

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Facultat de Medicina i Cirurgia  
Departament de Medicina**



**APLICABILITAT CLÍNICA DE LES TÈCNIQUES DE  
DETECCIÓ *IN VITRO* DE L'INTERFERÓ-GAMMA EN LA  
INFECCIÓ I LA MALALTIA TUBERCULOSA**

**Maria Luiza de Souza Galvão**

**2014**



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**Facultat de Medicina i Cirurgia  
Departament de Medicina**

**APLICABILITAT CLÍNICA DE LES TÈCNIQUES DE  
DETECCIÓ *IN VITRO* DE L'INTERFERÓ-GAMMA EN LA  
INFECCIÓ I LA MALALTIA TUBERCULOSA**

Presentada per  
Maria Luiza de Souza Galvão  
per a optar al grau de Doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona.

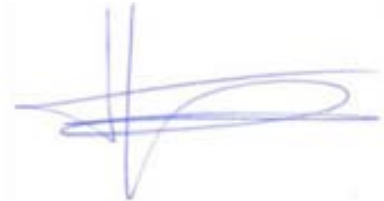
V.P. dels Directors de la Tesi



José Dominguez Benítez



María Neus Altet Gómez



Juan Ruíz Manzano

**Bellaterra, desembre 2014**



**Aos meus meninos bonitos.**

**“... porque el mismo rigor de hierro  
que hace falta para empezarlo  
se impone para terminarlo.”**

**Gabriel García Márquez**



## **AGRAÏMENTS:**

*A tots aquells que directament o indirectament han col·laborat per a fer-ho possible.*

*Aos meus meninos: Oriol, Adrià i Biel.*

*A minha família: Mamãe, papai, Túlio, Chris.*

*A la meua família política: Carmen i Josep Maria. Keith.*

*Als meus Directors de Tesi: Jose Domínguez, Neus Altet, Juan Ruiz Manzano*

*Als meus mestres: Rafel Vidal, José Alcaide.*

*Als companys de Drassanes: Cèlia, Àngels, Jordi, Toni, Adela, Eli, Pilar, Conxita, Maria, Araceli, José, Josep, Mónica, Maria José, Rafi.*

*Als companys de Can Rutí: Irene, Alicia i Cristina. Juanjo. Irma.*

*Als companys de la Vall d'Hebron: Ferran Morell, Jaume Ferrer, Núria Martín, Marc Miravittles, Asun Seminario.*

*Als companys de Salut Pública: Joan Caylà, Anna Rodés, Àngels Orcau i Imma Badosa.*

*I thank my TBNET colleagues: Christoph Lange, Martina Sester, and Delia Goletti.*

*I thank my English teacher: Peter Bokor.*

*A la Lua per la seva grata companya.*

**I a tots aquells que com jo estimen i treballen amb aquesta malaltia "eradicada".**





<b>SUMMARY .....</b>	<b>13</b>
LLISTAT D'ACRÒNIMS .....	21
ARTICLES EN ELS QUE ES BASA LA TESI: .....	23
ARTICLES COMPLEMENTARIS QUE NO FORMEN PART DE LA TESI .....	25
<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>27</b>
1.1. La tuberculosi de la prehistòria als nostres dies.....	29
1.1.1. La tuberculosi estat actual al món .....	32
1.1.2. La tuberculosi estat actual al nostre entorn .....	35
1.2. Gènere <i>Mycobacterium</i> .....	36
1.2.1. Complex <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	37
1.2.2. Micobacteris no tuberculosos .....	38
1.3. Història natural i immunopatologia. ....	42
1.3.1. Patogènia de la tuberculosi .....	42
1.3.2. Immunopatologia de la tuberculosi.....	43
1.3.3 Cadena Epidemiològica. Reservori. Font d'infecció .....	46
1.3.4 Mecanismes de transmissió .....	46
1.3.5. Factors condicionants de la transmissió .....	47
1.3.6. Factors de susceptibilitat a la malaltia.....	49
1.4 La infecció tuberculosa. ....	51
1.4.1. Diagnòstic de la infecció tuberculosa.....	51
1.4.1.1. Història de la tuberculina .....	51
1.4.1.2. Fonament de la prova de la tuberculina .....	52
1.4.1.3 Interpretació del resultat.....	53
1.4.1.4 Inconvenients de la prova de la tuberculina.....	55
1.4.2 Estudi de contactes .....	56
1.4.2.1 Fonament i necessitat de l'estudi de contactes .....	56
1.4.2.2 Recerca del cas índex i les vies de transmissió.....	56
1.4.2.3 Estratègies de l'estudi de contactes....	57

## ÍNDIX

1.4.2.4. Identificació i avaluació dels contacte .....	58
1.4.2.5. Tractament profilàctic dels contactes .....	59
1.4.3. Tractament de la infecció tuberculosa.....	60
1.4.3.1 Pautes habituals .....	60
1.4.3.2. Noves pautes .....	60
1.5. Vacuna BCG.....	61
1.5.1 Origen de la BCG.....	61
1.5.2. Resposta immunològica enfront a la BCG.....	63
1.5.3. Controvèrsia de la efectivitat de la BCG .....	64
1.5.4. Indicacions actuals de la BCG.....	65
1.5.5. Contraindicacions i precaucions .....	66
1.6. Malaltia tuberculosa.....	66
1.6.1 Manifestacions clíniques: .....	66
1.6.2 Tècniques de diagnòstic de la malaltia tuberculosa....	69
1.6.2.1. La prova de la tuberculina .....	69
1.6.2.2. Diagnòstic radiològic.....	69
1.6.2.3. Diagnòstic microbiològic.....	71
1.6.2.3.1. Examen microscòpic .....	71
1.6.2.3.2. Detecció directa d'àcids nucleics de <i>M. tuberculosis</i> .....	72
1.6.2.3.3. Cultiu i identificació de micobacteris .....	72
1.6.2.3.4. Estudis de sensibilitat <i>in vitro</i> : .....	73
1.6.3. Tractament de la malaltia tuberculosa. ....	76
1.6.3.1. Fonaments bacteriològics .....	77
1.6.3.2. Fàrmacs antituberculosos.....	78
1.6.3.3. Pautes terapèutiques .....	79
1.6.3.4. Nous fàrmacs antituberculosos .....	79
1.6.4. Tuberculosi Infantil.....	81
1.7. Diagnòstic basat en la producció de Interferon-gamma .....	82
1.7.1 Regió RD1 .....	82
1.7.2. Antígens RD1 .....	83
1.7.3. Tècniques de diagnòstic de la infecció tuberculosa .....	84

1.7.3.1 Tècniques <i>in vivo</i> .....	84
1.7.3.2 Tècniques <i>in vitro</i> .....	84
1.7.4. Normatives d'utilització dels IGRAs .....	90
<b>2. JUSTIFICACIÓ</b> .....	<b>93</b>
<b>3. OBJECTIUS</b> .....	<b>99</b>
<b>4. RESULTATS</b> .....	<b>103</b>
4.1. Article 1 .....	105
4.2. Article 2.....	117
4.3. Article 3.....	129
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>141</b>
5.1 Habilitat del QFN-G-IT i el T-SPOT.TB en diagnosticar la TB activa en adults en comparació amb la PT en diferents etapes de la malaltia. ....	143
5.2 El diagnòstic de la infecció tuberculosa en nens: anàlisi de les discordances utilitzant assaigs <i>in vitro</i> i la prova de la tuberculina.....	147
5.3 Correlació entre la prova de la tuberculina i els IGRA amb els factors de risc per a la propagació de la infecció en contactes amb bacil·loscòpia positiva en la tuberculosi pulmonar. ....	150
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>155</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>159</b>
<b>ANNEX I</b> .....	<b>171</b>
<b>ANNEX II</b> .....	<b>177</b>
<b>ANNEX III</b> .....	<b>199</b>
<b>ANNEX IV</b> .....	<b>213</b>
<b>ANNEX V</b> .....	<b>223</b>



### SUMMARY

The World Health Organization estimated approximately 8.6 million new cases of tuberculosis in 2011. Studies published in the 1980s indicated that 5 - 10% of recently infected contacts develop into active disease within 2 to 5 years after exposure to an infectious source; while another 5 - 10% develop tuberculosis sometime throughout the rest of their lives.

Tuberculosis prevention relies on the targeted identification and prevention-treatment of individuals who display an increased risk of developing the disease. Identification of infected individuals is done by evaluating the presence of an adaptive immunity against *Mycobacterium tuberculosis*, in the absence of the active disease.

Until recently, the only available tool for the diagnosis of tuberculosis infection was the tuberculin skin test (TST). This technique is theoretically simple, inexpensive, accessible, and standardized, and has been used for the past 100 years as the only method for the diagnosis of tuberculosis infection.

However, outside specialized tuberculosis units, there is a lack of knowledge about the TST in clinical practice, as well as there being frequent errors in the application of the technique, both in the reading and in the interpreting of the results. Another drawback is that most of the proteins present in PPD are not specific to *M. tuberculosis*, but are shared with other mycobacteria. This causes a decrease in the specificity of the test, as individuals sensitized by prior exposure to other mycobacteria or vaccinated with BCG also respond immunologically to PPD.

The test may also have a low sensitivity in immunocompromised patients with very advanced tuberculosis or in children. Yet another disadvantage is that the repeated use of the test in some conditions can produce a booster effect (false positives of antigenic stimulation). In addition, the test requires a second visit, in order to read the results within the following 48 – 72 hrs, which accounts for

## SUMMARY

the patient missing work or missing school hours. To note as well, the result of a positive test is physically evident, possibly causing problems of confidentiality and perhaps generating much concern.

In order to improve the sensitivity and specificity of the diagnosis of tuberculosis infection, some laboratory techniques have been developed. In the last years, interferon- $\gamma$  (IF- $\gamma$ ) release assays (IGRAs), the Quantiferon-TB Gold in Tube (QFN-G-IT) (QIAGEN, Düsseldorf, Germany), as well as the T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Limited, Abingdon, UK), have been introduced into clinical practice as laboratory methods for the immunodiagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI).

These techniques quantify the cellular immune response by detecting IF- $\gamma$ , produced by T cells sensitized previously, in response to *in vitro* stimulation with specific antigens of tuberculosis bacillus. The specific antigens used for stimulation of T cells are ESAT-6, CFP-10 and TB7.7 which are encoded by the RD1 and RD11 regions of the *M. tuberculosis*. These regions are present in the *M. tuberculosis complex* but absent in the BCG vaccine strain and most environmental mycobacteria.

QFN-G-IT uses whole blood, which is stimulated with specific antigens (ESAT-6, CFP-10 and TB7.7). The ELISA technique determines the amount of IF- $\gamma$  expressed in IU / ml. T-SPOT.TB requires prior separation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), followed by incubation with monocyte antigens. The reading of the T-SPOT.TB is done using the technique of ELISPOT, in which each spot represents an IF- $\gamma$  secretory T cell.

The results seem to show that these two techniques are able to distinguish between individuals truly infected with *M.tuberculosis*, and those who falsely react to TST from having been vaccinated with BCG or who have been infected with other mycobacteria. The tests include controls which allow them to detect and exclude anergy and false negatives.

## SUMMARY

Other advantages of these tests are that they avoid being subjective, usually caused by the interpretation of results; if necessary their repetition is possible without causing booster effect; they are fast, in that they obtain results within 24 hrs; a second visit in order to obtain results is not necessary; the work is done in the laboratory, which in turn protects the privacy of the patient.

A disadvantage of these tests, when comparing to the TST, is the higher initial cost. The implementation of the new tests, however, in the medium-term can represent a savings in health care resources, by reducing false positives in the TST and the costs of x-rays, of doctor visits, and of unnecessary treatments for tuberculosis infection. For these reasons, many countries with the proper financial resources have already incorporated them in their clinical practice.

This thesis is based on a study conducted jointly by the Tuberculosis Unit of Drassanes, in Barcelona, and by the Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, in Badalona, who together pioneered the introduction of these techniques in Spain. The purpose of the study was to test and compare the clinical utility of both IGRA techniques and TST in different situations.

The thesis focuses on the applicability in clinical practice of the new techniques as a complementary tool for the diagnosis of tuberculosis in adults; the diagnosis of tuberculosis infection in the pediatric population, and its use in the study of smear-positive contacts of patients of all ages.

We assessed the positivity of the QFN-G-IT and the T-SPOT.TB test in adult patients with active tuberculosis. The overall sensitivity in microbiologically confirmed patients, including both those at the beginning and during the treatment, was 75.9% using T-SPOT.TB and 58.2% using QFN-G-IT.

T-SPOT.TB produced significantly more positive results than QFN-G-IT ( $P = 0.003$ ), with poor agreement ( $\kappa = 0.44$ ; standard error [SE] = 0.096). However, when only analyzing patients included at the beginning of the treatment, the sensitivity increased to 83.3% for T-SPOT.TB and 69.4% for

## SUMMARY

QFN-G-IT. Differences between both tests were not significant ( $P = 0.125$ ,  $\kappa = 0.43$ ,  $SE = 0.153$ ). In contrast, while evaluating patients during treatment, the sensitivity of the T-SPOT.TB and QFN-GIT decreased to 69.8% and 48.8%, respectively. In this case, the difference in the number of positive results between the 2 tests was also significant ( $P = 0.022$ ,  $\kappa = 0.42$ ,  $SE = 0.127$ ).

We also studied the T cell IF- $\gamma$  responses during treatment, after curative treatment, and in self-healed patients. Although the differences in sensitivity between patients evaluated at the beginning and during the treatment were not significant for T-SPOT.TB ( $P = 0.209$ ) or for QFN-G-IT ( $P = 0.078$ ), the number of responding T cells after stimulation with ESAT-6 and the IFN- $\gamma$  released after specific antigen stimulation was significant ( $P = 0.004$  and  $P = 0.030$ , respectively). The number of responding T cells after stimulation with CFP-10 was not significant; however, we observed differences when comparing patients at the beginning, with patients recruited after more than 5 months of treatment. The results, obtained in the 10 patients monitored from the beginning and during the treatment, showed that there is considerable inter-individual variation in terms of the rate of decline of the response.

We concluded that the response to the specific antigens increased after finishing the treatment, comparing them with the values during the treatment. The T-SPOT.TB was more sensitive in patients with active TB than the QFN-G-IT. The IFN- $\gamma$  tests could be used as a complementary method in the diagnosis of active TB.

Children have a high risk of progression to active tuberculosis; therefore a rapid and specific diagnosis LTBI is essential in preventing the progression to disease. We studied the performance of IF- $\gamma$  tests and of TST in diagnosing tuberculosis infection in children, and we analyzed discordant results in a prospective study, including 98 children from contact-tracing studies and 68 children with  $TST \geq 5\text{mm}$ , recruited during public health screenings. The agreement between TST and IFN- $\gamma$  tests was high in non-BCG-vaccinated children. Variables



## SUMMARY

associated with discordant results between TST and IFN- $\gamma$  tests in multivariate analysis were the following: belonging to the screening group (adjusted OR=6.9; 95%CI=3.4.14.4;  $p<0.001$ ); being vaccinated with BCG (adjusted OR=10.1; 95%CI=3.3.30.9;  $p<0.001$ ); and a TST with induration between 5-9 mm (adjusted OR=10.4; 95%CI=3.5.31.1;  $p<0.001$ ).

The positive IFN- $\gamma$  test results were associated with risk of exposure ( $p<0.0001$ ). T-SPOT.TB was positive in 11 of 14 cases with active TB (78.6%) and QFN-G-IT in 9 of 14 (64.3%). In 6 of 12 children non-BCG-vaccinated, with a TST induration between 5 and 9 mm, and both IFN- $\gamma$  tests negative, the detection of sensitized T cells against *Mycobacterium avium* was positive.

In concordant IFN- $\gamma$  tests results, a positive correlation was found ( $p=0.0001$ ) between the number of responding cells and the amount of IF- $\gamma$  released; however, in discordant IFN- $\gamma$  test results, this correlation was negative ( $p=0.371$ ): an increase in the number of spot forming cells correlated with a decrease in the amount of IFN- $\gamma$  released. These findings may suggest an immunological dysfunction, related with a decreased production of IF- $\gamma$  or a decrease in the number of IF- $\gamma$  producing cells. Both situations have been associated with increased risk of developing active TB.

These tests were not able to distinguish between latent infection and active TB, as no significant differences were detected among children infected or sick, based on the number of activated T cells or on the amount of IFN- $\gamma$  released after antigenic stimulation.

Previous sensitization by non tuberculous mycobacteria (NTM) can cause false positive results of the TST in children. The use of IFN- $\gamma$  tests is helpful for the diagnosis of TB infection, as they avoid cross-reactions with BCG immunisation and NTM infections. The analysis of highly discordant results requires further investigation in order to bring to light possible clinical implications.

In order to follow up on this hypothesis, we initiated a new study using *Mycobacterium avium* complex specific glycopeptidolipids (GPLs). PBMCs were isolated from each individual and stimulated with *M. avium* serovar 4 GPLs. The

## SUMMARY

presence of sensitised T-cells against the antigens was analysed by means of ELISPOT *in house*. Preliminary results, in the first 38 individuals studied, found that within the study group (6 non-BCG vaccinated children with positive TST and negative T-SPOT.TB), 100% responded to the stimulation with GPLs while none of the negative individuals (8 children with a negative TST and T-SPOT.TB) showed a positive ELISPOT result after stimulation. The response to GPLs in children with LTBI (16 paediatric patients testing positive for both TST and T-SPOT.TB) was negative in all cases. In valid cases, a positive result in response to GPLs was obtained in patients with confirmed *M. avium* complex infection (5/5). In the end, only one of the two TB patients responded when stimulated with GPLs.

The results, although preliminary and still unpublished, suggest that non-BCG children, who respond to TST and have negative IGRA results, could be sensitised to NTM and may not require treatment for LTBI.

The spread of tuberculosis in confined spaces is strongly influenced by the number of nuclei of infected droplets in the air, the viability of *M. tuberculosis* bacilli, and the duration of exposure. Living in crowded conditions increases the risk of tuberculosis infection. Cough decreases the delay in the diagnosis of TB, increasing suspicion, but also increasing the spread of the disease.

The aim of this study was to assess the association between the positivity of TST and of IGRAs, with various risk factors for the spread of the disease, such as: the presence of a cough and diagnostic delay in the index case; the size of the room and the overcrowding in the environment where the contact took place. We also compared the performance of the 3 tests, the agreement between them, as well as their correlation with the time of exposure in contacts of patients with pulmonary tuberculosis smear positive.

The TST positivity was not correlated with any risk factors: cough; delayed diagnosis; room size; overcrowding. However both IGRA showed a significant association with cough and with room size. In addition, T-SPOT.TB showed a

## SUMMARY

trend towards association with delayed diagnosis, without reaching statistical significance. In adults, we found a higher amount of responding T cells after stimulation with CFP-10 ( $p = 0.029$ ), ESAT6/CFP10 ( $p = 0.042$ ) and in the amount of IFN- $\gamma$  released ( $p = 0.015$ ) in adults contacts with  $>6$  h of exposure, in comparison to the contacts with  $<6$  h of exposure.

This study is the first in the literature that has investigated the role of the environment and of host-related risk factors for TB infection using TST and IGRAs. We concluded that both IGRAs associated better than TST with certain risk factors involved in the transmission of the disease, such as cough, and the size of the room where contact was made.

The results of all the studies presented in this doctoral thesis show that the new laboratory methods for the immunodiagnosis of latent tuberculosis infection, can help in daily clinical practice in the diagnosis of tuberculosis – the disease as well as the infection thereof. Although the IFN- $\gamma$  tests are not able to distinguish between latent and active tuberculosis, they can be used even now, as a complementary method in the diagnosis of active TB, and as the main tool in the management of contact studies, both in children as well as in adults.

The great contribution of IGRAs has been to open a whole new line of research in laboratory tests based on the immunology of the tuberculosis. There is hope that the future will bring new generations of these tests, which will be able to differentiate between infection and disease, greatly helping to improve diagnosis and to optimize treatment.



## LLISTAT D'ACRÒNIMS:

<b>ADN</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>BCG</b>	Bacil de Calmette-Guerin
<b>CFP-10</b>	Culture filtrate protein 10 kDa
<b>CMH-II</b>	Complex major d'histocompatibilitat classe II
<b>CPA</b>	Cèl·lula presentadora d'antigen
<b>ECC</b>	Estudi de Contactes Convencional
<b>EEA</b>	European Economic Area
<b>EFTA</b>	The European Free Trade Association
<b>ESAT-6</b>	Early secreted antigen 6 kDa
<b>E</b>	Etambutol
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>H</b>	Isoniazida
<b>IF-<math>\gamma</math></b>	Interferó-Gamma
<b>IGRA</b>	Interferó-Gamma Release Assay
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MNT</b>	Micobacteris no tuberculosos
<b>OMS</b>	Organització Mundial de la Salut
<b>PAS</b>	Àcid p-aminosalicílic
<b>PPD</b>	Derivat proteic purificat
<b>PT</b>	Prova de la tuberculina
<b>QFN-G-IT</b>	Quantiferon Gold <i>in tube</i>
<b>R</b>	Rifampicina
<b>RD</b>	Regió de diferència
<b>SIDA</b>	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
<b>TAC</b>	Tomografia Axial Computeritzada
<b>TB</b>	Tuberculosi
<b>TB-MDR</b>	Tuberculosi Multidrogoresistent
<b>TIT</b>	Tractament de la infecció tuberculosa
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosi tumoral-alfa
<b>VIH</b>	Virus d'immunodeficiència humana
<b>XDR</b>	Resistència expandida
<b>Z</b>	Pirazinamida



## ARTICLES EN ELS QUE ES BASA LA TESI

### ARTICLES EN ELS QUE ES BASA LA TESI:

#### Article 1

Domínguez J, **De Souza-Galvão M**, Ruiz-Manzano J, Latorre I, Prat C, Lacomá A, Milà C, Jiménez MA, Blanco S, Maldonado J, Altet A, Ausina V.

**T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patients at the beginning, during, and after antituberculosis treatment.**

*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 63 (2009) 43–51.

Factor d'impacte: 2,139

#### Article 2

Altet-Gómez N, **De Souza-Galvão M**, Latorre I, Milà C, Jiménez MA, Solsona J, Cantos A, Zamora JJ ; Ruiz-Manzano J, Ausina V, Domínguez J.

**Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using *in vitro* tests and tuberculin skin test.**

*Eur Respir J.* 2011 May;37(5):1166-74

Factor d'impacte: 5,895

#### Article 3

**De Souza-Galvão ML**, Latorre I, Altet-Gómez N, Jiménez-Fuentes MA, Milà C, Solsona J, Seminario MA, Cantos A, Ruiz-Manzano J, Domínguez J.

**Correlation between tuberculin skin test and IGRAs with risk factors for the spread of infection in close contacts with sputum smear positive in pulmonary tuberculosis.**

*BMC Infectious Diseases.*2014, 14:258

Factor d'impacte: 3,025





**ARTICLES COMPLEMENTARIS QUE NO FORMEN PART DE LA TESI**

**Annex I**

Domínguez J, Ruiz-Manzano J, **De Souza-Galvão M**, Latorre I, Milà C, Blanco S, Jiménez MA, Prat C, Lacoma A, Altet N, Ausina V.

**Comparison of Two Commercially Available Gamma Interferon Blood Tests for Immunodiagnosis of Tuberculosis.**

*Clin Vaccine Immunol.* 2008 Jan;15(1):168-71.

**Annex II**

Domínguez J, Latorre I, Altet N, Mateo L, **De Souza-Galvão M**, Ruiz-Manzano J, Ausina V.

**IFN- $\gamma$ -release assays to diagnose TB infection in the immunocompromised individual.**

*Expert Review of Respiratory Medicine, June 2009, Vol. 3, No. 3, Pages 309-327.*

**Annex III**

Latorre I, **De Souza-Galvão M**, Ruiz-Manzano J, Lacoma A, Prat C, Fuenzalida L, Altet N, Ausina V, Domínguez J.

**Quantitative evaluation of T-cell response after specific antigen stimulation in active and latent tuberculosis infection in adults and children.**

*Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009 Nov;65(3):236-46

**Annex IV**

Latorre I, **De Souza-Galvão M**, Ruiz-Manzano J, Lacoma A, Prat C, Altet N, Ausina V, Domínguez J.

**Evaluating the non-tuberculous mycobacteria effect in the tuberculosis infection diagnosis.**

*Eur Respir J.* 2010 Feb;35(2):338-42

**Annex V**

Latorre I, Altet N, **de Souza-Galvão M**, Ruiz-Manzano J, Lacoma A, Prat C, Pérez M, Ausina V, Domínguez J.

**Specific *Mycobacterium tuberculosis* T cell responses to RD1-selected peptides for the monitoring of anti-tuberculosis therapy.**

*Scand J Infect Dis.* 2012 Mar;44(3):161-7.



# 1. INTRODUCCIÓ



## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. La tuberculosi: de la prehistòria als nostres dies.

La tuberculosi (TB) és una de les malalties més antigues que afecten els éssers humans. Tot i que les primeres evidències de la malaltia es varen trobar en restes òssies del període neolític (5.000 aC.), estudis més recents suggereixen que el microorganisme progenitor del *Mycobacterium tuberculosis* podria estar present en els primers homínids des de fa més de 3 milions d'anys (1).

El document mèdic egipci més famós, "el papir d'Ebers" (1550 aC.), conté la descripció d'una malaltia consumptiva pulmonar associada a adenopaties cervicals que podria molt bé correspondre a la primera descripció del quadre clínic de la TB pulmonar. S'especula que Amenophis IV i la seva esposa Nefertit puguin haver mort per la TB. S'han trobat indicis de TB vertebral en moltes mòmies egípcies i estudis genètics han pogut comprovar-hi la presència de fragments de material genètic del *M. tuberculosis* (2).

A Catalunya l'anàlisi de l'ADN de les despulles de Pere el Gran, Rei d'Aragó ha permet determinar com a probable causa de la seva mort una tuberculosi pulmonar (3).



**Figura 1:** Pere el Gran, III d'Aragó, I de Sicília, I de València i II de Barcelona.

## INTRODUCCIÓ

A la Grècia clàssica, Hipòcrates va descriure una supuració pulmonar amb posterior ulceració que va denominar "tisi" i va suggerir un origen hereditari en constatar un major nombre de casos entre membres de la mateixa família (4). El filòsof Aristòtil va ser el primer a insinuar la possibilitat de contagi a través de la respiració. Però la naturalesa infecciosa de la malaltia només va quedar establerta el 1865 per Jean-Antoine Villemin, qui va inocular pus de lesions humanes a conills comprovant que desenvolupaven la malaltia (5).

Al 1882 el bacteriòleg alemany Robert Koch va reproduir la malaltia infectant conills i conillets d'Índies i va aconseguir recuperar el bacil en cultiu pur a partir d'aquests animals. Aquests resultats els va presentar el 24 de març del 1882 a la Societat Fisiològica de Berlín en la conferència "*Über Tuberculose*". Aquests experiments li van permetre elaborar els seus famosos postulats que estableixen les condicions que ha de tenir un microorganisme per ser considerat l'agent causal d'una malaltia infecciosa i en aquesta data es celebra el "Dia Mundial de la Tuberculosi" (6). També va elaborar una tinció específica per a visualitzar els bacils fent servir una solució alcalina de blau de metilè. Posteriorment van ser Franz Ziehl i Friederich Neelsen els qui van modificar aquesta tècnica fent servir una solució de fenol amb carbol-fucsina i fucsina bàsica, desenvolupant la tinció de Ziehl-Neelsen que encara avui dia s'utilitza per visualitzar els micobacteris.

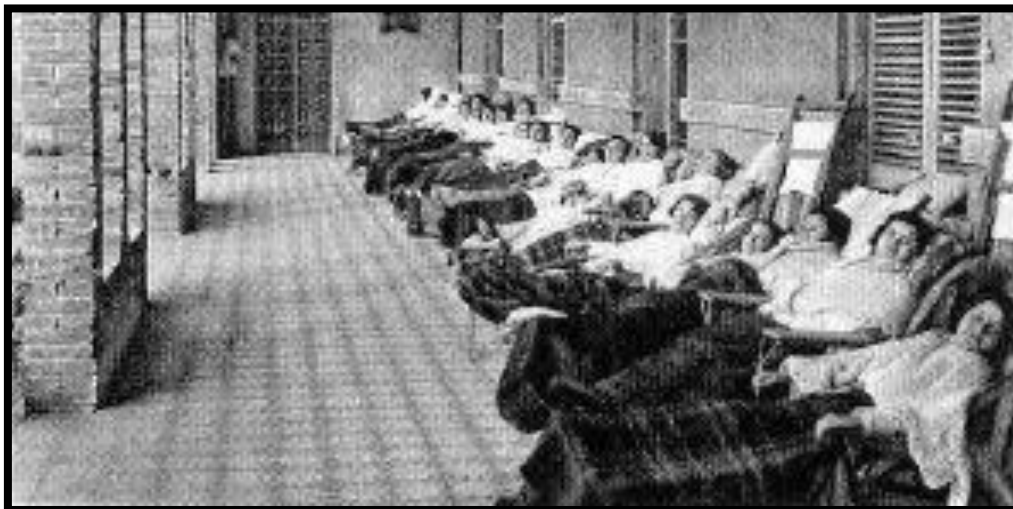


**Figura 2:** Robert Koch. 1843-1910

## INTRODUCCIÓ

Al 1908 de nou el mateix Koch va desenvolupar, en col·laboració amb el veterinari Camille Guérin, la tuberculina, el derivat proteic purificat a partir del bacil que inicialment va creure útil com agent immunitzant, però que posteriorment Charles Mantoux va introduir com a prova diagnòstica.

A finals del segle XIX i començaments del XX, l'observació empírica del fet que en poblacions situades a alçades superiors als 1.200 m. sobre el nivell del mar els casos de TB disminuïen, va fer creure als investigadors que existia una "immunitat física de les alçades". Això va propiciar la creació dels primers sanatoris antituberculosos a llocs amb clima apropiat que permetien aïllar als malalts durant mesos i sotmetre'ls a l'acció suposadament curativa de l'aire pur, el repòs absolut i l'alimentació variada i abundant (7).



**Figura 3:** Malaltes sotmeses a la cura sanatorial a la galeria del sanatori de l'Hospital de l'Esperit Sant (8).

L'any 1921, Albert Calmette i Camille Guérin, mitjançant successius cultius i subcultius d'una soca virulenta de *Mycobacterium bovis*, van aconseguir aïllar una soca menys virulenta que van anomenar *M. bovis-BCG* (Bacil de Calmette-Guerin) i van desenvolupar la primera vacuna contra la TB.

El 1944 durant la Segona Guerra Mundial, Albert Schatz i Selman Waksman van descobrir que un petit fong (el *Streptomyces griseus*) era capaç d'inhibir el creixement del *M. tuberculosis* i van aïllar l'estreptomicina, el primer medicament actiu enfront de la TB. Poc després, l'àcid p-aminosalicílic (PAS) va ser afegit a l'ús clínic i ambdós van ser estudiats en un assaig clínic controlat que va demostrar que la teràpia combinada era més efectiva que la monoteràpia (9). Els principals antibiòtics específics contra la TB van ser introduïts en la pràctica clínica en les dècades dels 50 i 60: la isoniazida (hidrazida de l'àcid isonicotínic), la pirazinamida (1952), l'etambutol (1961) i la rifampicina (1966). No va ser fins l'any 2013 quan es va comercialitzar un nou fàrmac específic pel tractament de la TB, la bedaquilina (10).



**Figura 4:** de l'Estreptomicina a la Bedaquilina.

### 1.1.1. La tuberculosi: estat actual al món

Amb la incorporació dels fàrmacs antituberculosos, la utilització de la radiografia de tòrax, la implantació de programes de control de la TB i la millora de les condicions higièniques i dietètiques de la població es va aconseguir una disminució important de la incidència de la TB, cosa que va fer pensar als anys 80 que la seva eradicació seria possible l'any 2010. No obstant això, des de 1985 les taxes de TB van augmentar de nou i de manera espectacular en els països desenvolupats com a conseqüència de l'aparició de l'epidèmia de la SIDA, (11) la detecció de noves soques multiresistents, l'augment de la pobresa als països en desenvolupament i la immigració cap a zones més riques. Tot això afegit a la manca d'interès en la investigació de nous medicaments, nous mètodes diagnòstics i vacunes i certa deixadesa per part dels sistemes de



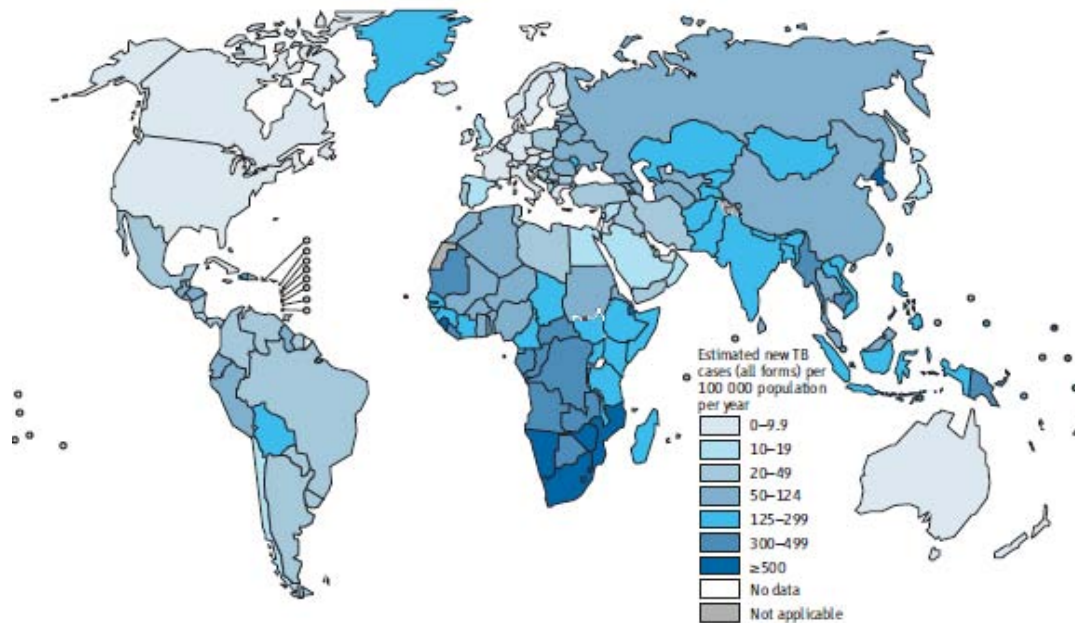
control de salut pública, va fer que la Organització Mundial de la Salut (OMS) hagués de declarar la TB com a emergència global l'any 1993 (12).

La Estratègia "STOP TB" és la base sobre la que s'assenta el "Pla Mundial per a aturar la Tuberculosi 2006-2015", la darrera estratègia posada en marxa per l'OMS llançada en el Fòrum Econòmic Mundial a Davos, Suïssa, el gener de 2006. Aquest Pla té com a objectius: aturar l'increment de la TB a nivell mundial l'any 2015 i començar a reduir la seva incidència; l'accés universal al diagnòstic i al tractament de qualitat de la TB; salvar 14 milions de vides; tractar 50 milions de pacients en total; tractar amb antiretrovirals 3 milions de pacients co-infectats amb el VIH; proporcionar gairebé un milió de tractaments per a la TB multi-drogoresistent (TB-MDR); desenvolupar nous fàrmacs per al tractament de la TB; aconseguir una nova vacuna eficaç i desenvolupar noves proves diagnòstiques ràpides i accessibles a tota la població.

L'any 2011 per primer cop l'OMS comunica que el nombre de persones malaltes i mortes per la TB ha disminuït al món. El nombre de malalts s'ha reduït a 8,8 milions el 2010, després d'haver assolit un pic de 9 milions l'any 2005 i la caiguda en el nombre de casos s'ha mantingut a un ritme del 2%. La taxa de mortalitat ha disminuït un 45% des de 1990 i el món està en camí d'assolir l'objectiu global d'un 50% de reducció per a l'any 2015. Les taxes de mortalitat i incidència són descendents en totes les sis regions de l'OMS i en la majoria dels 22 països amb alta càrrega que representen més del 80% dels casos mundials de tuberculosi. No obstant això, la càrrega mundial de la malaltia segueix sent enorme (13).

Per el 2012, s'estimen 8,6 milions de nous casos de TB, 13% dels quals coïnfectats amb VIH; 1.3 milions de persones van morir de tuberculosi, (incloent 320.000 VIH-positius). D'aquestes morts, 170.000 s'estima que presentaven MDR, una xifra de mortalitat alarmant tenint en compte el número total de casos de MDR estimats (450.000) (14).

Hi ha hagut molts progressos en la disminució de la càrrega de malaltia, però, malgrat la reducció en el nombre de casos, la mortalitat es manté exageradament alta per a una malaltia curable. Àfrica i algunes regions europees no estan en camí d'assolir l'objectiu de reduir a la meitat els nivells de la mortalitat de 1990 per a l'any 2015, en canvi la regió de les Amèriques i la del Pacífic Occidental ja l'han assolit.



**Figura 5:** Les taxes estimades d'incidència de la tuberculosi, 2012 (14).

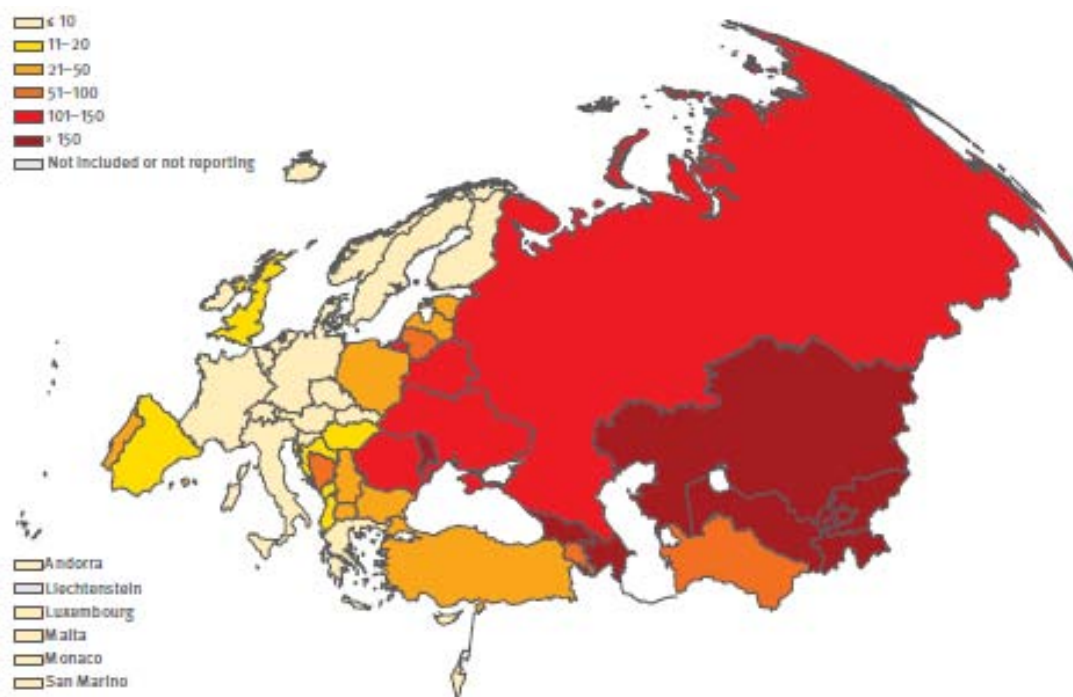
L'Índia i la Xina en conjunt representen gairebé el 40% dels casos de tuberculosi al món. Al voltant del 60% dels casos es troben a la Àsia Sud-oriental i al Pacífic Occidental. Àfrica compta amb 25% dels casos i les taxes més altes de casos i morts per habitant. A nivell mundial s'estima que 3,7% dels nous casos i el 20% dels anteriorment tractats siguin TB-MDR. L'Índia, la Xina, la Federació de Rússia i Sud-àfrica aporten el 60% dels casos mundials de TB-MDR. La major proporció de pacients amb TB-MDR estan a l'Europa oriental i l'Àsia central.

Aquest és el segon any consecutiu en el qual l'informe global de la OMS posa en relleu les xifres de tuberculosi en menors de 15 anys, i per primer cop inclou estimacions de la càrrega entre les dones, desglossat per regions i

estatus de VIH. Es calcula que hi va haver a tot el món 530.000 nous casos i 54.000 morts en menors de 15 anys. En quant a les dones, l'estimació es de 2,9 milions de nous casos i 410.000 morts (14).

### 1.1.2. La tuberculosi: estat actual al nostre entorn

L'any 2011, als països de la Unió Europea i de la zona EEA/EFTA (European Economic Area / The European Free Trade Association) es van registrar 73.996 casos de TB, el que representa una taxa mitjana de 14,6 casos per 100.000 habitants, un 8% inferior a la de l'any 2009 i amb una gran variabilitat entre els països, amb les taxes més altes a Romania (98,2), Lituània (58,2), Letònia (41,5), Bulgària (35,0), Estònia (24,5), Portugal (24,7), Polònia (19,7) i Espanya (15,4) (13).

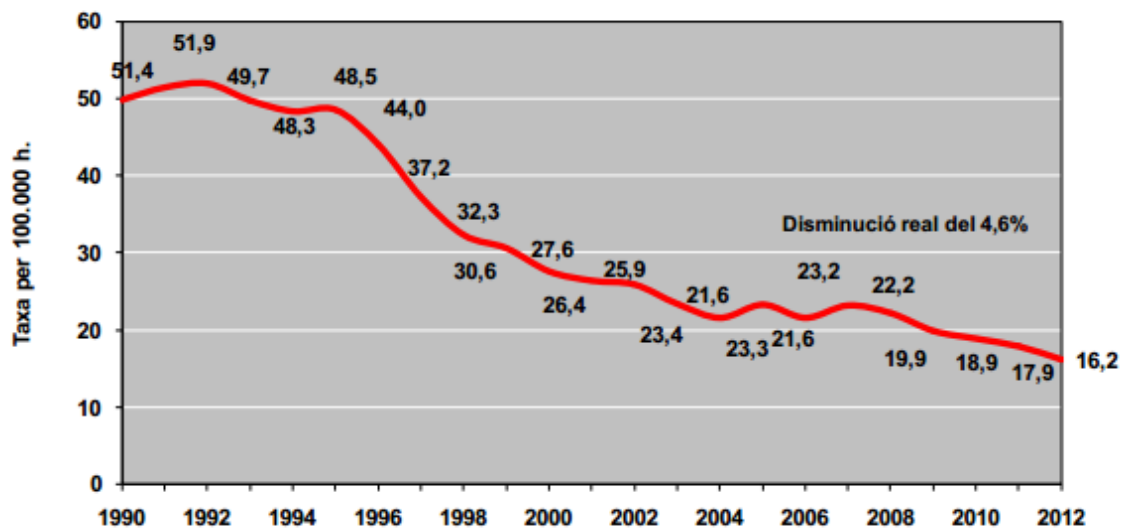


**Figura 6.** Incidència estimada de TB per 100.000 habitants. Regió Europea. 2011 (13).

Espanya és, des de fa anys, un dels països de l'Europa occidental amb un nombre més alt de casos. Els canvis demogràfics produïts durant els darrers

deu anys expliquen que, a les comunitats autònomes amb més immigrants, aquests representin fins al 30%-50% dels casos de TB.

L'any 2012 s'han notificat 1.231 casos de TB en residents a Catalunya, fet que correspon a una taxa de 16.3 casos per 100.000 habitants. Durant aquest any la taxa ha disminuït un 8,9% respecte de la de l'any anterior (figura 7) (15).



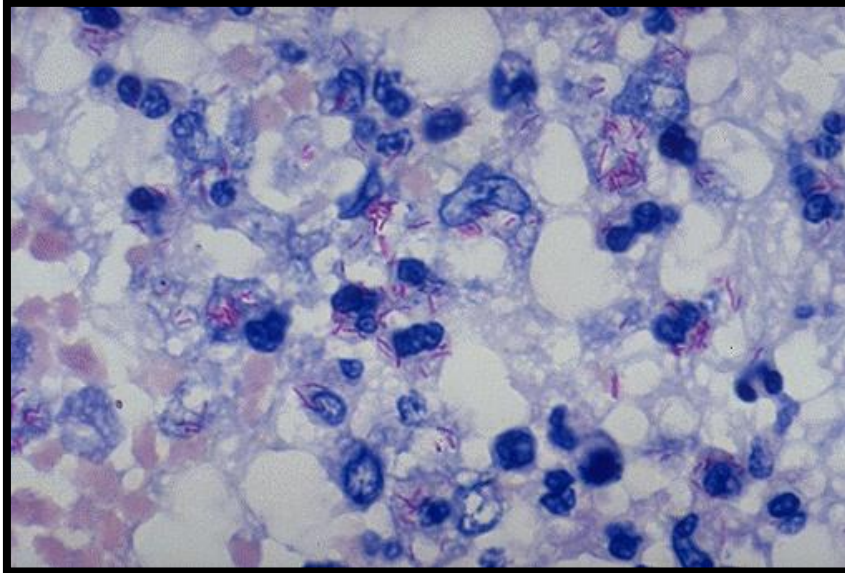
**Figura 7:** Evolució de la tuberculosi a Catalunya (1990-2012) (15).

## 1.2. Gènere *Mycobacterium*

L'ordre dels Actinomycetals inclou la família *Mycobacteriaceae*, *Actinomycetaceae*, *Streptomyetaceae* i *Nocardiaceae*. La família *Mycobacteriaceae* conté un únic gènere, el *Mycobacterium*.

Els micobacteris són microorganismes aerobis o microaeròfils que es classifiquen en grups segons la seva velocitat de creixement (ràpida o lenta) i la producció de pigment segons l'exposició a la llum (fotocromògens, escotocromògens i no cromògens). La seva paret cel·lular conté gran quantitat de lípids, incloent-hi àcids micòlics, cosa que dificulta l'acció dels colorants convencionals, com la tinció de Gram. Un cop tenyits amb colorants bàsics,

resisteixen a l'acció decolorant de solucions alcohòliques d'àcids forts (l'anomenada alcohol-àcid resistència) que és la base de la tinció de Ziehl-Neelsen emprada per a la seva identificació.



**Figura 8:** Tinció de Ziehl-Neelsen

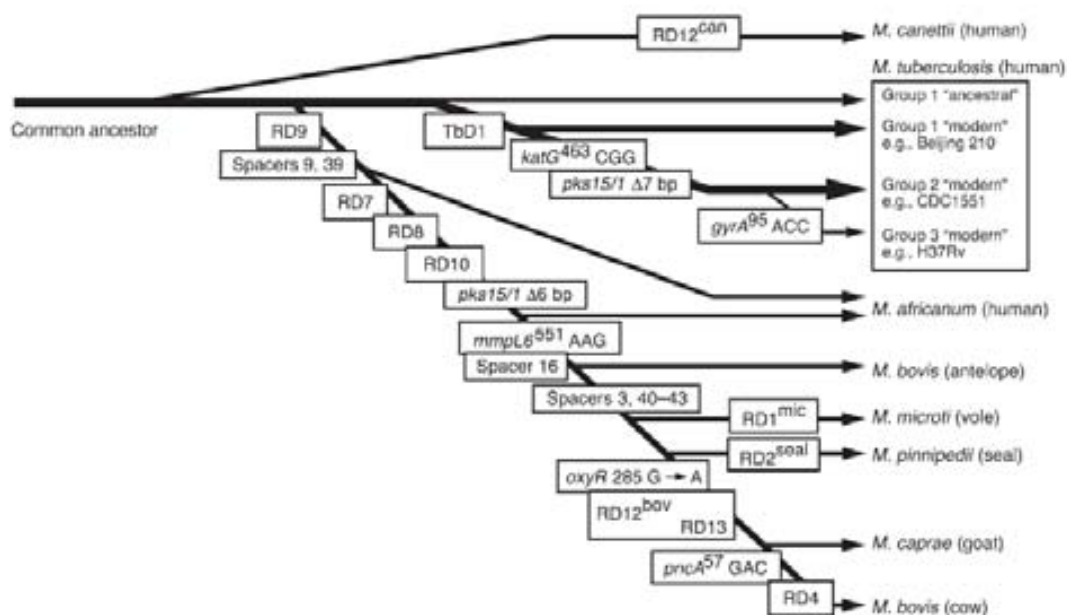
S'han descrit més de 100 espècies de les quals algunes són patògenes obligades com les incloses en el complex *M. tuberculosis* i *Mycobacterium leprae*, d'altres són patògenes oportunistes i la majoria són espècies exclusivament sapròfites.

El *M. tuberculosis* és un bacil prim, de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de llarg per 0,3 a 0,5  $\mu\text{m}$  d'ample, recte o lleugerament encorbat, no esporulat i Gram positiu que creix lentament en els cultius (temps de duplicació de 15 a 18 hores); necessiten entre 2 i 3 setmanes d'incubació a 37°C per a donar lloc a colònies visibles als cultius en medi sòlid.

### **1.2.1. Complex *Mycobacterium tuberculosis***

El complex *M. tuberculosis* engloba un conjunt de micobacteris que presenten més del 99% d'analogia en el seu ADN. Tradicionalment el formaven el *M. tuberculosis*, *M. bovis* (patogen animal), *M. bovis* BCG (variant atenuada de laboratori) i *Mycobacterium africanum* (patogen humà a Àfrica tropical). Els

avenços en genètica dels últims anys han permet d'establir noves espècies com a membres d'aquest complex: *Mycobacterium microti* (patogen de rosegadors i d'altres mamífers), *Mycobacterium canettii* (patogen humà a l'Est d'Àfrica) (16), *Mycobacterium caprae* (patogen animal) (17) i *Mycobacterium pinnipedii* (causant de TB en foques) (18), *Mycobacterium mungi* (TB en mangosta ratllada de Botswana) (19).



**Figura 9:** Esquema filogenètic de l'evolució del complex *M. tuberculosis*. (20)

### 1.2.2. Micobacteris no tuberculosos:

Fins a una tercera part dels micobacteris aïllats en les mostres clíniques dels laboratoris corresponen a micobacteris no inclosos en el complex *M. tuberculosis*. Aquest grup de micobacteris ha rebut diferents noms: micobacteris "atípics", "*Mycobacterium other than tuberculosis*", micobacteris "oportunistes", micobacteris "ambientals" i micobacteris "no tuberculosos" (MNT). Es caracteritzen per la seva baixa virulència i manca de transmissió entre individus i, a diferència del *M. tuberculosis*, el seu aïllament en mostres de pacients no és criteri suficient per a establir el diagnòstic de malaltia (21).

Constitueixen un grup heterogeni de més de 120 espècies, la classificació dels quals ha anat canviant gràcies a les modernes tècniques genètiques que han permès d'identificar més de 30 espècies només en els darrers 3 anys (20).

**Taula 1:** Principals espècies de micobacteris no tuberculosos productors de patologia humana (22).

Pulmonar	Limfàtica	Cutània / Múscul esquelètica	Disseminada
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. abscessus</i></li> <li>• <i>M. asiaticum</i></li> <li>• <i>M. avium</i> complex</li> <li>• <i>M. celatum</i></li> <li>• <i>M. fortuitum</i></li> <li>• <i>M. kansasii</i></li> <li>• <i>M. malmoense</i></li> <li>• <i>M. sulgai</i></li> <li>• <i>M. xenopi</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. avium</i> complex</li> <li>• <i>M. genavense</i></li> <li>• <i>M. malmoense</i></li> <li>• <i>M. scrofulaceum</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. abscessus</i></li> <li>• <i>M. avium</i> complex</li> <li>• <i>M. chelonae</i></li> <li>• <i>M. fortuitum</i></li> <li>• <i>M. kansasii</i></li> <li>• <i>M. malmoense</i></li> <li>• <i>M. marinum</i></li> <li>• <i>M. terrea</i></li> <li>• <i>M. ulcerans</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>M. abscessus</i></li> <li>• <i>M. avium</i> complex</li> <li>• <i>M. celatum</i></li> <li>• <i>M. chelonae</i></li> <li>• <i>M. genavense</i></li> <li>• <i>M. haemophilum</i></li> <li>• <i>M. kansasii</i></li> <li>• <i>M. scrofulaceum</i></li> </ul>

Els MNT es troben àmpliament distribuïts en el medi ambient i es poden aïllar en l'aigua i els seus sistemes de conducció, la terra, animals domèstics i salvatges, en la llet i altres aliments (23). L'home es contamina a través de l'aparell respiratori, gastrointestinal o per inoculació directa a través de la pell i teixits tous. El reservori del *M. avium* complex són les aixetes d'aigua i s'han descrit epidèmies nosocomials que van afectar a malalts amb SIDA (24). *M. kansasii* s'ha aïllat repetidament en sistemes de conducció d'aigua i aixetes, i *M. xenopi* creix a temperatures superiors a 28°, de manera que s'aïlla en els sistemes de conducció d'aigua calenta i pot produir infeccions nosocomials; *M. marinum* es transmet a través de l'aigua salada, aigua embassada (aquaris i piscines) i peix fresc. En canvi els MNT de creixement ràpid (*M. fortuitum*, *M. chelonae*, i *M. abscessus*) s'aïllen a la terra i l'aigua, encara que la causa més comuna de malaltia és per transmissió nosocomial (21) (22).

Les diferents espècies de MNT presenten variacions en la seva distribució geogràfica en funció de la seva capacitat de sobreviure en les diferents condicions ambientals i també en relació amb les possibilitats d'aïllament i identificació dels laboratoris locals. Aquestes variacions geogràfiques en la distribució de les MNT es reflecteixen també en la patologia humana causada per elles (25).

En un ampli estudi retrospectiu sobre els MNT aïllats en mostres clíniques de pacients en Espanya entre l'any 1976 i 1996 es va observar que el nombre de MNT aïllats va anar augmentant gradualment durant els 21 anys de l'estudi, amb un fort increment a partir de l'any 1991, de manera que el 57% dels aïllaments es van aconseguir entre 1993 i 1996. En l'actualitat, a Espanya, les MNT que causen més sovint patologia humana són *M. avium complex* i *M. Kansasii* (26).

El diagnòstic de micobacteriosi pulmonar es basa en els criteris proposats per l'American Thoracic Society (21). Els criteris clínics, radiològics i microbiològics són igualment importants i s'han d'acomplir tots per a fer un diagnòstic de la malaltia pulmonar per MNT.

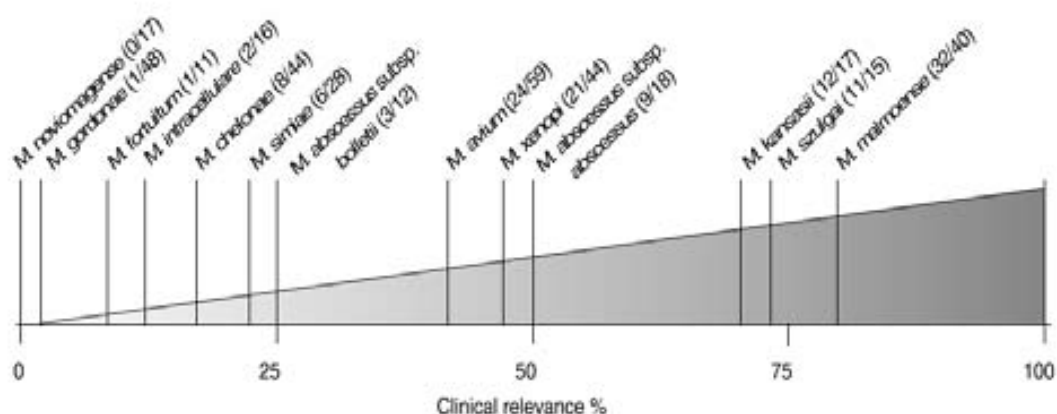
### 1. Clínics:

- a) Síntomes i signes compatibles: tos, febre, pèrdua de pes, hemòptisi o dispnea amb deteriorament de l'estat clínic.
- b) Alteració radiològica: opacitats nodulars o imatges cavitàries en la radiografia simple de tòrax i/o bronquièctasis disperses amb múltiples petits nòduls en la Tomografia Axial Computeritzada (TAC) toràcica.
- c) Exclusió d'altres malalties o tractaments que poguessin produir el deteriorament clínic.

### 2. Bacteriològics: quan es compleixi un o més dels següents apartats:

- a) Cultius positius en mínim dues mostres d'esput, que hauran de repetir si els resultats no són concloents.
- b) Cultiu positiu en mínim una mostra estèril (rentat broncoalveolar, per exemple) .
- c) Biòpsies de teixits: signes histopatològics d'infecció micobacteriana (inflamació granulomatosa o presència de bacils àcid alcohol resistents) i cultiu positiu per MNT o biòpsia amb signes histopatològics d'infecció micobacteriana amb 1 o més cultius positius d'esput o de rentat broncoalveolar.





**Figura 10:** Relevància clínica de les espècies de NTM en aïllaments respiratoris (27).

En general el tractament de les micobacteriosis ha de ser individualitzat i encara presenta nombrosos aspectes controvertits referents a com i durant quant de temps s'ha de tractar. El tractament precoç obté millors resultats i ha de ser indicat i controlat per centres i serveis amb experiència contrastada. L'èxit del tractament dependrà de la forma de presentació clínica, l'espècie de micobacteri responsable, el patró de sensibilitat a fàrmacs de la mateixa, i l'estat immunitari del malalt.

**Taula 2:** Tractaments recomanats per a les MNT que poden produir afectació pulmonar (27).

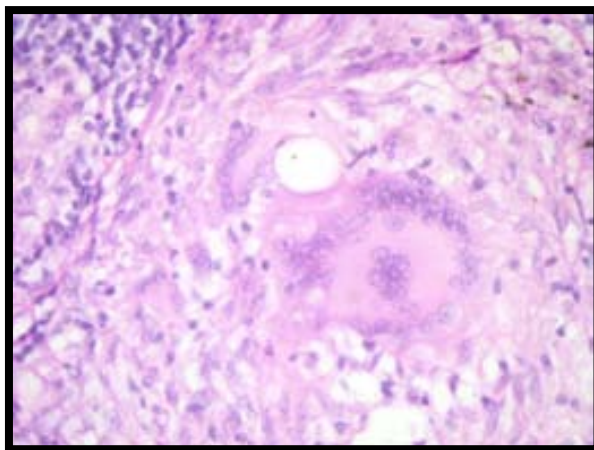
Espècie de MNT	Tractament recomanat
<b><i>M. avium complex</i></b>	Macròlid (Claritromicina/Azitromicina) + Rifampicina (o Rifabutina) + Etambutol
<b><i>M. kansasii</i></b>	Isoniazida + Rifampicina (o Rifabutina) + Etambutol
<b><i>M. szulgai</i></b>	Macròlid + Rifampicina (o Rifabutina) + Etambutol.
<b><i>M. malmoense</i></b>	Macròlid + Rifampicina (o Rifabutina) + Etambutol.
<b><i>M. xenopi</i></b>	Macròlid + Rifampicina (o Rifabutina) + Etambutol.
<b><i>M. abscessus</i></b>	3 o 4 dels següents: amikacina, cefoxitina, imipenem, tigecyclina, linezolid, macròlid.

### 1.3. Història natural i immunopatologia.

#### 1.3.1. Patogènia de la tuberculosi:

Quan un individu no infectat inhala bacils tuberculosos, una part d'aquests arriben fins als alvèols pulmonars, on són fagocitats i destruïts a l'interior dels macròfags sense produir la primoinfecció, o poden sobreviure i multiplicar-se acabant per destruir aquestes cèl·lules i tornar a l'espai extracel·lular. A través del sistema limfàtic i del torrent sanguini són transportats cap als ganglis limfàtics més propers, els de l'hili pulmonar, i simultàniament es disseminen per tot l'organisme, però només nien a les zones d'òrgans amb abundant sistema reticuloendotelial i elevada pressió parcial d'oxigen (28).

La multiplicació dels bacils produeix una quimiotaxi de macròfags i monòcits circulants cap als focus d'infecció que novament fagocitaran als bacils alliberats i aconseguiran destruir molts d'ells. Els bacils supervivents són aïllats per l'organisme amb la creació de nòduls (tubercles o fol·licles) compostos per macròfags vius, macròfags degenerats (cèl·lules epitelioides) i altres fusionats (cèl·lules gegants de Langerhans) i limfòcits T. A l'interior d'aquesta estructura es va formant lentament el càseum, producte resultant de la destrucció de les cèl·lules de la capa interior i dels bacils. El tubercle creix amb fibrosi perifèrica i necrosi central, arribant a constituir-ne el granuloma que tendeix a curar-se amb l'eliminació total dels bacils i la calcificació de l'estructura (29).



**Figura 11:** Anatomia patològica d'un granuloma tuberculós. Cortesia Dr. Francesc Tressera

També pot augmentar de mida englobant cada vegada més teixits perifèrics i patint fenòmens de necrosi amb l'aparició d'enzims proteolítics que liquen el càseum, afavorint la multiplicació extracel·lular dels bacils continguts. El granuloma connecta amb els bronquis i l'oxigen atmosfèric causa un creixement exponencial dels bacils i obre les vies de progressió canal·licular del material caseós que fa sembres broncogèniques al parènquima pulmonar i transforma el malalt en transmissor de bacils al medi ambient. Per aquests mecanismes la necrosi central de la lesió es buida i apareixerà la caverna tuberculosa (30).

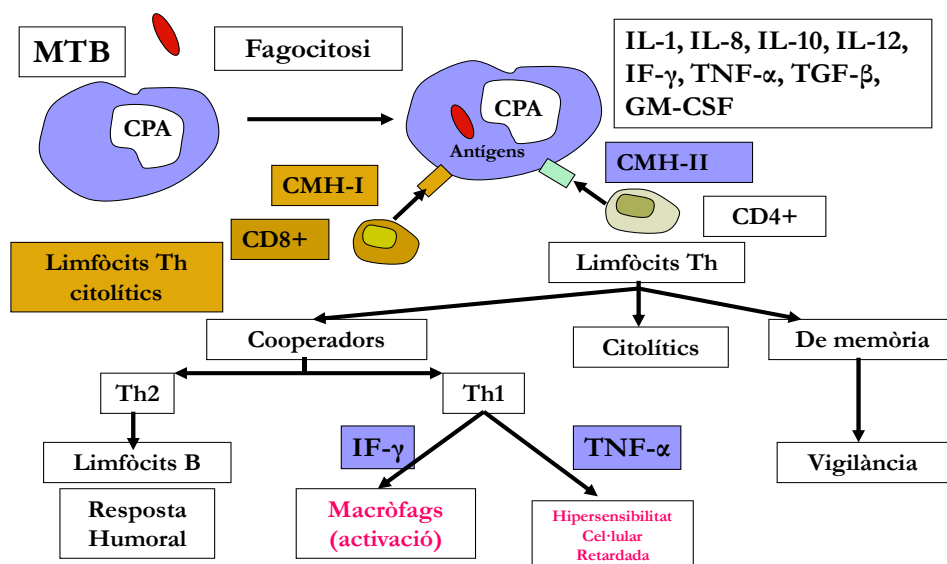
Quan la infecció tuberculosa no progressa a malaltia, es diu que l'individu presenta infecció tuberculosa, està sa, però té en el seu organisme bacils tuberculosos vius. Aquesta situació li confereix una immunitat bastant eficaç, però no absoluta, enfront a infeccions posteriors, encara que també suposa un risc d'emmalaltir. En 10-15% dels individus infectats, la immunitat específica és insuficient per a evitar la malaltia: en els dos primers anys després de la infecció apareixen gairebé el 80% dels casos. La malaltia que es desenvolupa dins dels primers 5 anys després de la infecció primària s'anomena TB primària. El més freqüent és que la malaltia es produeixi alguns anys després de la primoinfecció: és la TB post primària, secundària o de tipus adult, deguda a que el declivi del sistema immunitari permet el desenvolupament dels bacils procedents de la primoinfecció, com passa en el SIDA o amb l'envelliment (TB per reactivació endògena), o bé a que l'individu rep noves exposicions bacil·lars, repetides, abundants o d'especial virulència (TB per reinfecció exògena) (31).

### **1.3.2. Immunopatologia de la tuberculosi:**

Després dels primers dies de la infecció amb el bacil de Koch es posen en marxa mecanismes de defensa més específics, amb una immunitat de tipus retardat i mediada per cèl·lules, que és la immunitat bàsica contra les infeccions predominantment intracel·lulars. La resposta immune cel·lular juga un paper important en la infecció per *M. tuberculosis* principalment el macròfag i les

cèl·lules T (CD4 i CD8). També són importants les cèl·lules dendrítiques en el procés d'estimulació de les cèl·lules CD4 (32).

La interacció del *M. tuberculosis* amb el macròfag s'inicia amb la unió del bacil als receptors i l'entrada del micobacteri a la cèl·lula hoste i l'activació de cascades intracel·lulars que comporten a la producció de citocines. Les citocines pro inflamatòries com interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8 i factor de necrosi tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) es produeixen en les etapes inicials de la infecció, atreuen els neutròfils, limfòcits i macròfags que fagociten els bacils extracel·lulars, i a més generen un focus inflamatori.



**Figura 12:** Immunologia de la tuberculosi. Cortesia Dra. Altet.

Quan el bacil ha estat degradat per processos fagolisossomals, el macròfag com a cèl·lula presentadora d'antigen (CPA) presenta els antigens a través de les molècules del complex major d'histocompatibilitat classe II (CMH-II) a les cèl·lules T CD4. Les cèl·lules T CD4 són importants en el control de la tuberculosi, especialment la subclasse Th1, que produeix citocines com IF- $\gamma$  que activen l'activitat antimicrobiana del macròfag. El paper de les cèl·lules T CD4 ha quedat clar després que en models de ratolins mancats de CD4, es va

observar una major susceptibilitat d'aquests animals a desenvolupar tuberculosi. (33) D'altra banda, pacients infectats amb el virus de la immunodeficiència humana (VIH), són més susceptibles a desenvolupar tuberculosi o presentar una reactivació quan en etapes avançades de la malaltia el nombre de cèl·lules CD4 disminueix. (34)

Posteriorment, els limfòcits T CD4 específics es transformen en limfòcits Th1 sota la influència de la IL-12 secretada pels macròfags. Aquests limfòcits després de la seva activació secreten altres citocines, principalment IF- $\gamma$ , el qual activarà els macròfags infectats, induirà la producció d'intermediaris reactius de nitrogen i afavorirà l'eliminació del bacil.

A més de la resposta de cèl·lules T CD4, s'han aïllat limfòcits T CD8 que reconeixen específicament antígens micobacterians presentats pel complex major d'histocompatibilitat de classe I (CMH-I). Els mecanismes pels quals els antígens són presentats no són del tot coneguts, donat que el micobacteri roman dins el fagosoma i cal que els antígens estiguin al citosol per a ser presentats per CHM-I. Es pensa que hi pot haver inducció d'apoptosi de tal manera que cèl·lules dendrítiques i macròfags puguin accedir als antígens provinents de cèl·lules apoptòtiques i induir una resposta de CD8 específica d'antigen (35).

Al llarg de la malaltia hi ha un balanç continu entre la resposta Th1 i la Th2, ja que es detecta l'expressió tant de citocines de tipus 1 (IF- $\gamma$ ) com de tipus 2 IL-4 i IL-10. Es correlaciona un increment de IL-4 amb la gravetat de la malaltia i cavitació, tot i que no es coneix si aquesta relació és causa o conseqüència de la malaltia (36).

El paper de la immunitat humoral en la resposta a la infecció tuberculosa és controvertit. El bacil tuberculós, per la seva localització intracel·lular no s'exposaria a anticossos, però en alguns moments al llarg del procés esdevindrien extracel·lulars i podrien patir l'actuació dels anticossos. Aquests

podrien tenir funcions de prevenir l'entrada del bacteri a la superfície de les mucoses, la citotoxicitat depenent dels anticossos i la lisi mitjançant el complement. (37) A més, els anticossos poden opsonitzar els bacteris i facilitar la fagocitosi pels macròfags interferint en l'adhesió, promoure la fusió fagosoma-lisosoma, la neutralització de productes microbians o altres possibles mecanismes. També s'ha descrit que la pèrdua de la resposta IgG enfront de l'antigen 14 kDa s'ha associat amb un increment de la mortalitat en adults amb TB pulmonar (38).

### **1.3.3 Cadena Epidemiològica. Reservori. Font d'infecció:**

El reservori principal del bacil és l'home, malalt o infectat. El bestiar boví és el reservori habitual del *M. bovis* i altres animals ho són d'altres micobacteris i també del *M. tuberculosis*. La font de contagi gairebé exclusiva és l'home malalt de TB respiratòria (pulmonar, bronquial o laríngia). El paper com a fonts d'infecció d'altres formes clíniques de TB humana o animal és anecdòtic (39).

La capacitat de contagi d'un malalt està determinada per la comunicació de les seves lesions amb les vies aèries i és major en els malalts que tenen major nombre de microorganismes en elles i que els eliminen abundantment amb les secrecions respiratòries. En aquests casos els gèrmens es fan visibles en l'examen microscòpic (casos amb bacil·loscòpia positiva o bacil·lífers) indicant un alt grau de contagi. Altres malalts amb menys bacils, necessiten el cultiu de l'esput per demostrar-ho (casos amb bacil·loscòpia negativa i cultiu positiu) i tenen una capacitat de contagi 4 vegades menor (40).

### **1.3.4 Mecanismes de transmissió:**

S'han descrit nombroses vies i mecanismes de transmissió, com la digestiva, per la llet de vaques malaltes que encomana l'home a través de l'orofaringe o el tub digestiu; la urogenital, a través de l'orina i per transmissió sexual (41); la cutani-mucosa, d'interès per al personal sanitari, i la via transplacentària, poc freqüent. La més important i habitual és la via aèria, a partir d'un ésser humà o animal malalt o, amb menys freqüència, en manipular les seves secrecions,

mostres clíniques o lesions; durant les necròpsies o manipulació d'animals sacrificats (42).

La transmissió habitual passa a partir d'un individu afecte de TB respiratòria bacil·lífera que en tossir, esternudar, riure, cantar o parlar expulsa a l'aire partícules de secrecions respiratòries que contenen bacils. Aquestes gotes s'assequen ràpidament, convertint-se en «gotetes seques» que tenen entre 3 i 10 bacils cadascuna. Poden romandre suspeses en l'aire durant diverses hores o bé precipitar per tornar a l'aire amb la mobilització de la pols del sòl o dels mobles (el bacil suporta molt bé la dessecació), podent ser inhalades per un altre individu en qui, per la seva mida, el voltant del 6% arriba fins als alvèols pulmonars, on el bacil troba unes condicions de reproducció favorables. Si els bacils aconseguen implantar-s'hi i multiplicar-s'hi, s'ha produït la infecció. (7) Més recentment s'ha descrit l'associació entre els aerosols generats amb la tos i la transmissió de TB entre humans. La mesura directa dels aerosols generats amb la tos en pacients amb TB pulmonar sembla ser un nou predictor quantitatiu de la infecciositat que es podia correlacionar millor amb el risc d'infecció que la bacil·loscopia d'esput (43).

### **1.3.5. Factors condicionants de la transmissió:**

**Extensió de la malaltia:** són altament contagiosos els casos amb bacil·loscòpia positiva i els que tenen caverne en la radiografia de tòrax.

Intensitat i freqüència de la tos: quanta més tos, més contagi; cada atac de tos produeix unes 3.000 gotetes infeccioses.

Producció d'aerosols amb la tos: l'exposició a altes concentracions d'aerosols augmenta el risc d'infecció en els contactes, independentment de la bacil·loscopia (44).

**Volum i viscositat de l'esput:** l'esput poc viscos i més salivós és més idoni per produir aerosols i per tant pot ser més contagiós que l'esput purulent.

**Tractament antituberculós:** els pacients que el reben tenen 50 vegades menys capacitat de contagi. El tractament amb isoniazida i rifampicina redueix el nombre de bacils / ml en un 95% en les dues primeres setmanes en pacients sensibles (45).

**Característiques del bacil:** les diferències entre subllinatges del bacil tuberculós estan associades amb fenotips patològics i clínics diferents que poden afavorir o influir en la capacitat de transmissió d'aquestes soques dins de les comunitats (46) (47).

**Durada i intimitat del contacte:** la taxa de TB clínica i d'infecció per *M. tuberculosis* és molt més gran en contactes íntims i de convivència que en contactes d'escassa durada o esporàdics. A la patogènia de la malaltia té més importància l'exposició reiterada a contagis, encara que siguin poc intensos, que l'exposició ocasional a fonts amb gran capacitat de contagi. Es recomana considerar que el període d'infectivitat del cas índex que és bacil·lífer comença 3 mesos abans del seu diagnòstic. Tot i que existeix la creença que es necessita un llarg període d'exposició per a que s'estableixi la infecció tuberculosa, els estudis més recents mitjançant l'epidemiologia molecular indiquen que els contactes ocasionals poden ser suficients en determinades circumstàncies de la transmissió de la infecció (48).

**Estat immunitari del exposat:** els individus infectats per *M. tuberculosis* presenten una resistència més alta, però no total, a la infecció, en canvi, els que pateixen un dèficit d'immunitat cel·lular són més vulnerables a la infecció, com els VIH positius, per exemple (49).

Es sol infectar al voltant del 50% dels individus exposats a un cas bacil·lífer. Tradicionalment es deia que la infecció ocorria precoçment, abans dels 15 anys en el 80% i abans dels 25 en el 95%, però s'ha demostrat que la transmissió de la infecció es produeix en totes les edats, fins i tot en persones grans que han perdut la memòria immunològica d'infeccions anteriors o en malalts de SIDA que havien patit un episodi anterior de tuberculosi (50).



**Factors ambientals:** concentració de microorganismes en l'ambient: aquesta concentració es pot reduir mitjançant una adequada ventilació, per l'acció bactericida de la llum solar i ultraviolada o per l'ús de filtres (42).

Mishra et al. (51) van relacionar combustibles de biomassa de la cuina i tuberculosi basant-se en una enquesta realitzada a més de 260.000 persones a l'Índia. Aquest estudi va trobar que les dones de llars que utilitzen combustibles de biomassa per cuinar són tres vegades més propenses a patir tuberculosi que les de llars que utilitzen combustibles més nets.

### **1.3.6. Factors de susceptibilitat a la malaltia:**

El 85-90% dels individus infectats no emmalalteixen. El risc de desenvolupar la malaltia no és el mateix per a tota la població. Hi ha factors que influeixen en el seu desenvolupament, no ben coneguts, que condicionen que la tuberculosi sigui més freqüent en determinats grups de població o grups de risc. Entre aquests factors destaquen els següents:

Factors dependents de l'ambient, el volum, la ventilació, la higiene: destaca la durada i la intensitat de l'exposició al contagi, determinada per la intimitat o el grau d'amuntegament entre els exposats i la font d'infecció.

Factors relacionats amb l'hoste, condicionats pel grau de competència de la seva immunitat cel·lular i determinen tant la freqüència com la gravetat de la tuberculosi (52):

**La resistència natural o innata** a conseqüència de la selecció dels individus més resistents produïda després de l'exposició repetida dels avantpassats a la malaltia (53)

**La resistència adquirida** per la infecció prèvia amb un bacil del gènere *Mycobacterium*.

**L'edat:** La primoinfecció entre els 0 i els 4 anys cursa amb freqüència amb disseminacions hematògenes; entre els 6 i els 14 anys hi ha la major resistència

i la tendència a la progressió o la disseminació només passa en el 1-3% dels casos; la pubertat comporta un increment de la susceptibilitat; l'adult té un estat refractari relatiu, augmentant la susceptibilitat a partir dels 65-70 anys.

**Les races** sense una llarga història de tuberculosi són especialment susceptibles a desenvolupar una malaltia ràpidament mortal. Això es deu a la menor resistència natural, però també a factors socioeconòmics i ambientals i no a una veritable predisposició racial intrínseca (54).

**Els factors genètics** implicats amb la susceptibilitat a la TB no són encara del tot coneguts, encara que s'han estudiat molts possibles polimorfismes genètics implicats i s'ha descrit una concordança per TB significativament més gran entre bessons monozigòtics que entre dizigòtics (55).

**El sexe.** Després de la pubertat hi ha un clar predomini de morbiditat per tuberculosi pulmonar entre homes mentre que les xifres s'igualen per la tuberculosi extra pulmonar. No hi ha una explicació convincent per a aquesta diferència, sembla que els homes tenen una major proporció de factors de risc i per tant major exposició a la infecció, o bé que les dones accedeixen menys als serveis de salut, cosa que no passa als països industrialitzats.

**Immunodepressió:** SIDA, l'ús de tractaments immunosupressors (anti-TN- $\alpha$ ), malalties genètiques, neoplàsiques, diabetis, silicosis.

**Factors socials** desfavorables, com a condicions de treball, d'habitatge, amuntegament, mala nutrició, estrès, o consum de substàncies tòxiques, com alcohol, tabac i drogues (56).

També s'ha implicat la presència de polimorfismes genètics del receptor de la **vitamina D** que ocasionen el seu dèficit com factor de risc pel desenvolupament de TB en algunes poblacions (57).

### **1.4 La infecció tuberculosa.**

#### **1.4.1. Diagnòstic de la infecció tuberculosa.**

##### **1.4.1.1. Història de la tuberculina:**

Al 1882, a prop de 8 anys després del descobriment del bacil de la TB, Robert Koch va anunciar la cura de la TB. Va obtenir un filtrat de cultius de *M. tuberculosis* inactivat per la calor i va trobar que aquest material podria protegir els conillets d'índies de la TB experimental. Aquest producte, conegut com "la vella tuberculina de Koch", va ser llavors administrat a pacients tuberculosos amb la intenció de guarir-los de la malaltia.

Però els malalts que van rebre la tuberculina van presentar reaccions sistèmiques generalitzades, amb febre, miàlgies, nàusees, vòmits, mentre els voluntaris sans no van tenir aquesta reacció. Aquestes observacions van ser la base per proposar la tuberculina com una prova diagnòstica, malgrat el seu fracàs com a substància terapèutica (58).

La injecció intradèrmica de la tuberculina va ser descrita per Mantoux, i el seu mètode es va estendre gràcies a la reproductibilitat dels resultats.

El 1934 Florence Siebert es va servir d'un precipitat de filtrats de la vella tuberculina amb sulfat amònic i àcid tricloroacètic i el va nomenar derivat proteic purificat (PPD), creant una gran quantitat entre 1939 i 1941 sent considerada des d'aquest moment el material de referència estàndard per a totes les tuberculines (lot 49.608 de Siebert); l'anomenat PPD-S. Per a reduir l'adsorció de la tuberculina al vidre i contenidors de plàstic, s'hi afegeix una petita quantitat d'un detergent anomenat Tween (Connaught Laboratories, Inc, Swiftwater, PA Park-Davis, Avon CT) i és la tuberculina que s'utilitza per la prova estàndard amb 5 unitats de PPD-S (59).

A Espanya i el sud d'Europa es fa servir la tuberculina PPD-RT 23, que utilitza Tween-80 com adsorbent i la seva potència és diferent a l'anterior (utilitzada en USA) de tal manera que 5 unitats de tuberculina PPD-S equivalen a 2 unitats de tuberculina PPD-RT 23 (60).

També s'utilitza la tuberculina PPD CT 68, canadenca, que difereix en el procediment d'obtenció, en les soques bacil·lars i en el diluent que s'utilitza (diluent Cognaut).

### **1.4.1.2. Fonament de la prova de la tuberculina:**

La PT es fonamenta en la reacció d'hipersensibilitat retardada enfront de determinats compostos antigènics presents en la tuberculina. Molts dels constituents del PPD són proteïnes petites amb pesos moleculars d'aproximadament 10 kDa, però inclou també polisacàrids i alguns lípids.

Quan s'injecten en la dermis petites quantitats del PPD es desenvolupa una reacció inflamatòria local al cap d'unes 24-72 hores en individus que prèviament han estat exposats al bacil. La resposta està mediada per cèl·lules Th1 que penetren en el punt d'injecció de l'antigen, reconeixen complexos de pèptids-MHC de classe II en les cèl·lules que presenten antigen i alliberen citocines inflamatòries. Aquestes augmenten la permeabilitat local dels vasos sanguinis, duen plasma al teixit, es diposita fibrina i recluten cèl·lules accessòries a aquest punt, que provoquen una inflor visible (61).



**Figura 13:** PT amb la tècnica de Mantoux: injecció intradèrmica del PPD.  
Cortesia Adela Cantos.

La reacció comença al cap de 5-6 hores des de la injecció, i es llegeix entre les 48-72 hores, tot i que pot persistir fins a una setmana. Si hi ha hagut reacció es veurà una zona d'eritema i una altra, habitualment més petita, d'induració. S'han de marcar els límits de la induració i mesurar amb un regle transparent en l'eix transversal del braç.

### **1.4.1.3 Interpretació del resultat:**

En l'individu no infectat no s'observarà cap reacció i la prova es donarà per negativa. La tuberculina es pot repetir sempre perquè no indueix sensibilització en l'individu no infectat per micobacteries. La prova es considera positiva quan el diàmetre transversal a l'eix de l'avantbraç és igual o superior a 5 mm.



**Figura 14:** Lectura de la prova de la tuberculina. Cortesia Adela Cantos.

A major diàmetre de la induració, més probabilitat hi ha que la resposta sigui per infecció tuberculosa i a menor diàmetre, encara que la resposta també pot ser a causa de la infecció tuberculosa, augmenta la probabilitat que sigui conseqüència d'una infecció no tuberculosa o vacunació amb la BCG. Les reaccions de 15 o més mm de diàmetre o les que presenten vesiculació o necrosi solen ser degudes a infecció per el bacil tuberculós, però les excepcions són molt freqüents (62).

En els grups amb major risc de desenvolupar la TB, com més petit sigui el límit del diàmetre que s'accepti per el diagnòstic d'infecció, menor nombre d'infectats per *M. tuberculosis* restaran sense detectar (major sensibilitat) i en els grups amb menor risc, com més gran sigui el diàmetre, major seguretat que la resposta a la PT sigui conseqüència de la infecció per *M. tuberculosis* (major especificitat).

Una PT igual o superior a 5 mm obliga a fer les proves adients per descartar malaltia tuberculosa. La definició de la PT com a significativa d'infecció tuberculosa depèn de la probabilitat que l'individu hagi estat infectat pel bacil de la TB, del risc que té de desenvolupar la malaltia, de la prevalença de la infecció tuberculosa, de la taxa de cobertura de la vacunació BCG i de la taxa d'infecció per MNT. Per tant, variarà a cada país (63).

**Taula 3:** Criteris d'infecció tuberculosa segons el resultat de la prova de la tuberculina (63).

Induració ≥ 5 mm	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Contacte freqüent i recent de malalt tuberculós</li> <li>2. Persones amb imatges fibròtiques en la seva radiografia de tòrax compatibles amb tuberculosi antiga, mai tractada</li> <li>3. Coinfecció per VIH</li> <li>4. Pacients amb immunosupressió com a trasplantats o tractats amb corticoides (rebut l'equivalent a &gt; 15 mg/dia de prednisona més d'1 mes)</li> <li>5. Quan hi hagi clínica i radiologia compatible amb malaltia tuberculosa</li> </ol>
Induració ≥ 10 mm	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tots els altres amb risc d'infecció recent i de desenvolupar la malaltia: immigrants recents, UDVP, residents d'institucions tancades, comorbiditats (diabetis, silicosis, neoplàsies i malalties hematològiques, gastrectomia)</li> <li>2. Nens i adolescents independentment que estiguin o no vacunats amb BCG.</li> <li>3. Persones sense cap contacte ni factor de risc, descobertes per cribratge, no vacunades amb BCG.</li> </ol>
Induració ≥ 15 mm	Persones sense cap contacte ni factor de risc, descobertes per cribratge, vacunades amb BCG.

### **1.4.1.4 Inconvenients de la prova de la tuberculina:**

La PT presenta certs problemes de sensibilitat que poden ocasionar resultats **falsament negatius**:

En relació amb la tuberculina utilitzada: exposició prolongada o intensa a la llum i la calor; dilució inadequada; desnaturalització química; contaminació; adsorció (adherència de la tuberculina a la paret del flascó).

En relació amb la tècnica d'administració: quantitat insuficient; injecció no intradèrmica; injecció passats 30 minuts d'haver carregat la xeringa.

En relació amb la lectura i el seu registre: falta d'experiència del lector; error en el registre.

En relació amb el subjecte testat: edat (nadons amb immunitat immadura o edats avançades); infecció recent (període finestra); comorbiditat i tractaments que produeixin immunosupressió; anèrgia (incapacitat per obtenir una resposta cutània del tipus de sensibilitat retardada. Present fins a 30-40% d'infectats pel HIV).

Per altre costat, hi ha circumstàncies que poden produir resultats **falsament positius** (manca d'especificitat):

Infecció per MNT o vacunació amb la BCG: donat que el *M. tuberculosis* comparteix antígens amb les MNT i amb el bacil del *M. bovis*-BCG, una PT positiva pot ser deguda a infecció per aquests micobacteris. Habitualment aquestes reaccions són de baixa intensitat amb un diàmetre que no excedeix als 10-12 mm, però no es pot diferenciar amb precisió (62).

Per últim la utilització repetida de la PT pot provocar l'efecte *booster* (o de reforç): en algunes persones, en especial infectats més grans de 55 anys o en vacunats no infectats, la capacitat de resposta a la PT es pot debilitar amb el

temps i donar un resultat negatiu d'entrada que es pot positivament al repetir-se la prova, cosa que es pot interpretar de manera errònia com un viratge tuberculínic. També individus infectats per altres micobacteries poden presentar una segona reacció positiva en repetir la prova. Per tal d'evitar-lo cal repetir-la als 7 a 10 dies i prendre com definitiu el resultat d'aquesta segona prova (64).

### **1.4.2 Estudi de contactes**

#### **1.4.2.1 Fonament i necessitat de l'estudi de contactes:**

L'estudi de contactes convencional (ECC) consisteix en estudiar les persones que hagin estat en relació amb un malalt tuberculós. Els objectius de l'ECC són els següents:

- 1) reduir la morbiditat i mortalitat per TB amb la identificació precoç i el tractament adequat dels contactes;
- 2) aturar la transmissió addicional mitjançant la detecció precoç de possibles casos secundaris;
- 3) contribuir a l'eliminació de la TB a través de la prevenció de futurs casos mitjançant la detecció i tractament preventiu dels contactes infectats en risc de desenvolupar la malaltia (65).

En algunes situacions es porta a terme una investigació per tal de trobar la persona infectant que sigui el possible cas font d'algú amb TB o infecció latent. Es fa quan es sospita transmissió recent en els següents casos:

- 1) nen de 5 anys d'edat o menys amb TB o infecció per *M. tuberculosis* sense una font coneguda d'infecció;
- 2) persona amb TB primària sense font d'infecció coneguda;
- 3) grup de persones amb la PT o IGRA positiu en una institució d'alt risc.

#### **1.4.2.2 Recerca del cas índex i les vies de transmissió:**

L'ECC forma part essencial de l'estratègia de prevenció de la TB en els països desenvolupats i és una de les actuacions de medicina preventiva més rendibles en termes de cost-efectivitat. Els estudis publicats mostren una rendibilitat



diagnòstica en quant a nous casos de TB detectats entre 3-6% dels contactes estudiats (66) amb al voltant del 50-60% d'infecció en contactes de casos bacil·lífers (67) i 15-20% d'indicacions de tractament la infecció tuberculosa i/o probable. (68) Aquestes xifres solen estar directament relacionades amb l'edat del contacte inferior a 15 anys, l'estatus bacteriològic del cas índex (o focus emissor), existint una gradació entre els casos bacil·loscòpia positiva a l'examen directe en esput, els només cultiu positiu i els bacil·loscòpia més cultiu negatius (69). No obstant això, en el nostre medi, a diferència d'altres països desenvolupats, hi ha una considerable proporció de malalts i/o infectats entre els contactes dels pacients sense confirmació bacteriològica (67).

#### **1.4.2.3 Estratègies de l'estudi de contactes:**

El diagnòstic de la infecció tuberculosa es realitza amb la PT que es practica a tots els contactes no prèviament positius o sense antecedents de malaltia tuberculosa. En el nostre país s'accepta una induració transversal de 5 mm o més com a criteri de positivitat d'un contacte amb malalt bacil·lífer, prescindint de si estan vacunats o no de BCG (63) (70) (71).

El mètode tradicional de realitzar l'ECC es basa en el conegut esquema dels "cercles concèntrics" o "*stone in the pond*", consistent en iniciar la revisió per aquells subjectes amb major grau de contacte (contacte íntim > 6h/dia), i anar estenent l'estudi al cercle més extern: contactes freqüents (diari <6h/dia), i contactes esporàdics (no diari <6h en total). Això es fa tant a nivell del nucli familiar, com de l'espai lúdic, o l'àmbit laboral. L'estudi s'atura quan es troba una taxa d'infecció igual a l'esperada en la població general, i sempre que no es detecti un nou cas de TB o una conversió tuberculínica.

En tot cas, cal tenir en compte sempre la infecciositat del focus emissor (major si és una TB cavitada i/o bacil·lífera) i la susceptibilitat del subjecte receptor (augmentada en nens i immunodeprimits), així com l'espai físic on s'ha produït el contacte (major risc en espais tancats on es comparteix la ventilació) i el temps d'exposició (72).

**1.4.2.4. Identificació i avaluació dels contactes:**

Diverses normatives nacionals recomanen l'organització de la recerca dels contactes segons el risc d'infecció i classifiquen en contactes d'alta, mitjana o baixa prioritat a fi de facilitar les decisions terapèutiques.(73, 74) Les característiques del focus emissor, del contacte i del receptor que augmenten o disminueixen el risc del contacte es resumeixen en la següent taula:

**Taula 4:** Factors de risc per als contactes a l'estudi de contactes (74).

	AUGMENTA RISC	DISMINUEIX RISC
<b>Característiques del focus emissor</b>	TB cavitada Bacil·loscòpia + esput Retard diagnòstic	TB no cavitada TB pleural TB extra pulmonar Bacil·loscòpia negativa Diagnòstic precoç
<b>Característiques del receptor</b>	Edat infantil (sobretot < 4a) Edat molt avançada Immunodepressió (sobretot VIH amb CD4 <350) PT negativa prèvia	Edat adulta (15-65 a) PT positiva prèvia BCG (discutable)
<b>Circumstàncies del contacte</b>	Major grau d'exposició <ul style="list-style-type: none"> <li>• Major durada</li> <li>• Convivència</li> <li>• Espais tancats / aire compartit</li> </ul> Maniobres diagnòstiques (broncoscòpia, esput induït)	Menor grau d'exposició <ul style="list-style-type: none"> <li>• Menor durada</li> <li>• No convivència</li> <li>• Espais oberts / aire circulant</li> </ul>

Idealment s'hauria d'iniciar l'ECC en el mateix moment del diagnòstic del cas índex. En els casos d'alta prioritat (bacil·lífers, convivents, presència de nens) s'ha d'intentar fer en el termini d'una setmana. En els de mitjana (no bacil·lífers, convivents, adults) o baixa prioritat (no bacil·lífers, no convivents, adults) pot ser correcte el termini de dues setmanes. En el nostre medi està indicat estudiar els contactes de tots els casos de TB. També els contactes dels

nens PT positiva, sobretot els menors de 4 anys per intentar buscar el cas índex (63).

La pràctica habitual és fer la revisió dels contactes de l'àmbit familiar de tots els casos de TB i posteriorment els dels espais laborals i lúdic, sobretot en casos bacil·lífers, prioritzant els de major risc.

Pel que fa a la recerca de focus, si el nen és de curta edat i no es troba un focus familiar, s'ha d'esbrinar la presència d'un possible focus escolar o lúdic.

Es recomana fer la PT i una radiografia de tòrax a tots els contactes d'alt risc. En els de risc mitjà i baix es fa la radiografia únicament en aquells amb reacció tuberculínica igual o superior a 5mm.

Tots els contactes amb PT positiva deuen ser valorats clínicament per a descartar una TB activa i rebre tractament de la infecció segons els criteris establerts.

Als pacients amb PT negativa i de baix risc, s'ha de repetir la PT a les 10-12 setmanes des de l'últim contacte amb el malalt. En casos concrets s'haurà de valorar la indicació de tractament de la infecció probable, especialment en nens contactes de bacil·lífers (70).

### **1.4.2.5. Tractament profilàctic dels contactes:**

En els països industrialitzats amb bons sistemes sanitaris i menor incidència de malaltia tuberculosa està indicat utilitzar la quimioprofilaxi dels individus exposats a un cas de TB com actuació sanitària de transcendència per el control de la TB (75).

La quimioprofilaxi primària o tractament de la infecció probable és la administració de medicació específica en persones en contacte íntim amb un malalt bacil·lífer però sense evidència d'infecció tuberculosa (PT negativa), amb la doble finalitat d'evitar la infecció i d'avançar la profilaxis durant el període finestra de 2 a 10 setmanes entre el contagi i el viratge tuberculínic (76).

La quimioprofilaxi secundària o tractament de la infecció tuberculosa (TIT) intenta evitar el desenvolupament de la malaltia tuberculosa en aquells individus ja infectats (PT positiva), sobretot en aquells individus infectats recentment (77).

### **1.4.3. Tractament de la infecció tuberculosa.**

#### **1.4.3.1 Pautes habituals:**

El fàrmac d'elecció pel tractament de la infecció probable és la isoniazida (H) a dosis de 5-10 mg/kg de pes i dia en nens i 300mg al dia en adults. S'utilitza durant 2-3 mesos fins a repetir la PT en contactes d'alt risc (nens, adolescents, infectats per VIH o immunodeprimits). Si aquesta és negativa i ha cessat l'exposició a la font infectant es retira el tractament; si es positiva, es manté el tractament fins a completar 6 mesos, un cop descartada la malaltia activa (63).

El tractament de la infecció tuberculosa s'ha realitzat tradicionalment amb la isoniazida amb pautes de 6 a 12 mesos. La protecció de la pauta de 9 mesos és superior a la de 6 mesos en persones immunocompetents, però el benefici addicional és mínim si es prolonga el tractament a 12 mesos (78).

En estudis poblacionals que han tingut en compte l'acompliment s'ha vist que la pauta de 6 mesos és la més cost-efectiva (79) i afegit al fet que és difícil justificar que el tractament de la infecció sigui més llarg que el de la malaltia, aquesta és la duració més recomanada en la pràctica clínica (70).

#### **1.4.3.2. Noves pautes:**

Amb l'intent de reduir el temps d'administració del tractament de la infecció tuberculosa i millorar l'acompliment del tractament sense augmentar la toxicitat farmacològica s'han investigat noves pautes utilitzant associacions de Rifampicina (R) amb altres fàrmacs, així com de R sola. Els estudis en models animals van permetre comprovar que la utilització de R permet escurçar la duració del tractament amb la mateixa acció esterilitzant de la H i a més aquesta s'incrementa si s'associa amb la Pirazinamida (Z) (80) o la H (81).

Els primers estudis publicats van concloure que les pautes curtes tenien una efectivitat superior al placebo i similar a la H en prevenir la TB sense augmentar la toxicitat i amb un acompliment igual o superior (82-84) . La pauta de R i Z durant 2 mesos, en ser utilitzada en població immunocompetent va resultar altament hepatotòxica, (85) motiu pel qual es va abandonar el seu ús. Actualment les pautes que s'utilitzen són la R (10mg/kg/dia) durant 4 mesos (74) i l'associació de R (10mg/kg/dia) i H (5mg/kg/dia) durant 3 mesos. (70) Aquesta última s'ha vist que presenta millor acompliment en població immigrant (86).

En EUA recentment s'ha aprovat la utilització de la Rifapentina (900 mg) associada a la Isoniacida (900 mg) administrada en pauta de una dosi setmanal durant 12 setmanes per el TIT (87).

### **1.5. Vacuna BCG**

#### **1.5.1 Origen de la BCG:**

El 1925, els experiments del microbiòleg Albert Léon, Charles Calmette i del veterinari Camile Guérin a l'Institut Pasteur van donar com a resultat una substància que es pot considerar com la primera vacuna del segle XX: la vacuna contra la tuberculosi BCG (Bacil de Calmette i Guerin) (88).

La BCG és una vacuna viva, no patògena, que va ser preparada a partir d'una soca de *M. bovis*. Calmette i Guérin van necessitar tretze anys i 230 subcultius per aconseguir un bacil atenuat que un cop injectat a diferents animals d'experimentació els produïa unes lesions anatomopatològiques semblants a la TB i cert grau de resistència a la malaltia. Estudis genètics més recents van determinar que la pèrdua de virulència de la soca es deguda a la pèrdua del sistema secretor de la proteïna ESX-1 per delecció de la regió RD1 (89).

L'any 1921 va començar la seva utilització per via oral en nadons de famílies amb TB bacil·lífera. Barcelona l'any 1924 va ser la primera ciutat després de Paris en utilitzar la vacunació amb la BCG, gràcies a la col·laboració entre el

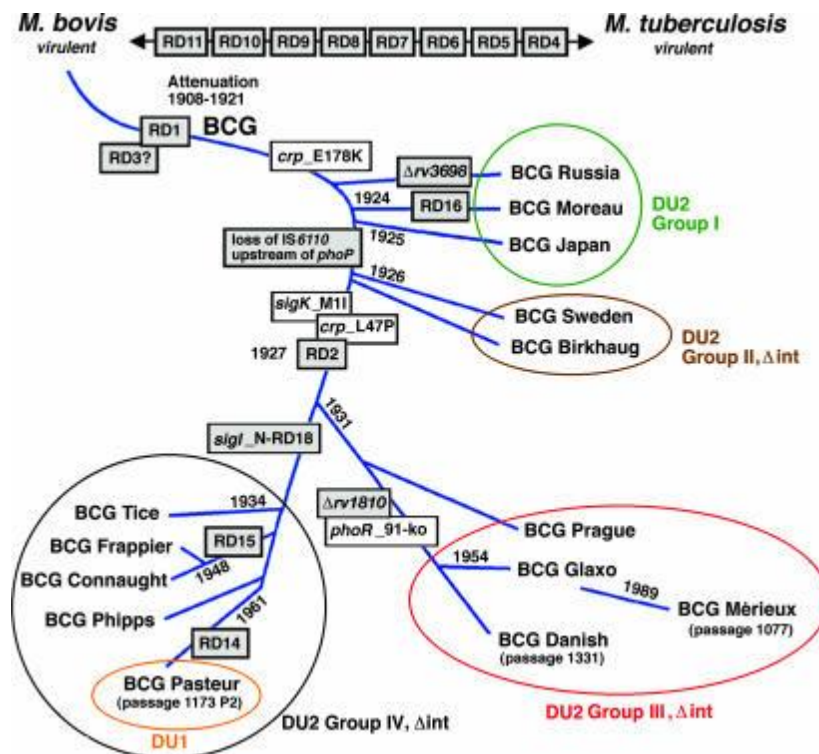
Dr.Lluís Sayé, del Dispensari Central Antituberculós de Barcelona, i els Drs. Calmette i Guerin de l'Institut Pasteur (90).



**Figura 15:** Dr. Calmette, Dr.Guerin i Dr. Sayé (d'esquerra a dreta).

La soca original de Calmette i Guérin va ser distribuïda a diversos països i laboratoris, que van utilitzar diferents procediments en l'elaboració de les vacunes, cosa que va modificar la seva virulència residual i les seves característiques immunogèniques, al variar el nombre de gens de delecció i la composició lipídica. (91) Cada BCG es coneix pel nom del lloc o del laboratori de producció, BCG (Copenhaguen), BCG (Montreal), BCG (Pasteur), entre d'altres. En Espanya la presentació més utilitzada prové de la soca del "Statens Serum Institut" de Dinamarca.

Estudis comparant el genoma de les diferents vacunes les van dividir segons les deleccions i insercions cromosòmiques en soques primitives: PCS Japó, Birkhaug, Suècia i Rússia i BCGs tardanes: Pasteur, Dinamarca, Glaxo i Praga. (92) La publicació de la seqüència completa de BCG va revelar grans diferències en el nivell d'expressió de proteïnes de superfície i antígens immunodominants inductors de resposta protectora en les soques primitives en comparació amb les tardanes fet que podria explicar la major resposta immunogènica de les primeres (93).



**Figura 16:** Arbre genealògic de les soques de BCG. De Brosch R et al. (93).

### 1.5.2. Resposta immunològica enfront a la BCG:

La immunització amb la BCG és una infecció provocada per un bacil viu no virulent que produeix una resposta no del tot coneguda, però bàsicament de tipus cel·lular amb la producció de limfòcits T CD4+ amb perfil de citocines del tipus Th1 i funcions efectores citotòxiques.

En el lloc de la inoculació es produeix una infecció local que pot anar associada a l'afectació dels ganglis limfàtics regionals. En observacions *post mortem* en individus vacunats i no vacunats amb BCG s'ha observat que malgrat el focus d'infecció primària tuberculosa es troba de forma similar en ambdós grups, en els individus vacunats les lesions disseminades es localitzen gairebé exclusivament al teixit pulmonar, mentre que en els no vacunats s'estenen per nombrosos òrgans i aparells (31). Aquestes troballes suggereixen que la vacuna

no impedeix la infecció tuberculosa, però ajuda a limitar i retardar la multiplicació dels bacils en el focus d'infecció primari i prevenir la seva disseminació hematògena i per tant evita les formes clíniques greus com la miliar i la meníngia (94).

### **1.5.3. Controvèrsia de la efectivitat de la BCG:**

La BCG és la vacuna més utilitzada en tot el món i, alhora, la més controvertida (95). S'estima que més de dos mil milions d'individus han estat vacunats i que, aproximadament, cada setmana reben aquesta vacuna 2 milions de nens a tot el món.

Els estudis que han avaluat la protecció contra les formes greus de TB en nens i joves, formes meníngia o miliar, van demostrar que la BCG proporciona un rang d'eficàcia del 47-98% (96). L'eficàcia contra la TB pulmonar, la forma més freqüent en adolescents i adults, varia entre el 0 i el 80% (97). Un metaanàlisi publicat l'any 1994 va concloure que la BCG proporciona una protecció global del 50% enfront de la malaltia tuberculosa i, en especial, prevé contra la meningitis tuberculosa durant l'edat infantil (98). Aquesta revisió no va aconseguir demostrar protecció de la vacunació BCG enfront de les formes pulmonars, a causa de l'heterogeneïtat dels resultats dels estudis analitzats.

Es calcula que els 100 milions de dosis de BCG anuals protegeixen, en els primers 5 anys de vida del nen vacunat, contra l'aparició de 30.0000 casos de tuberculosi meníngia i de 11.000 casos de tuberculosi miliar disseminada (96).

En qualsevol cas hi ha acord a considerar que la BCG presenta un limitat paper en la disminució de la transmissió de la tuberculosi, en protegir de les formes miliars i meníngies en el nen però no evitar la tuberculosi de l'adult. Per això la recerca en vacunes més eficaces que l'actual BCG té com a objectiu primordial prevenir les formes respiratòries de la malaltia (95).



### **1.5.4. Indicacions actuals de la BCG:**

Actualment la BCG és obligatòria en 64 països, està recomanada oficialment en altres 123 i es troba inclosa en el Programa Ampliat de Vacunació de l'OMS des de 1974. La BCG no s'aplica de forma sistemàtica en la població pediàtrica de l'Estat Espanyol en no trobar-se inclosa als calendaris vacunals de les diferents comunitats autònomes, inclòs el País Basc, que la va deixar de utilitzar a partir de l'any 2013 (99).

A nivell comunitari la indicació de vacunar s'ha de fer segons la situació epidemiològica del país i sempre com a complement de les altres mesures de prevenció disponibles. L'OMS recomana la vacunació BCG de forma sistemàtica i precoç, en nadons, en aquells països amb una alta prevalença d'infecció i un risc anual d'infecció (RAI)  $>1\%$  on, per l'elevat nombre de casos de tuberculosi bacil·lífera, hi ha una elevada transmissió de la infecció i una taxa de meningitis tuberculosa alta en menors de 5 anys. En els països amb prevalença mitjana i RAI entre 0,2-1, la vacunació amb BCG només es recomana en grups de risc. En els països que presenten baixa prevalença d'infecció i RAI  $< 0,2$ , la vacunació sistemàtica amb BCG no es recomana pel seu valor molt limitat (100).

Les indicacions de la vacuna BCG acceptades, amb matisacions, per als països de endèmia baixa i mitjana són (95):

1. Individus, especialment nens o nadons amb tuberculina negatius:
  - a) Contactes íntims i prolongats amb un cas amb tuberculosi pulmonar bacil·lífera no col·laborador, crònic o multiresistent, en els quals no es pugui fer una altra estratègia de control, i que no poden ser separats del focus. No hi ha dades fiables que confirmin l'eficàcia de la BCG en aquestes situacions.
  - b) Pertanyin a grups on el risc anual d'infecció és de l'1%, o superior i, en els quals s'han intentat altres mètodes de vigilància, tractament i prevenció que hagin fracassat.

2. Treballadors sanitaris i individus amb gran exposició al contagi amb taxes de conversió tuberculínica anual de l'1% o més. Recentment es qüestiona aquesta indicació per altres mesures més eficaces com a control ambiental, pràctica de proves tuberculíniques periòdiques i tractament dels infectats.

### **1.5.5. Contraindicacions i precaucions:**

Com que es tracta d'una vacuna viva atenuada, la BCG no ha de ser administrada a individus amb immunodeficiències primàries o secundàries, així com a persones infectades pel VIH, (inclosos els nens nascuts de mare infectada), o en tractaments immunosupressors. També està contraindicada en les dones embarassades. La revacunació no està recomanada, malgrat sigui pràctica habitual en molts països.

## **1.6. Malaltia tuberculosa**

### **1.6.1 Manifestacions clíniques:**

Les manifestacions clíniques de la TB molt sovint no es diferencien d'altres entitats nosològiques, amb un inici insidiós, poc alarmant i bastant variable, depenent de la virulència de l'agent causal, de l'òrgan afectat, l'edat i l'estat immunitari de l'hoste. En la gran majoria de casos, el pulmó és la porta d'entrada del *M. tuberculosis*, però aquest primer contacte passa gairebé sempre inadvertit i la primoinfecció sol ser subclínica o donar símptomes lleus i inespecífics. La TB simptomàtica gairebé sempre és una manifestació de la TB post-primària o del adult. Els símptomes es poden dividir en dos grups:

Sistèmics, els més freqüents són la febre o febreta, l'anorèxia, la pèrdua de pes, l'astènia, la sudoració vespertina profusa i el malestar general.

Símptomes específics de l'òrgan afectat que varien segons la localització de la malaltia. (7)

En la TB pulmonar no sempre existeix una correlació entre l'extensió de la malaltia i la magnitud dels símptomes. L'absència completa de símptomes pot ocórrer en el 5% dels pacients adults. El símptoma més freqüent és la tos, que pot ser seca o productiva, amb expectoració mucosa, purulenta, hemoptoica i, ocasionalment, hemoptisi franca. Es pot acompanyar de dolor toràctic de característiques pleurítiques. La dispnea es presenta en la malaltia molt estesa i formes de TB disseminada. Una forma especial d'inici és la pneumònia tuberculosa, que es pot presentar amb un quadre clínic-radiològic agut amb febre alta similar a la pneumònia bacteriana.

La TB miliar pot plantejar el diagnòstic diferencial amb la febre d'origen desconegut, ja que en el període inicial el patró radiològic d'afectació intersticial nodulillar difusa pot no ser evident i el quadre clínic inespecífic, en forma de quadre constitucional i episodis febrils prolongats (101). Aquesta forma de TB és més freqüent en els malalts VIH amb afectació de l'estat immunitari. És una forma de TB disseminada que pot afectar a qualsevol òrgan incloent-hi el pulmó.

A la malaltia tuberculosa, la manifestació hematològica més freqüent és una leucocitosi lleu, amb limfocitosi, encara que ocasionalment poden aparèixer leucopènia o una reacció leucemoide. L'anèmia és freqüent en casos de malaltia disseminada o evolució prolongada. Pot aparèixer una pancitopènia per afectació directa de la medul·la la òssia.

A l'estudi bioquímic es pot apreciar hiponatrèmia i hipoclorèmia en casos greus i disseminats, per secreció per part del teixit pulmonar d'una substància semblant a l'hormona antidiürètica (102).

L'exploració física sol ser inespecífica, però l'auscultació de hipofonesi basal pot indicar la presència de vessament pleural i la palpació d'adenopaties ens pot fer sospitar el diagnòstic.

El pulmó és l'òrgan diana en el 75-80% dels casos de TB, però en els malalts infectats pel VIH i en alguns grups de població immigrant és freqüent la presència de la TB extrapumonar.

La TB limfàtica més habitualment es presenta amb adenopaties cervicals palpables, indolores, clàssicament conegudes com escròfules. Poden presentar una evolució tòrpida amb fistulització i supuració crònica per reaccions immunològiques malgrat un tractament correcte (103).

La TB osteoarticular afecta sobretot les vèrtebres, el maluc i el genoll. Aquesta afectació sol ser monoarticular. La dada radiològica més freqüent és una artritis destructiva, i en el cas de l'afectació vertebral una erosió del cos vertebral, a vegades amb un abscess paravertebral (104).

La TB genito-urinària es manifesta en forma de símptomes inespecífics de poliúria, disúria i hematúria, encara que en molts pacients pot ser asimptomàtica. La presència de piúria estèril pot ser la dada analítica més demostrativa. L'afectació de l'aparell genital femení pot provocar trastorns en el ritme menstrual i infertilitat (105).

Les manifestacions de la TB meningia poden ser molt variades. Pot tenir un curs subagut, crònic o fulminant. La fase prodròmica cursa amb astènia, anorèxia, febre intermitent, cefalea i trastorns de la conducta. Posteriorment s'afegeix meningisme, vòmits, confusió, paràlisi de nervis cranials, i coma en formes greus (106).

### **1.6.2 Tècniques de diagnòstic de la malaltia tuberculosa:**

El diagnòstic de certesa de la TB és fa per l'aïllament de *M. tuberculosis* en el cultiu de la mostra clínica provinent de l'òrgan afectat. En algunes ocasions això no és possible i el diagnòstic es fonamenta en el judici clínic basat en el conjunt de dades clíniques, radiològiques, de laboratori i epidemiològiques (107).

A part del diagnòstic a partir de la sospita clínica en el pacient simptomàtic també s'ha de tenir present i fer una recerca activa d'aquesta malaltia en determinats col·lectius de risc, com immigrants procedents de països d'alta endèmia tuberculosa, indigents, presoners, usuaris de drogues per via parenteral, malalts de SIDA i portadors del VIH (108).

#### **1.6.2.1. La prova de la tuberculina:**

El valor de la PT en el diagnòstic de la TB activa, és més gran en els nens ja que la prevalença d'infectats a aquestes edats és baixa. Una reacció positiva amb o sense clínica sospitosa en un infant exposat a la TB, pot ser molt suggestiva de malaltia tuberculosa ja que la TB primària sol ser molt poc simptomàtica.

Una PT negativa no exclou el diagnòstic de TB activa, ja que el pacient pot trobar-se en algunes de les situacions que poden deprimir la resposta a la tuberculina, entre les que s'inclouen la TB disseminada i la TB pleural. També s'ha de tenir en compte que, a excepció dels infectats per el VIH, són els pacients d'edat avançada els que més freqüentment poden tenir una PT falsament negativa (109).

#### **1.6.2.2. Diagnòstic radiològic:**

La TB no presenta cap signe radiològic patognomònic, però en la TB pulmonar la principal sospita diagnòstica es fonamenta en una radiologia suggestiva, ja que aquesta tècnica té pocs falsos negatius. Es, per tant, una tècnica molt sensible però inespecífica. Una radiografia de tòrax normal pràcticament exclou el diagnòstic de TB pulmonar ja que només algunes formes de TB primària i en

infectats per el VIH molt immunodeprimits, la TB pot cursar amb una radiografia normal (110).

La radiografia varia segons la forma de TB. En la TB primària, es pot afectar qualsevol segment pulmonar. La presència d'adenopaties paratraqueals o hiliars és característica, i molt sovint son unilaterals. Es poden trobar atelèctasis per compressió bronquial per adenopaties i també un vessament pleural aïllat pot ser l'única manifestació de la TB primària.

En la TB post-primària l'afectació més constant es dona en segments apical i posterior dels lòbuls superiors o en l'apical del lòbul inferior. També es poden trobar tuberculomes (nòduls de diferent mida) de morfologia variada i de preferència als lòbuls superiors. La cavitació és freqüent (45- 60% dels casos) i s'associa a disseminació bronquial amb múltiples ombres acinars i àrees de consolidació a altres zones del pulmó. Les adenopaties són rares en aquesta fase de la TB. El vessament pleural també és freqüent (111). La radiografia hiperlordòtica pot visualitzar millor petites lesions als àpexs pulmonars.

La tuberculosi miliar pot ser una manifestació tant de la forma primària com post-primària. El patró radiològic típic el constitueixen múltiples nòduls fins, inferiors a 3 mm, generalment més profusos a lòbuls inferiors, però fins un 13% es poden presentar amb radiologia normal (101).

En els pacients infectats amb el VIH la radiologia de tòrax dependrà del grau d'immunodepressió del malalt. Si l'estat immunitari està conservat la radiologia no es diferencia de la dels no infectats, mentre que quan hi ha immunodepressió severa, es produiran les lesions típiques de la TB primària, amb freqüent afectació limfàtica i disseminacions hematògenes. En aquest últim cas són freqüents les radiografies de tòrax normals i la participació extrapulmonar (112).

**1.6.2.3. Diagnòstic microbiològic:**

El diagnòstic de certesa de la TB es fa amb l'aïllament i identificació del *M. tuberculosis*. S'aconsella estudiar 2 a 3 mostres d'esput recollides en dies successius degut a que l'eliminació de bacils pot ser discontinua. (113) En països amb alta incidència i pocs recursos, si no es poden processar immediatament es conservaran a la nevera a 4° C. Quan el malalt no expectora, la fibrobroncoscòpia és la tècnica d'elecció per obtenció de mostres, ja que permet realitzar broncoaspirats selectius, rentat broncoalveolar i biòpsia de les lesions bronquials. La seva rendibilitat, junt amb els esputs post-fibrobroncoscòpia, és superior a la de l'aspirat gàstric en dejú (114).

En la presència d'adenopaties mediastíniques amb absència de lesió pulmonar, la ultrasonografia endoscòpica amb aspiració amb agulla fina és la tècnica d'elecció (115).

En pacients amb VIH sospitosos de tenir una TB disseminada s'analitzaran, apart de les mostres respiratòries, 3 mostres d'orina, 3 mostres de femta, 1 mostra de LCR, 3 hemocultius, exsudats i biòpsies dels òrgans afectats.

**1.6.2.3.1. Examen microscòpic:**

La tinció de Ziehl Neelsen i la tinció per fluorocroms-auramina són els procediments més ràpids i fàcils, i aporten al clínic una confirmació preliminar del diagnòstic. S'ha de tenir en compte que l'àcid-alcohol resistència és una propietat de totes les espècies del gènere *Mycobacterium*, i per tant és necessari l'aïllament en cultiu per identificar l'espècie. A més, la no observació de bacils àcid-alcohol resistents en una mostra no descarta el diagnòstic, ja que és una tècnica de sensibilitat limitada. S'estima que la concentració més baixa de bacils que es pot detectar per examen microscòpic és de 10<sup>4</sup> /ml de mostra. A l'informe dels resultats, el microbiòleg ha de proporcionar al clínic una estimació semi quantitativa del nombre de microorganismes ja que la reducció del número de bacils emesos orienta sobre la contagiositat i l'eficàcia del tractament (116).

**Taula 5.** Quantificació de la bacil·loscòpia (116):

Nº de bacils / camp	Resultat
0 en 100 camps	Negatiu
1 a 19 en 100 camps	Nº de bacils
10-99 en 100 camps	+
1-10 per camp en 50 camps	++
> 10 per camp en 20 camps	+++

#### **1.6.2.3.2. Detecció directa d'àcids nucleics de *M. tuberculosis* complex:**

Hi ha diversos mètodes de detecció directa d'àcids nucleics que varien segons la seqüència de l'àcid nucleic amplificat, el sistema d'amplificació i el sistema de detecció de l'element amplificat, però només detecten micobacteris del grup *M. tuberculosis* complex i no estan indicades per les MNT (117).

El volum mínim necessari per a la realització d'aquestes tècniques és de 0,5 ml cosa que facilita l'ús en mostres de líquid cefaloraquidi.

En mostres amb bacil·loscòpia positiva, la sensibilitat de les tècniques oscil·len del 70 al 100% amb una especificitat superior al 90%, però disminueixen en mostres amb bacil·loscòpia negativa. Poden donar falsos positius i el seu cost econòmic és elevat, malgrat això, comporten una gran rapidesa al diagnòstic de la malaltia.

#### **1.6.2.3.3. Cultiu i identificació de micobacteris:**

Totes les mostres clíniques sospitoses s'han de sembrar en medis de cultiu adequats al mateix temps que es fa l'examen microscòpic. El cultiu és més sensible que l'examen microscòpic i és positiu quan la concentració bacil·lar és igual o superior a 1000 bacils/ml de mostra. És necessari per poder identificar l'espècie i permet assegurar la negativització i curació del pacient.

Els medis de cultiu poden ser sòlids (Lowenstein- Jensen, Middlebrook 7H10 i 7H 11), líquids radiomètrics (BACTEC 12B) o no radiomètrics (Bactec 9000 MB, ESP I I, MB-BacT). En països industrialitzats, s'utilitzen medis de cultiu líquids,



que s'incorporen a sistemes automatitzats de detecció del creixement amb lectura automàtica cada hora. Tenen una sensibilitat superior a la dels medis sòlids i el temps per obtenir un cultiu positiu varia de 5 a 15 dies, mentre que, en medi sòlid, aquest temps pot ser de 20 a 30 dies. Si no hi ha creixement, es mantenen en incubació fins a 42 dies en que s'informen com a negatius. Actualment la utilització d'un medi sòlid i d'un medi líquid es considera el més apropiat per obtenir una major rapidesa i sensibilitat (118).

Els mètodes de biologia molecular han anat substituint les proves bioquímiques convencionals per la identificació micobacteriana, ja que tenen una major capacitat de diferenciació i han permès conèixer noves espècies. Les diferents espècies del grup s'identifiquen per mètodes comercialitzats que, generalment, amplifiquen la regió 16S-23S de l'ADN, per després fer la hibridació amb oligonucleòtids específics. En alguns casos, també permet detectar cultius mixtes de *M tuberculosis* i MNT (119).

1. Tècniques d'hibridació en fase líquida, permeten saber, en 2 hores, si la soca aïllada pertany al grup *M. tuberculosis* complex.
2. Les tècniques d'hibridació en fase sòlida, permeten saber, en 6 hores:
  - a. si la soca aïllada pertany al grup *M. tuberculosis* complex i si presenta resistència a rifampicina e isoniazida, basades en la detecció d'alteracions en el gens *rpoB*, *katG* i *inhA*
  - b. diferenciar les espècies del grup *M. tuberculosis* complex

#### **1.6.2.3.4. Estudis de sensibilitat *in vitro*:**

En el genoma de *M. tuberculosis* es produeixen mutacions espontànies, que donen lloc a resistències als fàrmacs; aquests tipus de resistències solen ésser a un sol fàrmac i la seva freqüència és baixa. En la població bacil·lar d'un malalt tuberculós, poden haver bacils amb aquest tipus de mutacions al costat de bacils sensibles. Les proves de sensibilitat en el laboratori detecten, de forma aïllada per a cada fàrmac, si el percentatge de bacils resistents, en la població tuberculosa del malalt, és igual o superior a l'1 percent.

S'han de fer a tots els malalts la primera vegada que s'obté un aïllament.

Mètodes:

- 1) Mètodes fenotípics per detecció de resistències a fàrmacs de primera línia: isoniazida (H), rifampicina (R) estreptomicina (S), etambutol (E) i pirazinamida (Z).
  - a) En medi sòlid, basats en la detecció de mutants resistents, el mètode de les proporcions és el mètode de referència però necessita 3 setmanes d'incubació.
  - b) En medi líquid amb sistemes de lectura automàtica del creixement, permeten donar el resultat entre 5 a 10 dies des de que s'han inoculat amb la soca problema i la correlació amb els mètodes de referència és superior al 98%.
- 2) Els mètodes genotípics s'han introduït ja com a sistemes de rutina per a la detecció de resistències a rifampicina des de cultius positius o des de mostres clíniques, amb correlacions amb els mètodes de referència de 98% per la Rifampicina i del 96,2% per la isoniacida (120).

A partir del cultius positius i també de mostra directa, el sistema Genotype MTBDR; (Hain Lifescience, Nehren, Germany) detecta les mutacions en els gens *rpoB* que codifica la resistència a rifampicina i els gens *katG* i *inhA* per a les resistències a isoniazida. La sensibilitat i especificitat per la rifampicina és de 99 i 100% i per la isoniazida és de 88 i 100% respectivament (121).

Recentment ha aparegut en el mercat un sistema integrat conegut com a GenXpert® en el que la mostra es introduïda dins d'un cartutx i incorporat a l'aparell del mètode. A l'interior del cartutx es desenvolupa la lisi, extracció, amplificació i detecció seguint un protocol de PCR a temps real, sense que l'operador hagi d'intervenir, gràcies a un enginyós disseny de compartiments dels diferents reactius, comunicats oportunament amb la mostra per un èmbol. Aquest mètode està introduint un canvi molt important en l'ús d'aquestes tècniques i per primer cop està fent possible que s'incorpori a laboratoris de països sense recursos. GenXpert amplifica el gen *rpoB*, detectant

simultàniament *M. tuberculosis* i les mutacions de resistència a la rifampicina (en més del 95% dels casos) (122).

A títol d'orientació, les indicacions més adients serien:

- 1) en mostres amb bacil·loscòpia positiva, que es necessiti diferenciar si es tracta d'una tuberculosi o d'una infecció per MNT.
- 2) en mostres respiratòries de malalts pediàtrics.
- 3) en mostres respiratòries d'adults amb bacil·loscòpia negativa, alta sospita clínico-radiològica de tuberculosi i que pertanyen a grups de risc com, immunodeprimits, transplantats, etc.
- 4) en determinats líquids orgànics d'escàs rendiment de la bacil·loscòpia i del cultiu.

Un resultat negatiu no descarta el diagnòstic de tuberculosi i un resultat positiu sense concordança clínica, s'ha de valorar conjuntament amb el microbiòleg. La tècnica no és útil pel seguiment del tractament de la malaltia, ja que detecta àcids nucleics micobacterians encara que els bacils no siguin viables per l'efecte del tractament.



**Figura 17:** Aparell GeneXpert ®. Gentilesa de Cepheid.

Si es detecten resistències, el procés continua amb l'antibiograma ampliat pels fàrmacs de segona línia com amikacina, capreomicina, kanamicina, etionamida, quinolones. L'antibiograma és totalment fiable en el cas de la H i de la R, però

per a l'estreptomina el grau de fiabilitat és menor. Encara és més baix en el cas de l'etambutol i la pirazinamida. Per tot això, les proves de sensibilitat han de ser corroborades sempre per una detallada història clínica de contactes i fàrmacs previs.

La resistència primària es defineix com la presència d'una soca resistent en el primer aïllament d'un malalt que mai ha estat tractat, i és conseqüència probablement de la infecció a partir d'un pacient portador de una soca resistent. La resistència secundària o adquirida a un o més fàrmacs és la produïda per tractaments incorrectes que eliminen a la població sensible i permeten la selecció-multiplicació dels bacils resistents.

La multiresistència (MDR) es defineix com la resistència a la Isoniazida i la Rifampicina, associada o no a altres fàrmacs, mentre la resistència expandida (XDR) es considera com una multiresistència amb resistències a quinolones i fàrmacs injectables de segona línia (30).

### **1.6.3. Tractament de la malaltia tuberculosa.**

El tractament actual de la tuberculosi inicial o mai tractada es regeix per les bases bacteriològiques i pels nombrosos assaigs terapèutics controlats realitzats durant més de 30 anys per diverses societats científiques i organitzacions sanitàries internacionals. Es considera que un règim terapèutic és utilitzable quan aconsegueix curar més del 95% dels malalts i ocasiona menys del 5% d'intoleràncies greus que obliguin a la seva modificació. Encara que no existeix un esquema ideal, el millor tractament serà el format per fàrmacs que tinguin un alt poder bactericida i esterilitzant amb baix nombre de recidives, bona acceptació i tolerància, pocs efectes secundaris, administrats simultàniament i en preparats que continguin tots els fàrmacs combinats. Això facilitarà l'acompliment i evitarà els fracassos i la creació de resistències.

**1.6.3.1. Fonaments bacteriològics:**

La resistència bacteriològica a un fàrmac en la TB s'origina per una mutació cromosòmica natural i irreversible, que apareix espontàniament a partir d'un nombre determinat de bacils ( $10^m$ ), variable segons el fàrmac. La probabilitat d'una doble mutació enfront a 2 fàrmacs exigeix la suma de 2 potències ( $10^{m+n}$ ) i així per la mutació de tres ( $10^{m+n+p}$ ), que de manera natural seria impossible donat que aquesta població teòrica no hi cabria al cos humà, on les lesions no solen excedir de  $10^9$  a  $10^{10}$  bacils. (54)

**Taula 6:** Fàrmacs antituberculosos i tasa de mutació (7):

Fàrmac	Taxa de mutació *	Potència terapèutica **	Marge terapèutic***	Toxicitat
De primera línia				
Rifampicina	$1/10^8$	100	2-3	Baixa
Isoniazida	$1/10^6$	100	3-4	Baixa
Pirazinamida	$1/10^3$	5-10	1-2	Baixa
Etambutol	$1/10^6$	3-4	1-2	Baixa
Estreptomicina	$1/10^6$	30	1	Intermèdia
De segona línia				
Protionamida	$1/10^3$	5	1-2	Alta
Cicloserina	$1/10^3$	3-4	1	Alta
Capreomicina	$1/10^3$	5-10	1	Intermèdia
Ofloxací	$1/10^{6-8}$	-	-	Baixa
Clofazimina	$1/10^4$	-	-	Baixa

(\*)Taxa de mutació: nombre de bacils de la població a partir del qual sorgeixen de manera natural i espontània mutants resistents a fàrmacs;

(\*\*) Potència terapèutica: relació entre el nivell sanguini del fàrmac i la seva concentració inhibidora mínima *in vitro*;

(\*\*\*) Marge terapèutic: relació entre la dosi útil i la dosi tòxica; toxicitat: valoració global del seu efecte secundari.

**Taula 7:** Població bacil·lar segons el tipus lesional. (7)

Tipus lesional	Població bacil·lar
Infecció subclínica o latent	$< 10^5$
Massa caseosa sòlida	$10^5$
TB pell, gangli, pleura i menígea	$10^{12}$ - $10^5$
TB renal	$10^5$
TB osteoarticular	$10^6$ - $10^8$
Caverna	$10^7$ - $10^9$

La mutació natural només s'inicia a partir d'una població de  $10^5$ , per això un sol fàrmac és capaç d'eliminar a poblacions bacil·lars poc nombroses (fonament de l'ús de la H en monoteràpia en el tractament de la infecció tuberculosa).

En canvi, a un malalt cavitari, amb una població bacil·lar entre  $10^7$  i  $10^9$ , on hi ha de  $10^2$  a  $10^4$  mutants resistents a la H, el tractament amb només aquest fàrmac, comportaria l'eliminació inicial dels bacils sensibles majoritaris (amb negativització de la bacil·loscòpia) però seleccionaria els mutants resistents que es multiplicarien posteriorment. La resistència de *M. tuberculosis* enfront a un fàrmac és definitiva i irreversible, quedant aquest medicament invalidat per a tota la vida del malalt.

Per tractar una tuberculosi inicial haurem d'utilitzar un mínim de 3 fàrmacs. Donat l'augment de les resistències al nostre entorn, les actuals normatives recomanen la pauta amb 4 fàrmacs a tothom i sol·licitar sempre l'antibiograma. (63) (70) (73).

### **1.6.3.2. Fàrmacs antituberculosos:**

Els fàrmacs de segona línia només han de ser pautats per centres especialitzats en TB i administrats de manera directament observada o estrictament vigilada, donat que aquestos representen l'última oportunitat de curació del pacient.

**Taula 8:** Dosificació i combinacions de fàrmacs antituberculosos (70):

Fàrmac	Dosificació	Marques comercials de combinacions
Rifampicina	10 mg/kg (màxim: 900 mg)	RIFINAH ® / RIMACTAZID ® 300 mg R; 150 mg H
Isoniazida	5-10 mg/kg (màxim: 450 mg)	RIMCURE ® 150 mg R; 75 mg H; 400 mg Z
Pirazinamida	30 mg/kg (màxim: 2.500 mg)	RIFATER ® 120 mgR; 50mg H; 300 mg Z
Etambutol	25 mg/kg	RIMSTAR ® 150 mg R; 75 mg H; 400 mg Z; 275 mg E
Estreptomicina	15 mg/kg (màxim: 1.000 mg)	

**1.6.3.3. Pautes terapèutiques:**

Els esquemes de tractament que reuneixen tots els requisits favorables i que, per tant, han estat recomanats universalment són els de 6 mesos de durada: 2 mesos amb rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) i etambutol (E), seguits de 4 mesos amb R i H (2RHZE/4RH). L'esquema de 6 mesos s'ha d'utilitzar de rutina, sempre amb medicació combinada que facilita l'acompliment i evita la monoteràpia.

Es recomana utilitzar sempre els preparats farmacològics en combinació fixa. Actualment es disposa de preparats amb 4 fàrmacs (RHZE), 3 fàrmacs (RHZ) i 2 fàrmacs (RH). En alguns casos de malalts amb pesos extrems cal afegir algun comprimit de Z i o E per ajustar la dosi al pes.

**1.6.3.4. Nous fàrmacs antituberculosos:**

La gran majoria de fàrmacs per al tractament de tuberculosi es van comercialitzar entre els anys 40 i 60. La rifampicina, l'últim fàrmac es va afegir a l'arsenal terapèutic sobre l'any 1966. Després de diverses dècades d'oblit, afortunadament en els últims anys ha augmentat l'interès pel tractament de la

tuberculosi i diversos nous compostos químics estan en diferents graus de desenvolupament.

Les limitacions de l'actual esquema terapèutic són la seva llarga durada, la gran quantitat de comprimits, la seva elevada toxicitat, les importants interaccions farmacològiques i la manca d'eficàcia enfront dels bacils amb MDR.

Els fàrmacs ideals per tractar la TB haurien de complir els següents requisits: gran potència i amb efecte bactericida per evitar el desenvolupament de resistències; vida mitja llarga i similar de tots els components que permetés dosificacions 1 o 2 vegades a la setmana per facilitar el tractament directament observat; activitat davant de microorganismes latents o en fase no replicativa que permetés escurçar el tractament; activitat davant de microorganismes MDR; perfil farmacocinètic compatible amb la combinació amb altres fàrmacs com els antiretrovirals.

**Diarylquinolines: SIRTURO® (Bedaquilina, TMC207)** és el primer fàrmac anti-TB comercialitzat en els últims 40 anys, amb un mecanisme d'acció totalment nou (123). El fàrmac inhibeix la bomba de protons de l'ATP sintetasa, un enzim crítica per a la síntesi d'ATP de *Mycobacterium tuberculosis*. Té activitat enfront de les soques sensibles, MDR i XDR, no presenta resistència creuada amb els altres antituberculosos degut al seu mecanisme d'acció. TMC207 produeix increments en l'interval QT, per la qual cosa el seu ús ha de ser estretament vigilat quan s'associa a altres drogues amb el mateix efecte advers. S'ha reportat un increment de la mortalitat en el grup tractat amb Sirturo superior a la del grup placebo (10). Fins ara només ha estat aprovat per la FDA (Food and Drug Administration) per al tractament de la TB MDR i XDR sense resposta a altres pautes (124).

**OPC-67683 (Delamanid):** Actua inhibint la síntesi d'àcids micòlics de la paret cel·lular. No actua sobre altres bacteris patògens ni de la flora intestinal, no té resistència creuada ni antagonisme amb cap fàrmac de 1a línia. En estudis l'activitat intracel·lular *in vitro* ha demostrat ser superior a la isoniazida i igual a la rifampicina. Un estudi randomitzat en pacients amb MDR i XDR ha demostrat



que Delamanid associat a un règim de tractament recomanat per l'OMS almenys durant 6 mesos, pot millorar els resultats quant a la conversió del cultiu d'esput i mortalitat (125) .

### **1.6.4. Tuberculosi Infantil**

S'estima que la tuberculosi infantil l'any 2012 va ser equivalent a un 6% del total dels 8,6 milions de nou casos. Aquesta es concentra majoritàriament en països amb alta càrrega de morbiditat. El nen adquireix la infecció tuberculosa a partir d'un adult bacil·lífer del seu entorn, i ha de ser considerat sempre com a infectat recent. Des del punt de vista de salut pública la TB infantil no representa risc de contagi, però el nen infectat que no rep tractament de la infecció tuberculosa actua com a reservori i pot convertir-se en font d'infecció en el futur. Els nens poden patir TB a qualsevol edat, però aquesta és més freqüent i greu entre 1 i 4 anys.

La TB infantil és difícil de diagnosticar degut a la escassetat de símptomes i signes específics, així com a la paucibacil·laritat de les lesions, fet que dificulta l'obtenció de mostres per confirmació bacteriològica. En la majoria de casos el diagnòstic es basa en una forta presumpció i la suma dels elements: prova de tuberculina positiva, radiografia de tòrax anormal i antecedent de contacte amb focus tuberculós (126).

La troballa del focus de contagi tuberculós és de gran ajuda per al diagnòstic en pediatria. Com més petit és el nen (lactant, preescolar), major és la possibilitat de trobar la font contagiant al nucli familiar. En el nen escolaritzat la investigació s'ha de estendre als mestres, cuidadors, conductors d'autobús, companys de classe i contactes habituals.

La majoria dels nens malalts amb TB pulmonar poden trobar-se asimptomàtics o amb pocs símptomes, sent els lactants i nens petits els que tenen més

probabilitats de presentar-los. Els més comuns són febre, pèrdua o progrés inadequat de pes, decaïment i símptomes respiratoris. Aquests últims

dependran de la forma clínica i de l'extensió lesional. A la tuberculosi primària inicialment són escassos, però amb l'engrandiment dels ganglis mediastínics es poden trobar signes de compressió de la via aèria amb tos i sibil·làncies.

Els nens grans i adolescents poden presentar formes de TB similars a la de l'adult, amb els símptomes típics de tos, astènia, anorèxia, sudoració nocturna, pèrdua de pes i febre i poden tenir bacil·loscòpia de esput positiva. D'altres poden cursar amb tos crònica i pèrdua de pes. La presència d'eritema nodós o queratoconjuntivitis flictenular en un nen amb PT positiva orienta cap el diagnòstic de tuberculosi.

El tractament de la TB en el nen no difereix del tractament de la malaltia en l'adult, tret de la necessitat d'afegir-hi corticosteroides quan hi ha adenopaties que comprimeixen un bronqui i l'amenacen amb l'obstrucció. S'han d'utilitzar els mateixos fàrmacs i pautes estandarditzades per l'adult amb la correcció de dosi adaptada al pes del nen (126).

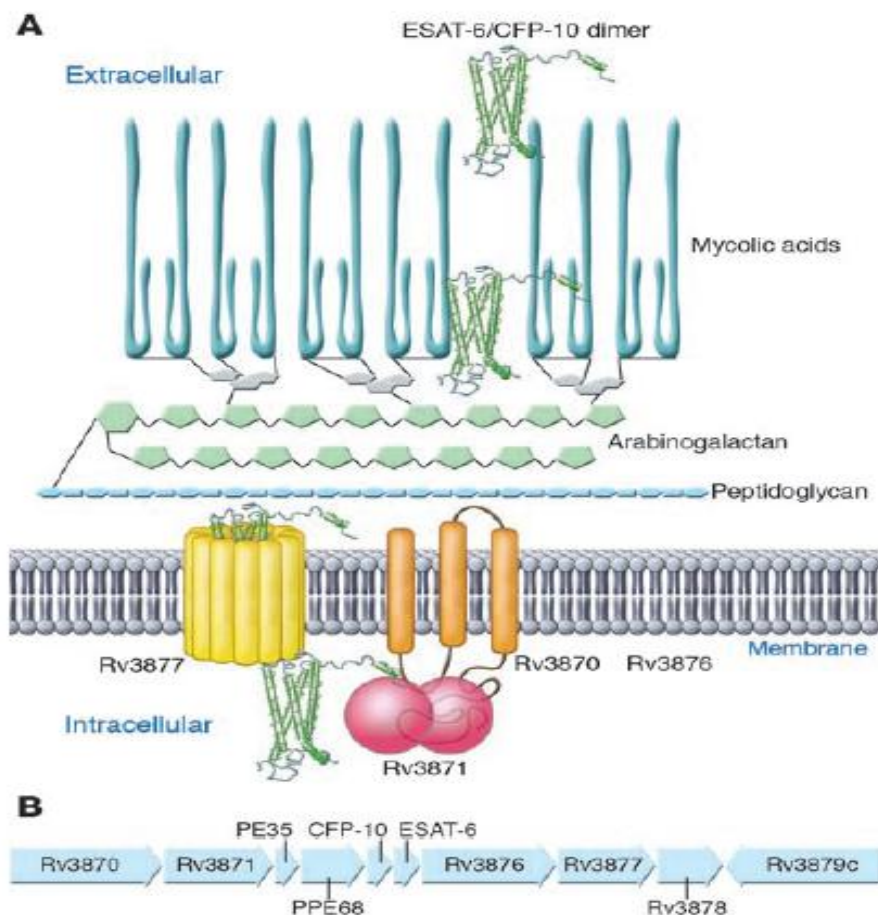
### **1.7. Diagnòstic basat en la producció de Interferon-gamma:**

#### **1.7.1 Regió RD1:**

La seqüenciació del genoma del *M. tuberculosis* va permetre d'identificar els gens involucrats en la seva patogènia (127). La comparació entre el genoma de la soca avirulenta del *M. bovis* BCG i el *M. tuberculosis* va identificar 3 diferents regions de diferència (RD) genètica que eren presents a *M. tuberculosis* i *M. bovis* però absents al *M. bovis* BCG. Només una d'aquestes regions, la RD1 està absent de totes les soques de BCG i gairebé tots els MNT (a excepció de *M. kansasii*, *M. marinum* i *M. szulgai*) i present en tots els *M. tuberculosis* virulents testats (128).

### 1.7.2. Antígens RD1:

Els gens presents en la regió RD1 semblen essencials per a la virulència dels microorganismes del *M. tuberculosis complex*, ja que la pèrdua de determinades parts d'aquesta regió, per exemple la delecció d'un fragment de 9,5kb de RD1, ocasiona el creixement de *M. tuberculosis* amb una atenuació similar a la soca vacunal (129). D'altra banda, la reintroducció de la RD1 en soques de BCG fa que aquestes recuperin part de la seva virulència (89).



**Figura 18:** Locus RD1 i components del sistema de secreció ESX. (132)

Els gens de la regió RD1 contribueixen a la virulència del *M. tuberculosis* per a la codificació d'un aparell secretor anomenat "secretion system 1" (ESX-1). Els gens *Rv3874* i *Rv3875* varen ser identificats per primer cop als anys 90 pel grup del Dr Peter Andersen del Statens Serum Institute de Dinamarca. (130).

Aquests gens, codifiquen 2 proteïnes involucrades amb la virulència del bacil: "culture filtrate protein 10 kDa" (CFP-10) i "early secreted antigen 6 kDa" (ESAT-6). Aquestes proteïnes estan relacionades amb mecanismes de supressió de la resposta immune de l'hoste, reclutament de nous macròfags i la propagació del *M. tuberculosis* a noves cèl·lules macrofàgiques, per mecanismes encara no del tot coneguts (131).

### **1.7.3. Tècniques de diagnòstic de la infecció tuberculosa**

#### **1.7.3.1 Tècniques *in vivo*:**

La prova cutània de la tuberculina amb PPD és àmpliament utilitzada per detectar la infecció tuberculosa. Reaccions falses positives poden ocórrer en persones infectades amb altres micobacteris, incloent la vacunació amb BCG.

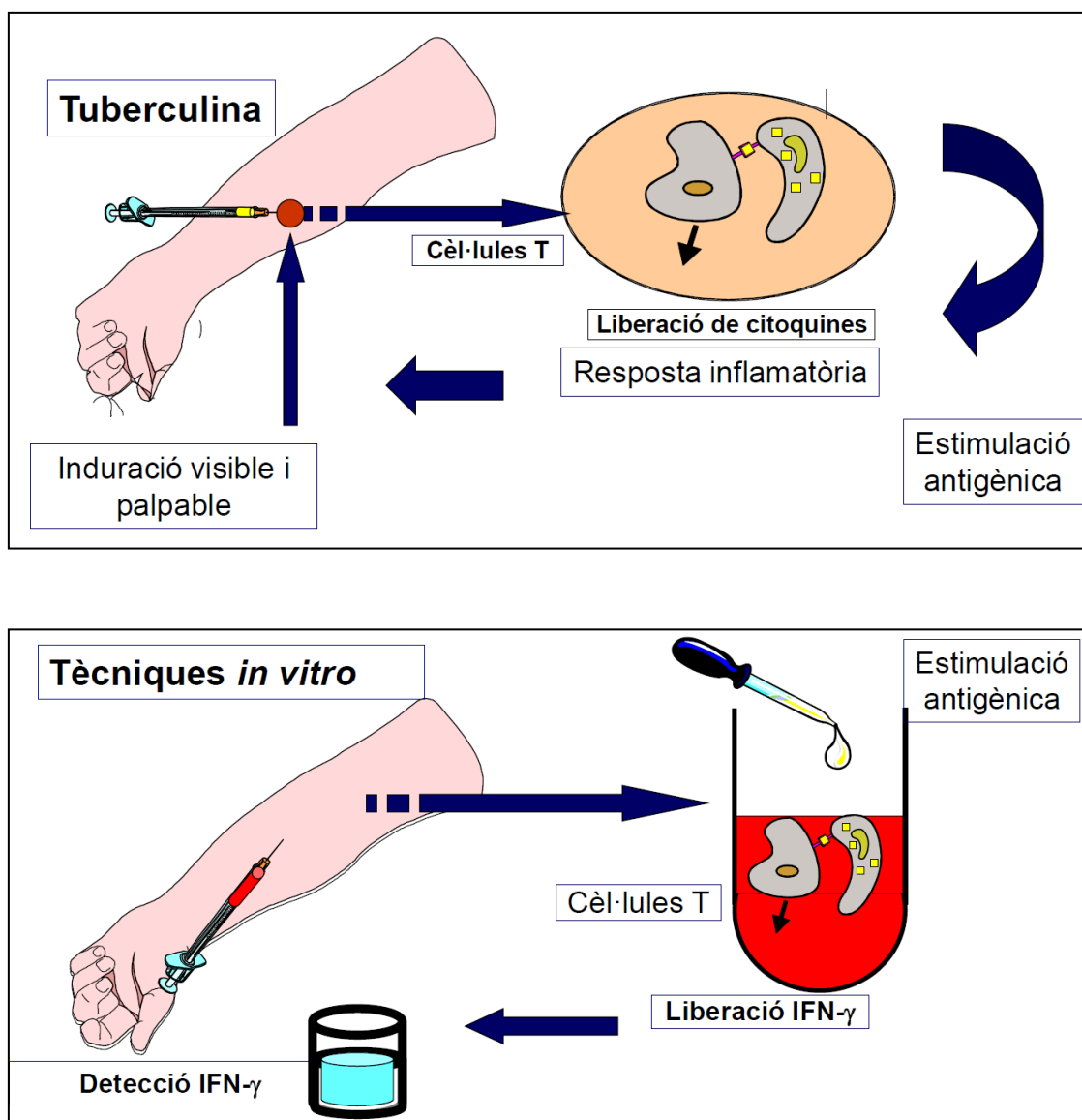
L'ESAT-6 i el CFP-10 es comporten com a potents antígens específics inductors de la resposta immunitària del tipus Th-1 amb producció de IF- $\gamma$  en les persones infectades per *M. tuberculosis*. Es va suggerir utilitzar l'ESAT-6 com un reactiu de diagnòstic amb la capacitat de discriminar la infecció amb MTB de la vacunació prèvia amb BCG.

C-Tb és una nova prova cutània per el diagnòstic de infecció TB, encara en fase experimental, que s'aplica amb la mateixa tècnica que la PT però utilitzant ESAT-6 i CFP-10 produïts com a proteïnes recombinants de *Lactococcus lactis*. (133).

#### **1.7.3.2 Tècniques *in vitro*:**

Basat en la inducció per part de l'ESAT-6 i el CFP-10 de la resposta immunitària del tipus Th-1 amb producció de IF- $\gamma$  en els éssers infectats per *M. tuberculosis* es van desenvolupar les tècniques *in vitro* per al diagnòstic de la infecció tuberculosa que es coneixen en la literatura anglesa amb les sigles IGRA (Interferon Gamma Release Assay) (134). Aquestes tècniques es basen, per tant, en la detecció en la sang perifèrica d'individus infectats, de IF- $\gamma$  alliberat

per les cèl·lules T sensibilitzades com a resposta a l'estimulació *in vitro* amb els antígens específics de *M. tuberculosis*.



**Figura 19:** Esquema comparatiu entre el mecanisme d'acció de la prova de la tuberculina i els IGRAs. (Adaptat de Cellestis).

En els anys 80 es va desenvolupar a Austràlia, el primer test d'interferó en sang total, per a diagnosticar la TB al ramat boví, molt semblant al que avui dia es fa servir en humans. La PT en aquests animals presentava els mateixos problemes de sensibilitat i especificitat que en humans, a part de majors problemes logístics (135).

El resultat de l'estudi de més de 12.000 bovins va demostrar que la prova d'IFN- $\gamma$  era alhora més sensible i més específica que la PT i va propiciar la seva comercialització.

L'èxit de la prova en el bestiar va portar al desenvolupament del primer test *in vitro* per el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent en humans: el QuantiFERON-TB (136). No obstant això, encara que més específic que la PT, aquesta prova utilitzava com a antigen el PPD i per tant seguia sent afectada per la vacuna BCG.



**Figura 20:** Injecció de tuberculina en la base de la cua d'un bou. Gentilesa Cellestis.

L'ús dels antigens específics ESAT-6 i CFP-10 va permetre el desenvolupament d'un IGRA altament específic, el QuantiFERON-TB Gold (QFN-G). Aquests antigens codificats per la regió RD1 del genoma de MTB estan absents en les soques de BCG i la majoria dels micobacteris no tuberculosos (NTM) (137).

**Taula 9:** Especificitat de l'ESAT-6 i CFP-10:

Tuberculosis complex	Antigens		Micobacteris no tuberculosos	Antigens	
	ESAT-6	CFP-10		ESAT-6	CFP-10
<i>M tuberculosis</i>	+	+	<i>M abcessus</i>	-	-
<i>M africanum</i>	+	+	<i>M avium</i>	-	-
<i>M bovis</i>	+	+	<i>M branderi</i>	-	-
BCG substrain			<i>M celatum</i>	-	-
Gothenburg	-	-	<i>M chelonae</i>	-	-
Moreau	-	-	<i>M fortuitum</i>	-	-
Tice	-	-	<i>M gordonii</i>	-	-
Tokyo	-	-	<i>M intracellulare</i>	-	-
Danish	-	-	<i>M kansasii</i>	+	+
Glaxo	-	-	<i>M malmoense</i>	-	-
Montreal	-	-	<i>M marinum</i>	+	+
Pasteur	-	-	<i>M oenavense</i>	-	-
			<i>M scrofulaceum</i>	-	-
			<i>M smegmatis</i>	-	-
			<i>M szulgai</i>	+	+
			<i>M terrae</i>	-	-
			<i>M vaccae</i>	-	-
			<i>M xenopi</i>	-	-

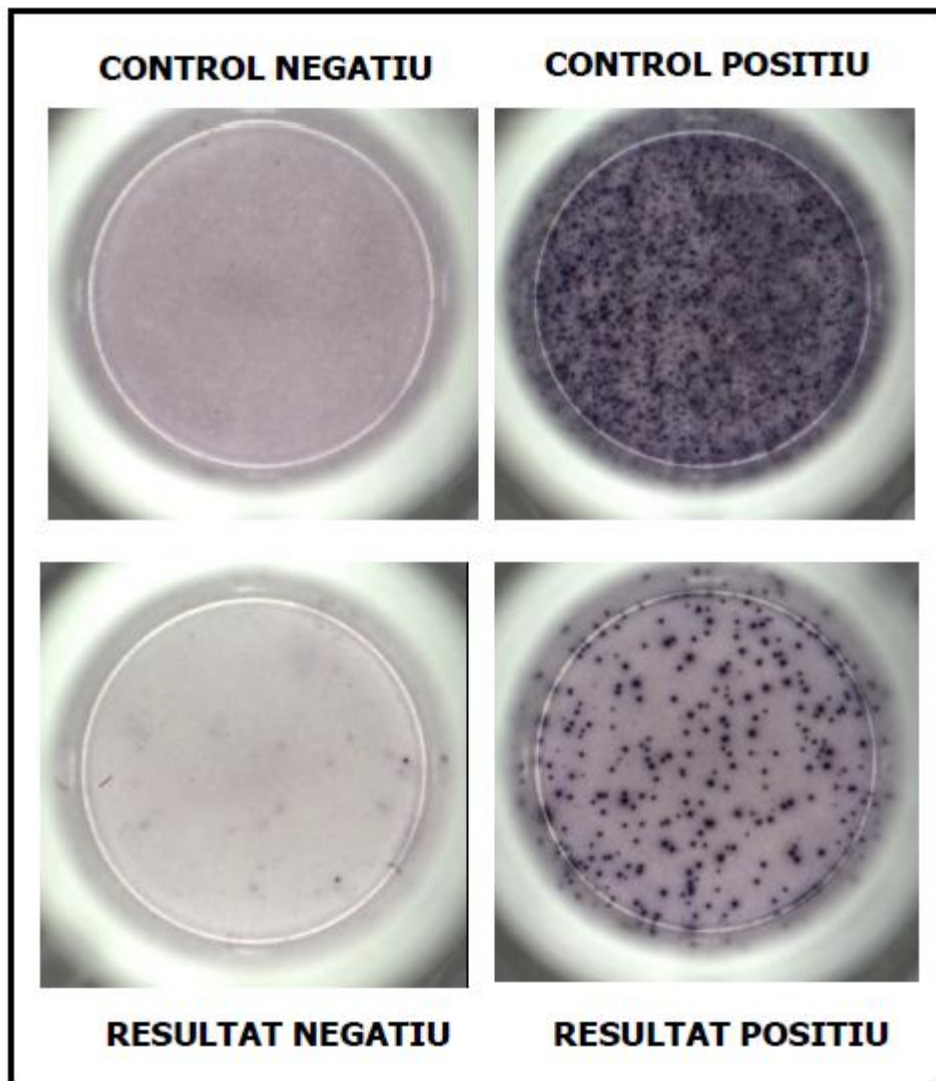
Per mesurar la resposta d'IFN- $\gamma$  es necessitava una mostra de sang fresca amb glòbuls blancs viables. Això limitava l'ús de la tècnica a laboratoris amb capacitat de procesar les mostres al cap de poques hores. El QuantiFERON TB Gold en tub d'assaig (QFT-G-IT) (Cellestis Limited, Carnegie, Victòria, Austràlia) va ser desenvolupat per fer front a aquesta limitació.

La versió *in tub* incorpora els antigens específics de *M. tuberculosis* en el mateix tub de recollida de la mostra de sang i, a més, afegeix un tercer antígen específic; el TB7.7 (Rv2654). Aquest nou antígen està codificat en RD11 i no es troba en cap de les soques de BCG, així com en les MNT més comunes .

**Figura 21:** Tubs per QFT-G-IT: nil, antígen i mitògen. Gentilesa Cellestis.

En el QFT-G-IT, es determina per mitjà de la tècnica d'ELISA, la producció total de IF- $\gamma$  produït en els individus infectats per la tuberculosi, a partir d'una mostra de sang total que s'incuba amb els antígens específics.

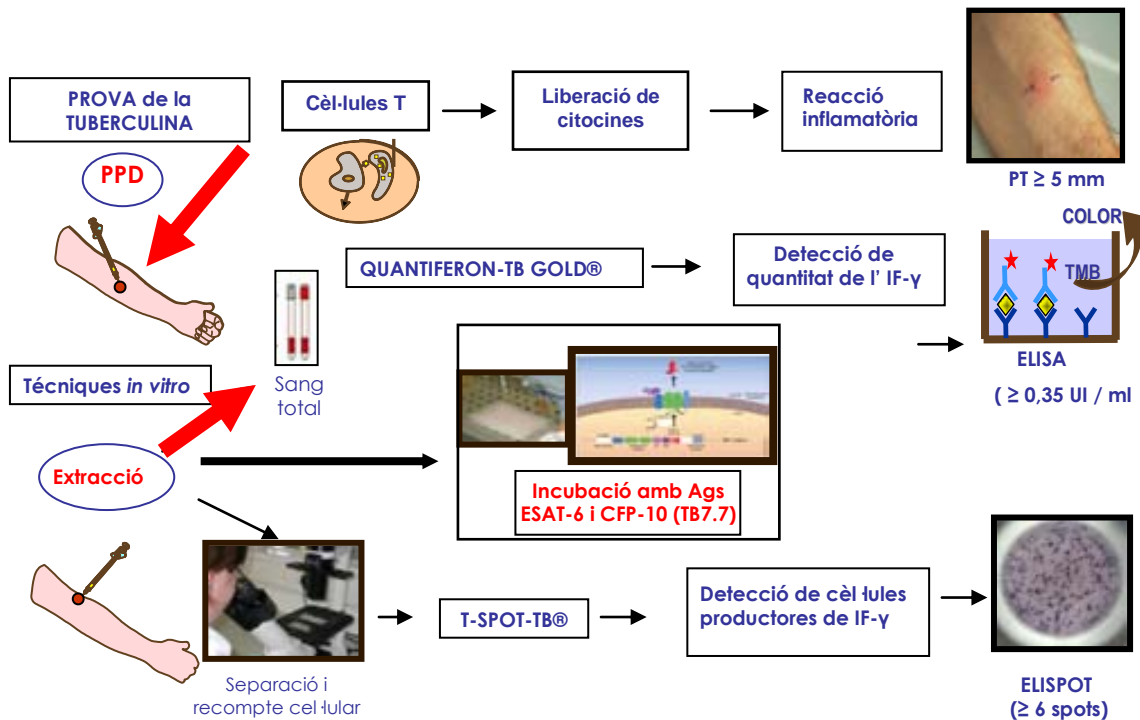
L'altra tècnica, el T-SPOT.TB va ser desenvolupada per Lalvani a finals dels anys 1990 i és comercialitzada per Oxford Immunotec Ltd a Òxford, UK (138). Es tracta d'una tècnica més laboriosa, que requereix una separació prèvia de les cèl·lules monocitàries per a la posterior incubació amb els antígens ESAT-6 i CFP-10. La seva lectura es fa per mitjà de la tècnica de l'ELISPOT en la qual cada *spot* representa una cèl·lula T secretora d' IF- $\gamma$ .



**Figura 22:** Lectura dels resultats del T-SPOT.TB. Cortesia Oxford Immunotec.



Ambdues tècniques incorporen controls positius i negatius capaços de detectar falsos resultats deguts a anèrgia i problemes immunològics (interpretats com a resultats indeterminats).



**Figura 23:** Comparació entre la prova de la tuberculina i les tècniques *in vitro* (139).

La utilització dels IGRAs presenta indubtables avantatges respecte a la PT: evita la subjectivitat en la interpretació dels resultats; la determinació es pot repetir si cal sense risc d'interferència en infectats per MNT o vacunats; l'obtenció dels resultats és ràpida; a l'eliminar la visita de lectura evita la pèrdua d'individus que no retornen; és de fàcil estandardització i aplicació en el laboratori; permet la inclusió de controls positius per detectar els pacients anèrgics, i respecta la privacitat del pacient (140).

El estudis publicats que han comparat els IGRAs amb la PT en diferents poblacions suggereixen que aquestes noves tècniques tenen major sensibilitat i especificitat i correlacionen millor el risc d'infectar-se amb el grau de contacte amb un malalt bacil·lífer que la PT (141 - 143).

El principal inconvenient dels IGRAs és el cost econòmic molt superior a la PT. Tanmateix, la seva implantació pot representar a mig termini un estalvi de recursos sanitaris en disminuir els falsos positius de la PT i les despeses derivades d'això: radiografies, visites mèdiques i tractaments de la infecció tuberculosa innecessaris. Per tot això, alguns estudis apunten a que la seva implantació és cost-efectiva (144) i el seu ús es va generalitzant als països amb recursos econòmics.

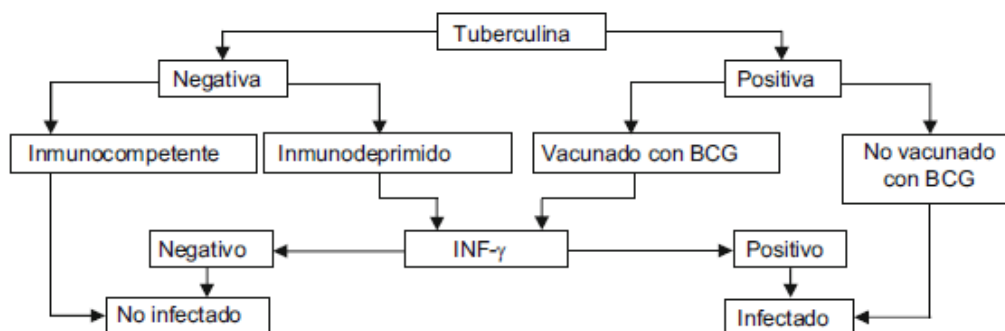
### **1.7.4. Normatives d'utilització dels IGRAs:**

Diferents societats científiques a nivell mundial han publicat normatives i recomanacions que avalen l'ús d'aquestes noves tecnologies (73) (145) (146).

El Center of Diseases Control (CDC) en Estados Unidos recomana utilitzar la PT o els IGRAs en els cribratges i en els estudis de contactes, per identificar les persones en major risc d'infectar-se i/o major risc de desenvolupar la malaltia si s'infecten i per tant, tributàries de TIT.

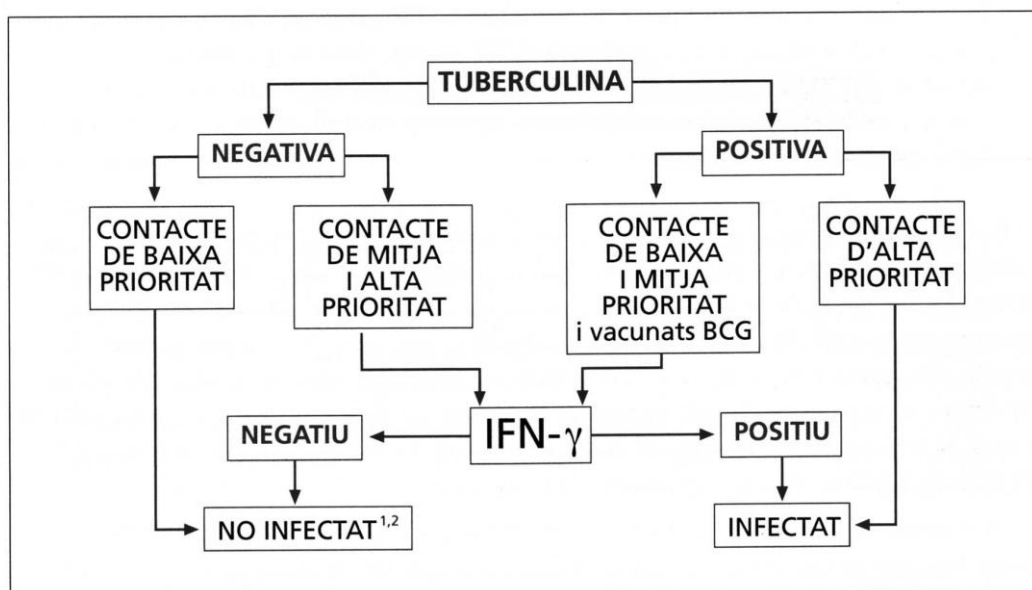
Desaconsellen utilitzar els IGRAs (així com la PT) en persones amb baix risc d'infecció i de progressió a TB activa si estan infectades, per tal de no augmentar el nombre de resultats falsos positius, reduir la prescripció de tractaments innecessaris i minimitzar la possibilitat d'esdeveniments adversos innecessaris (145).

El National Institute for Health and Care Excellence (NICE) en el Regne Unit recomana utilitzar la PT per el diagnòstic de la infecció latent en els estudis de contacte familiars, escolars i laborals i en una segona fase (l'estratègia *two steps*), utilitzar els tests d' IF- $\gamma$  per confirmar la infecció en les persones amb PT positiva vacunades de BCG. Desaconsella l'ús dels IGRAs en els menors de 5 anys; aconsella combinar ambdues proves per incrementar la sensibilitat en els immunodeprimits i utilitzar directament un test de IF- $\gamma$ . en aquelles poblacions poc accessibles (73).



**Figura 24:** Algorisme d'utilització conjunta de la prova de la tuberculina i les tècniques *in vitro* de l'interferó gamma en el diagnòstic de la infecció tuberculosa (147).

Al nostre país es recomana començar per la PT i utilitzar el IGRA com a prova confirmatòria en aquells casos en que es sospiti un fals negatiu (immunodeprimits i nens) o un fals positiu de la PT (vacunats amb la BCG) (63) (70) (147).



1: En els contactes de mitja i alta prioritat amb prova de tuberculina negativa i interferó gamma negatiu que es coneix o sospita immunodepressió, s'haurà d'avaluar individualment la probabilitat d'estar o no veritablement infectat.

2: En els contactes exposats a un cas de tuberculosi pulmonar no infectats, cal repetir prova de tuberculina a les 8-12 setmanes.

**Figura 25:** Algorisme d'utilització conjunta de la prova de la tuberculina i les tècniques *in vitro* de l'interferó gamma en el diagnòstic de la infecció tuberculosa en els estudis de contacte. (63)



## 2. JUSTIFICACIÓ



### 2. JUSTIFICACIÓ

L'OMS estima que a tot al món hi ha aproximadament 8,6 milions de nous casos de tuberculosi (14). Al voltant d'un terç de la població mundial està infectada pel bacil de la tuberculosi, el que representa un important reservori de la malaltia. Estudis publicats en els anys 80 van mostrar que el 5-10 % dels contactes recentment infectats desenvolupen la malaltia activa dins dels següents 2 a 5 anys després de l'exposició a una font infecciosa; mentre que un altre 5-10 % desenvolupen la tuberculosi en algun moment durant la resta de la seva vida (148). Per intentar erradicar la tuberculosi cal fer un diagnòstic ràpid i acurat així com oferir tractament preventiu a les persones infectades que presentin un risc més alt de desenvolupar la malaltia. Les persones que han tingut un contacte recent amb malalts amb TB pulmonar bacil·lífera, els infectats per el VIH, els pacients que reben tractament immunosupressor, així com la població pediàtrica són alguns dels grups amb un alt risc de desenvolupar la malaltia un cop infectats.

Fins fa pocs anys, l'única eina de la qual disposàvem per al diagnòstic de la infecció tuberculosa era la prova de la tuberculina. És una tècnica, teòricament senzilla, barata, accessible i estandarditzada que ha estat utilitzada durant els últims 100 anys com l'únic mètode per al diagnòstic de la infecció tuberculosa.

No obstant això, en la pràctica clínica hi ha un gran desconeixement sobre la PT fora dels mitjans especialitzats en TB, de tal manera que es produeixen freqüents errors en la tècnica d'aplicació de la PT, en la seva lectura i interpretació dels resultats. Un altre inconvenient és que la majoria de proteïnes presents al PPD no són específiques de *M. tuberculosis* sinó que les comparteix amb altres micobacteris. Això provoca una disminució en l'especificitat de la prova, ja que individus sensibilitzats per exposició prèvia a altres micobacteris o vacunats amb BCG també responen immunològicament al PPD.

## JUSTIFICACIÓ

D'altra banda pot tenir una baixa sensibilitat en pacients immunodeprimits, amb tuberculosi molt avançades o en nens petits. Altres inconvenients de caràcter pràctic són que l'ús repetit de la prova en algunes condicions pot produir un efecte *booster* (fals positiu per un efecte d'estimulació antigènica) . A més, es requereix una segona visita presencial de lectura a les 48-72hs, amb la pèrdua d'hores laborals o escolars. I finalment el resultat d'una prova positiva es fa evident, ocasionant problemes de confidencialitat i generant molta alarma social.

Per obviar aquests inconvenients pràctics i intentar millorar la sensibilitat i especificitat del diagnòstic de la infecció tuberculosa s'han desenvolupat tècniques de laboratori que quantifiquen la resposta immune cel·lular a partir de la detecció de l'IF- $\gamma$  produït per les cèl·lules T sensibilitzades prèviament com a resposta a l'estimulació *in vitro* amb antígens específics del bacil tuberculós. S'utilitzen per l'estimulació de les cèl·lules T, els antígens codificats en la regió RD1 de *M.tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10) i RD 11 (TB7.7) que són antígens presents en el complex *M.tuberculosis* però absents en la vacuna BCG i en la majoria dels micobacteris ambientals.

Els tests actualment comercialitzats són el Quantiferon Gold in tube (QFN-G-IT) i el T-SPOT.TB. El QFN-G-IT utilitza sang total que s'estimula amb els antígens i mitjançant tècnica d' ELISA determina la quantitat d' IF- $\gamma$  expressada en UI/ml. El T-SPOT.TB requereix una separació prèvia de les cèl·lules monocitàries seguit de la incubació amb els antígens i la seva lectura es fa mitjançant tècnica de l' ELISPOT en la qual cada *spot* representa una cèl·lula T secretora de IF- $\gamma$  .



Els resultats dels estudis realitzats amb totes dues tècniques semblen concloure que aquestes són capaces de discriminar entre els individus veritablement infectats per *M.tuberculosis* d'aquells que falsament reaccionen a la PT per haver estat vacunats amb la BCG o infectats per altres micobacteris. També incorporen controls per detectar l'anèrgia i excloure així els falsos negatius.

Algunes altres avantatges són que eviten la subjectivitat en la interpretació dels resultats; la determinació pot repetir-se si és necessari sense ocasionar *efecte booster*; són tècniques ràpides que permeten obtenir el resultat en 24hs; no requereixen una visita personalitzada de lectura i al realitzar-se al laboratori, es respecta més la privacitat del pacient.

Com a inconvenient en comparació a la PT, l'ús de les noves tècniques presenta un major cost econòmic inicial però, la seva implantació pot representar a mig termini un estalvi de recursos sanitaris al disminuir els falsos positius de la PT i les despeses derivades d'això: radiografies, visites mèdiques i tractaments de la infecció tuberculosa innecessaris cosa que ha fet que nombrosos països amb recursos econòmics ja les hagin incorporat a les seves guies de pràctica clínica.

Aquesta Tesi es basa en un estudi realitzat conjuntament per la Unitat de Tuberculosi de Drassanes de Barcelona i l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona que van ser pioners en la introducció d'aquestes tècniques a l'estat espanyol. La finalitat de l'estudi va ser comprovar i comparar la utilitat clínica d'ambdues tècniques IGRAs amb la PT en diferents poblacions.

La Tesi es centra en l'aplicabilitat en la pràctica clínica de les noves tècniques com a eina complementària per al diagnòstic de la malaltia tuberculosa en adults; el diagnòstic de la infecció tuberculosa en població pediàtrica i el seu ús en l'estudi dels contactes de malalts bacilífers de diferents edats.



## 3. OBJECTIUS



### **3. OBJECTIUS**

#### **1. Avaluar la utilitat de QFN-G-IT i T-SPOT.TB en el diagnòstic de la tuberculosi activa en adults en comparació amb la prova de la tuberculina en diferents etapes de la malaltia.**

1.1. Estudiar la producció d' IF- $\gamma$  en resposta als antígens específics de *M. tuberculosis* en el diagnòstic de la tuberculosi activa.

1.2. Estudiar la utilitat de la monitorització de la resposta d'IF- $\gamma$  durant les diferents fases del tractament antituberculós.

#### **2. Comparar els resultats de QFN-G-IT i T-SPOT.TB amb els obtinguts per la PT per al diagnòstic d'infecció tuberculosa en població pediàtrica segons el risc d'infecció.**

2.1. Analitzar els resultats concordants i discordants entre les diferents tècniques.

2.2. Investigar la influència de la infecció per micobacteries no tuberculoses.

#### **3. Correlacionar els resultats de la prova de la tuberculina i ambdós IGRAs amb factors associats amb la transmissió de la tuberculosi.**

3.1. Factors de risc associats al cas índex com el retard diagnòstic o la presència de tos.

3.2 Factors de risc associats a l'ambient on es produeix el contacte com l'índex d'amuntegament (nombre de persones compartint un determinat espai) o la mida de l'habitació on es produeix el contacte (expressat en metres quadrats).



## 4. RESULTATS





#### 4. RESULTATS:

##### 4.1. Article 1

#### **T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patients at the beginning, during, and after antituberculosis treatment.**

Jose Domínguez, Malú De Souza-Galvão, Juan Ruiz-Manzano, Irene Latorre  
Cristina Prat, Alicia Lacoma, Celia Milà, Maria Ángeles Jiménez, Silvia Blanco,  
José Maldonado, Neus Altet, Vicente Ausina.

*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 63 (2009) 43–51.

El diagnòstic precoç i el correcte tractament de la TB són els pilars del control de la malaltia. Els pacients amb bacil·loscòpia negativa i TB extrapulmonar poden presentar dificultats en el diagnòstic, obligant a la pràctica de mètodes invasius. A mitjans de la dècada dels noranta es va identificar per primera vegada els antígens específics del *M. tuberculosis* ESAT-6 i CFP-10 codificats per la regió de Diferència 1 (RD1) del genoma del micobacteri, i posteriorment el TB7.7 codificat a la regió RD11. Aquests antígens estan absents en les soques de la vacuna BCG i en la majoria de les MNT. Aquest descobriment va permetre el desenvolupament de proves més precises per al immunodiagnòstic de la infecció per *M. tuberculosis*, els tests *in vitro* de detecció d'IF- $\gamma$  (QuantiFERON-TB-Gold i el T-SPOT.TB)

En aquest estudi vam avaluar el rendiment d'aquests 2 nous tests en comparació amb la PT en el moment del diagnòstic de TB activa en pacients adults i a més estudiar la resposta de producció d'IF- $\gamma$  als antígens específics en les diferents fases del tractament. Vam estudiar pacients amb TB pulmonar i extrapulmonar actives, amb i sense confirmació microbiològica i un cinqué grup de pacients amb TB prèviament tractada.

En la nostra experiència el T-SPOT.TB ha estat més sensible en el diagnòstic de la tuberculosi activa que el QFN-G-IT; 83,3% de positivitat en el principi del tractament i 69,8% durant el mateix, mentres que per el QFN-G-IT va ser de 69,4% de positivitat al principi del tractament i 48,8% al llarg del tractament. Vam comprovar que la resposta als antígens específics disminueix durant el tractament, tornant a augmentar al final de la teràpia fins a nivells semblants als de l'inici d'aquesta.

En conclusió, les proves d'IF- $\gamma$  malgrat no siguin capaç de diferenciar entre malaltia i infecció, podrien ser utilitzades com a mètode complementari en el diagnòstic de la tuberculosi activa, especialment en àrees de baixa incidència de TB, en poblacions especials on és difícil d'obtenir la confirmació per cultiu i també en la TB extrapulmonar. El paper de la resposta al CFP-10 en els pacients després del tractament antituberculós i la seva utilització en el diagnòstic de la tuberculosi activa requereix més investigació.





## Mycobacteriology

## T-cell responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens in active tuberculosis patients at the beginning, during, and after antituberculosis treatment

Jose Domínguez<sup>a,c,d,\*</sup>, Malú De Souza-Galvão<sup>c,e</sup>, Juan Ruiz-Manzano<sup>b,c,d</sup>, Irene Latorre<sup>a,c,d</sup>,  
 Cristina Prat<sup>a,c,d</sup>, Alicia Lacomá<sup>a,c</sup>, Celia Milà<sup>e</sup>, María Ángeles Jiménez<sup>e</sup>, Silvia Blanco<sup>a,c,d</sup>,  
 José Maldonado<sup>f</sup>, Neus Altet<sup>e</sup>, Vicente Ausina<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>b</sup>Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Fundació Institut en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

<sup>c</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Ciber Enfermedades Respiratorias, Instituto de Salud Carlos III, Badalona, Spain

<sup>e</sup>Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>f</sup>Serveis Clínics de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 17 July 2008; accepted 12 September 2008

---

**Abstract**

The objectives of the study were to assess the performance of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFN-G-IT) and the T-SPOT.TB tests in the immunodiagnosis of active tuberculosis (TB) in adult patients, and to study the T-cell interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) responses during treatment and in patients who have recovered after curative treatment and self-healed TB patients. When only analyzing patients included at the beginning of treatment, the sensitivity was 83.3% for T-SPOT.TB and 69.4% for QFN-G-IT. In contrast, when evaluating patients during treatment, the sensitivity of the T-SPOT.TB and QFN-G-IT decreased to 69.8% and 48.8%, respectively. The response to the specific antigens increased after finishing the treatment compared with the values during the treatment. The T-SPOT.TB was more sensitive in diagnosing active TB than the QFN-G-IT. The IFN- $\gamma$  tests could be used as a complementary method in the diagnosis of active TB.  
 © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Active tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*

---

**1. Introduction**

The basis of tuberculosis (TB) control programs consists of the diagnosis and correct treatment of patients with active TB. One essential factor for controlling the spread of this disease is the ability to diagnose it in its early stages. Patients with pulmonary TB could be smear-negative for acid-fast bacilli, and mycobacterial culture can take several weeks. In addition, the diagnosis of extrapulmonary TB is

complicated and often requires invasive diagnostic methods (Migliori et al., 2006; Valdes et al., 1998).

In an effort to develop more accurate tests for the immunodiagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and also for vaccine design strategies, 2 specific region of difference (RD) 1 antigens have been described. These antigens are the early secreted antigenic protein 6 kDa (ESAT-6) and the culture filtrate protein 10 kDa (CFP-10) that are present in *M. tuberculosis* but absent from all *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine strains and from most environmental mycobacteria (Andersen et al., 2000).

In vitro assays to measure T-cell-mediated immune responses to these antigens have been evaluated. Infected individuals are identified by the interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) released by their T cells after being stimulated by *M. tuberculosis*-

\* Corresponding author. Servei de Microbiologia, Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut "Germans Trias i Pujol", Carretera del Canyet s/n, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. Tel.: +34-93-497-88-94; fax: +34-93-497-88-95.

E-mail address: jadomb@gmail.com (J. Domínguez).

specific antigens. Several studies have published promising results for the utility of T-cell assays in the diagnosis of latent TB infection (Dominguez et al., 2008; Eum et al., 2008; Ewer et al., 2003; Lalvani et al., 2001a; Piana et al., 2006; Porsa et al., 2007).

Basically, 3 in vitro IFN- $\gamma$  assays that incorporate RD1-specific antigens are available: QuantiFERON-TB Gold assay (QFN-Gold) and QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFN-G-IT) (Cellestis Limited, Carnegie, Australia), and the T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Limited, Abingdon, UK). QuantiFERON-TB Gold assay and QFN-G-IT detect IFN- $\gamma$  production after stimulation of whole blood samples with the specific antigens; in contrast, T-SPOT.TB detects the number of IFN- $\gamma$ -producing T cells after stimulation of isolated peripheral blood mononuclear cells. The main difference between QFN-Gold and QFN-G-IT is that in the latter, the specific *M. tuberculosis* antigens are included in the same blood sample collection tube with the addition of a 3rd specific antigen, TB7.7 (Rv2654). This new antigen is encoded in RD11 and is missing from the BCG strains as well as most common nontuberculous mycobacteria (Brock et al., 2004).

Numerous studies have evaluated the utility of these tests in diagnosing active TB (Pai and Menzies, 2007) and have described a wide range of sensitivities (Pai et al., 2008). In addition, they have shown that the IFN- $\gamma$  response decreased with treatment (Carrara et al., 2004; Goletti et al., 2006a; Lalvani et al., 2001a; Pathan et al., 2001), suggesting that this response could be used to monitor the efficacy of therapy. On the other hand, there are only few studies using tests based on specific antigens in patients who have recovered from active TB.

The objectives of the present study were to assess the accuracy and reliability of QFN-G-IT and the T-SPOT.TB tests in the immunodiagnosis of active TB in adult patients at the moment of diagnosis, and to study the T-cell IFN- $\gamma$  responses to the specific antigens during the treatment and in patients who have recovered after a curative treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study population

We enrolled adult patients between September 2004 and June 2007 who went to Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, the TB Control and Prevention Unit of Barcelona (CAP Drassanes), and the Serveis Clínic (Barcelona). Ethics approval for this study was provided by the corresponding ethics committees.

We obtained informed consent from all patients before blood sampling. A detailed questionnaire about clinical information was completed. Patients were asked to indicate the results of any previous tuberculin skin test (TST), whether they had received BCG vaccination, details of previous diagnosis of active TB, and whether they had any other medical conditions. All subjects were tested for human immunodeficiency virus (HIV) infection. Data were also

collected from medical records of chest radiography. The results and dates of culture and details of treatment of TB were also collected.

We included different patients during various stages of the anti-TB treatment (at the beginning, and during and after treatment) to evaluate the effect of the antibiotic therapy on the immune response and on the IFN- $\gamma$  test results. Patients at the beginning of treatment had received less than 2 weeks of therapy or were untreated at the time of giving blood for both assays. Patients studied during treatment were at later stages of their treatment course. The TST was performed at the beginning of the treatment on all patients diagnosed with pulmonary TB. The patients were classified into 5 groups.

#### 2.1.1. Group 1

Group 1 is composed of 79 patients diagnosed with pulmonary TB. Thirty-six cases were at the beginning of the treatment and 43 during the treatment. In all cases, *M. tuberculosis* was isolated by culture. Ten patients were followed longitudinally, all of whom were HIV negative and received curative treatment. Treatment was successful in these 10 participants as evidenced by no clinical or radiologic evidence of current disease, the completion of antituberculous chemotherapy, and sterile mycobacterial cultures.

#### 2.1.2. Group 2

Group 2 is composed of 14 patients with extrapulmonary TB (lymphadenitis [4], pleural [3], peritoneal [1], disseminated [6]). Two cases were recruited at the beginning of the treatment and 12 cases during the treatment. In all cases, *M. tuberculosis* was isolated by culture.

#### 2.1.3. Group 3

Group 3 is composed of 10 patients diagnosed with pulmonary TB (5 cases at the beginning of the treatment and the remaining 5 cases during the treatment) and 6 patients diagnosed with nonrespiratory TB (lymphadenitis [3], pleural [2], and cutaneous [1]) recruited during the treatment. Although the disease was not microbiologically confirmed, the physician decided that the patients suffered from TB based on clinical, pathologic, and radiologic findings, and the patients clinically and radiologically responded to a full course of anti-TB treatment.

#### 2.1.4. Group 4

Group 4 is composed of 6 healed pulmonary TB patients after a curative treatment. In all cases, the disease was microbiologically diagnosed and successfully treated.

The main demographic characteristics of the TB patients included in the study are shown in Table 1. The technicians performing the TST and the IFN- $\gamma$  tests were not made aware of the patients' clinical status and times of sample collection.

### 2.2. Tuberculin skin test

Tuberculin skin test was performed by the Mantoux method using 2 intradermal tuberculin units of PPD RT23 (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Size of

Table 1  
Demographic characteristics of TB patients studied

Variable	Group 1	Group 2	Group 3		Group 4
	Pulmonary TB confirmed microbiologically, n = 79 (%)	Extrapulmonary TB confirmed microbiologically, n = 14 (%)	Pulmonary TB not confirmed microbiologically, n = 10 (%)	Extrapulmonary TB not confirmed microbiologically, n = 6 (%)	Healed pulmonary TB after curative treatment, n = 6 (%)
Gender					
Female	25 (31.6)	5 (35.7)	1 (10)	2 (33.3)	2 (33.3)
Male	54 (68.4)	9 (64.3)	9 (90)	4 (66.7)	4 (66.7)
Age, mean ± SE	38.87 ± 18.5	40.24 ± 19.60	39.50 ± 12.7	28.67 ± 6.5	48.8 ± 11.98
BCG vaccinated					
Yes	16 (20.3)	1 (7.1)	6 (60)	2 (33.3)	2 (33.3)
No	63 (79.7)	13 (92.9)	4 (40)	4 (66.7)	4 (66.7)
Immunosuppression					
AIDS patients	2 (2.5)	6 (42.9)	1 (10)	0 (0)	0 (0)
Treatment with systemic steroids	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
No	76 (96.2)	8 (57.1)	9 (90)	6 (100)	6 (100)
Country of birth					
Immigrants from countries with high prevalence of TB infection	44 (55.7)	5 (35.7)	6 (60)	5 (83.3)	2 (33.3)
Autochthonous Spanish population	35 (44.3)	9 (64.3)	4 (40)	1 (16.7)	4 (66.7)
Groups of patients					
At the beginning of treatment	36 (45.5)	2 (14.3)	5 (50)	0 (0)	–
During the treatment	43 (54.5)	12 (85.7)	5 (50)	6 (100)	–

the induration was measured 48 to 72 h later. The TST results were noted and read according to the Spanish Society of Pneumology guidelines (Blanquer et al., 2008) by experienced staff who perform these duties regularly. In our study, TST indurations  $\geq 5$  mm were classified as positive results.

### 2.3. T-SPOT.TB

The test was performed following the manufacturer's recommendations. Cells were stimulated in each well by medium alone (as nil control), phytohemagglutinin (as positive control), and 2 peptide panels containing the antigens ESAT-6 and CFP-10. The presence of reactive antigen-specific T cells was revealed as a spot on the well. Spots were scored by the naked eye and, in doubtful cases, with the support of an automated AID ELISPOT plate reader (Lector AID Elisposts; Autoimmun Diagnostiks, Germany). Test wells were scored as positive if they contained at least 6 spot-forming cells more than the nil control well, and this number was at least twice the number of the nil control well on one or both of the antigen panels. A result was considered indeterminate if the antigen-stimulated sample was negative and if the value of the positive control was less than 20 spots.

### 2.4. QuantiFERON-TB Gold In-Tube

This test was also performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, a total of 3 mL of

blood was taken from each patient and collected in 3 tubes of 1 mL each (nil control, positive control, and TB-specific antigens). The amount of IFN- $\gamma$  released was measured by ELISA. Raw optical densities were interpreted using the specific software provided by the manufacturer. The result obtained by the nil control was subtracted from the mitogen control and the antigen-stimulated samples. Regardless of the result of the mitogen control, the cutoff value for a positive test was at least 0.35 IU/mL of IFN- $\gamma$  in the sample after simultaneous stimulation with the specific antigens. The result of the test was considered indeterminate if an antigen-stimulated sample was negative and if the value of the positive control was less than 0.5 IU/mL.

### 2.5. Statistical analysis

Concordance between the tests was assessed using Cohen's  $\kappa$  coefficient. We used the McNemar test to compare the proportion of negative and positive results among the QFN-G-IT, T-SPOT.TB, and TST. The differences in functions of the time of collecting the sample and of smear results were calculated using the nonparametric Mann-Whitney *U* test. Comparison of the number of spots and the IFN- $\gamma$  released was performed by Kruskal-Wallis 1-way analysis. Differences were considered significant when the *P* value was less than 0.05. All analyses were made with SPSS statistical software for Windows (SPSS version 14.0; SPSS, Chicago, IL).

3. Results

The number of positive results in each group of patients obtained by both IFN- $\gamma$  assays and the TST are shown in Table 2.

3.1. Results in pulmonary TB patients

The overall sensitivity in microbiologically confirmed patients, including both those at the beginning and during the treatment, was 75.9% using T-SPOT.TB and 58.2% using QFN-G-IT. T-SPOT.TB produced significantly more positive results than QFN-G-IT ( $P = 0.003$ ), with poor agreement ( $\kappa = 0.44$ ; standard error [SE] = 0.096). However, when only analyzing patients included at the beginning of the treatment, the sensitivity increased to 83.3% for T-SPOT.TB and 69.4% for QFN-G-IT. Differences between both tests were not significant ( $P = 0.125$ ,  $\kappa = 0.43$ , SE = 0.153). In these patients, the sensitivity of the TST is 94.4%, with insignificant differences with T-SPOT.TB ( $P = 0.125$ ,  $\kappa = 0.46$ , SE = 0.216) but significant with QFN-G-IT ( $P = 0.004$ ,  $\kappa = 0.24$ , SE = 0.142). In contrast, while evaluating patients during treatment, the sensitivity of the T-SPOT.TB and QFN-G-IT decreased to 69.8% and 48.8%, respectively. In this case, the difference in the number of positive results

between the 2 tests was also significant ( $P = 0.022$ ,  $\kappa = 0.42$ , SE = 0.127).

Although the differences in sensitivity between patients evaluated at the beginning and during the treatment were not significant for T-SPOT.TB ( $P = 0.209$ ) or for QFN-G-IT ( $P = 0.078$ ), the number of responding T cells after stimulation with ESAT-6 (Fig. 1) and the IFN- $\gamma$  released after specific antigen stimulation was significant ( $P = 0.004$  and  $P = 0.030$ , respectively) (Fig. 1). The number of responding T cells after stimulation with CFP-10 did not obtain significance (Fig. 1); however, we observed differences when comparing patients at the beginning with patients recruited after more than 5 months of treatment. We did not observe a relationship between negative results for IFN- $\gamma$  tests and the length of treatment time (data not shown).

However, the results obtained in the 10 patients monitored from the beginning and during the treatment showed that there is considerable interindividual variation in terms of the rate of decline of the response (Fig. 2 A-C).

In addition, the difference in the percentage of positive results for IFN- $\gamma$  tests was not significant for smear-positive or negative ( $P = 0.063$ ) (Table 2). However, the agreement between the IFN- $\gamma$  tests in smear-positive patients was better than in smear-negative ( $\kappa = 0.62$ , SE = 0.182, and  $\kappa = 0.21$ , SE = 0.181, respectively), with

Table 2  
QuantiferON-TB Gold In-tube, T-SPOT.TB, and TST results in the different groups of TB patients

Groups of patients	Diagnostic tests								
	T-SPOT.TB			QFN-G-IT			TST		
	Positive (%)	Negative (%)	Indet <sup>a</sup> (%)	Positive (%)	Negative (%)	Indet (%)	Positive (%)	Negative (%)	
<b>Group 1</b>									
Pulmonary TB confirmed microbiologically (n = 79)	60 (75.9)	16 (20.3)	3 (3.8)	46 (58.2)	31 (39.3)	2 (2.5)	55/58 (94.8)	3/58 (5.2)	
At the beginning of treatment (n = 36)	30 (83.3)	4 (11.1)	2 (5.6)	25 (69.4)	10 (27.8)	1 (2.8)	34 (94.4)	2 (5.6)	
Smear-positive (n = 19)	14 (73.7)	3 (15.8)	2 (10.5)	14 (73.7)	4 (21.1)	1 (5.2)	17 (89.5)	2 (10.5)	
Smear-negative (n = 17)	16 (94.1)	1 (5.9)	0 (0)	11 (64.7)	6 (35.3)	0 (0)	17 (100)	0 (0)	
During the treatment (n = 43)	30 (69.8)	12 (27.9)	1 (2.3)	21 (48.8)	21 (48.8)	1 (2.4)	21/22 (95.5)	1/22 (4.5)	
<b>Group 2</b>									
Extrapulmonary TB confirmed microbiologically (n = 14)	7 (50)	7 (50)	0 (0)	7 (50)	7 (50)	0 (0)	2/2 (100)	0 (0)	
At the beginning of treatment (n = 2)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	
During the treatment (n = 12)	5 (41.7)	7 (58.3)	0 (0)	5 (41.7)	7 (58.3)	0 (0)	–	–	
<b>Group 3</b>									
Pulmonary TB without microbiological confirmation (n = 10)	8 (80)	2 (20)	0 (0)	7 (70)	3 (30)	0 (0)	10 (100)	0 (0)	
At the beginning of treatment (n = 5)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	0 (0)	
During the treatment (n = 5)	4 (80)	1 (20)	0 (0)	2 (40)	3 (60)	0 (0)	–	–	
Extrapulmonary TB not confirmed microbiologically	6 (100)	0 (0)	0 (0)	4 (66.7)	2 (33.3)	0 (0)	4/4 (100)	0 (0)	
During treatment (n = 6)									
<b>Group 4</b>									
Healed pulmonary TB after curative treatment (n = 5)	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	0 (0)	5 (83.3)	1 (16.7)	

<sup>a</sup> Indeterminate result.

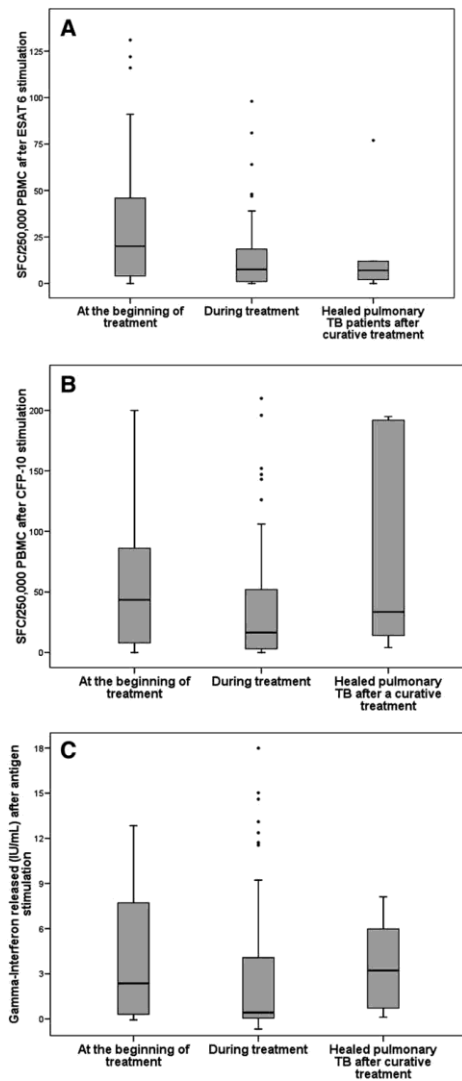


Fig. 1. Number of spot T cells formed and IFN- $\gamma$  released after specific antigen stimulation for patients at the beginning, during, and after curative treatment (A, after ESAT-6 stimulation; B, after CFP-10 stimulation; C, IFN- $\gamma$  released after specific antigen stimulation).

T-SPOT.TB being more sensitive than the QFN-G-IT in smear-negative patients. On the other hand, the differences in responding T cells after stimulation with ESAT-6 and CFP-10, and the IFN- $\gamma$  released were not significant

( $P = 0.621, 0.640,$  and  $0.459,$  respectively) between those patients with confirmed pulmonary TB and those that were not microbiologically confirmed.

Comparing the overall results obtained for the group of patients treated successfully and the results of patients at the beginning and during the treatment, the differences were not significant ( $P = 0.945$  and  $P = 0.719$  for T-SPOT.TB, and  $P = 0.713$  and  $P = 0.260$  for QFN-G-IT, respectively). However, although the differences were not significant, the

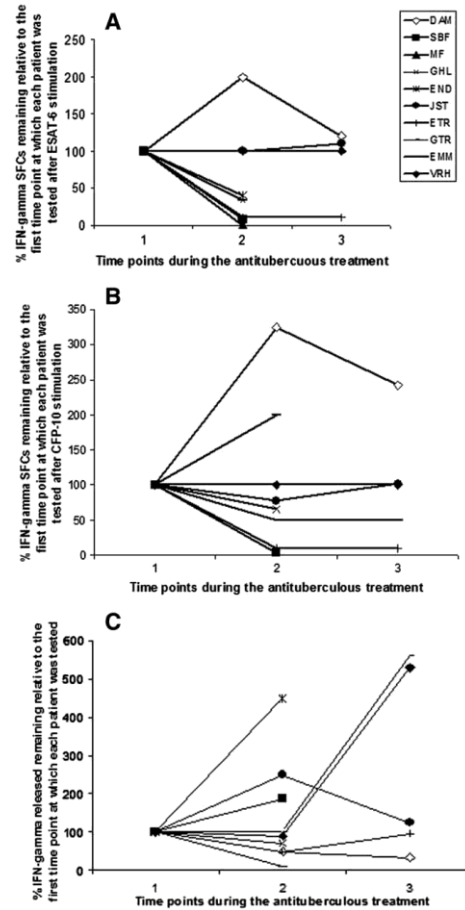


Fig. 2. Percentage of spot T cells and IFN- $\gamma$  released remaining at various time points relative to the original at the time at which each patient was 1st tested (1, at the time of TB diagnosis; 2, between 1 to 3 months of antituberculous therapy; and 3, more than 3 months of antituberculous treatment) (A, after ESAT-6 stimulation; B, after CFP-10 stimulation; C, IFN- $\gamma$  released after specific antigen stimulation).

Table 3

Median and 5 to 95 percentiles of T-cell IFN- $\gamma$  responders and IFN- $\gamma$  released against specific *M. tuberculosis* antigens in TB patients at the beginning, during, and after finishing the antituberculous treatment, and in self-healed patients

	No. of T cells IFN- $\gamma$ responders against ESAT-6 antigens			No. of T cells IFN- $\gamma$ responders against CFP-10 antigens			Amount of IFN- $\gamma$ released after stimulation with specific antigens		
	Median (5–95 percentiles)	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	Median (5–95 percentiles)	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	Median (5–95 percentiles)	<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>
At the beginning of the treatment	20.00 (0.35–119.90)	–	0.004	43.50 (0.70–176.95)	–	0.145	2.36 (0.01–30.13)	–	0.030
During the treatment	7.50 (1–66.35)	0.004	–	16.50 (3–147.5)	0.145	–	0.42 (0.05–15.46)	0.030	–
After curative treatment	7.00 (1.50–28.25)	0.069	0.623	33.50 (4–192.75)	0.954	0.373	3.12 (0.12–6.51)	0.772	0.275

<sup>a</sup> Significance value between the responses in patients included at the beginning of the treatment and each group of patients.

<sup>b</sup> Significance value between the responses in patients included during the treatment and each group of patients.

T-cell count after CFP-10 stimulation and the IFN- $\gamma$  released increase after finishing the treatment compared with the values during the treatment (Table 3).

### 3.2. Results in extrapulmonary TB patients

When analyzing all extrapulmonary TB patients, both IFN- $\gamma$  tests were positive for the 2 patients included at the beginning of the treatment (100%), decreasing to 11 (61.11%) and 9 (50%) positive results for the 18 patients included during the treatment by T-SPOT.TB and QFN-G-IT, respectively (Table 2). The concordance of both IFN- $\gamma$  tests in these patients was 80% ( $\kappa = 0.588$ , SE = 0.180). No relation between negative results and the amount of time under treatment was observed. Distribution of IFN- $\gamma$  test results considering the type of extrapulmonary TB cases is shown in Table 4.

## 4. Discussion

Several authors have studied IFN- $\gamma$  tests in diagnosing active TB, showing a wide range of sensitivities (Goletti et al., 2007; Pai and Menzies, 2007; Ravn et al., 2005; Richeldi, 2006). However, only 5 studies have made a direct comparison between the T-SPOT.TB and the QFN-Gold in the same study population (Chee et al., 2008; Ferrara et al., 2006; Goletti et al., 2006b; Kang et al., 2007; Lee et al., 2006).

Lee et al. (2006) compared T-SPOT.TB and QFN-Gold tests in 87 active TB patients. They found that T-SPOT.TB was the more sensitive test (96.6%), whereas the sensitivities of QFN-Gold and TST were 70.1% and 66.7%, respectively.

Table 4

QuantiferON-TB Gold In-Tube and T-SPOT.TB results in patients diagnosed with extrapulmonary TB

Extrapulmonary TB	Positive results (%)		Concordance (%)
	T-SPOT.TB	QFN-G-IT	
Lymphadenitis ( <i>n</i> = 7)	4 (57.1)	4 (57.1)	5/7 (71.4)
Pleural ( <i>n</i> = 5)	5 (100)	5 (100)	5/5 (100)
Peritoneal ( <i>n</i> = 1)	1 (100)	1 (100)	1/1 (100)
Disseminated ( <i>n</i> = 6)	2 (33.3)	1 (16.7)	5/6 (83.3)
Cutaneous ( <i>n</i> = 1)	1 (100)	0 (0)	0/0 (0)
Total ( <i>n</i> = 20)	13 (65)	11 (55)	16/20 (80)

Ferrara et al. (2006) studied 24 active TB patients (13 pulmonary and 11 extrapulmonary TB). Of the 11 patients with culture-proven pulmonary TB, the T-SPOT.TB was positive in 81.8% cases, whereas the QFN-Gold was positive in 72.7% of cases. Regarding the extrapulmonary TB cases, the T-SPOT.TB identified all patients (100%), whereas QFN-Gold and TST identified 73%. Goletti et al. (2006b) studied the 2 commercially available tests in 23 pulmonary TB cases obtaining a sensitivity for T-SPOT.TB of 91% and for QFN-Gold of 83%. Kang et al. (2007) conducted a prospective study enrolling 144 participants with suspected pulmonary TB and compared the results of the IFN- $\gamma$  with the final confirmed diagnoses. They found that the sensitivities for T-SPOT.TB and QFN-Gold were 92% and 89%, respectively. Finally, Chee et al. (2008) reported a sensitivity for the T-SPOT.TB of 94.1% and for QFN-G-IT of 83.0% (*P* = 0.001), evaluating 286 patients diagnosed of pulmonary TB.

Although there are few differences between the sensitivities of the tests in the 5 studies, in all studies, the sensitivities are in the same range, with the T-SPOT.TB being more sensitive than QFN-Gold. In general, our results are consistent with the results reported by the 5 referenced studies. In our study, the sensitivity in patients with pulmonary TB at the beginning of the treatment was higher for T-SPOT.TB (83.3%) than for QFN-G-IT (69.4%). More recently, Dosanjh et al. (2008) developed an ELISPOT [ELISPOT(PLUS)] incorporating a novel RD1 antigen, Rv3879c, for diagnosing active TB. They found that the ELISPOT(PLUS) assay is more sensitive than the standard ELISPOT, obtaining, when combined with TST, high sensitivity for rapid exclusion of active TB.

An alternative approach to the evaluation of the sensitivity of the in vitro tests has been to test patients with active TB. The false-negative result of both tests in active TB has been described previously (Dewan et al., 2007; Richeldi, 2006). Some hypotheses have been proposed to explain the negative results of the IFN- $\gamma$  assays in immunocompetent patients with active TB at the beginning of the treatment. First of all, IFN- $\gamma$  assays have been developed to diagnose latent TB infection (Lalvani et al., 2001b; Mazurek et al., 2001). Although patients with active TB are infected by definition with *M. tuberculosis*, they do not have a latent infection. Nevertheless, active TB occurs when the host



immune responses are unable to contain the latent infection (Pai and Menzies, 2007; Richeldi, 2006). Other factors involved could be the release of anti-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells and the temporary depression of T-cell responsiveness (Chen et al., 2007; Wilkinson et al., 1998).

On the other hand, these results could be also explained by the recruitment of specific T-cells during active TB. Antigen-specific cells clonally expand and migrate to the site of infection (Barnes et al., 1993; Kusters et al., 2008; Wilkinson et al., 2005). In fact, the detection of specific T cells in samples collected from the site of infection has been explored. Jafari et al. (2006) found specific T cells in the bronchoalveolar lavage of all patients with pulmonary TB by T-SPOT.TB. In other studies, the use of an ex vivo characterization of ESAT-6-specific T cells at sites of active disease in pleural (Losi et al., 2007; Wilkinson et al., 2005) or cerebrospinal fluids (Kusters et al., 2008) suggests a good alternative for diagnosing pleural TB and the meningitis, respectively.

The impact of the antituberculous treatment on the IFN- $\gamma$  tests in reducing the response to the specific antigens has been described elsewhere (Carrara et al., 2004; Dheda et al., 2007; Goletti et al., 2006a; Hirsch et al., 1999; Lalvani et al., 2001a; Pathan et al., 2001). T cells enumerated by both assays are effector cells that have recently been in contact with the antigen in vivo and can release IFN- $\gamma$  when they are reexposed to the antigen in vitro. It is thought that the frequencies of effector T cells are directly related to the antigen load. Consequently, the count of these effector T cells and the quantity of IFN- $\gamma$  released reflects a dynamic process of the antigen load. During TB treatment, the number of specific T cells decreases progressively, suggesting that the frequency of ESAT-6-specific T cells is related to antigen load (Ferrand et al., 2005; Pathan et al., 2001). It has been proposed that the IFN- $\gamma$  could be used to monitor the patients' response to the treatment (Lalvani, 2004).

In our study, there was an important decrease in the proportion of positive responders to both IFN- $\gamma$  tests during the treatment compared with that at the beginning of the therapy. The decrease in IFN- $\gamma$  released and in the count of specific responder T-cells was significant. The effect of the antituberculous treatment was observed in both pulmonary and extrapulmonary TB cases. These results strengthen the idea of the utility of these tests for monitoring the response to the treatment. However, it has recently been demonstrated that the sole utilization of IFN- $\gamma$  secretion by T cells is an insufficient biomarker of antigen load and clinical disease status (Millington et al., 2007). In our experience, the results obtained individually for the patients monitored at the beginning of and during the treatment confirmed the variation in responses between individuals (Fig. 2). Furthermore, we have also observed that the response becomes higher after finishing treatment than during treatment. The increased IFN- $\gamma$  production after treatment with these assays likely reflects the fact that

antigen-specific lymphoproliferation is inhibited by the nonspecific immunosuppression associated with active untreated TB. Therefore, other measures of T-cell function will be required in addition to the IFN- $\gamma$ . In this sense, promising results studying the dynamic relationship between IFN- $\gamma$  and interleukin 2 profiles have been obtained (Millington et al., 2007).

In our experience, the CFP-10 responder T cells during the treatment decrease in comparison with that at the beginning of the treatment, but the difference is not significant. After finishing the treatment, the achieved values were similar to those obtained at the beginning of the treatment (Table 3). The persistence of high levels of CFP-10-specific T cells in patients after a curative treatment has been recently described by Fox et al. (2007). In fact, they observed that CFP-10 responder T cells were higher in active TB cases than in cases of latent TB infection. In addition, 6 months after completing antituberculous treatment, the rates of these T cells were similar to those in the healthy contacts. They hypothesized that this differing immunogenicity of CFP-10 could reflect the nature of T-cell epitopes, and that CFP-10 responses could be more reliant on CD8-T cells in active TB than in contacts.

In our study, the high sensitivity obtained by the TST in patients diagnosed with pulmonary active TB could be surprising. The low sensitivity of the TST is directly related with immunosuppressive treatments, with old patients, and with extrapulmonary TB (Holden et al., 1971; Pina et al., 2002). Differences in the sensitivity found by our study and others could be explained by differences in the characteristics of the patients.

The gold standard of a positive culture is sometimes not obtained or at least not early enough. It has been described that about one-third of those treated for pulmonary TB do not have a positive culture for *M. tuberculosis*. In our experience, we did not observe differences between patients with or without microbiologic diagnosis in either of the assays studied. Interferon  $\gamma$  tests can also be especially useful in diagnosing extrapulmonary TB, where about half of the cases have not been microbiologically diagnosed, and which often required complex and invasive diagnostic tools. In addition, it could be useful in pulmonary smear-negative patients. We found that in patients who were sputum smear-negative, the T-SPOT.TB and the QFN-G-IT were positive in the 94.1% and 64.7% of cases, respectively. Ravn et al. (2005) obtained a sensitivity of 87% using QFN-Gold in patients who were negative by culture or microscopy. The contribution of the IFN- $\gamma$  tests in the clinical work is improved by a higher specificity than TST in detecting real *M. tuberculosis* infection, avoiding cross-reactions with atypical mycobacteria or with the BCG strains.

The main drawback of our study is the lack of longitudinal follow-up in all the patients included at the beginning of the treatment. This was not possible for logistic reasons. However, in our point of view, the differences

obtained between patients at the beginning of the treatment and patients during treatment are sufficiently consistent to draw conclusions.

In summary, the T-SPOT.TB has been more sensitive in diagnosing active TB than the QFN-G-IT. The response to the specific antigens decreases during the treatment, increasing again at the end of the curative therapy to similar levels to those shown at the beginning of the treatment. The role of the CFP-10-specific T cells in patients after the antituberculous treatment and their utilization in the diagnosis of active TB requires further research. The IFN- $\gamma$  tests could be used as a complementary method in the diagnosis of active TB. It is especially useful in low endemic areas where the ratio of latent TB infection is very low in special populations where culture-proven cases are difficult and also in extrapulmonary TB.

**Acknowledgments**

The authors thank the nurse and nurses' aides staff of the Unidad de Prevención y Control de la Tuberculosis de Barcelona and Serveis Clínics de Barcelona; Carmen Ramil, BSc, Lucia Haba, BSc, Miguel Ángel Cuesta, BSc, and Miguel Pérez, BSc, for technical assistance; and José María Pina, MD, for helpful comments.

None of the investigators have any financial interest in or a financial conflict with the subject matter or materials discussed in this manuscript. In 2005, Jose Domínguez participated in an Oxford Immunotec (manufacturer of T-SPOT.TB) advisory board meeting.

This work was supported by a grant from the Sociedad Española de Patología Respiratoria (SEPAR); the Societat Catalana de Pneumologia (SOCAP); the Fundació Catalana de Pneumologia (FUCAP); and Instituto de Salud Carlos III (RETIC RD06/0018). QuantiFERON-TB Gold In-Tube kits were provided by Inverness Medical Ibérica SAU, Cellestis' distributor in Spain. T-SPOT.TB was provided by Oxford Immunotec by means of a Material Transfer Agreement.

JD, IL, CP, and JRM are members of the European Tuberculosis Network (TB-NET) Group.

Neither the Scientific Societies nor Inverness Medical Ibérica SAU (Barcelona, Spain), Cellestis (Carnegie, Australia) or Oxford Immunotec (Abingdon, UK) played a role in the study design, conduct, collection, management, analysis, or interpretation of the data, or preparation, review, or approval of the manuscript.

**References**

Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM (2000) Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 356:1099–1104.  
 Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL (1993) Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immun* 61:3482–3489.

Blanquer R, Calpe JL, Caminero JA, Caylà J, Domínguez J, García JM, Vidal R, Ruiz-Manzano J (2008) SEPAR guidelines. Diagnostic and treatment of tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 44:546–561.  
 Brock I, Weldingh K, Leyten EM, Arend SM, Ravn P, Andersen P (2004) Specific T-cell epitopes for immunoassay-based diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Clin Microbiol* 42:2379–2387.  
 Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D (2004) Use of a T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculous therapy. *Clin Infect Dis* 38:754–756.  
 Chee CB, Gan SH, Khinmar KW, Barkham TM, Koh CK, Liang S, Wang YT (2008) Comparison of sensitivities of two commercial gamma interferon release assays for pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 46:1935–1940.  
 Chen X, Zhou B, Li M, Deng Q, Wu X, Le X, Wu C, Larmonier N, Zhang W, Zhang H, Wang H, Katsanis E (2007) CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress *Mycobacterium tuberculosis* immunity in patients with active disease. *Clin Immunol* 123:50–59.  
 Dewan FK, Grinsdale J, Kawamura LM (2007) Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. *Clin Infect Dis* 44:69–73.  
 Dheda K, Pooran A, Pai M, Miller RF, Lesley K, Booth HL, Scott GM, Akbar AN, Zumla A, Rook GA (2007) Interpretation of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-specific IFN-gamma release assays (T-SPOT.TB) and factors that may modulate test results. *J Infect* 55:169–173.  
 Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvao M, Latorre I, Mila C, Blanco S, Jimenez MA, Prat C, Lacombe A, Altet N, Ausina V (2008) Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 15:168–171.  
 Dossanjh DP, Hinks TS, Innes JA, Deeks JJ, Pasvol G, Hackforth S, Varia H, Millington KA, Gunatheesan R, Guyot-Revol V, Lalvani A (2008) Improved diagnostic evaluation of suspected tuberculosis. *Ann Intern Med* 148:325–336.  
 Eun SY, Lee YI, Kwak HK, Min JH, Hwang SH, Via LE, Barry 3rd CE, Cho SN (2008) Evaluation of the diagnostic utility of a whole-blood interferon-gamma assay for determining the risk of exposure to *Mycobacterium tuberculosis* in Bacille Calmette–Guerin (BCG)-vaccinated individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61:181–186.  
 Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A (2003) Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 361:1168–1173.  
 Ferrand RA, Bothamley GH, Whelan A, Dockrell HM (2005) Interferon-gamma responses to ESAT-6 in tuberculosis patients early into and after anti-tuberculosis treatment. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:1034–1039.  
 Ferrara G, Losi M, D'Amico R, Rovensi P, Piro R, Meacci M, Moccagni B, Dori IM, Andreani A, Bergamini BM, Mussini C, Rumpianesi F, Fabbri LM, Richeldi L (2006) Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*: a prospective study. *Lancet* 367:1328–1334.  
 Fox A, Jeffries DJ, Hill PC, Hammond AS, Lugos MD, Jackson-Sillah D, Donkor SA, Owiate PK, McAdam KP, Brookes RH (2007) ESAT-6 and CFP-10 can be combined to reduce the cost of testing for *Mycobacterium tuberculosis* infection, but CFP-10 responses associate with active disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101:691–698.  
 Goletti D, Butera O, Bizzoni F, Casetti R, Girardi E, Poccia F (2006a) Region of difference 1 antigen-specific CD4+ memory T cells correlate with a favorable outcome of tuberculosis. *J Infect Dis* 194:984–992.  
 Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Saltini C, Rizzi EB, Schinina V, Ippolito G, Amicosante M, Girardi E (2006b) Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting: a pilot study. *Clin Microbiol Infect* 12:544–550.  
 Goletti D, Carrara S, Vincenti D, Lange C, Mengoni F, Mastroianni C, Cirillo DM, Markova R, Drenska R, Amicosante M, Saltini C, Girardi E (2007) Response to RD1 selected epitopes is associated to active tuberculosis. Results of a European multicentre hospital-based study:

- interim analysis of a European Tuberculosis network (TB-NET) study. *Eur Respir J* 30:752a.
- Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P, Ellner JJ (1999) Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. *J Infect Dis* 180:2069–2073.
- Holden M, Dubin MR, Diamond PH (1971) Frequency of negative intermediate-strength tuberculin sensitivity in patients with active tuberculosis. *N Engl J Med* 285:1506–1509.
- Jafari C, Ernst M, Kalsdorf B, Greinert U, Diel R, Kirsten D, Marienfeld K, Lalvani A, Lange C (2006) Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. *Am J Respir Crit Care Med* 174:1048–1054.
- Kang YA, Lee HW, Hwang SS, Um SW, Han SK, Shim YS, Yim JJ (2007) Usefulness of whole-blood interferon- $\gamma$  assay and interferon- $\gamma$  enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Chest* 132:959–965.
- Kosters K, Nau R, Bossink A, Greiffendorf I, Jentsch M, Ernst M, Thijsen S, Hinks T, Lalvani A, Lange C (2008) Rapid diagnosis of CNS tuberculosis by a T-cell interferon-gamma release assay on cerebrospinal fluid mononuclear cells. *Infection*, doi:10.1007/s15010-15007-17316-15010.
- Lalvani A (2004) Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment? *Clin Infect Dis* 38: 757–759.
- Lalvani A, Nagvenkar P, Udwardia Z, Pathan AA, Wilkinson KA, Shastri JS, Ewer K, Hill AV, Mehta A, Rodrigues C (2001a) Enumeration of T cells specific for RD1-encoded antigens suggests a high prevalence of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in healthy urban Indians. *J Infect Dis* 183:469–477.
- Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AV (2001b) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 163:824–828.
- Lee JY, Choi HJ, Park IN, Hong SB, Oh YM, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim DS, Kim WD, Shim TS (2006) Comparison of two commercial interferon-gamma assays for diagnosing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Eur Respir J* 28:24–30.
- Losi M, Bossink A, Codecasa L, Jafari C, Ernst M, Thijsen S, Cirillo D, Ferrarese M, Greinert U, Fabbri LM, Richeldi L, Lange C (2007) Use of a T-cell interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur Respir J* 30:1173–1179.
- Mazurek GH, LoBue PA, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR, Iademarco MF, Rothel JS (2001) Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing for detecting latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JAMA* 286: 1740–1747.
- Migliori GB, Hopewell PC, Blasi F, Spanevello A, Raviglione MC (2006) Improving the TB case management: the international standards for tuberculosis care. *Eur Respir J* 28:687–690.
- Millington KA, Innes JA, Hackforth S, Hinks TS, Deeks JJ, Dossanj DP, Guyot-Revoll V, Gunatheesan R, Klenerman P, Lalvani A (2007) Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 178: 5217–5226.
- 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.
- Pai M, Zwerling A, Menzies D (2008) Systematic review: t-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*.
- Pathan AA, Wilkinson KA, Klenerman P, McShane H, Davidson RN, Pasvol G, Hill AV, Lalvani A (2001) Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN-gamma-secreting CD4 T cells in *Mycobacterium tuberculosis*-infected individuals: associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 167:5217–5225.
- Piana F, Codecasa LR, Cavallero P, Ferrarese M, Migliori GB, Barbarano L, Morra E, Cirillo DM (2006) Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J* 28:31–34.
- Pina JM, Domínguez A, Alcaide J, Alvarez J, Camps N, Diez M, Godoy P, Jansa JM, Minguell S (2002) Tuberculin test responses of tuberculosis patients. *Arch Bronconeumol* 38:568–573.
- Porsa E, Cheng L, Graviss EA (2007) Comparison of an ESAT-6/CFP-10 peptide-based enzyme-linked immunospot assay to a tuberculin skin test for screening of a population at moderate risk of contracting tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 14:714–719.
- Ravn P, Munk ME, Andersen AB, Lundgren B, Lundgren JD, Nielsen LN, Kok-Jensen A, Andersen P, Weldingh K (2005) Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 12:491–496.
- Richeldi L (2006) An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 174:736–742.
- Valdes L, Alvarez D, San Jose E, Penela P, Valle JM, Garcia-Pazos JM, Suarez J, Pose A (1998) Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 158:2017–2021.
- Wilkinson RJ, Vordermeier HM, Wilkinson KA, Sjolund A, Moreno C, Pasvol G, Ivanyi J (1998) Peptide-specific T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*: clinical spectrum, compartmentalization, and effect of chemotherapy. *J Infect Dis* 178:760–768.
- Wilkinson KA, Wilkinson RJ, Pathan A, Ewer K, Prakash M, Klenerman P, Maskell N, Davies R, Pasvol G, Lalvani A (2005) Ex vivo characterization of early secretory antigenic target 6-specific T cells at sites of active disease in pleural tuberculosis. *Clin Infect Dis* 40: 184–187.



**4.2. Article 2**

**Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using *in vitro* tests and tuberculin skin test.**

Neus Altet-Gómez, Malú De Souza-Galvão, Irene Latorre, Celia Milà, María Ángeles Jiménez, Jordi Solsona, Adela Cantos, Juan José Zamora ; Juan Ruiz-Manzano, Vicenç Ausina and José Domínguez.

*Eur Respir J.* 2011 May;37(5):1166-74

En el món desenvolupat s'estima que la proporció de nens amb TB és de 3-6%, però en els països en desenvolupament pot arribar al 15-20%, amb una mortalitat aproximada del 30%. El TIT centrat en els grups amb alt risc d'infecció i desenvolupament de la malaltia si s'infecten, és una estratègia essencial per a eliminar la tuberculosi. La població pediàtrica requereix especial consideració, ja que pot desenvolupar la malaltia molt ràpidament després de la infecció primària, amb les formes més greus prevalents en els nens més petits.

Els objectius d'aquest estudi van ser comparar els resultats dels tests d'IF- $\gamma$  (QFN-G-IT i T-SPOT.TB) i PT en el diagnòstic de la infecció tuberculosa en població pediàtrica en diferents graus de risc d'exposició i posteriorment analitzar els resultats discordants.

La positivitat dels tests d' IFN- $\gamma$  es va associar amb el risc d'exposició. QFN-G-IT i T-SPOT.TB van mostrar una sensibilitat superior al 75% en pacients diagnosticats de tuberculosi activa. Tot i això aquests tests no van ser capaços de distingir entre infecció latent i TB activa, ja que no es van detectar diferències significatives entre els nens infectats o malalts en el nombre de cèl·lules T activades ni en la quantitat d' IF- $\gamma$  alliberat després de l'estimulació antigènica. El nombre de cèl·lules activades i la quantitat d' IF- $\gamma$  alliberat es van correlacionar positivament quan el resultat dels test d'IF- $\gamma$  van ser concordants. En els resultats discordants, aquesta correlació va ser negativa: un augment en el nombre de cèl·lules activades es va correlacionar amb una disminució en la quantitat d'IF- $\gamma$  alliberat. Aquests resultats suggereixen una disfunció immunològica relacionada amb una disminució en la producció d'IF- $\gamma$  o una disminució en el nombre de cèl·lules productores d'IF- $\gamma$ . Ambdues situacions s'han associat amb un major risc de desenvolupar TB activa.

Per a investigar la influència de les infeccions per MNT es va realitzar un ELISPOT estimulants les cèl·lules amb sensitines de *Mycobacterium avium*. En 6 dels 12 nens no vacunats amb BCG amb una PT entre 5 i 9 mm i els dos IGRAs negatius, la detecció de cèl·lules T sensibilitzades contra *M. avium* va ser positiva.

En conclusió, l'ús dels test d' IF- $\gamma$  és útil per al diagnòstic de la infecció tuberculosa en població pediàtrica en la pràctica clínica de una Unitat de Tuberculosi. El seu ús elimina les reaccions creuades amb la vacuna BCG i pot ajudar a descartar infeccions per MNT.