGURA 35.- Resultados IGRA EN ENFERMOS-TB.

4.11 ENFERMOS TB CON QTF Plus POSITIVO, RESULTADOS INDIVIDUALIZADOS TUBOS TB1 Y TB2

Se estudiaron 79 enfermos TB con resultado QTF Plus disponible.

- ✓ TB1 y TB2 ambos positivos en 70 muestras (88,60%)
- ✓ Solo uno de los tubos positivo (1 TB1, 8 TB2) en 9 muestras (11,39%)
 - Valores TB1=TB2: 14 (17,72%)
 - Valores TB1>TB2: 19 (24,05%)
 - Valores TB2>TB1: 46 (58,22%)

En la Tabla 16 se recogen de manera individualizada los valores correspondientes a los tubos TB1 y TB2 en cada uno de los enfermos TB estudiados, resaltando en amarillo el valor más alto de cada pareja de tubos. El tubo TB2 fue en el que con mayor frecuencia (46 muestras) se registraron los valores más altos, el TB1 en 19, y en 14 muestras se obtuvo idéntico resultado en los dos tubos.

4.12 CONVERSIÓN IGRA Y DESARROLLO DE ENFERMEDAD

Existe la potencialidad (resaltada por el fabricante) de que el tubo TB2 (CD8+) pudiera predecir riesgo de desarrollar la enfermedad. Se estudiaron

durante 2 años (desde julio 2016 hasta diciembre 2018), coincidiendo con la incorporación de QuantiFERON TB Gold Plus al protocolo diagnóstico de ITL en Asturias. Se detectaron 9 casos (0,4%) de conversiones IGRA (T-SPOT.TB y/o QuantiFERON TB Gold Plus) en un total de 2.015 pacientes con IMID estudiados, frente a los 81 casos (0,57%) detectados en el mismo período de tiempo en población general (solo con QuantiFERON TB Gold Plus) sobre un total de 14.164 pacientes. En 4 de ellos (44%) la conversión fue seguida del desarrollo de enfermedad TB primaria, mientras que, hasta la fecha, ninguno de los 81 casos en población general desarrolló enfermedad.

En los 4 pacientes en los que se evidenció CONVERSIÓN IGRA seguido del desarrollo de enfermedad TB primaria, solamente en 2 de ellos se obtuvieron valores más altos en el TB2 pero las diferencias eran anodinas (Tabla 17).

	TB1	TB2	MIT	NIL
Caso 1	6,79	6,59	9,47	0,06
Caso 2	3,50	4,13	5,71	1,10
Caso 3	3,84	4,81	6,32	0,09
Caso 4	0,37	0,31	7,47	0,03

TABLA 17.- Pacientes en los que se detectó conversión IGRA seguida de desarrollo de enfermedad primaria.

(TB1-Cero) Resultado	(TB2-Cero) Resultado	(TB1-Cero) Resultado	(TB2-Cero) Resultado
0,00 (Negativo)	0,47 (Positivo)	2,72 (Positivo)	4,26 (Positivo)
0,08 (Negativo)	0,59 (Positivo)	2,73 (Positivo)	2,72 (Positivo)
0,10 (Negativo)	3,12 (Positivo)	2,96 (Positivo)	2,29 (Positivo)
0,15 (Negativo)	5,44 (Positivo)	2,99 (Positivo)	2,27 (Positivo)
0,25 (Negativo)	0,49 (Positivo)	3,10 (Positivo)	6,27 (Positivo)
0,27 (Negativo)	0,38 (Positivo límite)	3,50 (Positivo)	4,13 (Positivo)
0,31 (Negativo Límite)	0,41 (Positivo)	3,53 (Positivo)	3,89 (Positivo)
0,32 (Negativo Límite)	0,38 (Positivo límite)	3,84 (Positivo)	4,81 (Positivo)
0,37 (Positivo límite)	0,31 (Negativo Límite)	4,73 (Positivo)	6,24 (Positivo)
0,50 (Positivo)	0,43 (Positivo)	5,15 (Positivo)	5,61 (Positivo)
0,53 (Positivo)	0,68 (Positivo)	5,17 (Positivo)	6,23 (Positivo)
0,59 (Positivo)	0,59 (Positivo)	5,34 (Positivo)	6,48 (Positivo)
0,61 (Positivo)	0,64 (Positivo)	5,42 (Positivo)	4,71 (Positivo)
0,61 (Positivo)	1,71 (Positivo)	5,60 (Positivo)	5,45 (Positivo)
0,64 (Positivo)	0,72 (Positivo)	5,83 (Positivo)	6,18 (Positivo)
0,67 (Positivo)	1,71 (Positivo)	5,86 (Positivo)	5,43 (Positivo)
0,70 (Positivo)	0,70 (Positivo)	5,89 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
0,81 (Positivo)	0,85 (Positivo)	5,92 (Positivo)	6,00 (Positivo)
0,86 (Positivo)	0,49 (Positivo)	5,97 (Positivo)	5,97 (Positivo)
0,95 (Positivo)	1,15 (Positivo)	6,04 (Positivo)	6,82 (Positivo)
1,02 (Positivo)	1,55 (Positivo)	6,06 (Positivo)	7,16 (Positivo)
1,03 (Positivo)	1,45 (Positivo)	6,28 (Positivo)	6,28 (Positivo)
1,03 (Positivo)	1,75 (Positivo)	6,33 (Positivo)	2,88 (Positivo)
1,07 (Positivo)	1,04 (Positivo)	6,41 (Positivo)	7,46 (Positivo)
1,25 (Positivo)	0,95 (Positivo)	6,67 (Positivo)	6,67 (Positivo)
1,31 (Positivo)	1,41 (Positivo)	6,67 (Positivo)	7,51 (Positivo)
1,46 (Positivo)	1,56 (Positivo)	6,71 (Positivo)	6,71 (Positivo)
1,62 (Positivo)	1,56 (Positivo)	6,79 (Positivo)	6,59 (Positivo)
1,67 (Positivo)	4,17 (Positivo)	6,93 (Positivo)	7,92 (Positivo)
1,67 (Positivo)	3,34 (Positivo)	7,03 (Positivo)	9,36 (Positivo)
1,70 (Positivo)	2,19 (Positivo)	7,42 (Positivo)	7,42 (Positivo)
1,76 (Positivo)	2,53 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
1,92 (Positivo)	6,14 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,19 (Positivo)	1,86 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,19 (Positivo)	2,41 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,31 (Positivo)	3,39 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,36 (Positivo)	4,67 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,37 (Positivo)	4,67 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,38 (Positivo)	3,86 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,39 (Positivo)	2,03 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,40 (Positivo)	2,66 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,43 (Positivo)	1,23 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)
2,71 (Positivo)	2,19 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)	> 10,00 (Positivo)

TABLA 16.- Resultados individualizados tubos TB1 y TB2 QTF Plus en 79 enfermos TB. Se resaltan en amarillo los tubos en los que se obtuvo el valor más alto en cada paciente.

DISCUSIÓN

En la actualidad, el manejo de la infección tuberculosa latente todavía constituye un reto tanto desde un punto de vista clínico como de salud pública. La complejidad de las interacciones que se producen entre *M. tuberculosis* y el hospedador no ha sido totalmente descifrada, incluso se ha cuestionado la clásica dicotomía entre enfermedad activa e infección tuberculosa latente proponiendo un modelo dinámico que va desde la esterilización de la infección latente, la infección tuberculosa subclínica, hasta la tuberculosis activa en sus diferentes formas de presentación clínica.

Generalmente, las personas con alto riesgo de desarrollar tuberculosis activa están incluidas en una de estas dos categorías: 1) las que han sido infectadas recientemente por *M. tuberculosis*; 2) aquellas con afecciones que debilitan el sistema inmunitario en diferentes contextos clínicos. Se acepta que las personas infectadas inmunocompetentes tienen entre un 5 y un 10% de riesgo de desarrollar una enfermedad activa a lo largo de su vida, pero ese riesgo se incrementa significativamente por efecto de la inmunosupresión, y dentro de esta categoría se situarían los denominados agentes biológicos (entre ellos los antagonistas de TNF α), cada vez más usados para el tratamiento de una gran variedad de IMID, y los fármacos inmunosupresores utilizados para evitar el rechazo en pacientes trasplantados. Estos nuevos tratamientos han supuesto un gran avance para el manejo clínico de diferentes patologías, aunque entre los riesgos inherentes asociados a las mismas destacan las infecciones, y entre ellas, de manera destacada la tuberculosis.

El diagnóstico de la infección tuberculosa se realiza mediante pruebas inmunológicas que detectan la sensibilización del individuo a antígenos de *M. tuberculosis* en ausencia de hallazgos clínicos y/o radiológicos compatibles con enfermedad tuberculosa activa¹⁷⁸.

A lo largo de la última década, los IGRA se han convertido en una herramienta diagnóstica con un gran impacto en la práctica clínica. No obstante, la bibliografía existente es a menudo contradictoria, no se ha llegado a un consenso generalizado sobre el papel que deben ejercer, si deben sustituir a la tuberculina o complementar a ésta. En general, se consideran más apropiados para países de baja incidencia por su mayor especificidad, pero teniendo

presentes los recursos disponibles, la relación coste beneficio, y la utilización con criterios clínicos razonables¹⁷⁹. También se reconoce el papel confirmatorio de los IGRA de los resultados positivos de la prueba de la tuberculina en poblaciones masivamente vacunadas con BCG, como la española, o cuando se requiere máxima sensibilidad en la detección de infección tuberculosa latente, aspectos estos que se recogen en la guía de consenso SEIMC-SEPAR del 2016¹⁸⁰

Como se desprende de los datos recogidos en nuestro trabajo, en Asturias se ha producido un importante incremento de la demanda diagnóstica, por una parte, por la normativa del Gobierno del Principado de Asturias que desde el año 2015 recomienda su utilización para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente; y por otra, probablemente por la sencillez y comodidad que para el paciente suponen este tipo de pruebas que se llevan a cabo *ex-vivo* y en las que solo hace falta una muestra de sangre. Desde 2014 el número de estudios IGRA se ha cuadruplicado, mayoritariamente (dos terceras partes) en el contexto clásico de estudio de contactos y revisiones de personal sanitario, y una tercera parte, en el contexto de pacientes inmunodeprimidos y/o candidatos a terapias biológicas. Entre estos últimos destacan los pacientes con IMID de los servicios de Digestivo, Hematología y Reumatología que generan más del 75% de la demanda directamente relacionada con el manejo de agentes biológicos.

Como cabía esperar, la demanda diagnóstica de las pruebas IGRA en Asturias se genera en su mayoría (69,5%) a partir de las personas con edades comprendidas entre los 25 y 64 años, con una distribución prácticamente idéntica entre hombres y mujeres. Dato que se correlaciona con la una mayor densidad de población en esas edades medias de la vida. El mayor número de estudios se generó en el tramo de edad de 45-54 años.

Desde junio de 2007 hasta junio 2016 se realizaron 16.799 estudios de infección tuberculosa con QuantiFERON TB Gold In-Tube (QTF-GIT) en Asturias, de manera global la introducción de esta metodología diagnóstica nos permitió conocer, de una manera mucho más objetiva, que el porcentaje de infectados detectado por esta técnica, se situaba en un 15,2% (2.550

personas), cifra de infectados claramente inferior a la estimada para la tuberculina –y que siempre se cita en la literatura- que según la OMS sería de aproximadamente entre un 20 y un 30% de la población mundial. Conviene tener presente que, durante este primer periodo analizado en nuestro estudio, la prueba de la tuberculina todavía era en Asturias la prueba de referencia para el diagnóstico de la infección tuberculosa, y que los IGRA representaban una técnica complementaria de la misma, de manera especial en el caso de vacunados con BCG, para ganar especificidad. En lo que se refiere a la positividad IGRA por tramos de edad, aunque era esperable comprobar que se iba incrementando con la edad, resulta reseñable que, con esta técnica, el porcentaje de infectados en menores de 34 años no superara en ningún tramo el 10%. Por otra parte, el mayor número de indeterminados se registró en los tramos de edades extremas, y de manera especial (16,1%), en los menores de 14 años.

A partir de julio de 2016 QuantiFERON TB Gold Plus (QTF-Plus) sustituyó a la versión QuantiFERON TB Gold In-Tube, y coincidió con un cambio en las recomendaciones de la Dirección General de Salud Pública del Principado de Asturias que, en mayo de 2015, designaba a los IGRA como prueba de referencia para el diagnóstico de la infección tuberculosa y la tuberculina pasaba a ser una prueba complementaria para casos concretos. Esto motivó que en poco más de 2 años el número de estudios (16.358) igualase al total de estudios realizados con la versión QTF-GIT a lo largo de 9 años. Uno de los motivos que influyeron en los cambios recogidos en la citada normativa fue el desabastecimiento reiterado de tuberculina experimentado en nuestro país durante algo más de año y medio.

QuantiFERON TB Gold In-Tube vs. T-SPOT.TB

Los resultados comparativos entre la versión QTF-GIT y T-SPOT.TB evidenciaron una concordancia (resultados positivos, negativos e indeterminados) del 82,16% (2.842/3.459), siendo T-SPOT.TB la técnica IGRA con un mayor número de positivos (15,69% vs. 13,09%) pero también de resultados indeterminados 333 (9,62%) vs. 201 (5,81%). Por este motivo consideramos que en pacientes de riesgo la utilización simultánea de ambos

IGRA permitió alcanzar un resultado final positivo/negativo en el 98,2% de los pacientes (frente al 97,6% de QTF-GIT y 96,5% de T-SPOT.TB en el caso de utilización individual de uno de los dos IGRA) y, lo que es más reseñable, que entre estos había 288 positivos exclusivamente por uno de los dos IGRA (99 positivos por QTF con resultado negativo o indeterminado por T-SPOT.TB y 189 positivos por T-SPOT.TB con resultado negativo o indeterminado por QTF-GIT).

QuantiFERON TB Gold Plus vs. T-SPOT.TB

En lo que se refiere a la comparación de resultados entre la nueva versión QTF-Plus y T-SPOT.TB destacar que la concordancia (resultados positivos, negativos e indeterminados) alcanzó el 89,36% (2.824/3.160) un 7,2% superior a la registrada con la versión QTF-GIT, manteniéndose T-SPOT.TB como la técnica IGRA con un mayor número de positivos (18% vs. 16,77%) pero también de resultados indeterminados: 121 (3,82%) vs. 61 (1,93%). Conviene destacar la reducción en el número de resultados indeterminados registrados en ambos IGRA durante este período con respecto al anterior. A pesar del incremento en el número de resultados concordantes y de la reducción de resultados indeterminados, en pacientes de riesgo, los resultados también avalan la utilización simultánea de ambos IGRA, ya que permitió alcanzar un resultado final positivo/negativo en el 99,55% de los pacientes (frente al 98,06% de QTF-Plus y 96,17% de T-SPOT.TB en el caso de utilización individual de uno de los dos IGRA) y que, al igual que ocurría en el período anterior, entre éstos había 209 positivos exclusivamente por uno de los dos IGRA (85 positivos por QTF-Plus, con resultado negativo o indeterminado por T-SPOT.TB y 124 positivos por T-SPOT.TB, con resultado negativo o indeterminado por QTF-Plus).

En nuestro estudio, aunque no hemos comparado directamente QTF-GIT y QTF-Plus, sino que cada una de las dos versiones de QTF ha sido comparada con una misma versión de T-SPOT.TB, creemos que resulta evidente el incremento de sensibilidad de QTF-Plus con respecto a QTF-GIT. Por otra parte, revisando la, todavía escasa bibliografía existente, otros autores no han encontrado diferencias significativas entre ambas versiones. En un estudio

realizado en Alemania obtuvieron cifras de sensibilidad muy similares entre QTF-Plus y QTF-GIT en pacientes con tuberculosis activa¹⁸¹. Hasta la fecha, el trabajo más amplio es un estudio multicéntrico realizado en los Países Bajos y Bélgica en el que participaron 16 laboratorios, encontrando una elevada concordancia entre ambas versiones¹⁸². En otro trabajo, realizado en niños que habían enfermado tras exposición en su ambiente familiar, también hallaron una elevada concordancia entre QTF-GIT y QTF-Plus, tanto en el caso de enfermedad como de infección tuberculosa¹⁸³. Un estudio más, en población pediátrica con tuberculosis confirmada, mostró una elevada sensibilidad de QTF-Plus, pero solo en los casos de tuberculosis de localización pulmonar¹⁸⁴. Por otro lado, en otro estudio llevado a cabo en una región de baja prevalencia como es Italia, y que aglutinaba a participantes en diferentes situaciones clínicas: sanos, con infección latente, con enfermedad activa confirmada, y con tuberculosis ya curada; detectaron que, además de un elevado grado de concordancia entre QTF-GIT y QTF-Plus, la estimulación de TB2 inducía una respuesta de células T CD8+ en ausencia de una respuesta de células T CD4+ en los pacientes con tuberculosis activa¹⁸⁵. Otro estudio muestra que la respuesta de células T CD8+ disminuía con el tratamiento¹⁸⁶.

IGRA: lecturas individualizadas de los resultados

QuantiFERON TB Gold Plus: lecturas individualizadas registradas en los tubos TB1 (estimulación CD4+) y TB2 (estimulación CD8+)

En nuestra serie de muestras procesadas con QTF-Plus pudimos observar que, cuando los rangos de lectura eran inferiores a 0,11 o superiores a 0,46, los valores registrados en los tubos TB1 y TB2 de QTF-Plus fueron muy similares, no afectando a la interpretación final de la prueba. Las discrepancias se encontraron en los rangos de lectura comprendidos entre 0,12 y 0,45, muy próximos al punto de corte (0,35), y que muchas veces resultaron críticos, porque implicaba que el resultado positivo lo era a expensas solamente de uno de los dos tubos, hecho que constatamos en un 10,3% de los casos (44,6% solo TB1 y 55,4% solo TB2), circunstancia que también se cita en uno de los pocos estudios publicados hasta la fecha sobre QTF-Plus¹⁸⁷.

T-SPOT. TB: resultados individualizados antígenos ESAT-6 y CFP10

Las coincidencias en cuanto al criterio de positividad frente a uno y otro antígeno guardaban relación directa con los recuentos de *spots* altos, siendo la coincidencia máxima por encima de 30 *spots* en cualquiera de los pocillos, pero, a partir de ese umbral, aunque no había muchas discrepancias respecto al criterio de positividad, los recuentos de *spots* podían diferir bastante. En conjunto, se registraron más positivos con CFP-10 que con ESAT-6. En un 18% de los casos el resultado positivo fue a expensas de uno de los dos pocillos (48,3% solo ESAT-6 y 51,7% solo CFP-10) y que, de forma mayoritaria, coincidía con recuentos bajos (entre 8-20 *spots*).

Varios autores sugieren que el antígeno ESAT-6 ejerce un papel protector frente a la infección tuberculosa, así la respuesta de las células T podría persistir como consecuencia de una infección previamente tratada o en estado latente, mientras que la respuesta a CFP-10 puede ser más indicativa de una infección activa ya que, aparentemente, parece estar influida por el tratamiento.

188,189

Correlación entre los valores obtenidos por QuantiFERON TB Gold Plus (UI/mL) Y T-SPOT. TB (nº de *spots*)

Aunque el fundamento teórico de ambas pruebas IGRA es similar, para la obtención de resultados se emplean dos metodologías diferenciadas y, en principio, los resultados cuantitativos no serían totalmente comparables. En el caso de QTF se trata de un ELISA (mide la cantidad de interferón liberado, y lo cuantifica empleando -por duplicado- cuatro estándares como referencia para la lectura) y en el de T-SPOT.TB se trata de un ELISPOT (mide el número de células efectoras -las que liberan interferón-). Sin embargo, en nuestros registros, cuando comparábamos resultados de las muestras de pacientes en los que se había obtenido un resultado positivo coincidente en las dos pruebas IGRA, sí pudimos evidenciar una correlación entre los valores obtenidos por ambas. Aquellos resultados de T-SPOT.TB con un número de *spots* (en panel A y/o B) comprendido entre 8 y 30, se correlacionaban en el 100% de los casos con lecturas de QTF-Plus comprendidas entre 0,35-1 UI/mL y en un 52,38% con los que tenían lecturas entre 1,01-5 UI/mL, pero no había ningún caso con

lecturas ≥ 5 UI/mL). En el caso de los resultados de T-SPOT. TB con un número de *spots* (en panel A y/o B) >30 *spots*, se correlacionaban en un 47,62% con lecturas de QTF-Plus comprendidas entre 1,01-5 UI/mL, pero alcanzaba el 100% en el caso de lecturas ≥ 5 UI/mL.

En cambio, en un estudio prospectivo reciente (pero en el que emplean la versión QTF-GIT) en pacientes con tuberculosis activa¹⁹⁰, encontraron una pobre correlación entre los resultados cuantitativos de ambos IGRA, y sugieren que las causas podrían deberse a que T-SPOT.TB requiere un número específico de células mientras que, con QFT-GIT, se emplea sangre total, lo que no permite controlar que, en algunos pacientes, un pequeño número de células T puedan producir una gran cantidad de IFN- γ .

Criterios para validar los resultados en situaciones no aclaradas por el fabricante: efecto de la sobreincubación en los resultados de ambos IGRA. Efecto del ajuste de células por pocillo en T-SPOT.TB

Los once años de experiencia de nuestro laboratorio con las técnicas IGRA nos han permitido analizar diferentes situaciones que podrían influir en los resultados, recogidas en la literatura como variabilidad de resultados de las pruebas IGRA⁹⁶.

Existen evidencias de que, tras la extracción de sangre, un exceso de tiempo a temperatura ambiente antes de proceder a la incubación se asocia con un mayor número de resultados QFT-GIT indeterminados, por este motivo, el fabricante recomienda que la incubación de los tubos se realice lo más rápidamente posible^{191,192}. Los tiempos de incubación más adecuados se sitúan entre las 16 y las 24h, plazos avalados por un estudio en sujetos infectados en el que no detectaron cambios significativos cuando el período de incubación era de 16, 20 ó 24h¹⁵⁸. A pesar de ello, no ocurre lo mismo cuando la duración de la incubación se acorta, como se muestra en un trabajo en el que encuentran una respuesta significativamente menor para los tiempos de incubación cortos¹⁹³. También se han estudiado tiempos de incubación de QFT-GIT más prolongados (48 y 72 h) en 37 pacientes con sospecha de tuberculosis y 33 personas sanas, observaron resultados inconsistentes en 4 de los primeros y en dos de los segundos: se incrementaban los

indeterminados y aparecían falsos positivos y, con ello, se reducía la especificidad de QFT-GIT¹⁹⁴. Por otro lado, en otro estudio que prolongaba el período de incubación hasta los 6 días (*6-day lymphocyte stimulation test*) encontraron un aumento de la sensibilidad, lo que, según los autores, guardaría relación con un incremento de la respuesta relacionada con las células T de memoria¹⁹⁵.

En nuestro estudio, en el caso de QuantiFERON TB Gold Plus, a partir de 88 muestras duplicadas en las que la incubación en cada una de las réplicas se prolongó hasta las 72h (tres veces más del tiempo recomendado), los resultados fueron idénticos en 87 de ellas y solamente en una se obtuvo un resultado discrepante. En ningún caso se encontraron diferencias en los resultados del tubo NIL, lo que evidencia que, en el caso de QTF, la incubación hasta 72h no parece inducir la liberación inespecífica de interferón gamma.

Sin embargo, en el caso de T-SPOT. TB, a partir de 48 muestras duplicadas en las que la incubación en una de las réplicas se prolongó hasta las 72h, los resultados fueron muy dispares, con un incremento significativo de resultados indeterminados por liberación inespecífica de interferón gamma en el pocillo control negativo, lo que, en el caso de T-SPOT.TB, desaconseja prolongar el período de incubación, al menos hasta las 72h.

Por otra parte, en T-SPOT.TB, se recomienda ajustar el número de células que se inoculan a 250.000 ± 50.000 por pocillo. Tras preparar diferentes réplicas en 150 muestras, encontramos una concordancia total en los resultados cuando el número final de células era de 2 a 7 veces superior al recomendado (entre 500.000-1.750.000 células), y que era a partir de inóculos superiores a 1.750.000 células cuando se incrementaban los resultados indeterminados y aparecían también falsos negativos. Con todo, en nuestra experiencia, en la mayoría de muestras clínicas, el número de células mononucleares recuperadas de la sangre periférica de los pacientes se encuentran comprendidas dentro del rango de seguridad y muy pocas veces superan recuentos tan elevados.

IGRA en Personal Sanitario

El chequeo periódico de infección tuberculosa en entornos de alto riesgo está indicado en poblaciones específicas, como es el caso del personal sanitario. Diferentes estudios han evaluado el uso de IGRA en este tipo de trabajadores^{196,197}. En los estudios llevados a cabo en entornos con una incidencia de TB baja y moderada, parece que la prevalencia de resultados IGRA positivo en personal sanitario es significativamente más baja que los registrados con la prueba de la tuberculina, si bien, en el caso de entornos de alta incidencia, no encontraron diferencias significativas entre las positividades de la prueba de la tuberculina y los IGRA. Por su parte, los IGRA mostraron una buena correlación con los factores de riesgo ocupacional de la exposición a la TB en entornos de baja y moderada incidencia, por lo que parece que, en el personal sanitario, el uso de IGRA en lugar de tuberculina reduciría el número de tratamientos preventivos innecesarios. En nuestro estudio, llevado a cabo exclusivamente con la versión QTF-Plus, destacaba el bajo índice de positividad evidenciado en el personal sanitario con edades por debajo de los 45 años, en los que la tasa de positividad IGRA fue del 8,06%, prácticamente igual a la registrada en la población general en los mismos tramos de edad (8,75%), mientras que la tasa de conversión IGRA era del 1,36%, algo más del doble de la tasa de conversiones identificada en la población general (0,57%, 81 casos sobre un total de 14.164 pacientes estudiados), si bien sigue siendo una cifra que puede considerarse como de bajo riesgo. En otros estudios llevados a cabo en personal sanitario de EE.UU¹⁹⁸, se han descrito altas tasas de conversiones y reversiones IGRA, resultando sorprendente la magnitud de las mismas, con cifras de conversiones del orden del 5 al 6%, y de reversiones del 20% e incluso del 60%, que los propios autores relacionan con resultados próximos al punto de corte o con falsos positivos porque, en cualquier caso, esas altas tasas de conversión IGRA no parecen compatibles con las bajas tasas actuales de incidencia de TB en EE.UU¹⁹⁹. Además, conviene tener presente que la interpretación de los resultados de las pruebas IGRA no es propensa a la subjetividad, por lo que habría que descartar otros factores que pudieran afectar a la reproducibilidad de las pruebas IGRA. Por otra parte, parece recomendable evitar las definiciones simplistas, o categóricas en el

caso de las conversiones, ya que podrían no ser suficientemente sólidas como para identificar de manera adecuada a las personas infectadas. Por este motivo, en EEUU, en el caso del personal sanitario, se han planteado bajar puntos de corte más estrictos, y emplear estrategias de reevaluación para minimizar las conversiones debidas a posibles falsos positivos.

IGRA y diagnóstico de tuberculosis activa

La tuberculosis activa en adultos no puede confirmarse ni descartarse a partir de los resultados de las pruebas IGRA, y tampoco nos permiten distinguir entre infección latente y enfermedad activa. Este hecho condiciona que, en los países con alta incidencia de tuberculosis, la especificidad de los IGRA para el diagnóstico de enfermedad activa siempre será baja^{200,201}. En un trabajo analizaron el rendimiento diagnóstico de QFT-GIT y T-SPOT.TB en adultos con tuberculosis pulmonar activa (sospecha o confirmada), en países de ingresos medios y bajos. En los pacientes infectados por el VIH, la sensibilidad era del 76% (45-92% T-SPOT.TB y 60% QFT). La especificidad de ambos IGRA era baja en todos los grupos estudiados (61% T-SPOT.TB y 52% QFT-GIT) y también en los infectados por el VIH (52% para T-SPOT y 50% para el ensayo QFT-GIT). Tampoco se demostró en dicho estudio que los IGRA fueran más sensibles que la tuberculina para el diagnóstico de tuberculosis activa. La OMS en 2011 desaconsejaba el uso de los IGRA y de la tuberculina para el diagnóstico de la tuberculosis activa²⁰². En otra publicación²⁰³ se estudiaba la utilidad de los IGRA y de la tuberculina para el diagnóstico de la tuberculosis extra-pulmonar, concluyendo que la especificidad era muy baja, especialmente en los países de ingresos bajos. Algunos estudios han evaluado el valor añadido que pudieran tener los IGRA en los algoritmos de diagnóstico de tuberculosis activa para estratificar el riesgo, junto con los datos clínicos y la radiología, a pesar de que los resultados evidencian que el valor de los IGRA para predecir el riesgo de desarrollar enfermedad activa era muy limitado, tanto en población adulta en entornos con alta y baja incidencia^{204,205,206} de tuberculosis, como en población infantil.²⁰⁷

En nuestra serie, se realizaron pruebas IGRA solamente a 96 enfermos de tuberculosis, los cuales representaban algo menos de la mitad de la totalidad

(237 pacientes), el motivo fue, exclusivamente, porque no se recibieron muestras del resto de pacientes. Es destacable que un 11,5% de enfermos tenían resultados IGRA persistentemente negativos lo que, en consonancia con la literatura publicada, pone en evidencia el valor limitado que tiene un resultado IGRA-negativo para excluir enfermedad tuberculosa.

Enfermos de tuberculosis QTF-Plus positivo, resultados individualizados de los tubos TB1 y TB2

Respecto a la contribución del segundo tubo de antígeno TB2 en la nueva versión de QTF-Plus, se había publicado en trabajos previos una mayor respuesta específica CD8+ asociada a tuberculosis activa¹⁸⁵ y a una mayor exposición a *M. tuberculosis* en el caso de estudios de contactos²⁰⁸. Incluso algunos autores establecieron un valor de corte (0,6 UI/mL) para considerar diferencias significativas en la liberación de IFN- γ entre TB1 y TB2, no achacables a la variabilidad intra-test¹⁶⁶. Con todo, en nuestra serie no hemos encontrado diferencias por encima de dicho valor de corte, aunque, globalmente, se observaron unos valores medios de IFN- γ superiores en el tubo TB2, pero dicha diferencia no fue estadísticamente significativa, ni tampoco pudo relacionarse con ningún grupo de población determinado. En otro estudio realizado sobre 317 pacientes inmunodeprimidos, encontraron una mayor respuesta IFN- γ en TB2 en candidatos a trasplante de órgano sólido, lo que, según los autores, podría suponer una mejora en la sensibilidad de QTF-Plus para dichos pacientes²⁰⁹; el grado de concordancia entre TB1 y TB2 observado, al igual que en nuestro estudio, era muy elevado.

IGRA y monitorización del tratamiento antituberculoso

En nuestro trabajo, solamente se hizo seguimiento con IGRA durante el tratamiento a un grupo muy reducido de pacientes, los 11 que habían sido IGRA negativo al diagnóstico de la enfermedad (2 convirtieron a positivos durante el tratamiento, el resto persistían como negativos) y a otros 21, cuyas muestras fueron recibidas aleatoriamente, y en los que no se observaron cambios significativos en las cifras de positividad, tampoco hubo reversiones. Desde un punto de vista teórico, la respuesta analizada en las pruebas IGRA

está relacionada con la carga bacilar y antigénica presente en el organismo²¹⁰; si aceptáramos esta premisa, entonces el tratamiento y la inherente disminución de la carga antigénica deberían provocar una disminución en la respuesta IGRA, lo que podría ser utilizado para el seguimiento del tratamiento. La cuestión, clínicamente relevante, es si los IGRA podrían emplearse para evaluar la respuesta al tratamiento o para predecir el fracaso o la recaída de la enfermedad. Existen varias publicaciones que han tratado de correlacionar los cambios en las respuestas de IFN-gamma en los IGRA con la respuesta al tratamiento^{211,212,213}. En uno de los estudios más amplios, Denkinger y cols²¹⁴, encontraron una disminución significativa en la respuesta de IFN-gamma a lo largo del tiempo, pero no una correlación significativa con el examen microscópico o la negativización de los cultivos. Otros trabajos se han centrado en el impacto del tratamiento de la infección tuberculosa y las respuestas IGRA: en un ensayo aleatorio²¹⁵, que estudió pacientes con infección tuberculosa tratados con isoniacida o placebo respectivamente, y que medía las respuestas de CFP-10 y ESAT-6 mediante el ensayo ELISPOT, al inicio y a los 1, 3 y 6 meses, concluyeron que, si bien hubo una disminución en las respuestas observadas a lo largo del tiempo, dicha reducción fue similar tanto en el grupo tratado con isoniacida como en el grupo tratado con placebo.

Valor predictivo de las pruebas IGRA para identificar riesgo de progresión a la enfermedad activa

Se ha publicado que los valores predictivos positivos y negativos de IGRA podrían ser más altos que los de la tuberculina para predecir el riesgo de desarrollar enfermedad activa en individuos no tratados, en particular entre las poblaciones de alto riesgo²¹⁶, sin embargo, el estudio presentaba limitaciones, ya que no tuvieron en cuenta que las duraciones del período de seguimiento eran diferentes entre pacientes y, por lo tanto, los valores predictivos estimados no se ajustaron para el número de años-persona de seguimiento. En un metaanálisis²¹⁷ que recoge quince estudios con un tamaño de muestra combinado de 26.680 participantes, la capacidad pronóstica de los IGRA se resumió en forma de tasas de incidencia y de riesgo para los estudios longitudinales incluidos en la revisión. Concluyeron que, durante el seguimiento

(mediana de 3 años), la mayoría de los individuos IGRA-positivos no progresaron a enfermedad activa, situación similar a la de los datos históricos de la prueba de la tuberculina²¹⁸. Entre los individuos con IGRA positivo, las tasas de incidencia oscilaron entre 3,7 y 84,5 por cada 1.000 personas/año de seguimiento, mientras que variaron de 2,0 a 32,0 por 1.000 personas/año para los individuos con IGRA negativo. Las tasas de incidencia más altas, tanto entre individuos IGRA positivos como IGRA negativos, se encontraron en estudios que monitorizaron a sujetos inmunocomprometidos, como gestantes infectadas con VIH, bebés expuestos al VIH y hombres con silicosis. Aunque la tasa de progresión de la enfermedad después de una presunta infección tuberculosa aumenta en las personas infectadas por el VIH, actualmente no hay datos que sugieran que el valor predictivo de los IGRA sea mejor o peor en esta subpoblación que en otras. Conviene recordar que la mayoría de los estudios longitudinales han evaluado el valor predictivo de un solo resultado IGRA transversal, pocos trabajos recogen el valor predictivo de una conversión IGRA²¹⁹. En un estudio llevado a cabo en una cohorte de adolescentes en Sudáfrica se concluye que la conversión reciente de QFT-GIT implicaba un incremento del riesgo de progresión a la enfermedad activa, durante los 2 años siguientes a la conversión, aproximadamente 8 veces superior al de los no convertidores. No obstante, incluso entre los QFT-GIT conversores, el riesgo general de enfermedad de la tuberculosis era bajo (1,46 casos por 100 personas/año). En general, los datos disponibles actualmente muestran que el valor predictivo de los IGRA para la progresión a la enfermedad activa es bajo y tampoco es significativamente más alto que el de la tuberculina. La información disponible sugiere que la mayoría de pacientes con resultado IGRA-positivo o tuberculina-positivo no progresan a enfermedad activa durante el seguimiento. La explicación podría deberse a que, como el riesgo general de progresión de infección latente a tuberculosis activa en ausencia de infección reciente o inmunosupresión grave es bajo (<5% de riesgo de por vida en población sana), incluso una prueba perfecta y precisa siempre tendría un valor predictivo bajo para medir el riesgo de progresión a tuberculosis activa. Conviene tener presente que el verdadero objetivo de la prueba de la tuberculina y de los IGRA no es otro que identificar a las personas que se beneficiarían de la terapia preventiva y que, además, el desarrollo posterior de tuberculosis activa será el

resultante de una combinación de eventos de reinfección/reactivación, sin poder descartar que la infección latente pudiera conferir cierta inmunidad protectora contra la infección repetida²²⁰. Los IGRA son pruebas mediadas por el sistema inmunitario, que es a la vez el responsable de producir un resultado IGRA positivo y de prevenir la progresión a enfermedad activa, teniendo esto en cuenta, los individuos IGRA-falsos negativos serían aquellos con mayor riesgo de reactivación. La sensibilidad y especificidad de los IGRA dependen de un número muy reducido de antígenos y este es uno de los motivos que los hace pruebas diagnósticas imperfectas, ya que podría ocurrir que los antígenos expresados por *M. tuberculosis* durante la latencia no se expresen durante la replicación activa. Como consecuencia de todo lo comentado, la respuesta de interferón, aunque importante, resulta insuficiente para resolver las incertidumbres diagnósticas de las diversas fases del espectro de la tuberculosis.

IGRA en niños

Los niños infectados tienen un alto riesgo de desarrollar tuberculosis activa, además, en ellos el diagnóstico de enfermedad activa siempre es más difícil, especialmente en los niños más pequeños, por la dificultad que entraña obtener muestras de esputo, y por la baja sensibilidad de las pruebas microbiológicas convencionales²²¹. Dos revisiones sistemáticas de IGRA en niños concluyeron que los resultados obtenidos con IGRA y tuberculina fueron similares^{222,223}. En los niños menores de 5 años la sensibilidad de todas las pruebas era más baja, al igual que ocurría en los infectados por el VIH. De la evidencia existente podemos concluir que, en la actualidad, el papel de los IGRA para el diagnóstico de tuberculosis activa en niños es de apoyo, junto con otros datos clínicos, por lo que se recomienda insistir en la medida de lo posible en la obtención de muestras clínicas representativas para llevar a cabo los estudios microbiológicos y moleculares habituales. En nuestra serie, la mayoría de estudios IGRA en menores de 14 años se realizaron en el contexto de estudio de contactos llevados a cabo en colegios en los que se habían diagnosticado casos de tuberculosis en alumnos y/o personal docente, y para los que se abrieron las correspondientes alertas sanitarias por parte del

Servicio de Vigilancia Epidemiológica del Principado de Asturias, y era muy inferior el número de estudios realizados en contextos de casos de tuberculosis en entornos familiares. Por todo ello, los resultados de las pruebas IGRA en niños recogidos en nuestra serie arrastran el sesgo propio de las características que, en su momento, rodearon a los diferentes casos índice y la amplitud de cada estudio de contactos. El índice de positividad detectado oscilaba entre el 3 y el 8%, con cifras de resultados indeterminados que, en el caso de T-SPOT.TB, superaban el 20%, constituyendo el grupo de edad con las cifras más altas de resultados IGRA-indeterminados, si bien QTF-Plus fue la prueba IGRA con la que se registraron menos resultados indeterminados. En algunos casos, la positividad de las pruebas IGRA fue utilizada para reforzar la decisión de instaurar tratamiento en aquellos niños que presentaban hallazgos clínicos y radiológicos compatibles en los que las pruebas diagnósticas convencionales no habían permitido confirmar enfermedad activa.

IGRA en personas VIH positivo

La evidencia actual sugiere que los IGRA se comportan de manera similar para identificar a las personas infectadas por el VIH con presunta infección latente. Ni la tuberculina ni los IGRA tienen una sensibilidad óptima que permita establecer el diagnóstico de enfermedad activa, lo que hace recomendable el uso combinado de ambas pruebas, especialmente en individuos con inmunodepresión severa²²⁴. En los estudios publicados sobre personas infectadas por el VIH con tuberculosis activa, las estimaciones de sensibilidad son heterogéneas, pero en general más altas para el ensayo T-SPOT.TB (72%) que para el ensayo QFT-GIT (61%) en países de ingresos bajos y medios. A pesar de ello, en ninguno de esos estudios los IGRA fueron consistentemente más sensibles que la tuberculina en las comparaciones directas²²⁵. Santín y cols. estiman que, en las personas infectadas con VIH²²⁶, las tasas de resultados IGRA-indeterminados eran del 8.2% para QFT-GIT y del 5.9% para T-SPOT.TB, aunque los porcentajes eran superiores en los pacientes con recuentos CD4+ <200 (11,6% QFT-GIT, 11,4% T-SPOT.TB) que en aquellos con recuentos CD4+ >200 (3,1% QFT-GIT y 7,9% T-SPOT.TB). En nuestro estudio, el porcentaje de pacientes VIH estudiados entre 2007 y 2018 oscilaba

entre el 3 y el 4%, T-SPOT.TB también fue la prueba IGRA más sensible, pero a la vez la que registraba un mayor número de resultados indeterminados, más del doble que con las dos versiones de QTF (GIT y Plus).

IGRA en la monitorización de las terapias biológicas en las enfermedades inflamatorias crónicas (IMID)

El diagnóstico de la infección tuberculosa en pacientes con IMID antes de instaurar terapias con agentes biológicos inmunomoduladores es una práctica establecida y cada vez más habitual, aunque la elección de la mejor estrategia y el algoritmo diagnóstico más recomendable siguen siendo objeto de controversia. La evidencia actual no permite concluir que los IGRA sean mejores que la tuberculina en la identificación de pacientes con IMID que podrían beneficiarse del tratamiento preventivo²²⁷. Hasta la fecha, no se han realizado estudios sobre el valor predictivo de IGRA para pacientes con IMID. Shahidi y cols. evaluaron el impacto de la terapia inmunosupresora en la proporción de resultados indeterminados y positividad de IGRA y tuberculina²²⁸ en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. El porcentaje combinado de resultados indeterminados fue del 5% para QFT-GIT y T-SPOT.TB. Los resultados positivos, tanto de QFT-GIT como de la tuberculina, se vieron afectados por la terapia inmunosupresora ($p=0,02$). En otro estudio prospectivo²²⁹, compararon tuberculina y QFT-GIT para el cribado de infección tuberculosa en pacientes con patologías reumatológicas que iniciaban el tratamiento con anti-TNF α . Obtuvieron un 6,5% de resultados QFT-indeterminados, con un porcentaje de resultados discordantes entre ambas pruebas del 33%, ningún paciente desarrolló tuberculosis activa durante una mediana de 18 meses de tratamiento con anti-TNF α . A pesar de ello, los autores consideraban que, antes de iniciar el tratamiento con antagonistas del TNF α , en regiones con prevalencia de tuberculosis moderada o alta y en pacientes con factores de riesgo añadidos, un IGRA es suficiente, si bien existe cierta evidencia de que una estrategia combinada tuberculina e IGRA mejora la sensibilidad²²⁷.

En nuestro estudio, desde la publicación de la normativa para el diagnóstico de la infección tuberculosa en Asturias, se recogen 9 casos de conversiones IGRA en pacientes con terapias biológicas (0,4%), en 4 de ellos (44%) la conversión

IGRA (T-SPOT.TB y QTF-Plus) fue seguida del desarrollo de enfermedad tuberculosa primaria. En dos pacientes se registraron valores ligeramente más altos en el tubo TB2 de QTF-Plus y en los otros dos en el tubo TB1 (con un resultado negativo en TB2 en uno de ellos, pero próximo al punto de corte).

Podemos concluir que todavía no disponemos de un método diagnóstico de la infección tuberculosa que pueda ser considerado *gold standard*, lo que tenemos son herramientas diagnósticas que miden la sensibilización del hospedador frente a antígenos tuberculosos específicos. Este es el caso de la clásica prueba de la tuberculina y de los IGRA, y hasta la fecha sabemos que ambas metodologías son razonablemente eficaces pero imperfectas. Por todo ello, y de acuerdo con los datos que se desprenden de nuestro trabajo, consideramos que en pacientes de riesgo es recomendable mantener una estrategia de utilización combinada de dos IGRA y tuberculina ya que mejora la sensibilidad diagnóstica, mientras que en población general QTF-Plus parece reunir los requisitos para ser la herramienta diagnóstica más recomendable, complementada en casos puntuales con T-SPOT.TB.

Por todo lo comentado, parecería razonable restringir el diagnóstico de la infección tuberculosa a aquellas personas con un riesgo incrementado de desarrollar tuberculosis activa, que a su vez serían las que se beneficiarían del tratamiento preventivo. Teniendo esto presente, la decisión de recurrir a estas pruebas diagnósticas debería implicar la voluntad de optar por la instauración de la quimioprofilaxis cuando el resultado sea positivo.

Finalmente, en lo que se refiere a las expectativas de cara al futuro, comentar que existen diferentes líneas de investigación en fase de desarrollo e incluso con experiencias ya recogidas en la literatura, como la prueba de tuberculina ESAT6 (C-Tb) que ha demostrado ser una técnica segura y con unas tasas de positividad similares a la prueba de tuberculina tradicional y al QTF en niños y pacientes infectados por el virus VIH; los nuevos biomarcadores²³⁰, como la detección de IP-10, una proteína que se eleva tras la infección por *M. tuberculosis*; las firmas de ARN que podrían diferenciar ITL y TB activa; y los estudios que se están llevando a cabo con las nuevas vacunas²³¹ para prevenir la TB con unos resultados preliminares esperanzadores.

CONCLUSIONES

- 1.- En Asturias se ha producido incremento importante y progresivo de la demanda diagnóstica de las pruebas IGRA, en su mayoría (69,5%) a partir de las personas con edades comprendidas entre los 25 y 64 años, con una distribución prácticamente idéntica entre hombres y mujeres. El mayor número de estudios se generó en el tramo de edad de 45-54 años.
- 2.- El porcentaje de infectados detectado por IGRA fue del 15,2% (sobre un total de más de 30.000 estudios realizados) cifra claramente inferior a 20-30% estimado por la OMS a nivel mundial.
- 3.- En lo que se refiere a la positividad IGRA por tramos de edad, aunque era esperable comprobar que se iba incrementando con la edad, resulta reseñable que con esta técnica el porcentaje de infectados en menores de 34 años no superara en ningún tramo el 10%. Por otra parte, el mayor número de indeterminados se registró en los tramos de edades extremas, y de manera especial (16,1%) en los menores de 14 años.
- 4.- Los resultados comparativos entre la versión QTF-GIT y T-SPOT.TB evidenciaron una concordancia del 82,16%, siendo T-SPOT.TB la técnica IGRA con un mayor número de positivos (15,69% vs. 13,09%) pero también de resultados indeterminados (9,62% vs. 5,81%). Por este motivo, consideramos que en pacientes de riesgo la utilización simultánea de ambos IGRA permitió alcanzar un resultado final positivo/negativo en el 98,2% de los pacientes y, lo que es más reseñable, 288 pacientes fueron positivos exclusivamente por uno de los dos IGRA (99 QTF y 189 T-SPOT.TB).
- 5.- En lo que se refiere a la comparación de resultados entre la nueva versión QTF-Plus y T-SPOT.TB la concordancia alcanzó el 89,36% (un 7,2% superior a registrada con la versión QTF-GIT), manteniéndose T-SPOT.TB como la técnica IGRA con un mayor número de positivos (18% vs. 16,77%) pero también de resultados indeterminados (3,82% vs. 1,93%). En pacientes de riesgo, estos resultados también avalan la utilización simultánea de ambos IGRA ya que permitió alcanzar un resultado final positivo/negativo en el 99,55% de los pacientes y diagnosticar 209 positivos más a expensas solamente de uno de los dos IGRA (85 QTF y 124 T-SPOT.TB).

6.- Respecto a las lecturas individualizadas de los tubos TB1 y TB2 de la nueva versión QTF-Plus, cuando los rangos de lectura eran inferiores a 0,11 o superiores a 0,46 las lecturas fueron muy similares y no solían afectar a la interpretación final de la prueba. Las discrepancias se encontraron en los rangos de lectura comprendidos entre 0,12 y 0,45 muy próximos al punto de corte (0,35), donde en un 10,3% de los casos se registraron resultados positivos a expensas solamente de uno de los dos tubos, (44,6% solo TB1 y 55,4% solo TB2).

7.- En el caso de las lecturas individualizadas de los antígenos ESAT-6 y CFP-10 de T-SPOT.TB, las coincidencias fueron máximas por encima de 30 *spots* en cualquiera de los pocillos, pero, a partir de ese umbral los recuentos de *spots* podían diferir bastante. En conjunto, se registraron más positivos con CFP-10 que con ESAT-6. En un 18% de los casos el resultado positivo fue a expensas de uno de los dos pocillos (48,3% solo ESAT-6 y 51,7% solo CFP-10) y que, de forma mayoritaria, coincidía con recuentos bajos (entre 8-20 *spots*).

8.- En muestras positivas simultáneamente por QTF-Plus y T-SPOT.TB se evidenció una correlación entre los valores cuantitativos obtenidos con cada IGRA. Aquellos resultados de T-SPOT.TB con un número de *spots* (en panel A y/o B) comprendido entre 8 y 30 se correlacionaban en el 100% de los casos con lecturas de QTF-Plus comprendidas entre 0,35-1 UI/mL y en un 52,38% con los que tenían lecturas entre 1,01-5 UI/mL, pero no había ningún caso con lecturas ≥ 5 UI/mL). En el caso de los resultados de T-SPOT. TB con un número de *spots* (en panel A y/o B) >30 *spots* se correlacionaban en un 47,62% con lecturas de QTF-Plus comprendidas entre 1,01-5 UI/m, pero alcanzaba el 100% en el caso de lecturas ≥ 5 UI/mL.

9.- En el caso de QTF, la extensión del período de incubación hasta las 72h no inducía la liberación inespecífica de interferón gamma, lo que permitía una interpretación correcta de los resultados en el 98,8% de las muestras.

10.- En el caso de T-SPOT.TB la extensión del período de incubación hasta las 72h incrementaba significativamente el número de resultados indeterminados y también de falsos negativos.

11.- El ajuste del número de células recomendado por el fabricante para la fase de incubación en T-SPOT.TB (250.000 células) no resultó crítico ni alteró ninguno de los resultados cuando el exceso de células estaba comprendido en un rango de 2 a 7 veces el recomendado (500.000 -1.750.000 células), lo que le confiere gran robustez y flexibilidad.

12.- El índice de positividad IGRA evidenciado en el personal sanitario con edades por debajo de los 45 años fue del 8,06% prácticamente igual a la registrada en la población general, mientras que la tasa de conversión IGRA era del 1,36%, algo más del doble de la tasa de conversiones identificada en la población general (0,57%), si bien es una cifra que puede considerarse como de bajo riesgo.

13.- Es destacable que un 11,5% de enfermos de tuberculosis presentaban resultados IGRA persistentemente negativos lo que, en consonancia con la literatura publicada, pone en evidencia el valor limitado que tiene un resultado IGRA-negativo para excluir enfermedad tuberculosa.

14.- En enfermos de tuberculosis no hemos encontrado diferencias significativas entre las lecturas del tubo TB1 y TB2 de QTF-Plus, aunque, globalmente, se observaron unos valores medios de IFN- γ superiores en el tubo TB2.

15.- La monitorización IGRA durante el tratamiento se llevó a cabo en un grupo muy reducido de pacientes, los 11 que habían sido IGRA negativo al diagnóstico de la enfermedad (2 convirtieron a positivos durante el tratamiento, el resto persistían como negativos) y a otros 21, cuyas muestras fueron recibidas aleatoriamente, pero en ningún caso se observaron cambios significativos en las cifras de positividad, y tampoco hubo reversiones.

16.- IGRA en niños: El índice de positividad detectado oscilaba entre el 3 y el 8% con cifras de resultados indeterminados que en el caso de T-SPOT.TB superaban el 20%, constituyendo el grupo de edad con las cifras más altas de resultados IGRA-indeterminados, si bien QTF-Plus fue la prueba IGRA que más a menudo permitió alcanzar un resultado final positivo o negativo.

17.- IGRA en personas VIH positivo: la positividad IGRA oscilaba entre el 3 y el 4%, T-SPOT.TB también fue la prueba IGRA más sensible, pero a la vez la que registró un mayor número de resultados indeterminados, más del doble que con las dos versiones de QTF (GIT y Plus).

18.- IGRA en pacientes con terapias biológicas: Se identificaron 9 casos de conversiones IGRA en pacientes con terapias biológicas (0,4%), en 4 de ellos (44%) la conversión IGRA (T-SPOT.TB y QTF-Plus) fue seguida del desarrollo de enfermedad tuberculosa primaria. Lo que evidencia la importancia de un seguimiento adecuado de estos pacientes.

19.- De acuerdo con los datos que se desprenden de nuestro trabajo, consideramos que en pacientes de riesgo es recomendable mantener una estrategia de utilización combinada de dos IGRA y tuberculina ya que mejora la sensibilidad diagnóstica, mientras que en población general QTF-Plus parece reunir los requisitos para ser la herramienta diagnóstica más recomendable, complementada en casos puntuales con T-SPOT.TB.

BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization, Global tuberculosis report. Geneva Switzerland. 2018. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/
2. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2016. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2016.
<https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2016.pdf>
3. Resultados de la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmisibles. informe anual. año 2016. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica Instituto de Salud Carlos III Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades.
<http://gesdoc.isciii.es/gesdoccontroller?action=download&id=25/01/2019-d8ee271b6f>
4. Zumla A, Malon P, Henderson J, Grange JM. Impact of VIH infection on tuberculosis. Postgraduate Medical Journal. 2000 May; 76(895): 259-268 doi:10.1136/pmj.76.895.259
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1741590/pdf/v076p00259.pdf>
5. de March Ayuela P, García González A. [Tuberculosis and AIDS 15 years later (1981-1996): new perspectives]. Med Clin (Barc). 1998 Nov 14;111(16):628-34 PMID: 9881338.
https://www.researchgate.net/scientific-contributions/66287064_P_de_March_Ayuela
6. Rieder HL. Epidemiologic basis of tuberculosis. International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 1999
https://www.theunion.org/what-we-do/publications/english/pub_epidemiologic_basis_eng.pdf
7. Seale P. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD)--20th Eastern Region conference. 4-7 June 1999, Wanchai, Hong Kong. IDrugs. 1999 Aug;2(8):763-4. PMID: 16127650
https://www.researchgate.net/publication/7632542_International_Union_Against_Tuberculosis_and_Lung_Disease_IUATLD--20th_Eastern_Region_conference_4-7_June_1999_Wanchai_Hong_Kong
8. Khan K, Muennig P, Behta M, Zivin JG. Global drug-resistance patterns and the management of latent tuberculosis infection in immigrants to the United States. N Engl J Med. 2002 Dec 5;347(23):1850-9. doi: 10.1056/NEJMsa021099
https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMsa021099?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
9. Carmona O, Gómez MJ, Montes T, Marcano C y Mariño F. Microbiología Médica de Divo.5a. Ed. McGraw-Hill.Interamericana, Caracas 1997 ISBN: 9701011600 ISBN-13: 9789701011607.
10. Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev Infect Dis 1989;11 Suppl 2:420-430 Brennan PJ. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. Rev Infect Dis. 1989 Mar-

- Apr;11 Suppl 2:S420-30. doi: 10.1093/clinids/11.supplement_2.s420.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2469120>
11. Steck PA, Schwartz BA, Rosendahl MS, Gray GR. Mycolic acids. A reinvestigation. *J Biol Chem.* 1978 Aug 25;253(16):5625-9. PubMed [citation] PMID: 97301. <http://www.jbc.org/content/253/16/5625.long>
 12. Lázaro MT, Prados C, García Río F, Alvarez-Sala R, Gómez L, Casadevall J, García-Satué JL, Villamor J. [Tubercular disease and its treatment]. *Rev Clin Esp.* 1995 Feb;195(2):109-14. PMID: 7732179. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7732179>
 13. Collins HL, Kaufmann SH. The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology.* 2001 May;103(1):1-9. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01236.x. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1783212/>
 14. Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(5):571-7. doi: 10.1172/JCI15217 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150901/?report=reader>
 15. Ganz T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):693-7. DOI: 10.1172/JCI15218. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150915/>
 16. Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii54-8. doi: 10.1136/ard.61.suppl_2.ii54 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1766701/pdf/v061p0ii54.pdf>
 17. Lehrer RI, Ganz T. Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol.* 2002 Feb;14(1):96-102. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(01\)00303-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(01)00303-X)
 18. McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):707-12. doi: 10.1172/JCI15293. <https://www.jci.org/articles/view/15293>
 19. Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3565-73. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3565. <https://www.jimmunol.org/content/169/7/3565.long>
 20. Weikert LF, Lopez JP, Abdolrasulnia R, Chroneos ZC, Shepherd VL. Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Aug;279(2):L216-23. doi: 10.1152/ajplung.2000.279.2.L216 <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.2.L216>
 21. Ansel KM, Harris RB, Cyster JG. CXCL13 is required for B1 cell homing, natural antibody production, and body cavity immunity. *Immunity.* 2002 Jan;16(1):67-76. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00257-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00257-6)
 22. Schlesinger, LS. 1998. Mycobacterium tuberculosis and the complement system. *Trends Microbiol.* 6:47-49 Schlesinger LS. Mycobacterium tuberculosis and the complement system. *Trends Microbiol.* 1998 Feb;6(2):47-9; discussion 49-50. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01203-1. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01203-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01203-1)

23. Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1277-81. PMID: 9529042, PMCID: PMC108049. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108049/>
24. Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, Legres L, Dreher D, Nicod LP, Gluckman JC, Lagrange PH, Gicquel B, Neyrolles O. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Jan 6;197(1):121-7. doi: 10.1084/jem.20021468 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193794/>
25. Schorey JS, Carroll MC, Brown EJ. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*. 1997 Aug 22;277(5329):1091-3. doi: 10.1126/science.277.5329.1091 <https://science.sciencemag.org/content/277/5329/1091.long>
26. Natarajan K, Kundu M, Sharma P, Basu J. Innate immune responses to M. tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011 Sep;91(5):427-31. doi: 10.1016/j.tube.2011.04.003. Epub 2011 May 7. DOI: 10.1016/j.tube.2011.04.003 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.003>
27. Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. *Cell Host Microbe*. 2008 Jun 12;3(6):352-63. doi: 10.1016/j.chom.2008.05.003 <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.05.003>
28. Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytokine*. 2010 Mar;49(3):237-44. doi: 10.1016/j.cyto.2009.01.009. Epub 2009 Mar 4. doi: 10.1016/j.cyto.2009.01.009 <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.01.009>
29. López M, Sly LM, Luu Y, Young D, Cooper H, Reiner NE. The 19-kDa Mycobacterium tuberculosis protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2409-16. DOI: 10.4049/jimmunol.170.5.2409 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.5.2409>
30. Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun*. 2002 Mar;70(3):1033-41. doi: 10.1128/iai.70.3.1033-1041.2002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127779/>
31. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004 Oct;5(10):987-95. doi: 10.1038/ni1112 <https://www.nature.com/articles/ni1112>
32. Leemans JC, Florquin S, Heikens M, Pals ST, van der Neut R, Van Der Poll T. CD44 is a macrophage binding site for Mycobacterium tuberculosis that mediates macrophage recruitment and protective immunity against tuberculosis. *J Clin Invest*. 2003 Mar;111(5):681-9. doi: 10.1172/JCI16936 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC151898/>
33. van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002 Apr;15(2):294-309. doi: 10.1128/cmr.15.2.294-309.2002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC118070/>
34. Besra GS, Chatterjee J. Lipids and carbohydrates of Mycobacterium tuberculosis. In: Bloom BR. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. ASM Press;1994:285-306. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555818357>

35. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994 Feb 4;263(5147):678-81. Erratum in: *Science* 1994 Mar 11;263(5152):1359. doi: 10.1126/science.8303277 <https://science.sciencemag.org/content/263/5147/678.long>
36. Ernest JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 1998 Apr;66(4):1277-81. PMID: 9529042 PMCID: PMC108049 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108049/>
37. Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*. 1996 Mar;64(3):683-90. PMID: 8641767, PMCID: PMC173823. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173823/>
38. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011 Jul 2;378(9785):57-72. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62173-3. Epub 2011 Mar 21. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62173-3 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62173-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62173-3)
39. Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM, Nawroly N, Packe GE, Davidson RN, Griffiths CJ, Wilkinson RJ. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1988-94. doi: 10.1172/JCI31097 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904316/>
40. Vankayalapati R, Klucar P, Wizel B, Weis SE, Samten B, Safi H, Shams H, Barnes PF. NK cells regulate CD8+ T cell effector function in response to an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):130-7. doi: 10.4049/jimmunol.172.1.130 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.130>
41. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. Mycobacterium tuberculosis: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*. 2012 Mar;217(3):363-74. Epub 2011 Jul 18. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.008 <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.008>
42. Vankayalapati R, Barnes PF. Innate and adaptive immune responses to human Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2009 Dec;89 Suppl 1:S77-80. doi: 10.1016/S1472-9792(09)70018-6 [https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(09\)70018-6](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(09)70018-6)
43. Prezzemolo T, Guggino G, La Manna MP, Di Liberto D, Dieli F, Caccamo N. Functional Signatures of Human CD4 and CD8 T Cell Responses to Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol*. 2014 Apr 22;5:180. doi: 10.3389/fimmu.2014.00180 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4001014/?report=reader>
44. Reiling N, Hölscher C, Fehrenbach A, Kröger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 2002 Oct 1;169(7):3480-4. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3480 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3480>
45. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:593-623. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.593>
46. Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol*. 1999 Sep;7(9):366-72. Review. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01567-X](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01567-X)

47. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest.* 2002 Mar;109(6):699-705. doi: 10.1172/JCI15277 <https://www.jci.org/articles/view/15277>
48. Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Mar;157(3 Pt 1):729-35. doi: 10.1164/ajrccm.157.3.9705044 <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9705044>
49. López-Hernández, C. 2001. Efecto de *Mycobacterium tuberculosis* y sus fracciones en la producción de citocinas. Tesis de Licenciatura. U. A. Chiapas (Chiapas, México).
50. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med.* 1975 Jul 1;142(1):1-16. doi:10.1084/jem.142.1.1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2189870/pdf/je14211.pdf>
51. Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 1997 May 16;272(20):13326-31. doi: 10.1074/jbc.272.20.13326 <http://www.jbc.org/content/272/20/13326.long>
52. Kyei GB, Vergne I, Chua J, Roberts E, Harris J, Junutula JR, Deretic V. Rab14 is critical for maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *EMBO J.* 2006 Nov 15;25(22):5250-9. Epub 2006 Nov 2. doi: 10.1038/sj.emboj.7601407 <https://www.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601407>
53. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med.* 1992 Apr 1;175(4):1111-22. doi: 10.1084/jem.175.4.1111 <http://jem.rupress.org/content/175/4/1111.long>
54. Wolf AJ, Desvignes L, Linas B, Banaiee N, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. Initiation of the adaptive immune response to *Mycobacterium tuberculosis* depends on antigen production in the local lymph node, not the lungs. *J Exp Med.* 2008 Jan 21;205(1):105-15. Epub 2007 Dec 24. doi: 10.1084/jem.20071367 <http://jem.rupress.org/content/205/1/105.long>
55. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb).* 2004;84:93-101. Flynn JL. Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development. *Tuberculosis (Edinb).* 2004;84(1-2):93-101. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.93 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2003.08.010>
56. Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to an ongoing host-pathogen relationship. *Clin Immunol.* 2004 Nov;113(2):130-6. doi: 10.1016/j.clim.2004.08.012 <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.08.012>
57. Cooper AM. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:393-422. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132703 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4298253/>

58. Mahon RN, Rojas RE, Fulton SA, Franko JL, Harding CV, Boom WH. Mycobacterium tuberculosis cell wall glycolipids directly inhibit CD4+ T-cell activation by interfering with proximal T-cell-receptor signaling. *Infect Immun*. 2009 Oct;77(10):4574-83. Epub 2009 Aug 3. doi: 10.1128/IAI.00222-09.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2747961/>
59. Mahan CS, Walusimbi M, Johnson DF, et al. Tuberculosis treatment in VIH infected Ugandans with CD4 counts >350 cells/mm reduces immune activation with no effect on VIH load or CD4 count. *PLoS One*. 2010;5(2):e9138. Published 2010 Feb 22. doi:10.1371/journal.pone.0009138
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2825253/?report=reader>
60. Lancioni CL, Mahan CS, Johnson DF, Walusimbi M, Chervenak KA, Nalukwago S, Charlebois E, Havlir D, Mayanja-Kizza H, Whalen CC, Boom WH. Effects of antiretroviral therapy on immune function of VIH-infected adults with pulmonary tuberculosis and CD4+ >350 cells/mm³. *J Infect Dis*. 2011 Apr 1;203(7):992-1001. doi: 10.1093/infdis/jiq141
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068037/>
61. Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:353-84. Epub 2011 Oct 31. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132458. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011811-132458>
62. Buhtoiarov IN, Lum H, Berke G, Paulnock DM, Sondel PM, Rakhmilevich AL. CD40 ligation activates murine macrophages via an IFN-gamma-dependent mechanism resulting in tumor cell destruction in vitro. *J Immunol*. 2005 May 15;174(10):6013-22. doi: 10.4049/jimmunol.174.10.6013.
<https://www.jimmunol.org/content/174/10/6013.long>
63. Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology*. 1990 Jul;22(3):153-5. PMID: 2243727.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243727>
64. Fulton SA, Johnsen JM, Wolf SF, Sieburth DS, Boom WH. Interleukin-12 production by human monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis: role of phagocytosis. *Infect Immun*. 1996 Jul;64(7):2523-31. PMID: 8698475, PMCID: PMC174106.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174106/pdf/642523.pdf>
65. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.749.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>
66. Sodhi A, Gong J, Silva C, Qian D, Barnes PF. Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 1997 Sep;25(3):617-20. doi: 10.1086/513769
<https://doi.org/10.1086/513769>
67. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, Gong J, Barnes PF. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun*. 1996 Apr;64(4):1351-6. PMID: 8606100, PMCID: PMC173925.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173925/>
68. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, Gong J, Abrams JS, Barnes PF. T-cell cytokine responses in human infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect*

- Immun. 1995 Aug;63(8):3231-4. PubMed [citation] PMID: 7622255, PMCID: PMC173444.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173444/pdf/633231.pdf>
- 69.Randhawa PS. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology* 1990; 22: 153-5. PMID: 2243727
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2243727>
- 70.Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, Helden Pv Pv, Lukey PT, Duncan K. In situ detection of Mycobacterium tuberculosis transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infect Immun.* 2002 Nov;70(11):6330-8. doi: 10.1128/iai.70.11.6330-6338.2002
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC130373/>
- 71.Roberts L, McColl GJ. Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med J.* 2004 Dec;34(12):687-93. doi: 10.1111/j.1445-5994.2004.00710.x.
<https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2004.00710.x>
- 72.Dimakou K, Papaioannides D, Latsi P, Katsimboula S, Korantzopoulos P, Orphanidou D. Disseminated tuberculosis complicating anti-TNF-alpha treatment. *Int J Clin Pract.* 2004 Nov;58(11):1052-5.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2004.00061.x>
- 73.Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol.* 2001 Aug;13(4):417-28. Review.
[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00236-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00236-3)
- 74.Ghon A. The primary complex in human tuberculosis and its significance. *Am Rev Tuberc* 1923;7:314-7.
<https://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/art.1923.7.5.314>
- 75.Subbian S, Tsenova L, Yang G, O'Brien P, Parsons S, Peixoto B, Taylor L, Fallows D, Kaplan G. Chronic pulmonary cavitary tuberculosis in rabbits: a failed host immune response. *Open Biol.* 2011 Dec;1(4):110016. doi: 10.1098/rsob.110016.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3352086/?report=reader>
- 76.Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012 Apr 20;12(5):352-66. doi: 10.1038/nri3211.
<https://www.nature.com/articles/nri3211>
- 77.Kisich KO, Higgins M, Diamond G, Heifets L. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of Mycobacterium tuberculosis by human neutrophils. *Infect Immun.* 2002 Aug;70(8):4591-9. doi: 10.1128/iai.70.8.4591-4599.2002 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128192/>
- 78.Toossi Z. Cytokine circuits in tuberculosis. *Infect Agents Dis.* 1996 Mar;5(2):98-107. PMID: 8721046
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8721046>
- 79.Poveda F, Camacho J, Arnalich F, Codoceo R, del Arco A, Martínez-Hernández P. Circulating cytokine concentrations in tuberculosis and other chronic bacterial infections. *Infection.* 1999;27(4-5):272-4.
<https://doi.org/10.1007/s150100050028>
- 80.Appelberg R, Castro AG, Pedrosa J, Minóprio P. Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology.* 1994 Jul;82(3):361-4. PMID: 7959868, PMCID:PMC1414867
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1414867/>

81. Bermudez LE, Young LS. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J Immunol*. 1988 May 1;140(9):3006-13. PMID: 2834450 <https://www.jimmunol.org/content/140/9/3006.long>
82. Champisi J, Young LS, Bermudez LE. Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection. *Immunology*. 1995 Apr;84(4):549-PMID: 7790028, PMCID: PMC1415166 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1415166/>
83. Dunlap, N.E.; Briles, D.E. Immunology of tuberculosis. *Med. Clin. N. Am.* 1993, 77, 1235–1251. [CrossRef] Dunlap NE, Briles DE. Immunology of tuberculosis. *Med Clin North Am.* 1993 Nov;77(6):1235-51. doi: 10.1016/s0025-7125(16)30190-0 [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30190-0](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30190-0)
84. Falcone V, Bassey EB, Toniolo A, Conaldi PG, Collins FM. Differential release of tumor necrosis factor-alpha from murine peritoneal macrophages stimulated with virulent and avirulent species of mycobacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1994 Mar;8(3):225-32. doi: 10.1111/j.1574-695X.1994.tb00447.x <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8004059>
85. Fiorenza G, Bottasso OA, Rateni L, Farroni MA, Dlugovitzky D. Impaired neutrophil function in patients with pulmonary tuberculosis and its normalization in those undergoing specific treatment, except the VIH-coinfected cases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003 Mar 20;35(2):159-64. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00004-X [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00004-X)
86. Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez ML, Orozco H, Rook G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *Eur J Immunol*. 2004 Jan;34(1):174-83. doi: 10.1002/eji.200324253 <https://doi.org/10.1002/eji.200324253>
87. Kaufmann SH. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis*. 2004 Nov;63 Suppl 2:ii50-ii56. doi: 10.1136/ard.2004.028258 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1766775/>
88. Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):679-91. doi: 10.1164/ajrccm.157.3.9708002. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.157.3.9708002>
89. Natarajan K, Kundu M, Sharma P, Basu J. Innate immune responses to *M. tuberculosis* infection. *Tuberculosis* 2011; 91:427-431. doi: 10.1016/j.tube.2011.04.003 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2011.04.003>
90. Bafica A, Aliberti J, Mechanisms of host protection and pathogen evasion of immune responses during tuberculosis, in Aliberti J (Ed), *Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases*, doi 10.1007/978-1-4614-04842_2, Springer Science+Business Media, LLC 2012.
91. Amberson JB. The significance of latent forms of tuberculosis. *N Engl J Med* 1938; 219:572-6. doi: 10.1056/NEJM193810132191504 <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM193810132191504>

92. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1133-41. Epub 2005 Oct 2. doi: 10.1038/ni1261 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1618871/>
93. Moure González R. Detección rápida de Mycobacterium tuberculosis complex y de la Resistencia a los fármacos antituberculosos mediante métodos de amplificación genética e hibridación. Tesis doctoral. Programa de Biomedicina. Universitat de Barcelona 2009; 32-34.
94. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection*. 2009 Apr;37(2):80-6. Epub 2009 Mar 23. doi: 10.1007/s15010-008-8087-y <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs15010-008-8087-y>
95. Arend SM, Engelhard AC, Groot G, de Boer K, Andersen P, Ottenhoff TH, van Dissel JT. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Nov;8(6):1089-96. doi: 10.1128/CDLI.8.6.1089-1096.2001 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC96231/?report=reader>
96. Pai M, Denking 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. doi: 10.1128/CMR.00034-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3910908/>
97. Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS. Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection. *Eur Respir J*. 2006 Jul;28(1):24-30. Epub 2006 Apr 12. doi: 10.1183/09031936.06.00016906 <https://erj.ersjournals.com/content/28/1/24.long>
98. Finucane TE. The American Geriatrics Society statement on two-step PPD testing for nursing home patients on admission. *J Am Geriatr Soc*. 1988 Jan;36(1):77-8. doi: 10.1111/j.1532-5415.1988.tb03438.x <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1988.tb03438.x>
99. Rodríguez M, Richaud C. Granuloma facial a propósito de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2001;10:147-150. <https://www.medigraphic.com/pdfs/derma/cd-2001/cd013g.pdf>
100. Menzies D. Tuberculin skin testing. In: *Tuberculosis: A Comprehensive International Approach. Lung Biology in Health and Disease*, Vol. 144, 2nd edn: Lee B. Reichman and Earl S. Hershfield, Eds. Marcel Dekker Inc., New York, USA, 2000. ISBN 0-8247-8121 p. 279–322.
101. Torres AL. Intradermorreacciones en dermatología. Tesis Centro Dermatológico Pascua. México 1984.
102. Strass M. Pruebas cutáneas diagnósticas en alergia e inmunología. *Educación Médica Continua*. Pronai 2002.
103. Comín E. La prueba de la tuberculina. *FMC* 2003;10:492-4.
104. Rodríguez M. Resultados de la prueba de PPD en el Instituto Nacional de Pediatría. *Acta Pediatr Mex* 1999;20:299-303.

105. Moreno-Perez D, Andres Martin A, Altet Gomez N, et al. [Diagnosis of tuberculosis in pediatrics. Consensus document of the Spanish Society of Pediatric Infectology (SEIP) and the Spanish Society of Pediatric Pneumology (SENP)]. *An Pediatr (Barc)* 2010;73:143 e1- 14. doi: 10.1016/j.anpedi.2009.12.017
<https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2009.12.017>
106. Tuberculina PPD RT 23 SSI para la prueba de Mantoux, Statens Serum Institut, Artillerivej 5, DK-2300 Copenhagen S
107. González-Martín J, García-García JM, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz-Manzano J. Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Arch Bronconeumol.* 2010 May;46(5):255-74. Epub 2010 May 5. doi: 10.1016/j.arbres.2010.02.010 <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.02.006>
108. Arias Guillén M. Advances in the diagnosis of tuberculosis infection. *Arch Bronconeumol.* 2011 Oct;47(10):521-30. doi: 10.1016/j.arbres.2011.06.018. Epub 2011 Sep 7. Review. English, Spanish. doi: 10.1016/j.arbres.2011.06.018
<https://doi.org/10.1016/j.arbres.2011.06.018>
109. Al Zahrani K, Al Jahdali H, Menzies D. Does size matter? Utility of size of tuberculin reactions for the diagnosis of mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Oct;162(4 Pt 1):1419-22. doi: 10.1164/ajrccm.162.4.9912048
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.4.9912048>
110. Caminero Luna JA, Casal Román M, Ausina Ruiz V, Pina Gutiérrez JM, Sauret Valet J. Tuberculosis diagnosis. *Arch Bronconeumol.* 1996 Feb;32(2):85-99 [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(15\)30816-4](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(15)30816-4)
111. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jan;159(1):15-21. doi: 10.1164/ajrccm.159.1.9801120
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.159.1.9801120>
112. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. American Thoracic Society. *MMWR Recomm Rep.* 2000 Jun 9;49(RR-6):1-51. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr4906a1.htm>
113. Taylor Z, O'Brien RJ. Tuberculosis elimination: are we willing to pay the price? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1–2 Taylor Z, O'Brien RJ. Tuberculosis elimination: are we willing to pay the price? *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jan;163(1):1-2. doi: 10.1164/ajrccm.163.1.ed1400a
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.1.ed1400a>
114. Food and Drug Administration. QuantiFERON-TB Gold In-Tube - P010033/S011
<http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/DeviceApprovalsandClearances/PMAApprovals/ucm106548.htm>
115. Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Mar;163(4):824-8. doi: 10.1164/ajrccm.163.4.2009100
<https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.4.2009100>
116. Pai M, Riley LW, Colford JM Jr. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis*

- 2004;4:761–776. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01206-X
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01206-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01206-X)
117. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*. 1998 Nov;144 (Pt 11):3195-203. doi: 10.1099/00221287-144-11-3195
<https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3195>
118. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet*. 2000 Sep 23;356(9235):1099-104. Review. PubMed [citation] PMID: 11009160 DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02742-2 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02742-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02742-2)
119. Arend SM, Geluk A, van Meijgaarden KE, van Dissel JT, Theisen M, Andersen P, Ottenhoff TH. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. *Infect Immun*. 2000 Jun;68(6):3314-21. doi: 10.1128/iai.68.6.3314-3321.2000
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC97589/>
120. Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR Jr, Alexander LN, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to Mycobacterium avium complex and those with pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999 Jul;6(4):606-9. PubMed [citation] PMID: 10391871, PMID: PMC95736
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC95736/>
121. Oxford Immunotec Limited. T-SPOT.TB [U.K. package insert].
<http://www.oxfordimmunotec.com/96-UK>.
122. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, Janse van Rensburg E, Stone L, O'rie T, Pienaar B, de Kock M, Kaplan G, Mahomed H, Dheda K, Hanekom WA. Functional capacity of Mycobacterium tuberculosis-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J Immunol*. 2011 Sep 1;187(5):2222-32. Epub 2011 Jul 20. doi:10.4049/jimmunol.1101122
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3159795/>
123. Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, Idrizi E, Day CL, Perreau M, Lazor-Blanchet C, Petruccioli E, Hanekom W, Goletti D, Bart PA, Nicod L, Pantaleo G, Harari A. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur J Immunol*. 2013 Jun;43(6):1568-77. doi: 10.1002/eji.201243262.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535091/>
124. Nikolova M, Markova R, Drenska R, Muhtarova M, Todorova Y, Dimitrov V, Taskov H, Saltini C, Amicosante M. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Mar;75(3):277-81.. Epub 2012 Dec 28. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.023
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.023>
125. Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, Cuzzi G, Pinnetti C, Sampaolesi A, Antinori A, Girardi E, Goletti D. Polyfunctional T-cells and effector memory phenotype are associated with active TB in VIH-infected patients. *J Infect*.

- 2014 Dec;69(6):533-45. Epub 2014 Jun 26. doi: 10.1016/j.jinf.2014.06.009
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.009>
126. Ongaya A, Huante MB, Mwangi P, Keiser PH, Amukoye E, Endsley JJ. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cell recall in convalescing TB subjects with VIH co-infection. *Tuberculosis (Edinb)*. 2013 Dec;93 Suppl:S60-5. doi: 10.1016/S1472-9792(13)70012-X.
[https://doi.org/10.1016/S1472-9792\(13\)70012-X](https://doi.org/10.1016/S1472-9792(13)70012-X)
127. Lancioni C, Nyendak M, Kiguli S, Zalwango S, Mori T, Mayanja-Kizza H, Balyejusa S, Null M, Baseke J, Mulindwa D, Byrd L, Swarbrick G, Scott C, Johnson DF, Malone L, Mudido-Musoke P, Boom WH, Lewinsohn DM, Lewinsohn DA; Tuberculosis Research Unit. CD8+ T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Jan 15;185(2):206-12. Epub 2011 Oct 27. doi: 10.1164/rccm.201107-1355OC
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297089/>
128. Tuberculosis: Clinical Diagnosis and Management of Tuberculosis, and Measures for Its Prevention and Control. National Collaborating Centre for Chronic Conditions (UK), Centre for Clinical Practice at NICE (UK). London: National Institute for Health and Clinical Excellence (UK); 2011 Mar. PMID: 22720337 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK97852/>
129. Bamford AR, Crook AM, Clark JE, Nademi Z, Dixon G, Paton JY, Riddell A, Drobniewski F, Riordan A, Anderson ST, Williams A, Walters S, Kampmann B. Comparison of interferon-gamma release assays and tuberculin skin test in predicting active tuberculosis (TB) in children in the UK: a paediatric TB network study. *Arch Dis Child*. 2010 Mar;95(3):180-6. Epub 2009 Oct 8. PubMed [citation] PMID: 19815937 doi:10.1136/adc.2009.169805. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.2009.169805>
130. Donald PR. Childhood tuberculosis: out of control? *Curr Opin Pulm Med*. 2002 May;8(3):178-82. PubMed [citation] PMID: 11981305 <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=11981305>
131. Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):624-32. Review. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2004 Apr;4(4):251. Dosage error in article text. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00771-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00771-0)
132. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest*. 2010 Apr;137(4):952-68. Epub 2009 Dec 18. doi: 10.1378/chest.09-2350. <https://doi.org/10.1378/chest.09-2350>
133. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez-Angulo Y, Hatherill M, Moyo S, Hanekom W, Mahomed H. The utility of an interferon gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2011 Aug;30(8):694-700. doi:10.1097/INF.0b013e318214b915
<https://doi.org/10.1097/INF.0b013e318214b915>
134. Haustein T, Ridout D, Hartley JC, Thaker U, Shingadia D, Klein NJ, Novelli V, Dixon GLJ: The likelihood of an indeterminate test result from a wholeblood interferon-γ release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 28(8):669-673, Aug 2009. doi:

- 10.1097/INF.0b013e3181a16394
<https://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-200908000-00001>
135. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, Magdorf K. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007 Aug 1;45(3):322-8. Epub 2007 Jun 15. doi: 10.1086/519266 <https://doi.org/10.1086/519266>
136. Corbett EL, Charalambous S, Moloi VM, Fielding K, Grant AD, Dye C, De Cock KM, Hayes RJ, Williams BG, Churchyard GJ. Human immunodeficiency virus and the prevalence of undiagnosed tuberculosis in African gold miners. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Sep 15;170(6):673-9. Epub 2004 Jun 10. doi: 10.1164/rccm.200405-590OC <https://researchonline.lshtm.ac.uk/14673/>
137. Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. Clinical practice. Latent tuberculosis infection. *N Engl J Med*. 2002 Dec 5;347(23):1860-6. doi: 10.1056/NEJMcp021045 <https://doi.org/10.1056/NEJMcp021045>
138. Selwyn PA, Sckell BM, Alcabes P, Friedland GH, Klein RS, Schoenbaum EE. High risk of active tuberculosis in VIH-infected drug users with cutaneous anergy. *JAMA*. 1992 Jul 22-29;268(4):504-9. Erratum in: *JAMA* 1992 Dec 23-30;268(24):3434. doi: 10.1001/jama.268.4.504 <https://jamanetwork.com/journals/jama/article-abstract/398726>
139. Horsburgh CR Jr. Priorities for the treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med*. 2004 May 13;350(20):2060-7. doi: 10.1056/NEJMsa031667 <https://doi.org/10.1056/NEJMsa031667>
140. Redelman-Sidi G, Sepkowitz KA. IFN- γ release assays in the diagnosis of latent tuberculosis infection among immunocompromised adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013 Aug 15;188(4):422-31. doi: 10.1164/rccm.201209-1621CI <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1621CI>
141. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect Mycobacterium tuberculosis Infection - United States, 2010 Department of health and human services Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5905a1.htm>
142. National Institute for Health and Clinical Excellence. Clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control. CG117. London: National Institute for Health and Clinical Excellence, 2011. <http://publications.nice.org.uk/tuberculosis-cg117>
143. Chee CB, Sester M, Zhang W, Lange C. Diagnosis and treatment of latent infection with Mycobacterium tuberculosis. *Respirology*. 2013 Feb;18(2):205-16. Review. doi: 10.1111/resp.12002 <https://doi.org/10.1111/resp.12002>
144. Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, Metcalfe JZ, Date A, Coleman C, Marston BJ, Huang L, Hopewell PC, Pai M. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in VIH-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Mar 1;56(3):230-8. doi: 10.1097/QAI.0b013e31820b07ab <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383328/>
145. Mandalakas AM, Hesselning AC, Chegou NN, Kirchner HL, Zhu X, Marais BJ, Black GF, Beyers N, Walzl G. High level of discordant IGRA results in

- VIH-infected adults and children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 Apr;12(4):417-23. PMID: 18371268
<https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/2008/00000012/00000004/art00013>
146. Richeldi L, Losi M, D'Amico R, Luppi M, Ferrari A, Mussini C, Codeluppi M, Cocchi S, Prati F, Paci V, Meacci M, Meccugni B, Rumpianesi F, Roversi P, Cerri S, Luppi F, Ferrara G, Latorre I, Gerunda GE, Torelli G, Esposito R, Fabbri LM. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest.* 2009 Jul;136(1):198-204. Epub 2009 Mar 24. doi: 10.1378/chest.08-2575
<https://doi.org/10.1378/chest.08-2575>
147. Talati NJ, Seybold U, Humphrey B, Aina A, Tapia J, Weinfurter P, Albalak R, Blumberg HM. Poor concordance between interferon-gamma release assays and tuberculin skin tests in diagnosis of latent tuberculosis infection among VIH-infected individuals. *BMC Infect Dis.* 2009 Feb 10;9:15. doi: 10.1186/1471-2334-9-15
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649136/>
148. Leidl L, Mayanja-Kizza H, Sotgiu G, Baseke J, Ernst M, Hirsch C, Goletti D, Toossi Z, Lange C. Relationship of immunodiagnostic assays for tuberculosis and numbers of circulating CD4+ T-cells in VIH infection. *Eur Respir J.* 2010 Mar;35(3):619-26. Epub 2009 Jul 16. doi: 10.1183/09031936.00045509
<https://erj.ersjournals.com/content/35/3/619.long>
149. Rivas I, Latorre I, Sanvisens A, Domínguez J, Tor J, Prat C, Rey-Joly C, Muga R. Prospective evaluation of latent tuberculosis with interferon-gamma release assays in drug and alcohol abusers. *Epidemiol Infect.* 2009 Sep;137(9):1342-7. Epub 2009 Feb 26. doi: 10.1017/S0950268809002131
<https://doi.org/10.1017/S0950268809002131>
150. Theis VS, Rhodes JM. Review article: minimizing tuberculosis during anti-tumour necrosis factor-alpha treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008 Jan 1;27(1):19-30. Epub 2007 Oct 16. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03553.x
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03553.x>
151. Lalvani A, Millington KA. Screening for tuberculosis infection prior to initiation of anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev.* 2008 Dec;8(2):147-52. Epub 2008 Aug 13. doi: 10.1016/j.autrev.2008.07.011
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2593775/>
152. Bartalesi F, Vicidomini S, Goletti D, Fiorelli C, Fiori G, Melchiorre D, Tortoli E, Mantella A, Benucci M, Girardi E, Cerinic MM, Bartoloni A. QuantiFERON-TB Gold and the TST are both useful for latent tuberculosis infection screening in autoimmune diseases. *Eur Respir J.* 2009 Mar;33(3):586-93. Epub 2008 Dec 1. doi: 10.1183/09031936.00107608
<https://doi.org/10.1183/09031936.00107608>
153. Martin J, Walsh C, Gibbs A, McDonnell T, Fearon U, Keane J, Codd MB, Dodd J, Veale D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Comparison of interferon-gamma release assays and conventional screening tests before tumour necrosis factor - α blockade in patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010 Jan;69(1):181-5. doi: 10.1136/ard.2008.101857.
<https://doi.org/10.1136/ard.2008.101857>

154. NICE clinical guideline 117. Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control Ordering information. Issue date: March 2011 [consultado 3 Jun 2011]. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/guidance/CG117>
155. Ponce de Leon D, Acevedo-Vasquez E, Alvizuri S, Gutierrez C, Cucho M, Alfaro J, Perich R, Sanchez-Torres A, Pastor C, Sanchez-Schwartz C, Medina M, Gamboa R, Ugarte M. 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 May;35(5):776-81. Epub 2008 Apr 1. PubMed [citation] PMID: 18398944 <http://www.jrheum.org/content/35/5/776.long>
156. Banaei N, Gaur RL, Pai M. Interferon Gamma Release Assays for Latent Tuberculosis: What Are the Sources of Variability? *Journal of Clinical Microbiology*. 2016 Mar 25; 54(4): 845-850 doi: 10.1128/JCM.02803-15 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4809912/>
157. Mazurek GH, Whitworth WC, Goodwin DJ. 2012. Affect of blood collection time on QuantiFERON-TB Gold In-Tube test variability. *Am J Respir Crit Care Med* 185:A4735. <https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1.MeetingAbstracts.A4735>
158. Gaur RL, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *J Clin Microbiol*. 2013 Nov;51(11):3521-6. Epub 2013 Aug 21. doi: 10.1128/JCM.01627-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3889728/>
159. Tagmouti S, Slater M, Benedetti A, Kik SV, Banaei N, Cattamanchi A, Metcalfe J, Dowdy D, van Zyl Smit R, Dendukuri N, Pai M, Denkinger C. Reproducibility of interferon gamma (IFN- γ) release Assays. A systematic review. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Oct;11(8):1267-76. doi: 10.1513/AnnalsATS.201405-188OC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5469356/>
160. Smith SG, Joosten SA, Verscheure V, Pathan AA, McShane H, Ottenhoff TH, Dockrell HM, Mascart F. Identification of major factors influencing ELISpot-based monitoring of cellular responses to antigens from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. 2009 Nov 24;4(11):e7972 doi: 10.1371/journal.pone.0007972 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2776358/>
161. Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):3061-4. Epub 2011 Jun 22. doi: 10.1128/JCM.01136-11 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147723/>
162. Beffa P, Zellweger A, Janssens JP, Wrighton-Smith P, Zellweger JP. Indeterminate test results of T-SPOT.TB performed under routine field conditions. *Eur Respir J*. 2008 Apr;31(4):842-6. Epub 2007 Dec 5. doi: 10.1183/09031936.00117207 <https://doi.org/10.1183/09031936.00117207>
163. Franken WP, Thijsen S, Wolterbeek R, Bouwman JJ, el Bannoudi H, Kik SV, van Dissel JT, Arend SM. Variation in T-SPOT.TB spot interpretation between independent observers from different laboratories. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Oct;16(10):1439-42. Epub 2009 Aug 26. doi:

- 10.1128/CVI.00456-08
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2756839/>
164. Wild D. The immunoassay handbook. 3rd EDITION 2005, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. ISBN-13: 978-0080445267 ISBN-10: 0080445268
165. Detjen AK, Loebenberg L, Grewal HM, Stanley K, Gutschmidt A, Kruger C, Du Plessis N, Kidd M, Beyers N, Walzl G, Hesselning AC. Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. Clin Vaccine Immunol. 2009 Aug;16(8):1170-5. Epub 2009 Jun 17. doi: 10.1128/CVI.00168-09
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2725540/>
166. 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 Respir Crit Care Med. 2013 Jan 15;187(2):206-11. Epub 2012 Oct 26. PubMed [citation] PMID: 23103734, PMCID: PMC3570654 doi: 10.1164/rccm.201203-0430OC
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3570654/>
167. Whitworth WC, Hamilton LR, Goodwin DJ, Barrera C, West KB, Racster L, Daniels LJ, Chuke SO, Campbell BH, Bohanon J, Jaffar AT, Drane W, Maserang D, Mazurek GH. Within-subject interlaboratory variability of QuantiFERON-TB gold in-tube tests. PLoS One. 2012;7(9):e43790. Epub 2012 Sep 6. doi: 10.1371/journal.pone.0043790
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435391/>
168. Tuuminen T, Tavast E, Väisänen R, Himberg JJ, Seppälä I. Assessment of Imprecision in Gamma Interferon Release Assays for the Detection of Exposure to Mycobacterium tuberculosis . Clinical and Vaccine Immunology : CVI. 2010 Feb 24; 17(4): 596-601 doi: 10.1128/CVI.00320-09
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849328/>
169. van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M. Within-Subject Variability of Interferon-gamma Assay Results for Tuberculosis and Boosting Effect of Tuberculin Skin Testing: A Systematic Review. PLoS ONE. 2009 Dec 30; 4(12): e8517 doi: 10.1371/journal.pone.0008517
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2795193/>
170. Directrices sobre la atención de la infección tuberculosa latente. Organización Mundial de la Salud, 2015.
https://www.who.int/tb/publications/ltbi_document_page/es/
171. European Centre for Disease Prevention and Control. Use of interferon-gamma release assays in support of TB diagnosis. Stockholm: ECDC; 2011.
https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/1103_GUI_IGRA.pdf
172. Guía de Práctica Clínica sobre el Diagnóstico, el Tratamiento y la Prevención de la Tuberculosis 2010. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_473_Tuberculosis_AIAQS_compl.pdf
173. Actualización de los procedimientos para el diagnóstico de Infección Tuberculosa Latente (ITL) y la adquisición de Tuberculina PPD en Asturias. 2015. Circular de la DGSP 04/2015. Consejería de Sanidad. Gobierno del Principado de Asturias.
https://www.astursalud.es/documents/31867/36150/Circular+DGSP+04_2

- [015+Actualizacion+diagnostico+ITL.pdf/0f1cd1b6-57fa-54e7-cf63-2f7bdbb13092](#)
174. QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) ELISA Package Insert. QIAGEN Company. http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English_QFT_ELISA_R04_082016.pdf
175. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) Package Insert. QIAGEN Company. <http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/10/QFT-Plus-ELISA-IFU-L1095849-R02.pdf>
176. T-SPOT®.TB Package Insert. Oxford Immunotec. <http://www.oxfordimmunotec.com/international/wp-content/uploads/sites/3/Final-File-PI-TB-US-V6.pdf>
177. T-Cell Xtend® Package Insert. Oxford Immunotec. <http://oxfordimmunotec.com/north-america/wp-content/uploads/sites/2/Xtend-Package-Insert.pdf>
178. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, Keane J, Lewinsohn DA, Loeffler AM, Mazurek GH, O'Brien RJ, Pai M, Richeldi L, Salfinger M, Shinnick TM, Sterling TR, Warshauer DM, Woods GL. Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin Infect Dis.* 2017;64(2):e1-e33. doi:10.1093/cid/ciw694 <https://doi.org/10.1093/cid/ciw778>
179. Gualano G, Mencarini P, Lauria FN, Palmieri F, Mfinanga S, Mwaba P, Chakaya J, Zumla A, Ippolito G. Tuberculin skin test - Outdated or still useful for Latent TB infection screening? *Int J Infect Dis.* 2019 Mar;80S:S20-S22. Epub 2019 Feb 6. doi: 10.1016/j.ijid.2019.01.048. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.048>
180. Santin M, García-García JM, Domínguez J; Panel of experts from the Mycobacteria Study Group (GEIM) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) and the Spanish Society of Respiratory Diseases and Thoracic Surgery (SEPAR).. Guidelines for the use of interferon- γ release assays in the diagnosis of tuberculosis infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 May;34(5):303.e1-13. Epub 2016 Feb 22. doi: 10.1016/j.eimc.2015.11.022. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.022>
181. Hoffmann H, Avsar K, Göres R, Mavi SC, 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 Aug;22(8):701-3. Epub 2016 May 13. doi: 10.1016/j.cmi.2016.05.006. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.006>
182. Pieterman ED, Liqui Lung FG, Verbon A, Bax HI, Ang CW, Berkhout J, Blaauw G, Brandenburg A, van Burgel ND, Claessen A, van Dijk K, Heron M, Hooghiemstra M, Leussenkamp-Hummelink R, van Lochem E, van Loo IHM, Mulder B, Ott A, Pontesilli O, Reuwer A, Rombouts P, Saegeman V, et al. A multicentre verification study of the QuantiFERON(®)-TB Gold Plus assay. *Tuberculosis (Edinb).* 2018 Jan;108:136-142. Epub 2017 Nov 28. doi: 10.1016/j.tube.2017.11.014 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.11.014>
183. Kay W, DiNardo AR, Dlamini Q, Kahari J, Mndzebele T, Mtetwa G, Ustero P, Maphalala G, Mandalakas AM. Evaluation of the QuantiFERON-

- Tuberculosis Gold Plus Assay in Children with Tuberculosis Disease or Following Household Exposure to Tuberculosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 100, Issue 3, 6 Mar 2019, p. 540-543 doi: 10.4269/ajtmh.18-0674 <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0674>
184. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, Nguyen H, Doan H, Pham N, Nguyen H, Nguyen H, Nguyen HV, Le HV, Nguyen N, Graviss EA. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One*. 2019 Mar 4;14(3):e0213304.eCollection 2019. doi: 10.1371/journal.pone.0213304 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6398855/>
185. 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 (Edinb)*. 2017 Sep;106:38-43. Epub 2017 Jun 27 doi: 10.1016/j.tube.2017.06.002 <https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.06.002>
186. Kamada A, Amishima M. QuantiFERON-TB(®) Gold Plus as a potential tuberculosis treatment monitoring tool. *Eur Respir J*. 2017 Mar 22;49(3). pii: 1601976. Print 2017 Mar. doi:10.1183/13993003.01976-2016 <https://doi.org/10.1183/13993003.01976-2016>
187. Moon HW, Gaur RL, Tien SS, Spangler M, Pai M, Banaei N. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold-Plus in Health Care Workers in a Low-Incidence Setting. *J Clin Microbiol*. 2017 Jun;55(6):1650-1657. Epub 2017 Mar 15. doi: 10.1128/JCM.02498-16 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5442521/>
188. Ulrichs T, Anding R, Kaufmann SH, Munk ME. Numbers of IFN-gamma-producing cells against ESAT-6 increase in tuberculosis patients during chemotherapy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Dec;4(12):1181-3. PMID: 11144463 <https://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtlld/2000/00000004/0000012/art00015>
189. Chee CB, KhinMar KW, Gan SH, Barkham TM, Pushparani M, Wang YT. Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 1;175(3):282-7. Epub 2006 Nov 2. DOI: 10.1164/rccm.200608-1109OC <https://doi.org/10.1164/rccm.200608-1109OC>
190. Du F, Xie L, Zhang Y, Gao F, Zhang H, Chen W, Sun B, Sha W, Fang Y, Jia H, Xing A, Du B, Zheng L, Gao M, Zhang Z. Prospective Comparison of QFT-GIT and T-SPOT.TB Assays for Diagnosis of Active Tuberculosis. *Sci Rep*. 2018 Apr 12;8(1):5882. doi: 10.1038/s41598-018-24285-3 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5897568/>
191. Herrera V, Yeh E, Murphy K, Parsonnet J, Banaei N. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug;48(8):2672-6. Epub 2010 Jun 2. doi: 10.1128/JCM.00482-10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916573/>
192. Yun JW, Chung HS, Koh WJ, Chung DR, Kim YJ, Kang ES. Significant reduction in rate of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test by shortening incubation delay. *J Clin Microbiol*. 2014 Jan;52(1):90-4. Epub 2013 Oct 23. doi: 10.1128/JCM.01547-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3911472/>

193. Whitworth WC, Mazurek GH, Goodwin DJ. Assay parameters affecting variability of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay results. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;185:A4728 <https://doi.org/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1.MeetingAbstracts.A4728>
194. Min JW, Lee HY, Lee JS, Lee J, Chung JH, Han SK, Yim JJ. Effect of prolonged incubation time on results of the QuantiFERON TB gold in-tube assay for diagnosis of latent tuberculosis infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2013 Sep;20(9):1377-80. doi: 10.1128/CVI.00290-13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3889582/>
195. Leyten EM, Arend SM, Prins C, Cobelens FG, Ottenhoff TH, van Dissel JT. 2007. Discrepancy between Mycobacterium tuberculosis-specific gamma interferon release assays using short and prolonged in vitro incubation. *Clin. Vaccine Immunol*. 14:880–885. doi: 10.1128/CVI.00132-07 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1951056/>
196. Zwerling A, van den Hof S, Scholten J, Cobelens F, Menzies D, Pai M. Interferon-gamma release assays for tuberculosis screening of healthcare workers: a systematic review. *Thorax*. 2012 Jan;67(1):62-70. Epub 2011 Jan 12. doi: 10.1136/thx.2010.143180 <https://thorax.bmj.com/content/67/1/62>
197. Ringshausen FC, Schablon A, Nienhaus A. Interferon-gamma release assays for the tuberculosis serial testing of health care workers: a systematic review. *J Occup Med Toxicol*. 2012 Jun 18;7(1):6. doi: 10.1186/1745-6673-7-6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377540/>
198. Joshi M, Monson T, Woods G. 2012. Performance and practicality of IGRA in serial testing for latent TB infection in US healthcare workers—a real world experience. *Chest* 142:142A. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.1386337>
199. Dorman S, Belknap R, Graviss EA, Reeves R, Schulger N, Weinfurter P, Wang Y, Cronin W, Hirsch-Moverman Y, Teeter L, Parker M, Garrett DO, Daley CL. 3 December 2013. Interferon-release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am.J.Respir.Crit.CareMed*. doi: 10.1164/rccm.201302-0365OC <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201302-0365OC>
200. Pai M, Menzies D. 2007. Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis? *Clin. Infect. Dis*. 44:74–77. <http://dx.doi.org/10.1086/509927>
201. Dheda K, van Zyl Smit R, Badri M, Pai M. 2009. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr. Opin. Pulm. Med*. 15:188–200. doi: 10.1097/MCP.0b013e32832a0adc <http://dx.doi.org/10.1097/MCP.0b013e32832a0adc>
202. World Health Organization. 2011. Policy statement: use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRA) in low- and middle-income countries. World Health Organization, Geneva, Switzerland. https://www.who.int/tb/features_arcVIHe/policy_statement_igra_oct2011.pdf
203. Fan L, Chen Z, Hao XH, Hu ZY, Xiao HP. 2012. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis:

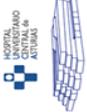
- asystematic review and meta-analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65: 456–466. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00972.x
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00972.x>
204. Metcalfe JZ, Cattamanchi A, Vittinghoff E, Ho C, Grinsdale J, Hopewell PC, Kawamura LM, Nahid P. 2010. Evaluation of quantitative IFN-gamma response for risk stratification of active tuberculosis suspects. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 181:87–93. doi: 10.1164/rccm.200906-0981OC
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2797629/>
205. Rangaka MX, Gideon HP, Wilkinson KA, Pai M, Mwansa-Kambafwile J, Maartens G, Glynn JR, Boule A, Fielding K, Goliath R, Titus R, Mathee S, Wilkinson RJ. 2012. Interferon release does not add discriminatory value to smear-negative VIH-tuberculosis algorithms. *Eur. Respir. J.* 39:163–171. doi: 10.1183/09031936.00058911
<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00058911>
206. Ling DI, Pai M, Davids V, Brunet L, Lenders L, Meldau R, Calligaro G, Allwood B, van Zyl-Smit R, Peter J, Bateman E, Dawson R, Dheda K. 2011. Are interferon-gamma release assays useful for diagnosing active tuberculosis in a high-burden setting? *Eur. Respir. J.* 38:649–656. doi: 10.1183/09031936.00181610
<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00181610>
207. Ling DI, Nicol M, Pai M, Pienaar S, Dendukuri N, Zar HJ. 2013. Incremental value of T-SPOT.TB for diagnosis of active pulmonary tuberculosis in children in a high-burden setting: a multivariable analysis. *Thorax* 68:860–866. <http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2012-203086>
208. Barcellini L, Borroni E, Brown J et al. First evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus performance in contact screening. *European Respiratory Journal* . 2016;48(5):1411-1419. doi:10.1183/13993003.00510-2016
<https://doi.org/10.1183/13993003.00510-2016>
209. Ryu M, Park M, Cho E et al. Comparative Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Immunocompromised Patients. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11). doi:10.1128/jcm.00438-18
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6204680/>
210. Lalvani A. 2004. Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *Clin. Infect. Dis.* 38: 757–759. doi: 10.1086/381763 <http://dx.doi.org/10.1086/381763>
211. Chee CB, KhinMar KW, Gan SH, Barkham TM, Koh CK, Shen L, Wang YT. 2010. Tuberculosis treatment effect on T-cell interferon gamma responses to Mycobacterium tuberculosis-specific antigens. *Eur. Respir. J.* 36:355–361. doi: 10.1183/09031936.00151309
<http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00151309>
212. Ribeiro S, Dooley K, Hackman J, Loredó C, Efron A, Chaisson RE, Conde MB, Boechat N, Dorman SE. 2009. T-SPOT.TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect. Dis.* 9:23. doi: 10.1186/1471-2334-9-2
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2651889/>
213. Chiappini E, Fossi F, Bonsignori F, Sollai S, Galli L, de Martino M. 2012. Utility of interferon-gamma release assay results to monitor antitubercular treatment in adults and children. *Clin. Ther.* 34:1041–1048. doi:

- 10.1016/j.clinthera.2012.03.006
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.03.006>.
214. Denkinger CM, Pai M, Patel M, Menzies D. 2013. Gamma interferon release assay for monitoring of treatment response for active tuberculosis: an explosion in the spaghetti factory. *J. Clin. Microbiol.* 51:607–610. doi: 10.1128/JCM.02278-12 <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02278-12>
215. Adetifa IM, Ota MO, Jeffries DJ, Lugos MD, Hammond AS, Battersby NJ, Owiafe PK, Donkor SD, Antonio M, Ibanga HB, Brookes RH, Aka P, Walton R, Adegbola RA, Hill PC. 2013. Interferon-gamma ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187:439–445. doi: 10.1164/rccm.201208-1352OC <https://doi.org/10.1164/rccm.201208-1352OC>
216. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. 2012. Predictive value of interferon-gamma release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. *Chest* 142:63–75. doi: 10.1378/chest.11-3157 <http://dx.doi.org/10.1378/chest.11-3157>.
217. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, Ling D, Menzies D, Mwansa Kambafwile J, Fielding K, Wilkinson RJ, Pai M. 2012. Predictive value of interferon-gamma release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 12:45–55. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70210-9 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3568693/>
218. Watkins RE, Brennan R, Plant AJ. 2000. Tuberculin reactivity and the risk of tuberculosis: a review. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4:895–903. PMID: 11055755 <https://www.ingentaconnect.com/content/iatld/ijtld/2000/00000004/0000010/art00001>
219. Machingaidze S, Verver S, Mulenga H, Abrahams DA, Hatherill M, Hanekom W, Hussey GD, Mahomed H. Predictive value of recent QuantiFERON conversion for tuberculosis disease in adolescents. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Nov 15;186(10):1051-6. Epub 2012 Sep 6. <https://doi.org/10.1164/rccm.201206-1134OC>
220. Andrews JR, Noubary F, Walensky RP, Cerda R, Losina E, Horsburgh CR. Risk of progression to active tuberculosis following reinfection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Infect Dis.* 2012 Mar;54(6):784-91. Epub 2012 Jan 19 doi: 10.1093/cid/cir951 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3284215/>
221. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 May 15;173(10):1078-90. Epub 2006 Feb 16. doi: 10.1164/rccm.200511-1809SO <https://doi.org/10.1164/rccm.200511-1809SO>
222. Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselink AC, Benedetti A, Menzies D. 2011. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 15:1018–1032. doi:10.5588/ijtld.10.0631 <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.10.0631>
223. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez-Angulo Y, Hatherill M, Moyo S, Hanekom W, Mahomed H. 2011. The utility of an interferon gamma

- release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30:694–700. <https://insights.ovid.com/crossref?an=00006454-201108000-00015>
224. Chen J, Zhang R, Wang J, Liu L, Zheng Y, Shen Y, Qi T, Lu H. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis in VIH-infected patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2011;6(11):e26827. Epub 2011 Nov 1. doi: 10.1371/journal.pone.0026827
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026827>
225. Cattamanchi A, Smith R, Steingart KR, Metcalfe JZ, Date A, Coleman C, Marston BJ, Huang L, Hopewell PC, Pai M. 2011. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection in VIH-infected individuals—a systematic review and meta-analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 56:230-238. doi: 10.1097/QAI.0b013e31820b07ab
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383328/>
226. Santin M, Muñoz L, Rigau D. Interferon- γ release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in VIH-infected adults: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012;7(3):e32482. Epub 2012 Mar 5. doi: 10.1371/journal.pone.0032482
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032482>
227. Winthrop KL, Weinblatt ME, Daley CL. You can't always get what you want, but if you try sometimes (with two tests--TST and IGRA--for tuberculosis) you get what you need. *Ann Rheum Dis.* 2012 Nov;71(11):1757-60. Epub 2012 Sep 12. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201979 <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201979>
228. Shahidi N, FuYT, QianH, Bressler B. 2012. Performance of interferon gamma release assays in patients with inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* 18:2034–2042. <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.22901>
229. Chang B, Park HY, Jeon K, Ahn JK, Cha HS, Koh EM, Kang ES, Koh WJ. Interferon- γ release assay in the diagnosis of latent tuberculosis infection in arthritis patients treated with tumor necrosis factor antagonists in Korea. *Clin Rheumatol.* 2011 Dec;30(12):1535-41. Epub 2011 May 10. doi: 10.1007/s10067-011-1771-9. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201979>
230. Petruccioli E, Scriba TJ, Petrone L, Hatherill M, Cirillo DM, Joosten SA, Ottenhoff TH, Denkinger CM, Goletti D. Correlates of tuberculosis risk: predictive biomarkers for progression to active tuberculosis. *Eur Respir J.* 2016 Dec;48(6):1751-1763. Epub 2016 Nov 11. doi: 10.1183/13993003.01012-2016
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5898936/>
231. Van Van Der Meeren O, Hatherill M, Nduba V, Wilkinson RJ, Muyoyeta M, Van Brakel E, Ayles HM, Henostroza G, Thienemann F, Scriba TJ, Diacon A, Blatner GL, Demoitié MA, Tameris M, Malahleha M, Innes JC, Hellstrom E, Martinson N, Singh T, Akite EJ, Khatoon A, Bollaerts A, Ginsberg AM, Evans TG, Gillard P, Tait DR. Phase 2b placebo-controlled trial of M72/AS01E candidate vaccine to prevent active tuberculosis in adults. *The New England Journal of Medicine.* 2018 Sep 25:

10.1056/NEJMoa1803484 PMC [article] doi: 10.1056/NEJMoa1803484
<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1803484>

ANEXOS



3950

Simultaneous use of two interferon-gamma release assay (T-SPOT.TB and novel QuantiFERON-TB Gold Plus) for the diagnosis of latent tuberculosis infection in immunosuppressed patients

F. Abreu-Salinas^{1,2,3}, C. Castiello-Abietar^{1,2,3}, A. Fernández-Blázquez^{1,2,3}, A. Leal-Negredo^{1,2,3}, P. Argüelles^{1,2,3}, S. Riestra^{1,2}, M. Arías-Guillén^{1,2}, M. Junco^{1,2,3}, J. J. Palacios^{1,2,3}
 1. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo-Asturias (Spain); 2. Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Oviedo-Asturias (Spain); 3. Regional Mycobacteria Reference Unit, Department of Microbiology, Oviedo-Asturias (Spain).

Background and objective

In Asturias (Spain), diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI) in immunosuppressed patients is carried out using two IGRA simultaneously (QuantiFERON TB Gold Plus and T-SPOT. TB) in order to achieve the highest sensitivity. The objective of this study is to compare the results obtained by these two assays in a region of one million inhabitants where the incidence of tuberculosis is currently between 10-15 cases / 100,000 population.

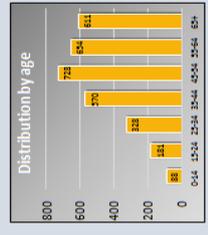
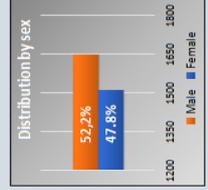
Material and Methods

- Period: September 1, 2016 to August 31, 2018.
- 3160 samples of immunocompromised patients from all 9 public hospitals of the SESPA network.
- QuantiFERON TB Gold Plus and T-SPOT. TB were analyzed.



- IGRAs were carried out according to the manufacturer's instructions.

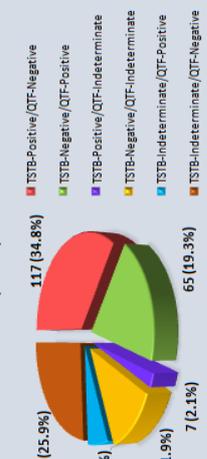
Results



CONCORDANCE between IGRAs: 2824 (89.36%)



DISCREPANT RESULTS 336 (10.63%)



	T-SPOT. TB			QTF-Plus			Total
	Positive	Negative	Indeterminate	Positive	Negative	Indeterminate	
T-SPOT. TB	445	117	7	569			
QTF-Plus	65	2365	40	2470			
Indeterminate	20	87	14	121			
Total	530	2569	61	3160			

- The combined use of two IGRAs made it possible to obtain a Positive or Negative final result in 3146 patients (99.55%).
- Six hundred and fifty-four patients (20.69%) were IGRA-Positive (T-SPOT. TB 18% vs. QTF Plus 16.77%); 2492 (78.86%) IGRA-Negative (T-SPOT. TB 78.16% vs. QTF Plus 81.29%); and 14 (0.44%) IGRA-Indeterminate (T-SPOT. TB 3.82% vs. QTF Plus 1.93%).

Conclusions

- ✓ The agreement between both IGRAs was very high and, therefore, in the general population, either of the two tests can be used.
- ✓ But we believe that the number of indeterminate results (especially with T-SPOT. TB) and the negative discordant results that could minimize the impact of LTBI, support our strategy of simultaneous use of the two IGRAs in immunosuppressed patients or with biological therapies.

Contact: jianjose.palacios@espa.es or falmatrucel68@gmail.com



Scientific Secretariat
28th ECCMID 2018
c/o ESCMID Executive
Office P.O. Box 214
4010 Basel, Switzerland
eccmid@eccmid.org
www.eccmid.org

Basel, 9th May 2019

To whom it may concern:

CONFIRMATION OF PRESENTATION AT ECCMID 2019

We hereby confirm that the following abstract was submitted, accepted and presented at the 29th ECCMID, the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, which took place in Amsterdam, Netherlands, 13 – 16 April 2019.

Title: Simultaneous use of two interferon-gamma release assay (T-SPOT.TB and novel QuantiFERON-TB Gold Plus) for the diagnosis of latent tuberculosis infection in immunosuppressed patients

Abstract Authors: F. Abreu-Salinas, C. Castelló-Abietar, A. Fernández-Blazquez, A. Leal, P. Arguelles, S. Riestra, M. Arias Guillen, M. Junco, J. Palacios

Presenter: Cristian Castelló-Abietar

Session Title: Latent TB and TB epidemiology

Presentation Type: Paper Poster Session

Presentation Number: P0962

Yours sincerely,

Winfried V. Kern
ECCMID 2019 Programme Director

ESCMID European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

ESCMID Executive Committee: J. Rodriguez-Banó, President, Seville, ES; M. Poljak, Immediate Past-President and Publications Officer, Ljubljana, SI; M. Sanguinetti, President-elect and Secretary General, Rome, IT; A. Friedrich, Treasurer, Groningen, NL; E. Cambau, Professional Affairs Officer, Paris, FR; E. Tacconelli, Guidelines Officer, Verona, IT; A. Zinkernagel, Scientific Affairs Officer, Zurich, CH; Ö. Ergönül, Education and Communications Officer, Istanbul, TR; Ad hoc Members: Ch. Giske, EUCAST Chairperson, Stockholm, SE; L. Scudeller, ESCMID Guidelines Director, Pavia, IT; L. Leibovici, CMI Editor-in-Chief, Patah-Tiqva, IL; W. Kern, ECCMID Programme Director, Freiburg, DE

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES
29th ECCMID

Amsterdam, Netherlands
13 – 16 April 2019

EUROPEAN CONGRESS OF
CLINICAL MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS DISEASES
ECCMID

ONE YEAR EXPERIENCE WITH QuantiFERON-TB Gold Plus IN PATIENTS WITH IMMUNOSUPPRESSIVE CONDITIONS

A. Fernández-Blázquez¹, P. Argüelles¹, C. Sabater Cabrera¹, J.M. García-García², V. Asensi³, I. Flores¹, M. Oblanca¹, I. J. Palacios¹
¹Department of Microbiology, Regional Mycobacteria Reference Center, Hospital Universitario Central Asturias (Spain), ²Department of Neurology, Hospital Universitario San Agustín Avilés (Spain), ³Department of Internal Medicine, Hospital Universitario Central Asturias (Spain)

Background **Aim** **Results**

Guidelines recommend interferon-γ release assays (IGRAs) for diagnostic testing for latent tuberculosis infection (LTBI) in immunocompromised patients or those at increased risk of tuberculosis. For patients with immunosuppressive conditions, we use two IGRAs (QuantiferON and T-SPOT.TB) simultaneously, in order to achieve the highest sensitivity possible.

Analyze the new version of QuantiFERON-TB Gold Plus (QTF-Plus) in regards to its previous version QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QTF-GIT), establishing comparisons between both QTF assays and TSTB assay.

Methods

Total population of Asturias ~1 million → Total patients with immunosuppressive conditions receiving health care services ~1000 per year. Immunosuppressive conditions: HIV, hematologic diseases, inflammatory bowel disease, rheumatic disease, candidates for biological therapy.

FIRST PERIOD:
May 2015 – June 2016
IGRAs: QTF-GIT and TSTB
Patients (n): 1535

SECOND PERIOD:
July 2016 – June 2017
IGRAs: QTF-Plus and TSTB
Patients (n): 1464

Statistical analysis:

- >Agreement rate between QTF and TSTB assays: Cohen's Kappa (κ).
- >Comparison between IGRAs results from both periods: X²-test (p value<0.05 was considered statistically significant).

Conclusions

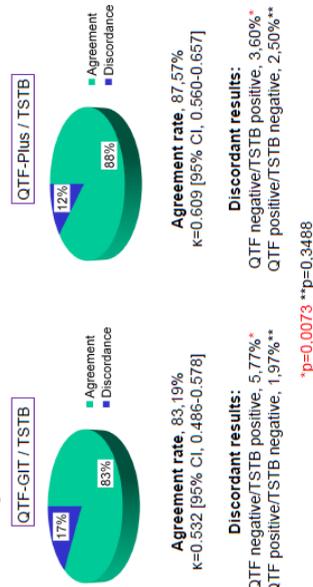
- ✓ The performance of QTF-Plus improves that of QTF-GIT, achieving substantial strength of agreement with TSTB.
- ✓ The amount of indeterminate results, especially from TSTB, and discordant results that could lead to misdiagnosis of LTBI, evidence the benefit of implementing two IGRAs simultaneously, to maximize sensitivity in patients at increased risk of tuberculosis.

Figure 1. Overall results during the first and second period

	First period (2015-2016)				Second period (2016-2017)			
	QTF-GIT		Indet.	Total TSTB	QTF-Plus		Indet.	Total TSTB
	Positive	Negative			Positive	Negative		
TSTB	174	79	9	262	171	49	5	225
	27	1089	27	1143	34	1107	21	1162
	19	97	14	130	15	58	4	77
Total QTF	220	1265	50	1535	220	1214	30	1464

First period: 20,06% IGRA positive
 Second period: 18,71% IGRA positive
 Indeterminate results: **p<0,00001**
 3,26% QTF-GIT vs. 8,47% TSTB
 2,05% QTF-Plus vs. 5,26% TSTB

Figure 2 and 3. Agreement and discordant results between both IGRAs





American Thoracic Society

*American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**
 *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**
 *Annals of the American Thoracic Society**

MARC MOSS, MD
President

POLLY E. PARSONS, MD
President-Elect

DAVID GOZAL, MD, MBA
Immediate Past President

JAMES M. BECK, MD
Vice President

JUAN C. CELEDON, MD, DrPH
Secretary-Treasurer

STEPHEN C. CRANE, PhD, MPH
Executive Director

May 31, 2018

To Whom It May Concern:

The ATS International Conference is the home of pulmonary, critical care, and sleep professionals, from those in the earliest stages of their careers to those whose research or strides in clinical care has gained them international recognition. Each year, thousands of these professionals choose to attend, present, and learn about the latest advances, meet with colleagues from around the world, and strike new collaborations. It is truly where today's science meets tomorrow's care.

This letter is to acknowledge that **Ana Fernández-Blázquez** was in attendance at the ATS 2018 International Conference held in San Diego, CA, USA and presented in Rapid Abstract Poster Discussion Session A25 entitled, "Tuberculosis Management: New Insights" for the abstract entitled, "Contribution of Xpert MTB/RIF to the Diagnosis of Tuberculosis in a Low-Prevalence Country Over a Period of 7 Years (2010-2017)" on Sunday, May 20, 2018.

Dr. Fernández-Blázquez also presented in Thematic Poster Session C62 entitled, "Tuberculosis: Bench to Bedside" for the poster entitled, "One-Year Experience with QuantiFERON-TB Gold Plus in Patients with Immunosuppressive Conditions" on Tuesday, May 22, 2018.

Both poster presentations were based on abstracts that were submitted to ATS and accepted for presentation. Please note the full authors listed below:

Contribution of Xpert MTB/RIF to the Diagnosis of Tuberculosis in a Low-Prevalence Country Over a Period of 7 Years (2010-2017). **Authors:** A. Fernández-Blázquez, C. Sabater Cabrera, A. García-Bernardo, J. García-García, R. Villa, M. Pando, M. Ramallal, M. Álvarez, F. Vázquez, J.J. Palacios-Gutiérrez.

One-Year Experience with QuantiFERON-TB Gold Plus in Patients with Immunosuppressive Conditions. **Authors:** A. Fernández-Blázquez, P. Argüelles, C. Sabater Cabrera, J. García-García, V. Asensi, M. Oblanca, I. Flórez, M. Vicuña, J.J. Palacios-Gutiérrez.

If you have any questions or concerns, please contact the American Thoracic Society at conference@thoracic.org or via phone at 212-315-8600.

Sincerely,



Liliana Rose
Coordinator
Scientific Meetings and Conferences



We help the world breathe®
PULMONARY • CRITICAL CARE • SLEEP

25 Broadway, 18th Floor, New York, NY 10004 U.S.
T. 212-315-8600 F. 212-315-6498 | thoracic.org

ATS 2018
International Conference
May 18-23, 2018
San Diego, CA
conference.thoracic.org

PROBLEMAS DE INTERPRETACIÓN EN LOS ENSAYOS BASADOS EN LA LIBERACIÓN DE INTERFERÓN GAMMA (IGRAs).



Argüelles Menéndez P, Gutiérrez Fernández C, Penedo Pallares A¹, Chamorro López L, Palacios Gasos M, Palacios Gutiérrez JJ¹.

Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal. Madrid.

¹Unidad de Referencia Regional de Micobacterias, Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

INTRODUCCIÓN

Los Interferon Gamma Release Assays (IGRAs) se basan en la detección del IFN-gamma liberado como respuesta a la estimulación *in vitro* de las células T sensibilizadas presentes en sangre periférica con antígenos específicos de *M. tuberculosis*. Existen dos formatos disponibles comercialmente: QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (Cellestis) -QFT- y T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec) -TSTB-. Esta tecnología está diseñada para el diagnóstico de la infección tuberculosa latente (ITL): se evita la subjetividad en la interpretación de los resultados, incluye controles positivos para identificar a los pacientes anérgicos y no se ve afectada por la vacunación con BCG. Desde el año 2008, en nuestra Unidad se emplea QFT de manera rutinaria en pacientes con sospecha de tuberculosis y en el contexto del estudio de contactos. Realizando además TSTB cuando se pretende descartar ITL en pacientes inmunodeprimidos, en edades pediátricas, o previo a la instauración de anti-TNF α . Hemos analizado 1425 muestras y constatado la existencia de un 20 a 30% de resultados en el tubo/pocillo control positivo en los cuales a pesar de que se cumplen los criterios mínimos exigidos por cada fabricante, podrían ser considerados "no totalmente óptimos" (QFT: valor en el tubo mitógeno ≤ 5 UI/ml; TSTB: pocillo control positivo >20 spots pero muestra de <250.000 células/ml). Creemos que esto influenciará la sensibilidad y valor predictivo negativo del IGRA.

OBJETIVO

En el contexto del diagnóstico de la ITL, comparar los resultados obtenidos por QFT y TSTB, en el grupo de pacientes inmunodeprimidos, pediátricos, y previo a terapia anti-TNF α , prestando especial atención a aquellos pacientes en los cuales los valores obtenidos en los controles positivos de sus muestras de sangre "no eran totalmente óptimos".

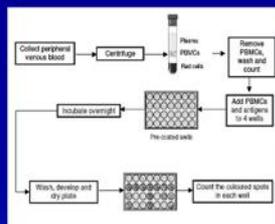


QuantiFERON-TB Gold In-Tube® (Cellestis)

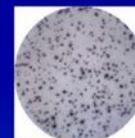


MATERIAL Y MÉTODOS

En QFT se procede mediante ELISA al análisis y cuantificación de la respuesta. TSTB es un tipo de ensayo ELISPOT. Se estudiaron 75 pacientes. A todos se les realizó de manera simultánea QFT y TSTB.



T-SPOT.TB® (Oxford Immunotec)



RESULTADOS

En 62/75 muestras (82,6%) se cumplían "de manera óptima" los requisitos al menos para uno de los IGRAs empleados, mientras que en 13/75 muestras (17,3%) se evidenciaban las variables objeto de este estudio en ambos IGRAs a la vez. En el caso del TSTB encontramos 31/75 muestras (41,3%) en las cuales no fue posible inocular 250.000 células si bien el control positivo presentaba >20 spots (resultado interpretable); de ellas 25 eran negativas, 5 positivas y 1 indeterminada. En el caso del QFT encontramos 24/75 muestras (32%) en las cuales el control positivo (mitógeno) era $>0,5$, pero <5 UI/mL (resultado interpretable); de ellas 22 fueron negativas y 2 positivas. En 2/25 muestras negativas por TSTB la prueba QFT realizada simultáneamente fue positiva (8%), a su vez en 2/22 muestras negativas por QFT la prueba TSTB fue positiva (9,1%).

CONCLUSIONES

En pacientes inmunodeprimidos, edad pediátrica y especialmente en chequeo previo a la instauración de terapia anti-TNF α creemos justificada la estrategia de utilización de dos IGRAs simultáneamente. Nuestros resultados evidencian casi un 10% de falsos negativos de cada prueba considerada individualmente. En un contexto clínico como el descrito, el impacto económico nos parece justificado frente a las repercusiones clínicas de un falso negativo. Lo comentado no es un inconveniente para que cualquiera de los IGRAs comercializados pueda ser considerado adecuado para población general y ser utilizado de manera individualizada.



IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico
Zaragoza, 20 -22 de Octubre de 2010

CERTIFICADO

Las Sociedades Científicas:

Asociación Española de Biopatología Médica (AEBM)
Asociación Española de Farmacéuticos Analistas (AEFA)
Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)

Certifican que:

***ARGÜELLES MENÉNDEZ, P; GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ, C; PENEDO PALLARES, A;
CHAMORRO LÓPEZ, L; PALACIOS GASOS, M; PALACIOS GUTIÉRREZ, J***

han presentado al IV Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en Zaragoza los días 20, 21 y 22 de Octubre de 2010, la comunicación número 201 titulada

***PROBLEMAS DE INTERPRETACIÓN EN LOS ENSAYOS BASADOS EN LA LIBERACIÓN
DE INTERFERÓN GAMMA (IGRAs)***

Imma Caballé Martín
Presidenta Comité de Congresos

Antonio Buño Soto
Presidente del Comité Científico

Zaragoza, 22 de Octubre de 2010

