



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent i la malaltia tuberculosa en població pediàtrica

Aleix Soler García



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

**SJD** Sant Joan de Déu  
Barcelona · Hospital

**Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en  
el diagnòstic de la infecció tuberculosa  
latent i la malaltia tuberculosa en població  
pediàtrica**

**Doctorand:** Aleix Soler García

**Directors:** Drs. Antoni Noguera Julian i Anna Gamell Fullà

**Tutor:** Dr. Antoni Noguera Julian



# **Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent i la malaltia tuberculosa en població pediàtrica**

Memòria de tesi doctoral presentada per

**Aleix Soler García**

per optar al grau de Doctor per la Universitat de Barcelona

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Antoni Noguera Julian** i de la **Dra. Anna Gamell Fullà** de la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu (Universitat de Barcelona)

Treball realitzat sota la tutorització del **Dr. Antoni Noguera Julian** de la Unitat de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu (Universitat de Barcelona)

Programa de Doctorat: Medicina i Recerca Translacional

Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Universitat de Barcelona

Febrer de 2023





### **AUTORITZACIÓ DE LA PRESENTACIÓ DE LA TESI**

El Dr. Antoni Noguera Julian, Professor de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona amb DNI 39360177R i la Dra. Anna Gamell Fullà, Investigadora del Departament de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, amb DNI: 40353484F, DECLAREM QUE: La memòria de tesi presentada pel Sr. Aleix Soler García amb títol "Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent i la malaltia tuberculosa en població pediàtrica", ha estat realitzada sota la nostra direcció i que autoritzem el seu dipòsit per ser defensada i jutjada per un tribunal.

Signat el dia dos de febrer de dos mil vint-i-tres.

Director

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Directora

A handwritten signature in blue ink, featuring a large circular loop at the top and a long horizontal stroke extending to the right.

**DECLARACIÓ DE LA PERSONA DOCTORAND I LES PERSONES QUE DIRIGUEIXEN DE L'ORIGINALITAT I BONES PRÀCTIQUES DE LA TESI**

El Dr. Antoni Noguera Julian, Professor de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona amb DNI 39360177R, la Dra. Anna Gamell Fullà, Investigadora del Departament de Malalties Infeccioses de l'Hospital Sant Joan de Déu, Universitat de Barcelona, amb DNI: 40353484F, i el doctorand Sr. Aleix Soler García, amb DNI: 46414166M DECLAREN QUE la tesi doctoral, amb títol "Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent i la malaltia tuberculosa en població pediàtrica", és original i conté resultats i informació fruit de recerca pròpia i que no s'han plagiat continguts d'altres tesis o publicacions o recerques d'altres autors. Tanmateix, confirmen que s'han seguit els codis ètics i de bones pràctiques per elaborar la tesi. Manifesten que donen el consentiment per a que la memòria de tesi pugui ser sotmesa a procediments per comprovar la seva originalitat.

Per a que consti, signen el dia dos de febrer de dos mil vint-i-tres.

Director



Directora



Doctorand



## **DECLARACIÓ D'AUTORIA DE LA TESI**

El doctorand Sr. Aleix Soler García, amb DNI: 46414166M DECLARA QUE és autor de la tesi doctoral titulada "Utilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent i la malaltia tuberculosa en població pediàtrica"

Signat el dia dos de febrer de dos mil vint-i-tres

El doctorand

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'A' followed by 'S' and 'G' in a cursive script.

Tesi en format de compendi de publicacions.

La tesi consta de vuit objectius i de quatre articles. Els articles que conformen la tesi són els següents:

1) Primer estudi

- Autors: **Soler-Garcia A**, Gamell A, Santiago B, Monsonís M, Calvo C, Cobo E, Colino E, Espiau M, Guerrero-Laleona C, Lobato Z, Martín-Nalda A, Pérez-Gorricho B, Pérez-Porcuna TM, Piqueras AI, Rodríguez-Molino A, Ruiz M, Soriano-Arandes A, Valmanya T, Tebruegge M, Noguera-Julian A.
- Títol: Diagnostic Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Plus Assays in Children and Adolescents with Tuberculosis Disease.
- Revista: Journal of Pediatrics. Abril 2020. Volum 223. Pàgines 212-215.
- ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2020: 1r Decil en la categoria de Pediatria.
- Factor d'impacte: 4,406

2) Segon estudi

- Autors: **Soler-Garcia A**, Gamell A, Santiago B, Monsonís M, Cobo E, Bustillo M, Tagarro A, Pérez-Gorricho B, Espiau M, Piqueras AI, Korta-Murua JJ, Rodríguez-Molino P, Lobato Z, Pérez-Porcuna T, Tebruegge M, Noguera-Julian A.
- Títol: QuantiFERON-TB Gold Plus assay specificity in children and adolescents with suspected tuberculosis - a multi-center cross-sectional study in Spain.
- Revista: The Pediatric Infectious Disease Journal. Setembre 2021. Volum: 40. Pàgines: 348-351.
- ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021: 1r Quartil en la categoria de Pediatria.
- Factor d'impacte: 3,806

## 3) Tercer estudi

- Autors: **Soler-Garcia A**, Gamell A, Pérez-Porcuna T, Soriano-Arandes A, Santiago B, Tórtola T, Ruiz-Serrano MJ, Korta-Murua JJ, Bustillo-Alonso M, Garrote-Llanos MI, Rodríguez-Molino P, Piqueras AI, Tagarro A, Monsonís M, Tebruegge M, Noguera-Julian A.
- Títol: Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus assays in children and adolescents at risk of tuberculosis: a cross-sectional multicentre study.
- Revista: Thorax. Desembre 2021. Volum: 77. Pàgines: 1193-1201.
- ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021: 1r Quartil en la categoria de Sistema respiratori.
- Factor d'impacte: 9,250.

## 4) Quart estudi

- Autors: **Soler-Garcia A**, Gamell A, Monsonís M, Korta-Murua JJ, Azurmendi-Gundín N, Espiau M, Tórtola T, Rincón-López E, Rodríguez-Molino P, Sainz T, Pérez-Porcuna T, Bustillo-Alonso M, Piqueras AI, Minguell-Domingo L, Lobato Z, Soto-Sánchez B, Rius N, Pérez-Gorricho B, Fortuny C, Santiago B, Tebruegge A, Noguera-Julian A.
- Títol: The value of the second QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube in children and adolescents with latent tuberculosis infection and tuberculosis disease in Spain.
- Revista: Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society. Pendent de revisió.
- ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021: 1r Quartil en la categoria de Pediatria i en Malalties Infecioses.
- Factor d'impacte: 5,235.

En el transcurs de la realització dels estudis que componen aquesta memòria de tesi, el doctorand ha participat en altres projectes vinculats amb la línia d'investigació de l'ús del QFT®-Plus. Fruit d'aquesta participació es va presentar un estudi multicèntric realitzat per la pTBnet, una xarxa europea per a la vigilància i estudi de la tuberculosi infantil que aplega més de 300 investigadors de 31 països d'arreu d'Europa. L'estudi, liderat pel Dr. Buonsenso, investigador de la *Università Cattolica del Sacro Cuore* de Roma, va tenir com a objectiu avaluar la sensibilitat de diversos tests IGRA en una mostra d'un miler de nens amb TBC.

- Autors: Buonsenso D, Noguera-Julian A, Moroni R, Hernández-Bartolomé Á, Fritschi N, Lancella L, Corsi L, **Soler-Garcia A**, Kruger R, Feiterna-Sperling C, Sali M, Lo Vecchio A, Scarano S, Hernanz Lobo H, Espiau M, Soriano-Arandes A, Şirvan BÇ, Brinkmann F, Ozere I, Baquero-Artigao F, Tsolia M, Milheiro Silva T, Bustillo-Alonso M, Martín Nalda A, Mancini M, Starshinova A, Ritz N, Velizarova S, Ferreras-Antolin L, Götzinger F, Bilogortseva O, Chechenyeva C, Tebruegge M, Santiago-García B.
- Títol: Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus assays in paediatric tuberculosis: a multicentre PTBNET study.
- Revista: Thorax. Octubre 2022.
- ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021: 1r Quartil en la categoria de Sistema respiratori.
- Factor d'impacte: 9,250.

## **AGRAÏMENTS**

No tindria sentit que les primeres paraules d'agraïment no anessin dirigides al Ton i a l'Anna. La seva manera de dirigir ha permès que el procés d'elaboració d'aquesta tesi i dels treballs que la conformen hagi estat, no només formatiu i estimulants, sinó també gaudit i assaborit. Vull donar-los les gràcies per la confiança que han dipositat en mi des de l'inici del projecte, deixant-me espai però alhora fent-me sentir acompanyat. També vull agrair-los l'accessibilitat i la paciència infinites que han tingut, les quals no m'han faltat en cap moment. I així mateix, també la docència i el mestratge, que m'han permès aprendre, desaprendre i sorprendre'm.

Gràcies també al Manuel per tota la predisposició, col·laboració i facilitat que ha mostrat per ajudar amb la recollida de dades de laboratori.

Many thanks also to Marc. His wise advice and suggestions have emphasized to me the importance of completeness and meticulousness.

Gracias a todos los coautores de los artículos de la tesis, y también a todos los investigadores de la pTBred. Su colaboración, altruismo y disposición son una muestra inequívoca de la importancia de cooperar y trabajar en red.

També vull donar les gràcies a tot el servei de Pediatria. Per l'acollida i suport que brinden tots els qui en formen part, que permet descentrar-se i recordar que totes les nostres accions i esforços han d'anar dirigides al benestar i cura dels més menuts.

I per acabar vull llançar un agraïment profund cap a totes les persones que treballen incansablement pels infants de tots els racons del món que pateixen malalties oblidades.



# ÍNDEX

---

# ÍNDEX

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>1</b> | <b>Abreviacions.....</b>  | <b>6</b>   |
| <b>2</b> | <b>Introducció .....</b>  | <b>10</b>  |
| 2.1      | Història de la tuberculosi .....  | 10         |
| 2.2      | Epidemiologia de la tuberculosi.....  | 15         |
| 2.3      | La tuberculosi infantil .....   | 18         |
| 2.4      | Història natural i patogènia de la tuberculosi.....   | 19         |
| 2.5      | Diagnòstic de la tuberculosi.....   | 23         |
| 2.5.1    | Test de la tuberculina .....  | 25         |
| 2.5.2    | Els tests IGRA .....  | 27         |
| 2.5.2.1  | El test QuantiFERON®-TB .....   | 30         |
| 2.5.2.2  | Evidència descrita per als tests QuantiFERON®-TB.....   | 32         |
| 2.6      | Tractament i prevenció de la tuberculosi .....  | 35         |
| <b>3</b> | <b>Justificació del treball i hipòtesis.....</b>  | <b>40</b>  |
| <b>4</b> | <b>Objectius .....</b>  | <b>44</b>  |
| <b>5</b> | <b>Metodologia i resultats.....</b>   | <b>46</b>  |
| 5.1      | Primer estudi .....   | 46         |
| 5.1.1    | Document del primer estudi.....   | 46         |
| 5.1.2    | Resum del primer estudi.....  | 52         |
| 5.2      | Segon estudi: .....   | 56         |
| 5.2.1    | Document del segon estudi .....   | 56         |
| 5.2.2    | Resum del segon estudi.....   | 65         |
| 5.3      | Tercer estudi:.....   | 68         |
| 5.3.1    | Document del tercer estudi.....   | 68         |
| 5.3.2    | Resum del tercer estudi.....  | 82         |
| 5.4      | Quart estudi: .....   | 86         |
| 5.4.1    | Document del quart estudi.....  | 86         |
| 5.4.2    | Resum del quart estudi.....   | 109        |
| <b>6</b> | <b>Discussió.....</b>   | <b>114</b> |
| 6.1      | Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa .....  | 114        |
| 6.1.1    | Sensibilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa.....  | 114        |
| 6.1.1.1  | Efecte de l'edat en la sensibilitat per a la malaltia tuberculosa .....   | 118        |
| 6.1.1.2  | Concordança entre PPD i QFT®-Plus en malaltia tuberculosa .....   | 120        |
| 6.1.2    | Especificitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa .....                                      | 123        |
| 6.1.2.1  | Justificació de la metodologia emprada i resultats.....   | 123        |
| 6.1.2.2  | Concordança entre QFT®-Plus i PPD i efecte de la vacuna BCG i de les infeccions per micobacteris ambientals ..... | 130        |
| 6.2      | Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la infecció tuberculosa latent.....                                    | 136        |
| 6.2.1    | Recomanacions sobre l'ús de tests IGRA per al diagnòstic de la infecció tuberculosa latent en pediatria.....      | 136        |
| 6.2.2    | Ús del QFT®-Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent .....   | 138        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 6.2.2.1    | Efecte de l'edat i de la immunosupressió en la sensibilitat per al diagnòstic de la infecció tuberculosa latent..... | 143        |
| 6.2.2.2    | Efecte de la vacuna BCG en la sensibilitat diagnòstica del QFT®-Plus per a la infecció tuberculosa latent .....      | 145        |
| <b>6.3</b> | <b>Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la població pediàtrica d'un país de baixa endèmia .....</b>            | <b>146</b> |
| 6.3.1      | Resultats indeterminats del test QFT®-Plus .....   | 146        |
| 6.3.2      | Aportació del segon tub reactiu en el rendiment del test.....  | 153        |
| 6.3.2.1    | Bases de l'estudi de la resposta CD8 <sup>+</sup> i resultats de l'estudi.....                                       | 153        |
| 6.3.2.2    | Resultats del TB2 del test en estudis previs.....  | 156        |
| 6.3.3      | Variació en el temps de la concentració d'interferó-gamma amb el tractament antituberculós.....                      | 162        |
| <b>6.4</b> | <b>Limitacions i fortaleces dels estudis inclosos .....</b>  | <b>167</b> |
| <b>6.5</b> | <b>Estudis futurs i aplicació dels resultats de la tesi .....</b>  | <b>169</b> |
| <b>7</b>   | <b>Conclusions.....</b>  | <b>174</b> |
| <b>8</b>   | <b>Bibliografia.....</b>   | <b>176</b> |

## ÍNDIX DE FIGURES

### **Figura 1. Pàgina 13:**

- Esquema que mostra la modificació de les caverne segons el lloc i l'extensió de la resecció costal.
- Font: Víctor Armand Ugon. *El tórax quirúrgico*. 1938.

### **Figura 2. Pàgina 16:**

- Casos de tuberculosi reportats anualment.
- Font: Organització Mundial de la Salut. *Global tuberculosis report 2020*. 2020.

### **Figura 3. Pàgina 16:**

- Incidència anual de casos de tuberculosi per països.
- Font: Organització Mundial de la Salut. *Global tuberculosis report 2020*. 2020.

### **Figura 4. Pàgina 17:**

- Evolució de la incidència anual de tuberculosi a Espanya.
- Font: Ministerio de Sanidad. *Plan para la Prevención y Control de la Tuberculosis*. 2019.

### **Figura 5. Pàgina 26:**

- Injecció del compost (esquerra) i lectura del PPD (dreta).
- Font: Centers of Disease Control and Prevention (CDC). *Public Health Image Library*.

### **Figura 6. Pàgina 28:**

- Test ELISPOT amb resultat negatiu (esquerra) i positiu (dreta).
- Font: immunospot.com. *The ELISPOT Source*.

## **ÍNDEX DE TAULES**

### **Taula 1. Pàgina 27:**

- Comparació entre tests PPD i IGRA.

### **Taula 2. Pàgina 33:**

- Interpretació dels resultats del QFT®-Plus (valors en unitats internacionals per mil·lilitre).
- Font: QIAGEN. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert.

### **Taula 3. Pàgina 116:**

- Estudis publicats sobre la sensibilitat del QFT®-Plus per al diagnòstic de la malaltia TBC en Pediatria.

### **Taula 4. Pàgina 122:**

- Estudis publicats sobre la correlació entre QFT®-GIT i PPD en pacients pediàtrics amb malaltia tuberculosa en països de baixa incidència.

### **Taula 5. Pàgina 128:**

- Estudis en què s'avalua l'especificitat del QFT®-GIT per a malaltia activa en pacients pediàtrics amb clínica suggestiva de TBC.

### **Taula 6. Pàgina 140:**

- Estudis publicats sobre l'ús del QFT®-Plus per al diagnòstic d'infecció latent en pacients pediàtrics.

### **Taula 7. Pàgina 161:**

- Grau de concordança entre TB1 i TB2 d'entre pacients pediàtrics amb un resultat positiu per al QFT®-Plus.

# 1 ABREVIACIONS

|                 |   |
|-----------------|---|
| BCG             | Bacil de Calmette-Guérin  |
| CD              | <i>Cluster of differentiation</i> (Conjunt de diferenciació)                    |
| CFP-10          | <i>Culture Filtrate Protein</i> (Proteïna filtrada de cultiu) 10                |
| CIG             | Concentració d'interferó gamma  |
| CLIA            | <i>Chemiluminescence immunoassay</i> (Test immunològic per quimioluminiscència) |
| CRP             | <i>C-reactive protein</i> (Proteïna C reactiva)                                 |
| DCI             | Diferència de concentració d'interferó gamma entre el tub TB2 i el tub TB1      |
| ELISA           | <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Test d'immnoabsorció enzimàtica)      |
| ELISPOT         | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Spot</i> (Detecció d'immunoabsorció enzimàtica)  |
| ESAT-6          | <i>Early Secretory Antigen Target</i> (Diana precoç d'antigen secretor) 6       |
| <i>et al.</i>   | <i>Et alii</i> (I d'altres)   |
| IC 95%          | Interval de confiança del 95%   |
| IFN $\gamma$    | Interferó gamma   |
| IGRA            | <i>Interferon gamma release assay</i> (Test d'alliberament d'interferó gamma)   |
| ITBL            | Infecció tuberculosa latent   |
| $\kappa$        | Índex kappa   |
| <i>M.</i>       | <i>Mycobacterium</i>  |
| MAC             | <i>Mycobacterium avium</i> complex (Complex <i>Mycobacterium avium</i> )        |
| MDR             | <i>Multi Drug Resistance</i> (Resistència a múltiples fàrmacs)                  |
| mitIFN $\gamma$ | Concentració d'interferó gamma al tub mitogen                                   |
| MNT             | Micobacteris no tuberculosos  |
| OMS             | Organització Mundial de la Salut  |
| OR              | <i>Odds ratio</i> (quocient d'oportunitats)                                     |
| p               | p-valor   |
| PCR             | Reacció en cadena de la polimerasa  |

|                   |  |
|-------------------|--|
| PPD               | <i>Purified Protein Derivative</i> (Derivat proteic purificat)   |
| pTBnet            | <i>Pediatric tuberculosis network European trial group</i> (grup europeu per a l'estudi en xarxa de la tuberculosi pediàtrica) |
| pTBred            | Red Española de Estudio de Tuberculosis Pediátrica   |
| QFT®-G            | QuantiFERON®-TB Gold   |
| QFT®-GIT          | QuantiFERON®-TB Gold-in-Tube   |
| QFT®-Plus         | QuantiFERON®-TB Gold Plus  |
| RI                | Resultat indeterminat  |
| RR                | Risc relatiu   |
| RSC8 <sup>+</sup> | Resposta significativa dels limfòcits CD8 <sup>+</sup>   |
| SMAC              | Sensitina de complex <i>Mycobacterium avium</i>  |
| TBC               | Tuberculosi  |
| TBF®              | Standard E TB-Feron ELISA  |
| Th1               | Limfòcit T <i>helper</i> (col·laborador) tipus 1   |
| Th2               | Limfòcit T <i>helper</i> (col·laborador) tipus 2   |
| TNF $\alpha$      | <i>Tumor necrosis factor</i> (Factor de necrosi tumoral) alfa  |
| XDR               | <i>Extreme Drug Resistance</i> (Resistència extrema a fàrmacs)   |
| VIH               | Virus de la Immunodeficiència Humana   |
| vs                | <i>Versus</i> (contra)   |





# INTRODUCCIÓ

---

## 2 INTRODUCCIÓ

### 2.1 Història de la tuberculosi

La tuberculosi (TBC), causada pel germen *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), és una malaltia inherent a la història de la humanitat. S'ha postulat que l'origen del gènere *Mycobacterium* podria remuntar-se a fa 150 milions d'anys.<sup>1</sup> La teoria neix de l'estudi del germen *M. ulcerans*. Es tracta d'un micobacteri amb una molt baixa capacitat de propagar-se. El fet que les àrees d'on és endèmic, avui en dia molt allunyades entre si, fossin adjacents quan existia el continent Gondwana és la base de la teoria de l'origen juràssic dels micobacteris.

En concret, l'origen de l'espècie *M. tuberculosis* ha estat estudiat àmpliament. El complex *Mycobacterium tuberculosis* és un dels exemples més importants d'homogeneïtat genètica. El fet que tinguin un índex de mutació molt baix ha permès aproximar que l'origen del bacteri es remunta a una soca comuna apareguda entre 20.000 i 35.000 anys ençà.<sup>2</sup> Tot i això, alguns investigadors han suggerit que la soca comuna és només el resultat de la transferència horitzontal de gens, i que el *M. tuberculosis* original va sorgir realment fa 3 milions d'anys a la banya d'Àfrica, des d'on tant l'espècie humana com la TBC s'haurien estès arreu.<sup>3</sup>

Sigui com sigui, són moltes les troballes que suggereixen que els éssers humans hem conviscut durant mil·lennis amb la TBC. S'han trobat nombroses mòmies egípcies amb lesions òssies suggestives de mal de Pott. A més, la seva anàlisi tissular en exemplars de més de 5.000 anys d'antiguitat ha permès aïllar-hi seqüències de DNA de *M. tuberculosis*.<sup>4</sup> D'altra banda, la malaltia està descrita en textos antics de l'Índia i la Xina,<sup>5</sup> així com a l'Antic Testament,<sup>6</sup> i detalladament referenciada per Hipòcrates.<sup>7</sup>

Durant l'Europa de l'Edat Mitjana, però, sembla que la malaltia perd interès per als clínics de l'època, malgrat que les restes arqueològiques corroboren que seguia present en la població.<sup>8</sup> És d'interès senyalar que des de l'Alta Edat Mitjana i fins al segle XVII va existir a França i Anglaterra la pràctica del 'toc reial', una cerimònia en la qual els reis d'aquests països tocaven les lesions de malalts amb escròfula, donat que als monarques se'ls atribuïen poders guaridors.

No és fins al segle XIX que es comença a dilucidar la fisiopatologia de la TBC. Cal destacar l'important paper que va jugar-hi René Laënnec. Aquest metge bretó, a més d'inventar l'estetoscopi, va definir el 1819 les manifestacions clíniques i les troballes anatomopatològiques de desenes de pacients amb malaltia tuberculosa, tant pulmonar com extrapulmonar.<sup>9</sup> Ell mateix va morir de TBC als 45 anys d'edat.

En aquesta època, fruit de la revolució industrial, té lloc un canvi radical en el model social. Centenars de milers de persones a Europa abandonen els camps i s'apleguen a les ciutats, molt sovint en condicions d'insalubritat i amuntegament. Aquestes condicions van ser ideals perquè en poc temps emergís una epidèmia de TBC que assoliria tot el continent, acarnissant-se en la nova classe treballadora i en especial en els més joves. Nombrosos artistes romàntics van ser-ne víctimes, com ara Gustavo Adolfo Bécquer i Frédéric Chopin, qui va buscar refugi a la cartoixa de Valldemossa fugint del clima fred de París. Catalunya no va ser una excepció a aquesta realitat, i unes 2.000 persones morien anualment per TBC a Barcelona a finals del segle XIX.<sup>10</sup>

Paral·lelament, però, el segle XIX va comportar un avenç incomparable en la comprensió de la malaltia. Enmig d'un debat científic en què es propugnava l'herència com a causa de la TBC, cada cop eren més les veus que apuntaven al seu origen infecciós, especialment al sud d'Europa. Un dels majors impulsors d'aquesta teoria va ser el cirurgià francès Jean-Antoine Villemin, qui va inocular líquid biològic d'un malalt a un ratolí. Tot i que l'animal va restar asimptomàtic, la seva necròpsia va objectivar

que presentava signes de la malaltia.<sup>11</sup> El que realment va canviar la història de la TBC, però, va ser el descobriment el 1882 del *M. tuberculosis* pel microbiòleg saxó Robert Koch, fet que li va valer el premi Nobel de Medicina l'any 1905.

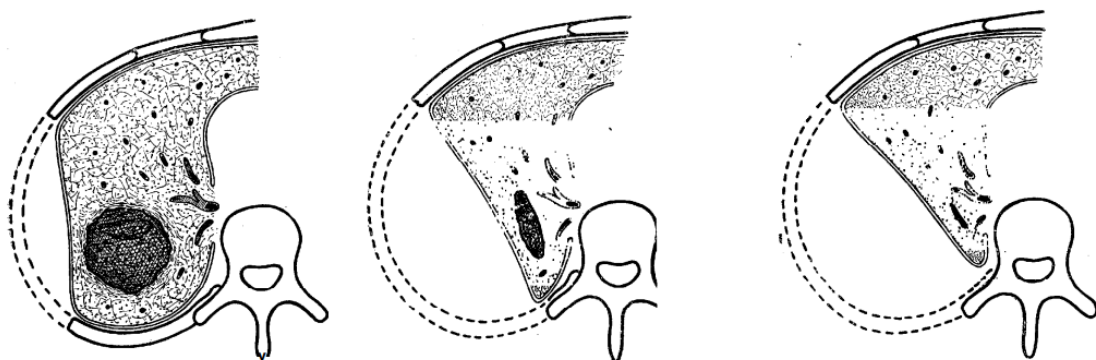
A partir d'aquest descobriment s'obre una nova etapa en la lluita contra la malaltia. El mateix Koch va proposar que una substància que va aïllar de colònies del bacil i que ell va anomenar 'tuberculina', podria ser inoculada amb fins terapèutics. Tot i que es va veure que aquesta pràctica no va resultar útil en el tractament de la TBC, sí que va inspirar la creació d'una tècnica diagnòstica. Va ser així com el pediatre austríac Clemens von Pirquet, que havia descobert el fenomen d'hipersensibilitat a substàncies després d'un contacte previ, va adonar-se que aquells nens que prèviament havien presentat un contacte amb el bacil de Koch desenvolupaven una reacció local quan se'ls inoculava una mostra diluïda de tuberculina.<sup>12</sup> Això va permetre a Charles Mantoux i Florence Seibert perfeccionar la tècnica que avui en dia coneixem com a PPD (de l'anglès *Purified Protein Derivative*). Això va obrir la possibilitat no només de diagnosticar els malalts de TBC, sinó també de realitzar un cribratge a la població pediàtrica que pogués patir una infecció tuberculosa latent (ITBL), no simptomàtica.<sup>13</sup>

Fins llavors, però, el maneig de la malaltia es reduïa a incentivar mesures higièniques preventives per a la població i a la construcció de balnearis i sanatoris. El primer sanatori va inaugurar-se a Silèsia (avui Polònia) l'any 1863 pel metge prussià Hermann Brehmen i ràpidament es va estendre aquesta pràctica per tot Europa. Cal destacar a Catalunya la creació el 1867 de l'Asil de Sant Joan de Déu per a nens amb TBC a la vila de Gràcia i la inauguració el 1904 del primer sanatori pròpiament dit, pel doctor Eduard Xalabarder, al Passeig de Sant Joan de Barcelona.<sup>14</sup> En general, els sanatoris eren espais enmig de la natura, ubicats estratègicament en llocs d'altitud, assolellats i resguardats del vent, on es vetllava perquè els pacients gaudissin de calma,

realitzessin exercici, s'exposessin a la llum solar i s'asseguessin un bon estat de nutrició.

A finals del segle XIX i principis del XX es va estendre l'ús de la teràpia col·lapsant dels pulmons. Es tractava de produir artificialment un pneumotòrax mitjançant una punció toràcica per col·lapsar les lesions cavitàries. En el cas que les cavitacions fossin als lòbuls inferiors, també s'induïa la formació de pneumoperitoneu. Alguns autors de l'època descriuen la negativització de l'esput en més del 50% dels malalts.<sup>15,16</sup> Posteriorment, al segon terç del segle XX va emergir la realització de toracoplàsties, intervencions en què es ressecaven diverses costelles dels malalts. La resecció de l'arc posterior de les costelles disminuïa significativament la pressió negativa de la paret toràcica cap a la pleura adjacent, fet que induïa una retracció del teixit parenquimatós pulmonar (**Figura 1**, pàgina 13). Tot i que eren operacions complexes, no s'entrava a la cavitat pleural, reduint significativament el risc d'empiema tuberculós. Alguns estudis de l'època demostraven que en fins a dos terços del pacients se'ls tancaven les cavitats tuberculoses.<sup>17</sup>

**Figura 1: Esquema que mostra la modificació de les caveres segons el lloc i l'extensió de la resecció costal** <sup>18</sup>



Font: Víctor Armand Ugon. *El tòrax quirúrgico*. 1938

Un altre punt clau en la lluita contra la TBC és el desenvolupament de la vacuna BCG, que deu el seu nom als seus propulsors, els francesos Albert Calmette i Camille Guérin, l'any 1921. Calmette havia observat que els pacients que havien sofert TBC ganglionar rarament presentaven després una malaltia pulmonar progressiva, la qual cosa li va suggerir la possibilitat d'estimular el sistema immunitari contra el bacil. Fins llavors, la creació de vacunes contra la TBC estava limitada per la perillositat d'inocular el bacil viu (ja fos *M. tuberculosis* o *M. bovis*). En aquest context, Calmette i Guérin van descobrir, de manera casual, que trasplantar colònies de *Mycobacterium bovis* a un medi mòbil les feia molt menys virulents, i aptes per al seu ús com a vacuna. Inicialment la vacuna es va inocular, via oral, a un lactant, fill d'una mare morta per TBC i a càrrec de la seva àvia, qui també en patia. El pacient va tolerar la vacuna i no va desenvolupar la malaltia, cosa que va propiciar que la BCG es comencés a administrar sistemàticament a desenes de milers de nens.<sup>19</sup>

El darrer punt d'inflexió va ser el descobriment de fàrmacs contra la TBC. Els primers, desenvolupats durant la Segona Guerra Mundial, van ser l'àcid paraaminosalicílic i la tiosemicarbazona. Eren agents quimioteràpics que presentaven activitat tuberculostàtica, però que no destruïen el bacil.<sup>5</sup> El 1944, però, es va desenvolupar l'estreptomina, el primer aminoglicòsid. El seu ús es va propagar ràpidament en constatar-se la seva efectivitat per tractar la malaltia en pacients joves.<sup>20</sup> El 1952 va desenvolupar-se la isoniazida, primer antituberculós oral; i el 1957, la rifampicina. El desenvolupament massiu d'aquests fàrmacs va significar un canvi sense precedents en el control de la TBC, permetent la curació de pacients amb la malaltia i el millor control del bacil d'aquells pacient amb ITBL.

De llavors ençà, però, han aparegut dos nous grans reptes per al control de l'epidèmia de TBC, als quals ens enfrontem avui en dia. D'una banda, el repunt de la TBC arran de l'epidèmia del virus de la immunodeficiència humana (VIH), que afecta més de 35

milions de persones arreu del món.<sup>21</sup> De l'altra, l'aparició de soques de bacils resistents als tractaments, en paral·lel a l'ús generalitzat d'antituberculosos. S'han definit com a soques multi-resistents (MDR) aquelles amb resistència, com a mínim, a rifampicina i isoniazida; i com a extremadament resistents (XDR) les que presenten, a més, resistència a una quinolona i a algun dels fàrmacs injectables de segona línia. El percentatge de soques MDR entre els nous casos de TBC és especialment alt en països de l'antiga Unió Soviètica, com ara Bielorússia (30%), Rússia (27%) i Moldàvia (26%).<sup>22</sup>

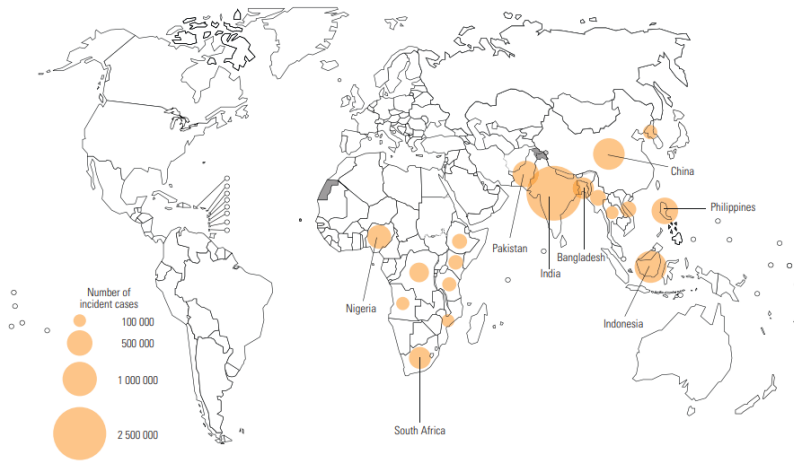
## 2.2 Epidemiologia de la tuberculosi

S'estima que fins a un quart de la població mundial (uns 1.700 milions de persones) està infectada pel bacil de Koch. L'any 2019 al voltant de 10 milions de persones van emmalaltir de TBC. D'entre elles, un 12% (1.200.000) eren nens menors de 15 anys.<sup>22</sup> A més, el 86% del casos detectats es van concentrar en només 30 països (tots a l'Àfrica subsahariana, al Sud-est asiàtic o a l'Orient Mitjà). Del total de casos, destaquen en termes absoluts l'Índia (26% del total de casos declarats), Indonèsia (8,5%), la Xina (8,4%), les Filipines (6%), el Pakistan (5,7%) i Nigèria (4,4%)<sup>22</sup> (**Figura 2**, pàgina 16). Pel que fa a la incidència, els països que més casos van reportar per 100.000 habitants van ser Lesotho (654), Sudàfrica (615), les Filipines (554), la República Centreafricana (540) i la República Popular Democràtica de Corea (513)<sup>22</sup> (**Figura 3**, pàgina 16).

Pel que fa a la mortalitat, *M. tuberculosis* ha estat durant els darrers temps l'agent infecciós que més morts ha causat anualment arreu del món, sent superat recentment pel virus SARS-CoV2<sup>22-24</sup>. A més, es troba entre les 10 primeres causes de mort en països pobres.<sup>25</sup> Globalment, es calcula que l'any 2019 van morir 1,4 milions de persones de TBC, un 16% de les quals (230.000 persones) eren menors de 15 anys. D'entre el global de víctimes, un 15% (unes 208.000) patia una coinfecció pel VIH.<sup>22</sup>

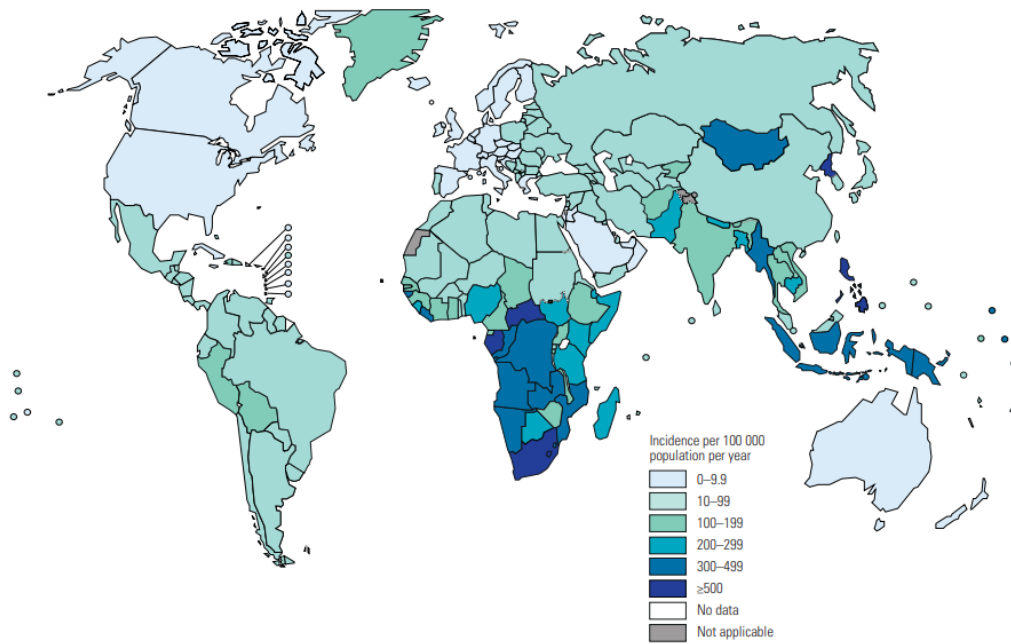
**Figura 2. Casos de tuberculosi reportats anualment<sup>22</sup>**

Estimated TB incidence in 2019, for countries with at least 100 000 incident cases



Font: Organització Mundial de la Salut. *Global tuberculosis report 2020*. 2020.

**Figura 3: Incidència anual de casos de tuberculosi per països<sup>22</sup>**

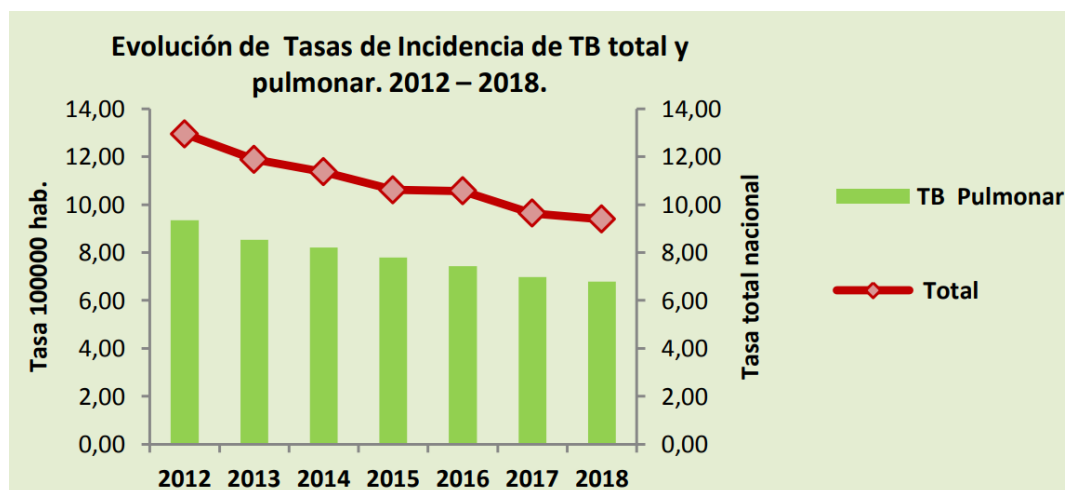


Font: Organització Mundial de la Salut. *Global tuberculosis report 2020*. 2020.



Espanya, com la majoria de països d'Europa Occidental, està considerat un país de baixa incidència de TBC (menys de 10 casos per cada 100.000 habitants i any), i des de 2012 se n'ha vist una reducció progressiva (**Figura 4**, pàgina 17).<sup>26</sup> El 2019 s'hi van declarar 4.400 casos (incidència de 9,34 casos per cada 100.000 habitants). Del total, un 68,7% van ser de TBC pulmonar (un 80,5% dels quals van ser confirmats microbiològicament), i un 0,8% (35 casos) van ser causats per soques MDR o XDR. Pel que fa a l'estudi dels nous casos, fins a un 3,6% presentava coinfecció amb VIH en el moment del diagnòstic, mentre que en un 67,1% dels pacients es va completar l'estudi de contactes.<sup>26</sup> Dels 4.400 casos, un 7,2% es van declarar en menors de 15 anys (TBC infantil), i un 4,9% en menors de 10 anys.<sup>26</sup> La incidència en la població pediàtrica s'ha vist lentament reduïda els darrers anys, de 4,98 casos per cada 100.000 menors de 15 anys l'any 2012 fins als 4,29 de l'any 2019.<sup>26,27</sup>

**Figura 4: Evolució de la incidència anual de tuberculosi a Espanya<sup>26</sup>**



Font: Ministerio de Sanidad. *Plan para la Prevención y Control de la Tuberculosis*. 2019

En concret, Catalunya va ser el 2019 la Comunitat Autònoma que més casos de TBC va reportar (1.080). Amb 14,2 casos per cada 100.000 habitants, va ser la tercera comunitat autònoma amb major incidència, per darrera de Galícia (18,8) i Ceuta (15,4). Del total de casos, un 59,5% van ser de TBC pulmonar (un 74,5% dels quals van ser

confirmats microbiològicament), i un 0,7% (8 casos) van ser causats per soques MDR o XDR. Pel que fa a l'estudi dels nous casos, fins a un 3,7% presentava coinfecció amb VIH en el moment del diagnòstic, mentre que en un 70,6% dels pacients es va completar l'estudi de contactes (74,5% en el cas dels menors de 10 anys). Del total de casos a Catalunya, un 8,1% van declarar-se en menors de 15 anys i un 4,8% (52 casos) en menors de 10 anys, sent la comunitat autònoma que més casos va declarar en aquesta franja d'edat. Així doncs, la incidència de TBC infantil a Catalunya es va situar el 2019 en 7,43 casos per 100.000 menors de 15 anys.<sup>26</sup>

## 2.3 La tuberculosi infantil

Sovint la TBC infantil ha estat menystinguda pels programes de prevenció i tractament de la malaltia. El fet que els nens juguin un paper residual en la transmissibilitat de la infecció podria explicar per què queda de vegades a l'ombra. Ara bé, la història natural de la malaltia, el diagnòstic, l'expressió clínica i l'impacte sobre la comunitat de la TBC infantil no són equiparables a les dels adults. Això, afegit a la seva potencial gravetat en el lactant i el nen petit, evidencia que cal posar esforços específics per al desenvolupament d'estratègies enfocades directament a la prevenció, vigilància, diagnòstic i tractament de la TBC infantil.

És aquesta realitat la que va motivar que el 2009 nasqués la pTBnet (de l'anglès *pediatric tuberculosis network European trial group*),<sup>28</sup> una xarxa de més de 300 membres de 31 països d'Europa creada per facilitar la realització d'estudis multinacionals, descriure l'epidemiologia de la TBC en nens europeus i crear una comissió d'experts en la malaltia. Aquesta iniciativa va crear el precedent perquè a Espanya, que té una incidència de TBC infantil major que la mitjana de la Unió Europea (4,29 vs 3,12 casos per cada 100.000 habitants),<sup>29</sup> s'hi creés una eina semblant amb l'objectiu de cohesionar els diversos centres i esprémer el seu potencial investigador.

Va ser així com va néixer el 2013 la pTBred (del castellà *Red Española de Estudio de Tuberculosis Pediátrica*),<sup>30</sup> integrada per més de 140 professionals de 85 centres de salut (la gran majoria hospitalaris). La xarxa té com a objectius desenvolupar un registre estatal de casos de TBC pediàtrica mitjançant una base de dades online accessible; promoure la investigació en la malaltia; establir vies i espais per a la comunicació entre professionals a la xarxa; i elaborar documents, guies i protocols d'actuació.<sup>31</sup> La xarxa fa servir la plataforma RedCap per al registre de dades. Es tracta d'una aplicació elaborada per la Universitat de Vanderbilt (Nashville, Tennessee), i està específicament dissenyada per a l'elaboració d'estudis d'investigació biomèdica. La plataforma és gratuïta, segura, flexible i permet la fàcil importació i exportació de dades a programes estadístics.<sup>32</sup>

## 2.4 Història natural i patogènia de la tuberculosi

El complex *Mycobacterium tuberculosis* es compon d'un conjunt de micobacteris altament relacionats entre si i amb una gran homogeneïtat en llur seqüència de nucleòtids. El complex està format per les espècies *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium caprae* i *Mycobacterium pinnipedii*. *M. bovis* és causant de TBC en bestiar, humans, primats, gossos i gats; *M. africanum* causa TBC humana a l'Àfrica tropical i representa una forma intermèdia entre la causada per *M. tuberculosis* i l'ocasionada per *M. bovis*; *M. microti* causa TBC en rosegadors i lesions locals en conillets d'índies i conills. L'espècie *M. tuberculosis* és, però, de lluny, la principal causa de TBC en humans.<sup>33</sup>

Es tracta d'un bacil immòbil, aerobi estricte i no esporulat. És un germen amb un cicle de replicació d'unes 18 hores, molt més llarg que el de la majoria de bacteris. Té una paret cel·lular rica en lípids. Aquest fet en dificulta la tinció pels mètodes convencionals, sent així mateix difícil la descoloració amb solució àcid-alcohòlica un

cop s'ha aconseguit la tinció. Aquesta dificultat per a la decoloració és la base de la tinció de Ziehl-Neelsen.<sup>33</sup>

El reservori del bacil és bàsicament l'ésser humà. Quan un pacient amb malaltia pulmonar cavitada tus o expectora produeix aerosols contaminants. Alguns d'aquests aerosols, anomenats gotes de Pflügge, romanen a l'aire ambient, i es dispersen fàcilment seguint els corrents d'aire. Quan les gotes són inhalades per un nou hoste, arriben sense dificultat a la via aèria inferior, en especial als lòbuls inferiors, que estan proporcionalment millor ventilats. En arribar als alvèols, els bacils són fagocitats pels macròfags, que secreten una cascada de citosines per activar la resposta immunitària innata (neutròfils, monòcits i d'altres macròfags alveolars), formant una estructura anomenada tubercle. Els bacils, fagocitats pels macròfags, tenen la capacitat d'impedir la unió del liposoma i el fagosoma macrofàgic, la qual cosa els permet no ser destruïts i començar a replicar-se dins de la cèl·lula fins que la destrueixen. Així doncs, si la resposta innata inicial no és efectiva, el tubercle creixerà i els bacils es disseminaran al teixit limfàtic adjacent (ganglis paratraqueals, perihiliars i subcarinals), formant l'anomenat complex de Gohn. En alguns casos, existeix la possibilitat que els bacils arribin al torrent sanguini i es disseminin via hematògena.<sup>33</sup>

Al cap de 2-3 setmanes, però, es desenvolupa una segona resposta immunitària, aquest cop efectiva, basada en els limfòcits (essencialment limfòcits T col·laboradors tipus 1 [Th1], però també limfòcits T citotòxics i limfòcits B) i en què la immunitat humoral juga un paper secundari. Els limfòcits Th1 es desplacen als focus d'infecció, i alliberen citosines com el factor de necrosi tumoral *alfa* (TNF $\alpha$ ) que indueixen la proliferació d'altres macròfags i limfòcits. Aquesta proliferació és el que permet la formació de granulomes situats al voltant del bacil per impedir-ne la proliferació i disseminació. El granuloma tuberculós presenta característicament teixit necròtic caseïficat al centre. Els limfòcits alliberen també interferó gamma (IFN $\gamma$ ), que acidifica

el fagosoma dels macròfags permetent la destrucció intracel·lular de gran part dels bacils. La importància del paper de l'IFN $\gamma$  en el control de la infecció queda palesa en múltiples models, i és que s'ha vist que tant ratolins com humans amb alteracions del receptor de l'IFN $\gamma$  presenten un risc augmentat de patir infeccions micobacterianes invasives.<sup>34,35</sup> Ara bé, malgrat aquesta resposta immunològica, hi ha un percentatge de gèrmens que són capaços d'adaptar llur metabolisme per respondre a aquesta situació d'estrès, romanent en els granulomes en estat de latència. És el que es coneix com a ITBL, una entitat asimptomàtica i no transmissible.<sup>33</sup>

El 90% de les vegades, la segona resposta immunitària és capaç d'impedir la proliferació bacil·lar inicial, fet que permet que els bacils romanents acabin sent destruïts al llarg dels anys a conseqüència de la fibrosi i de la reabsorció del granuloma. En un 5% dels casos de primoinfecció, però, la resposta inicial no serà prou efectiva, els bacils es replicaran sense que el sistema immunitari pugui impedir-ho i tindrà lloc una malaltia primària. Per últim, en el 5% de casos restants es conté inicialment la infecció, però els bacils latents acaben reactivant-se anys després de la primoinfecció i ocasionen una malaltia postprimària. D'entre els casos de reactivació, aproximadament la meitat tenen lloc entre els 2 i els 5 anys després de la primoinfecció i l'altra meitat més enllà dels cinc anys.<sup>36</sup>

La història natural de la malaltia en nens, però, té particularitats destacables, donat que la possibilitat de desenvolupar malaltia tuberculosa després de la infecció primària varia molt segons l'edat.<sup>37</sup> Així, els pacients en edat escolar (5-10 anys) tenen un molt baix risc (2%) de desenvolupar la malaltia, significativament menor que els de 2-5 anys (5%) i els majors de 10 anys (10-20%). Per contra, el risc de desenvolupar malaltia és molt alt en lactants (50%). A més a més, la probabilitat de desenvolupar una malaltia greu (meningitis tuberculosa o TBC miliar) després de la infecció primària arriba al 10-20% en lactants, sent menor de l'1% en majors de 2 anys.<sup>38</sup> A més, la majoria de

vegades la malaltia en nens es desenvolupa durant els primers 12 mesos després de la infecció.<sup>39</sup> És per aquesta raó que resulta especialment important detectar aquells nens que s'han infectat per tractar la ITBL abans no desenvolupin la malaltia.

Pel que fa a la presentació clínica, la forma pulmonar és la més freqüent en pediatria (85-90% dels casos),<sup>40</sup> donat que la via aèria és la porta d'entrada dels bacils a l'organisme. Se'n distingeixen dues presentacions: la TBC pulmonar primària, que és la predominant en nens, i la TBC pulmonar postprimària. La TBC pulmonar postprimària, poc freqüent en pediatria (tret d'adolescents amb malaltia reactivada o pacients en tractament immunosupressor) es deu a una reactivació d'una ITBL. Igual que en l'adult, la lesió típica n'és la cavitació pulmonar a l'àpex, on hi ha una major concentració d'oxigen. Aquestes lesions són conseqüència de la secreció de proteases pels macròfags i els mateixos bacils, que destrueixen el teixit fibròtic dels granulomes, de manera que el càseum es líquüefacta i s'organitza. Això origina un ambient òptim per als bacils, que es multiplicaran extracel·lularment a gran velocitat, expandint ràpidament el granuloma i destruint el teixit adjacent. La presència de cavitacions indica una alta capacitat de contagi, tenint en compte l'alta càrrega bacil·lar i la capacitat d'expectorar bacils contagiosos a través de les vies respiratòries. Per contra, la TBC pulmonar primària, la més freqüent en pediatria, pot passar clínicament inadvertida. Es deu a una progressió d'una primoinfecció tuberculosa, generalment en el primer any de la infecció. La lesió típica n'és el complex primari de Gohn, que consisteix en un infiltrat parenquimatos i un cordó de limfangitis associats a la presència d'adenopaties hiliars homolaterals. També poden objectivar-se atelèctasis (per obstrucció bronquial per efecte massa de les adenopaties) i vessament pleural. Aquest últim majoritàriament es deu, en la TBC pediàtrica, a una reacció d'hipersensibilitat, més que no pas a un vessament de càseum a l'espai pleural.<sup>33,40</sup>

La TBC ganglionar és la forma extrapulmonar més freqüent de la malaltia i és especialment prevalent en nens. La majoria d'adenitis tuberculoses afecten la cadena laterocervical, i la clínica sol ser larvada i anodina, en forma de masses no doloroses i violàcies de setmanes o mesos d'evolució.<sup>40</sup> La meningitis tuberculosa, per la seva banda, és la manifestació més greu de TBC. Es forma un exsudat inflamatori a la cisterna basal que condueix a un augment de la pressió intracranial. Es pot associar a lesions isquèmiques i vasculítiques al mesencèfal i als ganglis basals. La clínica sol ser subaguda (cefalea, irritabilitat, vòmits...), i si evoluciona pot presentar-se en forma de crisis comicials, afectació dels parells cranials o disminució del nivell de consciència.<sup>40</sup> La TBC disseminada, per altra banda, és conseqüència de la propagació limfohematògena del germen, que forma petits grànuls per tot l'organisme, afectant múltiples òrgans i sistemes. El patró radiològic pulmonar associat a aquesta forma de malaltia es coneix com a TBC miliar. Clínicament associa febrícula, astènia, pèrdua de pes, hepatoesplenomegàlia o simptomatologia pulmonar. Així mateix, la TBC osteoarticular se sol presentar de manera aïllada. Tret de la forma espinal (mal de Pott), sol tenir lloc en la reactivació de la malaltia, sent rara en menors de 5 anys.<sup>40</sup> Per últim, altres formes de TBC extrapulmonar (genitourinària, oftàlmica, cutània, intestinal...) apareixen sobretot en la reactivació de la malaltia i per tant són més típiques de pacients adults.<sup>33</sup>

## 2.5 Diagnòstic de la tuberculosi

Cal distingir entre el diagnòstic de la ITBL i el de la TBC.

Per tal de diagnosticar una ITBL, cal que el pacient estigui asimptomàtic, que tingui una radiografia de tòrax no suggestiva de malaltia activa (tot i que es poden trobar adenopaties calcificades o lesions parenquimatoses cicatricials suggestives d'infecció antiga) i que presenti una prova immunològica positiva, ja sigui un PPD o un IGRA (de l'anglès *Interferon-gamma release assay*).

El diagnòstic de la malaltia tuberculosa, per la seva banda, podrà ser de sospita o confirmat. La sospita vindrà donada per la simptomatologia o radiologia compatibles, i la constatació d'un risc epidemiològic d'infecció tuberculosa (contacte conegut amb un pacient bacil·lífer, provenir d'un país amb alta prevalença, etc). Un resultat positiu del PPD o l'IGRA en el context de sospita de TBC serà suggestiu de malaltia, però la seva negativitat no permetrà descartar-la. A més, és important tenir en compte que els tests immunològics *per se* no són útils per distingir la ITBL de la malaltia activa. Pel que fa al diagnòstic radiològic, la tomografia computeritzada pulmonar és més sensible que la radiografia en el diagnòstic de la TBC pulmonar, però donat que comporta una major irradiació, no es realitza de rutina, reservant-se per a nens petits (habitualment menors de 2 anys) o per a aquells casos en què la radiografia simple de tòrax no resulta concloent. S'han descrit nombrosos patrons radiològics, com ara el ganglionar (eixamplament mediastínic o infiltrats perihiliars), el parenquimatós (opacitats segmentàries o lobars o nòduls mal definits que resulten difícils de distingir d'una pneumònia típica), el cavitari (típics de la malaltia reactivada de l'adult) o el miliar (en context de TBC disseminada).<sup>40</sup>

El diagnòstic definitiu o confirmatori de la malaltia tuberculosa consisteix a demostrar la presència del bacil, habitualment en mostres de secrecions respiratòries directes (esput, esput induït, rentat bronco-alveolar) o indirectes (suc gàstric recollit mitjançant sonda nasogàstrica a primera hora del matí). Per augmentar la rendibilitat diagnòstica, s'aconseja estudiar un mínim de 3 mostres recollides en dies diferents. La tinció (tècnica de Ziehl-Neelsen) permet la visualització directe del germen, però donat que els micobacteris no tuberculosos també es visualitzen amb aquesta tècnica, el diagnòstic que se'n deriva serà de presumpció i no definitiu. D'altra banda, es pot aïllar el germen per cultiu, ja sigui sòlid (Lowenstein-Jensen) o líquid (Middlebrook). Donada la lenta replicació del bacteri, el temps de creixement en cultiu sòlid sol ser de 4-6



setmanes fins a poder identificar-lo. Per últim, els darrers anys s'han desenvolupat tècniques moleculars mitjançant PCR (de l'anglès *polymerase chain reaction*). Són molt més ràpides (hores), i a més d'identificar el material genètic del bacil permeten detectar gens inductors de resistències a fàrmacs antituberculosos. En els casos de TBC extrapulmonar, s'estudiaran líquids biològics o mostres de biòpsia corresponents a l'òrgan afectat (líquid cefaloraquidi, sinovial, peritoneal, etc).<sup>40</sup>

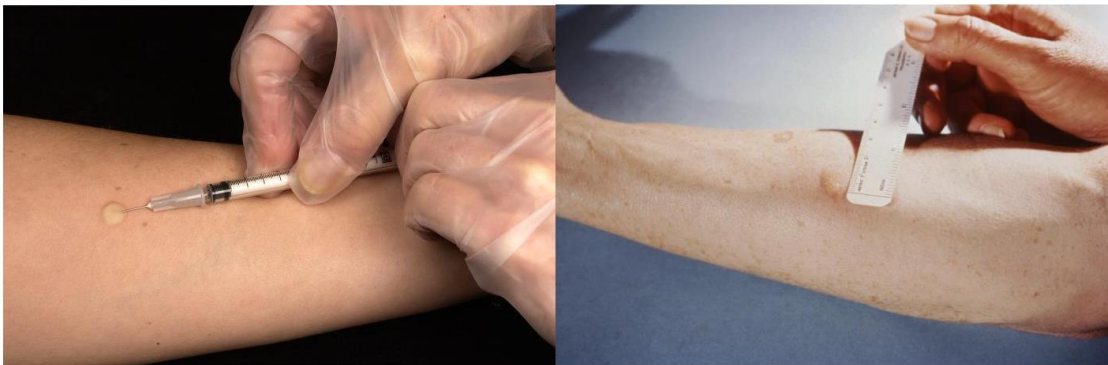
És molt important tenir en compte que el diagnòstic definitiu en nens és especialment difícil i no sol superar el 40-50% de casos en la majoria de les sèries. D'una banda, la clínica és sovint inespecífica i subaguda, fet que motiva un retard en la sospita diagnòstica; de l'altra, la confirmació microbiològica queda dificultada per la naturalesa paucibacil·lar de la TBC pulmonar primària de la majoria de pacients pediàtrics.<sup>41</sup> A més, els nens menors de 5 anys rarament són capaços d'expectorar, de manera que se sol recórrer a la recollida de suc gàstric mitjançant aspirat.<sup>37</sup> Els aspirats gàstrics, però, resulten positius en la tinció en menys del 20% dels casos i en el cultiu en menys del 50%.<sup>42</sup> En definitiva, donada la dificultat per a la confirmació microbiològica en nens, el diagnòstic de la malaltia tuberculosa en aquesta edat se sol establir per sospita en base a un PPD o IGRA positiu en el context de troballes clíniques i/o radiològiques compatibles i algun antecedent epidemiològic de risc.<sup>42</sup>

### **2.5.1 Test de la tuberculina**

Fins a inicis del segle XXI, el PPD seguia sent l'única eina diagnòstica per a la detecció de la ITBL. Tal com s'ha relatat, es tracta d'una prova basada en la reacció d'hipersensibilitat retardada (tipus IV) quan s'enfronten els limfòcits d'un pacient a compostos antigènics específics dels micobacteris *in vivo*. La prova es realitza mitjançant la injecció intradèrmica del compost a la cara ventral de l'avantbraç. La correcta realització de la tècnica queda palesa amb l'aparició d'una pàpula al lloc d'inoculació, que desapareix en 10-15 minuts. Posteriorment, al cap de 48-72 hores es

mesura el diàmetre transvers de la induració, en cas que hagi aparegut (**Figura 5**, pàgina 26). Cal tenir en compte, però, que són causes freqüents de falsos negatius les edats extremes de la vida (nounsats o lactants petits, i ancians), la immunosupressió, les formes disseminades de malaltia, la vacunació recent amb una vacuna de virus vius (com ara la triple vírica), la desnutrició o realitzar la prova en les primeres 8-12 setmanes després de la infecció primària (període finestra). A més, és possible tenir falsos positius en pacients vacunats amb BCG o en aquells infectats per micobacteris ambientals,<sup>40,43</sup> que comparteixen diversos antígens amb *M. tuberculosis*. En el nostre entorn, el llindar per considerar el PPD com a positiu variarà entre  $\geq 5\text{mm}$  i  $\geq 10\text{mm}$  en funció del risc de desenvolupar TBC. Així, serà  $\geq 5\text{mm}$  en pacients amb un risc elevat de desenvolupar la malaltia: haver presentat contacte estret amb un cas de TBC; presentar signes clínics o radiològics de malaltia; estar en situació d'immunosupressió (o infecció per VIH); o haver presentat una conversió d'un PPD prèviament negatiu. Per altra banda, el llindar se situarà en  $\geq 10\text{mm}$  per a nens en situació de menor risc: qualsevol altre cas diferent als exposats (estudi de nens migrats o viatgers). L'antecedent de vacunació amb BCG no altera la interpretació d'un PPD aïllat.<sup>44</sup>

**Figura 5: Injecció del compost (esquerra) i lectura del PPD (dreta)**<sup>45</sup>



Font: *Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Public Health Image Library.*

## 2.5.2 Els tests IGRA

Com a resposta a la baixa especificitat del PPD van néixer els tests IGRA. Són tècniques *in vitro* basades en la propietat dels limfòcits T sensibilitzats d'alliberar IFN $\gamma$  quan se'ls exposa a antígens del bacil. Els antígens usats són quasi exclusius del complex *M. tuberculosis*. El principal avantatge respecte al PPD és la major especificitat, donat que els antígens usats no estan presents ni en la vacuna BCG ni en la majoria de micobacteris ambientals (tot i que en menor mesura es troben també en algunes espècies de micobacteris no tuberculosos com *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. marinum*).<sup>46,47</sup> La **Taula 1** (pàgina 27) resumeix les principals semblances i les diferències entre la PPD i els IGRAs.

**Taula 1: comparació entre tests PPD i IGRA**

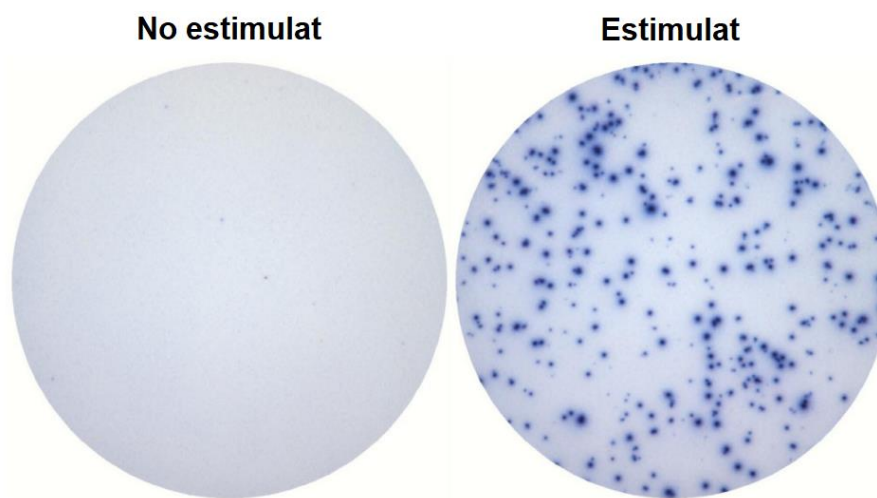
|                                  | <b>PPD</b>            | <b>IGRA</b>                 |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <b>Visites necessàries</b>       | Dues                  | Una                         |
| <b>Exposició als antígens</b>    | <i>In vivo</i>        | <i>In vitro</i>             |
| <b>Mètode</b>                    | Injecció intradèrmica | Venopunció                  |
| <b>Mesura</b>                    | Induració             | Concentració d'IFN $\gamma$ |
| <b>Requeriment de laboratori</b> | No                    | Sí                          |
| <b>Reacció creuada amb BCG</b>   | Sí                    | No                          |
| <b>Reacció creuada amb MNT</b>   | Sí                    | Menys probable              |
| <b>Sensibilitat</b>              | Similar               | Similar                     |
| <b>Especificitat</b>             | Menor                 | Major                       |
| <b>Diferenciació TBC d'ITBL</b>  | No                    | No                          |
| <b>Cost</b>                      | Menor                 | Major                       |

**IGRA:** Interferon-gamma release assay; **PPD:** Purified Protein Derivative; **IFN $\gamma$ :** Interferó gamma; **BCG:** Bacil Calmette-Guérin; **MNT:** Micobacteris no-tuberculosos; **TBC:** Tuberculosi; **ITBL:** Infecció latent.

Hi ha dos tipus de tests IGRA. D'una banda, aquells basats en la tècnica ELISPOT (de l'anglès *Enzyme-linked Immunosorbent Spot*), com el T-SPOT.®TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Regne Unit). La tècnica consisteix a usar una placa de

nitrocel·lulosa amb pous al fons dels quals hi ha fixats anticossos específics contra IFN $\gamma$ . Als pous s'hi dipositen els limfòcits que, en cas d'estar sensibilitzats, produiran IFN $\gamma$  quan siguin estimulats amb antígens del micobacteri. L'IFN $\gamma$  produït s'unirà a l'anticòs fixat a la base del pou, i el complex anticòs-IFN $\gamma$  serà marcat afegint a la placa immunoglobulines anti-interferó unides a biotina. El resultat és la visió de taques (*spots*) a la placa en cas que els limfòcits hagin produït IFN $\gamma$  (**Figura 6**, pàgina 28).<sup>43</sup>

**Figura 6: Test ELISPOT amb resultat negatiu (esquerra) i positiu (dreta)**<sup>48</sup>



Font: immunospot.com. *The ELISPOT Source*

D'altra banda, hi ha les proves IGRA, basades en la tècnica ELISA (de l'anglès *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Fins fa poc els tests QuantiFERON® (Qiagen, Hilden, Alemanya) n'eren els únics representants. D'aquests, se n'han desenvolupat quatre generacions: QuantiFERON®-TB (QFT®), QuantiFERON®-TB Gold (QFT®-G), QuantiFERON®-TB Gold-in-Tube (QFT®-GIT) i QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus). Darrerament, però, s'han comercialitzat nous IGRAs basats en la mateixa tècnica, com el Standard E TB-Feron® ELISA (TBF®; SD Biosensor, Gyeonggi-do, República de Corea), que ha demostrat presentar una bona concordança ( $\kappa=0,78$ ) tant amb el test QuantiFERON® equivalent en adults,<sup>49</sup> com amb el QFT®-Plus en

Pediatria ( $\kappa=0,919$ ).<sup>50</sup> En qualsevol cas, uns i altres es basen en el mateix principi que l'ELISPOT: fixar l'IFN $\gamma$  produït pels limfòcits amb anticossos anti-IFN $\gamma$  anclats en cubetes i marcar el complex anticòs-IFN $\gamma$  amb immunoglobulines anti-IFN $\gamma$  unides a biotina. La lectura, però, no es fa mitjançant el comptatge de taques, sinó quantificant el color emès mitjançant una tècnica d'espectrometria, que per densitat òptica correlaciona la intensitat del color amb la concentració d'IFN $\gamma$  produït pels limfòcits.<sup>43</sup>

Recentment s'han desenvolupat altres tècniques, com la CLIA (de l'anglès *chemiluminescence immunoassay*) per facilitar la mesura de concentració d'IFN $\gamma$  dels tests QuantiFERON®. Es fan servir els mateixos reactants, però varia el mètode de lectura del test. En comptes de mesurar la concentració d'IFN $\gamma$  per tècnica ELISA, un procés tècnicament exigent en termes de temps i de recursos humans, es fa per quimioluminiscència. En aquest cas, les molècules d'IFN $\gamma$  produïdes pels limfòcits estimulats són retingudes al fons dels pous per conglomerats d'anticossos anti-IFN $\gamma$  units entre si per microesferes magnètiques. Els complexos anticòs-IFN $\gamma$  es marquen amb immunoglobulines anti-IFN $\gamma$  conjugades amb èster d'acridini o algun dels seus derivats. Les darreres són molècules que tenen la propietat d'emetre llum visible quan se sotmeten a una solució alcalina de peròxid d'hidrogen. La intensitat de la llum emesa, quantificada per un lector, és relacionada directament amb la concentració d'IFN $\gamma$  produïda. Quan s'han comparat els resultats de tests QuantiFERON® llegits per ELISA i CLIA s'han vist resultats similars. En un estudi amb 341 mostres de QFT®-GIT es va veure una concordança molt bona ( $\kappa=0,98$ ) per als resultats qualitatius (positiu/negatiu/indeterminat) i una correlació moderada ( $r=0,75$ ) per als resultats quantitius (concentració d'IFN $\gamma$ ).<sup>51</sup> També s'ha desenvolupat un test QuantiFERON®-TB Gold Plus que detecta la concentració d'IFN $\gamma$  per CLIA, anomenat Liaison® QuantiFERON®-TB Gold Plus (DiaSorin, Saluggia, Itàlia).<sup>52</sup> Comparant el QuantiFERON®-TB Gold Plus llegit per ELISA i CLIA en 125 mostres es va veure una

correlació molt bona ( $\kappa=0,94$ ) en termes qualitativus.<sup>53</sup> En termes quantitativus, sembla que la tècnica CLIA podria mostrar concentracions més altes d'IFN $\gamma$  per a una mateixa mostra, la qual cosa faria plantejar canviar els punts de tall de positivitat.<sup>54</sup> En qualsevol cas, es tracta d'una tècnica innovadora, que encara requereix d'estudis que n'avalin l'ús però que presenta beneficis potencials, essencialment per l'automatització de la lectura del resultat.

### 2.5.2.1 El test QuantiFERON®-TB

Com ja s'ha relatat, els tests QuantiFERON® són IGRAs basats en la tècnica ELISA. El primer test llançat al mercat va ser el QuantiFERON®-TB (QFT; Qiagen, Hilden, Alemanya) l'any 2001. El test consistia a quantificar l'alliberació d'IFN $\gamma$  d'un grup de limfòcits quan se'ls afegia l'antigen PPD, de manera que no aportava una major especificitat a la tuberculina. L'any 2005, però, es va desenvolupar el QuantiFERON®-TB Gold (QFT®-G; Qiagen, Hilden, Alemanya), que utilitzava només antigens més específics del *M. tuberculosis*: ESAT-6 (de l'anglès *Early Secretory Antigen Target*) i CFP-10 (de l'anglès *Culture Filtrate Protein*).<sup>55</sup> Poc després, l'any 2007, es va presentar el QuantiFERON®-TB Gold-in-Tube (QFT®-GIT; Qiagen, Hilden, Alemanya). El test aportava dos canvis importants. D'una banda, afegia un tercer antigen: el TB7.7; de l'altra, els tubs utilitzats per introduir-hi la mostra ja estaven impregnats dels antigens corresponents, evitant així haver de pipetejar-los i facilitant per tant el treball tècnic.<sup>56</sup> El QFT®-GIT es componia de tres tubs: un tub nul amb heparina que no ha de presentar reacció (control negatiu); un tub mitogen amb fitohemaglutinina que avalua l'alliberació d'interferó-gamma independent de l'estímul antigènic de *M. tuberculosis* (control positiu); i un tub reactiu amb els antigens citats (ESAT-6, CFP-10 i TB7.7). El TBF®, esmentat anteriorment, és molt semblant al QFT®-GIT, amb la diferència que els antigens no són pèptids sintètics (produïts per síntesi química) sinó proteïnes recombinants (fabricades per tècnica de DNA-recombinant).<sup>49,57</sup>

Finalment, el 2016 es va presentar el quart test QuantiFERON®, anomenat QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus; Qiagen, Hilden, Alemanya). A l'igual que el QFT®-GIT, el QFT®-Plus també inclou un tub nul com a control negatiu i un tub de mitogen com a control positiu. La principal diferència, però, és que el QFT®-Plus conté dos tubs reactius: TB1 i TB2. El tub TB1 conté els pèptids dels antígens de *M. tuberculosis* ESAT-6 i CFP-10, però no conté TB7.7. Són pèptids elaborats per estimular específicament els limfòcits CD4<sup>+</sup>, que són els principals productors d'IFN $\gamma$ . D'altra banda, el TB2 conté, a més dels pèptids esmentats, d'altres igualment procedents dels antígens ESAT-6 i CFP-10 però dissenyats per estimular de manera específica la resposta dels limfòcits citotòxics (CD8<sup>+</sup>).<sup>47,58</sup> Als darrers temps s'ha donat una importància creixent al paper dels limfòcits CD8<sup>+</sup> en la resposta immunològica contra el micobacteri. Serien responsables de l'activació macrofàgica, de l'eliminació de cèl·lules infectades i fins i tot de la lisi intracel·lular dels bacils.<sup>59,60</sup> Alguns autors han descrit que la resposta CD8<sup>+</sup> és més intensa en les infeccions recents.<sup>61</sup> Així mateix, s'ha vist també que la resposta CD8<sup>+</sup> és més intensa en pacients adults amb TBC activa que en pacients amb ITBL.<sup>62,63</sup> Finalment, d'entre els pacients amb malaltia tuberculosa, aquells amb malaltia pulmonar presenten una resposta CD8<sup>+</sup> més intensa que aquells amb malaltia extrapulmonar,<sup>62,63</sup> en especial els que són bacil·lífers.<sup>63</sup> Pel que fa a l'edat pediàtrica, s'ha vist que els nens menors de 5 anys amb malaltia tuberculosa tenen més resposta CD8<sup>+</sup> que els qui presenten ITBL.<sup>64</sup> En definitiva, es creu que la resposta CD8<sup>+</sup> al bacil és especialment intensa en pacient amb un gran càrrega bacil·lar intracel·lular. Això seria coherent amb el fet que als limfòcits CD8<sup>+</sup> els són presentats pèptids mitjançant la molècula d'histocompatibilitat tipus I, que processa pèptids d'origen intracel·lular.

El test es realitza en dues fases. En primer lloc, s'obté la mostra per venopunció, requerint 1ml de sang per a cadascun dels quatre tubs. Tot seguit se sacsegen

suaument els tubs manualment per assegurar que la sang contacti amb tota la superfície interior del tub i, en les 16 hores que segueixen a l'extracció, s'incuben capgirats a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  entre 16 i 24 hores. Després de la incubació, i fins a un màxim de tres dies després, se centrifuguen els tubs durant 15 minuts a 2.000-3.000 RCF i se'n recull un mínim de 150 $\mu\text{L}$  de plasma amb una pipeta. Aquest plasma es pot guardar en nevera a  $2-8^{\circ}\text{C}$  durant un màxim a 28 dies (o a  $-20^{\circ}\text{C}$  si cal reservar-lo durant més temps) fins a la següent fase del test.

La segona etapa del test és la tècnica ELISA, que té una duració total d'unes tres hores. La tècnica requereix, abans i durant el procés d'anàlisi, de la realització a mà de diversos rentats, centrifugacions i dilucions de les mostres de plasma. El resultat final serà la lectura per densitometria òptica de la concentració d'IFN $\gamma$  a cadascun dels tubs analitzats.<sup>47</sup>

El test es considera positiu si en qualsevol dels dos tubs reactius la concentració d'IFN $\gamma$  està significativament per sobre de la del tub nul, i es considerarà negatiu en cas que no ho sigui per a cap dels dos tubs. Si el tub de mitogen presenta una concentració baixa d'IFN $\gamma$  en absència de resposta als tubs reactius o bé si el tub nul presenta una concentració alta d'IFN $\gamma$ , el test es considerarà indeterminat (**Taula 2**, pàgina 33).<sup>47</sup> Una concentració baixa d'IFN $\gamma$  tant als tubs reactius com al tub de mitogen pot indicar una manca de resposta dels limfòcits, ja sigui de causa quantitativa (limfopènia) o qualitativa.<sup>47</sup>

### **2.5.2.2 Evidència descrita per als tests QuantiFERON®-TB**

El rendiment del QFT®-GIT, el predecessor del QFT®-Plus, ha estat àmpliament estudiat tant en població adulta com pediàtrica. Meta-anàlisis realitzades en pacients adults amb malaltia tuberculosa han mostrat una sensibilitat del 80% (interval de confiança del 95% [IC 95%] 75-84%)<sup>65</sup> incloent casos confirmats i no confirmats, i del 81% (IC 95% 78-83%) en incloure només casos confirmats.<sup>66</sup> L'especificitat del test en



aquests estudis és molt variable, entre el 79% (IC 95% 75-82%)<sup>65</sup> i el 99% (IC 95% 98-100%).<sup>66</sup> La gran variabilitat descrita ve donada per les diferències en els grups control que s'han fet servir, tal com es discutirà més endavant. El test s'ha avaluat àmpliament també en població pediàtrica. Les meta-anàlisis més importants han mostrat una sensibilitat per al diagnòstic de la malaltia del 83% (IC 95% 75-92%)<sup>67</sup> en incloure tant casos sospitats com confirmats, i del 89,6% (IC 95% 79,7-95,4%)<sup>68</sup> tenint en compte només casos confirmats. L'especificitat en aquests estudis va ser del 91% (IC 95% 78-100%)<sup>67</sup> i del 95% (IC 95% 94-97%)<sup>68</sup> respectivament.

**Taula 2: interpretació dels resultats del QFT®-Plus (valors en unitats internacionals per mil·lilitre)<sup>47</sup>**

| <b>Nul</b> | <b>TB1 menys nul</b> | <b>TB2 menys nul</b> | <b>Mitogen menys nul</b> | <b>Resultat</b>     |
|------------|----------------------|----------------------|--------------------------|---------------------|
| ≤8,0       | ≥0,35 i ≥25% del nul | Qualsevol            | Qualsevol                | <b>Positiu</b>      |
|            | Qualsevol            | ≥0,35 i ≥25% del nul |                          |                     |
|            | <0,35 o <25% del nul | <0,35 o <25% del nul | ≥0,5                     | <b>Negatiu</b>      |
|            | <0,35 o <25% del nul | <0,35 o <25% del nul | <0,5                     | <b>Indeterminat</b> |
| >8,0       | Qualsevol            |                      |                          |                     |

Font: QIAGEN. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert.

El QuantiFERON®-TB Gold Plus es va llançar al mercat havent-se validat només internament, avaluant-ne la sensibilitat i especificitat per a malaltia tuberculosa en població adulta d'Austràlia i el Japó (països de baixa incidència). L'especificitat en 409 pacients sense factors de risc coneguts de TBC va ser del 97,6% (IC 95% 95,6-98,8%). Per estimar-ne la sensibilitat es van fer servir 164 pacients amb malaltia confirmada per cultiu, resultant del 95,3% (IC 95% 90,9-97,9%). No es va avaluar la seva validesa per al diagnòstic de la ITBL.<sup>47</sup> Inicialment, no es disposava de cap experiència en població pediàtrica.

Posteriorment al seu llançament, el test ha estat àmpliament estudiat en població adulta. Cal destacar una meta-anàlisi que va aglomerar 578 pacients amb malaltia tuberculosa, 3.235 pacients amb ITBL i 635 controls sans. Donat que la meta-anàlisi va aplegar 15 estudis diferents, hi va haver una variabilitat important entre la definició dels grups. Així doncs, s'hi van incloure casos de TBC tant confirmada com no confirmada; els casos de ITBL es van definir per un PPD o bé per un QFT®-GIT positiu; i els controls sans incloïen estudiants sense factors de risc coneguts, pacients amb infecció per micobacteris no tuberculosos, donants voluntaris (alguns sense factors de risc d'ITBL i d'altres amb QFT®-GIT negatiu) i treballadors sanitaris (alguns amb PPD negatiu i d'altres sense cap cribratge previ). En qualsevol cas, la sensibilitat i l'especificitat per a la detecció de malaltia tuberculosa es van establir en un 94% (IC 95% 90-98%) i un 96% (IC 95% 93-97%), respectivament. Pel que fa als pacients diagnosticats d'ITBL en base a un PPD o QFT®-GIT positiu, la sensibilitat va resultar del 91% (IC 95% 84-96%).<sup>69</sup> També han estat nombroses les comparacions directes entre el QFT®-GIT i el QFT®-Plus en una mateixa població. Cal destacar la meta-anàlisi publicada per Shafeque i d'altres (*et al.*), que inclou 7 estudis d'aquestes característiques.<sup>70</sup> En termes quantitius, es va veure que la concentració d'IFN $\gamma$  en malalts amb TBC va ser més gran en el QFT®-GIT que en el QFT®-Plus, fet que podria explicar-se tant per l'absència de l'antigen TB7.7 al darrer, com per la manera com s'introdueix l'antigen al tub reactiu (fixat amb resina en el QFT®-GIT i aspergit a l'interior del tub en el cas del QFT®-Plus). En termes de sensibilitat per al diagnòstic de la malaltia, els dos tests van mostrar taxes d'entre el 85 i el 100%, sent la diferència entre els dos tests (QFT®-Plus menys QFT®-GIT) d'entre -4 i +2%, en cap cas significativa. Tampoc la diferència en taxa de positivitat entre població susceptible a patir una ITBL va ser significativa, mentre que el percentatge de resultats concordants entre ambdós tests va ser d'entre el 89,9 i el 96,0% (amb índexs *kappa* d'entre 0,80 i 0,91). Finalment, l'especificitat en població sana amb baix risc de patir ITBL va ser

també semblant entre els dos tests (entre el 87 i el 100%), amb diferències (QFT®-Plus menys QFT®-GIT) d'entre -7,4 i -0,8%, de nou en cap cas significatives.

D'altra banda, els estudis que avaluen el QFT®-Plus en població pediàtrica són limitats. A data d'avui, quatre n'han estudiat la sensibilitat per a malaltia tuberculosa, tots ells en poblacions relativament petites (de 3 a 33 casos confirmats).<sup>71-74</sup> L'únic d'aquests estudis realitzat en un país de baixa incidència va mostrar una sensibilitat del 83,3% (IC 95% 51,6-97,9%).<sup>72</sup> Així mateix, només en un d'ells es van comparar en la mateixa població l'ús de QFT®-Plus i QFT®-GIT, sent el patró de resultats molt semblant entre ambdós tests.<sup>71</sup>

## 2.6 Tractament i prevenció de la tuberculosi

Tractar la malaltia tuberculosa implica atacar tant els bacils quiescents com els replicants, tant intracel·lulars com extracel·lulars. Els malalts adults amb TBC tenen una gran càrrega bacil·lar, i un alt índex de replicació, cosa que comporta un perill de selecció de soques mutants resistents als fàrmacs. És per aquesta raó que és necessari combinar com a mínim tres fàrmacs antituberculosos en el tractament de la TBC, almenys en la fase inicial del tractament. En la fase de consolidació se'n poden fer servir dos, donat que s'hauran eliminat els bacils altament replicants. En qualsevol cas, la duració total de la teràpia ha de ser llarga (com a mínim 6 mesos) per tal de tractar totes les poblacions bacil·lars i curar la malaltia.<sup>33</sup>

Dels fàrmacs antituberculosos, el que té una major capacitat bactericida és la isoniazida, que és capaç de destruir fins al 90% de població bacil·lar els primers dies de tractament, actuant tant extra com intracel·lularment. La segueixen en potència la rifampicina i, a major distància, la pirazinamida. A més de la capacitat bactericida, és important tenir en compte la capacitat esterilitzant, és a dir, la de destruir aquells bacils semidorments que creixen lentament o en brots. En aquest sentit, la pirazinamida té

una capacitat específica per atacar els bacils de creixement lent que es troben en ambient àcid. Així doncs, el tractament amb rifampicina, isoniazida i pirazinamida és la millor combinació en termes de capacitat bactericida i esterilitzant, i en la prevenció de desenvolupament de resistències en la fase intensiva del tractament.<sup>33</sup> En la fase de manteniment del tractament de la TBC per soca sensible als fàrmacs de primera línia, la combinació d'isoniazida i rifampicina és suficient.

En el benentès dels principis exposats s'estructuren els règims de tractament també en la infància. En pediatria, la TBC pulmonar no complicada té com a règim d'elecció administrar durant dos mesos la combinació de rifampicina, isoniazida, pirazinamida i etambutol en la fase inicial, i consolidar el tractament amb rifampicina i isoniazida durant 4 mesos més. Cal senyalar, però, que a les guies de 2022 l'OMS obre l'opció a escurçar a 2 mesos la fase de consolidació en nens i adolescents amb adenitis perifèrica o malaltia intratoràctica no complicada.<sup>75</sup> Pel que fa a la fase inicial, es podria ometre l'administració d'etambutol en cas que s'objectivi sensibilitat als altres tres fàrmacs. Dels quatre fàrmacs exposats, que són els considerats de primera línia, només la rifampicina presenta una formulació en forma de xarop, mentre que la resta s'administren en forma de comprimits, la qual cosa dificulta l'administració del tractament i l'ajustament de la dosi al pes del pacient, en especial en nens petits. El tractament de TBC causada per soques MDR o XDR és complex, i implica l'ús de quinolones, antituberculosos orals de segona línia (com ara cicloserina, etionamida i àcid para-aminosalicílic) i l'ús dels nous antituberculosos orals: bedaquilina, delamanid i linezolid.<sup>33,40</sup>

Per contra, l'objectiu del tractament de la ITBL és evitar que els bacils quiescents de l'interior dels macròfags es reactivin i ocasionin la malaltia tuberculosa. En aquests casos, la càrrega bacil·lar és baixa i hi ha poca replicació, de manera que el risc de seleccionar soques resistents és molt més baix. És per això que el tractament de la

ITBL se sol fer amb un o dos fàrmacs. Generalment, en pediatria s'administra isoniazida durant 6-9 mesos o bé la combinació d'isoniazida i rifampicina durant tres mesos.

Finalment, en pediatria és especialment important el concepte de quimioprofilaxi primària, que pretén evitar que els contactes d'alt risc amb pacient bacil·lífers desenvolupin la malaltia en el període finestra, quan les proves d'immunodiagnòstic (PPD o IGRAs) poden donar un resultat fals negatiu. D'aquesta manera, es recomana que els nens més petits (en general per sota dels 5 anys) i els immunodeprimits amb contacte de risc rebin tractament profilàctic fins a repetir la prova immunodiagnòstica passades 8-12 setmanes del contacte.<sup>33,40</sup>

La prevenció i el control de la malaltia passen per realitzar un diagnòstic precoç dels pacients amb sospita de TBC i, mitjançant el cribratge en població susceptible (pacients migrats o immunosuprimits) i l'estudi de contactes, dels casos d'ITBL. Donat que els tractament són llargs, cal garantir una correcta adherència a la teràpia (amb eines com els programes de tractament directament observat) i monitoritzar l'aparició d'efectes secundaris associats. A més, un aspecte a destacar en la prevenció de la malaltia és la vacunació amb BCG. Actualment es recomana només en aquells països amb una alta incidència de TBC. Cal tenir en compte que si bé protegeix contra la TBC primària i en disminueix el risc de presentació en formes greus, no està clara la seva utilitat en la prevenció de TBC postprimària, ni impedeix que un individu prèviament infectat emmalalteixi.<sup>22,33</sup>



# JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL I HIPÒTESIS

---

### **3 JUSTIFICACIÓ DEL TREBALL I HIPÒTESIS**

De manera generalitzada, i en estreta relació amb les limitacions que comporta la investigació en nens, l'evidència científica en pediatria és sovint poc contrastada comparada amb la que es fa en adults. Per tant és habitual que s'extrapolin a la població pediàtrica conclusions basades en estudis realitzats en població adulta. Això respon a una limitació, però no a la realitat, donat que els nens no són adults petits. Els infants tenen una idiosincràsia complexa (creixement, evolució morfològica, immaduresa orgànica, immunitat rudimentària a l'inici de la vida, solidaritat funcional, dependència...) que sens dubte els fa mereixedors, sempre que sigui possible, de ser subjectes d'estudi de les mesures diagnòstiques i terapèutiques que se'ls aplica, per tal d'assegurar que es faci de la manera més segura, eficient i contrastada possible.

La tuberculosi no és ni de bon tros una excepció a aquest raonament. Tal com ja s'ha comentat, la TBC infantil és un mal endèmic que sovint queda en una segon pla en el context global d'epidèmia de TBC. De tot l'univers de la infecció i malaltia tuberculoses, aquesta tesi se centra en el diagnòstic immunològic i, més en concret, en l'ús del test IGRA QuantiFERON®-TB Gold Plus. Hi ha un coneixement molt escàs sobre el comportament del test en població pediàtrica. Les poques publicacions disponibles són en cohorts petites en països d'alta endèmia. Aquest treball vol contribuir al coneixement sobre l'aplicabilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la població pediàtrica. Creiem que la investigació servirà als pediatres i infectòlegs d'arreu a l'hora de valorar d'una manera objectiva i crítica l'ús del test com a eina diagnòstica de la infecció i la malaltia tuberculosa en pediatria.

Per tal de realitzar aquesta investigació s'ha fet ús de la xarxa d'estudi pTBred, explicada anteriorment, per crear una base de dades multicèntrica en què s'inclouessin el màxim nombre possible de pacients pediàtrics sotmesos al test



QFT®-Plus, per qualsevol de les seves indicacions i independentment del diagnòstic que rebien finalment. Així ha estat com la col·laboració de més de seixanta professionals de 26 centres hospitalaris d'arreu de la geografia espanyola ha permès tenir accés a una gran cohort de pacients pediàtrics. L'heterogeneïtat d'edats, orígens i situació clínica són, en la nostra opinió, un reflex fidel de la població pediàtrica a qui s'aplica diàriament el QFT®-Plus al nostre entorn i per tant una oportunitat per avaluar el comportament del test en les situacions de la pràctica clínica real.

En base a allò exposat anteriorment, el treball pretén testar les següents hipòtesis:

- La sensibilitat del QFT®-Plus per al diagnòstic de la ITBL i la TBC pediàtrica no és millor que la del QFT®-GIT o la dels altres tests IGRA que el precedeixen.
- La sensibilitat del QFT®-Plus per al diagnòstic de la TBC pediàtrica no és millor que la del PPD.
- L'especificitat del QFT®-Plus per al diagnòstic de la TBC pediàtrica no és millor que la del QFT®-GIT o la dels altres tests IGRA que el precedeixen.
- La concordança entre el QFT®-Plus i el PPD és limitada en pacients amb TBC o ITBL.
- Els pacients que presenten un resultat indeterminat per al QFT®-Plus tenen un perfil clínic i epidemiològic diferent al d'aquells amb resultat positiu o negatiu.
- Els resultats dels tubs reactius TB1 i TB2 del QFT®-Plus mostren una bona correlació.
- L'aportació específica del tub reactiu TB2 del QFT®-Plus en la capacitat diagnòstica de la TBC i la ITBL és escassa.
- L'avaluació longitudinal de la concentració d'interferó gamma dels tubs reactius TB1 i TB2 del QFT®-Plus no és una eina útil per avaluar la resposta al tractament antituberculós en pacients amb TBC o ITBL.



# OBJECTIUS

---

## **4 OBJECTIUS**

D'acord amb les hipòtesis descrites, els objectius definits en aquesta tesi doctoral són:

### Objectius principals:

- 1) Definir la sensibilitat del QuantiFERON®-Gold Plus per al diagnòstic de malaltia tuberculosa i infecció latent en pacients pediàtrics i comparar-la amb la reportada prèviament per al QuantiFERON®-Gold in Tube i els altres tests d'immunodiagnòstic que el precedeixen.
- 2) Definir l'especificitat del QuantiFERON®-Gold Plus per al diagnòstic de tuberculosi en pediatria i comparar-la amb la reportada per al QuantiFERON®-Gold in Tube i els tests d'immunodiagnòstic que el precedeixen.

### Objectius secundaris:

- 1) Avaluar la concordança entre el QuantiFERON®-Gold Plus i el test de tuberculina, de manera específica en pacients amb tuberculosi o infecció latent.
- 2) Definir les variables que modifiquen la sensibilitat i l'especificitat del QuantiFERON®-Gold Plus en el diagnòstic de la tuberculosi i la infecció latent.
- 3) Identificar les variables relacionades amb una major probabilitat que el QuantiFERON®-Gold Plus presenti un resultat indeterminat.
- 4) Estudiar la correlació entre els resultats dels tubs reactius 1 i 2 del QuantiFERON®-Gold Plus.
- 5) Determinar la contribució específica del tub reactiu 2 en la capacitat del QuantiFERON®-Gold Plus de diagnosticar la tuberculosi i la infecció latent.
- 6) Avaluar com varia la concentració d'interferó gamma dels tubs reactius 1 i 2 en nens amb tuberculosi o infecció latent després que hagin completat el tractament antituberculós, i si aquesta variació pot ser un marcador de resposta al tractament.

# METODOLOGIA I RESULTATS

---

## **5 METODOLOGIA I RESULTATS**

### **5.1 Primer estudi**

#### **5.1.1 Document del primer estudi**

**Diagnostic Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Plus Assays in Children and Adolescents with Tuberculosis Disease.**

Soler-Garcia A, Gamell A, Santiago B, Monsonís M, Calvo C, Cobo E, Colino E, Espiau M, Guerrero-Laleona C, Lobato Z, Martín-Nalda A, Pérez-Gorricho B, Pérez-Porcuna TM, Piqueras AI, Rodríguez-Molino A, Ruiz M, Soriano-Arandes A, Valmanya T, Tebruegge M, Noguera-Julian A.

Article publicat a:

Journal of Pediatrics. Abril 2020.

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2020:

1r Decil en la categoria de Pediatria

Factor d'impacte: 4,406

## Diagnostic Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Plus Assays in Children and Adolescents with Tuberculosis Disease

Aleix Soler-Garcia, MD<sup>1</sup>, Anna Gamell, MD, PhD<sup>1</sup>, Begoña Santiago, MD, PhD<sup>2</sup>, Manuel Monsonís, MD<sup>3</sup>, Cristina Calvo, MD, PhD<sup>4,5,6,7</sup>, Elvira Cobo, MD<sup>2</sup>, Elena Colino, MD<sup>8</sup>, María Espiau, MD, PhD<sup>9</sup>, Carmelo Guerrero-Laleona, MD<sup>10</sup>, Zulema Lobato, MD<sup>11</sup>, Andrea Martín-Nalda, MD<sup>9</sup>, Beatriz Pérez-Gorricho, MD<sup>12</sup>, Tomas M. Perez-Porcuna, MD, PhD<sup>13,14</sup>, Ana Isabel Piqueras, MD<sup>15</sup>, Paula Rodríguez-Molino, MD<sup>5</sup>, Marta Ruiz, MD<sup>16</sup>, Antoni Soriano-Arandes, MD, PhD<sup>9</sup>, Teresa Valmanya, MD<sup>17</sup>, Marc Tebruegge, DTM&H, MRCPCH, FHEA, MSc, MD, PhD<sup>18,19,20,\*</sup>, and Antoni Noguera-Julian, MD, PhD<sup>1,7,21,22,\*</sup>, on behalf of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred)<sup>†</sup>

In 2016, a new interferon-gamma release assay, QuantiFERON-TB Gold Plus, was introduced. We conducted a cross-sectional multicenter study, involving 158 children and adolescents with tuberculosis disease. The overall sensitivity of the assay was 82.9% (IQR 77.0%-88.8%), indicating that in children this test does not have higher sensitivity than previous generation interferon-gamma release assays. (*J Pediatr* 2020; ■:1-5).

In 2017, an estimated 1 million children developed tuberculosis (TB) globally.<sup>1</sup> Microbiologic confirmation of TB in children is challenging because of its paucibacillary nature and the difficulties in obtaining sputum samples. Therefore, the diagnosis is often based on epidemiologic risk factors, suggestive clinical and radiologic findings, and positive immunodiagnostic tests (ie, tuberculin skin test [TST] and/or interferon-gamma release assay [IGRA]).

IGRAs are functional immunoassays that rely on the detection of interferon-gamma produced by T lymphocytes following stimulation with TB-specific peptides.<sup>2</sup> Their sensitivity is reduced in immunocompromised individuals and young children, who are at greater risk of progression from latent TB infection (LTBI) to TB disease, and severe and disseminated forms of disease.<sup>2</sup> In resource-rich settings, IGRAs are widely used for LTBI screening and as adjunctive tools in the diagnostic work-up of suspected TB disease.<sup>3</sup> Previous data show that in Europe QuantiFERON-TB assays (Cellestis/Qiagen, Carnegie, Australia) are used more widely than T-SPOT.TB assays (Oxford Immunotec, Oxford, United Kingdom) in routine clinical practice.<sup>4</sup>

In 2016, the QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-GIT) assay was phased out and the QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) assay was launched (Cellestis/Qiagen). Compared with the QFT-GIT, the QFT-Plus includes the original antigen tube (TB1, coated with ESAT-6 and CFP-10, but lacking TB7.7), and an additional antigen tube, TB2, that contains

short peptides from CFP-10 designed to detect interferon-gamma responses generated by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes. Data about the performance of QFT-Plus assays in children and adolescents remain limited.<sup>5,6</sup> This study aimed to determine the sensitivity of QFT-Plus assays in children and adolescents with TB disease in a low TB-burden setting.

|          |                                       |
|----------|---------------------------------------|
| BCG      | Bacillus Calmette-Guérin              |
| IGRA     | Interferon-gamma release assay        |
| LTBI     | Latent TB infection                   |
| QFT-GIT  | QuantiFERON-TB Gold in-Tube           |
| QFT-Plus | QuantiFERON-TB Gold Plus              |
| pTBred   | Spanish Pediatric TB Research Network |
| TST      | Tuberculin skin test                  |
| TB       | Tuberculosis                          |

From the <sup>1</sup>Malalties Infeccioses i Resposta Inflammatòria Sistèmica en Pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain; <sup>3</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; <sup>4</sup>Pediatrics Department, Hospital Severo Ochoa, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, and <sup>6</sup>Health Research Institute IdiPAZ, Hospital La Paz, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Red de Investigación Transaccional en Infectología Pediátrica, RITIP, Madrid, Spain; <sup>8</sup>Pediatrics Department, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain; <sup>9</sup>Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain; <sup>10</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain; <sup>11</sup>Servei de Pediatría, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Althaia, Manresa, Spain; <sup>12</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; <sup>13</sup>Atenció Primària, Fundació Assistencial Mútua Terrassa, Terrassa, Spain; <sup>14</sup>Unitat de Salut Internacional, Departament de Pediatría, Fundació Recerca Mútua Terrassa, Atenció Primària, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Terrassa, Spain; <sup>15</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; <sup>16</sup>Pediatrics Department, Hospital de Getafe, Madrid, Spain; <sup>17</sup>Servei de Pediatría, Hospital Universitari Amal de Vilanova, Lleida, Spain; <sup>18</sup>Department of Pediatric Infectious Diseases & Immunology, Evelina London Children's Hospital, Guy's and St. Thomas NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; <sup>19</sup>Department of Infection, Immunity and Inflammation, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, London, United Kingdom; <sup>20</sup>Department of Pediatrics, University of Melbourne, Parkville, Australia; <sup>21</sup>Departament de Pediatría, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; and <sup>22</sup>CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Madrid, Spain

\*Contributed equally.

†List of additional members of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network is available at [www.jpeds.com](http://www.jpeds.com) (Appendix).

Supported by "Subvencions per a la Intensificació de Facultatius Especialistes" (Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Programa PERIS 2016-2020) (SLT008/18/00193 [to A.N.-J.]). M.T. has received QuantiFERON assays at reduced pricing or free of charge for TB diagnostics projects from the manufacturer (Cellestis/Qiagen) in the past, and has received support for conference attendance from Cepheid. The manufacturers had no influence on the study design, data collection, analysis or interpretation, writing of the manuscript or decision to submit the data for publication. The other authors declare no conflicts of interest.

0022-3476/\$ - see front matter. © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2020.02.025>

## Methods

We performed a cross-sectional study within the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred),<sup>7</sup> which includes 83 participating centers. Patients <18 years of age diagnosed with TB are eligible for inclusion in the pTBred database. Data are collected using Research Electronic Data Capture electronic data capture tools, hosted at Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. Approval for pTBred was obtained from the Hospital Carlos III Madrid Ethics Committee (ref.P13/12). Informed consent was obtained from parents/guardians at inclusion. By June 2019, 741 patients with TB disease had been included in the pTBred database.

For this study, patients included from September 2016 to June 2019 in whom QFT-Plus tests had been performed at initial diagnosis were eligible. All QFT-Plus assays were performed in fully accredited diagnostic laboratories at each participating institution, and their results interpreted according to manufacturer's instructions ([www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English\\_QFTPlus\\_ELISA\\_R04\\_022016.pdf](http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English_QFTPlus_ELISA_R04_022016.pdf)). In brief, QFT-Plus results were classified as positive (ie, TB1-nil and/or TB2-nil  $\geq 0.35$  IU/mL), negative or indeterminate; where available, quantitative background-corrected antigen responses were also collected.

In pTBred, the diagnosis of TB disease is based on epidemiologic, clinical, radiologic, and microbiologic findings according to consensus criteria published elsewhere.<sup>8</sup> Cases are classified as microbiologically confirmed (ie, by culture or molecular tests) or probable TB, and disease severity is categorized as per established criteria.<sup>9</sup> TSTs were performed by intradermal injection of 2 tuberculin-units of purified protein derivative (PPD RT23; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark), with results read after 48-72 hours. The cut-offs for a positive TST result were based on national guidelines:  $\geq 5$  mm induration in children assessed for clinically or radiologically suspected TB and children with TB contact;  $\geq 10$  mm in children undergoing new-entrant screening. Other variables collected were age, sex, bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination history, comorbidities, hemoglobin levels, lymphocyte counts, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate at presentation.

Data are reported as proportions with 95% CIs or medians with IQR. Sensitivity was calculated based on the proportion of positive QFT-Plus results; indeterminate results were considered negative for this analysis. Total percentage agreement and Cohen kappa coefficient ( $\kappa$ ) were used to quantify concordance between TST and QFT-Plus results; indeterminate QFT-Plus results were excluded from this analysis. Statistical analyses were performed using SPSS v 24 (IBM, Armond, New York), with statistical significance defined as a *P* value of <.05.

## Results

During the study period, 168 children diagnosed with TB disease were included in the pTBred database; 158 had QFT-Plus results:

131 were positive (82.9%), 25 negative (15.8%), and 2 indeterminate (1.3%, both because of insufficient mitogen responses) (Table I). The median age was 5.3 (IQR 2.4-11.6) years. Most patients had been born in Spain (73.4%) and were BCG-unvaccinated (73.4%). Nine (5.7%) had significant comorbidities: Down syndrome (*n* = 3), malnutrition (*n* = 2) and acute lymphoblastic leukemia, Crohn's disease, STAT-1 deficiency, and auto-immune thrombocytopenia (*n* = 1, each). The main reasons for assessment were clinically or radiologically suspected TB (53.8%) and contact tracing (40.5%). Seventy-eight (49.4%) children were tested for HIV-infection; all had negative results. Most patients (75.3%) had isolated intra-thoracic disease (Table II). Almost one-half (46.8%) were microbiologically confirmed.

The overall sensitivity of QFT-Plus was 82.9% (77.0%-88.8%). The assay sensitivity was  $\geq 75\%$  in all subgroups analyzed (Table I), except for the subgroup of patients with negative TST results (44.0% [23.1%-65.9%]). QFT-Plus sensitivity was not significantly affected by sex, BCG vaccination, reason for TB screening, TB disease location and severity, or microbiologic confirmation (78.4% in confirmed and 86.9% in unconfirmed cases; *P* = .079). However, the analyses showed that the assay had lower sensitivity in children <5 years of age than in older children (78.7% vs 86.7%), although this was not statistically significant. No significant differences were observed in hemoglobin, lymphocyte count, or inflammatory marker levels between patients with positive and those with negative QFT-Plus results (data not shown).

TSTs were performed in 146 patients, and the result was positive in 121 (82.9% [76.7%-89.1%]). In this subgroup, 11 (7.5%) patients had a TST+/QFT- and 11 (7.5%) a TST-/QFT+ discordant result constellation. Concordance between QFT-Plus and TST was moderate (84.3%,  $\kappa$  = 0.454), and BCG vaccination status did not have a significant impact on concordance (BCG nonvaccinated patients: 82.4%,  $\kappa$  = 0.448 vs BCG-vaccinated patients: 91.3%,  $\kappa$  = 0.465; *P* = .478). In the subgroup of BCG-vaccinated cases (*n* = 27), 22 (81.5%) had intrathoracic disease and 5 (18.5%) extrathoracic disease, and 16 (59.3%) of those cases were microbiologically-confirmed.

Concordance between qualitative TB1 and TB2 results was very good (96.9%,  $\kappa$  = 0.894). Quantitative results were available for 105 of 131 patients with positive QFT-Plus results. In 101 cases, both TB1-nil and TB2-nil were positive, and only 1 of the 2 tubes produced a positive result in 4 patients (TB1-nil positive vs TB2-nil positive, *n* = 2 each). Median TB1-nil and TB2-nil concentrations were similar (4.60 [2.42-7.79] and 4.90 [2.39-8.13] IU/mL respectively; *P* = .451) and correlated strongly (*r* = 0.923; *P* < .001). There were no significant associations between the magnitude of background-corrected antigen responses and age, sex, BCG vaccination status, reason for assessment, TST result, disease site or severity, microbiological confirmation status, or levels of hemoglobin, lymphocyte count, C-reactive protein, and erythrocyte sedimentation rate (data not shown).



**Table I.** QFT-Plus assay results in correlation to clinical characteristics, TST results, and microbiological results in the 158 children with TB disease included in the study population

| Characteristics                        | Total number* | Positive QFT-Plus | Negative QFT-Plus | Indeterminate QFT-Plus | Sensitivity, % (95% CI) | P value† |
|--|---------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|----------|
|  | n = 158       | n = 131           | n = 25            | n = 2                  | 82.9 (77.0-88.8)        |          |
| Age                                    |               |                   |                   |                        |                         | .389     |
| <5 y                                   | 75 (47.0)     | 59 (78.7)         | 15 (20.0)         | 1 (1.3)                | 78.7 (69.2-88.2)        |          |
| ≥5 y                                   | 83 (53.0)     | 72 (86.7)         | 10 (12.0)         | 1 (1.3)                | 86.7 (79.3-94.2)        |          |
| Sex                                    |               |                   |                   |                        |                         | .769     |
| Female                                 | 80 (50.6)     | 68 (85.0)         | 11 (13.7)         | 1 (1.3)                | 85.0 (77.0-93.0)        |          |
| Male                                   | 78 (49.4)     | 63 (80.8)         | 14 (17.9)         | 1 (1.3)                | 80.7 (71.8-89.7)        |          |
| BCG vaccination status                 |               |                   |                   |                        |                         | .220     |
| Nonvaccinated                          | 116 (73.4)    | 93 (80.1)         | 22 (19.0)         | 1 (0.9)                | 80.2 (72.8-87.5)        |          |
| Vaccinated                             | 27 (17.1)     | 23 (85.2)         | 3 (11.1)          | 1 (3.7)                | 85.2 (70.9-99.5)        |          |
| Unknown                                | 15 (9.5)      | 15 (100)          | 0 (0)             | 0 (0)                  | 100 (79.6-100)          |          |
| Reason for TB assessment               |               |                   |                   |                        |                         | .093     |
| Contact tracing                        | 64 (40.5)     | 48 (75.0)         | 15 (23.4)         | 1 (1.6)                | 75.0 (64.1-85.9)        |          |
| Clinically/radiologically suspected TB | 85 (53.8)     | 75 (88.2)         | 10 (11.8)         | 0 (0)                  | 88.2 (81.2-95.2)        |          |
| New-entrant screening                  | 9 (5.7)       | 8 (88.9)          | 0 (0)             | 1 (11.1)               | 88.9 (63.3-100)         |          |
| Tuberculin skin test                   |               |                   |                   |                        |                         | <.001    |
| Negative                               | 25 (15.8)     | 11 (44.0)         | 13 (52.0)         | 1 (4.0)                | 44.0 (23.1-64.9)        |          |
| Positive                               | 121 (76.6)    | 109 (90.1)        | 11 (9.1)          | 1 (0.8)                | 90.1 (84.7-95.5)        |          |
| Not done                               | 12 (7.6)      | 11 (91.7)         | 1 (8.3)           | 0 (0)                  | 91.7 (73.3-100)         |          |
| Disease site <sup>§</sup>              |               |                   |                   |                        |                         | .185     |
| Only intrathoracic disease             | 119 (75.3)    | 95 (79.8)         | 22 (18.5)         | 2 (1.7)                | 79.8 (72.5-87.2)        |          |
| Extra- +/- intrathoracic disease       | 39 (24.7)     | 36 (92.3)         | 3 (7.7)           | 0 (0)                  | 92.3 (83.6-100)         |          |
| Disease severity <sup>§</sup>          |               |                   |                   |                        |                         | .231     |
| Nonsevere                              | 102 (64.5)    | 81 (79.4)         | 19 (18.6)         | 2 (2.0)                | 79.4 (70.6-86.1)        |          |
| Severe                                 | 51 (32.3)     | 45 (88.2)         | 6 (11.8)          | 0 (0)                  | 88.2 (76.6-94.5)        |          |
| Unknown                                | 5 (3.2)       | 5 (100)           | 0 (0)             | 0 (0)                  | 100 (56.6-100)          |          |
| Microbiological confirmation           |               |                   |                   |                        |                         | .079     |
| No                                     | 84 (53.2)     | 73 (86.9)         | 9 (10.7)          | 2 (2.4)                | 86.9 (79.5-94.3)        |          |
| Yes                                    | 74 (46.8)     | 58 (78.4)         | 16 (21.6)         | 0 (0)                  | 78.4 (68.8-88.0)        |          |

All data are expressed as numbers and percentages, except where stated otherwise.

\*Percentage in this column refers to proportion of patients in each subgroup.

†P values based on  $\chi^2$  tests comparing data from 2 or more subgroups.

## Discussion

This large study on the performance of QFT-Plus assays in children and adolescents with TB disease showed sensitivity of QFT-Plus assay of 82.9%, highlighting that approximately 1 in 5 children with TB have a false-negative test result when

this assay is used as an adjunctive test. Importantly, this shows that in the context of TB disease, the new generation assay does not perform better than previous generation QFT assays, which had a pooled sensitivity of 83% in a well-designed meta-analysis that included data from 31 pediatric studies.<sup>2</sup> Our results are in accordance with head-to-

**Table II.** Comparison of QFT-Plus assay performance according to disease site, severity of disease (classified according to criteria proposed by Wiseman et al<sup>9</sup>) and microbiological confirmation status in the 158 children with TB disease included in the study population

| Site of disease                 | n (%)*         | Severe disease† | Microbiological confirmation† | Positive QFT-Plus result‡ |
|---------------------------------|----------------|-----------------|-------------------------------|---------------------------|
| Intra-thoracic                  |                |                 |                               |                           |
| Ghon focus                      | 17 (14.3)      | 6 (35.3)        | 3 (17.6)                      | 13 (76.5)                 |
| Ghon complex                    | 77 (64.7)      | 18 (23.4)       | 37 (48.1)                     | 58 (75.3)                 |
| Adult type disease              | 4 (3.4)        | 3 (75.0)        | 2 (50.0)                      | 4 (100)                   |
| Pleural disease                 | 5 (4.2)        | 0 (0.0)         | 2 (40.0)                      | 4 (80.0)                  |
| Pleural and parenchymal disease | 10 (8.4)       | 2 (20.0)        | 6 (60.0)                      | 10 (100)                  |
| Cardiac disease                 | 1 (0.8)        | 1 (100)         | 1 (100)                       | 1 (100)                   |
| Not specified                   | 5 (4.2)        | Not specified   | 2 (40)                        | 5 (100)                   |
| Total                           | 119/158 (75.3) | 30 (25.2)       | 52 (43.7)                     | 95 (79.8)                 |
| Extrathoracic                   |                |                 |                               |                           |
| Peripheral lymphadenitis        | 20 (51.3)      | 2 (10.0)        | 12 (60.0)                     | 18 (90.0)                 |
| Abdominal disease               | 7 (17.9)       | 7 (100)         | 3 (42.9)                      | 6 (85.7)                  |
| Bone and joint disease          | 4 (10.3)       | 4 (100)         | 1 (25.0)                      | 4 (100)                   |
| Brain disease                   | 7 (17.9)       | 7 (100)         | 4 (57.1)                      | 7 (100)                   |
| Bone & joint and brain disease  | 1 (2.6)        | 1 (100)         | 1 (100)                       | 1 (100)                   |
| Total                           | 39/158 (24.7)  | 21 (53.9)       | 21 (53.9)                     | 36 (92.3)                 |

All data are expressed as numbers and percentages.

\*Percentages in this column refer to subgroups according to intrathoracic and extrathoracic disease.

†Percentages in these columns refer to subgroups according to site of disease.

head studies in adults, which also have not observed improved sensitivity.<sup>10,11</sup> Our data also show that the second, newly added TB2 tube only identifies a very small proportion of additional cases that do not show positive responses in the TB1 tube (2 out of 158 patients; 1.3%).

Two studies investigated the performance of QFT-Plus assays in children.<sup>5,6</sup> One retrospective study from Vietnam, which only included 33 patients with confirmed TB disease, reported the sensitivity of the assay was only 54% in this subgroup.<sup>5</sup> In a study from Eswatini, which compared QFT-Plus and QFT-GIT assays and only included 12 children with TB disease, the sensitivity of both assays was only 42%, although, importantly, several patients had HIV-infection with low CD4+ lymphocyte counts.<sup>6</sup>

In our cohort, the concordance between TST and QFT-Plus results was only moderate, and the sensitivity of the QFT-Plus was lowest in patients with a negative TST result. Importantly, the sensitivities of the QFT-Plus assay and TST were identical, and equal proportions had TST+/QFT- or TST-/QFT+ result discordance, combined observed in 14% of the study population. This observation lends further weight to the common pediatric practice of performing both a TST and an IGRA in parallel in patients with suspected TB disease.<sup>3</sup>

We did not identify any definitive factors impacting significantly on the performance of QFT-Plus assays. Unexpectedly, assay sensitivity was higher in patients with unconfirmed disease (vs those with microbiologically confirmed disease) and also in cases with extra-thoracic disease (vs those with intrathoracic disease). Our data also indicate that the assays may have lower sensitivity in children <5 years of age than in older children (78.7% vs 86.7%). However, none of the comparisons between subgroups were statistically significant, potentially because of the comparatively small size of those subgroups. Future studies should specifically investigate whether age impacts on the performance of QFT-Plus assays, as some previous studies, including our own, have shown that QFT-GIT performance is impaired in young children.<sup>12</sup>

Our study has some limitations. In Spain, malnutrition and HIV-infection are rare and our results, therefore, may not be applicable to high TB-burden settings where these conditions are common. Furthermore, microbiologic confirmation was only obtained in approximately one-half of the cases, reflecting the difficulties in achieving confirmation in children. Because only patients with TB disease were included, we were unable to determine the specificity of the QFT-Plus assay in uninfected children or performance in patients with LTBI. Finally, we did not include other IGRAs in the study, precluding direct comparisons with those assays.

Our results suggest QFT-Plus assays do not perform better than the previous generation QFT-GIT assays as an adjunctive test for the diagnosis of TB in children and adolescents in a low TB-burden setting. Considering that approximately

1 in 5 patients had a false-negative QFT-Plus result, the assay cannot be used as a rule-out test. Further studies investigating the impact of age on assay performance in greater detail are warranted. ■

Submitted for publication Dec 16, 2019; last revision received Jan 27, 2020; accepted Feb 12, 2020.

Reprint requests: Antoni Noguera-Julian, MD, PhD, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues, Spain. E-mail: ton@sjdhospitalbarcelona.org

## Data Statement

Data sharing statement available at [www.jpeds.com](http://www.jpeds.com).

## References

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. WHO 2019. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Accessed December 1, 2019.
2. Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselning AC, Benedetti A, Menzies D. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:1018-32.
3. Tebruegge M, Ritz N, Curtis N, Shingadia D. Diagnostic tests for childhood tuberculosis: Past imperfect, present tense and future perfect? *Pediatr Infect Dis J* 2015;34:1014-9.
4. Tebruegge M, Ritz N, Koetz K, Noguera-Julian A, Seddon JA, Welch SB, et al. Availability and use of molecular microbiological and immunological tests for the diagnosis of tuberculosis in Europe. *PLoS One* 2014;9:e99129.
5. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, Nguyen H, Doan H, Pham N, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One* 2019;14:e0213304.
6. Kay AW, DiNardo AR, Dlamini Q, Kahari J, Mndzebele T, Mtetwa G, et al. Evaluation of the QuantiFERON-Tuberculosis gold plus assay in children with tuberculosis disease or following household exposure to tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg* 2019;100:540-3.
7. Prieto LM, Santiago B, Del Rosal T, Carazo B, Jiménez AB, Pérez-Gorricho B, et al. Linezolid-containing treatment regimens for tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J* 2019;38:263-7.
8. Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, Browning R, Cardenas V, Casenghi M, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostics in children: 1. Proposed clinical case definitions for classification of intrathoracic tuberculosis disease. Consensus from an expert panel. *J Infect Dis* 2012;205:S199-208.
9. Wiseman CA, Gie RP, Starke JR, Schaaf HS, Donald PR, Cotton MF, et al. A proposed comprehensive classification of tuberculosis disease severity in children. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:347-52.
10. Horne DJ, Jones BE, Kamada A, Fukushima K, Winthrop KL, Siegel SAR, et al. Multicenter study of QuantiFERON®-TB Gold Plus in patients with active tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2018;22:617-21.
11. Yi L, Sasaki Y, Nagai H, Ishikawa S, Takamori M, Sakashita K, et al. Evaluation of QuantiFERON-TB Gold Plus for detection of mycobacterium tuberculosis infection in Japan. *Sci Rep* 2016;6:30617.
12. Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Latorre I, Altet N, Domínguez J, Fortuny C, et al. Performance of tuberculin skin tests and interferon- $\gamma$  release assays in children younger than 5 years. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37:1235-41.

## Appendix

List of additional members of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred)

Elena Colino; Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria; Las Palmas de Gran Canaria, Spain.

David Gómez-Pastrana; Hospital Jerez de la Frontera; Jerez de la Frontera, Spain.

Maria Montero and Estrella Peromingo; Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, Spain.

Matilde Bustillo; Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain.

Elisenda Moliner; Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain.

Marina Fenoy, Marta Velásquez and Maria Queralt Soler; Hospital de Terrassa, Terrassa, Spain.

Lourdes GARCÍA; Hospital de Mataró, Mataró, Spain.

Olga Calavia; Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain.

Neus Rius and Maria Teresa Pascual; Hospital Sant Joan, Reus, Spain.

Pere Soler-Palacín and Teresa Tórtola; Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Miguel Lillo; Hospital de Albacete, Albacete, Spain.

Marta Dapena; Hospital de Castelló, Castelló de la Plana, Spain.

Eva María López-Medina; Hospital La Fe, Valencia, Spain.

Marta Ruiz; Hospital de Getafe, Getafe, Spain.

María del Mar Santos, Ángel Hernández and Teresa Hernández-Sanpelayo; Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

Alfredo Tagarro; Hospital Princesa Sofía, Madrid, Spain.

Ana Méndez, María José Mellado, Fernando Baquero-Artigao, Talía Sainz and Miluca García-Hortelano; Hospital La Paz, Madrid, Spain.

Javier Álvarez and Enrique Villalobos; Hospital Niño Jesús, Madrid, Spain.

María Luz García-García; Hospital Severo Ochoa, Madrid, Spain.

María Isabel Garrote; Hospital de Basurto, Bilbao, Spain.

José Javier Korta Murua and Nerea Azurmendi Gundín; Hospital de Donosti, San Sebastián, Spain.

Laia Sánchez-Torrent; Hospital de Sant Boi, Sant Boi, Spain.

Eneritz Velasco-Arnaiz and Clàudia Fortuny; Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

## 5.1.2 Resum del primer estudi

### Precisió diagnòstica del QuantiFERON-TB Gold Plus en nens i adolescents amb malaltia tuberculosa

#### Objectiu

---

- Definir la sensibilitat del QFT®-Plus en nens i adolescents amb malaltia tuberculosa en un país de baixa incidència com és Espanya.

#### Pacients i mètodes

---

- És un estudi transversal i multicèntric dins del marc de la pTBred.
- S'hi van incloure pacients menors de 18 anys amb diagnòstic de TBC a qui s'hagés realitzat el test QFT®-Plus entre el setembre de 2016 i el juny de 2019.
- Els casos es van definir en funció de la confirmació microbiològica, la localització i la gravetat de la malaltia.
- La sensibilitat es va definir com la proporció de resultats de QFT®-Plus positius d'entre el total de pacients, considerant els casos amb QFT®-Plus indeterminats com a negatius per a aquest càlcul.
- Es va calcular la concordança entre el QFT®-Plus i el PPD i entre els dos tubs reactius dels QFT®-Plus (TB1 i TB2) mitjançant l'índex  $\kappa$  de Cohen per a les dades qualitatives i amb la  $\rho$  de Spearman per a les quantitatives. Es van excloure els resultats indeterminats per a aquest càlcul.

## Resultats

---

### Dades epidemiològiques

- S'hi van incloure 158 pacients amb TBC.
- La mediana d'edat va ser de 5,3 anys (rang interquartílic [RIQ] 2,4-11,6) i un 50,6% eren de sexe femení. La majoria eren nascuts a Espanya (73,4%).
- Un 53,8% dels pacients van ser estudiats per sospita clínica o radiològica de TBC; un 40,5% per cribratge en estudi de contactes; i un 5,7% en el context de cribratge del nen migrat.

### Dades clíniques

- La TBC va ser confirmada microbiològicament en un 46,8% dels pacients.
- El 75,3% dels pacients va presentar malaltia intratoràcica, d'entre els quals 25,2% en forma de malaltia greu. Els quadres més freqüents van ser complex de Gohn (64,7% dels casos), focus de Gohn (14,3%) i vessament pleural, ja fos associat a malaltia parenquimatososa (8,4%) o aïllat (4,2%).
- El 24,7% dels pacients va presentar malaltia extratoràcica, d'entre els quals 53,9% en forma de malaltia greu. Els quadres més freqüents van ser limfadenitis perifèrica (51,3%), malaltia abdominal (17,9%), meningitis tuberculosa (17,9%) i malaltia osteoarticular (10,3%).

### Resultats del QFT®-Plus

- Del total de 158 pacients, el resultat del QFT®-Plus va ser: positiu per 131, negatiu per 25 i indeterminat per 2.
- La sensibilitat del QFT®-Plus va resultar del 82,9% (IC95% 77,0-88,8). Va ser major del 75% per a tots els subgrups de pacients avaluats, tret d'aquells amb un PPD negatiu.

- La sensibilitat del QFT®-Plus va ser major entre els pacients amb PPD positiu que entre aquells amb PPD negatiu (90,1% vs 44,0%; p-valor (p) <0,001).
- La sensibilitat del QFT®-Plus no es va veure significativament afectada per l'edat (menors de 5 anys *versus* (vs)  $\geq 5$  anys) (p=0,389), el sexe (p=0,769), l'estatus vacunal de BCG (p=0,220), el motiu d'estudi (p=0,093), la localització de la malaltia (p=0,185), la gravetat (p=0,231) ni la confirmació microbiològica (p=0,079).

#### Anàlisi de la concordança entre QFT®-Plus i el PPD i entre TB1 i TB2.

- A un total de 146 pacients se'ls va realitzar un test PPD: 121 van presentar un resultat positiu i 25 un resultat negatiu.
- La sensibilitat del PPD per a la TBC va resultar del 82,9% (IC95% 76,7-89,1).
- La concordança entre PPD i QFT®-Plus va ser moderada (84,3%,  $\kappa=0,454$ ).
- La concordança entre TB1 i TB2 va ser bona (96,9%,  $\kappa=0,894$ ).
- Es va disposar dels resultats quantitius del test en 105 dels 131 pacients amb resultat positiu del QFT®-Plus, d'entre els quals 101 van tenir tant TB1 com TB2 positius, 2 TB1 positiu amb TB2 negatiu, i 2 TB1 negatiu amb TB2 positiu. La mitjana de concentració d'IFN- $\gamma$  ([IFN- $\gamma$ ]) va ser similar entre els dos tubs (p=0,451), observant-se una correlació forta entre si (p=0,923; p<0,001).

#### **Conclusions**

---

- La sensibilitat del QFT®-Plus en un país de baixa incidència com Espanya no sembla que millori la que presentaven els tests QuantiFERON®-TB previs.
- Un de cada cinc malalts va presentar un resultat negatiu per al QFT®-Plus, de manera que el test no permet descartar la presència de malaltia.



## **5.2 Segon estudi:**

### **5.2.1 Document del segon estudi**

**QuantiFERON-TB Gold Plus assay specificity in children and adolescents with suspected tuberculosis - a multi-center cross-sectional study in Spain.**

Soler-Garcia A, Gamell A, Santiago B, Monsonís M, Cobo E, Bustillo M, Tagarro A, Pérez-Gorricho B, Espiau M, Piqueras AI, Korta-Murua JJ, Rodríguez-Molino P, Lobato Z, Pérez-Porcuna T, Tebruegge M, Noguera-Julian A.

Article publicat a:

The Pediatric Infectious Disease Journal. Setembre 2021.

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021:

1r Quartil en la categoria de Pediatria

Factor d'impacte: 3,806

*Nota: Aquest article va optar al premi de la Pediatric Infectious Disease Journal (PIDJ) atorgat per la European Society for Paediatric Infectious Diseases (ESPID).*



- and subtyping by pulsed-field gel electrophoresis. *Rev Argent Microbiol.* 2013;45:160–164.
- Durisin M, Büchner A, Lesinski-Schiedat A, et al. Cochlear implantation in children with bacterial meningitic deafness: the influence of the degree of ossification and obliteration on impedance and charge of the implant. *Cochlear Implants Int.* 2015;16:147–158.
  - van de Beek D, Cabellos C, Dzapova O, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:S37–S62.
  - Jongenburger I, Reij MW, Boer EP, et al. Actual distribution of *Cronobacter* spp. in industrial batches of powdered infant formula and consequences for performance of sampling strategies. *Int J Food Microbiol.* 2011;151:62–69.
  - Centers for Disease Control and Prevention. FDA advise against powdered formula in NICUs. *AAP News.* 2002;20:219.

**QUANTIFERON-TB GOLD PLUS ASSAY SPECIFICITY IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH SUSPECTED TUBERCULOSIS—A MULTICENTER CROSS-SECTIONAL STUDY IN SPAIN**

Aleix Soler-García, MD,\* Anna Gamell, MD, PhD,\* Begoña Santiago, MD, PhD,†‡ Manuel Monsonís, MD,§ Elvira Cobo-Vázquez, MD,† Matilde Bustillo-Alonso, MD,¶ Alfredo Tagarro, MD, PhD,‡‡\*\* Beatriz Pérez-Gorricho, MD,†† María Espiau, MD, PhD,‡‡ Ana Isabel Piqueras, MD, PhD,§§ José Javier Korta-Murua, MD, PhD,¶¶|| Paula Rodríguez-Molino, MD,\*\*\* Zulema Lobato, MD,††† Tomàs Pérez-Porcuna, MD, PhD,‡‡‡‡ Marc Tebruegge, DTM&H, MRCPCH, FHEA, MSc, MD, PhD,§§§¶¶¶|| and Antoni Noguera-Julian, MD, PhD,\*†‡‡‡‡‡‡ for the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred)‡‡‡‡‡‡

**Abstract:** In this cross-sectional study of 284 children and adolescents with clinically or radiologically suspected tuberculosis in a low-endemic country, the QuantiFERON-TB Gold Plus assay specificity, sensitivity, positive predictive value and negative predictive value were 91.5%, 87.3%, 86.4%, and 91.2%, respectively. The specificity was higher than that observed in tuberculin skin tests performed simultaneously, but similar to previous-generation interferon-gamma release assays.

**Key Words:** interferon-gamma release assay, pediatrics, tuberculin skin test, tuberculosis

Accepted for publication April 6, 2021

From the \*Infectious Diseases and Systemic Inflammatory Response in Pediatrics, Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Sant Joan de Déu Research Foundation, Barcelona, Spain; †Pediatric Infectious Diseases Unit, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain; ‡Translational Research Network in Pediatric Infectious Diseases (RITIP), Madrid, Spain; §Microbiology Department, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain; ¶Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain; ||Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastián de los Reyes, Madrid, Spain; \*\*Fundación Para la Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre, Universidad Europea de Madrid, Madrid, Spain; ††Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; ‡‡Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Vall d’Hebron Research Institute, Barcelona, Spain; §§Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain; ¶¶Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Donostia-Instituto Biodonostia, San Sebastián, Spain; |||Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, EHU-UPV, San Sebastián, Spain; \*\*\*Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain; †††Servicio de Pediatría, Hospital Sant Joan de Déu, Fundació Althaia, Manresa, Spain; ‡‡‡Atenció Primària—Unitat de Salut Internacional, Fundació Assistencial Mútua Terrassa, Fundació Recerca Mútua Terrassa, Hos-

pital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain; §§§Department of Pediatric Infectious Diseases & Immunology, Evelina London Children’s Hospital, Guy’s and St. Thomas’ NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; ¶¶¶Department of Infection, Immunity and Inflammation, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, London, United Kingdom; ||||Department of Pediatrics, University of Melbourne, Parkville, VIC, Australia; \*\*\*\*Departament de Pediatría, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ††††CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Madrid, Spain; and ‡‡‡‡The QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred) members are listed in the Appendix.

A.N.-J. was supported by “Subvencions per a la Intensificació de Facultatius Especialistes” (Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Programa PERIS 2016-2020) [SLT008/18/00193].

M.T. has received QuantiFERON assays at reduced pricing or free of charge for TB diagnostics projects from the manufacturer (Cellestis/Qiagen) in the past and has received support for conference attendance from Cepheid. The manufacturers had no influence on the study design, data collection, analysis or interpretation, writing of the manuscript, or decision to submit the data for publication. The remaining authors have no other conflicts of interest to disclose.

M.T. and A.N.-J. have contributed equally to this work.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal’s website (www.pidj.com)

Address for correspondence: Antoni Noguera-Julian, MD, PhD, Hospital Sant Joan de Déu, Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues, Spain. E-mail: ton@sjdhospitalbarcelona.org.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved. DOI: 10.1097/INF.00000000000003173

**T**uberculosis (TB) is the leading cause of death from an infectious disease worldwide.<sup>1</sup> It is estimated that around 1.1 million children develop TB annually.<sup>1</sup> In children, microbiologic confirmation is difficult to achieve due to the paucibacillary nature of TB in this age group and the difficulties in obtaining sputum.<sup>2</sup> Therefore, TB diagnosis in children is often based on a combination of clinical and radiologic findings, epidemiologic risk factors and a positive tuberculin skin test (TST) or interferon-gamma release assay (IGRA) result.<sup>2</sup>

IGRAs are immunoassays that rely on the detection of interferon-gamma produced by T cells following stimulation with relatively TB-specific peptides.<sup>2</sup> In Europe QuantiFERON-TB assays (Cellestis/Qiagen, Hilden, Germany) are more widely used than T-SPOT.TB assays (Oxford Immunotec, Abingdon, United Kingdom).<sup>3</sup> In 2017, the QuantiFERON-TB Gold Plus assay (QFT-Plus) was launched, replacing the previous-generation QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-GIT) assay. QFT-Plus uses 2 antigen tubes: TB1—intended to primarily induce CD4+ T-cell response—contains ESAT-6 and CFP-10 antigens that were also part of the QFT-GIT, but in contrast to the previous-generation assay lacks TB7.7; TB2 is a new tube that contains additional short peptides—aimed at eliciting CD8+ T-cell responses—which are claimed to be more pronounced in recent infection (compared with remote infection) and to potentially reflect TB exposure intensity.<sup>4</sup>

We recently demonstrated that QFT-Plus assays do not have greater sensitivity than previous-generation QFT assays in the diagnosis of TB disease in children and adolescents.<sup>5</sup> However, data on the performance of QFT-Plus in the pediatric age group remain limited, with most studies primarily having focused on test sensitivity.<sup>5-8</sup> This study aimed to determine the specificity of QFT-Plus assays in children and adolescents with suspected TB in a low TB-burden setting.

**MATERIALS AND METHODS**

We performed a cross-sectional study within the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred), which includes 83 participating centers.<sup>5</sup> Data are collected prospectively using Red-Cap tools, hosted at Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio

Downloaded from http://pidj.com/ by guest on 10/16/2021

Marañón.<sup>9</sup> Approvals for pTBred and for the study reported here were obtained from the Hospital Carlos III Ethics Committee (Madrid, Spain; ref. P13/12) and from the Hospital Sant Joan de Déu Ethics Committee (Esplugues, Spain; ref. PIC-168-16). Informed consent was obtained from parents/guardians at inclusion.

For this study, we enrolled patients <18 years of age in whom QFT-Plus was performed due to clinically or radiologically suspected TB from September 2016 to March 2020. Patients with a previous history of TB disease or latent TB infection (LTBI) were excluded. All QFT-Plus assays were performed in fully accredited diagnostic laboratories at each participating institution, and their results were interpreted according to manufacturer's instructions. In brief, QFT-Plus results were classified as positive (i.e., TB1-nil and TB2-nil  $\geq 0.35$  IU/mL), negative or indeterminate. TSTs were performed by intradermal injection of 2 tuberculin-units of purified protein derivative (PPD RT23; Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark), with results read after 48–72 hours by specifically trained nurses. According to national guidelines, a 5-mm induration cutoff was used to define a positive test result, irrespective of BCG vaccination status.

Patients were categorized according to their final diagnosis as “TB” or “not TB.” In pTBred, the diagnosis of TB disease is based on epidemiologic, clinical, radiologic, and microbiologic features according to criteria published elsewhere.<sup>10</sup> TB disease was further categorized as microbiologically confirmed or unconfirmed and as intrathoracic or extrathoracic according to established consensus definitions.<sup>11</sup>

Data are reported as proportions with 95% confidence intervals (CI; using binomial exact calculation) or medians with interquartile ranges (IQR). Test specificity was calculated based on the proportion of negative QFT-Plus results in patients classified as “not TB.” Total percentage agreement and Cohen kappa coefficient ( $\kappa$ ) were used to quantify concordance between TST and QFT-Plus results. Indeterminate QFT-Plus results were excluded from these analyses. Statistical analyses were performed using SPSS (V24; IBM, Armond, NY), with statistical significance defined as a 2-tailed *P* value <0.05.

**RESULTS**

During the study period, QFT-Plus was performed in 286 children with clinical or radiologic suspicion of TB. Two patients were excluded due to a previous history of TB. Of the 284 remaining

patients, 102 (35.9%) were diagnosed with TB, while 182 (64.1%) had an alternative diagnosis (i.e., “not TB”; Table 1).

Of the 102 TB cases (50 [49.0%] females, median age: 8.5 [IQR: 1.9–12.5] years), 89 (87.3%) had positive QFT-Plus results; the remaining 13 (12.7%) had negative results (no indeterminate results), corresponding to a test sensitivity of 87.3% (95% CI: 79.2–93.0). Detailed data on disease phenotypes and test performance are shown in Table (Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/INF/E387>).

Of the 182 “not TB” cases (93 [51.1%] females, median age: 7.0 [IQR: 3.2–12.8] years), 14 (7.7%) had positive QFT-Plus results (see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/E388>), 17 (9.3%) had indeterminate results, and the remaining 151 cases (83.0%) had negative results. Seventy-three (40.1%) had a thoracic disease focus, while 109 (59.9%) had extrathoracic disease (see Table, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/INF/E388>). The most common final diagnoses were community-acquired pneumonia (n=46), selflimiting cervical lymphadenitis (n=30), nontuberculous mycobacteria (NTM) lymphadenitis (n=17), and selflimiting fever (n=15).

The overall specificity of QFT-Plus for TB disease was 91.5% (95% CI: 86.2–95.3%), having excluded indeterminate results. The assay specificity was  $\geq 85\%$  in all subgroups analyzed (Table 1), except in TST-positive patients (79.3% [95% CI: 60.3–92.0%]), in whom specificity was significantly lower than in TST-negative patients (95.6% [95% CI: 88.9–98.8%]; *P*=0.025). The positive and negative predictive values of the assay were 86.4% (95% CI: 78.3–92.4%) and 92.1% (95% CI: 86.8–95.7%), respectively.

Of the 14 “not TB” patients with a positive QFT-Plus result (see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/E388>), 8 had risk factors for TB infection (born in or travel to high TB-burden country, n=6; contact with TB patient, n=2), and were therefore deemed to have LTBI. In 4 patients with initial borderline-positive QFT-Plus results, repeat testing yielded negative results, indicating the initial result had been false positive.

TSTs were performed in 128 “not TB” patients; 30 (23.4%) had positive and 98 (76.6%) negative results. Therefore, TST had significantly lower specificity (76.6% [68.3%–83.6%]) than QFT-Plus (*P*<0.001). Concordance between both tests was weak (77.1%,  $\kappa$ =0.208). Of the 23 (19.5%) patients with a TST-positive/QFT-Plus-negative result constellation, 8 were BCG-vaccinated; 8 had clinical features consistent with NTM lymphadenitis (3 subsequently microbiologically confirmed; all 8 recovered without

**TABLE 1.** QFT-Plus Assay Results in Relation to Clinical Characteristics and Tuberculin Skin Test Results in the 182 Children With Final Classification of “not TB”

| Characteristics, n (%)      |               | Total      | Negative QFT-Plus | Positive QFT-Plus | Indeterminate QFT-Plus | Specificity, % (95% CI) | <i>P</i> |
|-----------------------------|---------------|------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|----------|
|                             |               | n = 182    | n = 151           | n = 14            | n = 17                 | 91.5 (86.2–95.3)        |          |
| Age                         | <5 yrs        | 113 (62.1) | 94 (83.2)         | 11 (9.7)          | 8 (7.1)                | 89.5 (82.0–94.7)        | 0.224    |
|                             | $\geq 5$ yrs  | 69 (37.9)  | 57 (82.6)         | 3 (4.3)           | 9 (13.1)               | 95.0 (86.1–99.0)        |          |
| Sex                         | Female        | 93 (51.1)  | 82 (88.2)         | 8 (8.6)           | 3 (3.2)                | 91.1 (83.2–96.1)        | 0.838    |
|                             | Male          | 89 (48.9)  | 69 (77.5)         | 6 (6.8)           | 14 (15.7)              | 92.0 (83.4–97.0)        |          |
| BCG vaccination status      | Nonvaccinated | 138 (75.8) | 115 (83.3)        | 8 (5.8)           | 15 (10.9)              | 93.5 (87.6–97.2)        | 0.263    |
|                             | Vaccinated    | 25 (13.8)  | 21 (84.0)         | 3 (12.0)          | 1 (4.0)                | 87.5 (67.6–97.3)        |          |
|                             | Unknown*      | 19 (10.4)  | 15 (78.9)         | 3 (15.8)          | 1 (5.3)                | 83.3 (58.9–96.4)        |          |
| Disease focus               | Thoracic      | 73 (40.1)  | 58 (79.5)         | 4 (5.5)           | 11 (15.0)              | 93.6 (84.3–98.2)        | 0.467    |
|                             | Nonthoracic   | 109 (59.9) | 93 (85.3)         | 10 (9.2)          | 6 (5.5)                | 90.3 (82.8–95.3)        |          |
| Tuberculin skin test result | Negative      | 98 (53.8)  | 85 (86.7)         | 4 (4.1)           | 9 (9.2)                | 95.6 (88.9–98.8)        | 0.025    |
|                             | Positive      | 30 (16.5)  | 23 (76.7)         | 6 (20.0)          | 1 (3.3)                | 79.3 (60.3–92.0)        |          |
|                             | Not done*     | 54 (29.7)  | 43 (79.6)         | 4 (7.4)           | 7 (13.0)               | 91.5 (79.6–97.6)        |          |

Indeterminate assay results were excluded in the calculation of specificity estimates.

\*Excluded from calculation of corresponding *P* value.

BCG indicates bacillus Calmette-Guérin vaccine; n, number.



TB treatment); 5 had epidemiologic risk factors for LTBI; in the remaining 2 cases, no potential explanation for the positive TST result was found. Four patients (3.4%) had a TST-negative/QFT-Plus-positive result constellation (patients 10–13; see Table, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/INF/E388>). Only 1 of those (patient 10) had risk factors for LTBI; a repeat QFT-Plus assay in this patient produced a negative result. QFT-Plus result conversion was also observed in 2 of the remaining 3 patients.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is one of the largest studies evaluating the specificity of QFT-Plus assays in children and adolescents with suspected TB disease. The key strength of this study lies in the use of a control group with a broad spectrum of alternative diagnoses, thereby reflecting clinical practice. Most previous studies investigating the specificity of previous-generation IGRAs (i.e., QFT-GIT and T-SPOT.TB assays) in children had significant limitations. Studies focusing on LTBI were hampered by the lack of a gold standard for LTBI, and often made broad assumptions concerning TST/IGRA result discordance. Fewer studies focused on children with suspected TB disease, based on suggestive clinical features and radiologic findings, but many of those were constrained by the small number of pediatric TB cases included.<sup>12</sup>

The specificity of the QFT-Plus assay has been broadly evaluated in adults. A large meta-analysis including more than 2700 patients estimated the assay specificity to be as high as 96%.<sup>13</sup> However, adult data cannot directly be extrapolated to children, given that previous studies, including our own, have shown that IGRAs perform less well in young children than in adults.<sup>14,15</sup>

Despite QFT-Plus assays having been introduced in 2016, pediatric data on assay specificity remain scarce. One recently published study from Italy, which included 43 children with suspected TB disease, estimated the assay specificity to be 90.1%, which aligns well with the estimate of 91.5% in our study.<sup>8</sup> However, the aforementioned study only included 12 children with TB disease, limiting the precision of its estimates. The negative predictive value of the assay was 92.1% in our study. In low-burden settings, such as Spain, these figures translate into about 1 in 10 patients with an alternative diagnosis having a positive QFT-Plus result. The latter may be due to either coincidental LTBI or a false-positive test result. We found that most patients in the “not TB” group with borderline interferon-gamma levels in TB1 or TB2 antigen tubes converted to negative results on repeat testing. In patients with an alternative diagnosis and repeatedly positive QFT-Plus results, potential risk factors for LTBI should be sought and chemoprophylaxis be considered.

Our data suggest that the QFT-Plus assay has significantly greater specificity for TB disease than the TST.<sup>12</sup> This likely results from the former using 2 well-defined mycobacterial antigens, which are absent from all known BCG vaccine strains and most NTM species, to elicit T-cell responses.<sup>2</sup> In contrast, the TST test substance, PPD, contains a broad array of mycobacterial antigens that are also expressed by BCG and NTM, resulting in potential confounding in BCG-vaccinated individuals and patients with NTM infection.<sup>2</sup> This hypothesis is further supported by the observation that most children in our study with a TST-positive/QFT-Plus-negative result constellation either had previously been vaccinated with BCG or had probable or confirmed NTM lymphadenitis.

Our study has a number of limitations. First, several patients in the “not TB” control group did not have a histologically or microbiologically confirmed alternative diagnosis.

Additionally, a small number of patients in the “not TB” group had positive QFT-Plus results, and—due to the presence of significant risk factors—were deemed to have incidental LTBI, which cannot be proven in the absence of a gold standard for LTBI. Finally, we did not collect data on the precise timing between QFT-Plus and TST. Potential boosting of IGRA responses resulting from prior TST administration has previously been hypothesized<sup>16</sup>; however, we have subsequently demonstrated that this does not occur.<sup>17,18</sup>

In summary, our data show that in children with suspected TB the specificity of the QFT-Plus assay is greater than 90%, similar to previous-generation IGRAs. In our study, the QFT-Plus assay had significantly higher specificity than the TST. However, a small proportion of patients without TB disease had false-positive QFT-Plus assay results, which converted to negative results on repeat testing. Therefore, while a positive QFT-Plus result in children presenting with clinical or radiologic features of TB lends substantial support to a putative diagnosis of TB, it does not rule out an alternative diagnosis.

## REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis report 2018. WHO 2019. Available at: [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/). Accessed January 10, 2021.
2. Tebruegge M, Ritz N, Curtis N, et al. Diagnostic Tests for childhood tuberculosis: past imperfect, present tense and future perfect? *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34:1014–1019.
3. Tebruegge M, Ritz N, Koetz K, et al. Availability and use of molecular microbiological and immunological tests for the diagnosis of tuberculosis in Europe. *PLoS One*. 2014;9:e99129.
4. Barcellini L, Borroni E, Brown J, et al. First evaluation of QuantiFERON-TB gold plus performance in contact screening. *Eur Respir J*. 2016;48:1411–1419.
5. Soler-Garcia A, Gamell A, Santiago B, et al.; QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred). Diagnostic accuracy of QuantiFERON-TB gold plus assays in children and adolescents with tuberculosis disease. *J Pediatr*. 2020;223:212–215.e1.
6. Kay AW, DiNardo AR, Dlamini Q, et al. Evaluation of the QuantiFERON-tuberculosis gold plus assay in children with tuberculosis disease or following household exposure to tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100:540–543.
7. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One*. 2019;14:e0213304.
8. Buonsenso D, Delogu G, Perricone C, et al. Accuracy of QuantiFERON-TB gold plus test for diagnosis of mycobacterium tuberculosis infection in children. *J Clin Microbiol*. 2020;58:e00272–e00220.
9. Harris PA, Taylor R, Thielke R, et al. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform*. 2009;42:377–381.
10. Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostics in children: 1. Proposed clinical case definitions for classification of intrathoracic tuberculosis disease. Consensus from an expert panel. *J Infect Dis*. 2012;205(suppl 2):S199–S208.
11. Wiseman CA, Gie RP, Starke JR, et al. A proposed comprehensive classification of tuberculosis disease severity in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2012;31:347–352.
12. Laurenti P, Raponi M, de Waure C, et al. Performance of interferon- $\gamma$  release assays in the diagnosis of confirmed active tuberculosis in immunocompetent children: a new systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2016;16:131.
13. Pourakbari B, Mamishi S, Benvari S, et al. Comparison of the QuantiFERON-TB gold plus and QuantiFERON-TB gold in-tube interferon- $\gamma$  release assays: a systematic review and meta-analysis. *Adv Med Sci*. 2019;64:437–443.
14. Velasco-Armaiz E, Soriano-Aranda A, Latorre I, et al. Performance of tuberculin skin tests and interferon- $\gamma$  release assays in children younger than 5 years. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37:1235–1241.

15. Tebruegge M, de Graaf H, Sukhtankar P, et al. Extremes of age are associated with indeterminate QuantiFERON-TB gold assay results. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2694–2697.
16. Leyten EM, Prins C, Bossink AW, et al. Effect of tuberculin skin testing on a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma assay. *Eur Respir J*. 2007;29:1212–1216.
17. Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Espiau M, et al. Impact of baseline tuberculin skin test and isoniazid chemoprophylaxis on subsequent interferon-TB gold in-tube performance in young children assessed after tuberculosis contact in Catalonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39:e22–e25.
18. Ritz N, Yau C, Connell TG, et al. Absence of interferon-gamma release assay conversion following tuberculin skin testing. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15:767–769.

#### APPENDIX: QFT-PLUS STUDY GROUP OF THE SPANISH PEDIATRIC TB RESEARCH NETWORK (PTBRED)

Olga Calavia, Rebeca Lahoz (Servei de Pediatria, Hospital Universitari Joan XXIII, Tarragona, Spain); Teresa Vallmanya (Servei de Pediatria, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain); María-Isabel Garrote-Llanos (Sección de Infectología Pediátrica, Hospital Universitario Basurto, Bilbao, Vizcaya, España; Departamento de Pediatria, Universidad del País Vasco, UPV/EHU, Bilbao, Vizcaya, España); María Montero, Estrella Peromingo-Matute (Unidad de Pediatria y sus áreas específicas, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz, España); Queralt Soler-Campins, Marta Velázquez, Marina Fenoy (Servicio de Pediatria, Consorci Sanitari de Terrassa, Terrassa, Barcelona, España); Beatriz Soto-Sánchez, Marta Ruiz, Sara Guillén (Pediatrics Department, Hospital de Getafe, Madrid, Spain); Elena Colino, Saro Quintana (Pediatrics Department, Complejo Hospitalario Universitario Insular-Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain); Cristina Calvo, María Luz García-García (Pediatrics Department, Hospital Severo Ochoa, Madrid, Spain); Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain; Health Research Institute IdiPAZ, Hospital La Paz, Madrid, Spain; Red de Investigación Translacional en Infectología Pediátrica, RITIP, Madrid, Spain); Nerea Azurmendi Gundiñ (Servicio de Pediatria, Hospital Universitario Donostia-Instituto BioDonostia, San Sebastián, Guipúzcoa, España); Departamento de Pediatria, Facultad de Medicina, EHU-UPV, San Sebastián, Guipúzcoa, España); Pere Soler-Palacín, Andrea Martín-Nalda (Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain); María Teresa Tórtola (Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain); Antoni Soriano-Arandes (Paediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain); Eva María López-Medina (Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, Spain); María del Mar Santos, Ángel Hernández, Teresa Hernández-Sampelayo (Pediatric Infectious Diseases Unit, Gregorio Marañón Hospital, Madrid, Spain); Ana Méndez-Echevarría, María José Mellado, Fernando Baquero-Artigao, Talía Sainz (Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, Hospital La Paz, Madrid, Spain); Milagros García Hortelano (Department of Pediatrics, Hospital Carlos III, Madrid, Spain); Javier Álvarez, Enrique Villalobos (Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain); Inés Gale (Unidad de Enfermedades Infecciosas, Servicio de Pediatria, Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain); Miguel Lillo (Pediatric Oncology, Hospital General Universitario de Albacete, Albacete, Spain); Marta Dapena (Department of Pediatrics, Hospital General de Castelló, Infectious

Diseases Unit, Castelló); David Gómez-Pastrana (Neumología Pediátrica, Servicio de Pediatria, Hospital Universitario Jerez de la Frontera, Cádiz, Spain); Elisenda Moliner (Neonatology Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain); Lourdes García (Pediatrics, Consorci Sanitari del Maresme, Mataró, Spain); Neus Rius, María Teresa Pascual (Pediatrics, Hospital Universitari Sant Joan de Reus, Reus, Spain); Laia Sánchez-Torrent (Pediatrics, Parc Sanitari Sant Joan de Déu, Sant Boi de Llobregat, Spain); and Eneritz Velasco-Arnaiz, Clàudia Fortuny, Miguel Lanaspá (Malalties Infeccioses i Resposta Inflamatòria Sistèmica en Pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain).

#### RESPIRATORY PATHOGEN DETECTION IN CHILDREN: SALIVA AS A DIAGNOSTIC SPECIMEN

Emma M. de Koff, MD, MSc,\*†‡ Sjoerd M. Euser, PhD,‡  
Paul Badoux, BSc,‡ Judith Sluiter-Post, MSc,\*  
Dirk Eggink, PhD,§ Elisabeth A. M. Sanders, MD, PhD,†§  
and Marlies A. van Houten, MD, PhD\*¶

**Abstract:** We compared pathogen detection between saliva, nasopharyngeal and oropharyngeal swabs in children with respiratory symptoms. The sensitivity in nasopharyngeal swabs was 93% (95% confidence interval [CI]: 78%–98%), in oropharyngeal swabs 79% (95% CI: 60%–90%), in saliva overall 76% (95% CI: 58%–88%) and in 18 saliva samples collected with drooling or sponges, 94% (95% CI: 74%–99%). Saliva could be a relevant specimen alternative.

**Key Words:** respiratory pathogens, saliva, diagnostics, pediatrics

Accepted for publication April 21, 2021

From the \*Spaarne Academy, Spaarne Gasthuis, Hoofddorp and Haarlem, The Netherlands; †Department of Pediatric Immunology and Infectious Diseases, Wilhelmina Children's Hospital, University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands; ‡Regional Public Health Laboratory Kennemerland, Haarlem, The Netherlands; §Center for Infectious Disease Control, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands; and ¶Department of Pediatrics, Spaarne Gasthuis, Hoofddorp and Haarlem, The Netherlands.

This work was funded by the Spaarne Gasthuis Hoofddorp and Haarlem and the Regional Public Health Laboratory Kennemerland Haarlem. No external funding was received.

M.A.v.H. has received grants from Pfizer unrelated to this work. The other authors have no conflicts of interest to disclose.

E.M.d.K., S.M.E., E.A.M.S. and M.A.v.H. were involved in the conception and design of the study. E.M.d.K., P.B. and M.A.v.H. were involved in acquisition of the data. E.M.d.K., S.M.E. and M.A.v.H. analyzed the data and drafted the manuscript. All authors interpreted the data, critically revised the article for intellectual content and approved the final version to be submitted.

Address for correspondence: Marlies A. van Houten, MD, PhD, Department of Pediatrics, Spaarne Gasthuis, Spaarnepoort 1, 2134 TM Hoofddorp, The Netherlands. E-mail: mvanhouten2@spaarneghasthuis.nl.

Copyright © 2021 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.  
DOI: 10.1097/INF.0000000000003191

**R**espiratory infections are the most common cause of illness in childhood, and may be caused by various viral and bacterial pathogens.<sup>1</sup> Accurate and timely identification of pathogens causing infectious diseases is important to guide treatment and infection control precautions, which is highlighted by the current SARS-CoV-2 pandemic. Multiplex polymerase chain reaction (PCR) of nasopharyngeal swabs (NPS) and oropharyngeal swabs (OPS) is widely applied for respiratory pathogen detection. However, particularly for children, NPS and OPS collection holds disadvantages, as the procedure is uncomfortable and may be experienced as painful, induces sneezing or coughing, and requires a trained health care worker to obtain a high-quality sample. Saliva collection causes

**Supplementary Table 2.** Disease phenotypes, disease severity and QFT-Plus results in the 102 children with tuberculosis disease. In pTBred, the diagnosis of tuberculosis disease was based on epidemiological, clinical, radiological, and microbiological features according to published criteria.<sup>10</sup> Tuberculosis was further categorized as microbiologically-confirmed or unconfirmed, and as intrathoracic or extrathoracic according to established consensus definitions.<sup>11</sup>

|                              | Site of disease          | Number (percentage)* | Severe disease** | Microbiological confirmation** | Positive QFT-Plus result** | Sensitivity (95% CI)    |
|------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|
| <b>Intrathoracic disease</b> | Ghon focus               | 13 (20.3)            | 6 (46.2)         | 9 (69.2)                       | 12 (92.3)                  | 92.3 (64.0-99.8)        |
|                              | Ghon complex             | 22 (34.4)            | 7 (31.8)         | 11 (50.0)                      | 16 (72.7)                  | 72.7 (49.8-89.3)        |
|                              | Adult-type disease       | 4 (6.3)              | 4 (100)          | 4 (100)                        | 4 (100)                    | 100 (39.8-100)          |
|                              | Pleural                  | 5 (7.8)              | 0 (0.0)          | 1 (20.0)                       | 3 (60.0)                   | 60.0 (14.7-94.7)        |
|                              | Pleural and parenchymal  | 14 (21.9)            | 4 (28.6)         | 8 (57.1)                       | 14 (100)                   | 100 (76.8-100)          |
|                              | Pericardial              | 1 (1.5)              | 1 (100)          | 0 (0)                          | 1 (100)                    | 100 (2.5-100)           |
|                              | Not specified            | 5 (7.8)              | Not specified    | 3 (60.0)                       | 4 (80.0)                   | 80.0 (28.4-99.5)        |
| <b>Total</b>                 | <b>64/102 (62.7)</b>     | <b>22 (34.4)</b>     | <b>36 (56.3)</b> | <b>54 (84.4)</b>               | <b>84.4 (73.1-92.2)</b>    |                         |
| <b>Extrathoracic disease</b> | Peripheral lymphadenitis | 18 (47.4)            | 0 (0)            | 14 (77.8)                      | 15 (83.3)                  | 83.3 (58.6-96.4)        |
|                              | Abdominal                | 6 (15.8)             | 6 (100)          | 5 (83.3)                       | 6 (100)                    | 100 (54.1-100)          |
|                              | Osteoarticular           | 6 (15.8)             | 6 (100)          | 4 (66.7)                       | 6 (100)                    | 100 (54.1-100)          |
|                              | Central nervous system   | 8 (21.0)             | 8 (100)          | 7 (87.5)                       | 8 (100)                    | 100 (63.1-100)          |
|                              | <b>Total</b>             | <b>38/102 (37.3)</b> | <b>20 (52.6)</b> | <b>30 (78.9)</b>               | <b>35 (92.1)</b>           | <b>92.1 (78.6-98.3)</b> |

\* Percentages in this column refer to subgroups according to intrathoracic and extrathoracic disease.

\*\* Percentages in these columns refer to subgroups according to the site of disease.



**Supplementary Table 3.** Characteristics of the 14 patients with final classification of ‘not TB’ who had positive QFT-Plus results.

| Pt | Age (years) | Sex | BCG status | Risk factors for TB  | Reason for TB testing               | QFT-Plus result <sup>a</sup> | TST (mm) | Other investigations   | Final diagnosis <sup>b</sup>  |
|----|-------------|-----|------------|--|-------------------------------------|------------------------------|----------|--|---|
| 1  | 12.0        | M   | nk         | Born in Morocco; travel to Morocco and drinking unprocessed milk | Cervical and axillary lymphadenitis | not available                | 20       | Necrotizing granulomatous pattern in node biopsy. PCR positive for <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , negative cultures. Normal chest X-ray.   | <i>Mycobacterium mucogenicum</i> lymphadenitis + incidentally diagnosed LTBI        |
| 2  | 16.0        | M   | nk         | Born in Morocco  | Hemoptysis                          | 3.40/5.05                    | 15       | Normal pulmonary CT scan and bronchoscopy.   | Self-limiting hemoptysis + incidentally diagnosed LTBI                              |
| 3  | 10.3        | F   | Yes        | None   | Persistent fever and cough          | 0.22/0.55                    | 15       | Pulmonary CT scan showed unspecific, small nodular lesion in left upper lobe.  | Self-limiting fever with incidental pulmonary node + incidentally diagnosed LTBI    |
| 4  | 11.2        | F   | No         | Prolonged stay in Morocco  | Cervical lymphadenitis              | 6.62/6.62                    | 23       | Anterior mediastinal mass in pulmonary CT scan. Biopsy consistent with Hodgkin's lymphoma.   | Hodgkin's lymphoma + incidentally diagnosed LTBI                                    |
| 5  | 16.7        | M   | nk         | Born in Ivory Cost   | Prolonged low-grade fever           | 6.10/6.82                    | ND       | Normal chest x-ray.  | Self-limiting fever + incidentally diagnosed LTBI                                   |
| 6  | 17.4        | M   | Yes        | Born in Guinea   | Cough, low-grade fever and asthenia | 0.27/0.75                    | ND       | Normal chest x-ray and pulmonary CT scan.  | Self-limiting respiratory tract infection + incidentally diagnosed LTBI             |
| 7  | 13.6        | M   | No         | Close contact with smear-positive TB case                        | Traumatic elbow arthritis           | 3.15/4.85                    | 22       | Normal chest X-ray; arthritis cured with non-steroidal anti-inflammatory drugs   | Traumatic elbow arthritis + incidentally diagnosed LTBI                             |
| 8  | 15.7        | M   | Yes        | Close contact with smear-positive index case                     | Bilateral progressive panuveitis    | 3.67/4.04                    | ND       | Also positive T-SPOT.TB assay. No response to antituberculous treatment; good response to corticosteroids. Normal chest x-ray.   | Autoimmune uveitis + incidentally diagnosed LTBI                                    |
| 9  | 13.6        | M   | No         | None   | Sacroiliitis                        | 6.01/4.68                    | 25       | Sacroiliitis resolved with non-steroidal anti-inflammatory drugs alone. Normal chest x-ray.  | Idiopathic sacroiliitis + incidentally diagnosed LTBI                               |
| 10 | 11.7        | F   | No         | Annual travel to Morocco   | Avascular peripheral retinopathy    | 0.52/0                       | 0        | Repeat QFT-Plus 1 month later: negative. No etiology identified.   | Avascular peripheral retinopathy of unknown origin + false positive QFT-Plus result |
| 11 | 8.7         | F   | No         | None   | Limp and fever                      | 0.30/0.64                    | 0        | Repeat QFT-Plus 2 weeks later: negative. MRI identified a benign bone tumour in the left acetabulum. Normal chest x-ray.   | Benign bone tumor + false positive QFT-Plus result                                  |
| 12 | 1.0         | F   | No         | None   | Cervical lymphadenitis              | 1.27/0.01                    | 0        | Repeat QFT-Plus 1 month later: negative. Ultrasound scan consistent with reactive lymphadenitis. Normal chest x-ray.   | Self-limiting cervical lymphadenitis + false positive QFT-Plus result               |
| 13 | 0.8         | M   | No         | None   | Recurrent pneumonia                 | not available                | 0        | Pulmonary CT scan and fbronchoscopy showed left main bronchus stenosis. Normal immune work-up. BAL cultures identified <i>Pseudomonas</i> , <i>Haemophilus</i> , <i>Klebsiella</i> and <i>Moraxella</i> (mycobacterial cultures negative). | Recurrent pneumonias due to airway malformation + false positive QFT-Plus result    |
| 14 | 1.3         | F   | No         | None   | Fever without a focus               | 0.23/0.38                    | ND       | Repeat QFT-Plus 2 weeks later: negative. Amastigotes on microscopy and positive PCR for <i>Leishmania</i> on bone marrow. Normal chest x-ray.  | Visceral leishmaniosis + false positive QFT-Plus result                             |

<sup>a</sup>TB1 minus nil / TB2 minus nil, in IU/mL

<sup>b</sup>Interpretation of tuberculosis immunodiagnostic test results (as LTBI or false-positive test result) was done by the treating physician.

Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; BCG, bacillus Calmette-Guérin vaccine; CT, computerized tomography; F, female; M, male; MRI, magnetic resonance imaging; ND, not done; NK, not known; PCR, polymerase chain reaction; Pt, patient number; QFT-Plus, QuantiFERON-Plus; TB, tuberculosis; TST, tuberculin skin test.

**Supplementary Table 4.** Disease phenotype, QFT-Plus results and final diagnoses in 182 children with final classification of ‘not TB’.

| Site of disease | Symptom/sign that prompted testing for TB                         | QFT-Plus result (%) |                |                  | Final diagnosis (no. of indeterminate QFT-Plus results)  |
|-----------------|---|---------------------|----------------|------------------|--|
|                 |   | Negative            | Positive       | Indeterminate    |  |
| Thoracic        | Clinical signs of pneumonia and/or radiological infiltrates, n=58 | 45 (77.6)           | 2 (3.5)        | 11 (18.9)        | CAP resolving with antibiotics (no organism identified), n=30 (2)<br>Bacteriologically-confirmed CAP, n=8 (3)<br>Self-limiting CAP, n=8 (1)<br>Aspergillosis in patients with medullar aplasia, n=2 (2)<br>Self-limiting hilar lymphadenopathy, n=3<br>Pneumonia and meningitis caused by <i>S. pneumoniae</i> , n=1 (1)<br><i>Empyema</i> caused by <i>S. aureus</i> , n=1 (1)<br>Cystic adenomatoid malformation, n=1 (1)<br>Pulmonary echinococcosis, n=1<br>Sarcoidosis, n=1<br>Endotracheal sarcoma, n=1<br>Bronchial stenosis, n=1 |
|                 | Prolonged cough, n=7  | 6 (85.7)            | 1 (14.3)       | 0 (0.0)          | Self-limiting cough, n=3<br>Asthma, n=3<br>Chronic idiopathic cough, n=1   |
|                 | Pericardial effusion, n=3   | 3 (100)             | 0 (0.0)        | 0 (0.0)          | Viral pericarditis/myocarditis, n=3  |
|                 | Hemoptysis, n=3   | 2 (66.7)            | 1 (33.3)       | 0 (0.0)          | Self-limiting hemoptysis, n=2<br>Autoimmune hepatitis and alveolar hemorrhage, n=1   |
|                 | Chest pain, n=1   | 1 (100.0)           | 0 (0.0)        | 0 (0.0)          | Sickle cell disease, n=1   |
|                 | Dysphonia n=1   | 1 (100)             | 0 (0.0)        | 0 (0.0)          | Laryngeal papillomatosis, n=1  |
|                 | <b>Total n=73</b>   | <b>58 (79.5)</b>    | <b>4 (5.5)</b> | <b>11 (15.0)</b> |  |
| Extrathoracic   | Cervical mass, n=65   | 58 (89.2)           | 3 (4.6)        | 4 (6.2)          | Self-limiting cervical lymphadenitis, n=30 (2)<br>Lymphadenitis that resolved with antibiotics, n=5 (1)<br>Probable NTM lymphadenitis, n=12<br>Microbiologically-confirmed bacterial lymphadenitis, n=6 (1)<br>Confirmed NTM lymphadenitis, n=5<br>Hodgkin’s lymphoma, n=3   |

|  |                  |                 |                |  |   |
|--|------------------|-----------------|----------------|--|---|
|  |                  |                 |                |  | Epstein-Barr virus infection, n=1<br>Castleman’s disease, n=1<br>Mastoiditis, n=1<br>Odontogenic cyst, n=1  |
| Fever or constitutional syndrome, n=23 | 20 (87.0)        | 2 (8.7)         | 1 (4.3)        |  | Self-limiting fever, n=15<br>PFAPA syndrome, n=2<br>Abdominal lymphatic malformation, n=1 (1)<br>Visceral leishmaniosis, n=1<br>Newly diagnosed type 1 diabetes, n=1<br>SAPHO syndrome, n=1<br>Acute hepatic failure, n=1<br>Renal abscess, n=1 |
| Osteoarticular disease, n=8            | 5 (62.5)         | 3 (37.2)        | 0 (0.0)        |  | Self-limiting arthritis, n= 4<br>Discitis resolving without antibiotics, n=1<br>Benign bone tumor, n=1<br>Psoriatic arthritis, n=1<br>Traumatic arthritis, n=1  |
| Skin lesions, n=4                      | 4 (100)          | 0 (0.0)         | 0 (0.0)        |  | Biopsy-proven panniculitis, n=2<br>Erythema nodosum, n=2  |
| Ocular disease, n=3                    | 1 (33.3)         | 2 (66.7)        | 0 (0.0)        |  | Autoimmune uveitis, n=1<br>Erdheim-Chester disease (histiocytosis), n=1<br>Idiopathic avascular retina, n=1   |
| Gastrointestinal symptoms, n=2         | 2 (100)          | 0 (0.0)         | 0 (0.0)        |  | Acute pancreatitis, n=1<br>Self-limiting diarrhea, n=1  |
| Axillary lymphadenitis, n=1            | 1 (100)          | 0 (0.0)         | 0 (0.0)        |  | BCGitis, n=1  |
| Pancytopenia, n=1                      | 1 (100)          | 0 (0.0)         | 0 (0.0)        |  | Medullar aplasia, n=1   |
| Ataxia n=1                             | 1 (100)          | 0 (0.0)         | 0 (0.0)        |  | Acute disseminated encephalomyelitis, n=1   |
| Chronic otorrhoea n=1                  | 0 (0.0)          | 0 (0.0)         | 1 (100)        |  | Bacterial otitis externa, n=1 (1)   |
| <b>Total n=109</b>                     | <b>93 (85.3)</b> | <b>10 (9.2)</b> | <b>6 (5.5)</b> |  |   |

Abbreviations: CAP, community-acquired pneumonia; n, number; NTM, non-tuberculous mycobacteria



## 5.2.2 Resum del segon estudi

### Especificitat del test QuantiFERON-TB Gold Plus en nens i adolescents amb sospita de tuberculosi – estudi transversal prospectiu a Espanya.

#### Objectiu

---

- Definir l'especificitat del QFT®-Plus en nens i adolescents amb sospita de malaltia tuberculosa en un país de baixa incidència com és Espanya.

#### Pacients i mètodes

---

- És un estudi transversal i multicèntric dins del marc de la pTBred.
- S'hi van incloure pacients menors de 18 anys a qui s'hagués realitzat un test QFT®-Plus per sospita clínica o radiològica de TBC, entre el setembre de 2016 i el març de 2020.
- Es va classificar els pacients en 'no-TBC' o 'TBC', en funció de si es va arribar a un diagnòstic alternatiu que justificués la clínica que va motivar la realització del QFT®-Plus (no-TBC) o bé si l'evolució del pacient va confirmar la sospita inicial de malaltia tuberculosa (TBC).
- L'especificitat del test es va definir com la proporció de resultats de QFT®-Plus negatius d'entre el total de pacients classificats com a 'no-TBC'. Els pacients amb un resultat indeterminat per al test van ser exclosos d'aquest càlcul.
- Es va calcular la concordança (mitjançant l'índex  $\kappa$  de Cohen) entre el QFT®-Plus i el PPD. Els tests amb resultat indeterminat van ser exclosos d'aquest càlcul.

## Resultats

---

### Característiques de la població estudiada

- Es van incloure 284 pacients, 102 classificats com a 'TBC' i 182 com a 'no-TBC'.
- Els pacients 'TBC' tenien una edat mediana de 8,5 anys (RIQ 1,9-12,5) i un 49,0% eren de sexe femení.
- Els pacients classificats com a 'no-TBC' tenien una edat mediana de 7,0 anys (RIQ 3,2-12,8) i un 51,1% eren de sexe femení.

### Resultats del QFT®-Plus i càlcul de l'especificitat

- Dels 182 pacients 'no-TBC', 14 van presentar un resultat positiu per al QFT®-Plus, 151 un resultat negatiu i 17 un resultat indeterminat.
- L'especificitat del QFT®-Plus va ser 91,5% (IC95% 86,2-95,3). Va ser major del 85% per a tots els subgrups de pacients avaluats tret d'aquells amb un resultat positiu per al PPD.
- El valor predictiu negatiu del test va ser de 92,1% (IC95% 86,8-95,7); i el valor predictiu positiu, de 86,4% (IC95% 78,3-92,4).
- L'especificitat del QFT®-Plus entre els pacients amb PPD negatiu va ser major que entre aquells amb PPD positiu (95,6% vs 79,3%;  $p=0,025$ ).
- L'especificitat del QFT®-Plus no es va veure afectada per l'edat (menors de 5 anys vs  $\geq 5$  anys) ( $p=0,224$ ), el sexe ( $p=0,838$ ), l'estatus vacunal de BCG ( $p=0,263$ ) o la localització de la malaltia sospitada ( $p=0,467$ ).
- Els 14 pacients 'no-TBC' amb QFT®-Plus positiu van rebre diagnòstics alternatius que justificaven la clínica per la qual van ser estudiats. D'aquests 14 pacients, 9 van rebre a més el diagnòstic addicional d'ITBL, ja fos en base a un PPD positiu o a l'antecedent d'un factor de risc d'ITBL.

### Anàlisi de la concordança entre QFT®-Plus i el PPD

- A 128 pacients 'no-TBC' se'ls va realitzar un test PPD, 30 van presentar un resultat positiu i 98 un resultat negatiu.
- L'especificitat del PPD per a la TBC va ser del 76,6% (IC95% 68,3-83,6), menor que la del QFT®-Plus ( $p < 0,001$ ).
- La concordança entre el PPD i el QFT®-Plus va ser feble (77,1%,  $\kappa = 0,208$ ).
- Dels 182 pacients 'no-TBC', 23 van presentar un resultat positiu per al PPD i negatiu per al QFT®-Plus. D'aquests, 8 havien rebut la vacuna BCG, 8 van ser diagnosticats de limfadenitis per micobacteris no-tuberculosos i 5 tenien factors de risc d'ITBL.

### Dades clíniques dels pacients amb diagnòstic alternatiu a TBC

- Els diagnòstics finals més freqüent van ser el de pneumònia adquirida a la comunitat (46 casos) i limfadenitis cervical autolimitada o amb bona resposta a antibioteràpia convencional (41 casos).

### **Conclusions**

---

- L'especificitat del QFT®-Plus per a pacients pediàtrics amb sospita de malaltia tuberculosa és major del 90%, similar a la presentada pels tests QuantiFERON®-TB previs.
- L'especificitat del QFT®-Plus va ser significativament més elevada que la del PPD.
- Malgrat que un resultat positiu del QFT®-Plus en un pacient amb sospita clínica o radiològica dona suport al diagnòstic de tuberculosi, no permet excloure altres diagnòstics alternatius.

## **5.3 Tercer estudi:**

### **5.3.1 Document del tercer estudi**

**Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus assays in children and adolescents  
at risk of tuberculosis: a cross-sectional multicentre study**

Soler-Garcia A, Gamell A, Pérez-Porcuna T, Soriano-Arandes A, Santiago B, Tórtola T,  
Ruiz-Serrano MJ, Korta-Murua JJ, Bustillo-Alonso M, Garrote-Llanos MI, Rodríguez-  
Molino P, Piqueras AI, Tagarro A, Monsonís M, Tebruegge M, Noguera-Julian A.

Article publicat a:

Thorax. Desembre 2021.

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021:

1r Quartil en la categoria de Sistema Respiratori.

Factor d'impacte: 9,250.

Original research

# Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus assays in children and adolescents at risk of tuberculosis: a cross-sectional multicentre study

Aleix Soler-García,<sup>1</sup> Anna Gamell,<sup>1</sup> Tomàs Pérez-Porcuna,<sup>2,3</sup> Antonio Soriano-Arandes,<sup>4</sup> Begoña Santiago,<sup>5</sup> Teresa Tórtola,<sup>6</sup> María Jesús Ruiz-Serrano,<sup>7</sup> José Javier Korta Murua,<sup>8,9</sup> Matilde Bustillo-Alonso,<sup>10</sup> María Isabel Garrote-Llanos,<sup>11</sup> Paula Rodríguez-Molino,<sup>12</sup> Ana Isabel Piqueras,<sup>13</sup> Alfredo Tagarro,<sup>14,15,16</sup> Manuel Monsonís,<sup>17</sup> Marc Tebruegge,<sup>18,19</sup> Antoni Noguera-Julian,<sup>1,16,20,21</sup> On behalf of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network

► Additional supplemental material is published online only. To view, please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-217592>).

For numbered affiliations see end of article.

**Correspondence to**  
Dr Antoni Noguera-Julian, Malalties Infeccioses i Resposta Inflamatorià Sistèmica en Pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, 08950 Barcelona, Spain; [ton@sjdhospitalbarcelona.org](mailto:ton@sjdhospitalbarcelona.org)

MT and AN-J are joint senior authors.

Received 6 May 2021  
Accepted 6 November 2021



© Author(s) (or their employer(s)) 2021. No commercial re-use. See rights and permissions. Published by BMJ.

**To cite:** Soler-García A, Gamell A, Pérez-Porcuna T, et al. *Thorax* Epub ahead of print: [please include Day Month Year]. doi:10.1136/thoraxjnl-2021-217592

## ABSTRACT

**Introduction** The QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) assay, which features two antigen-stimulated tubes (TB1 and TB2) instead of a single tube used in previous-generation interferon-gamma release assays (IGRAs), was launched in 2016. Despite this, data regarding the assay's performance in the paediatric setting remain scarce. This study aimed to determine the performance of QFT-Plus in a large cohort of children and adolescents at risk of tuberculosis (TB) in a low-burden setting.

**Methods** Cross-sectional, multicentre study at healthcare institutions participating in the Spanish Paediatric TB Research Network, including patients <18 years who had a QFT-Plus performed between September 2016 and June 2020.

**Results** Of 1726 patients (52.8% male, median age: 8.4 years), 260 (15.1%) underwent testing during contact tracing, 288 (16.7%) on clinical/radiological suspicion of tuberculosis disease (TBD), 649 (37.6%) during new-entrant migrant screening and 529 (30.6%) prior to initiation of immunosuppressive treatment. Overall, the sensitivity of QFT-Plus for TBD (n=189) and for latent tuberculosis infection (LTBI, n=195) was 83.6% and 68.2%, respectively. The agreement between QFT-Plus TB1 and TB2 antigen tubes was excellent (98.9%,  $\kappa=0.961$ ). Only five (2.5%) patients with TBD had discordance between TB1 and TB2 results (TB1+/TB2-, n=2; TB1-/TB2+, n=3). Indeterminate assay results (n=54, 3.1%) were associated with young age, lymphopenia and elevated C reactive protein concentrations.

**Conclusions** Our non-comparative study indicates that QFT-Plus does not have greater sensitivity than previous-generation IGRAs in children in both TBD and LTBI. In TBD, the addition of the second antigen tube, TB2, does not enhance the assay's performance substantially.

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from an infectious disease worldwide.<sup>1,2</sup> It is estimated that 1.1 million children develop tuberculosis disease (TBD) annually.<sup>2,3</sup> In paediatric patients, microbiological confirmation of TBD is difficult to

## Key messages

### What is the key question?

► Does QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) perform better than previous interferon-gamma release assays (IGRAs) in children and adolescents at risk of tuberculosis (TB) in a low-endemic setting?

### What is the bottom line?

► QFT-Plus performed very similarly to previous IGRAs, and the second antigen tube did not significantly increase the assay sensitivity in the diagnosis of active TB.

### Why read on?

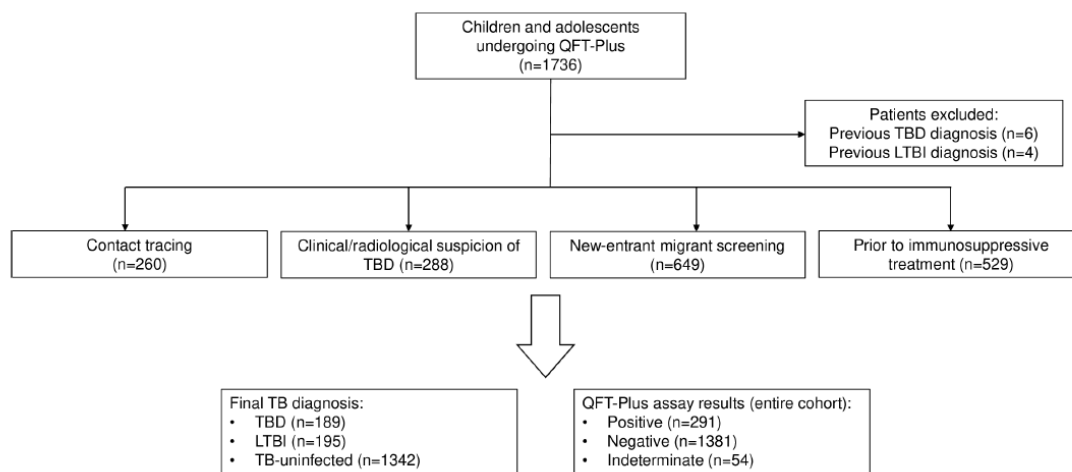
► We report the findings of the currently largest multicentre study on the performance of QFT-Plus in 1726 children and adolescents investigated for TB infection in Spain.

achieve due to its paucibacillary nature and difficulties in obtaining sputum in young children.<sup>4,5</sup> Therefore, the diagnosis of TBD in children is often based on a combination of clinical and radiological findings, epidemiologic risk factors and a positive tuberculin skin test (TST) or interferon-gamma release assay (IGRA) result.<sup>6</sup>

IGRAs are in vitro immunoassays based on the detection of interferon-gamma produced by T cells in response to stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*-specific peptides.<sup>7</sup> In resource-rich countries, IGRAs are widely used for latent tuberculosis infection (LTBI) screening and as adjunctive tools in the diagnostic work-up of suspected TBD.<sup>8</sup> The main advantage of IGRAs compared with TST lies in their greater specificity, with less potential confounding by prior BCG vaccination and non-tuberculous mycobacterial infections.<sup>9</sup>

In Europe, QuantiFERON-TB assays (QFT; Cellestis/Qiagen, Hilden, Germany) are more commonly used than T-SPOT.TB assays (Oxford Immunotec, Abingdon, UK).<sup>8</sup> In 2016, the QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT-Plus) assay was

## Tuberculosis



**Figure 1** Flowchart showing the indications for TB screening, as well as QFT-Plus assay results and the final diagnoses regarding TB. LTBI, latent tuberculosis infection; QFT-Plus, QuantiFERON TB Gold Plus; TB, tuberculosis; TBD, tuberculosis disease.

launched, replacing the previous-generation QuantiFERON-TB Gold in-Tube (QFT-GIT) assay. QFT-Plus assays require an extra millilitre of blood and comprise of 4 tubes (vs three tubes in QFT-GIT): a negative-control (nil) tube, a positive-control (mitogen) tube and two antigen tubes (TB1 and TB2). TB1, intended to elicit CD4+ T-cell responses, contains the original QFT ESAT-6 and CFP-10 antigens but lacks TB7.7, which was included in QFT-GIT. TB2 is a new tube that contains the same two mycobacterial peptides and additional shorter peptides aimed at eliciting CD8+ T-cell responses.<sup>10 11</sup>

In adults, a large meta-analysis estimated the pooled sensitivity of QFT-Plus in the diagnosis of TBD to be 93%,<sup>12</sup> and head-to-head comparisons between QFT-Plus and QFT-GIT did not identify clinically relevant differences between the two assays.<sup>13 14</sup> Recent data suggest that QFT-Plus assay performance is not impaired in HIV-infected adults, but patients with immune-mediated inflammatory diseases show decreased interferon-gamma responses when compared with healthy controls.<sup>15 16</sup> However, currently data on the performance of QFT-Plus in children remain scarce, and no meta-analysis has been performed yet.<sup>17-21</sup>

We recently reported that QFT-Plus is no more sensitive or specific than previous QFT assays in children and adolescents with TBD.<sup>20 22</sup> In this study, we aimed to determine the performance of QFT-Plus in a large cohort of paediatric patients at risk of TB in a low-burden country by including children undergoing LTBI screening as part of contact tracing (CTR), migrant screening and screening prior to initiation of immunosuppressive medication.

## METHODS

We performed a cross-sectional study within the Spanish Paediatric TB Research Network (pTBred),<sup>23</sup> which currently includes 83 participating centres. Data were collected using REDCap tools, hosted at Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón in Madrid.<sup>24</sup> In Spain, the incidence of TBD has continuously been decreasing over the last 20 years. In 2019, the incidence was 9.3 cases per 100 000 persons in the general population, and 4.2 per 100 000 in children <15 years of age.<sup>25</sup> BCG vaccination has not been part of the routine immunisation

programme in Spain since 1980, except for the Basque Country, where neonatal BCG vaccination continued until 2013.

For this study, we enrolled patients <18 years of age who underwent a QFT-Plus assay at a pTBred participating centre between September 2016 and June 2020 due to any of the following indications: (1) CTR, (2) clinical or radiological suspicion of TBD (CRS), (3) new-entrant migrant screening (NMS) or (4) prior to initiation of immunosuppressive treatment (IIT). Some participating centres recruited all eligible patients consecutively, while others used convenience sampling. Patients with a previous history of TBD or LTBI were excluded from participation.

All QFT-Plus assays were performed in fully accredited diagnostic laboratories at each participating institution, and their results were interpreted according to the manufacturer's instructions.<sup>26</sup> In brief, the test result was considered positive when TB1 or TB2 antigen tube minus nil tube interferon-gamma concentrations were  $\geq 0.35$  IU/mL and  $\geq 25\%$  of the nil tube concentration; negative when they were  $< 0.35$  IU/mL; and indeterminate when the nil tube concentration was  $> 8$  IU/mL (ie, failed negative control) and/or when the mitogen tube minus nil tube concentration was  $< 0.5$  IU/mL (ie, failed positive control).

TSTs were performed by intradermal injection of two tuberculin-units of purified protein derivative (RT23; Statens Serum Institut; Copenhagen, Denmark), with results read after 48–72 hours. The cut-offs for a positive TST result were based on national guidelines:  $\geq 10$  mm induration in NMS children and  $\geq 5$  mm in all other groups, irrespective of BCG vaccination status.<sup>27</sup>

For the purpose of this study, haemoglobin concentrations and lymphocyte counts were classified as low, normal or high, as previously described.<sup>28</sup> In addition, data on C reactive protein (CRP, normal value  $< 15$  mg/L) and erythrocyte sedimentation rate (ESR, normal value  $< 15$  mm) at the time when the QFT-Plus was performed were collected if available.

Patients were categorised according to their final diagnosis regarding TB infection, as follows: (1) TB-uninfected: patients without signs or symptoms consistent with TBD and with a negative QFT-Plus and a negative TST result (if performed), (2) LTBI: patients without signs or symptoms consistent with



TBD and a positive QFT-Plus and/or positive TST result, and (3) TBD. In pTBred, the diagnosis of TBD is based on epidemiological, clinical, radiological and microbiological findings according to published consensus criteria.<sup>29</sup> independent of TST and IGRA results. TBD was further classified as (1) microbiologically confirmed or unconfirmed, (2) intrathoracic or extrathoracic, and (3) severe or non-severe, based on published consensus definitions.<sup>30</sup> Some of the TBD cases (n=158) included in the present study had been included in previous reports.<sup>20 22</sup>

Quantitative variables are reported as medians and IQRs, and categorical variables as proportions with 95% CIs. Missing data were handled with the complete case analysis method. Sensitivity was calculated based on the proportion of positive QFT-Plus results; indeterminate results were considered negative for those calculations. Bivariate analysis was performed using  $\chi^2$  and Fisher's exact tests for categorical variables, and Student t-test and analysis of variance for quantitative variables. Non-normally distributed variables were compared with Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test. Spearman rho test was used to analyse relationships between quantitative data. Binary logistic regression modelling was used for multivariate analysis to test the effect of covariates as risk factors for determinate (ie, positive or negative) versus indeterminate QFT-Plus results. The results are presented as unadjusted ORs and adjusted ORs with 95% CIs.

Total percentage agreement and Cohen kappa coefficient ( $\kappa$ ) with SE were used to quantify concordance between QFT-Plus and TST results, and between qualitative TB1 and TB2 results; patients with indeterminate results were excluded from those

analyses. Strength of agreement was defined as poor ( $\kappa \leq 0.2$ ), fair ( $0.2 < \kappa \leq 0.4$ ), moderate ( $0.4 < \kappa \leq 0.6$ ), good ( $0.6 < \kappa \leq 0.8$ ) and excellent ( $\kappa > 0.8$ ). All statistical analyses were performed using SPSS V.24, with statistical significance defined as a p value of  $< 0.05$ . Graphs were generated with SPSS and Prism V.8 (GraphPad; San Diego, California, USA).

RESULTS

Characteristics of the study population

Of an initial study population of 1736 children and adolescents, 10 patients were excluded due to a previous diagnosis of TBD (n=6) or LTBI (n=4). Therefore, the final study cohort comprised 1726 patients (52.8% male; median (IQR) age: 8.4 (4.3–12.8) years; figure 1). The indications for performing QFT-Plus were: CTR (n=260, 15.1%), CRS (n=288, 16.7%), NMS (n=649, 37.6%) and IIT (n=529, 30.6%). There was no significant difference between those four patient groups with regards to gender, patient origin and BCG vaccination status, but the age distribution and family origin differed significantly (table 1).

The majority of patients were born in Spain (n=1280, 74.2%), but fewer than one third (n=521, 30.2%) of the families were native. Among the 410 children born outside Spain, the most frequent region of origin was South America, followed by Northern Africa and Southern Asia (table 1).

Haemoglobin concentrations, lymphocyte counts, CRP and ESR values were available for 58.8%, 58.6%, 47.0% and 40.5% of the patients, respectively. Low haemoglobin concentrations

Table 1 Comparison of baseline characteristics of the study participants according to test indication

| Test indication | Contact tracing     | Clinical/radiological suspicion of TB | New-entrant screening | Immunosuppressive treatment screening* | Total      | P value     |        |
|-----------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------|--|------------|-------------|--------|
| n (%)           | 260 (15.1)          | 288 (16.7)                            | 649 (37.6)            | 529 (30.6)                             | 1726 (100) |             |        |
| Age (years)     | <5                  | 118 (45.4)                            | 107 (37.2)            | 178 (27.1)                             | 112 (21.2) | 515 (29.8)  | <0.001 |
|                 | ≥5                  | 142 (54.6)                            | 181 (62.8)            | 471 (72.6)                             | 417 (78.8) | 1211 (70.2) |        |
| Sex             | Male                | 136 (52.3)                            | 157 (54.3)            | 348 (53.6)                             | 271 (51.2) | 911 (52.8)  | 0.816  |
|                 | Female              | 123 (47.5)                            | 132 (45.7)            | 301 (46.4)                             | 258 (48.8) | 815 (47.2)  |        |
| BCG status      | Unvaccinated        | 189 (72.7)                            | 214 (74.3)            | 476 (73.4)                             | 397 (75.0) | 1276 (73.9) | 0.567  |
|                 | Vaccinated          | 53 (20.4)                             | 44 (15.3)             | 115 (17.7)                             | 91 (17.2)  | 303 (17.6)  |        |
|                 | Unknown†            | 18 (6.9)                              | 30 (10.4)             | 58 (8.9)                               | 41 (7.8)   | 147 (8.5)   |        |
| Patient origin  | Born in Spain       | 205 (78.8)                            | 209 (72.6)            | 478 (73.7)                             | 388 (73.4) | 1280 (74.2) | 0.119  |
|                 | Born outside Spain‡ | 46 (17.7)                             | 73 (25.3)             | 157 (24.2)                             | 134 (25.3) | 410 (23.8)  |        |
|                 | Unknown†            | 9 (3.5)                               | 6 (2.1)               | 14 (2.1)                               | 7 (1.3)    | 36 (2.1)    |        |
| Family origin   | Native              | 103 (39.6)                            | 108 (37.5)            | 0 (0.0)                                | 310 (58.6) | 521 (30.2)  | <0.001 |
|                 | Non-native§         | 139 (53.5)                            | 169 (58.7)            | 633 (97.5)                             | 209 (39.5) | 1150 (66.6) |        |
|                 | Unknown†            | 18 (6.9)                              | 11 (3.8)              | 16 (2.5)                               | 10 (1.9)   | 55 (3.2)    |        |
| Final diagnosis | TB-uninfected       | 95 (36.5)                             | 166 (57.6)            | 557 (85.8)                             | 524 (99.0) | 1342 (77.8) | <0.001 |
|                 | LTBI                | 84 (32.3)                             | 25 (8.7)¶             | 81 (12.5)                              | 5 (1.0)    | 195 (11.3)  |        |
|                 | TBD                 | 81 (31.2)                             | 97 (33.7)             | 11 (1.7)                               | 0 (0.0)    | 189 (11.0)  |        |

Data are shown as number (percentage), except where stated otherwise.

\*Most common diseases requiring immunosuppressive treatment comprised malignancies (n=225, 42.5%; most common diagnoses: neuroblastoma (n=53), leukaemia (n=51), central nervous system tumour (n=40) and lymphoma (n=28)); rheumatological diseases (n=129, 24.4%; mainly juvenile idiopathic arthritis (n=95)); inflammatory bowel disease (n=52, 9.8%); dermatological diseases (n=51, 9.6%; mainly atopic dermatitis (n=23) and psoriasis (n=18)); and COVID-19/multisystem inflammatory syndrome in children (n=13, 2.5%).

†Not included in the statistical analysis.

‡Patients' origins were South America (104/410, 25.4%), Northern Africa (76/410, 18.5%), Southern Asia (60/410, 14.6%), Eastern Europe (56/410, 13.7%), Sub-Saharan Africa (53/410, 12.9%), Far East (26/410, 6.3%), Western Europe (21/410, 5.1%), Middle East (13/410, 3.2%) and North America (1/410, 0.2%).

§Families' origins were Northern Africa (422/1150, 36.7%), South America (266/1150, 23.1%), Southern Asia (173/1150, 15.0%), Sub-Saharan Africa (100/1150, 8.7%), Eastern Europe (91/1150, 7.9%), Far East (49/1150, 4.3%), Western Europe (34/1150, 3.0%), Middle East (14/1150, 1.2%) and North America (1/1150, 0.1%).

¶Patients with incidental diagnosis of LTBI comprised community-acquired pneumonia (n=6); self-limiting fever (n=4); self-limiting cough (n=3); self-limiting haemoptysis (n=2); reactive lymphadenopathy (n=2); and non-tuberculous mycobacterial lymphadenitis, synovitis, Hodgkin's lymphoma, sickle-cell anaemia, bacterial otitis externa, traumatic bone fracture, autoimmune uveitis and self-limiting sacroiliitis (n=1, each).

LTBI, latent tuberculosis infection; TB, tuberculosis; TBD, tuberculosis disease.

**Tuberculosis**

**Table 2** Subgroup analysis of the sensitivity of QFT-Plus in patients with tuberculosis disease based on demographic variables, test results and disease manifestation

|                              |                                 | Total      | Positive   | Negative  | Indeterminate | Sensitivity (95% CI) | P value |
|------------------------------|---------------------------------|------------|------------|-----------|---------------|----------------------|---------|
| n (%)                        |                                 | 189 (100)  | 158 (83.6) | 29 (15.3) | 2 (1.1)       | 83.6 (77.5 to 88.6)  |         |
| Age (years)                  | <5                              | 89 (47.1)  | 72 (80.9)  | 16 (18.0) | 1 (1.1)       | 80.9 (71.2 to 88.5)  | 0.344   |
|                              | ≥5                              | 100 (52.9) | 86 (86.0)  | 13 (13.0) | 1 (1.0)       | 86.0 (77.6 to 92.1)  |         |
| Sex                          | Male                            | 94 (49.7)  | 76 (80.9)  | 17 (18.1) | 1 (1.1)       | 80.9 (71.4 to 88.2)  | 0.310   |
|                              | Female                          | 95 (50.3)  | 82 (86.3)  | 12 (12.6) | 1 (1.1)       | 86.3 (77.7 to 92.5)  |         |
| BCG status                   | Unvaccinated                    | 139 (73.5) | 115 (82.7) | 23 (16.5) | 1 (0.7)       | 82.7 (75.4 to 88.6)  | 0.596   |
|                              | Vaccinated                      | 33 (17.5)  | 26 (78.8)  | 6 (18.2)  | 1 (3.0)       | 78.8 (61.1 to 91.0)  |         |
|                              | Unknown*                        | 17 (9.0)   | 17 (100)   | 0 (0.0)   | 0 (0.0)       | 100 (80.5 to 100)    |         |
| Patient origin               | Born in Spain                   | 138 (73.0) | 115 (83.3) | 21 (15.2) | 2 (1.5)       | 83.3 (76.1 to 89.1)  | 0.913   |
|                              | Born outside Spain              | 50 (26.5)  | 42 (84.0)  | 8 (16.0)  | 0 (0.0)       | 84.0 (70.9 to 92.8)  |         |
|                              | Unknown*                        | 1 (0.5)    | 1 (100)    | 0 (0.0)   | 0 (0.0)       | 100 (2.5 to 100)     |         |
| Family origin                | Native                          | 43 (22.8)  | 39 (90.7)  | 4 (9.3)   | 0 (0.0)       | 90.7 (77.9 to 97.4)  | 0.137   |
|                              | Non-native                      | 137 (72.5) | 111 (81.0) | 24 (17.5) | 2 (1.5)       | 81.0 (73.4 to 87.2)  |         |
|                              | Unknown*                        | 9 (4.8)    | 8 (88.9)   | 1 (11.1)  | 0 (0.0)       | 88.9 (51.8 to 99.7)  |         |
| TST result                   | Negative                        | 27 (14.3)  | 11 (40.7)  | 15 (55.6) | 1 (3.7)       | 40.7 (22.4 to 61.2)  | <0.001  |
|                              | Positive                        | 146 (77.2) | 132 (90.4) | 13 (8.9)  | 1 (0.7)       | 90.4 (84.4 to 94.7)  |         |
|                              | Not done*                       | 16 (8.5)   | 15 (93.8)  | 1 (6.3)   | 0 (0.0)       | 93.8 (69.8 to 99.8)  |         |
| Test indication              | Contact tracing                 | 81 (42.9)  | 64 (79.0)  | 16 (19.8) | 1 (1.2)       | 79.0 (68.5 to 87.3)  | 0.315   |
|                              | Clinical/radiological suspicion | 97 (51.3)  | 84 (86.6)  | 13 (13.4) | 0 (0.0)       | 86.6 (78.2 to 92.7)  |         |
|                              | New-entrant migrant screening   | 11 (5.8)   | 10 (90.9)  | 0 (0.0)   | 1 (9.1)       | 90.9 (58.7 to 99.8)  |         |
| Disease location             | Intrathoracic only              | 147 (77.8) | 121 (82.3) | 24 (16.3) | 2 (1.4)       | 82.3 (75.2 to 88.1)  | 0.372   |
|                              | Extrathoracic±intrathoracic     | 42 (22.2)  | 37 (88.1)  | 5 (11.9)  | 0 (0.0)       | 88.1 (74.4 to 96.0)  |         |
| Disease severity             | Non-severe                      | 128 (67.7) | 103 (80.5) | 23 (18.0) | 2 (1.6)       | 80.5 (72.5 to 86.9)  | 0.130   |
|                              | Severe                          | 57 (30.2)  | 51 (89.5)  | 6 (10.5)  | 0 (0.0)       | 89.5 (78.5 to 96.0)  |         |
|                              | Unknown*                        | 4 (2.1)    | 4 (100)    | 0 (0.0)   | 0 (0.0)       | 100 (39.8 to 100)    |         |
| Microbiological confirmation | No                              | 108 (57.1) | 85 (78.7)  | 21 (19.4) | 2 (1.9)       | 78.7 (69.8 to 86.0)  | 0.036   |
|                              | Yes                             | 81 (42.9)  | 73 (90.1)  | 8 (9.9)   | 0 (0.0)       | 90.1 (81.5 to 95.6)  |         |

Indeterminate QFT-Plus results were considered negative for this analysis. Data are shown as number (percentage), except where stated otherwise.

\*Not included in the statistical analysis.

QFT-Plus, QuantiFERON TB Gold Plus; TST, tuberculin skin test.

were mainly observed in CRS and IIT patients, while the highest proportion of lymphopenia was observed in IIT patients (online supplemental table 1).

QFT-Plus test results were negative in 1381 (80.0%) patients, positive in 291 (16.9%), and indeterminate in 54 (3.1%). The final diagnoses were as follows: 1342 (77.8%) patients were categorised as TB-uninfected, 195 (11.3%) as LTBI and 189 (11.0%) as TBD. The highest rates of TBD were observed in CTR and CRS children; none of the IIT patients were diagnosed with TBD (table 1). The highest proportion of patients with LTBI was observed in the CTR group.

**Assay performance in patients with TBD and LTBI**

The overall sensitivity of QFT-Plus in children with TBD was 83.6% (95% CI 77.5% to 88.6%). In subgroup analyses (table 2), QFT-Plus sensitivity was significantly higher in TST-positive (90.4%, 95% CI 84.4% to 94.7%) than in TST-negative TBD cases (40.7%, 95% CI 22.4 to 61.2);  $p < 0.001$ ). Furthermore, the assay sensitivity was higher in patients with microbiologically-confirmed disease (90.1%, 95% CI 81.5% to 95.6%) than in cases with unconfirmed disease (78.7%, 95% CI 69.8% to 86.0%;  $p = 0.036$ ). No significant differences in

sensitivity were observed between patient subgroups based on disease severity and disease location. Compared with TB-uninfected patients, TBD cases were younger, more often born abroad and more commonly born to immigrant families. The latter also had significantly higher ESR values and higher rates of lymphocytosis (table 3).

The overall sensitivity of QFT-Plus in children with LTBI was 68.2% (95% CI 61.2% to 74.7%) (online supplemental table 2). The sensitivity was significantly higher in children born in Spain (76.0%, 95% CI 64.8% to 85.1%) than in those born outside Spain (57.0%, 95% CI 46.7% to 66.9%;  $p = 0.009$ ) and higher in BCG-unvaccinated children (84.2%, 95% CI 72.1% to 92.5%) than in BCG-vaccinated children (46.0%, 95% CI 35.2% to 57.0%;  $p < 0.001$ ). Compared with TB-uninfected children, patients with LTBI were older, more commonly male and more commonly BCG-vaccinated (table 3). In addition, the latter were more commonly born abroad and born to a non-native family.

**Correlation between QFT-Plus and TST results**

TSTs were performed in 1188 (68.8%) patients, of whom 296 (24.9%) had a positive result. After excluding indeterminate QFT-Plus results, the agreement between QFT-Plus and TST

Thorax: first published as 10.1136/thoraxjnl-2021-217592 on 7 December 2021. Downloaded from http://thorax.bmj.com/ on December 8, 2021 by guest. Protected by copyright.



## Tuberculosis

**Table 3** Comparison of demographic characteristics and test results between TB-uninfected children, patients with LTBI and TBD

|                                     |                    | TB-uninfected, n=1342<br>(77.8) | LTBI n=195 (11.3) | TBD n=189 (11.0) | TBD versus TB-uninfected | LTBI versus TB-uninfected |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|-------------------|------------------|--------------------------|---------------------------|
| Age (years)                         | <5                 | 403 (30.0)                      | 23 (11.8)         | 89 (47.1)        | <0.001                   | <0.001                    |
|                                     | ≥5                 | 939 (70.0)                      | 172 (88.2)        | 100 (52.9)       |                          |                           |
| Sex                                 | Male               | 687 (51.2)                      | 130 (66.7)        | 94 (49.7)        | 0.708                    | <0.001                    |
|                                     | Female             | 655 (48.8)                      | 65 (33.3)         | 95 (50.3)        |                          |                           |
| BCG status                          | Unvaccinated       | 1080 (80.5)                     | 57 (29.2)         | 139 (73.5)       | 0.106                    | <0.001                    |
|                                     | Vaccinated         | 183 (13.6)                      | 87 (44.6)         | 33 (17.5)        |                          |                           |
|                                     | Unknown*           | 79 (5.9)                        | 51 (26.2)         | 17 (9.0)         |                          |                           |
| Patient origin                      | Born in Spain      | 1067 (79.5)                     | 75 (38.5)         | 138 (73.0)       | 0.026                    | <0.001                    |
|                                     | Born outside Spain | 260 (19.4)                      | 100 (51.3)        | 50 (26.5)        |                          |                           |
|                                     | Unknown*           | 15 (1.1)                        | 20 (10.3)         | 1 (0.5)          |                          |                           |
| Family origin                       | Native             | 438 (32.6)                      | 40 (20.5)         | 43 (22.8)        | 0.012                    | 0.011                     |
|                                     | Non-native         | 883 (65.8)                      | 130 (66.7)        | 137 (72.5)       |                          |                           |
|                                     | Unknown*           | 21 (1.6)                        | 25 (12.8)         | 9 (4.8)          |                          |                           |
| QFT-Plus result                     | Negative           | 1291 (96.2)                     | 61 (31.3)         | 29 (15.3)        | <0.001                   | <0.001                    |
|                                     | Positive           | 0 (0.0)                         | 133 (68.2)        | 158 (83.6)       |                          |                           |
|                                     | Indeterminate      | 51 (3.8)                        | 1 (0.5)           | 2 (1.1)          |                          |                           |
| TST result †                        | Negative           | 853 (100)                       | 12 (7.4)          | 27 (15.6)        | <0.001                   | <0.001                    |
|                                     | Positive           | 0 (0.0)                         | 150 (92.6)        | 146 (84.4)       |                          |                           |
| Haemoglobin level                   | Low                | 219 (31.7)                      | 20 (13.8)         | 44 (24.4)        | 0.112                    | <0.001                    |
|                                     | Normal             | 441 (63.9)                      | 116 (80.0)        | 130 (72.2)       |                          |                           |
|                                     | High               | 30 (4.3)                        | 9 (6.2)           | 6 (3.3)          |                          |                           |
| Lymphocyte count                    | Low                | 103 (15.0)                      | 4 (2.8)           | 6 (3.4)          | <0.001                   | <0.001                    |
|                                     | Normal             | 502 (73.1)                      | 126 (86.9)        | 137 (76.5)       |                          |                           |
|                                     | High               | 82 (11.9)                       | 15 (10.3)         | 36 (20.1)        |                          |                           |
| C reactive protein (mg/L)           |                    | 2.4 (0.5–23.5)                  | 0.7 (0.3–3.7)     | 4.7 (1.5–37.9)   | 0.775                    | <0.001                    |
| Erythrocyte sedimentation rate (mm) |                    | 4.0 (2.0–14.0)                  | 5.0 (2.0–13.0)    | 16.0 (5.0–39.5)  | <0.001                   | 0.748                     |

Data are shown as number (percentage) or median (IQR).

\*Not included in the statistical analysis.

†TST was only performed in 853 TB-uninfected, 162 LTBI and 173 patients with TBD.

LTBI, latent tuberculosis infection; QFT-Plus, QuantIFERON TB Gold Plus; TB, tuberculosis; TBD, tuberculosis disease; TST, tuberculin skin test.

was good in the entire cohort (91.6%,  $\kappa$ (SE)=0.766 (0.022)) but only moderate in patients with TBD (86.0%,  $\kappa$ (SE)=0.472 (0.092)). TST and QFT-Plus results were concordant in only 88 (54.7%) of 161 LTBI patients, while 61 (37.9%) had TST+/QFT-Plus– discordance and 12 (7.5%) had TST-/QFT-Plus + discordance.

In patients diagnosed with TBD, the sensitivity of TST was 84.4% (95% CI 78.1% to 89.5%), very similar to the sensitivity observed with QFT-Plus (83.6%,  $p=0.837$ ). In patients with LTBI, the sensitivity of TST was 92.6% (95% CI 87.4% to 96.1%), significantly higher than that of QFT-Plus (68.2%,  $p<0.001$ ).

### QFT-Plus antigen and mitogen responses

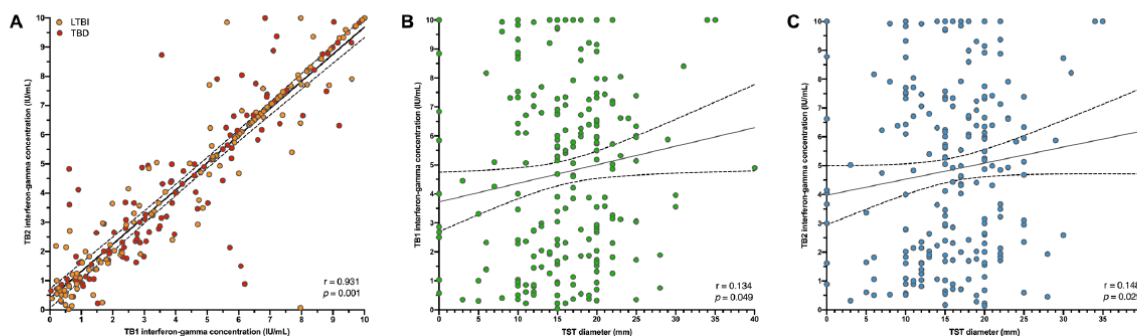
Categorical results (positive/negative) of individual QFT-Plus TB1 and TB2 antigen tubes results were available for 1666 of 1672 (99.6%) patients with a determinate QFT-Plus result (54 patients with indeterminate results excluded). Overall, the agreement of categorical results between TB1 and TB2 tubes was excellent (98.9%,  $\kappa$ (SE)=0.961 (0.009)). Among children with a positive QFT-Plus result, categorical TB1 and TB2 results were concordant in 266 (93.7%) of 284 patients. Eighteen (6.3%) children showed discordant results: 8 had a TB1+/TB2– and 10 a TB1–/TB2+ constellation. Only 5 of those 18 patients had

TBD (TB1+/TB2–,  $n=2$ ; TB1–/TB2+,  $n=3$ ) (online supplemental table 3). Sex, age, reason for assessment, BCG status and final diagnosis did not differ significantly between those two discordant subgroups (data not shown).

Quantitative data for all four assay tubes were available in 999 patients (57.9%), and TB1-nil and TB2-nil results in 1367 (79.2%). In patients with positive QFT-Plus results and available quantitative data ( $n=284$ ), median (IQR) background-corrected TB1 responses were 4.62 IU/mL (2.33–7.13) in TBD cases and 5.17 IU/mL (1.67–7.38) in LTBI cases ( $p=0.741$ ); median TB2 responses were 4.68 IU/mL (2.26–7.39) and 5.05 IU/mL (1.83–7.33), respectively ( $p=0.612$ ). There was a strong positive correlation between background-corrected TB1 and TB2 responses ( $r=0.931$ ,  $p=0.001$ ; figure 2A). There was also a weak association between background-corrected TB1 and TB2 responses and TST induration diameters (figure 2B,C), but no association between antigen responses and CRP or ESR (data not shown).

Background-corrected mitogen (positive control) responses showed a statistically significant positive association with age and a significant inverse relationship with CRP concentrations and ESR (online supplemental figure 1A–C). Haemoglobin or lymphocyte levels had no impact on quantitative QFT-Plus results, neither on antigen nor on mitogen responses (data not shown).

Tuberculosis



**Figure 2** Relationship between (A) background-corrected interferon-gamma concentrations in TB1 antigen-stimulated samples (TB1-nil) and TB2 antigen-stimulated samples (TB2-nil) in 284 patients with a positive QFT-Plus result in whom quantitative data were available; (B) TST diameter and background-corrected interferon-gamma concentrations in TB1 antigen-stimulated samples (TB1-nil); and (C) TST diameter and background-corrected interferon-gamma concentrations in TB2 antigen-stimulated sample (TB2-nil). All graphs show a fitted linear regression line (solid line) and the corresponding 95% CI (interrupted lines). The values shown are Spearman correlation coefficients (*r*) and their corresponding *p* value. LTBI, latent tuberculosis infection; QFT-Plus, QuantiFERON TB Gold Plus; TBD, tuberculosis disease; TST, tuberculin skin test.

**Indeterminate QFT-Plus results**

Overall, 54 patients (3.1%) had an indeterminate QFT-Plus result. In 50 patients, the indeterminate result was due to insufficient mitogen responses, while only one patient had that result due to an elevated nil tube interferon-gamma concentration (quantitative data not available in *n*=3). The group of patients with indeterminate results mainly comprised children classified as TB-uninfected (*n*=51); one child had LTBI, and two had TBD (both unconfirmed).

The bivariate analyses showed that patients with an indeterminate result were on average younger than those with determinate test results (table 4). Additionally, the analyses showed that the proportion of indeterminate results was highest in children in the CRS and IIT groups. Furthermore, indeterminate results were associated with low haemoglobin concentrations and lymphopenia, as well as elevated CRP and ESR levels.

In the logistic regression model, in which all variables with a *p* value of <0.1 in the bivariate analysis were included, age <5 years, lymphopenia and elevated CRP concentrations remained

significantly associated with indeterminate QFT-Plus results (table 4).

**DISCUSSION**

To our knowledge, this is the largest study to date to evaluate QFT-Plus assays in children and adolescents at risk of TB, facilitated by a well-established collaborative paediatric TB research network. Our study was conducted in a real-life clinical setting and included patients assessed for TB infection for the four most common screening indications in low-burden countries.

Our cohort includes a substantial number of children with TBD. TBD was more common in young children, in patients assessed due to recent TB contact or clinical/radiological suspicion, and in those born abroad or to an immigrant family, as expected.<sup>31</sup> In TBD, the sensitivity of QFT-Plus was only 83.6%, equivalent to that of TST (84.4%) in our study. Importantly, this figure is also very similar to the estimates reported for previous-generation IGRAs in children, including QFT-GIT, 83% (95%

**Table 4** Bivariate statistical analysis and multivariate regression analysis of potential risk factors associated with indeterminate QFT-Plus results

|  | Bivariate analysis |               |         | Multivariate regression analysis |               |         |
|--|--------------------|---------------|---------|----------------------------------|---------------|---------|
|  | OR                 | 95% CI        | P value | Adjusted OR                      | 95% CI        | P value |
| Age <5 years                           | 1.924              | 1.11 to 3.33  | 0.019   | 3.392                            | 1.26 to 9.17  | 0.016   |
| Male sex                               | 1.674              | 0.95 to 2.95  | 0.075   | 3.101                            | 1.07 to 8.96  | 0.037   |
| BCG-vaccinated                         | 1.112              | 0.54 to 2.31  | 0.776   | –                                | –             | –       |
| Patient born in Spain                  | 1.125              | 0.59 to 2.16  | 0.723   | –                                | –             | –       |
| Spanish family origin                  | 1.646              | 0.94 to 2.88  | 0.081   | 2.117                            | 0.74 to 6.03  | 0.160   |
| Reason for assessment                  | –                  | –             | –       | –                                | –             | –       |
| New-entrant migrant screening          | Ref.               | –             | –       | Ref.                             | –             | –       |
| Clinical/radiological suspicion of TBD | 9.097              | 3.36 to 24.62 | <0.001  | 0.114                            | 0.01 to 1.62  | 0.114   |
| Contact tracing                        | 0.998              | 0.192 to 5.18 | 0.999   | –                                | –             | –       |
| Prior to immunosuppressive treatment   | 7.198              | 2.76 to 18.78 | <0.001  | 0.268                            | 0.03 to 2.81  | 0.272   |
| Low haemoglobin level*                 | 5.855              | 3.05 to 11.26 | <0.001  | 1.137                            | 0.39 to 3.31  | 0.814   |
| Low lymphocyte count*                  | 6.184              | 3.22 to 11.86 | <0.001  | 4.881                            | 1.64 to 14.50 | 0.004   |
| CRP level (per 5 mg/L increase)        | 1.065              | 1.05 to 1.09  | <0.001  | 1.067                            | 1.03 to 1.10  | <0.001  |
| ESR level (per 1 mm increase)          | 1.025              | 1.01 to 1.04  | <0.001  | 1.013                            | 0.99 to 1.03  | 0.196   |

\*Haemoglobin concentrations and lymphocyte counts were dichotomised (low values vs normal/high values) for this analysis. CRP, C reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; QFT-Plus, QuantiFERON TB Gold Plus; TBD, tuberculosis disease.

CI 75% to 92%), and T-SPOT.TB, 84% (95% CI 63% to 100%) assays,<sup>7</sup> indicating that the new assay design has not resulted in enhanced sensitivity in patients with TBD, as has been claimed.<sup>26</sup> This aligns with data from adult studies that performed head-to-head comparisons of QFT-GIT and QFT-Plus in adult patients with TBD, reporting nearly identical sensitivities for both assays.<sup>13</sup> While it would have been desirable to include a direct head-to-head comparison with previous-generation IGRAs in our study, few paediatric IGRA studies include such comparisons due to the technical difficulties in obtaining large enough blood samples from young children. One paediatric study in Eswatini, which included only 12 children with TBD, directly compared QFT-GIT and QFT-Plus, and reported identical sensitivities.<sup>17</sup>

To date, the data on the performance of QFT-Plus in children with TBD remain very limited, despite the assay having been released for routine clinical use in 2016. The two largest published paediatric studies in Europe, which included 43 children with suspected TBD and 84 children with microbiologically confirmed TBD, reported test sensitivities of 83.3% and 82.9%, respectively.<sup>19,20</sup> Concerningly, one paediatric study in Vietnam, a high TB prevalence setting, reported that while the sensitivity of QFT-Plus was 84.2% in patients with isolated pulmonary TBD ( $n=19$ ), it was only 14.3% in patients with extrapulmonary TBD ( $n=14$ ).<sup>18</sup>

Subgroup analyses showed that the sensitivity of QFT-Plus was significantly higher in microbiologically confirmed than in unconfirmed TBD cases. Although the underlying mechanism is uncertain, it is tempting to hypothesise that this may have resulted from the former patient group having more advanced disease and higher antigenic loads, leading to greater induction of MTB-specific T cells, and thereby higher interferon-gamma responses in the QFT-Plus assay. This hypothesis aligns with previous adult data indicating that there is a relationship between antigenic load and the magnitude of interferon-gamma responses.<sup>32</sup> Nevertheless, it is possible that some children in our study who lacked microbiological confirmation had an alternative diagnosis and were incorrectly diagnosed with TBD. We also found that the sensitivity of QFT-Plus was significantly higher in TST-positive than in TST-negative TBD cases, which is not unexpected, as both tests are based on the detection of immune responses to mycobacterial antigens.

According to the manufacturer, the second QFT-Plus antigen tube (TB2), which was absent from previous assay versions, is intended to preferentially induce MTB-specific CD8+ T-cell responses to improve the assay's sensitivity specifically in patients with TBD (rather than LTBI).<sup>26</sup> Only five (2.6%) of 189 children with TBD in our cohort had discordance between categorical TB1 and TB2 results, and only three (1.6%) of those had a TB1–/TB2+ result constellation, showing that the contribution of the second antigen tube to the assay's sensitivity in paediatric TBD is negligible. Importantly, the disadvantages of having an additional antigen tube include the need to obtain a larger volume of blood, which can be challenging in young children, and a substantial increase in costs due to the need to run an additional sample for every patient in the QFT ELISA. In contrast to the TST, all IGRAs require a complex laboratory infrastructure, which is a challenge in low-resource, high-TB incidence countries. Notably, recent data suggest that skin tests based on ESAT-6 and CFP-10, which are likely to have greater specificity than the TST that uses a mixture of poorly defined mycobacterial antigens, may be a viable alternative in settings with limited infrastructure.<sup>33</sup>

The analyses of quantitative antigen-induced interferon-gamma responses revealed a strong positive correlation between

TB1 and TB2 responses, and only a weak relationship between antigen-induced interferon-gamma responses and TST indurations. Importantly, the magnitude of TB1 and TB2 responses did not differ significantly between LTBI and TBD cases, showing that the assay is not suited to differentiating between those infection states. We observed a positive correlation between age and the magnitude of mitogen responses, a phenomenon that has also been reported in QFT-GIT.<sup>34</sup> Furthermore, we found that there was an inverse relationship between mitogen responses and CRP concentrations and ESRs, indicating that proinflammatory states can have an adverse impact on positive-control responses.<sup>35</sup>

LTBI was diagnosed in 195 patients in our cohort, most often among children assessed during CTR and NMS. The sensitivity of QFT-Plus for LTBI was 68.2% overall and was significantly higher in BCG-unvaccinated children and those born in Spain, likely reflecting result discordance between TST and QFT-Plus in BCG-vaccinated patients. Importantly, comparisons between studies investigating the performance of diagnostic tests for LTBI are hampered by the lack of a gold standard and the presence of varying TB risk factors in the populations assessed.<sup>36</sup> However, we recently reported a similar sensitivity estimate (72.2%) for the QFT-GIT assay in the diagnosis of LTBI among children <5 years of age.<sup>37</sup>

The proportion of indeterminate assay results (3.1%) was very similar to that reported by a recent meta-analysis on previous-generation IGRAs in children (4%),<sup>38</sup> and those results were almost universally due to low mitogen (positive-control) responses. We found that indeterminate QFT-Plus results were associated with young age, a phenomenon previously also reported in QFT-GIT assays.<sup>34,37,39</sup> Multivariate analysis additionally identified lymphopenia and elevated CRP as significant risk factors for indeterminate QFT-Plus results. The former is to be expected, as IGRAs require a sufficient number of functional T cells in order to generate adequate interferon-gamma responses, and—in contrast to the T-SPOT.TB assay—cell numbers are not being adjusted prior to antigenic stimulation in QFT assays. Interestingly, recent data suggest that CRP at physiological concentrations can inhibit intracellular expression of various cytokines, including interleukin-2 and interferon-gamma, which may explain the latter observation.<sup>35</sup>

One of the key strengths of this study lies in its sample size, allowing us to generate precise sensitivity estimates with narrow CIs. Another strength is that the study was conducted in a routine clinical setting, as diagnostic studies conducted under highly controlled conditions tend to overestimate test performance. However, our study has limitations, including the absence of direct head-to-head comparisons with other IGRA assays and missing data (including TST results, haematological results and inflammatory markers) in a substantial number of patients. Also, we did not collect data on the precise timing of the TST and blood sampling for QFT-Plus; while data from early studies suggested that performing a TST prior to an IGRA may result in a boosting phenomenon, this has subsequently been shown not to be the case.<sup>40–42</sup> In common with all previous studies, our estimates of test performance related to the diagnosis of LTBI are limited by the lack of a universally agreed gold standard, and the definition of LTBI used may have led to incorporation bias.

In summary, our results show that in children and adolescents at risk of TB in a low-TB prevalence setting, the QFT-Plus assay does not perform better than the previous-generation IGRAs or the long-established TST, consistent with the data of the largest meta-analysis in adults to date.<sup>43</sup> Close to one in five children with TBD had false-negative QFT-Plus results, highlighting that the assay cannot be used as a rule-out test in children with



## Tuberculosis

suspected TBD. Furthermore, our data show that the new antigen tube, TB2, only makes a negligible contribution to assay sensitivity. Multivariate analysis identified young age, lymphopenia and elevated CRP concentrations as risk factors for indeterminate test result. Further studies are needed to determine whether QFT-Plus assays perform better than previous-generation IGRAs in children in high TB prevalence settings.

## Author affiliations

- <sup>1</sup>Malalties Infeccioses i Resposta Inflamatòria Sistèmica en Pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- <sup>2</sup>Atenció Primària, Fundació Assistencial Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain
- <sup>3</sup>Unitat de Salut Internacional, Departament de Pediatria, Fundació Recerca Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Terrassa, Spain
- <sup>4</sup>Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- <sup>5</sup>Paediatric Infectious Diseases Unit, Gregorio Marañón Mother and Child Hospital, Madrid, Spain
- <sup>6</sup>Unitat de Micobactèries, Laboratori Supranacional de Referència de l'OMS per a la Tuberculosis, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain
- <sup>7</sup>Clinical Microbiology and Infectious Diseases Department, Gregorio Marañón Mother and Child Hospital, Madrid, Spain
- <sup>8</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Donostia-Instituto BioDonostia, Donostia Ospitalea, San Sebastian, Spain
- <sup>9</sup>Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, EHU-UPV, Donostia University Hospital Gipuzkoa Building, San Sebastian, Spain
- <sup>10</sup>Pediatrics Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain
- <sup>11</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital de Basurto, Basurto, Spain
- <sup>12</sup>Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain
- <sup>13</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Hospital La Fe, Valencia, Spain
- <sup>14</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Infanta Sofía, San Sebastian de los Reyes, Spain
- <sup>15</sup>Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre, Universidad Europea de Madrid, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain
- <sup>16</sup>Red de Investigación Translacional en Infectología Pediátrica, RITIP, Madrid, Spain
- <sup>17</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain
- <sup>18</sup>Department of Pediatrics, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia
- <sup>19</sup>Department of Infection, Immunity and Inflammation, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, London, UK
- <sup>20</sup>CIBERESP, Madrid, Spain
- <sup>21</sup>Departament de Pediatria, Universitat de Barcelona Facultat de Medicina, Barcelona, Spain

**Collaborators** On behalf of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred; see online supplemental appendix 1).

**Contributors** TP-P, AS-A, AN-J and MT conceived the original idea and supervised the development of the project. AS-G, AG, TP-P, AS-A, BS, MJR-S, JJKM, MB-A, MIG-L, PR-M, AIP, AT and AN-J collaborated on the enrolment of patients and the clinical interpretation of individual results. MM and TT supervised the development of the immunological experiments. AS-G, AG, MT and AN-J performed the analysis of the data and designed the figures. AS-G and AG wrote the first draft of the manuscript, with support from AN-J and MT. All authors discussed the results and commented on and approved the final version of the manuscript. AN-J accepts full responsibility for the work and the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.

**Funding** This work was partially supported by a research grant from the Carlos III Institute of Health, Ministry of Economy and Competitiveness (Spain), reference P116/00314, and by the Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery, grant number 90/2015. Tomàs PÉREZ-PORCUNA and Antoni NOGUERA-JULIAN were supported by "Subvencions per a la Intensificació de Facultatius Especialistes" (Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, Programa PERIS 2016–2020) [SLT006/17/00144 and SLT008/18/00193, respectively].

**Competing interests** MT has received QuantiFERON assays at reduced pricing or free of charge for tuberculosis diagnostics projects from the manufacturer (Cellestis/Qiagen) in the past and has received support for conference attendance from Cepheid. The manufacturers had no influence on the study design, data collection, analysis or interpretation, writing of the manuscript or decision to submit the data for publication.

**Patient consent for publication** Not applicable.

**Ethics approval** Approval for pTBred was obtained from the Hospital Carlos III Ethics Committee (Madrid, ref. P13/12). Informed consent was obtained from parents/guardians and assent from adolescents >11 years of age at inclusion.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data availability statement** Data are available upon reasonable request. Data are available upon reasonable request to the corresponding author.

## REFERENCES

- 1 Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet* 2011;378:57–72.
- 2 WHO. Global tuberculosis report 2018. Available: [www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/) [Accessed 25 Apr 2021].
- 3 Nelson LJ, Wells CD. Global epidemiology of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:636–47.
- 4 Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, et al. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1078–90.
- 5 Mandal N, Anand PK, Gautam S, et al. Diagnosis and treatment of paediatric tuberculosis: an insight review. *Crit Rev Microbiol* 2017;43:466–80.
- 6 Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1186–205.
- 7 Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselting AC, et al. Interferon-Gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:1018–32.
- 8 Tebruegge M, Ritz N, Koetz K, et al. Availability and use of molecular microbiological and immunological tests for the diagnosis of tuberculosis in Europe. *PLoS One* 2014;9:e99129.
- 9 Starke JR, Committee On Infectious Diseases. Interferon- $\gamma$  release assays for diagnosis of tuberculosis infection and disease in children. *Pediatrics* 2014;134:e1763–73.
- 10 Ryu MR, Park M-S, Cho EH, et al. Comparative evaluation of QuantiFERON-TB gold in-tube and QuantiFERON-TB gold plus in diagnosis of latent tuberculosis infection in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 2018;56:e00438–18.
- 11 Petruccioli E, Chiacchio T, Peponi I, et al. First characterization of the CD4 and CD8 T-cell responses to QuantiFERON-TB plus. *J Infect* 2016;73:588–97.
- 12 Pourakbari B, Mamishi S, Benvari S, et al. Comparison of the QuantiFERON-TB gold plus and QuantiFERON-TB gold in-tube interferon- $\gamma$  release assays: a systematic review and meta-analysis. *Adv Med Sci* 2019;64:437–43.
- 13 Shafeque A, Bigio J, Hogan CA, et al. Fourth-Generation QuantiFERON-TB gold plus: what is the evidence? *J Clin Microbiol* 2020;58:e01950–19.
- 14 Petruccioli E, Vanini V, Chiacchio T, et al. Analytical evaluation of QuantiFERON- plus and QuantiFERON- gold in-tube assays in subjects with or without tuberculosis. *Tuberculosis* 2017;106:38–43.
- 15 Petruccioli E, Chiacchio T, Navarra A, et al. Effect of HIV-infection on QuantiFERON-plus accuracy in patients with active tuberculosis and latent infection. *J Infect* 2020;80:536–46.
- 16 Chiacchio T, Petruccioli E, Vanini V, et al. Characterization of QuantiFERON-TB-Plus results in latent tuberculosis infected patients with or without immune-mediated inflammatory diseases. *J Infect* 2019;79:15–23.
- 17 Kay AW, DiNardo AR, Dlamini Q, et al. Evaluation of the QuantiFERON-Tuberculosis gold plus assay in children with tuberculosis disease or following household exposure to tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg* 2019;100:540–3.
- 18 Nguyen DT, Phan H, Trinh T, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One* 2019;14:e0213304.
- 19 Buonsenso D, Delogu G, Perricone C, et al. Accuracy of QuantiFERON-TB gold plus test for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00272–20.
- 20 Soler-García A, Gamell A, Santiago B, et al. Diagnostic accuracy of QuantiFERON-TB gold plus assays in children and adolescents with tuberculosis disease. *J Pediatr* 2020;223:212–5.
- 21 Primaturia C, Reniarti L, Nataprawira HMN. Comparison between the Interferon  $\gamma$  Release Assay-QuantiFERON Gold Plus (QFT-Plus)-and Tuberculin Skin Test (TST) in the Detection of Tuberculosis Infection in Immunocompromised Children. *Pulm Med* 2020;2020:7159485.
- 22 Soler-García A, Gamell A, Santiago B, et al. QuantiFERON-TB gold plus assay specificity in children and adolescents with suspected tuberculosis—a multicenter cross-sectional study in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2021;40:e348–51.
- 23 Piñeiro Pérez R, Santiago García B, José Mellado Peña M. red Española de Estudio de tuberculosis Pediátrica. *A la vanguardia de Europa. Rev Esp Salud Publica* 2017;91:e201701001.
- 24 Harris PA, Taylor R, Thielke R, et al. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform* 2009;42:377–81.
- 25 Grupo de trabajo Plan Prevención y Control de la Tuberculosis. Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España, 2019. Available: [www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/docs/PlanTB2019.pdf](http://www.msbs.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/PlanTuberculosis/docs/PlanTB2019.pdf) [Accessed 25 Apr 2021].

- 26 QIAGEN. Quantiferon-Tb gold plus (QFT-Plus) ELISA package insert. rev. Available: [www.QuantiFERON.com](http://www.QuantiFERON.com) [Accessed 25 Apr 2021].
- 27 Moreno-Pérez D, Andrés Martín A, Altet Gómez N. Diagnosis of tuberculosis in pediatrics. consensus document of the Spanish Society of pediatric Infectology (SEIP) and the Spanish Society of pediatric Pneumology (SENP). *An Pediatr* 2010.
- 28 Mayo Clinic Laboratories. Complete blood count (CBC) with differential, blood, 2021. Available: [www.mayocliniclabs.com/test-info/pediatric/refvalues/reference.php?unit\\_code=9109](http://www.mayocliniclabs.com/test-info/pediatric/refvalues/reference.php?unit_code=9109) [Accessed 25 Apr 2021].
- 29 Graham SM, Ahmed T, Amanullah F, et al. Evaluation of tuberculosis diagnostics in children: 1. proposed clinical case definitions for classification of intrathoracic tuberculosis disease. consensus from an expert panel. *J Infect Dis* 2012;205 Suppl 2:S199–208.
- 30 Wiseman CA, Gie RP, Starke JR, et al. A proposed comprehensive classification of tuberculosis disease severity in children. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:347–52.
- 31 European centre for disease prevention and Control/WHO regional office. tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2018 – 2016 data. Available: [www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2018-19mar2018.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/ecdc-tuberculosis-surveillance-monitoring-Europe-2018-19mar2018.pdf) [Accessed 25 Apr 2021].
- 32 Millington KA, Innes JA, Hackforth S, et al. Dynamic relationship between IFN-gamma and IL-2 profile of Mycobacterium tuberculosis-specific T cells and antigen load. *J Immunol* 2007;178:5217–26.
- 33 Hamada Y, Cirillo DM, Matteelli A, et al. Tests for tuberculosis infection: landscape analysis. *Eur Respir J* 2021;19:2100167.
- 34 Connell TG, Tebruegge M, Ritz N, et al. Indeterminate interferon-gamma release assay results in children. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:285–6.
- 35 Yoshida T, Ichikawa J, Giuroiu I, et al. C reactive protein impairs adaptive immunity in immune cells of patients with melanoma. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000234.
- 36 Auguste P, Tsertsvadze A, Pink J, et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2017;17:200.
- 37 Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Latorre I, et al. Performance of tuberculin skin tests and interferon- $\gamma$  release assays in children younger than 5 years. *Pediatr Infect Dis J* 2018;37:1235–41.
- 38 Meier NR, Volken T, Geiger M, et al. Risk factors for indeterminate interferon-gamma release assay for the diagnosis of tuberculosis in Children-A systematic review and meta-analysis. *Front Pediatr* 2019;7:208.
- 39 Tebruegge M, de Graaf H, Sukhtankar P, et al. Extremes of age are associated with indeterminate QuantiFERON-TB gold assay results. *J Clin Microbiol* 2014;52:2694–7.
- 40 Richeldi L, Bergamini BM, Vaienti F. Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J* 2008;32:524–5.
- 41 Ritz N, Yau C, Connell TG, et al. Absence of interferon-gamma release assay conversion following tuberculin skin testing. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011;15:767–9.
- 42 Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Espiau M, et al. Impact of baseline tuberculin skin test and isoniazid chemoprophylaxis on subsequent QuantiFERON-TB gold in-tube performance in young children assessed after tuberculosis contact in Catalonia. *Pediatr Infect Dis J* 2020;39:e22–5.
- 43 Oh CE, Ortiz-Brizuela E, Bastos ML, et al. Comparing the diagnostic performance of QuantiFERON-TB gold plus to other tests of latent tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2021;73:e1116–25.

**Supplementary Table 1. Summary of hematological parameters and inflammatory markers according to QFT-Plus test indications.** Data are shown as number (percentage) or median (IQR).

|                               |        | Contact tracing<br>(n=260) | Clinical/radiological<br>suspicion of TBD<br>(n=288) | New-entrant screening<br>(n=649) | IS treatment screening<br>(n=529) | p-value |
|-------------------------------|--------|----------------------------|--|----------------------------------|-----------------------------------|---------|
| Hemoglobin levels<br>(n=1015) | Low    | 19 (9.7)                   | 88 (36.7)  | 12 (12.0)                        | 164 (34.2)                        | <0.001  |
|                               | Normal | 164 (83.7)                 | 144 (60.0)   | 78 (78.0)                        | 301 (62.8)                        |         |
|                               | High   | 13 (6.6)                   | 8 (3.3)  | 10 (10.0)                        | 14 (2.9)                          |         |
| Lymphocyte counts<br>(n=1011) | Low    | 5 (2.6)                    | 23 (9.6)   | 0 (0.0)                          | 85 (17.8)                         | <0.001  |
|                               | Normal | 169 (86.2)                 | 176 (73.6)   | 81 (81.8)                        | 339 (71.1)                        |         |
|                               | High   | 22 (11.2)                  | 40 (16.7)  | 18 (18.2)                        | 53 (11.1)                         |         |
| CRP (n=811)*                  | mg/l   | 1.1 (0.4-3.5)              | 10.5 (1.4-61.7)                                      | 0.7 (0.3-3.5)                    | 2.1 (0.5-18.6)                    | <0.001  |
| ESR (n=699)*                  | mm     | 3.0 (2.0-9.0)              | 15.0 (5.0-43.0)                                      | 6.5 (2.0-17.8)                   | 4.0 (2.0-14.0)                    | <0.001  |

Abbreviations: CRP = C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate; IS = immunosuppressive; TBD = tuberculosis disease.

\* CRP and ESR values at the time point when the QFT-Plus assay was performed were available for the following: contact tracing patients: 152 and 146, respectively; patients with clinical/radiological suspicion of TBD: 229 and 162, respectively; new-entrant screening patients: 34 and 72, respectively; patients screened prior to immunosuppressive treatment: 396 and 319, respectively.

**Supplementary Table 2. Subgroup analysis of the sensitivity of QFT-Plus in patients with latent TB infection based on demographic variables, and test indication.** Indeterminate QFT-Plus results were considered negative for this analysis. Data are shown as number (percentage), except where stated otherwise.

|                     |                                 | Total <sup>a</sup> | Positive   | Negative  | Indeterminate | Sensitivity<br>(95% CI) | p-value |
|---------------------|---------------------------------|--------------------|------------|-----------|---------------|-------------------------|---------|
| <b>n (%)</b>        |                                 | 195 (100)          | 133 (68.2) | 61 (31.3) | 1 (0.5)       | 68.2 (61.2-74.7)        |         |
| Age                 | < 5 years                       | 23 (11.8)          | 13 (56.5)  | 10 (43.5) | 0 (0.0)       | 56.5 (34.5-76.8)        | 0.200   |
|                     | ≥ 5 years                       | 172 (88.2)         | 120 (69.8) | 51 (29.7) | 1 (0.6)       | 69.8 (62.3-76.5)        |         |
| Sex                 | Male                            | 130 (66.7)         | 90 (69.2)  | 39 (30.0) | 1 (0.8)       | 69.2 (60.5-77.0)        | 0.664   |
|                     | Female                          | 65 (33.3)          | 43 (66.2)  | 22 (33.8) | 0 (0.0)       | 66.2 (53.3-77.4)        |         |
| BCG status          | Unvaccinated                    | 57 (29.2)          | 48 (84.2)  | 9 (15.8)  | 0 (0.0)       | 84.2 (72.1-92.5)        | <0.001  |
|                     | Vaccinated                      | 87 (44.6)          | 40 (46.0)  | 46 (52.9) | 1 (1.1)       | 46.0 (35.2-57.0)        |         |
|                     | Unknown*                        | 51 (26.2)          | 45 (88.2)  | 6 (11.8)  | 0 (0.0)       | 88.2 (76.1-95.6)        |         |
| Patient origin      | Born in Spain                   | 75 (38.5)          | 57 (76.0)  | 17 (22.7) | 1 (1.3)       | 76.0 (64.8-85.1)        | 0.009   |
|                     | Born outside Spain <sup>a</sup> | 100 (51.3)         | 57 (57.0)  | 43 (43.0) | 0 (0.0)       | 57.0 (46.7-66.9)        |         |
|                     | Unknown*                        | 20 (10.3)          | 19 (95.0)  | 1 (5.0)   | 0 (0.0)       | 95.0 (75.1-99.9)        |         |
| Family origin       | Native                          | 40 (20.5)          | 30 (75.0)  | 10 (25.0) | 0 (0.0)       | 75.0 (58.8-87.3)        | 0.164   |
|                     | Non-native <sup>b</sup>         | 130 (66.7)         | 82 (63.1)  | 48 (36.9) | 0 (0.0)       | 63.1 (54.2-71.4)        |         |
|                     | Unknown*                        | 25 (12.8)          | 21 (84.0)  | 3 (12.0)  | 1 (4.0)       | 84.0 (63.9-95.5)        |         |
| Reason for referral | Contact tracing                 | 84 (43.1)          | 70 (83.3)  | 14 (16.7) | 0 (0.0)       | 83.3 (73.6-90.6)        | < 0.001 |
|                     | Clinical/radiological suspicion | 25 (12.8)          | 10 (40.0)  | 14 (56.0) | 1 (4.0)       | 40.0 (21.1-61.3)        |         |
|                     | New-entrant migrant screening   | 81 (41.5)          | 51 (63.0)  | 30 (37.0) | 0 (0.0)       | 63.0 (51.5-73.4)        |         |
|                     | Immunosuppressive treatment     | 5 (2.6)            | 2 (40.0)   | 3 (60.0)  | 0 (0.0)       | 40.0 (5.3-85.3)         |         |

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guérin; CI = confidence interval.

\*Not included in the statistical analysis.

<sup>a</sup> Percentage in this column refers to the proportion of patients in each subgroup.



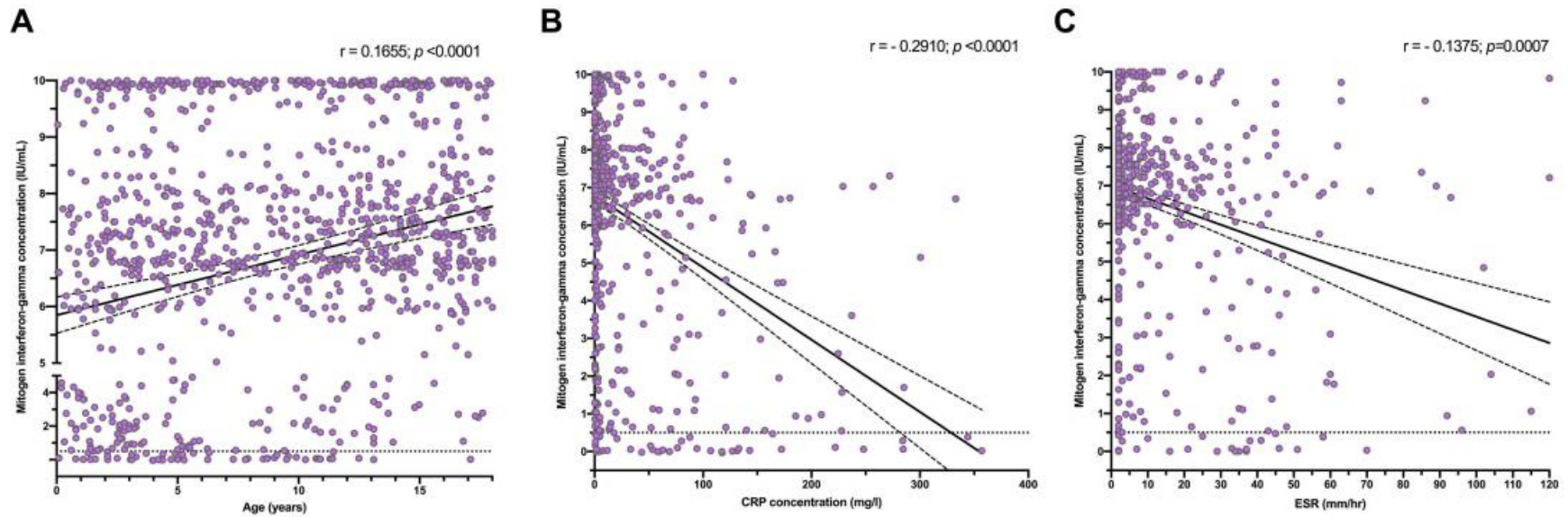
**Supplementary Table 3. Characteristics of the patients with discordant categorical test results between QFT-Plus TB1 and TB2 antigen tubes.**

| QFT-Plus results | Patient | Age (years) / gender | BCG status     | Reason for referral             | TST result | Final diagnosis |
|------------------|---------|----------------------|----------------|---------------------------------|------------|-----------------|
| TB1+ / TB2-      | 1       | 15.4 / male          | Non-vaccinated | Contact tracing                 | Negative   | LTBI            |
|                  | 2       | 14.9 / male          | Unknown        | New-entrant screening           | Not done   | LTBI            |
|                  | 3       | 5.2 / female         | Vaccinated     | New-entrant screening           | Positive   | LTBI            |
|                  | 4       | 2.5 / male           | Non-vaccinated | Contact tracing                 | Not done   | LTBI            |
|                  | 5       | 10.5 / male          | Vaccinated     | Contact tracing                 | Negative   | LTBI            |
|                  | 6       | 11.1 / female        | Non-vaccinated | IS treatment screening          | Positive   | LTBI            |
|                  | 7       | 12.4 / male          | Vaccinated     | Clinical/radiological suspicion | Positive   | Confirmed TBD   |
|                  | 8       | 7.3 / male           | Non-vaccinated | Clinical/radiological suspicion | Positive   | Confirmed TBD   |
| TB1- / TB2+      | 9       | 9.5 / male           | Non-vaccinated | Contact tracing                 | Positive   | LTBI            |
|                  | 10      | 14.1 / female        | Unknown        | Clinical/radiological suspicion | Negative   | LTBI            |
|                  | 11      | 5.3 / female         | Non-vaccinated | IS treatment screening          | Not done   | LTBI            |
|                  | 12      | 17.4 / male          | Vaccinated     | Contact tracing                 | Positive   | LTBI            |
|                  | 13      | 10.3 / female        | Vaccinated     | Clinical/radiological suspicion | Positive   | LTBI            |
|                  | 14      | 17.4 / male          | Vaccinated     | Clinical/radiological suspicion | Not done   | LTBI            |
|                  | 15      | 15.9 / male          | Unknown        | New-entrant screening           | Positive   | LTBI            |
|                  | 16      | 0.1 / female         | Non-vaccinated | Contact tracing                 | Positive   | Confirmed TBD   |
|                  | 17      | 8.3 / male           | Unknown        | Clinical/radiological suspicion | Positive   | Confirmed TBD   |
|                  | 18      | 6.1 / female         | Non-vaccinated | Contact tracing                 | Positive   | Unconfirmed TBD |

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guérin; IS = immunosuppressive; LTBI = latent tuberculosis infection; TBD = tuberculosis disease; TST = tuberculin skin test.



**Supplementary Figure 1.** Relationship between background-corrected interferon-gamma concentrations in the QFT-Plus mitogen (positive control) tube in patients in whom the necessary quantitative data were available and, A) age (n=1002), B) C-reactive protein concentrations (n=710), and C) erythrocyte sedimentation rate (n=598), with fitted linear regression lines (solid line) and corresponding 95% confidence interval (interrupted lines). The dotted lines indicate the cut-offs for insufficient positive control responses (<0.5 IU/mL). The data from one patient with an indeterminate result due to high nil tube interferon-gamma concentration were omitted from the graphs to allow better data visualization. The values shown are Spearman correlation coefficients (r) and their corresponding p-value.



### 5.3.2 Resum del tercer estudi

#### Rendiment del test QuantiFERON-TB Gold Plus en nens i adolescents en risc de tuberculosi: estudi multicèntric transversal.

##### Objectiu

---

- Determinar el rendiment del QFT®-Plus en una cohort de nens en risc de tuberculosi en un país de baixa incidència.

##### Pacients i mètodes

---

- És un estudi transversal i multicèntric dins del marc de la pTBred.
- S'hi van incloure pacients menors de 18 anys a qui s'hagués realitzat un test QFT®-Plus entre el setembre de 2016 i el juny de 2020 per qualsevol de les seves indicacions: sospita clínica o radiològica de TBC (SC), cribratge en estudi de contactes (EC), cribratge del nen migrat (NM) o cribratge previ a l'inici d'un tractament immunosupressor (TI). D'acord amb el diagnòstic final, els pacients van ser classificats en tres grups: 'TBC', 'ITBL', i 'no-infectats'.
- La sensibilitat es va definir com la proporció de resultats de QFT®-Plus positius d'entre el total de casos de TBC i ITBL, considerant els casos amb QFT®-Plus indeterminats com a negatius per a aquest càlcul.
- Es va calcular la concordança entre el QFT®-Plus i el PPD i entre els dos tubs reactius dels QFT®-Plus (TB1 i TB2) mitjançant l'índex  $\kappa$  de Cohen per a les dades qualitatives i amb la  $\rho$  de Spearman per a les quantitatives. Es van excloure els resultats indeterminats per a aquest càlcul.
- Es va realitzar una regressió logística binària com a anàlisi multivariant per determinar els factors de risc independents associats a un resultat indeterminat del QFT®-Plus.

## Resultats

---

### Característiques de la població estudiada

- Es van analitzar 1726 pacients.
- Els subjectes tenien una edat mediana de 8,4 anys (RIQ 4,3-12,8) i un 47,2% eren de sexe femení. La majoria de pacients eren nascuts a Espanya (74,2%).
- Les indicacions per a la realització del QFT®-Plus van ser: EC en un 15,1%, SC en un 16,7%, NM en un 37,6% i TI en un 30,6%.
- Els resultats del QFT®-Plus van ser: positiu en 291 pacients (16,9%), negatiu en 1381 (80,0%) i indeterminat en 54 (3,1%).
- La classificació final va ser: 'no infecció' en 1342 pacients (77,8%), 'ITBL' en 195 (11,3%) i 'TBC' en 189 (11,0%). Es va observar una major taxa de pacients amb TBC als grups EC i SC, i una major taxa de pacients amb LTBI al grup EC.

### Resultats del QFT®-Plus en pacients amb TBC i LTBI

- La sensibilitat del QFT®-Plus per a TBC va ser del 83,6% (IC95% 77,5-88,6), sent més alta en pacients amb PPD positiu respecte a pacients amb PPD negatiu (90,4% vs 40,7%,  $p < 0,001$ ) i en pacients amb malaltia microbiològicament confirmada respecte aquells sense confirmació (90,1% vs 78,7%,  $p = 0,036$ ). La sensibilitat no es va veure afectada per la resta de variables avaluades.
- La sensibilitat del QFT®-Plus per a la ITBL va ser del 68,2% (IC95% 61,2-74,7), sent més alta en pacients no vacunats amb BCG que en vacunats (84,2% vs 46,0%,  $p < 0,001$ ) i en pacients nascuts a Espanya que en nascuts a altres països (76,0% vs 57,0%,  $p = 0,009$ ). No es va veure afectada per la resta de variables.

### Correlació entre QFT®-Plus i el PPD

- A 1188 pacient se'ls va realitzar un test PPD, 296 van presentar un resultat positiu i 892 un resultat negatiu.
- La sensibilitat del PPD per a la TBC va ser del 84,4% (IC95% 78,1-89,5), equiparable a la del QFT®-Plus ( $p=0,837$ ). La sensibilitat del PPD per a la ITBL va ser del 92,6% (IC95% 87,4-96,1), superior a la del QFT®-Plus ( $p<0,001$ ).
- La concordança entre el PPD i el QFT®-Plus va ser globalment bona (91,6%,  $\kappa=0,766$ ), però moderada en avaluar tan sols els pacients amb TBC (86,0%,  $\kappa=0,472$ ). Dels 161 pacients amb ITBL, 88 (54,7%) van presentar un resultat positiu per als dos tests.

### Resultats dels tubs reactius del QFT®-Plus

- Per a 1666 (99,6%) pacients amb un resultat no indeterminat, es va disposar del resultat qualitatiu d'ambdós tubs reactius dels QFT®-Plus. La concordança entre els dos tubs va ser excel·lent (98,9%,  $\kappa=0,961$ ).
- D'entre els pacients amb QFT®-Plus positiu, 266 (93,7%) van presentar un resultat qualitatiu concordant entre els dos tubs.
- Per a 284 (97,6%) dels pacients amb QFT®-Plus positiu, es va disposar dels resultats quantitius del test . La [IFN- $\gamma$ ] va ser similar en comparar els grups TBC i ITBL, tant pel tub TB1 ( $p=0,741$ ) com pel TB2 ( $p=0,612$ ).
- La correlació de la [IFN- $\gamma$ ] entre TB1 i TB2 va ser molt marcada ( $\rho=0,931$ ,  $p=0,001$ ). Per contra, la correlació entre la [IFN- $\gamma$ ] i el diàmetre d'induració del PPD va ser significativa però feble tant en TB1 ( $\rho=0,134$ ,  $p=0,049$ ) com en TB2 ( $\rho=0,148$ ,  $p=0,029$ ).

- Es va veure una correlació estadísticament significativa entre la [IFN- $\gamma$ ] al tub mitogen (control positiu) tant amb l'edat dels pacients (correlació positiva) com amb les concentracions de proteïna C reactiva (CRP) i VSG (correlació inversa).

#### Resultats indeterminats del QFT®-Plus

- En 50 dels 51 pacients amb un QFT®-Plus indeterminat i disponibilitat del resultat quantitatiu, el resultat ho va ser per una concentració d'IFN- $\gamma$  insuficient al tub mitogen.
- Els factors de risc independentment associats a presentar un resultat indeterminat per al QFT®-Plus van ser l'edat menor a 5 anys (*Odds Ratio* [OR] 3,392,  $p=0,016$ ), la limfopènia (OR 4,881,  $p<0,001$ ) i les xifres altes de CRP (OR 1,067 per cada 5mg/L d'increment,  $p <0,001$ ).

#### **Conclusions**

---

- En avaluar el QFT®-Plus en una gran població pediàtrica no s'ha vist que presenti un millor rendiment que els tests QuantiFERON-TB previs o que el PPD, d'igual manera com s'ha descrit en població adulta.
- Prop d'un de cada 5 pacients amb tuberculosi va presentar un resultat negatiu del QFT®-Plus, fet que emfatitza que la negativitat del test no descarta la malaltia. El nou tub TB2 representa una contribució molt minsa a la sensibilitat del test.
- L'anàlisi multivariada va identificar l'edat <5 anys, la limfopènia i la PCR elevada com a factors de risc independents de presentar un resultat indeterminat del QFT®-Plus.

## **5.4 Quart estudi:**

### **5.4.1 Document del quart estudi**

#### **The value of the second QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube in children and adolescents with latent tuberculosis infection and tuberculosis disease in Spain**

Soler-Garcia A, Gamell A, Monsonís M, Korta-Murua JJ, Azurmendi-Gundín N, Espiau M, Tórtola T, Rincón-López E, Rodríguez-Molino P, Sainz T, Pérez-Porcuna T, Bustillo-Alonso M, Piqueras AI, Minguell-Domingo L, Lobato Z, Soto-Sánchez B, Rius N, Pérez-Gorricho B, Fortuny C, Santiago B, Tebruegge A, Noguera-Julian A.

Article en revisió a:

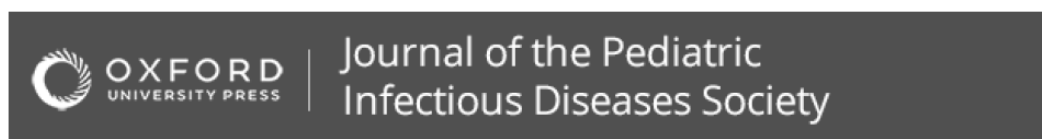
Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society

ISI Journal Citation Reports Ranking ® 2021:

1r Quartil en la categoria de Pediatria i en Malalties Infeccioses.

Factor d'impacte: 5,235.

Manuscripts submitted to Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society



**The value of the second QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube in children and adolescents with latent tuberculosis infection and tuberculosis disease in Spain**

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | <i>Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society</i>   |
| Manuscript ID                 | Draft   |
| Manuscript Type:              | Brief Report  |
| Date Submitted by the Author: | n/a   |
| Complete List of Authors:     | Soler-Garcia, Aleix; Hospital Sant Joan de Deu, Pediatrics<br>Gamell, Anna ; Hospital Sant Joan de Deu, Pediatrics<br>Monsonís, Manuel; Hospital Sant Joan de Deu, Clinical Microbiology Department<br>Korta-Murua, José Javier ; Donostia Ospitalea, Servicio de Pediatría<br>Azurmendi-Gundín, Nerea; Donostia Ospitalea, Servicio de Pediatría<br>Espiau, María; Vall d'Hebron University Hospital, UPIIP<br>Tórtola, Teresa; Vall d'Hebron University Hospital, Unitat de Micobactèries, Laboratori Supranacional de Referència de l'OMS per a la Tuberculosi<br>Rincon-Lopez, Elena Maria; Hospital General Universitario Gregorio Marañon, Department of Paediatrics. Paediatric Infectious Diseases Unit.<br>Rodriguez Molino, Paula; La Paz University Hospital Children Hospital, 4. Paediatrics, Infectious and Tropical Diseases Department.<br>Sainz Costa, Talía; Hospital Universitario La Paz, Paediatric Infectious Diseases; Hospital Universitario La Paz , Hospital La Paz Institute For Health Research (Idipaz)<br>Pérez Porcuna, Tomàs; Mutua de Terrassa Foundation for Teaching and Research, Servei de Pediatría<br>Bustillo, Matilde; Hospital Universitario Miguel Servet, Pediatric Infectious Diseases<br>Piqueras, Ana; Hospital La Fe, Pediatrics; Hospital Universitario La Fe<br>Minguell-Domingo, Laura; Arnau de Vilanova University Hospital, Servei de Pediatría<br>Lobato, Zulema; Althaia Foundation of Manresa, Pediatrics<br>Soto, Beatriz; Hospital Universitario de Getafe, Paediatrics<br>Rius, Neus; Hospital Universitario Sant Joan de Reus, Servei de Pediatría<br>Pérez-Gorricho, Beatriz; Hospital Nino Jesus, Servicio de Pediatría<br>Fortuny, Claudia; Hospital Sant Joan de Deu, Pediatrics<br>Santiago, Begoña; Hospital General Universitario Gregorio Marañon, Sección Enfermedades Infecciosas Pediátricas<br>Tebuegge, Marc; Great Ormond Street Hospital for Children NHS Foundation Trust, Department of Infection, Immunity and Inflammation<br>Noguera-Julian, Antoni; Hospital Sant Joan de Deu, Pediatrics |
| Keywords:                     | CD8 T-cell, interferon-gamma release assay, latent tuberculosis, treatment monitoring, tuberculosis   |

<https://mc.manuscriptcentral.com/jpids>

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/jpids>



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**The value of the second QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube in children and adolescents with latent tuberculosis infection and tuberculosis disease in Spain**

**Running title:** QFT-Plus TB2 added value in children

<sup>1</sup>Aleix SOLER-GARCIA, <sup>1</sup>Anna GAMELL, <sup>2</sup>Manuel MONSONÍS, <sup>3,4</sup>José Javier KORTA-MURUA, <sup>5</sup>Nerea AZURMENDI-GUNDÍN, <sup>5</sup>María ESPIAU, <sup>6</sup>Teresa TÓRTOLA, <sup>7</sup>Elena RINCÓN-LÓPEZ, <sup>8</sup>Paula RODRÍGUEZ-MOLINO, <sup>8,9,10</sup>Talia SAINZ, <sup>11,12</sup>Tomàs PÉREZ-PORCUNA, <sup>13</sup>Matilde BUSTILLO-ALONSO, <sup>14</sup>Ana Isabel PIQUERAS, <sup>15</sup>Laura MINGUELL-DOMINGO, <sup>16</sup>Zulema LOBATO, <sup>17</sup>Beatriz SOTO-SÁNCHEZ, <sup>18</sup>Neus RIUS, <sup>19</sup>Beatriz PÉREZ-GORRICO, <sup>1,20-22</sup>Clàudia FORTUNY, <sup>7,10,21</sup>Begoña SANTIAGO, <sup>23-25</sup>Marc TEBRUEGGE\*, <sup>1,20-22</sup>Antoni NOGUERA-JULIAN\*; on behalf of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (see Appendix 1).

<sup>1</sup>Malalties Infeccioses i Resposta Inflamatòria Sistèmica en Pediatria, Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Institut de Recerca Pediàtrica, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>Servei de Microbiologia, Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain.

<sup>3</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Donostia-Instituto BioDonostia, Donostia Ospitalea, San Sebastian, Spain.

<sup>4</sup>Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, EHU-UPV, Donostia University Hospital Gipuzkoa Building, San Sebastian, Spain.

<sup>5</sup>Pediatric Infectious Diseases and Immunodeficiencies Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Vall d'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Unitat de Micobactèries, Laboratori Supranacional de Referència de l'OMS per a la Tuberculosi, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>7</sup>Paediatric Infectious Diseases Unit, Gregorio Marañón Mother and Child Hospital, Madrid, Spain.

<sup>8</sup>Pediatric Infectious and Tropical Diseases Department, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain.

<sup>9</sup>La Paz Research Institute (IdiPAZ). Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Madrid, Spain.

<sup>10</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Madrid, Spain.

<sup>11</sup>Atenció Primària, Fundació Assistencial Mútua de Terrassa, Terrassa, Spain.

1

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

<sup>12</sup>Unitat de Salut Internacional, Departament de Pediatria, Fundació Recerca Hospital

Universitari Mútua de Terrassa, Universitat de Barcelona, Terrassa, Spain.

<sup>13</sup>Pediatrics Department, Miguel Servet University Hospital, Zaragoza, Spain.

<sup>14</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Hospital La Fe, Valencia, Spain.

<sup>15</sup>Servei de Pediatria, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain.

<sup>16</sup>Servei de Pediatria, Hospital Sant Joan de Déu – Fundació Althaia, Manresa, Spain.

<sup>17</sup>Pediatrics Department, Hospital de Getafe, Madrid, Spain.

<sup>18</sup>Servei de Pediatria, Hospital Universitari Sant Joan, Reus, Spain.

<sup>19</sup>Pediatric Infectious Diseases Unit, Department of Pediatrics, Hospital Infantil

Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain.

<sup>20</sup>Departament de Cirurgia i Especialitats Medicoquirúrgiques, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

<sup>21</sup>Red de Investigación Translacional en Infectología Pediátrica (RITIP), Madrid, Spain.

<sup>22</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

<sup>23</sup>Department of Paediatrics, Klinik Ottakring, Wiener Gesundheitsverbund, Vienna, Austria

<sup>24</sup>Department of Paediatrics, Royal Children's Hospital Melbourne, University of Melbourne, Melbourne, Australia.

<sup>25</sup>Department of Infection, Immunity & Inflammation, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, University College London, London, UK.

\*Both authors share credit for senior authorship.

**Keywords:** CD8 T-cell; interferon-gamma release assay; latent tuberculosis; treatment monitoring; tuberculosis

**Brief description**

The added value of the second QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube in the diagnosis of tuberculosis infection or disease in children is minimal. The assay is not useful for monitoring treatment response as only one in six patients convert to a negative result.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Corresponding author:**

Antoni NOGUERA-JULIAN, MD, PhD

Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Hospital Sant Joan de Déu

Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues (Spain)

E-mail: [ton@hsjdbcn.es](mailto:ton@hsjdbcn.es); phone number: +34 670 061 258

**Alternate corresponding author:**

Anna GAMELL

Unitat d'Infeccions, Servei de Pediatria, Hospital Sant Joan de Déu

Passeig Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues (Spain)

E-mail: [annamaria.gamell@sjd.es](mailto:annamaria.gamell@sjd.es); phone number: +34 932 804 000 (ext. 82615)

**Abbreviations**

IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$

IGRA, interferon- $\gamma$  release assay

IQR, interquartile range

LTBI, latent tuberculosis infection

QFT-Plus, QuantiFERON-TB Gold-Plus

TB, tuberculosis

TBD, tuberculosis disease

TB1, TB1 QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube

TB2, TB2 QuantiFERON-TB Gold-Plus antigen tube

**Funding**

This work was partially supported by a research grant from the Carlos III Institute of Health, Ministry of

Economy and Competitiveness (Spain), reference PI22/00766, and by the Spanish Society of Pneumology and

Thoracic Surgery, grant numbers 90-2015 and 169-2022.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Conflicts of interest**

Marc TEBRUEGGE has received QuantiFERON assays at reduced pricing or free of charge for tuberculosis diagnostics projects from the manufacturer (Cellestis/Qiagen) in the past and has received support for conference attendance from Cepheid. Begoña SANTIAGO has participated in research projects on tuberculosis diagnostics funded by Cepheid. The manufacturers had no influence on the study design, data collection, analysis or interpretation, writing of the manuscript or decision to submit the data for publication. The rest of authors have no conflicts of interest to disclose.

For Review Only

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Abstract**

We studied 295 children (tuberculosis disease, n=159; latent tuberculosis infection, n=136) with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay results. No significant differences between first and second antigen tube interferon-gamma responses were detected, irrespective of patient and disease characteristics. Of patients with a repeat assay after treatment completion (n=65), only 16.9% converted to negative results.

For Review Only

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Introduction

Globally, approximately 1.2 million children develop tuberculosis (TB) disease (TBD) annually [1].

Microbiological confirmation is obtained in fewer than half of pediatric TBD cases. Therefore, the diagnosis is often based on a combination of clinical and radiological findings, epidemiological risk factors, and a positive tuberculin skin test or interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) release assay (IGRA) result. In the absence of clinical and radiological findings, a positive immunodiagnostic TB test indicates presence of latent TB infection (LTBI).

IGRAs are *in vitro* immunoassays based on the detection of IFN- $\gamma$  produced by T-cells in response to stimulation with *Mycobacterium tuberculosis*-specific peptides [2]. In 2016, the fourth-generation QuantiFERON-TB Gold-Plus (QFT-Plus) assay replaced the previous-generation QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay [2]. QFT-Plus consists of 4 tubes: a negative control (nil) tube; a positive control (mitogen) tube; the TB1 antigen tube (TB1), which contains the ESAT-6 and CFP-10 peptide antigens eliciting CD4 T-cell response; and a newly added TB2 antigen tube (TB2), which contains shorter ESAT-6 and CFP-10 peptides designed to detect both CD4 and CD8 T-cell responses [3].

CD8 T-cell responses to TB antigens have been claimed to be enhanced in patients with TBD (compared to LTBI), in those with recent TB exposure and in young children with TBD, potentially increasing the assay's sensitivity in those subgroups of patients [3]. However, data from recent studies in adults and in children indicate that QFT-Plus does not have greater sensitivity than previous-generation assays in patients with TBD or LTBI [2,4]. Furthermore, a recent meta-analysis on previous-generation IGRA assays suggests that changes in antigen responses during or after completion of treatment are of limited use for determining the effectiveness of anti-TB treatment [5]. Currently, longitudinal data on QFT-Plus, especially in children, remain very limited.

This study aimed to determine the specific contribution of TB2 in the diagnosis of TBD and LTBI in children, and to assess changes in QFT-Plus IFN- $\gamma$  responses after completion of anti-TB therapy.

### Methods

We recently reported on the performance of QFT-Plus assay in children and adolescents (<18 years-of-age) at risk of TB infection who underwent a QFT-Plus between September 2016 and June 2020 in Spain, a low-endemic country [6]. This cross-sectional study was performed within the Spanish Pediatric TB Research Network [7,8], for which approval was obtained from the Hospital Carlos III Ethics Committee (Madrid, ref.

1  
2  
3 P13/12). Informed consent was obtained from parents/guardians, and assent from adolescents >11 years-of-  
4  
5 age. Patients with a previous history of TBD or LTBI were excluded from participation.  
6

7 For this particular substudy, we included patients assessed during contact tracing, with clinical or radiological  
8 suspicion of TBD, or undergoing new-entrant screening in whom QFT-Plus yielded a positive result. Patients  
9 studied prior to initiation of immunosuppressive treatment and those without available quantitative QFT-Plus  
10 results were excluded. Patients were categorized according to their final diagnosis as LTBI or TBD. TBD was  
11 further categorized into i) microbiologically-confirmed or unconfirmed, ii) intrathoracic or extrathoracic, and  
12  
13 iii) severe or non-severe. In a subset of patients, QFT-Plus results at diagnosis (baseline) and after completion  
14 of LTBI or TBD treatment were compared. Detailed study methods and definitions have been reported  
15 previously [6].  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 In this report, all TB1 and TB2 IFN- $\gamma$  concentrations (in IU/ml) are background-corrected (i.e., IFN- $\gamma$   
24 concentration in antigen-stimulated tube minus nil tube concentration). Changes in IFN- $\gamma$  responses over time  
25 were categorized as: i) unchanged (IFN- $\gamma$  concentration after treatment completion within +/- 25% of  
26 concentration at baseline), ii) increased (>25% higher), or decreased (>25% lower).  
27  
28  
29

30 Quantitative variables are reported as medians and interquartile ranges (IQR) and categorical variables as  
31 numbers and proportions. Bivariate analyses were performed using Chi-square and Fisher's exact tests for  
32 categorical variables. Since all quantitative variables followed a non-normal distribution (Kolmogorov-  
33 Smirnov), non-parametric statistical tests were used (Mann-Whitney  $U$  test, Kruskal-Wallis test, Wilcoxon  
34 signed-rank test and Pearson correlation coefficient). All statistical analyses were performed with SPSS V24  
35 (IBM; Armonk, NY), with statistical significance defined as a p-value <0.05.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

#### 45 **Results**

46 Of 307 children and adolescents with a positive QFT-Plus assay result at baseline, 12 had to be excluded  
47 (missing quantitative data, n=7; tested prior to immunosuppressive therapy, n=5). The final study population  
48 therefore included 295 patients [57.3% male, median (IQR) age: 10.2 (4.2-14.4) years], comprising 159 TBD and  
49 136 LTBI cases (**Suppl. Table 1**). Of the TBD cases, 121 (76.1%) had isolated intrathoracic disease, 102 (64.2%)  
50 were non-severe, and 75 (47.2%) were microbiologically-confirmed (**Table 1**).  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

58 In the whole cohort, median (IQR) background-corrected TB1 and TB2 IFN- $\gamma$  concentrations were very similar  
59 at baseline: 4.86 (1.87-7.13) vs 4.85 (1.91-7.32) IU/ml, respectively ( $p=0.745$ ). Additional subgroup analyses  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

showed that there were no significant differences between TB1 and TB2 IFN- $\gamma$  responses in any of the subgroups analyzed (**Table 1**). Only 3 TBD patients (1.9%) and 6 LTBI patients (4.4%) showed a TB1-/TB2+ result constellation (i.e. background-corrected IFN- $\gamma$  concentration in TB1 below positive cut-off of 0.35 IU/ml, but at or above the cut-off in TB2). The remaining patients had TB1+/TB2- [TBD n=2 (1.3%); LTBI n=5 (3.7%)] or TB1+/TB2+ [TBD n=154 (96.8%); LTBI n=125 (91.9%)] result constellations.

In 65 patients QFT-Plus assays were repeated after completion of anti-TB treatment, comprising 33 TBD cases [median (IQR) interval between assays: 12.2 (7.4-17.6) months] and 32 LTBI cases [12.1 (8.5-21.7) months]. In 11 patients (16.9%; 3 TBD and 8 LTBI patients), the categorical QFT-Plus assay result converted to negative; in the remaining 54 (83.1%) patients the result remained positive. No significant differences in baseline characteristics were observed between patients who converted to a negative QFT-Plus result and those who remained positive (**Suppl. Table 2**). However, median background-corrected TB1 and TB2 responses at baseline were substantially higher in patients who remained positive than in those who converted to a negative assay result, although this did not reach statistical significance.

In the whole sub-cohort of patients with repeat QFT-Plus assays (n=65) and in most subgroups analyzed, background-corrected median TB1 and TB2 responses were both significantly lower after treatment completion than at baseline (**Suppl. Table 3**). Nevertheless, **Figure 1** shows that there was significant variation on an individual patient level, among both TBD and LTBI patients. Notably, TB1 responses remained unchanged or increased in 47.7%, and TB2 responses in 50.8% of patients (**Figure 1**). Further analyses revealed that there was a weak correlation between the magnitude of reduction in TB1 and TB2 responses and the interval duration between first and second QFT-Plus assay (**Suppl. Figure 1**).

## Discussion

This study provides substantial additional data regarding the value of the QFT-Plus TB2 tube in children, as well as longitudinal data in children treated for LTBI or TBD. The first key finding is that TB2 responses did not differ significantly from TB1 responses in the whole cohort, as well as several well-defined subgroups based on patient and disease characteristics, indicating that the newly-added antigen tube only has limited impact on test performance. Secondly, only a small proportion (16.9%) of patients converted to a negative QFT-Plus result after treatment completion; furthermore, only approximately half of the patients showed a significant decline in TB1 or TB2 responses (52.3% and 49.2%, respectively) between baseline and completion of TB



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

treatment. Both observations highlight that the QFT-Plus assay is not suitable as a tool for monitoring treatment response.

The main rationale for including an additional, second antigen tube eliciting CD8 T-cell responses into the QFT-Plus assay was that this might enhance assay performance in patients with TBD, based on adult studies showing that patients with TBD have higher levels of TB-specific CD8 T-cells than those with LTBI [9]. However, in our cohort fewer than 2% of TBD patients had background-corrected IFN- $\gamma$  concentrations in TB2 above the positive cut-off and simultaneously IFN- $\gamma$  concentrations below that threshold in TB1, consequently rendering the overall test result positive based on TB2 alone. All remaining patients would have had a positive result if the TB1 tube had been used alone. Also, we found no significant difference between TB1 and TB2 responses in children with TBD overall, as well as subgroups stratified by disease severity, disease site, and microbiological confirmation status. Those observations indicate that the TB2 tube does not enhance assay sensitivity substantially in pediatric patients with TBD.

With regards to the evolution of QFT-Plus responses during and following anti-TB treatment, conflicting results have been reported by adult studies, with some showing overall significant decreases in IFN- $\gamma$  responses, both in LTBI and TBD patients [10], while others showed no changes [11], or even increased responses [12]. While the majority of patients in our cohort did not convert their categorical result after completion of treatment, median TB1 and TB2 responses were both significantly lower after TB treatment than at baseline in our cohort. However, analyses of individual patient data showed that approximately half of the children with repeat QFT-Plus assay had unchanged or increased antigen responses after completion of treatment, precluding the use of QFT-Plus as a monitoring tool. Overall baseline IFN- $\gamma$  concentrations were lower and the interval between tests longer in patients who converted to a negative QFT-Plus, although this did not reach statistical significance.

In summary, our results show that the added value of TB2 in pediatric patients with LTBI or TBD is marginal, and that the QFT-Plus assay, at least in its current form, cannot be used to monitor treatment response in the short term. Long-term studies would be required to determine how long on average QFT-Plus assays remain positive following completion of treatment.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis report 2022. WHO 2022. Available at: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022/tb-disease-burden>. Accessed 15 January 2023.
2. Shafeque A, Bigio J, Hogan CA, Pai M, Banaei N. Fourth-generation quanti FERON-TB gold plus: What is the evidence? *J Clin Microbiol* **2020** ;58: e01950-19.
3. QIAGEN. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert, 2016. Available at: [http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English\\_QFTPlus\\_ELISA\\_R04\\_022016.pdf](http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English_QFTPlus_ELISA_R04_022016.pdf). Accessed 15 January 2023.
4. Soler-Garcia A, Gamell A, Santiago B, *et al.* Diagnostic Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Plus Assays in Children and Adolescents with Tuberculosis Disease. *J Pediatr* **2020**; 223: 212-215.e1.
5. Pourakbari B, Mamishi S, Benvari S, Mahmoudi S. Comparison of the QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube interferon- $\gamma$  release assays: A systematic review and meta-analysis. *Adv Med Sci* **2019**; 64: 437-443.
6. Soler-Garcia A, Gamell A, Pérez-Porcuna T, *et al.* Performance of QuantiFERON- TB Gold Plus assays in children and adolescents at risk of tuberculosis: a cross-sectional multicentre study. *Thorax* **2022**; 77: 1193-1201.
7. Calzada-Hernández J, Anton J, Martín de Carpi J, *et al.* Dual latent tuberculosis screening with tuberculin skin tests and QuantiFERON-TB assays before TNF- $\alpha$  inhibitor initiation in children in Spain. *Eur J Pediatr* **2023**; 182: 307-317.
8. Martínez-Planas A, Baquero-Artigao F, Santiago B, *et al.* Interferon-Gamma Release Assays Differentiate between Mycobacterium avium Complex and Tuberculous Lymphadenitis in Children. *J Pediatr* **2021**;236 :211-218.e2.
9. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, *et al.* Functional Capacity of Mycobacterium tuberculosis -Specific T Cell Responses in Humans Is Associated with Mycobacterial Load. *J Immunol* **2011**; 187: 2222-2232.
10. Petruccioli E, Chiacchio T, Vanini V, *et al.* Effect of therapy on Quantiferon-Plus response in patients with active and latent tuberculosis infection. *Sci Rep* **2018**; 8: 15626.
11. Kim OH, Jo KW, Park S, *et al.* Comparison of the change in QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube results after preventive therapy for latent tuberculosis infection. *PLoS*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

One **2020**; 15: e0234700.

12. Chedid C, Kokhraidze E, Tukvadze N, *et al.* Relevance of QuantiFERON-TB Gold Plus and Heparin-Binding Hemagglutinin Interferon- $\gamma$  Release Assays for Monitoring of Pulmonary Tuberculosis Clearance: A Multicentered Study. *Front Immunol* **2021**; 11: 616450.

For Review Only

**Table 1. Background-corrected interferon- $\gamma$  concentration (IU/ml) in TB1 and TB2 antigen tubes according to demographic characteristics, tuberculin skin test result and TB disease characteristics.** Comparisons were done with Mann-Whitney *U* tests. Data are shown as medians (IQRs).

|                          |   | TB1 IFN- $\gamma$<br>concentration | TB2 IFN- $\gamma$<br>concentration | $\Delta$ Difference<br>(TB1 – TB2) | <i>p</i> -value |
|--------------------------|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| Entire cohort            |   | 4.86 (1.87-7.13)                   | 4.85 (1.91-7.32)                   | 0.01                               | 0.745           |
| Diagnosis                | TBD (n=159)                                   | 4.60 (2.31-7.03)                   | 4.60 (2.03-7.34)                   | 0.00                               | 0.778           |
|                          | LTBI (n=136)                                  | 5.08 (1.64-7.33)                   | 4.98 (1.73-7.30)                   | 0.10                               | 0.890           |
| Age                      | < 5 years (n=83)                              | 4.50 (2.42-7.31)                   | 4.41 (2.35-7.34)                   | 0.09                               | 0.859           |
|                          | $\geq$ 5 years (n=212)                        | 4.90 (1.81-7.13)                   | 4.89 (1.83-7.31)                   | 0.01                               | 0.785           |
| Sex                      | Male (n=169)                                  | 4.86 (1.83-6.98)                   | 4.83 (2.03-7.28)                   | 0.03                               | 0.687           |
|                          | Female (n=126)                                | 4.85 (2.23-7.33)                   | 4.91 (1.83-7.35)                   | -0.06                              | 0.998           |
| Patient origin           | Born in Spain (n=178)                         | 4.23 (1.87-6.75)                   | 4.38 (1.83-6.74)                   | -0.15                              | 0.797           |
|                          | Born outside Spain (n=97)                     | 5.28 (1.89-7.17)                   | 5.28 (2.13-7.33)                   | 0.00                               | 0.905           |
|                          | Unknown (n=20)                                | 7.54 (1.61-8.35)                   | 7.17 (2.46-9.10)                   | 0.37                               | 0.779           |
| Family origin            | Native (n=74)                                 | 3.69 (1.63-6.51)                   | 3.63 (1.69-6.39)                   | 0.06                               | 0.962           |
|                          | Non-native (n=192)                            | 5.18 (2.09-7.19)                   | 5.16 (1.85-7.34)                   | 0.02                               | 0.885           |
|                          | Unknown (n=29)                                | 3.56 (1.19-8.22)                   | 4.71 (2.51-8.30)                   | -1.15                              | 0.363           |
| Reason for referral      | Contact tracing (n=139)                       | 4.88 (1.89-7.34)                   | 4.99 (1.93-7.33)                   | -0.11                              | 0.839           |
|                          | Clinical/radiological suspicion of TBD (n=95) | 4.00 (1.86-6.20)                   | 4.32 (1.61-6.62)                   | -0.32                              | 0.875           |
|                          | New-entrant screening (n=61)                  | 5.18 (1.95-7.78)                   | 5.28 (2.25-7.69)                   | -0.10                              | 0.896           |
| Bacillus Calmette-Guérin | Unvaccinated (n=168)                          | 4.90 (2.31-6.89)                   | 4.92 (1.97-6.99)                   | -0.02                              | 0.959           |

|  |  |                  |                  |       |       |
|--|--|------------------|------------------|-------|-------|
| vaccination status                               | Vaccinated (n=64)                      | 3.56 (1.41-6.87) | 3.37 (1.45-7.31) | 0.19  | 0.877 |
|  | Unknown (n=63)                         | 5.78 (1.67-8.17) | 5.96 (3.20-8.27) | -0.18 | 0.526 |
| Tuberculin skin test result                      | Negative (n=22)                        | 3.09 (1.05-6.63) | 3.83 (1.27-7.12) | -0.74 | 0.690 |
|  | Positive (n=225)                       | 5.07 (1.91-7.17) | 4.99 (1.98-7.33) | 0.08  | 0.748 |
|  | Not done (n=48)                        | 4.72 (2.26-7.59) | 3.72 (1.69-7.24) | 1.00  | 0.881 |
| TBD severity <sup>a</sup>                        | Non-severe (n=102)                     | 5.50 (2.76-7.44) | 5.56 (2.63-7.94) | -0.06 | 0.743 |
|  | Severe (n=54)                          | 3.08 (1.44-5.76) | 3.28 (1.37-5.74) | -0.20 | 0.993 |
|  | Unknown (n=3)                          | 2.44 (0.83-2.44) | 1.83 (1.76-1.83) | 0.61  | 1.000 |
| TBD location <sup>a</sup>                        | Intrathoracic only (n=121)             | 4.90 (2.43-7.07) | 4.88 (2.39-7.34) | 0.02  | 0.839 |
|  | Extrathoracic +/- intrathoracic (n=38) | 2.99 (1.17-6.86) | 3.71 (1.05-6.86) | -0.72 | 0.815 |
| Microbiological confirmation of TBD <sup>a</sup> | Unconfirmed (n=84)                     | 4.62 (2.73-7.11) | 4.52 (2.32-7.31) | 0.10  | 0.987 |
|  | Confirmed (n=75)                       | 4.50 (1.86-6.91) | 4.88 (1.83-7.40) | -0.38 | 0.718 |

<sup>a</sup>Data refer to TBD patients only.

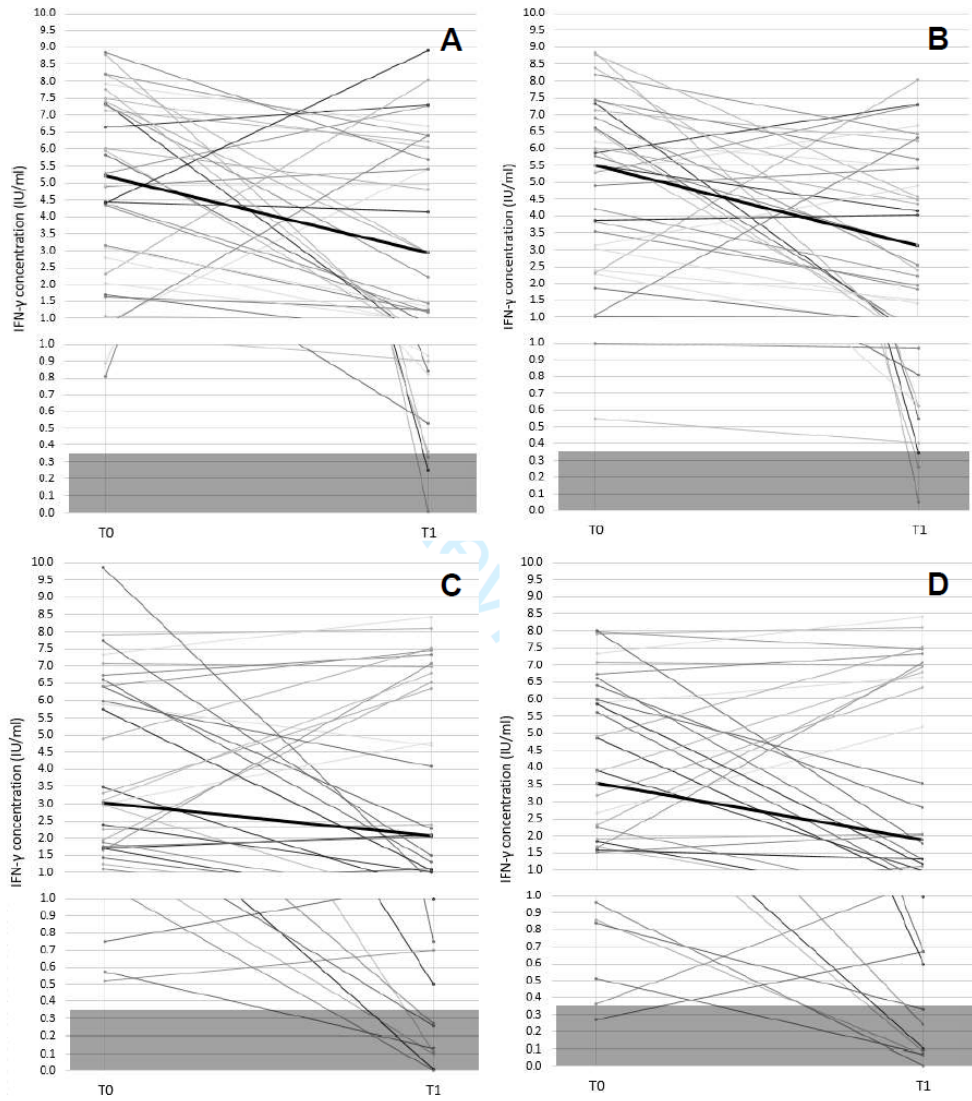
1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Figure 1.** Background-corrected IFN- $\gamma$  concentrations (IU/ml) at baseline (T0) and after completion of anti-TB treatment (T1) in patients with tuberculosis disease (Panel A: QFT-Plus TB1 tube; Panel B: QFT-Plus TB2 tube) and in patients with latent tuberculosis infection (Panel C: QFT-Plus TB1 tube; Panel D: QFT-Plus TB2 tube). Bold lines represent the medians and regular lines the data of individual patients. The shaded areas indicate concentrations that are categorized as negative according to the manufacturer (<0.35 IU/ml). Changes in IFN- $\gamma$  concentrations over time are shown in the table: i) unchanged (IFN- $\gamma$  concentration after treatment completion within +/- 25% of concentration at baseline), ii) increased (>25% higher), or decreased (>25% lower).

IFN- $\gamma$  = Interferon gamma; IU = international unit; LTBI = latent tuberculosis infection; TBD = tuberculosis disease.

For Review Only

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



|                |     | LTBI (n=32) | TBD (n=33) | Total (n=65) |
|----------------|-----|-------------|------------|--------------|
| Decrease > 25% | TB1 | 15 (46.9%)  | 19 (57.6%) | 34 (52.3%)   |
|                | TB2 | 15 (46.9%)  | 17 (51.5%) | 32 (49.2%)   |
| +/- 25%        | TB1 | 8 (25.0%)   | 9 (27.3%)  | 17 (26.2%)   |
|                | TB2 | 9 (28.1%)   | 11 (33.3%) | 20 (30.8%)   |
| Increase > 25% | TB1 | 9 (28.1%)   | 5 (15.2%)  | 14 (21.5%)   |
|                | TB2 | 8 (25.0%)   | 5 (15.2%)  | 13 (20.0%)   |

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**Appendix 1. Additional members of the QFT-Plus Study Group of the Spanish Pediatric TB Research Network (pTBred)**

Elena COLINO (Complejo Hospitalario Universitario Insular Materno Infantil de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, Spain); David GÓMEZ-PASTRANA (Hospital de Jerez de la Frontera, Jerez de la Frontera, Spain); María MONTERO, Estrella PEROMINGO (Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain); Miguel LAFUENTE-HIDALGO (Hospital Universitario Miguel Servet, Zaragoza, Spain); Elisenda MOLINER (Hospital Sant Pau, Barcelona, Spain); Teresa VALMANYA, (Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain); Marina FENOY, Marta VELÁZQUEZ, María Queralt SOLER-CAMPINS (Hospital Consorci de Terrassa, Terrassa, Spain); Lourdes GARCIA (Hospital de Mataró, Mataró, Spain); Rebeca LAHOZ, Olga CALAVIA (Hospital Joan XXIII, Tarragona, Spain); María Teresa PASCUAL (Hospital Sant Joan, Reus, Spain); Antoni SORIANO-ARANDES, Andrea MARTÍN-NALDA, Pere SOLER-PALACÍN (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain); Miguel LILLO (Hospital de Albacete, Albacete, Spain); Marta DAPENA (Hospital General de Castelló, Castelló de la Plana, Spain); Eva María LÓPEZ-MEDINA (Hospital la Fe, Valencia, Spain); Marta RUIZ-JIMÉNEZ (Hospital de Getafe, Getafe, Spain); Ángel HERNÁNDEZ, María Jesús RUIZ-SERRANO, Elvira COBO-VÁZQUEZ, María del Mar SANTOS, Teresa HERNÁNDEZ-SAMPELAYO (Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain); Alfredo TAGARRO (Hospital Infanta Sofía, Madrid, Spain); Ana MÉNDEZ-ECHEVARRÍA, María José MELLADO, Fernando BAQUERO-ARTIGAO, Cristina CALVO (Hospital La Paz, Madrid, Spain); Javier ÁLVAREZ, Marta Taida GARCÍA ASCASO, Enrique VILLALOBOS (Hospital del Niño Jesús, Madrid, Spain); María Luz GARCÍA-GARCÍA (Hospital Severo Ochoa, Madrid, Spain); María Isabel GARROTE-LLANOS, Joseba REMENTERÍA (Hospital de Basurto, Bilbao, Spain); Laia SÁNCHEZ-TORRENT (Hospital de Sant Boi, Sant Boi de Llobregat, Spain); Milagros GARCÍA-HORTELANO (Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain).



*Supplementary Table 1. Baseline characteristics of the study participants according to their final diagnosis. Comparisons were done with Chi square test. Data are shown as numbers (percentages).*

| Final diagnosis     |  | TBD (n=159) | LTBI (n=136) | Total (n=295) | p-value |
|---------------------|--|-------------|--------------|---------------|---------|
| Age                 | < 5 years                              | 70 (44.0)   | 13 (9.6)     | 83 (28.1)     | <0.001  |
|                     | ≥ 5 years                              | 89 (56.0)   | 123 (90.4)   | 212 (71.9)    |         |
| Sex                 | Male                                   | 76 (47.8)   | 93 (68.4)    | 169 (57.3)    | <0.001  |
|                     | Female                                 | 83 (52.2)   | 43 (31.6)    | 126 (42.7)    |         |
| Patient origin      | Born in Spain                          | 119 (74.8)  | 59 (43.4)    | 178 (60.3)    | <0.001  |
|                     | Born outside Spain                     | 39 (24.5)   | 58 (42.6)    | 97 (32.9)     |         |
|                     | Unknown*                               | 1 (0.6)     | 19 (14.0)    | 20 (6.8)      |         |
| Family origin       | Native                                 | 41 (25.8)   | 33 (24.3)    | 74 (25.1)     | 0.781   |
|                     | Non-native                             | 110 (69.2)  | 82 (60.3)    | 192 (65.1)    |         |
|                     | Unknown*                               | 8 (5.0)     | 21 (15.4)    | 29 (9.8)      |         |
| Reason for referral | Contact tracing                        | 64 (40.3)   | 75 (55.1)    | 139 (47.1)    | <0.001  |
|                     | Clinical/radiological suspicion of TBD | 85 (53.5)   | 10 (7.4)     | 95 (32.2)     |         |
|                     | New-entrant screening                  | 10 (6.3)    | 51 (37.5)    | 61 (20.7)     |         |
| BCG status          | Unvaccinated                           | 117 (73.6)  | 51 (37.5)    | 168 (56.9)    | <0.001  |
|                     | Vaccinated                             | 24 (15.1)   | 40 (29.4)    | 64 (21.7)     |         |
|                     | Unknown*                               | 18 (11.3)   | 45 (33.1)    | 63 (21.4)     |         |
| TST result          | Negative                               | 10 (6.3)    | 12 (8.8)     | 22 (7.5)      | 0.216   |
|                     | Positive                               | 133 (83.6)  | 92 (67.6)    | 225 (76.3)    |         |
|                     | Not done*                              | 16 (10.1)   | 32 (23.5)    | 48 (16.3)     |         |

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guérin; LTBI = latent tuberculosis infection; TBD = tuberculosis disease; TST= tuberculin skin test.

\*Not included in the statistical analysis.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

**Supplementary Table 2. Comparison between participants who reverted to a negative QFT-Plus result after completion of anti-TB treatment and those who remained positive. Comparisons were done with Chi square and Mann-Whitney *U* tests. Data are shown as numbers (%), except where stated otherwise.**

|  |  | QFT-Plus result after anti-TB treatment |                  | p-value |
|--|--|---|------------------|---------|
|  |  | Positive (n=54)                         | Negative (n=11)  |         |
| Median (IQR) interval between tests, in months       |  | 10.4 (7.5-19.0)                         | 19.6 (8.4-21.9)  | 0.294   |
| Median (IQR) TB1 concentration at baseline, in IU/ml |  | 5.10 (2.39-6.64)                        | 1.82 (0.86-6.62) | 0.167   |
| Median (IQR) TB2 concentration at baseline, in IU/ml |  | 4.89 (2.29-6.81)                        | 1.89 (1.25-7.34) | 0.278   |
| Diagnosis  | TBD                                    | 30 (90.9)                               | 3 (9.1)          | 0.087   |
|  | LTBI                                   | 24 (75.0)                               | 8 (25.0)         |         |
| Age  | < 5 years                              | 20 (83.3)                               | 4 (16.7)         | 1.000   |
|  | ≥ 5 years                              | 34 (82.9)                               | 7 (17.1)         |         |
| Sex  | Male                                   | 32 (86.5)                               | 5 (13.5)         | 0.509   |
|  | Female                                 | 22 (78.6)                               | 6 (21.4)         |         |
| Patient origin                                       | Born in Spain                          | 36 (80.0)                               | 9 (20.0)         | 0.480   |
|  | Born outside Spain                     | 18 (90.0)                               | 2 (10.0)         |         |
| Family origin  | Native                                 | 15 (75.0)                               | 5 (25.0)         | 0.292   |
|  | Non-native                             | 39 (86.7)                               | 6 (13.3)         |         |
| Reason for referral                                  | Contact tracing                        | 36 (85.7)                               | 6 (14.3)         | 0.188   |
|  | Clinical/radiological suspicion of TBD | 16 (84.2)                               | 3 (15.8)         |         |
|  | New-entrant screening                  | 2 (50.0)                                | 2 (50.0)         |         |
| BCG status   | Unvaccinated                           | 39 (81.3)                               | 9 (18.8)         | 1.000   |
|  | Vaccinated                             | 13 (86.7)                               | 2 (13.3)         |         |
|  | Unknown*                               | 2 (100)                                 | 0 (0.0)          |         |
| TST result   | Negative                               | 3 (75.0)                                | 1 (25.0)         | 0.559   |
|  | Positive                               | 47 (82.5)                               | 10 (17.5)        |         |
|  | Not done*                              | 4 (100)                                 | 0 (0.0)          |         |
| TBD severity†  | Non-severe                             | 21 (91.3)                               | 2 (8.7)          | 1.000   |
|  | Severe                                 | 9 (90.0)                                | 1 (10.0)         |         |
| TBD location†  | Intrathoracic only                     | 24 (88.9)                               | 3 (11.1)         | 1.000   |
|  | Extrathoracic +/- intrathoracic        | 6 (100)                                 | 0 (0.0)          |         |
| Microbiological confirmation of TBD†                 | Unconfirmed                            | 15 (88.2)                               | 2 (11.8)         | 1.000   |
|  | Confirmed                              | 15 (93.7)                               | 1 (6.3)          |         |

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guérin; LTBI = latent tuberculosis infection; TBD = tuberculosis disease; TST= tuberculin skin test.

\*Not included in the statistical analysis.

†Data refer to TBD patients only.

**Supplementary table 3. Comparison of background-corrected interferon- $\gamma$  concentrations at baseline and after completion of anti-TB treatment.** Comparisons were done with Wilcoxon signed-rank tests. LTBI treatment comprised isoniazid (H) and rifampicin (R) for 3 months, n=30; H for 6 months or R for 4 months, n=1 each. Standard TBD treatment regimens (HR and pyrazinamide with or without ethambutol in the intensive phase; HR in the continuation phase) were used in 30 patients; regimens including second-line drugs were used in 3 patients. Data are shown as medians (IQRs).

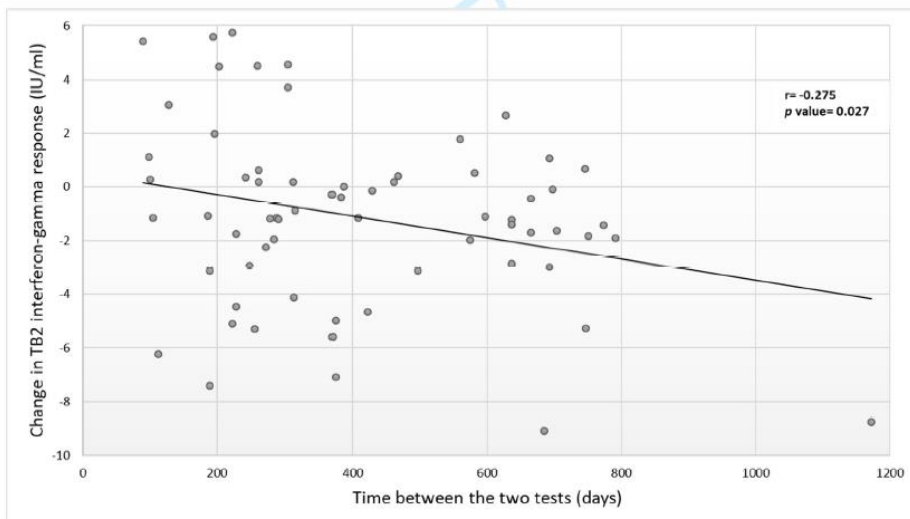
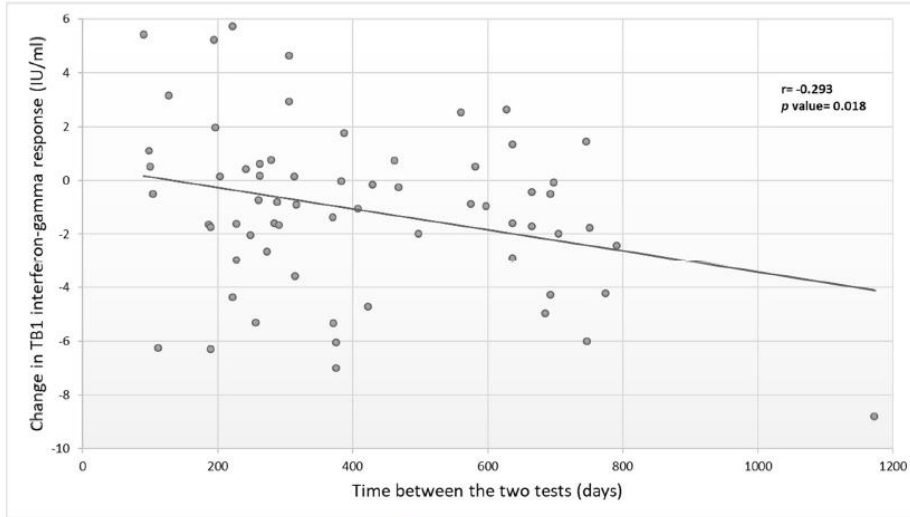
|                                      | IFN- $\gamma$ concentration in TB1            |                  |                        |              |              | IFN- $\gamma$ concentration in TB2 |                  |                        |              | TB2 minus TB1 IFN- $\gamma$ levels |                    |         |
|--------------------------------------|---|------------------|------------------------|--------------|--------------|------------------------------------|------------------|------------------------|--------------|------------------------------------|--------------------|---------|
|                                      | At baseline                                   | After treatment  | $\Delta$<br>Difference | p-value      |              | At baseline                        | After treatment  | $\Delta$<br>Difference | p-value      | At baseline                        | After treatment    | p-value |
| Entire cohort                        | 4.88 (2.08-6.62)                              | 2.41 (0.67-6.33) | 2.47                   | <b>0.004</b> |              | 4.43 (1.92-6.89)                   | 2.27 (0.83-6.37) | 2.16                   | <b>0.005</b> | 0.00 (-0.15-0.39)                  | 0.00 (-0.10-0.06)  | 0.299   |
| Diagnosis                            | TBD (n=33)                                    | 5.50 (3.08-7.02) | 3.11 (0.89-5.58)       | 2.39         | <b>0.003</b> | 5.19 (2.95-7.37)                   | 2.94 (0.92-6.14) | 2.25                   | <b>0.009</b> | 0.00 (-0.17-0.54)                  | 0.00 (-0.22-0.19)  | 0.355   |
|                                      | LTBI (n=32)                                   | 3.53 (1.59-6.29) | 1.89 (0.62-6.91)       | 1.64         | 0.340        | 3.04 (1.70-6.39)                   | 2.07 (0.56-6.73) | 0.97                   | 0.258        | 0.00 (-0.13-0.24)                  | 0.00 (-0.09-0.03)  | 0.587   |
| Age                                  | < 5 years (n=24)                              | 4.77 (2.57-7.14) | 1.88 (0.62-4.45)       | 2.89         | <b>0.002</b> | 5.45 (2.88-7.69)                   | 1.30 (0.77-4.92) | 4.15                   | <b>0.001</b> | 0.09 (-0.05-0.59)                  | -0.01 (-0.34-0.30) | 0.092   |
|                                      | $\geq$ 5 years (n=41)                         | 4.88 (1.84-6.62) | 3.54 (0.90-6.96)       | 1.34         | 0.351        | 3.49 (1.74-6.51)                   | 4.07 (0.92-6.89) | -0.58                  | 0.464        | 0.00 (-0.31-0.21)                  | 0.00 (-0.09-0.01)  | 0.750   |
| Sex                                  | Male (n=37)                                   | 4.86 (1.89-6.21) | 1.81 (0.65-4.78)       | 3.05         | <b>0.003</b> | 4.41 (2.00-6.21)                   | 1.44 (0.79-5.12) | 2.97                   | <b>0.006</b> | 0.06 (0.00-0.50)                   | 0.00 (-0.14-0.18)  | 0.349   |
|                                      | Female (n=28)                                 | 5.41 (2.25-7.44) | 4.74 (1.15-6.66)       | 0.67         | 0.300        | 4.69 (1.91-7.38)                   | 4.82 (1.00-6.48) | -0.13                  | 0.269        | 0.00 (-0.26-0.12)                  | 0.00 (-0.09-0.23)  | 0.668   |
| Patient origin                       | Born in Spain (n=45)                          | 4.88 (2.29-6.62) | 1.81 (0.61-6.00)       | 3.07         | <b>0.004</b> | 4.43 (1.99-6.89)                   | 1.34 (0.62-6.46) | 3.09                   | <b>0.011</b> | 0.00 (-0.26-0.39)                  | 0.00 (-0.09-0.07)  | 0.919   |
|                                      | Born outside Spain (n=20)                     | 4.43 (1.59-6.77) | 2.68 (1.80-6.40)       | 1.75         | 0.391        | 4.25 (1.71-7.01)                   | 2.67 (1.64-6.32) | 1.58                   | 0.218        | 0.12 (0.00-0.38)                   | -0.01 (-0.31-0.01) | 0.067   |
| Family origin                        | Native (n=20)                                 | 4.87 (1.93-6.98) | 1.12 (0.39-7.25)       | 3.75         | 0.156        | 4.19 (1.92-6.98)                   | 1.04 (0.33-7.25) | 3.15                   | 0.145        | -0.06 (-0.68-0.00)                 | 0.00 (-0.06-0.05)  | 0.177   |
|                                      | Non-native (n=45)                             | 4.90 (2.11-6.47) | 2.54 (1.14-5.58)       | 2.36         | <b>0.014</b> | 4.43 (1.86-6.88)                   | 2.40 (1.15-5.56) | 2.03                   | <b>0.015</b> | 0.07 (0.00-0.50)                   | 0.00 (-0.27-0.06)  | 0.429   |
| Reason for referral                  | Contact tracing (n=42)                        | 4.87 (2.16-7.08) | 2.24 (0.90-6.70)       | 2.63         | <b>0.021</b> | 4.63 (2.16-7.31)                   | 2.24 (0.84-6.55) | 2.39                   | <b>0.009</b> | 0.00 (-0.15-0.39)                  | 0.00 (-0.14-0.03)  | 0.215   |
|                                      | Clinical/radiological suspicion of TBD (n=19) | 5.50 (3.12-6.20) | 4.01 (0.67-5.47)       | 1.49         | 0.077        | 4.94 (2.02-6.62)                   | 4.14 (0.93-6.39) | 0.80                   | 0.251        | 0.00 (-0.25-0.48)                  | 0.00 (-0.07-0.10)  | 0.796   |
|                                      | New-entrant screening (n=4)                   | 1.27 (0.87-2.40) | 0.82 (0.08-4.23)       | 0.45         | 0.715        | 1.56 (1.18-2.67)                   | 1.18 (0.06-4.10) | 0.38                   | 1.000        | 0.23 (0.13-0.53)                   | -0.04 (-0.34-0.59) | 0.465   |
| BCG status                           | Unvaccinated (n=48)                           | 5.11 (2.30-6.60) | 2.52 (0.62-6.15)       | 2.59         | <b>0.003</b> | 4.89 (2.09-6.70)                   | 1.86 (0.71-6.48) | 3.03                   | <b>0.007</b> | 0.00 (-0.26-0.39)                  | 0.00 (-0.09-0.06)  | 0.796   |
|                                      | Vaccinated (n=15)                             | 2.67 (1.51-6.90) | 2.06 (1.30-6.42)       | 0.61         | 0.532        | 3.00 (1.63-7.30)                   | 2.21 (1.20-4.77) | 0.79                   | 0.334        | 0.13 (0.00-0.40)                   | -0.01 (-0.33-0.34) | 0.075   |
|                                      | Unknown (n=2)                                 | 5.16 (3.18-5.16) | 6.29 (6.22-6.29)       | -1.13        | 0.655        | 5.22 (3.30-5.22)                   | 6.29 (6.23-6.29) | -1.07                  | 0.655        | 0.06 (0.00-0.06)                   | 0.01 (0.00-0.01)   | 0.655   |
| TST result                           | Negative (n=4)                                | 3.68 (1.17-8.09) | 4.17 (0.55-7.04)       | -0.49        | 0.715        | 4.20 (1.05-8.24)                   | 4.22 (0.52-7.07) | -0.02                  | 0.715        | 0.10 (-0.20-0.65)                  | 0.01 (-0.03-0.08)  | 0.715   |
|                                      | Positive (n=57)                               | 4.86 (2.26-6.58) | 2.41 (0.65-6.29)       | 2.45         | <b>0.005</b> | 4.41 (1.99-6.67)                   | 2.27 (0.79-6.29) | 2.14                   | <b>0.008</b> | 0.00 (-0.15-0.39)                  | 0.00 (-0.14-0.05)  | 0.347   |
|                                      | Not done (n=4)                                | 7.00 (1.71-8.14) | 3.05 (0.94-5.90)       | 3.95         | 0.144        | 6.88 (2.07-8.10)                   | 3.16 (1.20-6.00) | 3.72                   | 0.144        | 0.02 (-0.20-0.37)                  | 0.20 (-0.20-0.45)  | 1.000   |
| TBD severity*                        | Non-severe (n=23)                             | 5.50 (3.84-7.13) | 3.11 (0.97-5.69)       | 2.39         | <b>0.013</b> | 5.30 (4.32-7.40)                   | 2.94 (1.19-6.23) | 2.36                   | <b>0.032</b> | 0.00 (-0.13-0.24)                  | 0.00 (-0.09-0.03)  | 0.526   |
|                                      | Severe (n=10)                                 | 4.49 (2.27-6.70) | 2.94 (0.71-5.71)       | 1.55         | 0.169        | 4.02 (1.54-7.03)                   | 3.08 (0.75-5.65) | 0.94                   | 0.139        | 0.05 (-0.09-0.58)                  | -0.04 (-0.12-0.15) | 0.333   |
| TBD location*                        | Intrathoracic only (n=27)                     | 5.50 (3.03-7.13) | 2.54 (0.97-5.47)       | 2.96         | <b>0.003</b> | 5.19 (2.80-7.40)                   | 2.93 (0.93-6.05) | 2.26                   | <b>0.025</b> | 0.00 (-0.25-0.53)                  | 0.00 (-0.17-0.29)  | 0.726   |
|                                      | Extrathoracic +/- intrathoracic (n=6)         | 5.38 (2.81-6.51) | 5.16 (0.76-6.64)       | 0.22         | 0.753        | 5.45 (4.10-7.03)                   | 5.18 (0.49-6.62) | 0.27                   | 0.345        | 0.02 (-0.04-1.04)                  | -0.02 (-0.27-0.13) | 0.179   |
| Microbiological confirmation of TBD* | Unconfirmed (n=17)                            | 5.77 (3.29-7.24) | 2.22 (0.76-4.36)       | 3.55         | <b>0.003</b> | 5.19 (3.13-7.42)                   | 1.44 (1.05-4.92) | 3.75                   | <b>0.004</b> | 0.07 (-0.38-0.57)                  | 0.00 (-0.25-0.29)  | 0.393   |
|                                      | Confirmed (n=16)                              | 5.31 (2.59-6.16) | 4.69 (0.99-6.39)       | 0.62         | 0.438        | 5.12 (2.22-7.21)                   | 5.18 (0.85-6.60) | -0.06                  | 0.501        | 0.00 (-0.14-0.50)                  | 0.00 (-0.21-0.09)  | 0.683   |

Abbreviations: BCG = Bacillus Calmette-Guérin; IFN- $\gamma$  = interferon- $\gamma$ ; LTBI = latent tuberculosis infection; TBD = tuberculosis disease; TST= tuberculin skin test.

\* Data refer to TBD patients only.

Supplementary Figure 1. Change in background-corrected interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) concentrations between baseline and after completion of anti-TB treatment in the QFT-Plus TB1 tube (upper panel) and TB2 tube (lower panel) according to the time elapsed between both tests, with trend line (Pearson's correlation test).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## 5.4.2 Resum del quart estudi

**Valor del segon tub reactiu del test QuantiFERON-TB Gold-Plus en nens i adolescents amb infecció tuberculosa latent i malaltia tuberculosa a Espanya.**

### Objectius

---

- Determinar la contribució específica del tub TB2 en la capacitat del QFT®-Plus de diagnosticar la TBC i la ITBC, sobretot en els pacients de qui s'espera una major resposta CD8<sup>+</sup> (els de menor edat o alta càrrega bacil·lar).
- Avaluar si el canvi de concentració d'interferó-gamma després d'haver completat la teràpia antituberculosa pot ser un marcador de resposta al tractament.

### Pacients i mètodes

---

- La població de l'estudi és un subgrup de la inclosa al tercer article. Es van seleccionar aquells pacients amb un resultat positiu per al QFT®-Plus i de qui es disposés del resultat quantitatiu el test.
- Els pacients sotmesos al test com a indicació de cribratge previ a l'inici d'un tractament immunosupressor van ser exclosos de l'estudi.
- A alguns pacients se'ls va repetir el test després d'haver completat el tractament contra la TBC o la ITBL.
- En funció del diagnòstic final, es van classificar els pacients en 'TBC' i 'ITBL'.
- La variable principal usada va ser la concentració d'interferó-gamma (CIG) en TB1 i TB2, calculada en unitats internacionals per mil·lilitre (UI/ml) i sostraint-ne el valor en UI/ml del tub nul.

## Resultats

---

### Característiques de la població estudiada

- Van ser inclosos 295 pacients.
- Els subjectes tenien una mediana d'edat de 10,2 anys (RIQ 4,2,14,4 anys) i un 57,3% eren de sexe masculí.
- Hi va haver 136 casos d'ITBL i 159 de TBC (d'entre els quals 75 casos (47,2%) amb confirmació microbiològica).

### Comparació de la concentració d'Interferó-gamma entre TB1 i TB2

- Globalment, la CIG mediana va ser de 4,86 UI/ml (RIQ 1,87-7,13) al TB1 i de 4,85UI/ml (RIQ 1,91-7,32) al TB2.
- La diferència de CIG entre els dos tubs no va ser significativa en el conjunt de pacients ( $p=0,745$ ). Tampoc no ho va ser en cap dels subgrups avaluats, incloent-hi els menors de cinc anys ( $p=0,859$ ) o aquells amb TBC confirmada microbiològicament ( $p=0,718$ ).

### Evolució de la concentració d'Interferó-gamma en el temps

- En 65 pacients (33 amb TBC i 32 amb ITBL) es va repetir el test un cop van finalitzar el tractament farmacològic (mediana de 12 mesos entre els dos tests).
- En 11 pacients (16,9%) el test va negativitzar. No es van identificar variables significativament associades a una major taxa de negativització.
- La CIG va disminuir significativament en el global de pacients tant en TB1 ( $p=0,004$ ) com en TB2 ( $p=0,005$ ). També va presentar una disminució en molts dels subgrups de pacients avaluats.

- Tot i això, el canvi en la CIG va ser altament variable entre pacients. De fet, la CIG va romandre estable o fins i tot va augmentar en el 47,7 i 50,8% dels pacients per al TB1 i al TB2 respectivament.
- La diferència de CIG entre TB2 i TB1 (és a dir, com els nivells de CIG en TB2 disminueixen en el temps respecte els de TB1) no va variar significativament, ni en el global de pacients ( $p=0,299$ ) ni en cap dels subgrups avaluats.
- Finalment, la quantitat de temps transcorregut entre els dos tests es va correlacionar feblement amb el descens de CIG tant en TB1 (coeficient de correlació de Pearson:  $r=0,293$ ,  $p=0,018$ ) com en TB2 ( $r=0,275$ ,  $p=0,027$ ), però no amb la diferència de CIG entre TB2 i TB1.

## Conclusions

---

- Els pacients a qui s'atribueix una resposta CD8<sup>+</sup> (avaluada al TB2) més intensa no van presentar major CIG en TB2 que en TB1.
- La contribució en CIG del TB2 no va ser significativa en cap subgrup avaluat.
- El canvi de CIG un cop finalitzada la teràpia antituberculosa va resultar altament variable, de manera que no sembla que el QFT®-Plus resulti una bona eina per monitoritzar la resposta al tractament.





# DISCUSSIÓ

---

## **6 DISCUSSIÓ**

És habitual que en la població pediàtrica no sigui possible arribar a un diagnòstic microbiològic de tuberculosi activa. Per aquesta raó, i per les implicacions terapèutiques que comporta el diagnòstic de TBC resulta molt important disposar de proves complementàries que ajudin a esclarir si els nens amb clínica suggestiva pateixen la malaltia o no. El test ideal seria aquell que resultés positiu en tots els pacients amb TBC (sensibilitat del 100%) i negatiu en tots aquells que no la pateixen (especificitat del 100%). En el cas de la TBC, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) proposa com a òptim un llindar de sensibilitat per sobre del 95%.<sup>76</sup> Els tests dels quals disposem (PPD i IGRA) disten d'aquests paràmetres ideals, sent, a més, eines que no han estat dissenyades per al diagnòstic de la malaltia activa. Així doncs, no serveixen ni per confirmar la malaltia ni per descartar-la. Tot i això, poden ser d'utilitat a la pràctica clínica habitual a l'hora de reforçar o menystenir una sospita clínica de TBC. El primer punt que es vol abordar és l'anàlisi de la sensibilitat del QFT®-Plus, és a dir, el percentatge de pacients diagnosticats de TBC que presenten un resultat positiu per al test.

### **6.1 Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa**

#### **6.1.1 Sensibilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa**

La sensibilitat del QFT®-Plus per a la malaltia tuberculosa que es va trobar als estudis presentats va ser del 82,9% (IC 95% 77,0-88,8%) al primer i del 83,6% (IC 95% 77,5-88,6%) al tercer. Tal com s'ha esmentat prèviament, són pocs els estudis que han avaluat la sensibilitat del test en població pediàtrica, i menys encara si considerem països de baixa incidència com és Espanya. A la **Taula 3** (pàgina 116) s'hi mostren els estudis publicats fins l'actualitat i les seves característiques principals en comparació al

tercer estudi. Al publicat per Buonsenso *et al.* el 2022 s'hi pren com a mostra pacients pediàtrics de tot Europa reclutats en xarxa, incloent-hi també individus dels nostres estudis.<sup>77</sup>

Es fa difícil comparar els resultats obtinguts al nostre estudi amb els de Kay i Nguyen *et al.*, donada l'alta incidència de TBC a Vietnam i Swazilàndia i a l'alta taxa de coinfecció amb el VIH a Swazilàndia.<sup>71,73</sup> Pel que fa a l'estudi de Kay *et al.*, la baixa taxa de positius entre els pacients amb malaltia no confirmada (19,4%) juntament amb el fet que no se'ls apliqués PPD suggereix que potser molts d'ells no presentaven realment malaltia tuberculosa.<sup>71</sup> D'igual manera, de l'estudi de Borkowska-Tatar *et al.* crida l'atenció la baixa taxa de confirmació microbiològica reportada (tan sols 3 casos confirmats), la qual cosa també fa difícil realitzar comparacions. Per últim, els dos estudis de Buonsenso *et al.* prenen com a base una població amb incidències similars a la d'Espanya (el primer a Itàlia i el segon en pacients de tot Europa). En tots dos s'hi van reportar sensibilitats similars a la presentada pels nostres estudis. Sigui com sigui, creiem important destacar que en el moment de la seva publicació els nostres estudis eren els que havien avaluat la sensibilitat del QFT®-Plus per a malaltia tuberculosa en una cohort pediàtrica més gran.

De l'estudi de Kay *et al.* també cal destacar que d'entre els pacients amb TBC confirmada microbiològicament aquells amb malaltia pulmonar exclusiva presentaven una marcada major sensibilitat (84,2%, IC95% 60,4-96,7%) que els qui presentaven malaltia extrapulmonar (14,3%, IC95% 1,8-42,8%). D'altra banda, en el segon estudi de Buonsenso *et al.* es va identificar una lleugera i no significativa major sensibilitat en pacients amb malaltia pulmonar: 85,8% (IC95% 81,1-89,8%) vs 77,8% (IC95% 67,8-85,9%) en aquells amb malaltia extrapulmonar ( $p=0,07$ ).<sup>77</sup>

**Taula 3: Estudis publicats sobre la sensibilitat del QFT®-Plus per al diagnòstic de la malaltia TBC en Pediatria**

| Primer autor                             | Kay <sup>71</sup>     | Nguyen <sup>73</sup>               | Buonsenso <sup>72</sup> | Borkowska-Tatar <sup>74</sup> | Buonsenso <sup>77</sup> | <i>Tercer estudi</i>  |
|--|-----------------------|------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <b>Any</b>                               | 2019                  | 2019                               | 2020                    | 2021                          | 2022                    | 2021                  |
| <b>País</b>                              | Swazilàndia           | Vietnam                            | Itàlia                  | Polònia                       | <i>Europa</i>           | Espanya               |
| <b>Incidència<sup>1</sup></b>            | 319                   | 176                                | 7                       | 10                            | 25                      | 9                     |
| <b>Casos (MC)</b>                        | 12 (5)                | 126 (33)                           | 12 (10)                 | 22 (3)                        | 358 (182)               | 189 (81)              |
| <b>Positius VIH (%)</b>                  | 42 (13,2)             | 0                                  | 0                       | No reportat                   | No reportat             | 0                     |
| <b>Rang d'edat</b>                       | 0-19 anys             | 0-16 anys                          | 1-17 anys               | 1-14 anys                     | 0-17 anys               | 0-17 anys             |
| <b>Indicació del test</b>                | Sospita clínica       | Sospita clínica                    | Sospita clínica         | Estudi de contactes           | Qualsevol               | Qualsevol             |
| <b>Sensibilitat en (RIQ)</b>             | 41,7%<br>(15,2-72,3%) | 29,6%<br>(20,9-37,3%)              | 83,3%<br>(51,6-97,9%)   | 77,3<br>(54,6-92,2%)          | 83,8%<br>(80,2-87,8%)   | 83,6%<br>(77,5-88,6%) |
| <b>Sensibilitat MC (RIQ)</b>             | 80,0%<br>(28,3-99,5%) | 54,6%<br>(36,4-71,9%)              | 100%<br>(69,2-100%)     | 66,7%<br>(9,4-99,1%)          | 87,4%<br>(81,6-91,8%)   | 90,1%<br>(81,5-95,6%) |
| <b>Sensibilitat 5a<sup>2</sup> (RIQ)</b> | 23,5%<br>(6,8-49,9%)  | 49,7% <sup>3</sup><br>(15,1-72,3%) | No calculat             | No calculat                   | 81,7%<br>(75,2-87,0%)   | 80,9%<br>(77,5-88,6%) |

**MC:** malaltia confirmada microbiològicament; **VIH:** virus de la immunodeficiència humana; **RIQ:** rang interquartílic.

<sup>1</sup>: Incidència anual de tuberculosi en casos per cada 100.000 habitants al conjunt del país.<sup>78</sup>

<sup>2</sup>: Sensibilitat en menors de 5 anys.

<sup>3</sup>: Càlcul realitzat tan sols en pacients amb malaltia confirmada.

Per contra, en el nostre cas, a tots dos estudis es va apreciar una lleugera però no significativa major sensibilitat en pacients amb malaltia extrapulmonar: 92,3% (IC95% 83,6%-100%) vs 79,8% (IC95% 72,5-87,2%) ( $p=0,185$ ) al primer estudi; i 88,1% (IC95% 74,4-96,0%) vs 82,3% (IC95% 75,2-86,9%) ( $p=0,372$ ) al tercer. Sigui com sigui, comparar la sensibilitat del test en TBC extrapulmonar és molt complex, donada l'heterogeneïtat de la malaltia. Així, per exemple, Song *et al.* van objectivar sensibilitats de l'IGRA en malaltia ganglionar molt més altes que en malaltia osteoarticular: 85,7% (IC95% 63,7-97,0%) vs 45,5% (IC95% 16,8-76,6%) ( $p=0,0161$ ).<sup>79</sup> Als estudis d'aquesta tesi hi ha una relatiu baix nombre de pacients a cadascuna de les formes de TBC extrapulmonar, de manera que resulta difícil extreure'n conclusions consistents.

Creiem que és una limitació important dels nostres estudis no haver comparat en la mateixa població el QFT®-Plus amb el seu predecessor QFT®-GIT, fet que permetria esgrimir amb un major detall si la nova versió comporta o no una millora en la sensibilitat. De fet, de les publicacions presentades l'única que va fer un estudi comparatiu va ser la de Kay *et al.*, en què els 12 pacients inclosos van presentar un resultat qualitativament idèntic als dos tests: 4 indeterminats, 3 negatius i 5 positius.

A falta d'enfrontar directament els dos tests, hem fet la comparativa amb estudis amplis que hagin avaluat la sensibilitat del QFT®-GIT en TBC pediàtrica. Fins la data s'han realitzat sis meta-anàlisis d'entre les quals cal destacar-ne tres. La primera es va publicar per Mandalakas *et al.* l'any 2011,<sup>67</sup> aglutinant 31 estudis basats en pacients pediàtrics. D'aquests 31 estudis, en 17 es presentava el càlcul de la sensibilitat del test IGRA per a la TBC, resultant de manera global del 83% (IC95% 75-92%), però del 86% (IC95% 78-94%) quan es tenien compte tan sols els 15 estudis realitzats a països de baixa incidència (Austràlia<sup>80,81</sup>, República de Corea<sup>82</sup>, Itàlia<sup>83,84</sup>, França<sup>85,86</sup>, el Regne Unit<sup>87-89</sup>, Alemanya<sup>90</sup>, Espanya<sup>91</sup>, el Japó<sup>92,93</sup> i els Estats Units d'Amèrica<sup>94</sup>). D'igual manera que als nostres estudis, a aquesta meta-anàlisi s'hi inclouen pacients

tant amb malaltia confirmada com amb malaltia sospitada, però sense realitzar una avaluació separada dels dos grups de pacients. Com a limitacions per fer una comparació adequada cal dir que d'entre els 15 estudis realitzats en països de renda alta, en 2 l'IGRA utilitzat no va ser QFT®-GIT sinó QFT®-G<sup>92,93</sup>, la seva versió prèvia. Excloent els darrers, la xifra total de nens amb TBC a qui es va realitzar el QFT®-GIT va ascendir a 370 casos, el 64% dels quals provenien de tan sols dos estudis.<sup>87,94</sup> La segona meta-anàlisi va ser publicada per Sollai *et al.* l'any 2014.<sup>95</sup> En aquesta ocasió s'hi van incloure nous estudis addicionals realitzats en països de baixa incidència no avaluats a l'anterior meta-anàlisi.<sup>96-104</sup> La sensibilitat va ser del 79% (IC95% 75-82%) quan s'analitzaven exclusivament els estudis realitzats en països de baixa incidència. Com a aportació, es va repetir l'anàlisi prenent tan sols els casos en què la malaltia s'havia confirmat, augmentant la sensibilitat fins al 86% (IC95% 81-90%). Per últim, resulta interessant esmentar la meta-anàlisi presentada per Laurenti *et al.* l'any 2016.<sup>68</sup> No s'hi va incloure cap estudi nou, però destaca perquè es va realitzar en base a publicacions que incloguessin pacients amb malaltia confirmada i a qui s'hagués realitzat PPD, QFT®-GIT i T-SPOT.®TB. La sensibilitat per al QFT®-GIT va ser de 89,6% (IC 95% 79,7%-95,7%), molt similar a la del PPD (88%, IC 95% 79-94%) i a la del T-SPOT.®TB (89%, IC95% 80-94%).

Així, la sensibilitat que mostra el QFT®-Plus resulta similar a la prèviament reportada per al QFT®-GIT en nens amb malaltia tuberculosa, de manera que no sembla que augmenti la taxa de positius entre els malalts.

#### **6.1.1.1 Efecte de l'edat en la sensibilitat per a la malaltia tuberculosa**

Inicialment hi havia fortes reticències a l'hora de fer servir els test IGRA en menors de 5 anys, donat que se sospitava que la sensibilitat del test es reduïa significativament.<sup>105</sup> Tot i això, s'han anat presentant múltiples publicacions que indiquen que aquesta tècnica també pot ser una eina útil en aquest grup d'edat.<sup>106-110</sup>

Pel que fa als nostres estudis, tant al primer com al tercer article es va veure que la sensibilitat del test en menors de 5 anys no era significativament menor que la dels majors de 5 anys (al primer 78,7%, IC95% 69,2-88,2% vs 86,7%, IC95% 79,3-94,2%,  $p=0,389$ ; al tercer 80,9%, IC95% 77,5-88,6% vs 86,0%, IC95% 77,6-92,1%,  $p=0,344$ ). Dels cinc articles previs que han avaluat la sensibilitat del QFT®-Plus en Pediatria a més del nostre, en tres es pot extrapolar la comparació entre majors i menors de 5 anys.<sup>71,73,77</sup> Així, a l'estudi de Nguyen *et al.* la sensibilitat en menors de 5 anys no va ser significativament inferior que la dels majors (41,7% vs 61,9%,  $p=0,261$ ),<sup>73</sup> mentre que Kay *et al.* sí que van reportar una sensibilitat menor en pacients menors de 5 anys (23,5% vs 78,6%,  $p=0,002$ ).<sup>71</sup> El segon estudi de Buonsenso *et al.* va presentar dades similars a les nostres: sensibilitat en menors de 5 anys del 81,7% (IC95% 75,2%-87,0%) i en majors del 86,0% (IC95% 80,0-90,7) ( $p=0,271$ ).<sup>77</sup> En conclusió, són necessaris més estudis per tal de determinar si la sensibilitat del test és menor en els pacients més joves.

Pel que fa a l'estudi de la sensibilitat del QFT®-GIT en menors de 5 anys les dades són així mateix limitades, trobant tan sols vuit estudis realitzats en nens amb TBC en aquesta franja d'edat.<sup>77,90,103,108,109,111-113</sup> Són estudis molt heterogenis pel que fa als criteris d'inclusió (en un d'ells s'inclouen només casos confirmats<sup>90</sup> i en la resta també casos sospitosos), rangs d'edat, nombre de pacients (entre 5 i 331) i països de procedència, i reporten unes sensibilitats compreses entre el 39 i el 93%. Dels vuit estudis, quatre es van realitzar en països de baixa incidència: un estudi francès amb 19 pacients va mostrar una sensibilitat del 79,0% (IC95% 54,4-94,0%)<sup>103</sup>; un d'italià amb 108 pacients, del 89,8% (IC95% 82,5-94,8%)<sup>108</sup>; un d'espanyol amb 38 pacients, del 77,0% (IC95% 60,7-88,9%) en global i del 93,8% (IC95% 69,8-99,8%) si es tenien en compte tan sols els pacients amb malaltia confirmada;<sup>109</sup> i un d'uropeu amb 331 pacients, del 84,9% (IC95% 80,6-88,6%).<sup>77</sup> En qualsevol cas, la sensibilitat del QFT®-

Plus per a diagnosticar TBC en menors de 5 anys no sembla major que la presentada pel QFT®-GIT en poblacions amb incidències de tuberculosi similars.

#### **6.1.1.2 Concordança entre PPD i QFT®-Plus en malaltia tuberculosa**

Resulta important estudiar el comportament creuat dels test PPD i QFT®-Plus quan s'usen en pacients amb sospita de malaltia tuberculosa. No només ho és comparar-los en termes de sensibilitat sinó també en concordança, donat que a major taxa d'acord entre els dos tests, menor seria la indicació de realitzar-los en paral·lel, i viceversa.

En els articles d'aquesta tesi doctoral, la concordança va resultar del 84,3% (índex kappa [ $\kappa$ ] de 0,448) al primer article i del 86,0% (índex  $\kappa$  de 0,472) al tercer. Resulta, per tant, una correlació feble entre els dos tests. A més, el PPD va presentar una sensibilitat similar a la del QFT®-Plus: 82,9% (IC95% 75,8-88,6%) ( $p=0,994$  en comparació amb la sensibilitat del QFT®-Plus) al primer estudi i 84,4% (IC95% 78,1-89,4) ( $p=0,837$ ) al tercer. Dels estudis de QFT®-Plus en pediatria prèviament citats, l'únic en què es va avaluar la concordança entre tots dos tests va ser el dut a terme per Borkowska-Tatar *et al.*, resultant del 81,0% ( $\kappa$  de 0,275). En aquest cas, la sensibilitat del QFT®-Plus va ser de nou similar a la del PPD (95,2%, IC95% 76,2-99,9% vs 77,3%, IC95% 54,6-92,2%;  $p=0,0892$ ).<sup>74</sup> Així doncs, la sensibilitat del QFT®-Plus no sembla superar a la del PPD per al diagnòstic de malaltia tuberculosa en pediatria. A més, el fet que la correlació entre els dos tests sigui feble suggereix que podria ser recomanable aplicar tots dos tests quan se sospiti la malaltia, per tal d'optimitzar la seva potència diagnòstica i reduir les probabilitats de presentar un resultat fals negatiu.

Un cop més, creiem que seria de molta utilitat la realització d'estudis en pacients pediàtrics amb TBC en què s'estudiessin de forma paral·lela el QFT®-GIT, el QFT®-Plus i el PPD. Donat que no hi ha publicacions al respecte, hem comparat els nostres resultats amb els obtinguts en estudis en què es comparava el QFT®-GIT amb el PPD.



En la majoria de les meta-anàlisis realitzades per avaluar el QFT®-GIT en pediatria es comparava la seva sensibilitat per diagnosticar la malaltia activa amb la del PPD. La majoria d'aquests resultats van mostrar diferències de sensibilitat entre els dos tests molt petites, de manera semblant al que hem descrit en el cas del QFT®-Plus. Així, en la meta-anàlisi de Laurenti *et al.* la sensibilitat va ser del 88,2% (IC95% 79,4-94,2%) per al PPD i del 89,6% (IC95% 79,7-95,7%) per al QFT®-GIT;<sup>68</sup> a la de Sollai *et al.* va ser del 78% (IC95% 70-84%) i 76% (IC95% 68-83%) respectivament;<sup>95</sup> a la de Chiappini *et al.*, de 82,3% (IC95% 71,5-93,1%) i 79,2% (IC95% 69,6%-88,1%);<sup>114</sup> i a la de Mandalakas *et al.*, de 81% (IC95% 73-90%) i 86% (IC95% 78-94%).<sup>67</sup> Aquesta semblança en les sensibilitats es va mantenir en avaluar tan sols els casos confirmats microbiològicament: 85% (IC95% 79-90%) vs 85% (IC95% 77-91%) en Sun *et al.*;<sup>115</sup> 85,7% (IC95% 76,1-95,4%) vs 89,7% (83,4-96,0%) en Chiappini *et al.*;<sup>114</sup> i 79% (IC95% 75-83%) vs 81% (IC95% 76-85%) en Sollai *et al.* <sup>95</sup> A la darrera, la sensibilitat entre tests va ser semblant també en avaluar tan sols estudis realitzats en població de països de baixa incidència: 78% (IC95% 74-82%) vs 79% (IC95% 75-82%) en global i 86% (IC95% 79-91%) vs 86% (IC95% 81-90%) en casos confirmats.

Per altra banda, són diverses les publicacions en què s'han realitzat els dos tests (QFT®-GIT i PPD) de manera simultània en nens amb malaltia activa, tot i que són heterogenis en nombre de pacients i criteris de positivitat. Així, per exemple, en els estudis de Kampmann *et al.* i Bamford *et al.* es va considerar positiu el PPD quan presentava una induració major als 15mm.<sup>87,88</sup> En qualsevol cas, els estudis amb major nombre de pacients procedents de països de baixa incidència mostren concordances semblants a les descrites entre el QFT®-Plus i el PPD, tal i com es mostra a la **Taula 4** (pàgina 122). De tots ells, l'únic en què es va tenir en compte l'antecedent de vacunació amb BCG va ser el presentat per Tsolia *et al.*, objectivant un percentatge de resultats

**Taula 4: Estudis publicats sobre la correlació entre QFT®-GIT i PPD en pacients pediàtrics amb malaltia tuberculosa en països de baixa incidència**

| Primer autor                  | Chiappini <sup>116</sup> | Bamford <sup>87</sup> | Kampmann <sup>88</sup> | Velasco-Arnaiz <sup>109</sup> | Tsolia <sup>97</sup>    | Detjen <sup>90</sup>    | Chiappini <sup>99</sup> | Domínguez <sup>91</sup> | Grare <sup>85</sup>    |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| <b>Any</b>                    | 2019                     | 2010                  | 2009                   | 2018                          | 2010                    | 2009                    | 2012                    | 2008                    | 2010                   |
| <b>País</b>                   | Itàlia                   | Regne Unit            | Regne Unit             | Espanya                       | Grècia                  | Alemanya                | Itàlia                  | Espanya                 | França                 |
| <b>Incidència<sup>1</sup></b> | 7                        | 7                     | 7                      | 9                             | 5                       | 6                       | 7                       | 9                       | 8                      |
| <b>Casos (MC)</b>             | 205 (83)                 | 195 (49)              | 91 (25)                | 37 (15)                       | 34 (11)                 | 28 (28)                 | 25 (5)                  | 9 (9)                   | 5 (3)                  |
| <b>Cor. % (κ)</b>             | 87,6 (0,368)             | 78,3 (0,540)          | 80,5 (0,610)           | 92,1 (0,725)                  | 88,2 (NC <sup>2</sup> ) | 92,9 (NC <sup>2</sup> ) | 84,0 (0,606)            | 66,7 (NC <sup>2</sup> ) | 80,0 (0,545)           |
| <b>Cor. MC, % (κ)</b>         | 88,9 (0,403)             | 81,0 (0,410)          | 86,4 (0,490)           | 100 (NC <sup>2</sup> )        | 90,9 (NC <sup>2</sup> ) | 92,9 (NC <sup>2</sup> ) | 20,0 (NC <sup>2</sup> ) | 66,7 (NC <sup>2</sup> ) | 100 (NC <sup>2</sup> ) |

**Cor. % (κ):** Percentatge de casos amb resultats concordants entre QFT®-GIT i PPD (entre parèntesi l'índex kappa). **Cor. MC, % (κ):** Percentatge de casos amb resultats concordants entre QFT®-GIT i PPD d'entre els pacients amb confirmació microbiològica (entre parèntesi l'índex kappa). **NC:** No calculable.

<sup>1</sup>: Incidència anual de tuberculosi en casos per cada 100.000 habitants al conjunt del país.<sup>78</sup>

<sup>2</sup> No calculable per absència de pacients amb resultat negatiu per a ambdós tests

concordants del 100% en pacients no vacunats i del 62,5% en els que sí que ho estaven.<sup>97</sup>

Així doncs, no sembla que el QFT®-Plus en nens amb malaltia tuberculosa presenti una millor correlació amb el PPD que el seu predecessor.

## **6.1.2 Especificitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la malaltia tuberculosa**

### **6.1.2.1 Justificació de la metodologia emprada i resultats**

La importància de fer servir un test amb la màxima especificitat rau en l'objectiu de reduir la taxa de falsos positius i evitar així l'administració de tractaments innecessaris en pacients sense TBC. Tal com s'ha reiterat, ni els tests IGRA en general ni el QFT®-Plus en particular s'han dissenyat per al diagnòstic de la malaltia activa. Tot i això, estudiar-ne l'especificitat en la població pediàtrica resulta important per determinar fins a quin punt pot ser una eina de suport fiable per als clínics.

La població avaluada al nostre estudi per tal de determinar l'especificitat del test van ser pacients sotmesos al QFT®-Plus per sospita de malaltia tuberculosa, l'evolució clínica i les proves complementàries dels quals van suggerir finalment que no patien TBC, ja fos per la remissió de la simptomatologia sense tractament antituberculós o perquè es va arribar a un diagnòstic alternatiu al de TBC que justificava la clínica que havia motivat la realització inicial del test. Aquesta metodologia difereix de la de la majoria d'estudis previs, en què es definia l'especificitat com a percentatge de resultats negatius d'entre pacients asimptomàtics sense factors de risc coneguts de tuberculosi. Aquesta definició, però, té dues limitacions importants. Per una banda, no respon a la cerca d'especificitat de la TBC sinó a la de la ITBL, de manera que no s'ajusta a la situació clínica d'estudiar un pacient amb simptomatologia suggestiva de TBC. D'altra banda, la ja reiterada absència de *gold standard* per al diagnòstic d'ITBL implica assumir una sèrie de consideracions que comporten un risc molt important de biaix

ahora de parlar de falsos positius per al QFT®-Plus, i és que per més baix que sigui el risc teòric d'ITBL, no deixa de tractar-se d'una patologia definida, en la majoria de casos, per la positivitat d'un test immunodiagnòstic. Prèviament, Sester *et al.* van publicar el 2011 una meta-anàlisi en què estudiaven l'especificitat del QFT®-GIT en pacients adults.<sup>65</sup> Tal com es va fer al segon estudi, els pacients no van ser seleccionats per no tenir factors de risc d'ITBL sinó per presentar signes suggestius de TBC però havent rebut un diagnòstic alternatiu. El resultat obtingut va ser el d'una especificitat del 79% (IC95%75-82%), marcadament més baixa que la definida per estudis previs.

En base a aquesta definició, en el nostre estudi, es va observar una especificitat per a TBC del 91,5% (IC 95% 86,2-95,3%) en una cohort de 182 pacients. No es va veure que l'antecedent de vacunació amb BCG es relacionés amb el grau d'especificitat. D'altra banda, el valor predictiu negatiu del test va resultar del 92,1% (IC95% 86,8-95,7%).

De tots els estudis que han avaluat el QFT®-Plus en pediatria més enllà dels de la present tesi, només en dos s'ha disposat d'un grup control per a poder calcular l'especificitat del test. A l'estudi de Borkowska-Tatar *et al.* es van classificar els pacients sotmesos al QFT®-Plus en funció de si havien presentat contacte domiciliari amb un malalt bacil·lífer o no.<sup>74</sup> D'entre els 54 que no en presentaven s'hi van incloure tant pacients estudiats per sospita clínica o radiològica de TBC com d'altres sotmesos a cribratge prèviament a l'inici d'un tractament immunosupressor. Així doncs, es van incloure al mateix grup pacients amb sospita de TBC i d'altres en què es volia descartar una ITBL, sense especificar el nombre d'individus de cada subgrup. En qualsevol cas, d'aquests 54 pacients, 46 van ser classificats com a no infectats, dels quals 45 van presentar un resultat negatiu per al test i un, un resultat indeterminat. Així doncs, tenint en compte que, excloent el pacient amb resultat indeterminat, dels 45

pacients amb sospita clínica però sense TBC tots presenten un resultat negatiu, això traduiria una especificitat del 100% (IC95% 92,1-100%). Tot i això, la comparació amb el nostre estudi queda limitada per la inclusió d'un nombre no especificat de pacients sense sospita de malaltia activa. L'altre estudi és el de Buonsenso *et al.* D'una manera similar a com s'ha descrit al segon article de la tesi, s'hi van incloure 43 pacients amb sospita de TBC, dels quals 31 van presentar un diagnòstic alternatiu a la malaltia. D'entre els darrers, 27 van presentar un resultat negatiu per al test i 4 un resultat indeterminat, la qual cosa comporta una especificitat del 100% (IC95% 87,2-100%). El valor predictiu negatiu del QFT®-Plus, per la seva banda, va resultar del 93,1% (IC95% 77,2-99,1%).<sup>72</sup> Així doncs, el segon estudi d'aquesta tesi és fins al moment, el que més pacients ha inclòs per tal d'estudiar l'especificitat del QFT®-Plus en pediatria.

No hi ha estudis en nens que hagin avaluat l'especificitat dels tests IGRA aplicant el QFT®-GIT i el QFT®-Plus al mateix grup de pacients, de manera que no és possible fer-ne una comparació directa. Tot i això, en cinc de les meta-anàlisis que han estudiat el QFT®-GIT en pediatria s'ha calculat l'especificitat combinada dels estudis que en formen part.<sup>67,68,95,114,115</sup> L'especificitat descrita varia des del 91% (IC95% 78-100%) de Mandalakas *et al.* fins al 100% (IC95% 84-100%) de Sun *et al.*, observant-se en ambdós casos intervals de confiança amplis.<sup>67,115</sup> De tota manera, l'única de les meta-anàlisis en què s'especifica el criteri seguit a l'hora de definir el grup control per al càlcul de l'especificitat és la publicada per Mandalakas *et al.*<sup>67</sup> s'hi van incloure tant pacients amb símptomes de TBC en qui es descarta finalment la malaltia com pacients avaluats per estudi de contactes. A més, alguns dels estudis es basen en el QFT®-G, la versió prèvia del QFT®-GIT.<sup>93,117</sup> Així, les meta-anàlisis realitzades no ens són útils per comparar llurs dades d'especificitat amb les objectivades al segon estudi. Davant d'això, s'ha realitzat l'anàlisi comparativa directament amb els estudis que en formen part, així com amb d'altres publicacions no recollides a cap de les meta-anàlisis.

D'aquesta manera, s'han revisat vint-i-quatre estudis que avaluen l'especificitat del QFT®-GIT en Pediatria. El més determinant alhora de determinar la comparabilitat amb l'estudi de la present tesi és analitzar quin és el grup control de pacients sobre què es calcula l'especificitat. Cinc d'ells es basen en pacients estudiats per estudi de contactes però que han presentat un resultat negatiu per al PPD, interpretació que implica assumir el PPD com a prova *gold standard* per a la ITBL.<sup>85,86,96,97,118</sup> Cal puntualitzar que d'entre els darrers, el de Tsolia *et al.* seleccionava tan sols aquells pacients amb un contacte poc estret. D'altra banda, Thomas *et al.* calculen l'especificitat en pacients amb contacte de risc però sense diagnòstic d'ITBL, d'acord amb el criteri personal dels clínics que tractaven els pacients.<sup>119</sup> D'altres tres estudis analitzen conjuntament tant pacients asimptomàtics estudiats per un contacte de risc i amb un resultat negatiu per al PPD (en qui, per tant, s'estudia la ITBL) com d'altres amb clínica suggestiva de TBC però amb un diagnòstic alternatiu.<sup>81,84,99</sup> D'altra part, set estudis prenen com a base pacients asimptomàtics sense història de contacte de risc. Les marcades diferències epidemiològiques dels països en què es van realitzar justifiquen les grans diferències de pacients amb resultat positiu. Així, el 37,8% de pacients de Dayal *et al.*, de l'Índia, van presentar un resultat positiu en contra del 0% dels pacients de Lighter *et al.*, dels Estats Units.<sup>82,86,94,120-123</sup>

Més propers al model defensat al segon article de la tesi se situen onze publicacions, en què es buscava el percentatge de pacients amb un resultat positiu d'entre els avaluats per sospita clínica però sense diagnòstic final de TBC. D'entre ells, però, els publicats per Moyo i Jenum *et al.* s'han exclòs de la comparació donat que incloïen a l'anàlisi pacients asimptomàtics avaluats en el context d'estudi de contactes.<sup>111,113</sup> Petrucci i Lombardi *et al.*, per altra banda, van realitzar en dos estudis basats en la mateixa població un disseny molt semblant al nostre. Malgrat això, no és possible fer-hi una comparació directa, donat que d'entre els pacient amb clínica suggestiva de

TBC n'hi va haver de classificats com a 'ITBL', sense que comptessin en el càlcul de l'especificitat. El fet que no s'especificués si es van classificar com a tal en base al resultat del QFT®-GIT fa impossible saber realment la taxa de falsos positius per a TBC de la mostra.<sup>124,125</sup> Finalment, les altres set publicacions es resumeixen a la **taula 5** (pàgina 128) i es comparen amb la del segon estudi de la tesi.

Al nostre estudi es va objectivar un valor predictiu negatiu per al QFT®-Plus similar a la reportada per al QFT®-GIT per Sali, Blandinières i Detjen *et al.*<sup>90,126,127</sup> No seria correcte comparar aquesta xifra amb la dels estudis realitzats en països de molt alta incidència com l'Índia, Tanzània i Etiòpia.<sup>122,128,129</sup> Als darrers, la probabilitat pretest que un pacient amb clínica compatible presenti TBC és més alta, de manera que a igualtat de sensibilitat i especificitat del test el percentatge de pacients amb malaltia serà major. Així, el nombre de pacients amb un resultat fals negatiu serà més alt (com també el de pacients amb un resultat vertader positiu), el de pacients amb un resultat vertader negatiu serà més baix (com també el d'aquells amb un resultat fals positiu), i per tant augmentarà el valor predictiu positiu i en disminuirà el valor predictiu negatiu.

Els estudis duts a terme per Rose, Blandinières, Sali, Yassin i Chun *et al*, a l'igual que es va fer al segon estudi de la tesi, van incloure per al càlcul d'especificitat tots aquells pacients amb clínica de TBC però amb un diagnòstic final diferent al de TBC. Dogra *et al*, per la seva banda, van excloure del càlcul aquells pacients amb una història de contacte de risc. Per últim, Detjen *et al.* van ser els més restrictius, donat que van excloure també pacients amb qualsevol tipus d'afectació radiològica així com aquells amb antecedents d'haver rebut la vacuna BCG. L'objectiu de tals restriccions és reduir la probabilitat que els pacients presentin una ITBL subjacent que justifiqui la positivitat del QFT®-Plus. Així doncs, aquest criteri podria explicar les majors especificitats reportades per Dogra i Detjen *et al.* Per contra, si no s'és restrictiu en els criteris d'inclusió caldrà esperar una menor especificitat com més risc epidemiològic hi hagi de

**Taula 5: Estudis en què s'avalua l'especificitat del QFT®-GIT per a malaltia activa en pacients pediàtrics amb clínica suggestiva de TBC.**

| <b>Primer autor</b>                         | <b>Detjen<sup>90</sup></b> | <b>Dogra<sup>128</sup></b> | <b>Chun<sup>82</sup></b> | <b>Yassin<sup>122</sup></b> | <b>Rose<sup>129</sup></b> | <b>Sali<sup>126</sup></b> | <b>Blandinières<sup>127</sup></b> | <b>Segon estudi</b> |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| <b>Any</b>                                  | 2007                       | 2007                       | 2008                     | 2011                        | 2012                      | 2015                      | 2013                              | 2021                |
| <b>País</b>                                 | Alemanya                   | Índia                      | Rep. Corea               | Etiòpia                     | Tanzània                  | Itàlia                    | França                            | Espanya             |
| <b>Incidència<sup>1</sup></b>               | 6                          | 188                        | 49                       | 132                         | 222                       | 7                         | 8                                 | 9                   |
| <b>Casos<sup>2</sup></b>                    | 40                         | 89                         | 71                       | 77                          | 68                        | 100                       | 87                                | 165                 |
| <b>Rang d'edat</b>                          | 0-15 anys                  | 1-12 anys                  | 0-15 anys                | 1-15 anys                   | 0-15 anys                 | 0-14 anys                 | 0-15 anys                         | 0-18 anys           |
| <b>Especificitat, % (IC95%)<sup>3</sup></b> | 100<br>(91,2-100)          | 96,6<br>(90,4-99,3)        | 98,6<br>(92,4-100)       | 55,8<br>(44,1-67,2)         | 89,7<br>(79,9-95,8)       | 96,0<br>(90,1-98,9)       | 100<br>(95,9-100)                 | 91,5<br>(86,2-95,3) |
| <b>VPN, % (IC95%)<sup>4</sup></b>           | 95,2<br>(83,8-99,4)        | NC                         | 98,6<br>(92,4-100)       | 53,8<br>(42,2-65,0)         | 47,7<br>(38,8-56,7)       | 98,0<br>(92,8-99,8)       | 86,1<br>(77,8-92,2)               | 92,1<br>(86,8-95,7) |

IC95%: interval de confiança del 95%; **VPN**: Valor predictiu negatiu; **Rep**: República; **NC**: no calculable.

<sup>1</sup> Incidència anual en casos per cada 100.000 habitants al conjunt del país.<sup>78</sup>

<sup>2</sup> Pacients del grup control, excloent-ne aquells amb un resultat indeterminat.

<sup>3</sup> Percentatge de pacients amb un resultat positiu per al test IGRA, excloent-ne aquells amb un resultat indeterminat.

<sup>4</sup> Percentatge de pacients sense TBC d'entre aquells amb un resultat negatiu.



presentar una ITBL concomitant. Això podria justificar la baixa especificitat de l'estudi de Yassin *et al*, realitzat en un país d'alta incidència com és Etiòpia.

En el nostre cas, es va optar per un criteri no restrictiu per tal de reflectir la realitat clínica dels pediatres que han de realitzar el test en un pacient amb sospita de TBC en el nostre entorn. Així doncs, un resultat QFT®-Plus positiu en un pacient en qui s'ha descartat malaltia activa, caldrà considerar-lo un resultat fals positiu o, alternativament, un diagnòstic concomitant d'ITBL. De fet, la majoria de pacients del nostre estudi amb un resultat positiu del test presentaven factors de risc d'ITBL i van ser diagnosticats com a tal. Els que no en tenien van presentar uns resultats per al QFT®-Plus quantitativament al límit de la normalitat, que en els casos en què va repetir-se va esdevenir negatiu, donant suport al diagnòstic de resultat fals positiu.

En resum, els estudis de Sali i Blandinières *et al*. tenen un disseny molt semblant al nostre i estan realitzats en països d'una incidència també molt similar (Itàlia i França respectivament), de manera que resulten els millors comparadors possibles. D'aquesta manera, l'especificitat reportada per Sali *et al*. per al QFT®-GIT va ser similar a la del nostre estudi (96,0%, IC95% 90,1-98,9%;  $p=0,160$ ), mentre que la reportada per Blandinières *et al*. va ser fins i tot superior (100%, IC95% 95,9-100%; p-valor no calculable per absència de resultats positius).

Així doncs, el QFT®-Plus sembla que presenta una especificitat com a mínim no superior al del seu predecessor, si bé com ja s'ha detallat la comparativa entre estudis és especialment difícil. En qualsevol cas, cal puntualitzar que la millora de l'especificitat no es troba entre els objectius dels promotors dels QFT®-Plus.<sup>47</sup>

### 6.1.2.2 Concordança entre QFT®-Plus i PPD i efecte de la vacuna BCG i de les infeccions per micobacteris ambientals

A l'estudi de la tesi, es va objectivar que els pacients amb un PPD positiu presentaven una menor especificitat del QFT®-Plus que els qui tenien un PPD negatiu (79,3%, IC95% 60,3-92,0% vs 95,6%, IC95% 88,9-98,8%;  $p=0,025$ ). D'altra banda, l'especificitat del PPD va resultar significativament menor que la del QFT®-Plus (76,6%, IC95% 68,3-83,6%;  $p < 0,001$ ), sent la concordança entre els dos tests feble (77,1%, índex  $\kappa$  de 0,208). Aquests resultats ja eren previsibles si tenim en compte la definició vigent d'ITBL en les Guies Nacionals i que vam emprar als nostres estudis, que atorga el diagnòstic d'ITBL quan bé el PPD, bé el test IGRA són positius.<sup>44</sup> Dels 23 pacients amb una combinació PPD positiu / QFT®-Plus negatiu, vuit presentaven un antecedent de vacunació amb BCG i d'altres vuit van ser diagnosticats d'adenitis per micobacteris no tuberculosos (MNT). Precisament, són aquests dos antecedents els que clàssicament s'han associat a un resultat positiu del PPD no relacionat amb una infecció o malaltia per *M. tuberculosis* complex, elements que en justificarien la menor especificitat respecte la del QFT®-Plus.

La relació entre la vacunació amb BCG i la positivització del PPD és coneguda des de fa dècades. De fet, són diverses les publicacions de mitjan del segle XX en què s'avalua la resposta vacunal mitjançant la realització del test. Així, per exemple, als anys seixanta, Ashley *et al.* van aplicar el PPD a 437 lactants 10 setmanes després que rebessin la vacuna, i el resultat va ser positiu en el 82,2%.<sup>130</sup>

Dit això, no està clar fins a quin punt l'antecedent no recent d'haver rebut la vacuna BCG justifica un PPD positiu. En aquest sentit, Wang *et al.* van publicar el 2002 una meta-anàlisi que aplegava 26 estudis i quasi cent mil pacients a qui es va aplicar el PPD, un terç dels quals estava vacunat.<sup>131</sup> Els estudis eren heterogenis pel que fa als països en què es van realitzar i a la substància de PPD usada. Tot i això, es va

objectivar que els pacients vacunats presentaven un risc relatiu (RR) de 2,12 (IC95% 1,50-3,00) de presentar un resultat positiu per al test respecte els no vacunats. En realitzar l'anàlisi en funció de l'edat de vacunació, es va veure que els pacients vacunats al naixement presentaven un RR marcadament més baix que els vacunats posteriorment (1,16, IC95% 1,09-1,23; vs 2,08, IC 95% 1,89-2,21). Es va objectivar també que, passats quinze anys de la vacunació, el RR dequia de manera considerable en ambdós grups (1,20, IC95% 1,09-1,22, en els vacunats al naixement; i 0,80, IC95% 0,74-0,85 en els vacunats posteriorment). Per últim, també van descriure que els vacunats tenien un RR més alt (1,61, IC95% 1,35-1,94) de presentar un efecte *booster* (positivització en repetir el test del PPD).

El 2006, Farhat *et al.* van publicar, amb el mateix objectiu, una altra meta-anàlisi que aplegava fins a 31 estudis (dels quals 24 incloïen només pacients pediàtrics) que compilaven més de 240.000 pacients vacunats.<sup>81</sup> Van estimar la proporció de pacients amb un resultat fals positiu conseqüència de l'antecedent de vacunació calculant la diferència de percentatge de positivitat per al PPD entre els pacients vacunats i els no vacunats. El resultat va ser que tan sols el 8,5% de pacients vacunats abans de l'any de vida van presentar un resultat fals positiu per al PPD. Per contra, aquesta xifra augmentava fins al 41,8% si la vacunació s'havia produït més enllà del primer any de vida. A més, van objectivar que passats deu anys des de la vacunació, el percentatge pacients amb un resultat fals positiu era tan sols de l'1,0% entre els vacunats abans de l'any de vida, mentre que els que l'havien rebut més tard mantenien un 21,2% de taxa de falsos positius. D'altra banda, van descriure que augmentar el punt de tall de positivitat del PPD dels 10 als 15mm tenia un efecte discret per reduir la taxa de falsos positius, sent menyspreable entre els vacunats més enllà de l'any d'edat.<sup>132</sup> Pel que fa a aquest darrer aspecte, Connell *et al.* van objectivar mitjançant una regressió logística

que l'antecedent de vacunació no es relacionava amb una major induració de la reacció a la tuberculina en pacients diagnosticats d'ITBL o TBC.<sup>81</sup>

En conclusió, la taxa de falsos positius induïts per la BCG no seria tan alta com s'esperaria, sobretot si transcorre un temps llarg des de la vacunació i aquesta s'ha administrat precoçment. En consonància amb aquesta idea, Tebruegge *et al.* van estudiar el 2015 un grup de pacients amb una combinació PPD positiu / IGRA negatiu. Van objectivar que els limfòcits dels pacients vacunats presentaven una major producció d'IFN $\gamma$  quan se'ls estimulava amb ESAT-6 i CFP-10 respecte els pacients amb PPD negatiu. Aquesta troballa no s'explica per l'antecedent de vacunació, donat que la soca de Calmette-Guérin no presenta tals pèptids, fet que suggereix que no es tractava d'un resultat fals positiu per la vacuna sinó d'un fals negatiu del test IGRA.<sup>133</sup>

En qualsevol cas, resulta important conèixer l'antecedent de vacunació així com l'edat en què s'ha produït. Les polítiques de vacunació amb BCG són dinàmiques i variants. Així, hi ha països, com la majoria dels d'Europa occidental que han abandonat la vacunació sistemàtica; d'altres, com els Estats Units d'Amèrica, que no l'han aplicada mai; i alguns que recomanen dues (com Rússia o Nigèria) o fins i tot tres dosis de BCG (com Bielorrússia o el Kazakhstan). Finalment, la majoria de països al món, amb taxes altes o mitjanes d'incidència de TBC, vacunen sistemàticament al naixement amb una sola dosi de BCG. Donat que sovint no és possible disposar de manera fidedigna d'un correcte historial de vacunació, resulta molt útil el *BCG World Atlas*, una base de dades oberta i gratuïta creada al Canadà en què es pot consultar detalladament la política de vacunació de fins a 180 països del món.<sup>134</sup>

Els MNT són microorganismes que, en la seva majoria, viuen de manera ubiqua a la natura, trobant-se al sòl, en aigües, en menjar o en animals. Tot i que se n'han identificat més de 130 espècies, només algunes causen malaltia en els humans.<sup>135</sup>

Malgrat la freqüent exposició a aquests patògens en molts segments de la població, la

malaltia per MNT és, des d'un punt de vista epidemiològic, poc freqüent, presentant una incidència d'1-2 casos anuals per cada 100.000 nens a Austràlia i Europa.<sup>136</sup> El quadre clínic més freqüent en pediatria són les adenitis cervicals, mentre que la malaltia disseminada és quasi exclusiva de pacients immunosuprimits.<sup>135</sup>

Se sap que les infeccions actives per MNT s'associen a una possible positivització del PPD. Tebruegge *et al*, per exemple, van publicar una sèrie de 140 pacients pediàtrics amb malaltia per MNT, els quals presentaven una taxa de positivitat del 18,4%.<sup>136</sup> També cal destacar un estudi dut a terme per Martínez-Planas *et al*, en què comparava, en pacients europeus, 34 infants amb limfadenitis tuberculosa i 78 amb limfadenitis produïda pel complex *Mycobacterium avium* (MAC), tots ells amb confirmació microbiològica. El PPD va resultar positiu en un 59,5% dels pacients amb MAC, mentre que només un 3,6% (que representava un sol pacient el qual havia presentat contacte proper amb un adult bacil·lífer) va presentar un test IGRA positiu. Per contra, el 91,3% dels pacients amb TBC tenien un resultat positiu per a l'IGRA, fet a partir del qual els autors conclouien que aquests tests són útils a l'hora de diferenciar adenitis tuberculosos d'aquelles produïdes per micobacteris ambientals.<sup>137</sup>

Per contra, no hi ha una clara evidència sobre si l'exposició asimptomàtica a micobacteris ambientals justifica una positivització del test. En aquest sentit, l'any 2010 Latorre *et al*. van publicar un estudi realitzat a Barcelona. S'hi incloïen 21 pacients pediàtrics, sense antecedents de vacunació amb BCG i que presentaven una combinació PPD positiu / T-SPOT.®TB negatiu, els quals havien estat estudiats bé per un contacte amb un pacient bacil·lífer, bé com a cribratge sistemàtic a l'escola. Es van estimular *in vitro* els limfòcits dels pacients amb sensitina de complex *Mycobacterium avium* (SMAC), un preparat heterogeni de diversos antígens de MNT, i se'n va quantificar la resposta mitjançant un test ELISPOT. Es va veure que 10 dels 16 pacients amb un resultat vàlid (62,5%) van presentar un resultat positiu. Els autors van

interpretar que aquesta troballa implica una exposició prèvia a MNT, i que per tant justifica interpretar com a fals positius el resultat del PPD en quasi dos terços dels pacients amb un resultat PPD+ / IGRA-.<sup>138</sup>

Aquesta interpretació, però, és qüestionable. L'any 1999 Lein *et al.* es van publicar un estudi en què reclutaven 8 pacients adults amb malaltia per MAC i 27 amb TBC, tots ells confirmats microbiològicament. Es va mesurar la concentració d'IFN $\gamma$  alliberada pels limfòcits quan s'estimulaven *in vitro* amb SMAC i amb PPD. Es va observar que els limfòcits dels pacients amb TBC no només presentaven resposta a SMAC, sinó que ho feien en major grau que els dels pacients amb infecció per MAC (8,0 vs 4,0 UI/ml). Així mateix, l'IFN $\gamma$  alliberat en estimular-los amb PPD era marcadament més elevat en pacients amb TBC (8,6 vs 2,5 UI/ml).<sup>139</sup> De fet, al mateix estudi de Latorre *et al.* es va objectivar que d'entre un grup de 8 pacients control amb combinació PPD positiu / T-SPOT.®TB positiu (i per tant, amb un diagnòstic d'ITBL) i amb resultat vàlid per a l'ELISPOT amb SMAC, 5 (62,5%) van presentar un resultat positiu. És a dir, la taxa de positivitat va ser igual en pacients amb combinació PPD positiu / T-SPOT.®TB positiu que en aquells amb combinació PPD positiu / T-SPOT.®TB negatiu.<sup>138</sup>

D'altra banda, la possibilitat de realitzar test intradèrmics amb inòculs d'antígens de MNT va obrir la porta a disposar d'un test molt més ràpid que els cultius per diferenciar les infeccions per TBC de les produïdes per MNT. D'aquesta manera, von Reyn *et al.* van presentar el 1998 un estudi realitzat en pacients adults amb malaltia pulmonar confirmada bé per TBC (29 pacients), bé per MAC (44 pacients). Tots ells van ser sotmesos de manera dual a PPD i a la inoculació de SMAC intradèrmic. Es va definir com a dominància la situació en què un dels dos tests presentés una induració d'almenys 5mm major que la de l'altre. Es va veure una dominància de SMAC en el 73% dels pacients amb infecció per MAC però només en el 3% dels qui no la presentaven. Així doncs, es va demostrar que el test dual amb PPD i SMAC pot ser útil

per identificar pacients amb infecció per MAC. Per contra, la dominància PPD es va veure en tan sols el 52% dels pacients amb TBC, cosa que reforça la idea que el SMAC presenta una marcada reactivitat creuada amb *M. tuberculosis*.<sup>140</sup>

L'alta especificitat del test dual per al diagnòstic d'infecció per MNT d'aquest i d'altres estudis va permetre que Farhat *et al.* realitzessin una metaanàlisi incloent 12 estudis que aplegaven més d'un milió de subjectes sense malaltia micobacteriana activa i no vacunats amb BCG, sotmesos al test intradèrmic dual (PPD per una banda i SMAC o qualsevol altre test per mesurar la sensibilització a MNT per l'altre). Es van definir com a sensibilitzats a MNT aquells subjectes amb un induració per a MNT  $\geq 5\text{mm}$  i amb dominància sobre el PPD (almenys 2mm major). D'entre els pacients sensibilitzats a MNT, es van definir com a resultat falsos positius aquells PPD d'entre 10 i 14mm. Si el PPD resultava  $\geq 15\text{mm}$  es va interpretar com una doble infecció per *M. tuberculosis* i MNT. En base a aquesta definició, es va objectivar que tan sols entre el 2,0 i el 2,7% dels pacients sensibilitzats a MNT presentaven un resultat fals positiu del PPD. Així mateix, la taxa de sensibilització a MNT en països com França o els Països Baixos va resultar del 3,0 i el 6,4% respectivament, fet que tradueix que en la població general la taxa de PPD falsos positius a causa de la sensibilització a MNT es mouria entre el 0,0 i el 0,2%.<sup>132</sup> Així doncs, la possibilitat que la sensibilització a MNT justifiqui un fals positiu del PPD s'hauria de tenir realment en compte tan sols en ambients en què la incidència de TBC sigui molt baixa.

En definitiva, resulta molt incert el punt fins al qual una exposició ambiental a un MNT o l'antecedent de BCG justifiquen una combinació PPD positiu / IGRA negatiu. Davant d'aquesta incertesa, i donada la impossibilitat de descartar una ITBL, la majoria d'experts recomanen fortament considerar el test IGRA com a fals negatiu i administrar quimioprofilaxi, en base al major risc dels nens de presentar una activació de la malaltia i a la seguretat dels fàrmacs administrats.<sup>141</sup>

## **6.2 Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la infecció tuberculosa latent**

### **6.2.1 Recomanacions sobre l'ús de tests IGRA per al diagnòstic de la infecció tuberculosa latent en pediatria**

Com ja s'ha comentat, la importància de diagnosticar els pacients amb ITBL rau en la possibilitat d'administrar tractament farmacològic que redueixi el risc d'activació del micobacteri. Per al seu diagnòstic es disposa del PPD i dels tests IGRA. La seva validació per a aquest diagnòstic es basa a demostrar en estudis longitudinals que els pacients amb un test positiu que no reben quimioprofilaxi tenen més risc de progressar cap a malaltia activa que aquells amb un test negatiu. Realitzar aquest tipus d'estudis longitudinals, però, és costós i èticament difícil de justificar. Així doncs, a data d'avui no hi ha cap publicació que avaluï longitudinalment el risc de progressió a TBC en nens amb QFT®-Plus positiu sense tractament. Pel que fa al QFT®-GIT, la metaanàlisi publicada per Auguste *et al.* l'any 2017 avaluava el risc de progressió de pacients adolescents (entre 11 i 19 anys) amb un resultat positiu per al test. La meta-anàlisi aplegava tres estudis de pacients de la República de Corea, Sudàfrica i Alemanya.<sup>142-144</sup> El resultat va ser que 56 dels 3007 participants amb un resultat positiu i que no van rebre quimioprofilaxi van desenvolupar TBC en el termini de 2 anys, en comparació amb 25 dels 5376 amb un resultat negatiu (OR del 4,01; IC95%: 2,51-6,40),<sup>145</sup> la qual cosa certifica que presentar un resultat positiu per al test tradueix un augment de risc de desenvolupar malaltia tuberculosa activa.

No hi ha consensos clars entre les múltiples guies sobre l'estratègia a seguir a l'hora d'aplicar el PPD i els IGRA en pediatria, de manera que algunes recomanen realitzar només un dels tests, d'altres aplicar-los de manera seqüencial (primer un i, en funció del resultat, aplicar l'altre) mentre que també n'hi ha que defensen la seva aplicació de manera paral·lela (tots dos d'inici). La raó d'aquesta manca d'acord és que l'evidència



sobre la que es basen les guies en pediatria és limitada, donada la important variabilitat i heterogeneïtat dels estudis de què disposem.

Així doncs, les guies espanyoles (*Sociedad Española de Infectología Pediátrica* i *Sociedad Española de Neumología Pediátrica*) defineixen el PPD com a test d'elecció en el cribratge de la ITBL. S'indica la realització de test IGRA en aquells casos en què calgui maximitzar la sensibilitat (pacients amb PPD negatiu però menors de cinc anys, amb immunosupressió o que siguin contacte estret d'un cas bacil·lífer) i en aquells en què calgui potenciar l'especificitat (PPD positiu però pacients vacunats amb BCG, sense factors de risc o amb un contacte no diari).<sup>44</sup>

Les guies de l'OMS, per la seva banda, manifesten que es poden utilitzar de manera indistinta PPD o IGRA, en funció dels recursos de cada país, si bé es tracta d'una recomanació emesa en base a estudis realitzats en països d'elevada incidència.<sup>146</sup>

Les recomanacions britàniques (*National Institute for Health and Care Excellence*) indiquen, quan sigui possible, la realització en primera instància d'un test PPD, tant en l'estudi de contactes com en el cribratge del nen migrat. En contactes menors de 2 anys recomanen la realització d'un test IGRA només en cas de presentar dos PPD negatius previs separats per sis setmanes, la negativitat dels quals indicaria suspendre la profilaxi primària. En contactes majors de 2 anys, recomanen la realització en paral·lel de PPD i IGRA en els casos en què el primer PPD fos negatiu.<sup>147</sup>

Les guies europees (*European Centre for Disease Prevention and Control*), plantegen que tant el PPD com els tests IGRA són d'utilitat per detectar la ITBL en nens immunocompetents. Recalquen, però, l'ús preferent dels tests IGRA en pacients vacunats amb BCG; i el del PPD en menors de cinc anys (argumentant la manca d'evidència de la utilització de tests IGRA en aquest rang d'edat). Per últim, recomanen la realització dels dos tests en paral·lel en pacients immunodeprimits,

argumentant la sensibilitat insuficient que presenten tots dos tests de manera aïllada.<sup>148</sup>

L'Acadèmia Americana de Pediatria, per contra, és la que més fortament recomana l'ús dels test IGRA, situant-los en preferència respecte el PPD en l'estudi de contactes de majors de 2 anys, i recomanant-ne l'ús en pacients vacunats amb PPD positiu. En els menors de 2 anys recomanen l'ús preferent del PPD, tot i que qualifiquen l'aplicació dels IGRA com a 'acceptable'. Per últim, recomanen l'ús en paral·lel d'IGRA i PPD en cas de sospita de malaltia activa, per tal de potenciar la sensibilitat d'ambdós tests.<sup>105</sup>

Per últim, les guies americanes (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomanen l'ús preferent de PPD en menors de cinc anys. En majors de 5 anys, per contra, suggereixen fer servir els test IGRA tret dels pacients immunosuprimits, en qui no recomanen la utilització d'un test sobre l'altre.<sup>149</sup>

Així doncs, davant d'aquesta manca d'unanimitat, resulta especialment important estudiar el paper que pot jugar el QFT®-Plus en el diagnòstic de la ITBL.

## **6.2.2 Ús del QFT®-Plus en el diagnòstic de la infecció tuberculosa latent**

Donat que no existeix un test *gold standard* per al diagnòstic de la ITBL, la definició de sensibilitat varia força entre estudis. Alguns calculen el percentatge de pacients amb un test IGRA positiu d'entre aquells diagnosticats d'ITBL en base al PPD, la qual cosa equival conceptualment a considerar el PPD com a *gold standard*. D'altres, prenen com a base una població amb factors de risc d'ITBL (generalment convivents asimptomàtics de malalts de TBC) i calculen el percentatge dels quals resulta positiu per a un determinat test (PPD o IGRA). Donat que aquesta metodologia no s'adequa del tot al concepte de sensibilitat, al tercer estudi es va optar per una definició alternativa. Així, es va calcular el percentatge de pacients amb QFT®-Plus positiu

d'entre aquells a qui s'atorgués el diagnòstic d'ITBL, és a dir, tots aquells amb un test ja fos PPD o QFT®-Plus positiu i que no presentessin signes de TBC.

En base a aquesta definició, es va objectivar una sensibilitat del QFT®-Plus per als 195 pacients diagnosticats d'ITBL del 68,2% (IC95% 61,2-74,7%). Per altra banda, la sensibilitat del PPD va ser marcadament més alta: 92,6% (IC95% 87,3-96,1%), sent el percentatge de pacients amb resultat concordant entre ambdós tests de sols el 54,7%.

Els estudis que han avaluat el QFT®-Plus com a eina per al diagnòstic d'ITBL en nens són escassos. A més, són heterogenis pel que fa a l'edat dels pacients, els criteris d'inclusió, els països de procedència dels pacients i les definicions d'ITBL. A data d'agost de 2022, són nou els estudis publicats, sense comptar el presentat a la tesi. D'aquests, el presentat per Gaensbauer *et al*, que recluta pacients menors de dos anys, inclou tan sols tres pacients amb diagnòstic d'ITBL. A més, els pacients són sotmesos bé al QFT®-G o al QFT®-Plus, realitzant l'anàlisi estadística de manera conjunta. Per tot plegat resulta difícil confrontar-lo amb el de la tesi.<sup>150</sup> D'altra banda, l'estudi publicat per Buonsenso *et al*. a Itàlia inclou 155 pacients amb risc d'ITBL (per contacte estret o per migració recent) a qui s'aplica el QFT®-Plus. D'aquests, 18 són catalogats d'ITBL en base a un resultat positiu del test. Tot i això, donat que als pacients no se'ls aplica el PPD tampoc és possible realitzar comparacions amb el nostre estudi.<sup>72</sup> Els altres set estudis són també molt heterogenis entre si. A la **Taula 6** (pàgina 140) s'hi realitza una comparació dels resultats de quatre d'ells amb el tercer estudi publicat a la present tesi. S'hi exclouen el de Surve *et al*. donat que inclou només pacients menors de cinc anys, el de Primaturia *et al*. perquè recluta tan sols pacients immunosuprimits i el de Kay *et al*. perquè compara QFT®-Plus amb QFT®-GIT sense realitzar PPD.<sup>71,106,151</sup> Cal destacar que a la taula s'han adaptat les definicions d'ITBL i de sensibilitat a les utilitzades al tercer estudi, per tal de permetre una millor comparabilitat.

**Taula 6: Estudis publicats sobre l'ús del QFT®-Plus per al diagnòstic d'infecció latent en pacients pediàtrics**

| Primer autor                                  | Benachinmardi <sup>50</sup> | Ghanaie <sup>152</sup> | Böncüoğlu <sup>153</sup> | Borkowska-Tatar <sup>74</sup> | <i>Tercer estudi</i> |
|---|-----------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------|
| <b>Any</b>                                    | 2021                        | 2021                   | 2021                     | 2021                          | 2021                 |
| <b>País</b>                                   | Índia                       | Iran                   | Turquia                  | Polònia                       | Espanya              |
| <b>Incidència<sup>1</sup></b>                 | 188                         | 13                     | 15                       | 10                            | 9                    |
| <b>Casos</b>                                  | 77                          | 230                    | 220                      | 204                           | 1726                 |
| <b>ITBL (PPD) [QFT®-Plus]<sup>2</sup></b>     | 35 (19) [32]                | 66 (29) [48]           | 94 (76) [34]             | 36 (35) [25]                  | 195 (150) [133]      |
| <b>Rang d'edat</b>                            | 0-17 anys                   | 0-17 anys              | 0-17 anys                | 1-14 anys                     | 0-17 anys            |
| <b>Raó de l'estudi</b>                        | Contacte                    | Contacte               | Qualsevol                | Contacte o sospita            | Qualsevol            |
| <b>Sens. PPD, % (IC95%)<sup>3</sup></b>       | 54,3 (36,7-71,2)            | 43,9 (31,7-56,7)       | 80,9 (71,4-88,2)         | 97,2 (85,5-99,9)              | 92,6 (87,4-96,1)     |
| <b>Sens. QFT®-Plus, % (IC95%)<sup>3</sup></b> | 91,4 (76,9-98,2)            | 72,7 (60,4-83,0)       | 36,2 (26,5-46,7)         | 69,4 (51,9-83,7)              | 68,2 (61,2-74,7)     |
| <b>Comparació sens., p-valor<sup>4</sup></b>  | 0,0059                      | 0,0152                 | 0,018                    | <0,001                        | <0,001               |
| <b>Concordança, % (índex κ)<sup>5</sup></b>   | 75,3 (0,460)                | 76,1 (0,152)           | 63,6 (0,153)             | 90,2 (0,830)                  | 91,6 (0,766)         |
| <b>Concordança en ITBL, %<sup>6</sup></b>     | 45,7                        | 16,7                   | 17,0                     | 66,7                          | 54,7                 |

ITBL: Infecció tuberculosa latent; PPD: test de la tuberculina; QFT®-Plus: QuantiFERON®-TB Gold Plus; Sens: sensibilitat; IC95%: interval de confiança del 95%.

<sup>1</sup> Incidència anual en casos per cada 100.000 habitants al conjunt del país.<sup>78</sup>

<sup>2</sup> Casos d'ITBL, entre parèntesis els casos definits per un PPD positiu, entre claudàtors els casos definits per un QFT®-Plus positiu.

<sup>3</sup> Sensibilitat per a cadascun dels tests, definida com a percentatge de pacients amb un resultat positiu d'entre el total de casos amb ITBL.

<sup>4</sup> Comparació de la sensibilitat de PPD i QFT®-Plus. Contrast d'hipòtesi mitjançant el test de McNemar.

<sup>5</sup> Concordança en el global de pacients sotmesos a ambdós tests.

<sup>6</sup> Concordança en el pacients definits com a ITBL.

Tal i com es mostra a la taula, els resultats presentats no són uniformes entre els estudis, com tampoc ho és l'epidemiologia dels diferents països on s'han realitzat. Respecte la resta, el QFT®-Plus presenta al nostre estudi una sensibilitat lleugerament superior a la mitjana ponderada pel nombre pacients amb ITBL dels altres quatre estudis (60,2%, IC95% 53,6-66,5%). La concordança total al nostre estudi va ser marcadament més alta que la de la resta (91,6%, índex  $\kappa$  de 0,766). Tot i això, aquesta alta concordança és bàsicament a expenses de pacients que van presentar un resultat negatiu per als dos tests, de manera que en poblacions amb una incidència més alta d'ITBL (i per tant menor taxa esperable de resultats doblement negatius) podria esperar-se un menor grau de concordança entre els dos tests. Per contra, d'entre els pacients amb ITBL, només un 54,7% van presentar un resultat positiu per al PPD i el QFT®-Plus, sent un percentatge més baix que el publicat per Borkowska-Tatar *et al*, però marcadament més alt que el reportat per Ghanaie i Böncüoğlu *et al*.<sup>74,152,153</sup>

Un cop més, resultaria interessant considerar la realització en paral·lel del QFT®-Plus i QFT®-GIT per avaluar si el primer aporta una major taxa de positivitat en pacients amb risc d'ITBL. L'únic dels estudis en què s'ha realitzat aquesta anàlisi en pacients pediàtrics és el publicat per Kay *et al*.<sup>71</sup> Es van reclutar 46 pacients que van presentar un contacte domiciliari amb un cas de TBC, amb una concordança molt alta entre ambdós tests (95,7%, índex  $\kappa$  de 0,901). Setze pacients van ser catalogats d'ITBL, dels quals catorze presentaven un resultat positiu per ambdós tests, un la combinació QFT®-Plus positiu / QFT®-GIT negatiu i un, QFT®-Plus negatiu / QFT®-GIT positiu.

De les diverses meta-anàlisis que estudien el QFT®-GIT en pediatria, l'única en què s'avalua la concordança entre el PPD i el QFT®-GIT en la ITBL és la publicada per Machingaidze *et al*,<sup>154</sup> que recopila 12 estudis de països tant d'alta com de baixa incidència. La concordança entre els dos tests (quantificada amb l'índex de  $\kappa$ ) resulta molt variable. Així, mentre que les concordances aportades pels diversos estudis se

situen entre 0,50<sup>155</sup> i 0,86,<sup>98</sup> la mitjana ponderada per nombre de casos resulta de 0,60, lleument inferior a l'objectivada per al QFT®-Plus al tercer estudi i superior a l'observada a la majoria de publicacions que avaluen el QFT®-Plus en pediatria, tret de la reportada per Borkowska-Tatar *et al.*<sup>74</sup>

D'altra banda, per fer el càlcul de la sensibilitat del QFT®-GIT en els mateixos termes que s'han exposat anteriorment (percentatge de positius d'entre els pacients definits com a ITBL ja sigui per PPD o IGRA positius) són necessàries dades que només són accessibles en alguns dels estudis publicats. És així perquè alguns d'ells defineixen ITBL només en base al PPD, sense incloure a l'anàlisi els pacients amb QFT®-GIT positiu i PPD negatiu. A més, comparar la sensibilitat en poblacions d'alta incidència pot comportar un biaix important, donat que en aquests països l'alta taxa de vacunació amb BCG pot implicar un augment dels diagnòstics d'ITBL en base a una positivitat del PPD explicable pel mateix antecedent de vacunació. D'aquesta manera, s'han identificat cinc estudis en què és possible el càlcul de la sensibilitat del QFT®-GIT per a ITBL en nens de països de baixa incidència. Els cinc estudis sumen un total de 300 casos d'ITBL, en poblacions d'Espanya,<sup>91</sup> Itàlia,<sup>84</sup> Regne Unit<sup>89,119</sup> i Austràlia.<sup>81</sup> D'entre els 300 casos se'n van reportar 174 amb un resultat positiu per al QFT®-GIT, fet que es tradueix en una sensibilitat del 58,0% (IC95% 52,2-63,6%). Amb un 68,2% (IC95% 61,2-74,7%), la sensibilitat del QFT®-Plus reportada al tercer estudi va resultar superior ( $p=0,0222$ ). Així doncs, el QFT®-Plus podria comportar una millora de la sensibilitat per al diagnòstic d'ITBL en països de baixa incidència. Tot i això, la ja reiterada gran heterogeneïtat dels estudis i, sobre tot, l'absència de *gold standard* per al seu diagnòstic fan molt difícil extreure conclusions sòlides. Només la realització dels dos tests en paral·lel permetria fer-ne una comparació directa.

### 6.2.2.1 Efecte de l'edat i de la immunosupressió en la sensibilitat per al diagnòstic de la infecció tuberculosa latent

Pel que fa a l'avaluació del QFT®-Plus en nens petits, Surve *et al.* van presentar l'any 2021 un estudi realitzat a l'Índia en què reclutaven tan sols pacients menors de cinc anys en risc de patir una infecció latent, ja fos per contacte amb un cas de tuberculosi activa o bé per malnutrició.<sup>106</sup> Es van realitzar QFT®-Plus i PPD en 299 nens, dels quals 74 (24,8%) van presentar un resultat positiu per a algun dels dos tests (13 d'ells eren menors de 2 anys). La sensibilitat del QFT®-Plus va resultar del 47,3% (IC95% 35,6-59,2%), més baixa que la del PPD (91,9%, IC95% 83,2-970%,  $p < 0,001$ ), mentre que la concordança entre els dos tests va ser moderada (85,0% de resultats concordants, índex  $\kappa$  de 0,483). En menors de dos anys, la sensibilitat del QFT®-Plus va resultar del 46,2% (IC95% 19,2-74,9%) i la seva concordança amb el PPD del 85,2% (índex  $\kappa$  de 0,478), similar a la dels majors de dos anys ( $p=0,957$ ). Al nostre estudi, la sensibilitat en menors de cinc anys va ser similar a la presentada per Surve *et al.* (56,5%, IC95% 34,5-76,5%). En el nostre cas, no va resultar significativament inferior que la dels majors de 5 anys (69,8%, IC95% 62,3-76,5,  $p=0,200$ ). De la mateixa manera, a l'estudi de Barkowska-Tatar *et al.* es va realitzar una subanàlisi en pacients menors de 5 anys ( $n=79$ ), observant una molt bona concordança entre PPD i QFT®-Plus (94,9% de resultats concordants, índex  $\kappa$  de 0,827), lleugerament superior, de fet, a la dels majors de cinc anys ( $n=125$ ;  $p=0,0702$ ).<sup>74</sup>

Hi ha diversos estudis que han avaluat el rendiment del QFT®-GIT en menors de cinc anys en països de baixa endèmia. Pavić *et al.* van objectivar en 141 pacients croates amb ITBL una concordança entre QFT®-GIT i PPD del 88,6% (índex  $\kappa$  de 0,591) i una sensibilitat del QFT®-GIT del 62,1% (IC95% 42,3-79,3%).<sup>107</sup> D'una manera similar, Garazzino *et al.* van avaluar un total de 616 pacients menors de 2 anys a Itàlia. La concordança entre el QFT®-GIT i PPD va resultar del 91,2% (índex  $\kappa$  de 0,730); i la sensibilitat del QFT®-GIT, del 66,7% (IC95% 50,5-80,4%).<sup>108</sup> Velasco-Arnaiz *et al.*, per

la seva banda, van observar en 383 pacients una concordança del 83,2% (índex  $\kappa$  de 0,551). Així doncs, no sembla que el QFT®-Plus millori la sensibilitat ni la concordança amb el PPD respecte el QFT®-GIT en el diagnòstic de la ITBL en menors de 5 anys.

Val la pena destacar que ni en l'estudi de Pavić ni en el de Velasco-Arnaiz es va observar, d'entre els pacients amb un test positiu, una correlació entre l'edat i la concentració d'IFN $\gamma$  alliberat al tub reactiu, mentre que sí que es va veure que els pacients més petits presentaven menor producció d'IFN $\gamma$  al tub mitogen (control positiu), tal com es discuteix a l'apartat 6.3.1 (Resultats indeterminats).<sup>107,109</sup> Critselis *et al*, anant més enllà, van observar en 761 pacients grecs majors concentracions d'IFN $\gamma$  al tub reactiu en menors de 2 anys respecte els més grans, cosa que es els autors justifiquen per un contacte més recent amb el bacil. A més, van observar que la concordança entre QFT®-GIT i PPD en menors de 2 anys era equiparable a la dels pacients més grans.<sup>110</sup>

Així doncs, val la pena reforçar la idea que malgrat que el QFT®-Plus no sembla millorar el rendiment diagnòstic respecte el del QFT®-GIT en nens menors de 5 anys, els tests IGRA sí que poden representar una eina diagnòstica de gran ajut per al diagnòstic d'ITBL també en aquest grup d'edat, donat que si bé la menor producció d'IFN $\gamma$  al tub mitogen pot fer-ne augmentar la taxa de resultats indeterminats, són pacients capaços de produir IFN $\gamma$  davant l'estímul antigènic micobacterià d'una manera equiparable a la dels de major edat.

D'igual manera, en els nens immunosuprimits també s'ha posat en dubte la rendibilitat dels test IGRA. Primaturia *et al*. van sotmetre a QFT®-Plus i PPD setanta-un pacients d'Indonèsia majors de 5 anys i amb immunodeficiència secundària (la major part per quimioteràpia), mostrant una concordança entre els dos tests del 87,1% (índex  $\kappa$  de 0,345) i una major taxa de resultats positius per al QFT®-Plus que per al PPD ( $p=0,0455$ ).<sup>151</sup> Böncüoğlu *et al.*, per la seva banda, van incloure al seu estudi 99



pacients immunosuprimits. La concordança entre els dos tests en aquest grup va ser del 69,6%, major, de fet, que la que presentaven els immunocompetents (63,6%).<sup>153</sup> Al nostre estudi la sensibilitat del QFT®-Plus per a ITBL en pacients estudiats prèviament a l'inici de tractament immunosupressor va ser del 40,0% (IC95% 5,3-85,3%), tot i que el fet que s'hi incloguessin tan sols 5 casos d'ITBL (entre 529 pacients estudiats) fa difícil extreure'n conclusions sòlides.

### **6.2.2.2 Efecte de la vacuna BCG en la sensibilitat diagnòstica del QFT®-Plus per a la infecció tuberculosa latent**

Per últim, al tercer estudi, en comparar els diversos subgrups de pacients entre si es va objectivar una major sensibilitat del QFT®-Plus en aquells no vacunats amb BCG respecte els qui sí que ho estaven ( $p < 0,001$ ), i en els pacients nascuts a Espanya respecte els nascuts a l'estranger ( $p = 0,009$ ). Tal i com s'ha discutit a l'apartat 6.1.2 (Especificitat), aquesta troballa pot interpretar-se bé com una menor sensibilitat del QFT®-Plus en pacients amb alt risc d'ITBL (fals negatiu del QFT®-Plus), bé com una menor especificitat del PPD en pacients vacunats amb BCG (fals positiu del PPD). En qualsevol cas, molts dels estudis prèviament esmentats ja van observar una menor concordança entre el QFT®-GIT i el PPD en pacients vacunats amb BCG.<sup>84,91,94,97,108-110,124,128</sup> De fet, Velasco i Critselis *et al.* van observar que els nens menors de cinc anys no vacunats presentaven un nivell de concordança entre els tests excel·lent [94,6% (índex  $\kappa$  de 0,816) i 96,4% (índex  $\kappa$  de 0,91) respectivament], molt superior a l'observada en els vacunats [52,0% (índex  $\kappa$  de 0,190) i 75,0% (índex  $\kappa$  de 0,50)].<sup>109,110</sup> Velasco *et al.* van observar nivells similars de concordança també en pacients estudiats en estudis de contactes (94,4%, índex  $\kappa$  de 0,801).<sup>109</sup> Creiem que en el futur seria constructiu avaluar si se certifica que el PPD i el QFT®-Plus presenten un alt grau de concordança en algun perfil específic de pacients, com els no vacunats. D'aquesta manera, es podria indicar la realització de només un dels dos tests en determinats grups de pacients. Fins a tenir aquesta informació, sembla indicat la

realització en paral·lel de PPD i QFT®-Plus, donada la limitada concordança observada.

## **6.3 Rendiment del QuantiFERON®-TB Gold Plus en la població pediàtrica d'un país de baixa endèmia**

### **6.3.1 Resultats indeterminats del test QFT®-Plus**

A diferència del PPD, els test IGRA poden presentar un resultat indeterminat (RI). A més, els tests QuantiFERON ho fan en més freqüència que el T-SPOT.®TB.<sup>156</sup> Hi ha dues circumstàncies que defineixen el resultat del QFT®-Plus o del QFT®-GIT com a indeterminat. D'una banda, que la concentració d'IFN $\gamma$  al tub nul (control negatiu) sigui superior a 8,0UI/ml, cosa que anomenarem d'ara en endavant 'excés de nul'. D'altra banda, que la diferència de concentració d'IFN $\gamma$  entre el tub mitogen (control positiu) i el tub nul sigui menor a 0,5UI/ml en un context de baixa concentració d'IFN $\gamma$  a ambdós tubs reactius. Una concentració d'IFN $\gamma$  es considera baixa quan la diferència entre el tub reactiu i el tub nul o bé és menor de 0,35UI/ml o bé equival a menys del 25% del valor del tub nul. A aquesta circumstància l'anomenarem 'mitogen insuficient'.

Al tercer article de la tesi es van identificar 54 pacients amb un RI per al QFT®-Plus, la qual cosa va representar un 3,1% del total de resultats. Aquest percentatge, però, va decaure a l'1,1% entre els pacients amb TBC i al 0,5% dels qui es van classificar com a ITBL. Ara bé, el fet que la ITBL quedi definida per un resultat positiu del QFT®-Plus fa esperable que el percentatge de pacients amb un RI (i per tant, no positiu) sigui menor que en la resta de la població. En qualsevol cas, d'entre els 51 pacients amb RI i disponibilitat dels resultats quantitatius del test, 50 van definir-se com a tal per 'mitogen insuficient' i només un per 'excés de nul'. Aquest alt percentatge de RIs deguts a una resposta insuficient al mitogen és constant a totes les publicacions pediàtriques avaluades i citades als propers paràgrafs, tant les que estudien el QFT®-Plus com les de QFT®-GIT.

Les deu publicacions que han estudiat l'ús del QFT®-Plus en edat pediàtrica presenten resultats molt variables pel que fa la taxa de RIs. Buonsenso *et al.* van observar un 2,5% de RIs, tractant-se de 5 pacients dels quals 4 presentaven bé una alteració del funcionament del sistema immunitari, bé una infecció bacteriana aguda.<sup>72</sup> De manera semblant, Gaensbauer *et al.* van descriure un 2,6% de RIs en una mostra de pacients menors de dos anys.<sup>150</sup> D'altra banda, Nguyen *et al.* van objectivar-ne una taxa de tan sols el 0,45%, mentre que Benachinmardi no van descriure cap RI en els 77 pacients avaluats.<sup>50,73</sup> Borkowska-Tatar i Primaturia *et al.* van descriure'n taxes del 0,47% i l'1,4% respectivament. Tots dos estudis van incloure només pacients majors de cinc anys, si bé a l'estudi de Primaturia *et al.* tots ells presentaven algun grau d'immunosupressió.<sup>74,151</sup> Per últim, en els estudis de Ghanaie, Böncüoğlu i Surve *et al.*, que tenien com a objectiu estudiar la concordança entre QFT®-Plus i PPD, no s'hi descriu cap RI. Tot i això, als mètodes no sempre s'especifiquen adequadament els criteris d'exclusió i és possible que alguns dels pacients s'exclouguessin precisament per presentar un RI.<sup>106,152,153</sup> Cap dels estudis esmentats va analitzar els factors de risc de presentar un RI. Cal destacar, però, que Buonsenso i Gaensbauer *et al.* van analitzar si l'edat influïa en la concentració d'IFN $\gamma$  al tub mitogen (mitlIFN $\gamma$ ).<sup>72,150</sup> En cap dels dos estudis es va objectivar una menor mitlIFN $\gamma$  entre els pacients més joves, si bé cal recordar que Gaensbauer *et al.* incloïen tan sols infants menors de dos anys.

Tal com s'ha reiterat, l'estudi de Kay *et al.* és l'únic que ha avaluat l'ús concomitant de QFT®-GIT i QFT®-Plus en pacients pediàtrics. D'entre els 12 pacients amb TBC, 4 van presentar un RI per als dos tests de manera repetida. D'aquests, tres presentaven una infecció per VIH, de manera que la taxa de RIs entre els pacients coinfectats va resultar major que la dels pacients seronegatius (60% vs 14,3%). Dels 46 pacients sense TBC, 1 va presentar un RI per a tots dos tests i 1 només per a QFT®-GIT, sent tots dos menors de 4 anys. En definitiva, ambdós tests van presentar una excel·lent

concordança per distingir els RIs dels positius/negatius (89%, índex  $\kappa$  de 0,900),<sup>71</sup> mentre que l'heterogeneïtat en la resta d'estudis dificulta la comparació amb els resultats descrits per al QFT®-GIT.

En aquest darrer sentit, de les diferents meta-anàlisis que han avaluat l'ús del predecessor del QFT®-Plus en pediatria, tan sols Mandalakas *et al.* fan esment als RIs. Així, descriuen d'entre 462 pacients un taxa del 6,5%, sense poder realitzar una anàlisi estratificada per estudiar factors que s'associïn a una major taxa de RIs.<sup>67</sup> Per contra, al nostre estudi s'han avaluat els factors associats a un major risc d'obtenir un RI, a més de realitzar una cerca bibliogràfica del que s'ha descrit tant per a QFT®-Plus com a per a QFT®-GIT.

Un dels elements descrits al nostre estudi associat a un major risc de tenir un RI va ser l'edat menor de cinc anys, amb un OR del 3,39 (IC95% 1,26-9,17). L'efecte de l'edat sobre la capacitat de resposta dels limfòcits per secretar IFN $\gamma$  ha estat àmpliament estudiada prèviament en nens sotmesos a QFT®-GIT. Són pocs els autors que no han descrit una correlació entre aquests dos elements. Lombardi, Zrinski i Kampmann *et al.* van observar proporcions similars d'indeterminats entre els pacients més joves i els més grans, si bé el nombre de tests amb aquest resultat era baix en tots tres casos (4, 10 i 14 respectivament).<sup>88,157,158</sup> Pel que fa a resultats quantitatius, Pavić *et al.* no van observar relació entre l'edat i la mitIFN $\gamma$ .<sup>107</sup>

Per contra, són nombroses les publicacions en què sí que s'ha observat tal relació. Així, Critselis, Velasco-Arnaiz, Connell, Sali i Blandinières *et al.* van observar una major taxa de RIs entre els pacients més joves respecte els més grans.<sup>81,109,110,126,127</sup> Pel que fa a l'anàlisi quantitativa, Velasco-Arnaiz, Tebruegge, Connell i Lombardi *et al.*, a més, van objectivar una correlació entre l'edat i la mitIFN $\gamma$ .<sup>109,157,159,160</sup> I anant un pas més enllà, Jenum, Critselis, Haustein i Rose *et al.* van observar mitjançant una regressió logística, de manera independent, una relació inversament proporcional

entre l'edat i el risc de presentar un RI, disminuint entre un 13 i un 17% per cada any d'edat.<sup>89,110,113,129</sup> Aquestes asseveracions, però, no són aplicables a la població adulta. I és que tal com van demostrar Tebruegge *et al.* en comparar el rendiment del QFT®-GIT en infants i adults, en els darrers la relació s'inverteix i la mitIFN $\gamma$  disminueix com més avançada és l'edat dels pacients.<sup>160</sup>

Donat el clar efecte de l'edat sobre la capacitat dels limfòcits de respondre al mitogen, autors com Tebruegge o Connell *et al.* proposen adaptar el llindar d'indeterminació de la mitIFN $\gamma$  o fins i tot cercar un altre control positiu que no es vegi tan afectat per l'edat del pacient.<sup>159,160</sup> En aquest sentit, Haustein *et al.* van sotmetre al QFT®-GIT 237 infants, un 25% dels quals amb algun grau d'immunosupressió, bé per sospita de TBC bé per risc d'ITBL. Els autors van quantificar que disminuir el límit de mitIFN $\gamma$  de 0,5 a 0,3UI/ml disminuïa la taxa de RIs en tals sols el 14%.<sup>89</sup> Per contra, disminuir aquest llindar en excés augmenta el risc que el resultat esdevingui fals negatiu en comptes d'indeterminat vertader'. En definitiva, calen més estudis per tal d'augmentar el rendiment dels tests IGRA en la població més jove a expenses de reduir-ne la taxa de RIs.

En segon lloc, al tercer estudi vam objectivar que xifres més altes de CRP augmentaven el risc d'obtenir un RI, concretament un 6,5% (IC95% 3,0-10,0%) per cada 5mg/L d'augment. Fins on sabem, aquest fet no s'ha descrit anteriorment com a tal, si bé sí que s'ha objectivat de manera repetida com un ambient inflamatori fa disminuir la resposta dels limfòcits al mitogen. Sharninghausen *et al.*, per exemple, van descriure en pacients adults que la combinació d'anèmia i hipoalbuminèmia resulta un factor de risc independent d'obtenir un RI. Tal com expliquen els autors, aquesta alteració analítica combinada és habitual en pacients adults amb malalties inflamatòries cròniques (en el cas de l'article, malaltia renal avançada, càncer i cirrosi).<sup>161</sup> Zrinski *et al.*, per la seva banda, van realitzar una descripció dels 10 pacients

de la seva cohort amb un RI. Tots ells presentaven elevació de CRP, leucocitosi, febre o pneumònia activa. Un cop resolta aquesta situació, però, se'ls va repetir el QFT®-GIT i cap d'ells va presentar de nou un RI.<sup>158</sup>

Resulta interessant, però, com les infeccions específicament respiratòries augmenten el risc de tenir un RI. Ho hem pogut observar al segon estudi de la tesi, en què es van incloure 73 pacients amb sospita clínica de TBC per clínica respiratòria però que finalment van rebre un diagnòstic alternatiu. D'entre ells, la taxa de RIs va ser del 15,0%, marcadament superior a la dels 109 pacients amb clínica no respiratòria del segon article (5,5%,  $p=0,0298$ ) i a la del conjunt de pacients del tercer article (3,1%,  $p<0,001$ ). En aquesta línia, Pavić, Petrucci, Sali i Blandinières *et al.* han descrit taxes de pneumònia d'entre el 35% i el 100% en pacients pediàtrics amb un RI per al QFT®-GIT.<sup>107,124,126,127</sup> Jenum *et al.*, per la seva banda, van determinar que els pacients amb clínica respiratòria tenen un OR del 3,20 (IC95% 1,14-8,91) de presentar un RI.<sup>113</sup> Blandinières *et al.* proposen que la causa d'aquesta relació seria que els pacients amb pneumònia presenten un augment de resposta dels limfòcits T *helper* de tipus 2 (Th2), els quals secreten citocines com l'interleucina 4 que inhibeixen l'activitat dels Th1, els principals productors d'IFN $\gamma$ .<sup>127</sup>

Finalment, el tercer element que a la regressió logística del nostre estudi es va veure relacionat amb un major risc d'obtenir un RI va ser la limfopènia, amb un (OR) del 4,88 (IC95% 1,64-14,50). Un cop més, la relació entre RIs i limfopènia també ha estat objectivada en pacients sotmesos al QFT®-GIT. En un estudi de laboratori, van Zyl-Smit *et al.* van modificar la concentració de limfòcits d'una mostra de pacients adults per tal de veure com això afectava la mitIFN $\gamma$ . Així, van objectivar que enriquir la mostra amb limfòcits del mateix pacient sense modificar-ne el volum feia augmentar el mitIFN $\gamma$ . Concretament, les xifres més altes de mitIFN $\gamma$  s'assolien quan la concentració era de 2.500 limfòcits per mil·lilitre.<sup>162</sup> Richeldi *et al.*, per la seva banda, van descriure

que pacients adults amb RI tenien xifres més baixes de limfòcits,<sup>156</sup> mentre que Baldassari *et al.* van quantificar en 9,4 (IC95% 5,2-17,0) l'OR de presentar un RI d'entre els pacients amb menys de 500 limfòcits per mil·lilitre.<sup>163</sup> A més de la limfopènia, d'altres circumstàncies que alteren el funcionalisme dels limfòcits també s'han relacionat amb una major taxa de RIs. Baldassari *et al.* van calcular en 3,2 (1,7-5,9) l'OR de tenir un RI d'entre pacients adults tractats amb metilprednisolona endovenosa.<sup>163</sup> Pel que fa a estudis en pacients pediàtrics, Tebruegge *et al.* van relatar que fins al 31,8% de pacients amb un RI estaven immunodeprimits,<sup>160</sup> mentre que per a Hausteiner *et al.* els pacients amb algun grau d'immunosupressió tenen un OR del 8,33 (IC95% de 4,07-17,07) d'obtenir un RI.<sup>89</sup>

Hi ha d'altres factors relacionats amb un major risc de RI que no han estat avaluats al nostre estudi. La desnutrició és un d'ells, tal com han suggerit Thomas o Jennum *et al.*<sup>102,113</sup> D'altres autors, com Dogra i Rose *et al.*, però, no han observat tal relació.<sup>128,129</sup> En aquest sentit, però, cal destacar que el marcador que més sembla relacionar-se amb una resposta ineficient al mitogen és la baixa altura per a l'edat, i no el baix pes per a l'edat.<sup>113</sup> Això podria ser degut al fet que l'afectació de la talla és un millor marcador de desnutrició crònica que no pas el pes.

Thomas *et al.*, d'altra banda, van estudiar 251 nens de Bangladesh sotmesos a PPD, QFT®-GIT i coprocultiu. Van observar que la infecció per helmints (concretament *Ascaris lumbricoides* o *Trichuris trichiura*) és un factor de risc independent d'obtenir un RI. Segons relaten els autors, aquest tipus d'infeccions potencien l'expressió de l'antigen 4 dels limfòcits T citotòxics, que és un regulador negatiu dels limfòcits *helper*.<sup>102</sup>

També l'ús de fàrmacs com el dimetil fumarat (usat com a tractament de l'esclerosi múltiple)<sup>163</sup> o les benzilpenicil·lines poden augmentar la taxa de RIs. En concret, les penicil·lines, molt usades en pediatria, es conjuguen amb l'IFN $\gamma$ , reduint-ne la detecció

mitjançant tècniques de laboratori com el *western Blot*, tal com van descriure Brooks *et al.*<sup>164</sup>

Per últim, també són importants les variables preclíniques. Herrera *et al.* van demostrar en 41 voluntaris adults sans que augmentar el temps d'incubació de la mostra de 0 a 12 hores feia augmentar la taxa de RI del 0,0 al 17,1%. Segons relaten els autors, el canvi de la temperatura ambient seria la responsable de la menor capacitat dels limfòcits de secretar IFN $\gamma$ .<sup>165</sup>

És habitual que un RI compliqui la interpretació del test als clínics. Quan es comparen les taxes de positivitat per al QFT®-GIT entre pacients amb un resultat inicialment no indeterminat amb els que havien presentat un RI inicialment i són sotmesos a un segon test els resultats són variables. Així, mentre Sharninghausen *et al.* van observar menor taxa de positivitat entre els inicialment indeterminats (13,6 vs 31,5%,  $p=0,0137$ ),<sup>161</sup> Baldassari *et al.* en van objectivar una major proporció (25,8 vs 21,1%,  $p<0,001$ ).<sup>163</sup> Això no obstant, un RI pot tenir una significança en si mateix, donat que parla de pacients els limfòcits dels quals no estant presentat una resposta esperable a un estímul. Així, un RI en un pacient amb sospita clínica de TBC ha de fer plantejar que l'afectació que presenti sigui greu i/o que sofreixi un defecte del seu sistema immunitari.<sup>126</sup> En aquest sentit, Rose *et al.* van observar a Tanzània que els nens amb TBC confirmada i un RI tenien un risc més elevat de mort o de malaltia greu passats sis mesos del diagnòstic.<sup>129</sup>

En conclusió, sembla que el QFT®-Plus presenta un comportament similar al del QFT®-GIT pel que fa als RIs, tot i que fins al moment no hi ha estudis més enllà del nostre en què se n'hagin avaluat els factors de risc en població pediàtrica. Sigui com sigui, davant d'un pacient amb aquest resultat cal explorar la presència de factors de risc que justifiquin una producció inadequada de mitogen.



## 6.3.2 Aportació del segon tub reactiu en el rendiment del test

### 6.3.2.1 Bases de l'estudi de la resposta CD8<sup>+</sup> i resultats de l'estudi

Tal com s'ha explicat anteriorment, el QFT®-Plus es va dissenyar amb el TB2, un tub reactiu accessori al TB1. Es va afegir per tal d'estimular no només els limfòcits CD4<sup>+</sup> (i més em concret els Th1) sinó també els limfòcits citotòxics CD8<sup>+</sup>. D'aquesta manera, segons els fabricants, es permetria identificar amb una major precisió els pacients més joves amb TBC, els que presenten una infecció més recent i els qui presenten malaltia activa, donat que en aquests grups de pacients la resposta CD8<sup>+</sup> és aparentment major.<sup>47</sup>

Els limfòcits CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> tenen funcions redundants entre si, com la citòlisi o l'alliberació d'IFN $\gamma$ . A més, però, els limfòcits CD8<sup>+</sup> juguen un rol específic que els atorga un paper important en la defensa contra el bacil. Així doncs, s'ha vist en diversos models que els antígens tuberculosos, un cop fagocitats pels macròfags, passen al citosol i des d'allà són presentats a la superfície cel·lular mitjançant molècules d'histocompatibilitat de tipus I als limfòcits CD8<sup>+</sup>.<sup>166-168</sup> Més en detall, Lewinsohn *et al.* van demostrar que les cèl·lules CD8<sup>+</sup> reconeixen d'una manera més específica les cèl·lules dendrítiques amb una alta càrrega bacil·lar intracel·lular.<sup>169</sup> Segons van descriure Lazarevic *et al.*, però, semblaria que en persones crònicament exposades al bacil la capacitat lítica d'aquest tipus de limfòcit aniria minvant al llarg del temps.<sup>170</sup> De tota manera, si bé està clar que els limfòcits CD8<sup>+</sup> tenen un marcat augment de l'activitat davant la infecció per micobacteris, hi ha indicis que suggereixen que qualitativament aquests limfòcits podrien no presentar una resposta efectiva, i és que s'ha vist que limfòcits de pacients amb TBC pulmonar expressen molècules citotòxiques en menor quantitat que individus sans.<sup>171,172</sup> En la mateixa línia, Day *et al.*

van observar que d'entre pacients amb TBC pulmonar aquells amb esputos positius (i per tant més càrrega bacil·lar) presentaven menor producció de citoquines.<sup>62</sup>

Un dels estudis més importants que demostra el paper de la resposta CD8<sup>+</sup> en pacients amb TBC és el publicat per Rozot *et al.* el 2013. S'hi van incloure 86 pacients adults amb TBC i 240 amb ITBL, els limfòcits dels quals van ser estimulats amb ESAT-6 i CFP-10 (els antigens inclosos al QFT®-Plus) i avaluats per citometria de flux. El resultat va ser que es van identificar limfòcits CD8<sup>+</sup> específics en el 60% dels pacients amb TBC però només en el 15% dels qui presentaven una ITBL ( $p < 0,001$ ). De fet, els autors defensaven que aquells pacients amb ITBL i resposta CD8<sup>+</sup> podrien tenir formes subclíniques de malaltia activa, i per tant més risc de progressar a TBC, tot i que no se'n descriu un seguiment prospectiu que permeti confirmar aquesta hipòtesi. És important ressaltar, però, que en avaluar tan sols aquells limfòcits capaços de secretar IFN $\gamma$  no es va objectivar una diferència significativa de percentatge de resposta entre tots dos grups.<sup>63</sup>

D'estudis realitzats en edat pediàtrica cal destacar-ne el publicat per Lancioni *et al.* el 2011 a Uganda. Els autors van observar entre els pacients menors de 5 anys que la resposta específica CD8<sup>+</sup>, però no la de les cèl·lules perifèriques mononuclears, era major en els nens amb TBC ( $n=70$ ) que la dels pacients asimptomàtics estudiats per un contacte de risc ( $n=58$ ). És més, el fet de presentar una resposta CD8<sup>+</sup> es va relacionar de manera independent amb un RR del 3,7 de presentar una malaltia activa. Aquesta troballa no es va observar en pacients majors de 5 anys, si bé els autors ho justifiquen per un menor nombre de pacients d'aquesta franja d'edat.<sup>64</sup>

Tal com s'ha explicat, al quart estudi de la tesi es va analitzar la concentració d' IFN $\gamma$  (CIG) als dos tubs reactius. Més en concret, es va fer servir la diferència de concentració d'IFN $\gamma$  entre TB2 i TB1 (DCI) com a marcador subrogat de la resposta CD8<sup>+</sup> específica. Realitzant aquesta anàlisi, es va observar que la DCI era propera a

zero no només en els pacients amb ITBL sinó també en aquells amb TBC. De fet, la CIG al TB2 va ser similar en comparar els pacients amb TBC amb aquells amb ITBL.

També s'ha avaluat si hi havia correlació entre les diferents manifestacions clíniques de la malaltia tuberculosa i el grau de resposta CD8<sup>+</sup>. En aquest sentit, Rozot *et al.* van objectivar que els pacients amb malaltia pulmonar presentaven en un major percentatge resposta CD8<sup>+</sup> positiva respecte els qui tenien TBC extrapulmonar. A més a més, d'entre els pacients amb TBC pulmonar, els qui tenien un esput positiu presentaven, així mateix, major resposta CD8<sup>+</sup> que aquells en qui no s'havien identificat bacils a l'esput.<sup>63</sup> De manera semblant, Day *et al.* van objectivar en pacients adults amb TBC de Sud-Àfrica que a més recompte de bacils a l'esput, major percentatge de limfòcits CD8<sup>+</sup>. Per contra, al quart estudi de la tesi no es va veure que la localització de la malaltia (pulmonar vs extrapulmonar) ni la seva confirmació microbiològica es relacionessin amb diferents CIG al TB2. De fet, la DCI va ser propera a zero tant en pacients amb malaltia pulmonar com en aquells amb TBC confirmada microbiològicament.

Pel que fa al paper de l'edat cal citar de nou Lancioni *et al.*<sup>64</sup> Analitzant tan sols els subjectes asimptomàtics estudiats per un contacte de risc, van veure que la resposta CD8<sup>+</sup> en menors de 5 anys era menys intensa que en els pacients més grans, mentre que la resposta de cèl·lules perifèriques mononuclears era similar. Aquesta troballa, segons els autors, es deu al fet que els pacients més grans haurien presentat al llarg de la seva vida més contactes amb el bacil, de manera que la seva càrrega bacil·lar intracel·lular seria major.

Per contra, al quart estudi de la tesi la DCI va ser propera a zero en pacients majors de cinc anys, mentre que la CIG al TB2 no es va veure afectada per l'edat. Cal dir, però, que la marcada menor incidència al nostre medi respecte la població de l'estudi de Lancioni *et al.* (Uganda, 196 casos per cada 100.000 habitants i any)<sup>78</sup> fa que la

hipotètica càrrega bacil·lar dels pacients estudiats sigui menor, i per tant també hauria de ser-ho la resposta CD8<sup>+</sup> esperable.

Per últim, els fabricants citen l'estudi publicat per Nikolova *et al.* l'any 2013 per defensar que el QFT®-Plus pot ser útil en la investigació de contactes recents. Es tracta d'un estudi realitzat en adults, entre els quals hi havia 17 pacients amb TBC pulmonar confirmada no tractada, 14 contactes asimptomàtics de malalts amb diagnòstic recent i 31 controls sans. A tots ells se'ls va aplicar el QFT®-GIT i es va realitzar una citometria de flux per avaluar el perfil dels limfòcits estimulats. Tal com cabria esperar, la CIG al tub reactiu es va relacionar amb el percentatge de resposta CD4<sup>+</sup> però no amb el de CD8<sup>+</sup>. L'interessant, però, va ser que els pacients amb contacte recent presentaven, tant si el QFT®-GIT era positiu com negatiu, una major resposta CD8<sup>+</sup> que la resta de grups, la qual cosa no es va veure en analitzar la resposta CD4<sup>+</sup>.<sup>61</sup> Per contra, al quart estudi de la tesi no es va veure una major resposta al TB2 entre els pacients estudiats per un contacte de risc respecte d'aquells estudiats per altres motius. A més, la DCI va ser propera a zero en aquest grup. Val a dir, però, que a l'estudi de Nikolova *et al.* van incloure al grup de pacients amb contactes de risc aquells sense història d'altres contactes previs. Si bé en el nostre cas no es va fer aquesta distinció, el fet que es tracti de pacients pediàtrics redueix les probabilitats que haguessin presentat un contacte de risc previ al de la raó de l'estudi.

### **6.3.2.2 Resultats del TB2 del test en estudis previs**

En resum, hem observat una marcada discrepància entre la resposta CD8<sup>+</sup> esperada i l'observada. Tal com s'ha descrit anteriorment, s'han volgut comparar els resultats obtinguts amb d'altres estudis realitzats en pacients sotmesos al QFT®-Plus. Fins a la data, només Buonsenso, Nguyen, Surve i Benachinmardi *et al.* han realitzat una anàlisi quantitativa dels resultats del test en pediatria. Nguyen *et al.* descriuen que en els pacients amb TBC pulmonar la CIG al TB2 era major que la del TB1 (2,0 vs 0,9 UI/ml),

fet que no es descriu als pacients amb TBC extrapulmonar o en aquells sense TBC. De tota manera, no es realitza contrast d'hipòtesi, de manera que no es determina si aquesta diferència és estadísticament significativa.<sup>73</sup> Benachinmardi *et al*, per la seva banda, comparen la CIG en TB1 i TB2 en nens asimptomàtics en contacte amb pacients bacil·lífers, sense trobar diferències significatives (1,03 vs 0,96UI/ml,  $p=0,98$ ).<sup>50</sup> Surve *et al*, que van estudiar nens amb risc d'ITBL, van descriure que d'entre 35 pacients amb resultat positiu n'hi havia 5 en els quals la DCI va resultar 'significativa' (d'entre 1 i 5UI/ml). Es tracta, però, d'una exposició gràfica dels resultats sense una anàlisi quantitativa global i sense cap contrast d'hipòtesi.<sup>106</sup> En el cas de Buonsenso *et al*, la DCI entre els dos tubs no va resultar significativa ni en pacients amb TBC ni en aquells amb ITBL. Tampoc no van observar diferències de CIG per a cap dels dos tubs en comparar els pacients en funció del seu diagnòstic definitiu.<sup>126</sup>

Per altra banda, són molts els estudis realitzats en pacients adults en què s'ha realitzat una anàlisi semblant a la nostra, calculant la DCI entre els dos tubs reactius com a marcador subrogat de la resposta CD8<sup>+</sup> específica. Alguns d'ells prenen de manera arbitrària un valor de DCI superior a 0,6UI/ml com a marcador de resposta significativa dels CD8<sup>+</sup> (RSCD8<sup>+</sup>). Els resultats d'aquests estudis són força variables. Barcellini *et al*, per exemple, van prendre com a mostra 119 pacients amb TBC a Itàlia, en els quals la DCI sí que resultava significativa (2,88 vs 2,09 UI/ml,  $p>0,001$ ). A més, resulta interessant que la DCI va resultar major en pacients amb esput positiu respecte d'aquells amb esput negatiu ( $p=0,0135$ ), cosa que reflectiria la major resposta CD8<sup>+</sup> en pacients amb una alta càrrega bacil·lar. Val a dir, però, que l'estudi no disposava de pacients control sense TBC.<sup>173</sup> Pieterman *et al*, per la seva banda, van voler determinar en pacients belgues i neerlandesos si el QFT®-Plus és capaç de diferenciar la ITBL remota de la recent, comparant els resultats en pacients estudiats bé per contacte de risc, bé com a protocol laboral en treballadors sanitaris (assumint-

ne una infecció recent) amb aquells estudiats prèviament a un tractament immunosupressor (considerats com a infectats remotament). El resultat va ser que el percentatge de pacients amb una RSCD8<sup>+</sup> (és a dir, una DCI de més de 0,6UI/ml) va ser superior en el grup d'infectats recentment (33 vs 17%, p=0,029).<sup>174</sup> Viana-Machado *et al.* van realitzar una anàlisi molt similar en pacients portuguesos: van descriure que el RR de presentar una RSCD8<sup>+</sup> era del 1,80 (IC95% 1,14-2,84) entre els pacients amb un contacte recent respecte els que havien presentat un contacte remot. A més, però, en analitzar només els pacients estudiats per contacte de risc, van objectivar que el RR augmentava entre els qui havien presentat contacte amb un pacient amb esput positiu, així com en aquells que passaven més hores a la setmana en contacte amb el cas índex.<sup>175</sup>

D'altra banda, altres publicacions presenten resultats contraris als exposats. Un exemple és el presentat per Venkatappa *et al.* als Estats Units en pacients estudiats com a cribratge d'ITBL, en què la DCI objectivada va ser propera a zero tant en el global de pacients com en aquells estudiats per contacte estret.<sup>176</sup> Pérez-Recio *et al.* van realitzar un estudi multicèntric eminentment a Espanya en què s'inclouïen només pacients amb un resultat positiu per al QFT®-Plus. D'igual manera que van fer Pieterman i Viana Machado *et al.*, van classificar els pacients en funció de si s'estudiaven per contacte de risc, per cribratge laboral o per inici de teràpia immunosupressora. El resultat va ser que la DCI va ser propera a zero en tots els tres grups, sense que el percentatge de pacients amb una RSCD8<sup>+</sup> variés entre ells. A més, en analitzar específicament els pacients estudiats per contacte, no es va veure que ni el grau d'intensitat del contacte ni la positivitat de l'esput del pacient índex es relacionés amb una major CGI al TB2 ni amb un major percentatge de RSCD8<sup>+</sup>.<sup>177</sup>

Com ja s'ha dit, definir la RSCD8<sup>+</sup> com una DCI de més de 0,6UI/ml és arbitrari, tal com defensen Tsuyuzaki *et al.* en una anàlisi quantitativa de pacients adults japonesos

estudiats per sospita d'ITBL.<sup>178</sup> Al quart estudi de la tesi, el 15,9% dels pacients van presentar una DCI superior a 0,6UI/ml, sense que es veiés una relació entre el percentatge de pacients amb una RSCD8<sup>+</sup> i cap de les variables avaluades (incloent-hi el diagnòstic definitiu, el motiu de l'estudi, la confirmació microbiològica de la malaltia o la seva gravetat). Crida l'atenció, però, que també hi ha haver pacients amb una DCI menor de -0,6UI/ml (és a dir, que la CIG al TB1 era major a 0,6UI/ml respecte a la del TB2). De fet, el percentatge de pacients amb aquest patró no va ser significativament inferior a la d'aquells amb una RSCD8<sup>+</sup> (12,5% vs 15,9, p=0,326).

Més enllà de les limitacions de l'estudi, hi ha dues possibles explicacions per a les discrepàncies entre la resposta CD8<sup>+</sup> teòricament esperada per les característiques clíniques dels pacients i l'observada per mitjà del QFT®-Plus. D'una banda, que la suposada resposta CD8<sup>+</sup> no sigui tan marcada com s'ha manifestat. Això, però, sembla improbable, perquè són molts els models animals i humans que han objectivat aquesta resposta *in vitro*.<sup>166-172,179</sup> L'altre possible escenari, al nostre parer més probable, és que el disseny del QFT®-Plus no sigui tan capaç com s'esperaria de mesurar l'esmentada resposta CD8<sup>+</sup> de forma acurada.

En aquest sentit creiem que resulta molt il·lustrador l'estudi publicat per Petruccioli *et al.* el 2016.<sup>180</sup> Van sotmetre pacients adults al QFT®-Plus i van realitzar una citometria de flux a tots dos tubs reactius per avaluar la resposta CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> en cadascun d'ells. Els pacients presentaven bé TBC (n=27), bé ITBL diagnosticada en context de contacte de risc (n=30). Els darrers es van dividir en infecció remota si el contacte havia estat més de tres anys abans i en recent si havia tingut lloc menys de tres mesos abans de l'estudi. Curiosament, el percentatge de resposta CD8<sup>+</sup> al TB2 va ser només del 25% en els pacients amb ITBL recent i del 18% en aquells amb ITBL remota. Aquest darrer fet podria semblar coherent amb la idea que l'estímul CD8<sup>+</sup> en les infeccions remotes es perd amb el pas del temps. El que va resultar sorprenent, però,

és que en analitzar la reacció CD8<sup>+</sup> al TB1 es va veure que el percentatge de resposta era del 33% en pacients amb ITBL recent i de fins al 83% en aquells amb infecció remota, superior a l'observada al TB2. En el global de pacients amb TBC sí que es va veure, tal com s'esperava, una major resposta CD8<sup>+</sup> al TB2 que al TB1 (44 vs 15%). En estratificar els pacients, però, es va observar que en aquells amb malaltia no greu i en aquells en què la TBC no es va confirmar microbiològicament el grau de resposta CD8<sup>+</sup> va ser similar a tots dos tubs (25% vs 25%).

Així doncs, l'estudi de Petruccioli *et al.* podria estar indicant que el TB2 del QFT®-Plus no és l'únic que llegeix la resposta CD8<sup>+</sup>, i que a més podria no fer-ho de manera òptima, tret d'aquelles situacions amb una càrrega bacil·lar alta (malalts amb TBC greu o confirmada microbiològicament). De la mateixa manera, suggereix que el QFT®-GIT ja avaluava la resposta CD8<sup>+</sup>, i que tampoc no ho feia d'una manera específica. Això ajuda a explicar resultats com els presentats per Lombardi *et al.*, que van objectivar en pacients menors de 5 anys que la CIG entre els 21 nens que presentaven TBC era major que la dels 13 del grup amb ITBL (10 vs 1,96UI/mL). Aquesta troballa, però, no es va veure entre els pacients majors de cinc anys ni en el global de pacients, d'una manera semblant als resultats presentats per Lancioni *et al.*<sup>64,125</sup>

L'estudi presentat per Petruccioli *et al.*, a més, podria ser útil per interpretar els resultats no concordants entre els dos tubs reactius, tal i com es va avaluar al primer i al tercer estudi. A la **taula 7** (pàgina 161) se'n resumeixen els resultats i es comparen amb els de Surve i Buonsenso *et al.*, que són els únics que han fet aquesta anàlisi en pacients pediàtrics. Crida l'atenció que el percentatge de pacients amb combinació TB1-/TB2+ no és marcadament inferior al d'aquells amb resultat TB1+/TB2-. Atenent al disseny del test, però, caldria esperar que la combinació TB1+/TB2- fos poc freqüent, donat que tots dos tubs reactius haurien d'estimular la resposta CD4<sup>+</sup>. Per a Pieterman *et al.*, que al seu estudi van presentar dades similars (d'entre els pacients amb un



QFT®-Plus positiu, 8,4% presentaven una combinació TB1-/TB2+ i un 7,0%, TB1+/TB2-) els resultats TB1+/TB2- serien fruit de la variabilitat casual.<sup>174</sup> Per contra, els resultats obtinguts al nostre estudi (com l'absència de predomini TB2 en cap del perfil de pacients en qui s'esperaria, i la marcada major CIG en TB1 respecte TB2 en un percentatge gens menyspreable de pacients) així com l'evidència aportada per altres investigadors són suggestives que el segon tub reactiu del QFT®-Plus podria no complir amb els objectius per als quals va ser dissenyat, sent la seva aportació a la capacitat diagnòstica del test, en conclusió, limitada.

**Taula 7: Grau de concordança entre TB1 i TB2 d'entre pacients pediàtrics amb un resultat positiu per al QFT®-Plus**

| Primer autor                   | Buonsenso <sup>72</sup> | Surve <sup>106</sup> | 1r estudi  | 3r estudi  |
|--------------------------------|-------------------------|----------------------|------------|------------|
| <b>Any</b>                     | 2020                    | 2021                 | 2020       | 2021       |
| <b>País</b>                    | Itàlia                  | Índia                | Espanya    | Espanya    |
| <b>Incidència<sup>1</sup></b>  | 7                       | 188                  | 9          | 9          |
| <b>Casos (TBC)<sup>2</sup></b> | 30 (12)                 | 35 (0)               | 105 (105)  | 284 (155)  |
| <b>Rang d'edat</b>             | 1-17 anys               | 0-5 anys             | 0-17 anys  | 0-17 anys  |
| <b>Resultat TB1+/TB2+ (%)</b>  | 30 (100)                | 30 (85,7)            | 101 (96,2) | 266 (93,7) |
| <b>Resultat TB1+/TB2- (%)</b>  | 0 (0)                   | 2 (5,7)              | 2 (1,9)    | 8 (2,8)    |
| <b>Resultat TB1-/TB2+ (%)</b>  | 0 (0)                   | 3 (8,6)              | 2 (1,9)    | 10 (3,5)   |

<sup>1</sup> Incidència anual en casos per cada 100.000 habitants al conjunt del país.<sup>78</sup>

<sup>2</sup> Nombre de pacients amb un resultat positiu per al QFT®-Plus. Entre parèntesi aquells amb TBC.

Per últim, cal esmentar que tant al nostre estudi com a la majoria dels prèviament exposats la majoria de pacients amb resultats discordants entre els dos tubs reactius presenta CIG properes al llindar de la negativitat.<sup>174</sup> Davant d'aquest fet, alguns investigadors, i fins i tot algunes autoritats sanitàries com la sueca, han proposat que es creï una zona grisa en què es consideri el resultat del test com a *borderline*, generalment d'entre 0,2 i 0,99UI/ml.<sup>181</sup> Wikell *et al.* van avaluar en una mostra de més de 50.000 pacients adults sotmesos al QFT®-Plus, aquells pacients amb un resultat *borderline* per a qualsevol dels dos tubs reactius, els quals representaven el 5,8% del total. Cal destacar tres conclusions de l'estudi. En primer lloc, que el 38,3% dels pacients amb un resultat inicialment *borderline* va negativitzar quan se'ls va repetir el

test. D'entre els que van convertir a negatiu, cap va presentar malaltia tuberculosa als 2 anys de seguiment, fet que suggeriria que un resultat feblement positiu que esdevé negatiu podria considerar-se realment com a fals positiu. En segon lloc, el percentatge de pacients amb un resultat discordant va disminuir de l'1,5% fins al 0,3% en aplicar els límits de zona grisa. En tercer lloc, els autors van analitzar aquells pacients amb una CIG al TB1 menor a 0,2UI/ml (vertaderament negatiu) i major de 0,35UI/ml al TB2 (positiu). Aquests pacients, que són els que teòricament haguessin resultat falsament negatius si se'ls hagués aplicat el QFT®-GIT tenint en compte els criteris de resultat *borderline*, van representar només el 0,4% del total, cosa que reforça la idea que l'aportació diagnòstica del segon tub reactiu és escassa.<sup>182</sup>

### **6.3.3 Variació en el temps de la concentració d'interferó-gamma amb el tractament antituberculós**

S'ha suggerit en diverses ocasions que monitoritzar l'activitat dels limfòcits efectors mitjançant tests IGRA pot ser una eina útil per avaluar la resposta clínica al tractament antituberculós.<sup>183,184</sup> Aquest principi es basa en el fet que aquests tests, a diferència del PPD, no avaluen la resposta dels limfòcits de memòria.<sup>158</sup> Els resultats obtinguts en fer servir el QFT®-GIT amb aquest propòsit són, però, poc concloents. En alguns estudis s'ha vist que després del tractament la CIG del tub reactiu disminueix<sup>64,185</sup>. Tot i això, en la majoria dels que fan servir un grup control sense tractament, no s'ha vist que la mesura del CIG sigui un marcador d'utilitat.<sup>183,186</sup> D'entre els darrers cal destacar un estudi publicat per Xin *et al.* en què es comparaven 1800 pacients tractats per una ITBL amb d'altres 800 que no rebien tractament, observant que el descens de la CIG era similar a tots dos grups.<sup>187</sup>

S'ha postulat que aquesta correlació pobre entre el tractament i el resultat dels tests IGRA previs al QFT®-Plus es podria explicar pel fet que la resposta dels limfòcits CD4<sup>+</sup>, als quals els són presentats antigens tan intra com extracel·lulars, és poc

dependent del grau de càrrega bacil·lar intracel·lular. Per contra, tal com s'ha justificat anteriorment, seria esperable que la reducció de la càrrega bacil·lar en resposta al tractament antituberculós s'associés a una disminució de la resposta CD8<sup>+</sup>. Resulten interessants en aquest sentit els resultats publicats per Nyendak *et al.* a Uganda l'any 2013.<sup>188</sup> Es van reclutar 50 pacients adults amb TBC cavitada i amb esputos positius i se'ls va realitzar un test T-SPOT.<sup>®</sup>TB als 0, 2 i 6 mesos de l'inici del tractament antituberculós. Es va veure que el percentatge de limfòcits CD8<sup>+</sup> que responien a l'estímul antigènic disminuïa significativament, especialment en els primers 2 mesos de tractament, que és quan més es redueix la càrrega bacil·lar. Per contra, el percentatge de limfòcits CD4<sup>+</sup> que responien no es va modificar amb el temps. Si bé la malnutrició, la qual produeix un descens de la resposta CD4<sup>+</sup>, podria resultar un factor de confusió (donat que a l'inici del tractament el percentatge de pacients malnodrits era major), els resultats d'aquest estudi indiquen que mesurar específicament la resposta CD8<sup>+</sup> podria resultar d'utilitat per monitoritzar l'efecte del tractament antituberculós. D'una manera semblant, Day *et al.* van observar en 13 pacients tractats de TBC que la resposta CD4<sup>+</sup> es mantenia al llarg del temps, mentre que la resposta CD8<sup>+</sup> disminuïa lleugerament.<sup>62</sup>

L'evidència sobre com el tractament afecta al llarg del temps als resultats del QFT<sup>®</sup>-Plus és encara molt limitada. A data d'avui, no hi ha publicacions realitzades en pacients pediàtrics més enllà del quart estudi de la tesi. Les publicacions en pacients adults són, així mateix, escasses i discordants pel que fa als resultats publicats. Així, alguns dels resultats efectivament mostren una disminució de la CIG amb el tractament i d'altres no.

Pel que fa a la malaltia activa, cal destacar l'estudi presentat per Kamada *et al.* en 38 pacients del Japó amb QFT<sup>®</sup>-Plus positiu al diagnòstic a qui se'ls va realitzar el test als 0, 3 i 6 mesos de tractament. Els investigadors van observar que la CIG dequeia de

manera significativa tant en TB1 com en TB2 durant els primers tres mesos de tractament, però no posteriorment. A més a més, es va avaluar l'evolució de la DCI (com a marcador de resposta CD8<sup>+</sup>) al llarg del temps, observant que disminuïa de manera significativa entre els tres i els sis mesos de tractament, però no abans. Els autors van proposar que a la fase aguda de la malaltia les respostes CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> són molt actives. Per contra, en la fase subaguda els limfòcits CD4<sup>+</sup> jugarien un paper més indirecte com a immunomoduladors de la resposta contra el bacil, mentre que els CD8<sup>+</sup> persistirien en la resposta directa contra el germen. Sigui com sigui, amb una taxa de negativització de tan sols 14%, els autors no veien la negativització del QFT®-Plus com un bon marcador de resposta al tractament.<sup>189</sup> Mamishi *et al.*, per la seva banda, van realitzar un disseny similar en 100 pacients de l'Índia amb TBC. En aquest cas però, si bé el descens de la CIG va ser significatiu tant en TB1 com en TB2, la DCI no es va modificar significativament. Tot i això, cal tenir en compte que la valoració es va realitzar tan sols tres mesos des de l'inici del tractament i no posteriorment.<sup>190</sup> Per últim, Petruccioli *et al.* van avaluar 28 pacients amb TBC. Van descriure que la CIG disminuïa tant en TB1 com en TB2, mentre que el percentatge de pacients amb un resultat positiu es reduïa de manera significativa. Resulta interessant destacar, però, que d'entre els pacients amb malaltia confirmada microbiològicament el canvi de CIG amb el tractament no va ser significatiu, a diferència de l'observat en pacients amb malaltia no confirmada. En qualsevol cas, la DCI va romandre propera a zero tant abans com després del tractament.<sup>191</sup>

Per contra, Chedid *et al.* van avaluar en un estudi multicèntric 132 pacients amb TBC provinents de països d'alta endèmia (Geòrgia, el Líban, Bangladesh, Madagascar i el Paraguai) a qui es va aplicar el test a l'inici, als dos mesos i al final del tractament antituberculós. El percentatge de pacients amb un resultat positiu per al test en global, per a TB1 i per a TB2, va mantenir-se estable en tot moment, mentre que la DCI va

romandre propera a zero en els tres moments d'anàlisi.<sup>192</sup> Finalment, Chiacchio *et al.* van veure que en una mostra de set pacients d'Itàlia amb TBC el percentatge de positivitat al QFT®-Plus es mantenia sense canvis un cop finalitzat el tractament.<sup>193</sup>

Pel que fa a estudis en pacients amb ITBL també hi ha resultats discrepants. Petruccioli *et al.* van avaluar a Itàlia 46 pacients amb ITBL. La disminució de la CIG va resultar significativa tant en TB1 com en TB2, però la DCI va resultar propera a zero, tant abans com després del tractament. Curiosament, però, aquells pacients amb una ITBL remota (de més de tres anys) no van presentar canvis significatius en la CIG amb el tractament per a cap dels dos tubs reactius, a diferència del que es va observar en aquells amb una ITBL recent (de menys de tres mesos).<sup>191</sup>

Per contra, Kim *et al.* van realitzar en 44 pacients de la República de Corea tant QFT®-GIT com QFT®-Plus abans i després del tractament antituberculós. Inicialment la CIG era lleugerament major al QFT®-GIT que als dos tubs del QFT®-Plus, sent similar a TB1 i a TB2. Després del tractament, però, la CIG era equiparable als tres tubs (QFT®-GIT, TB1 i TB2). En qualsevol cas, el canvi de CIG un cop finalitzat el tractament no va ser significatiu per a cap dels tres tubs.<sup>194</sup> Per últim, Chiacchio *et al.* van observar fins i tot que el percentatge de pacients amb ITBL amb un test positiu augmentava del 9 al 45% un cop finalitzat el tractament.<sup>193</sup>

El quart estudi de la tesi presenta resultats semblants als exposats. Es va veure que els pacients amb TBC presentaven un descens significatiu de la CIG tant al TB1 com al TB2, mentre que aquells amb ITBL no en mostraven una variació destacable. Kim *et al.* va proposar que aquest fet podria deure's a la diferent càrrega bacil·lar dels dos perfils de pacients.<sup>194</sup> Tot i això, tal com també havien observat Petruccioli *et al.*,<sup>191</sup> en els pacients de la nostra sèrie amb TBC es va veure un descens significatiu de la CIG en aquells sense confirmació microbiològica i amb malaltia no greu, mentre que els qui presentaven TBC confirmada o malaltia greu (als qui se'ls suposa una major càrrega

bacil·lar) no es va observar tal reducció. Aquesta troballa va en contra del fet que sigui la càrrega bacil·lar la que determina la reducció de la CIG. D'altra banda, d'entre els pacients amb ITBL sí que es va veure un descens significatiu en aquells estudiats per contacte de risc, mentre que els pacients estudiats en context de cribratge del nen migrat, de qui se suposa un temps d'exposició més antic, no presentaven una reducció significativa. Aquesta troballa podria explicar les diferències observades entre els estudis de Kim *et al.* (que comprenia adults sans estudiats per cribratge laboral) i Petruccioli *et al.* (que incloïa sobretot pacients estudiats per contacte de risc).<sup>191,194</sup>

Més enllà de l'exposat, resulta difícil identificar en quins perfils de pacient la CIG disminueix amb el tractament i en quins no, més encara tenint en compte que la CIG basal tant a TB1 com en TB2 no es va relacionar amb el diagnòstic final, la raó de l'estudi, l'edat o la confirmació microbiològica de la malaltia. Tampoc es va veure cap factor epidemiològic associat a una major taxa de negativització del test post-tractament. En qualsevol cas, amb una taxa de negativització de tan sols el 16%, no sembla que la repetició del QFT®-Plus sigui una eina útil per mesurar la resposta al tractament. Tampoc no sembla que ho sigui la monitorització de la CIG, donat que tan sols un 50% dels pacients va presentar un descens d'almenys un 25% de la CIG. De fet, fins a un 20% va presentar-ne un augment de més del 25%.

A més a més, resulta important destacar que la CIG en TB1 i TB2 va variar de manera paral·lela, tant en el global dels pacients com en cadascun dels subgrups analitzats. És a dir, que la DCI entre els dos tubs va romandre constant al llarg del temps, sense identificar cap perfil de pacient en què la CIG al TB2 variés en diferent mesura que la del TB1. Així doncs, els resultats observats suggereixen que l'addició del TB2 no suposa una aportació destacable a la capacitat del QFT®-Plus d'identificar aquells pacients amb una bona resposta al tractament. Aquest fet augmenta la sospita que la

correlació entre la CIG al TB2 i la resposta CD8<sup>+</sup> real és més feble del que caldria esperar, tal com s'ha discutit a l'apartat 6.3.2.

## 6.4 Limitacions i fortalezes dels estudis inclosos

Els quatre articles que conformen la tesi doctoral comparteixen algunes limitacions. Així, del conjunt de pacients amb diagnòstic final de TBC, només al voltant d'un 40% té confirmació microbiològica de la malaltia, característica comuna als estudis publicats en pediatria. Pel que fa al diagnòstic d'ITBL, cal reiterar que l'absència d'una prova estàndard que la defineixi dificulta que hi hagi un consens universal sobre la seva definició.

Pel que fa al disseny, es tracta d'estudis observacionals, amb la limitació que això comporta, donat el major risc de biaix derivat de possibles variables de confusió. D'altra banda, el fet que siguin estudis multicèntrics, si bé permet augmentar la quantitat de pacients avaluats, augmenta el risc d'errors no esmenables en la recol·lecció de dades. Així mateix, una de les limitacions més importants que cal esmentar és que, tal com s'ha reiterat a la discussió, no s'ha realitzat una comparació directa entre el QFT®-Plus i el seu predecessor QFT®-GIT, la qual cosa hagués permès dilucidar d'una manera més fidel quina és l'aportació del nou tub reactiu pel que fa al poder diagnòstic del test. Per últim, s'ha de recordar que d'entre les dades recollides no consta el temps concret de realització del PPD i el QFT®-Plus, fet important donat que s'havia especulat que la realització del PPD pot induir una resposta falsament positiva del QFT®-Plus. Tot i això, publicacions recents no donen suport a aquesta hipòtesi.<sup>195,196</sup>

Pel que fa a la recol·lecció de dades, val la pena destacar que, a diferència de la majoria d'estudis realitzats en països d'alta endèmia, hi havia un percentatge alt de pacients en què no es va determinar l'estatus serològic del VIH. Si bé la serologia VIH

es determina sistemàticament en el cribatge del nen migrat, no és així en pacients estudiats per contacte de risc, per sospita clínica o prèviament a l'inici de tractament immunosupressor, en base a la baixa taxa de nens i adolescents espanyols infectats pel VIH (menys de 0,1 nous casos per cada 100.000 habitants en menors de 15 anys l'any 2020).<sup>197</sup> Tampoc no s'ha avaluat l'efecte del fum de tabac, cosa que en nens a Catalunya s'ha identificat com a factor de risc de presentar tant ITBL com TBC.<sup>198</sup> A més dels esmentats, hi ha limitacions que caracteritzen de manera específica alguns dels articles.

Així, al primer estudi fins a un 20% dels pacients no tenien disponible els resultats quantitatius del test. A més, sense comptar aquells amb tuberculosi ganglionar, el nombre de pacients amb tuberculosi extrapulmonar va resultar de tan sols 19 casos (12,0%).

Pel que fa al segon estudi, el grup sobre el qual es va calcular l'especificitat (tots aquells pacients amb sospita de TBC però amb un diagnòstic alternatiu) era molt heterogeni pel que fa a la clínica que va motivar la realització del QFT®-Plus. A més, només en el 14,2% del grup es va aconseguir una confirmació microbiològica d'algun patògen alternatiu a la TBC, si bé cal tenir en compte que en molts d'ells els diagnòstics alternatius no eren d'etiologia infecciosa.

Al tercer article un dels objectius era avaluar els factors de risc de presentar un resultat indeterminat per al QFT®-Plus. Malgrat que la malnutrició i la infecció per helmints han estat descrits com a factors de risc de presentar aquest resultat en altres tests IGRA, no es van recollir aquestes dades epidemiològiques, les quals sovint no són tingudes en compte en estudis realitzats en països de baixa endèmia com el nostre.

Per altra banda, cal destacar d'aquest mateix article que només a un 63,5% dels pacients classificats com a 'no infectats' se'ls havia realitzat el PPD, de manera que el percentatge de la població estudiada amb una ITBL de base podria ser major.



Finalment, al quart article no es va establir de manera homogènia el moment en què repetir el QFT®-Plus després del tractament antituberculós, donat que els esquemes de tractament van ser variats en funció del diagnòstic final i del perfil clínic dels malalts amb TBC. Es va observar una correlació significativa entre el temps transcorregut entre els dos tests i el grau de descens de la CIG, de manera que la important heterogeneïtat de la variable 'temps entre tests' podria representar un factor de confusió a l'hora d'analitzar la variació en la CIG. Finalment, cal destacar que, per limitacions ètiques evidents, no es va comptar amb un grup control de pacients amb TBC sense tractar, fet que hagués permès estudiar si, tal com s'ha descrit en adults, la resposta CD8<sup>+</sup> augmenta en fases tardanes de la malaltia.<sup>170</sup>

Pel que fa a les fortaleeses dels estudis que configuren la tesi, cal destacar, d'una banda, el nombre de pacients inclosos. Si bé alguns estudis realitzats en població adulta inclouen poblacions més grans, els realitzats en població pediàtrica i, en especial aquells realitzats en població de baixa endèmia, tenen mostres marcadament més petites. D'altra banda, cal destacar la innovació que representen alguns dels aspectes analitzats. Així doncs, fins a la data de publicació dels articles, no s'havien reportat en nens sotmesos al QFT®-Plus anàlisis tals com l'avaluació dels factors relacionats amb un resultat indeterminat, l'anàlisi de l'especificitat del test, l'estudi de l'efecte del tractament antituberculós sobre la CIG o l'exploració de la contribució específica del TB2 en la capacitat diagnòstica del QFT®-Plus.

## **6.5 Estudis futurs i aplicació dels resultats de la tesi**

Amb els resultats obtinguts a través dels estudis d'aquesta tesi, hem pogut aprofundir en la interpretació i per tant millor utilització del QFT®-Plus en infants. Tot i això, donada l'absència d'una prova *gold standard*, el rendiment limitat dels tests en pediatria i l'absència d'exàmens que diferenciïn de manera efectiva la TBC de la ITBL,

es proposen noves línies d'investigació per avaluar nous test IGRA en pacients pediàtrics. Algunes d'aquestes línies proposades són:

- Avaluar noves tècniques com la quimioluminescència en la determinació dels nivells d'IFN $\gamma$  dels tests IGRA, com ja fan alguns tests nous comercialitzats en els darrers anys.
- Simplificar la metodologia al laboratori i automatitzar-la, disminuint la variabilitat tècnica i millorar així potencialment el rendiment diagnòstic dels IGRA en disminuir el percentatge de resultats indeterminats.
- Avaluar noves propostes tècniques que requereixin menys volum de sang.
- Estudiar el paper de l'hemaglutinina lligada a heparina o altres proteïnes com a antigen estimulator de l'alliberació d'IFN $\gamma$ , per tal de dilucidar si pot ser útil a l'hora de diferenciar la infecció latent de la TBC activa.
- Investigar punts de tall diferent del tub mitogen en funció de l'edat del pacient, amb la intenció de disminuir la taxa de resultats indeterminats.
- Examinar de manera específica i prospectivament aquells pacients que presenten al QFT®-Plus valors de CIG propers al llindar de positivitat (zona grisa).
- Analitzar de manera específica el comportament del QFT®-Plus en pacients amb immunodeficiències i en els pacients menors de 2 anys, dos grups amb alt risc de TBC greus i disseminades.
- Investigar el valor del QFT®-Plus i els nous tests IGRA que puguin aparèixer en altres poblacions pediàtriques de risc, com ara els pacients oncològics o aquells amb diabetis tipus 1.
- Aprofundir en l'estudi de marcadors immunològics, inclosos els tests IGRA, que permetin monitoritzar la resposta al tractament antituberculós i, potencialment, individualitzar-ne la durada en cada pacient.

Finalment, en base als resultats obtinguts als diferents articles que conformen la tesi, així com d'acord amb la recerca realitzada d'estudis sobre l'aplicació del QFT®-Plus i del QFT®-GIT en Pediatria creiem important reforçar les següents recomanacions per a pediatres que tractin pacient amb risc d'ITBL o amb sospita de TBC:

- La confirmació microbiològica de la TBC en Pediatria és poc freqüent. El seu diagnòstic de presumpció es basa en la sospita clínica o radiològica en un pacient amb factors de risc de presentar la malaltia.
- El PPD i els test IGRA poden reforçar una sospita diagnòstica de TBC, però ni la seva positivitat confirma el diagnòstic ni la seva negativitat el descarta.
- En qualsevol cas, davant d'un pacient amb sospita clínica de malaltia, és recomanable la realització d'un dels tests esmentats. En cas que resulti negatiu, i donat que la correlació dels dos tests és subòptima, seria recomanable la realització de l'altre test, per tal de potenciar la sensibilitat de totes les proves complementàries. En paral·lel a l'exposat, caldria completar l'estudi de contactes, la realització de proves d'imatge així com la recollida de mostres biològiques.



# CONCLUSIONS

---

## **7 CONCLUSIONS**

- 1) La sensibilitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus per al diagnòstic tant de la tuberculosi activa com de la infecció latent és similar a la reportada prèviament per al QuantiFERON®-TB Gold-In-Tube.
- 2) L'especificitat del QuantiFERON®-TB Gold Plus en pacients amb sospita de tuberculosi és semblant a la reportada per al QuantiFERON®-TB Gold-In-Tube.
- 3) La concordança entre el QuantiFERON®-TB Gold Plus i el test de la tuberculina és globalment alta, però feble en els pacients amb tuberculosi activa i amb infecció latent.
- 4) En els pacients amb malaltia confirmada microbiològicament, el QuantiFERON®-TB Gold Plus presenta una major sensibilitat.
- 5) L'edat menor a cinc anys, la limfopènia i els nivells més elevats de proteïna C reactiva són factors de risc independent de presentar un resultat indeterminat per al QuantiFERON®-TB Gold Plus.
- 6) La concordança entre els tubs reactius 1 i 2 és excel·lent tant a nivell dels resultats qualitius com quantitius.
- 7) El tub reactiu 2 de QuantiFERON®-TB Gold Plus no presenta un rendiment diferenciat al tub reactiu 1 en cap perfil de pacient concret i, per tant, no suposa un guany en el rendiment del test respecte a versions prèvies.
- 8) La variació en la concentració d'interferó gamma en els tubs reactius de QuantiFERON®-TB Gold Plus un cop completat el tractament antituberculós presenta una alta variabilitat entre pacients i no és útil per a la monitorització de la resposta terapèutica.

# BIBLIOGRAFIA

---

## 8 **BIBLIOGRAFIA**

1. Hayman J. Mycobacterium ulcerans: an infection from jurassic time? *Lancet*. 1984;324(8410):1015-1016.
2. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Conell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9869-9874.
3. M Cristina G, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2005;1(1):0055-0061.
4. Crubézy É, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. Identification d'ADN de Mycobacterium dans un mal de Pott égyptien de 5400 ans. *Comptes Rendus l'Academie des Sci - Ser III*. 1998;321(11):941-951.
5. Daniel TM. The history of tuberculosis. *Respir Med*. 2006;100(11):1862-1870.
6. *Llibre Del Deuteronomi 28:22*. 1500 a.C
7. Hipocrates. *The Aphorisms Of Hippocrates: With A Translation Into Latin And English*. 400 a.C.
8. Roberts C, Buikstra J. *The Bioarchaeology of Tuberculosis: A Global View on a Reemerging Disease*. 2003.
9. Laennec RTH. *De l'auscultation Médiante Ou Traité Du Diagnostic Des Maladies Des Poumons et Du Coeur, Fondé Principalement Sur Ce Nouveau Moyen d'exploration*. 1819.
10. Báguena MJ. *Cent Anys de Lluita Antituberculosa a Barcelona. Cent Anys de*



- Salut Publica a Barcelona. Barcelona: Ajuntament de Barcelona. 1991.*
11. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(3):196-201.
  12. Von Pirquet C. Frequency of tuberculosis in childhood . *J Am Med Assoc.* 1909;52:675-678.
  13. WHO Tuberculosis Research Office. FURTHER studies of geographic variation in naturally acquired tuberculin sensitivity. *Bull World Heal Organ.* 1955;12:63-83.
  14. Calbet i Camarasa JM. Lluita antituberculosa a Catalunya. *Gimbernat Rev d'Història la Med i les Ciències la Salut.* 1988;9:41-56.
  15. Hjaltsted O, Törning K. Clinical aspects of pneumothorax therapy as illustrated by the results obtained in 191 cases of completed treatment. *Br J Tuberc.* 1939;33(1):4-16.
  16. Mitchell RS. Artificial pneumothorax: a statistical analysis of 557 cases initiated in 1930-1939 and followed in 1949. I. The influence of clinical findings before induction on early and late results. *Am Rev Tuberc.* 1951;64(1):1-20.
  17. Beard HJ. A review of 100 consecutive cases of thoracoplasty with special reference to the advanced case. *Br J Tuberc Dis Chest.* 1951;45(3):131-137.
  18. Armand Ugón V. *El Tórax Quirúrgico.* Editorial Científica del SMU. 1938.
  19. Sakula A. BCG: Who were Calmette and Guerin? *Thorax.* 1983;38(11):806-812.
  20. Weitzman D, de Wend Cayley FE, Wingfield AL. Streptomycin in the treatment of pulmonary tuberculosis. *Br J Tuberc Dis Chest.* 1950;44(4):98-104.
  21. World Health Organization. *Global HIV & AIDS Statistics 2021.* 2021.

22. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2020*. 2020.
23. Lawn SD, Zumla AI. Tuberculosis. *Lancet*. 2011;378(9785):57-72.
24. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2022*. 2022.
25. World Health Organization. *The top 10 causes of death*. 2020. Disponible a: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
26. Grupo de trabajo Plan Prevención y Control de la Tuberculosis. Plan para la prevención y control de la tuberculosis en España. *Com Salud Pública del Cons Interterritorial del Sist Nac Salud Minist Sanidad, Gob España*. 2019.
27. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Ministerio de Ciencia e Innovación. *Tuberculosis. Vigilancia 2012 a 2017. Resultados de La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica*. 2019.
28. TBnet - ptbnet. Pediatric tuberculosis network european trialsgroup. Disponible a: <http://www.tb-net.org/index.php/ptbnet>.
29. World Health Organization. *Tuberculosis Surveillance and Monitoring Report in Europe*. 2019.
30. pTBred | Asociación Española de Pediatría. Disponible a: <https://www.aeped.es/ptbred>.
31. Piñeiro Pérez R, Santiago García B, José Mellado Peña M. Red Española de Estudio de Tuberculosis Pediátrica. A la vanguardia de Europa. *Revista Española de Salud Pública*. 2017;91:e201701001
32. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J*

- Biomed Inform.* 2009;42(2):377-381.
33. C. Rozman, F. Cardellach. *Medicina Interna. XVII Edición.* Vol 2.; Elsevier. 2012.
  34. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Exp Med.* 1993;178(6):2249-2254.
  35. Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genet.* 1999;21(4):370-378.
  36. Sloot R, Schim van der Loeff MF, Kouw PM, Borgdorff MW. Risk of tuberculosis after recent exposure. A 10-year follow-up study of contacts in Amsterdam. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(9):1044-1052.
  37. Mandal N, Anand PK, Gautam S, Das S, Hussain T. Diagnosis and treatment of paediatric tuberculosis: An insight review. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(4):466-480.
  38. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Sarke JJ, et al. The natural history of childhood intra-thoracic tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(4):392-402.
  39. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Hesselning AC, Obihara CC, Nelson LJ, et al. The clinical epidemiology of childhood pulmonary tuberculosis: a critical review of literature from the pre-chemotherapy era. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004;8(3):278-285.
  40. Cruz M. *Manual de Pediatría.* Cuarta edición. Ergon. 2020.

41. Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Beyers N, Donald PR, Starke JR. Childhood pulmonary tuberculosis: old wisdom and new challenges. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(10):1078-1090.
42. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank M, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(5):1186-1205.
43. Trajman A, Steffen RE, Menzies D. Interferon-Gamma Release Assays versus Tuberculin Skin Testing for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Overview of the Evidence. *Pulm Med.* 2013;2013:1-11.
44. Moreno-Pérez D, Andrés Martín A, Altet Gómez N, Baquero-Artigao F, Escribano Montaner A, Gómez-Pastrana D, et al. Diagnosis of tuberculosis in pediatrics. Consensus document of the Spanish Society of Pediatric Infectology (SEIP) and the Spanish Society of Pediatric Pneumology (SENP). *An Pediatr (Barc).* 2010;73(3):143.e1-143.
45. Centers of Disease Control and Prevention. Public Health Image Library(PHIL). Disponible a: <https://phil.cdc.gov/QuickSearch.aspx?key=true>.
46. Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011;37(1):88-99.
47. QIAGEN. QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT®-Plus) ELISA Package Insert . 2016. Disponible a: [http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English\\_QFTPlus\\_ELISA\\_R04\\_022016.pdf](http://www.quantiferon.com/wp-content/uploads/2017/04/English_QFTPlus_ELISA_R04_022016.pdf).
48. Immunospot.com. Human IFN- $\gamma$  Single-Color ELISPOT. Disponible a:

- <http://www.immunospot.com/immunospot-kits/human-ifn-gamma-single-color-elispot>.
49. Kweon OJ, Lim YK, Kim HR, Kim TH, Lee MK. Evaluation of Standard E TB-Feron Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Health Care Workers. *J Clin Microbiol*. 2019;57(12):e01347-19.
  50. Benachinmardi K, Sampath S, Rao M. Evaluation of a new interferon gamma release assay, in comparison to tuberculin skin tests and quantiferon tuberculosis goldplus for the detection of latent tuberculosis infection in children from a high tuberculosis burden setting. *Int J mycobacteriology*. 2021;10(2):142-148.
  51. Kim JJ, Park Y, Choi D, Suk Kim H. Performance Evaluation of a New Automated Chemiluminescent Immunoanalyzer-Based Interferon-Gamma Releasing Assay AdvanSure I3 in Comparison With the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay. *Ann Lab Med*. 2020;40(1):33-39.
  52. QIAGEN, DiaSorin. LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus The world's leading IGRA technology, now with unique workflow efficiency. 2020.
  53. Brantestig S, Kinnuen A, Almeflo S, Restorp K, Ahlqvist J, Dyrdak R. Comparative evaluation of CLIA and EIA for Quantiferon-TB Gold Plus. *APMIS*. 2020;128(4):343-349.
  54. Bisognin F, Lombardi G, Re, MC, Dal Monte P. QuantiFERON-TB Gold Plus with Chemiluminescence Immunoassay: Do We Need a Higher Cutoff? *J Clin Microbiol*. 2020;58(10): e00780-20.
  55. Mol CJ, Koethe SM. QuantiFERON-TB GOLD--An innovation in tuberculosis

- screening. *AAOHN J.* 2006;54(6):245-247.
56. Catanzaro A, Daley C. A summary of the Third Global Interferon- $\gamma$  Release Assay Symposium. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34(6):619-624.
57. SD Biosensor. TB-Feron ELISA. Disponible a:  
[http://www.sdbiosensor.com/product/product\\_view?product\\_no=113](http://www.sdbiosensor.com/product/product_view?product_no=113).
58. Ryu MR, Park M-S, Cho EH, Jung CW, Kim K, Kim SJ, et al. Comparative Evaluation of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and QuantiFERON-TB Gold Plus in Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in Immunocompromised Patients. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11): e00438-18.
59. Brookes RH, Pathan AA, McShane H, Hensmann M, Price DA, Hill AVS. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular Mycobacterium tuberculosis growth in activated human macrophages. *Eur J Immunol.* 2003;33(12):3293-3302.
60. Turner J, Dockrell HM. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live mycobacterium bovis BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. *Immunology.* 1996;87(3):339-342.
61. Nikolova M, Markova R, Drenska R, Muhtarova M, Todorova Y, Dimitrov V, et al. Antigen-specific CD4- and CD8-positive signatures in different phases of Mycobacterium tuberculosis infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75(3):277-281.
62. Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, van Rensburg EJ, Stone L, O'rie T, et al. Functional Capacity of Mycobacterium tuberculosis -Specific T Cell Responses in Humans Is Associated with Mycobacterial Load. *J Immunol.* 2011;187(5):2222-2232.
63. Rozot V, Vigano S, Mazza-Stalder J, Idrizi E, Day CL, Perreau M, et al.

- Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells are functionally and phenotypically different between latent infection and active disease. *Eur J Immunol.* 2013;43(6):1568-1577.
64. Lancioni C, Nyendak M, Kiguli S, Zalwango S, Mori T, Mayanja-Kizza H, et al. CD8 + T cells provide an immunologic signature of tuberculosis in young children. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185(2):206-212.
65. Sester M, Sotgiu G, Lange C, Giehl C, Girardi E, Migliori GB, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011;37(1):100-111.
66. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest.* 2010;137(4):952-968.
67. Mandalakas AM, Detjen AK, Hesselning AC, Benedetti A, Menzies D. Interferon-gamma release assays and childhood tuberculosis: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(8):1018-1032.
68. Laurenti P, Raponi M, de Waure C, Marino M, Ricciardi W, Damiani G. Performance of interferon- $\gamma$  release assays in the diagnosis of confirmed active tuberculosis in immunocompetent children: a new systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1):131.
69. Sotgiu G, Saderi L, Petruccioli E, Aliberti S, Piana A, Petrone L, et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2019;79(5):444-453.
70. Shafeque A, Bigio J, Hogan CA, Pai M, Banaei N. Fourth-generation quantiFERON-TB gold plus: What is the evidence? *J Clin Microbiol.* 2020;58(9):

- e01950-19.
71. Kay AW, DiNardo AR, Dlamini Q, Kahari J, Mndzebele T, Mtetwa G, et al. Evaluation of the QuantiFERON-Tuberculosis Gold Plus Assay in Children with Tuberculosis Disease or Following Household Exposure to Tuberculosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(3):540-543.
  72. Buonsenso D, Delogu G, Perricone C, Grossi R, Careddu A, De Maio F, et al. Accuracy of QuantiFERON-TB Gold-PLUS Test for the Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in Children. *J Clin Microbiol.* 2020;58(6):e00272-20.
  73. Nguyen DT, Phan H, Trinh T, Nguyen H, Doan H, Pham N, et al. Sensitivity and characteristics associated with positive QuantiFERON-TB Gold-Plus assay in children with confirmed tuberculosis. *PLoS One.* 2019;14(3):e0213304.
  74. Borkowska-Tatar D, Krasinska M, Augustynowicz-Kopec E. QuantiFERON-TB Gold Plus Test in Diagnostics of Latent Tuberculosis Infection in Children Aged 1-14 in a Country with a Low Tuberculosis Incidence. *Polish J Microbiol.* 2021;70(4):461-468.
  75. World Health Organization. *WHO consolidated guidelines on tuberculosis Module 5: Management of tuberculosis in children and adolescents.* 2022.
  76. World Health Organization. *High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting.* 2014.
  77. Buonsenso D, Noguera-Julian A, Moroni R, Hernández-Bartolomé A, Fritschi N, Lancelli L, et al. Performance of QuantiFERON-TB Gold Plus assays in paediatric tuberculosis: a multicentre PTBNET study. *Thorax.* 2022;78(3):288-296.



78. World Health Organization. *WHO Estimates of Tuberculosis Incidence by Country and Territory, 2020*. Disponible a:  
<https://www.gov.uk/government/publications/tuberculosis-tb-by-country-rates-per-100000-people>.
79. Song KH, Jeon JH, Park WB, Kim SH, Park KU, Kim NJ, et al. Usefulness of the whole-blood interferon-gamma release assay for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;63(2):182-187.
80. Connell TG, Curtis N, Ranganathan SC, Buttery JP. Performance of a whole blood interferon gamma assay for detecting latent infection with Mycobacterium tuberculosis in children. *Thorax*. 2006;61(7):616-620.
81. Connell TG, Ritz N, Paxton GA, Buttery JP, Curtis N, Ranganathan SC. A three-way comparison of tuberculin skin testing, QuantiFERON-TB gold and T-SPOT.TB in children. *PLoS One*. 2008;3(7):e2624.
82. Chun JK, Kim CK, Kim HS, Jung GY, Lee TJ, Kim KH, et al. The role of a whole blood interferon- $\gamma$  assay for the detection of latent tuberculosis infection in Bacille Calmette-Guérin vaccinated children. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(4):389-394.
83. Bergamini BM, Losi M, Vaienti F, D'Amico R, Meccugni B, Meacci M, et al. Performance of commercial blood tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection in children and adolescents. *Pediatrics*. 2009;123(3):e419-24.
84. Bianchi L, Galli L, Moriondo M, Veneruso G, Becciolini L, Azzari C, et al. Interferon-gamma release assay improves the diagnosis of tuberculosis in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(6):510-514.
85. Grare M, Derelle J, Dailloux M, Laurain C. QuantiFERON-TB Gold In-Tube as

- help for the diagnosis of tuberculosis in a French pediatric hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66(4):366-372.
86. Herrmann JL, Belloy M, Porcher R, Simonney N, Avoutaam R, Lebourgeois M, et al. Temporal dynamics of interferon gamma responses in children evaluated for tuberculosis. *PLoS One*. 2009;4(1):e4130.
87. Bamford ARJ, Crook AM, Clark JE, Nademi Z, Dixon G, Paton JY, et al. Comparison of interferon-gamma release assays and tuberculin skin test in predicting active tuberculosis (TB) in children in the UK: a paediatric TB network study. *Arch Dis Child*. 2010;95(3):180-186.
88. Kampmann B, Whittaker E, Williams A, Walters S, Gordon A, Martínez-Alier N, et al. Interferon- $\gamma$  release assays do not identify more children with active tuberculosis than the tuberculin skin test. *Eur Respir J*. 2009;33(6):1374-1382.
89. Haustein T, Ridout DA, Hartley JC, Thaker U, Shingadia D, Klein N, et al. The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-gamma release assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children correlates with age and immune status. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(8):669-673.
90. Detjen AK, Keil T, Roll S, Hauer B, Mauch H, Wahn U, et al. Interferon- Release Assays Improve the Diagnosis of Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Disease in Children in a Country with a Low Incidence of Tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2007;45(3):322-328.
91. Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, Latorre I, Milà C, Blanco S, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15(1):168-171.

92. Higuchi R, Mori M, Ozawa R, Miyamae T, Imagawa T, Nishimaki S, et al. Whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis in children in Japan. *Pediatr Int*. 2009;51(1):97-102.
93. Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, Mori T. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis*. 2008;88(3):244-248.
94. Lighter J, Rigaud M, Eduardo R, Peng CH, Pollack H. Latent tuberculosis diagnosis in children by using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test. *Pediatrics*. 2009;123(1):30-37.
95. Sollai S, Galli L, de Martino M, Chiappini E. Systematic review and meta-analysis on the utility of Interferon-gamma release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a 2013 update. *BMC Infect Dis*. 2014;14 Suppl 1: S6.
96. Altet-Gómez N, De Souza-Galvao M, Latorre I, Milà C, Jiménez MA, Solsona J, et al. Diagnosing TB infection in children: analysis of discordances using in vitro tests and the tuberculin skin test. *Eur Respir J*. 2011;37(5):1166-1174.
97. Tsolia MN, Mavrikou M, Critselis E, Papadopoulos NG, Makrinioti H, Spyridis N, et al. Whole blood interferon- $\gamma$  release assay is a useful tool for the diagnosis of tuberculosis infection particularly among Bacille Calmette Guèrin-vaccinated children. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(12):1137-1140.
98. Tavast E, Salo E, Seppälä I, Tuuminen T. IGRA tests perform similarly to TST but cause no adverse reactions: pediatric experience in Finland. *BMC Res Notes*. 2009;2:9.
99. Chiappini E, della Bella C, Bonsignori F, Sollai S, Amedei A, Galli L, et al.

- Potential Role of *M. tuberculosis* Specific IFN- $\gamma$  and IL-2 ELISPOT Assays in Discriminating Children with Active or Latent Tuberculosis. *PLoS One*. 2012;7(9):e46041.
100. Méndez-Echevarría A, González-Muñoz M, Mellado MJ, Baquero-Artigao F, Blázquez D, Penín M, et al. Interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of tuberculosis in children. *Arch Dis Child*. 2012;97(6):514-516.
101. Nenadić N, Kirin BK, Letoja IZ, Plavec D, Topić RZ, Dodig S. Serial interferon- $\gamma$  release assay in children with latent tuberculosis infection and children with tuberculosis. *Pediatr Pulmonol*. 2012;47(4):401-408.
102. Thomas TA, Mondal D, Noor Z, Liu L, Alam M, Haque R, et al. Malnutrition and helminth infection affect performance of an interferon gamma-release assay. *Pediatrics*. 2010;126(6): e1522-9.
103. Debord C, De Lauzanne A, Gourgouillon N, Guérin-El Khourouj V, Pédrón B, Gaudelus J, et al. Interferon-gamma release assay performance for diagnosing tuberculosis disease in 0- to 5-year-old children. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(11):995-997.
104. Losi M, Bocchino M, Matarese A, Bellofiore B, Roversi P, Rumpianesi F, et al. Role of the quantiferon-TB test in ruling out pleural tuberculosis: a multi-centre study. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1):159-165.
105. Nolt D, Starke JR. Tuberculosis Infection in Children and Adolescents: Testing and Treatment. *Pediatrics*. 2021;148(6): e2021054663.
106. Surve S, Bhor V, Naukariya K, Begum S, Munne K, Tipre P, et al. Discordance between TST and QFT-TBGold Plus for Latent Tuberculosis Screening among Under-Five Children: An Interim Analysis. *J Trop Pediatr*. 2021;67(6):103.

107. Pavić I, Topić RZ, Raos M, Aberle N, Dodig S. Interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(10):866-870.
108. Garazzino S, Galli L, Chiappini E, Pinon M, Bergamini BM, Cazzato S, et al. Performance of interferon- $\gamma$  release assay for the diagnosis of active or latent tuberculosis in children in the first 2 years of age: a multicenter study of the Italian Society of Pediatric Infectious Diseases. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(9):e226-231.
109. Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Latorre I, Altet N, Domínguez J, Fortuny E, et al. Performance of Tuberculin Skin Tests and Interferon- $\gamma$  Release Assays in Children Younger Than 5 Years. *Pediatr Infect Dis J.* 2018;37(12):1235-1241.
110. Critselis E, Amanatidou V, Syridou G, Spyridis NP, Mavrikou M, Papadopoulos NG, et al. The effect of age on whole blood interferon-gamma release assay response among children investigated for latent tuberculosis infection. *J Pediatr.* 2012;161(4):632-638.
111. Moyo S, Isaacs F, Gelderbloem S, Verver S, Hawkridge AJ, Matherill M, et al. Tuberculin skin test and QuantiFERON® assay in young children investigated for tuberculosis in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011;15(9):1176-1181.
112. Vallada MG, Okay TS, Del Negro GMB, Antonio CA, Yamamoto L, Ramos SRTS. Accuracy of the QuantiFERON-TB Gold in Tube for diagnosing tuberculosis in a young pediatric population previously vaccinated with Bacille Calmette-Guérin. *Rev Paul Pediatr.* 2014;32(1):4-10.
113. Jenum S, Selvam S, Mahelai D, Jesuraj N, Cárdenas V, Kenneth J, et al. Influence of age and nutritional status on the performance of the tuberculin skin test and QuantiFERON-TB Gold in-Tube in young children evaluated for

- tuberculosis in Southern India. *Pediatr Infect Dis J.* 2014;33(10):e260-e269.
114. Chiappini E, Accetta G, Bonsignori F, Boddi V, Galli L, Biggeri A, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children: a systematic review and meta-analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012;25(3):557-564.
115. Sun L, Xiao J, Miao Q, Feng WX, Wu XR, Yin QQ, et al. Interferon gamma release assay in diagnosis of pediatric tuberculosis: a meta-analysis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;63(2):165-173.
116. Chiappini E, Storelli F, Tersigni C, Venturini E, de Martino M, Galli L. QuantiFERON-TB Gold In-Tube test performance in a large pediatric population investigated for suspected tuberculosis infection. *Paediatr Respir Rev.* 2019;32:36-47.
117. Hesseling AC, Mandalakas AM, Kirchner HL, Chegou NN, Marais BJ, Stanley K, et al. Highly discordant T cell responses in individuals with recent exposure to household tuberculosis. *Thorax.* 2009;64(10):840-846.
118. Tsiouris SJ, Austin J, Toro P, Coetzee D, Weyer K, Stein Z, et al. Results of a tuberculosis-specific IFN-gamma assay in children at high risk for tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10(8):939-941.
119. Thomas B, Pugalenthi A, Patel H, Woltmann G, Bankart J, Hoskyns W. Concordance between tuberculin skin test and interferon- $\gamma$  assay and interferon- $\gamma$  response to mitogen in pediatric tuberculosis contacts. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46(12):1225-1232.
120. Dayal R, Verma V, Sharma B, Kumar G, Kumar N, Gupta R, et al. Diagnostic value of interferon- gamma release assays (QuantiFERON-TB Gold® In Tube)

- in childhood tuberculosis. *Indian J Pediatr.* 2012;79(2):183-187.
121. Lighter J, Rigaud M, Huie M, Peng CH, Pollack H. Chemokine IP-10: An adjunct marker for latent tuberculosis infection in children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13(6):731-736.
  122. Yassin MA, Petrucci R, Garie KT, Harper G, Arbide I, Aschalew M, et al. Can interferon-gamma or interferon-gamma-induced-protein-10 differentiate tuberculosis infection and disease in children of high endemic areas? *PLoS One.* 2011;6(9):e23733.
  123. Uluk T, Allison WE, Vince J, Wand H, Tefuarani N, Causer LM, et al. Evaluation of an interferon-gamma release assay in children with suspected tuberculosis in Papua New Guinea. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(2):187-189.
  124. Petrucci R, Lombardi G, Corsini I, Bacchi Reggiani ML, Visciotti F, Bernardi F, et al. Quantiferon-TB Gold In-Tube Improves Tuberculosis Diagnosis in Children. *Pediatr Infect Dis J.* 2017;36(1):44-49.
  125. Lombardi G, Petrucci R, Corsini I, Bacchi Reggiani ML, Visciotti F, Bernardi F, et al. Quantitative Analysis of Gamma Interferon Release Assay Response in Children with Latent and Active Tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(2): e01360-17.
  126. Sali M, Buonsenso D, Goletti D, D'Alfonso P, Zumbo A, Fadda G, et al. Accuracy of QuantiFERON-TB Gold Test for Tuberculosis Diagnosis in Children. *PLoS One.* 2015;10(10): e0138952.
  127. Blandinières A, de Lauzanne A, Guérin-El Khourouj V, Gourgouillon N, See H, Pédrón B, et al. QuantiFERON to diagnose infection by Mycobacterium tuberculosis: performance in infants and older children. *J Infect.* 2013;67(5):391-

398.

128. Dogra S, Narang P, Mendiratta DK, Chaturvedi P, Reingold A, Colford J, et al. Comparison of a whole blood interferon- $\gamma$  assay with tuberculin skin testing for the detection of tuberculosis infection in hospitalized children in rural India. *J Infect.* 2007;54(3):267-276.
129. Rose M V., Kimaro G, Nissen TN, Kroidl I, Hoelscher M, Bygbjerg IC, et al. QuantiFERON®-TB gold in-tube performance for diagnosing active tuberculosis in children and adults in a high burden setting. *PLoS One.* 2012;7(7): e37851.
130. Ashley MJ, Siebenmann CO. Tuberculin Skin Sensitivity Following BCG Vaccination with Vaccines of High and Low Viable Counts. *Can Med Assoc J.* 1967;97:1335-1339.
131. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax.* 2002;57(9):804-809.
132. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006;10:1192-1204.
133. Tebruegge M, Dutta B, Donath S, Ritz N, Forbes B, Camacho-Badilla K, et al. Mycobacteria-Specific Cytokine Responses Detect Tuberculosis Infection and Distinguish Latent from Active Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015;192(4):485-499.
134. Zwerling A, Behr MA, Verma A, Brewer TF, Menzies D, Pai M. The BCG World Atlas: a database of global BCG vaccination policies and practices. *PLoS Med.* 2011;8(3):e1001012.



135. Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS. *Red Book. 2018-2021 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31st Edition.*; 2018.
136. Tebruegge M, Pantazidou A, MacGregor D, Gonis G, Leslie D, Sedda L, et al. Nontuberculous Mycobacterial Disease in Children – Epidemiology, Diagnosis & Management at a Tertiary Center. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147513.
137. Martínez-Planas A, Baquero-Artigao F, Santiago B, Fortuny C, Méndez-Echevarría A, Del Rosal T, et al. Interferon-Gamma Release Assays Differentiate between Mycobacterium avium Complex and Tuberculous Lymphadenitis in Children. *J Pediatr*. 2021;236:211-218.
138. Latorre I, De Souza-Galvão M, Ruiz-Manzano J, Lacoma A, Prat C, Altet N, et al. Evaluating the non-tuberculous mycobacteria effect in the tuberculosis infection diagnosis. *Eur Respir J*. 2010;35(2):338-342.
139. Lein AD, Von Reyn CF, Ravn P, Horsburgh CR, Alexander LN, Andersen P. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to Mycobacterium avium complex and those with pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(4):606-609.
140. Von Reyn CF, Williams DE, Horsburgh CR, Jaeger AS, Marsh BJ, Haslov K, et al. Dual skin testing with Mycobacterium avium sensitin and purified protein derivative to discriminate pulmonary disease due to M. avium complex from pulmonary disease due to Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*. 1998;177(3):730-736.
141. Tebruegge M, Ritz N, Curtis N, Shingadia D. Diagnostic Tests for Childhood Tuberculosis: Past Imperfect, Present Tense and Future Perfect? *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(9):1014-1019.

142. Song SE, Yang JY, Lee KS, Kim H, Him YM, Kim S, et al. Comparison of the tuberculin skin test and interferon gamma release assay for the screening of tuberculosis in adolescents in close contact with tuberculosis TB patients. *PLoS One*. 2014;9(7): e100267.
143. Mahomed H, Hawkrigde T, Verver S, Abrahams D, Geiter L, Hatherill M, et al. The tuberculin skin test versus QuantiFERON TB Gold® in predicting tuberculosis disease in an adolescent cohort study in South Africa. *PLoS One*. 2011;6(3):e17984.
144. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(10):1164-1170.
145. Auguste P, Tsertsvadze A, Pink J, Court R, McCarthy N, Sutcliffe P, et al. Comparing interferon-gamma release assays with tuberculin skin test for identifying latent tuberculosis infection that progresses to active tuberculosis: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):200.
146. Getahun H, Matteelli A, Abubakar I, Aziz MA, Baddeley A, Barreira D, et al. Management of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. *Eur Respir J*. 2015;46(6):1563-1576.
147. National Institute for Health and Care Excellence. *NICE guideline. Tuberculosis*. 2016. Disponible a: [www.nice.org.uk/guidance/ng33](http://www.nice.org.uk/guidance/ng33).
148. European Centre for Disease Prevention and Control. *Programmatic management of latent tuberculosis infection in the European Union*. 2018.
149. Lewinsohn DM, Leonard MK, LoBue PA, Cohn DL, Daley CL, Desmond E, et al.

- Official American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America/Centers for Disease Control and Prevention Clinical Practice Guidelines: Diagnosis of Tuberculosis in Adults and Children. *Clin Infect Dis*. 2017;64(2):111-115.
150. Gaensbauer J, Young J, Harasaki C, Aiona K, Belknap R, Haas MK. Interferon-Gamma Release Assay Testing in Children Younger Than 2 Years in a US-Based Health System. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(9):803-807.
151. Primaturia C, Reniarti L, Nataprawira HMN. Comparison between the Interferon  $\gamma$  Release Assay - QuantiFERON Gold plus (QFT-Plus) - And Tuberculin Skin Test (TST) in the Detection of Tuberculosis Infection in Immunocompromised Children. *Pulm Med*. 2020;2020:7159485.
152. Ghanaie RM, Karimi A, Azimi L, James S, Nasehi M, Mishkar AP, et al. Diagnosis of latent tuberculosis infection among pediatric household contacts of Iranian tuberculosis cases using tuberculin skin test, IFN-  $\gamma$  release assay and IFN- $\gamma$ -induced protein-10. *BMC Pediatr*. 2021;21(1):76.
153. Böncüoğlu E, Kıymet E, Şahinkaya Ş, Kara AA, Çağlar I, Arikan KÖ, et al. Usefulness of screening tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in children. *Pediatr Pulmonol*. 2021;56(5):1114-1120.
154. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez-Angulo Y, Hatherill M, Moyo S, Hanekom W, et al. The utility of an interferon gamma release assay for diagnosis of latent tuberculosis infection and disease in children: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(8):694-700.
155. Nakaoka H, Lawson L, Squire SB, Coulter B, Ravn P, Brock I, et al. Risk for tuberculosis among children. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(9):1383-1388.

156. Richeldi L, Losi M, D'Amico R, Luppi M, Ferrari A, Mussini C, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest*. 2009;136(1):198-204.
157. Lombardi G, Pellegrino MT, Denicolò A, Corsini I, Tadolini M, Bergamini BM, et al. QuantiFERON-TB Performs Better in Children, Including Infants, than in Adults with Active Tuberculosis: a Multicenter Study. *J Clin Microbiol*. 2019;57(10):e01048-19.
158. Zrinski Topić R, Zoričić-Letoja I, Pavić I, Dodig S. Indeterminate results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay in nonimmunosuppressed children. *Arch Med Res*. 2011;42(2):138-143.
159. Connell TG, Tebruegge M, Ritz N, Bryant PA, Leslie D, Curtis N. Indeterminate interferon-gamma release assay results in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(3):285-286.
160. Tebruegge M, De Graaf H, Sukhtankar P, Elkington P, Marshall B, Schuster H, et al. Extremes of age are associated with indeterminate QuantiFERON-TB gold assay results. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2694-2697.
161. Sharninghausen JC, Shapiro AE, Koelle DM, Nina Kim H. Risk Factors for Indeterminate Outcome on Interferon Gamma Release Assay in Non-US-Born Persons Screened for Latent Tuberculosis Infection. *Open forum Infect Dis*. 2018;5(8):184.
162. van Zyl-Smit RN, Lehloenya RJ, Meldau R, Dheda K. Impact of correcting the lymphocyte count to improve the sensitivity of TB antigen-specific peripheral blood-based quantitative T cell assays (T-SPOT.(®)TB and QFT-GIT). *J Thorac Dis*. 2016;8(3):482-489.

163. Baldassari LE, Feng J, Macaron G, Planchon SM, Alshehri E, Moss BP, et al. Tuberculosis screening in multiple sclerosis: effect of disease-modifying therapies and lymphopenia on the prevalence of indeterminate TB screening results in the clinical setting. *Mult Scler J - Exp Transl Clin*. 2019;5(3):205521731987546.
164. Brooks BM, Flanagan BF, Thomas AL, Coleman JW. Penicillin conjugates to interferon-gamma and reduces its activity: a novel drug-cytokine interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(5):1175-1181.
165. Herrera V, Yeh E, Murphy K, Parsonnet J, Banaei N. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48(8):2672-2676.
166. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-1298.
167. Lewinsohn DM, Grotzke JE, Heinzl AS, Zhu L, Owendale PJ, Johnson M, et al. Secreted proteins from Mycobacterium tuberculosis gain access to the cytosolic MHC class-I antigen-processing pathway. *J Immunol*. 2006;177(1):437-442.
168. Grotzke JE, Siler AC, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. Secreted immunodominant Mycobacterium tuberculosis antigens are processed by the cytosolic pathway. *J Immunol*. 2010;185(7):4336-4343.
169. Lewinsohn DA, Heinzl AS, Gardner JM, Zhu L, Alderson MR, Lewinsohn DM. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8+ T cells preferentially recognize heavily infected cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(11):1346-1352.
170. Lazarevic V, Nolt D, Flynn JL. Long-term control of Mycobacterium tuberculosis

- infection is mediated by dynamic immune responses. *J Immunol.* 2005;175(2):1107-1117.
171. Smith SM, Klein MR, Malin AS, Sillah J, Huygen K, Andersen P, et al. Human CD8(+) T cells specific for Mycobacterium tuberculosis secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia. *Infect Immun.* 2000;68(12):7144-7148.
172. Andersson J, Samarina A, Fink J, Rahman S, Grundström S. Impaired expression of perforin and granulysin in CD8+ T cells at the site of infection in human chronic pulmonary tuberculosis. *Infect Immun.* 2007;75(11):5210-5222.
173. Barcellini L, Borroni E, Brown J, Brunetti E, Codecasa L, Cugnata F, et al. First independent evaluation of QuantiFERON-TB Plus performance. *Eur Respir J.* 2016;47(5):1587-1590.
174. Pieterman ED, Liqui Lung FG, Verbon A, Bax HI, Ang CW, Berkhout J, et al. A multicentre verification study of the QuantiFERON®-TB Gold Plus assay. *Tuberculosis.* 2018;108:136-142.
175. Viana Machado F, Morais C, Santos S, Reis R. Evaluation of CD8+ response in QuantiFERON-TB Gold Plus as a marker of recent infection. *Respir Med.* 2021;185:106508.
176. Venkatappa TK, Punnoose R, Katz DJ, Higgins MP, Banaei N, Graviss EA, et al. Comparing QuantiFERON-TB gold plus with other tests to diagnose mycobacterium tuberculosis infection. *J Clin Microbiol.* 2019;57(11):e00985-19.
177. Pérez-Recio S, Pallarès N, Grijota-Camino MD, Sánchez-Montalvá A, Barcia L, Campos-Gutiérrez S, et al. Identification of Recent Tuberculosis Exposure Using QuantiFERON-TB Gold Plus, a Multicenter Study. *Microbiol Spectr.*

- 2021;9(3):972-21.
178. Tsuyuzaki M, Igari H, Okada N, Suzuki K. Role of CD8 T-cell in immune response to tuberculosis-specific antigen in QuantiFERON-TB Gold Plus. *J Infect Chemother.* 2020;26(6):570-574.
179. Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Locatelli Hoops S, Breiden B, et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.* 2006;24(1):105-117.
180. Petruccioli E, Chiacchio T, Pepponi I, Vanini V, Urso R, Cuzzi G, et al. Characterization of the CD4 and CD8 T-cell response in the QuantiFERON-TB Gold Plus kit. *Int J mycobacteriology.* 2016;5 Suppl 1:S25-S26.
181. Jonsson J. *Tuberculosis control in Sweden (tesi doctoral)*. Karolinska Institutet. 2018
182. Wikell A, Jonsson J, Dyrdak R, Henningsson AJ, Eringfält A, Kjerstadius T, et al. The Impact of Borderline Quantiferon-TB Gold Plus Results for Latent Tuberculosis Screening under Routine Conditions in a Low-Endemicity Setting. *J Clin Microbiol.* 2021;59(12):e0137021.
183. Johnson JL, Geldenhuys H, Thiel BA, Toefy A, Suliman S, Pienaar B, et al. Effect of isoniazid therapy for latent TB infection on QuantiFERON-TB gold in-tube responses in adults with positive tuberculin skin test results in a high TB incidence area: a controlled study. *Chest.* 2014;145(3):612-617.
184. Ribeiro S, Dooley K, Hackman J, Loredó C, Efron A, Chaisson RE, et al. T-SPOT.TB responses during treatment of pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis.* 2009;9:23.
185. Carrara S, Vincenti D, Petrosillo N, Amicosante M, Girardi E, Goletti D. Use of a

- T cell-based assay for monitoring efficacy of antituberculosis therapy. *Clin Infect Dis*. 2004;38(5):754-756.
186. Adetifa IM, Ota MOC, Jeffries DJ, Lugos MD, Hammond AS, Battersby NJ, et al. Interferon- $\gamma$  ELISPOT as a biomarker of treatment efficacy in latent tuberculosis infection: a clinical trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):439-445.
187. Xin H, Cao X, Zhang H, Liu J, Pan S, Li X, et al. Dynamic changes of interferon gamma release assay results with latent tuberculosis infection treatment. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(11):1555.
188. Nyendak MR, Park B, Null MD, Baseke J, Swarbrick G, Mayanja-Kizza H, et al. Mycobacterium tuberculosis specific CD8(+) T cells rapidly decline with antituberculosis treatment. *PLoS One*. 2013;8(12):e81564.
189. Kamada A, Amishima M. QuantiFERON-TB® Gold Plus as a potential tuberculosis treatment monitoring tool. *Eur Respir J*. 2017;49(3):1601976.
190. Mamishi S, Marjani M, Pourakbari B, Sadeghi RH, Mahmoudi S. Evaluation of treatment response in active tuberculosis using QuantiFERON-TB Gold Plus. *Eur Cytokine Netw*. 2020;31(4):129-133.
191. Petruccioli E, Chiacchio T, Vanini V, Cuzzi G, Codecasa LR, Ferrarese M, et al. Effect of therapy on Quantiferon-Plus response in patients with active and latent tuberculosis infection. *Sci Rep*. 2018;8(1):15626.
192. Chedid C, Kokhraidze E, Tukvadze N, Banu S, Uddin MKM, Biswas S, et al. Relevance of QuantiFERON-TB Gold Plus and Heparin-Binding Hemagglutinin Interferon- $\gamma$  Release Assays for Monitoring of Pulmonary Tuberculosis Clearance: A Multicentered Study. *Front Immunol*. 2021;11:616450.
193. Chiacchio T, Petruccioli E, Pepponi I, Vanini V, Gualano G, Cirillo D, et al.



- Modulation of CD4 and CD8 response to QuantiFERON-TB Plus in patients with active tuberculosis and latent tuberculosis infection followed over time during treatment. *Int J mycobacteriology*. 2016;5 Suppl 1:S141-142.
194. Kim OH, Jo KW, Park S, Jo YH, Kim MN, Sung H, et al. Comparison of the change in QuantiFERON-TB Gold Plus and QuantiFERON-TB Gold In-Tube results after preventive therapy for latent tuberculosis infection. *PLoS One*. 2020;15(6):e0234700.
195. Ritz N, Yau C, Connell TG, Tebruegge M, Leslie D, Curtis N. Absence of interferon-gamma release assay conversion following tuberculin skin testing. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(6):767-9.
196. Velasco-Arnaiz E, Soriano-Arandes A, Espiau M, Altet N, Fortuny C, Monsonís M, et al. Impact of Baseline Tuberculin Skin Test and Isoniazid Chemoprophylaxis on Subsequent Quantiferon-TB Gold In-Tube Performance in Young Children Assessed After Tuberculosis Contact in Catalonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2020;39(2):e22-e25.
197. Ministerio de Sanidad. Sistema de información sobre nuevos diagnósticos de VIH. Registro nacional de casos de SIDA. *Vigilancia Epidemiológica Del VIH y SIDA En España 2020*. 2021.
198. Altet N, Latorre I, Jiménez-Fuentes MÁ, Soriano-Arandes A, Villar-Hernández R, Milà C, et al. Tobacco Smoking and Second-Hand Smoke Exposure Impact on Tuberculosis in Children. *J Clin Med*. 2022;11(7):2000.

