

UniversidadeVigo

Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología

**“EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA Y
SEGUIMIENTO DE PERSONAS EN
CONTACTO CON TUBERCULOSIS
PULMONAR”**

Memoria presentada por:

Luis Anibarro García

para optar al grado de Doctor

Dirigida por:

Dra. África González Fernández

Área de Inmunología

Vigo 2015

Universidade de Vigo

La Dra. **África González Fernández**, Directora del Centro de Investigaciones Biomédicas y Catedrática de Inmunología (CINBIO) de la Universidad de Vigo

INFORMA

Que la memoria adjunta titulada “**Evaluación diagnóstica y seguimiento de personas en contacto con tuberculosis pulmonar**” presentada por D. Luis Anibarro García para optar al grado de Doctor por la Universidad de Vigo, por la modalidad de "*compendio de artículos*", ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para ser defendida frente a un tribunal calificador.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma la presente certificación

En Vigo a **20 JULIO 2015**

Dra. África González Fernández

Empezamos nuestras presentaciones soltando una retahíla de datos que describen la grandeza del problema.

El continuo bombardeo de imágenes y datos trágicos acaban por acostumbrarnos a ellas, provocando en nuestro medio una cierta insensibilización colectiva y un enquistamiento en nuestro pequeño mundo.

Al final, esta avalancha de datos consigue el efecto contrario en el lector, insensibilizando más que concienciando.

Joan Carrera y José I. González Faus

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 Situación actual de la tuberculosis	21
1.2. Patogenia.....	25
1.2.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25
1.2.2. Transmisión	26
1.2.3. Tuberculosis activa y tuberculosis latente. Respuesta inmunitaria.....	26
1.2.4. Factores de riesgo de desarrollo de enfermedad tuberculosa.....	31
1.3. Diagnóstico	33
1.3.1. Diagnóstico de la enfermedad activa	33
1.3.2. Diagnóstico de la infección latente	35
1.4 Tratamiento	45
1.4.1. Bases microbiológicas del tratamiento	45
1.4.2. Tratamiento de la tuberculosis activa	46
1.4.3. Tratamiento de la tuberculosis latente	46
1.5. Prevención.....	49
1.5.1. Vacunas.....	49
1.5.2. Prevención primaria.....	50
1.5.3. Prevención secundaria. Estudio de contactos.	52
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	55
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	59
3.1. Hipótesis	61
3.1.1. Identificación de la existencia del periodo ventana en los IGRAS en personas sanas con exposición reciente a un enfermo con tuberculosis pulmonar.....	61
3.1.2. Valoración de la correlación de la PT y QFT en personas sanas expuestas a <i>M. tuberculosis</i> antes y después del “periodo ventana”	61
3.1.3. Estudio diagnóstico de infección tuberculosa en pacientes en hemodiálisis expuestos a <i>M. tuberculosis</i>	61
3.2. Objetivos	63
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	65

Índice

4.1. Ámbito de estudio	67
4.2. Diseño	68
4.3. Población a estudio	69
4.4. Recogida de datos	70
4.5. Determinaciones	71
4.5.1. Prueba de tuberculina.....	71
4.5.2. Quantiferon® -TB gold In-tube	72
4.6. Diagnóstico de infección latente	75
4.7. Estudio del periodo ventana.....	76
4.8. Análisis estadístico.....	77
4.9. Consideraciones éticas	78
5. RESULTADOS	79
5.1. Estudio 1	81
5.2. Estudio 2	85
5.3. Estudio 3	89
6. DISCUSIÓN.....	95
6.1. Existencia de un periodo ventana tras la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	98
6.2. Concordancia y asociación con el riesgo de infección de la PT y QFT antes y después del “periodo ventana”.....	101
6.3. Validez de la prueba de QFT entre pacientes en programas de hemodiálisis con exposición reciente a <i>M. tuberculosis</i>	103
6.4. Limitaciones del estudio	105
7. CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA.....	113
ANEXOS.....	149
ANEXO 1. Artículo 1.	151
ANEXO 2. Artículo 2.	157
ANEXO 3. Artículo 3.	165
ANEXO 4. Consentimiento informado para los estudios 1 y 2 (castellano).....	175
ANEXO 5. Otros artículos que no forman parte de la tesis.....	181

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A la **Dra. África González Fernández**. Por haber aceptado la dirección de esta tesis. Por haberme enseñado que la ciencia y la investigación no están hechas para personas brillantes, sino para las trabajadoras y constantes. Por su dedicación, su confianza, su esfuerzo y su paciencia infinita conmigo.

A los **miembros del laboratorio de Inmunología de la Universidad de Vigo**. Por tener siempre abiertas las puertas de su lugar de trabajo, donde nunca me he sentido extraño.

A **mis compañeros de los servicios de Medicina Interna, Nefrología, Neumología y Radiología**. Por haberme ayudado en los momentos de duda en el manejo clínico con los pacientes, por su empeño en resolver mis incertidumbres y su colaboración allá donde no llegaban mis conocimientos o habilidades.

A los **componentes del servicio de Microbiología**. Por recibir siempre con una sonrisa mis continuas interrupciones a su labor. Por su disponibilidad y su compromiso con los pacientes, de manera especial a **Matilde y a las dos Ángeles**. A los **técnicos del laboratorio** por su capacidad y profesionalidad.

A **Alberto, Laura, Rosana, Loli, Alejandro, Daniel, Maribel y el resto de mis compañeros** que han pasado por la UTB. Por haber entendido que el compromiso con la enfermedad tuberculosa va mucho más allá de la consulta o una atención correcta a los pacientes. Por su voluntarismo, altruismo y entrega. Pocas Unidades habrá en las que se luche tanto por la Sanidad Pública y los pacientes, a pesar de las dificultades y obstáculos.

A los **residentes** que fueron y son de mi servicio de Medicina Interna. Ellos son los que hacen que mantenga el entusiasmo por la profesión médica y nuestra especialidad.

A los **pacientes**. A los que aceptaron participar en los estudios y a los demás. De ellos no hago más que aprender todos los días lecciones de vida.

A **Mary, Esteban, Javier y Berta**. Por su apoyo imprescindible, siempre lleno de cariño.

Agradecimientos

A mis compañeros del mundillo profesional de la tuberculosis. Especialmente a los de las Unidades de Tuberculosis de Galicia y los del Grupo de Estudio de Micobacterias de la SEIMC. Con ellos he entendido que los que estamos implicados en esta enfermedad combinamos ciencia, clínica y sobre todo amistad y apoyo. ¡Qué suerte haber topado con compañeros así!

A mi familia. A mamá. ¿Cuántas veces he dado gracias a Dios por haberme tocado una madre así? A **Ana y Javier** por haber crecido y madurado juntos en los juegos y peleas infantiles. Y después de mayores, en los momentos buenos y malos. A los **abuelos**, que ya no están, y de quien siempre admiro su libertad y su capacidad de transmitir amor.

A **Susana**, por compartir conmigo todos los momentos de la vida. Porque no deja de sorprenderme cada día que pasa. **A su familia**, que es también la mía.

A mis hijos, que pretendo dar y enseñar todo lo bueno que de mí pueda salir. **Pilocha**, que te espero para aprender toda la humanidad que transmitirás en esta profesión apasionante. **Nacho** con tu pragmatismo tan lleno de bondad. **Gonza**, la alegría de la casa. ¡Cuánto os quiero!

A papá.....

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- **BAAR.** Bacilo ácido-alcohol resistente
- **BCG.** Bacilo de Calmette y Guérin
- **CEIC.** Comité Ético de Investigación Clínica
- **CDC.** Del inglés “Center for Disease Control and Prevention”
- **CFP-10.** De inglés “Culture Filtrate Protein 10”
- **DOTS.** Del inglés “Directed Observed Therapy Short Course”
- **ECDC.** Del inglés “European Centre for Disease Prevention and Control”
- **ELISA.** Del inglés “Enzyme-linked ImmunSorbent Assay”
- **EMB.** Etambutol
- **ESAT-6.** Del inglés “Early Secretory Antigen Target 6”
- **IFN- γ .** Interferon-gamma
- **IGRA.** Del inglés “Interferon-gamma Release Assay”
- **INH (H).** Isoniacida
- **ILT.** Infección latente tuberculosa
- **IL-12.** Interleucina 12
- **LAM.** Lipoarabinomanano
- **NK** Del inglés “*Natural Killer*”
- **OMS.** Organización Mundial de la Salud
- **PPD.** Del inglés “Purified Protein Derivative”
- **PT.** Prueba de tuberculina

Abreviaturas

- **PZ (Z).** Pirazinamida
- **QFT.** Del inglés “Quantiferon[®]-TB Gold In-Tube”
- **RIF (R).** Rifampicina
- **TB.** Tuberculosis
- **TB 7.7.** Proteína Recombinante Rv2654
- **TNF- α .** Factor de Necrosis Tumoral alfa
- **Tc** Célula T citotóxica
- **Th.** Célula T helper
- **Treg.** Célula T reguladora
- **UTB.** Unidad de tuberculosis
- **VIH.** Virus de la Inmunodeficiencia Humana
- **WHO.** Del inglés “World Health Organization”

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB), es una enfermedad infecciosa transmisible que está causada por especies bacterianas pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*. De todas las especies componentes de este complejo, *Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico más frecuente causante de la enfermedad, aunque existen otras (*M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. canettii*), que ocasionalmente pueden producir patología en el ser humano [1-3].

A pesar que desde hace más de 70 años se conocen tratamientos eficaces y baratos, la TB se encuentra, junto al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el paludismo, entre las tres enfermedades infecciosas causantes de mayor mortalidad a nivel mundial [4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el año 2013 se produjeron 9 millones de nuevos casos de enfermedad tuberculosa y 1,5 millones de muertos por su causa, de los que 360.000 presentaban también co-infección por VIH [4]. Los países y sociedades con menores recursos económicos y sociales son los de mayor prevalencia de enfermedad, por lo que destacados tisiólogos han definido a la TB como una enfermedad social (**Figura 1**) [5].

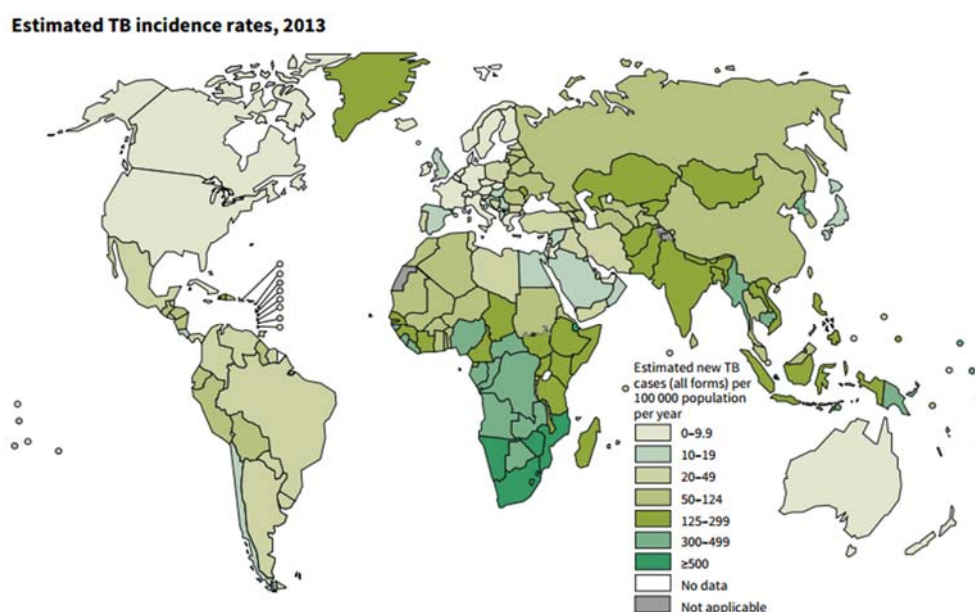


Figura 1. Incidencia estimada de tuberculosis por países en 2013.

Fuente: *Global tuberculosis report*, WHO 2014

A pesar de la espectacularidad de las cifras, en los últimos años se observa ya una tendencia descendente tanto en la incidencia de la enfermedad, que fue del 2,2% entre 2010 y 2011, como en la mortalidad, que ha decrecido en un 45% desde 1990 (**Figura 2**).

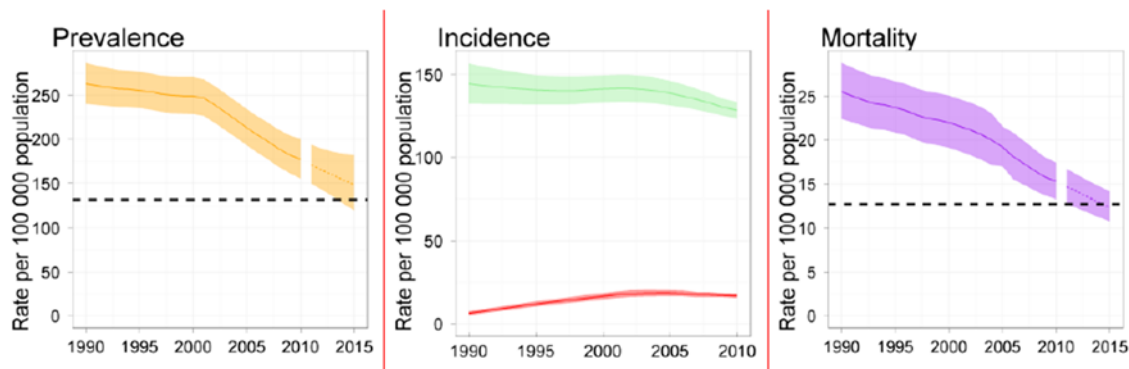


Figura 2. *Tendencia global de prevalencia, incidencia y mortalidad por tuberculosis*

Fuente: Global tuberculosis report, WHO 2014

España sigue presentando una incidencia superior a la que presentan otros países de nuestro entorno. Los datos oficiales de incidencia están probablemente infraestimados debido a la infradeclaración de casos por parte de los médicos responsables del diagnóstico [6-9].

Según el informe de 2014 del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), la tasa de enfermedad declarada en 2012 en España fue de 13,0 casos/100.000 habitantes, con un descenso medio anual del 8% desde el año 2008 [10]. En Galicia existe desde 1996 un Programa de Prevención y Control de la TB. Entre sus funciones está la de realizar una búsqueda activa de casos, tanto entre personas con riesgo de enfermedad, como a través de distintos registros que tratan de localizar a enfermos no declarados. Por ello, es probable que los datos oficiales sean muy próximos a la realidad [11]. En 2013, la incidencia de enfermedad se estimó en 21,8 casos/100.000 habitantes [12]. A pesar de que el número de enfermos nuevos anuales es aún superior al del resto del estado, es de señalar el notable progreso realizado desde los inicios del programa en 1996, cuando el número de casos nuevos mostraba una incidencia superior a los 70 casos/100.000 habitantes (**Figura 3**). Sin duda alguna, la cumplimentación de los pilares básicos de control de la enfermedad (diagnóstico precoz, tratamientos eficaces y estudio de personas con elevado riesgo de progresión a enfermedad), han contribuido a esta gran disminución de la incidencia [13].

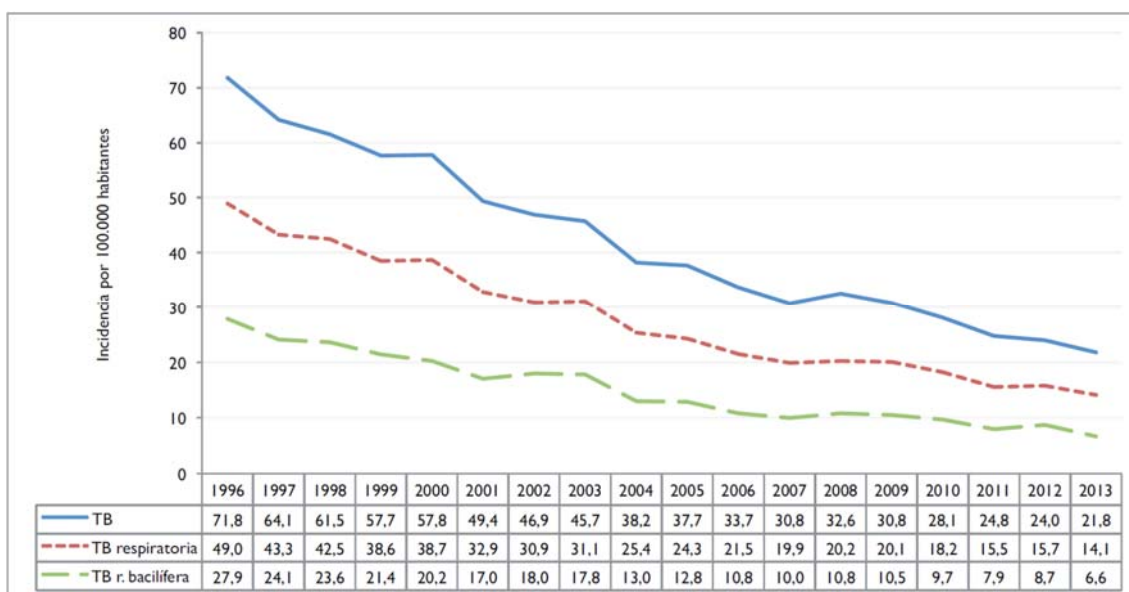


Figura 3. Incidencia de tuberculosis en Galicia desde la creación del Programa Gallego de Prevención y Control de tuberculosis.

Fuente: Informe da tuberculose en Galicia. Xunta de Galicia 2014

En el área de Pontevedra-Salnés y en la ciudad de Pontevedra, la incidencia es levemente superior a la media gallega, tal y como ocurre en otros áreas costeras de la comunidad autónoma (**Tabla 1**) [12].

Tabla 1. Número de nuevos casos de tuberculosis e incidencia de la enfermedad por Unidades de Tuberculosis en Galicia durante el año 2013.

UTB	Núm.	Incidencia
A Coruña	146	26,5
Ferrol	45	22,6
Lugo	61	17,6
Ourense	54	16,5
Pontevedra	85	27,7
Santiago	83	17,8
Vigo	129	22,6
GALICIA	603	21,8

Fuente: Informe da tuberculose en Galicia. Xunta de Galicia 2014

Por otra parte, el porcentaje de cepas de *M. tuberculosis* resistentes al fármaco isoniacida entre los pacientes con diagnóstico inicial de tuberculosis (aquellos que nunca han recibido tratamiento previo), es del 5%, lo que puede considerarse como valores claramente inferiores a los observados en otras partes del mundo (**Figura 4**).

Igualmente, las cepas multirresistentes (resistencia al menos a isoniácida y rifampicina), son prácticamente anecdóticas, detectándose un solo caso en el año 2013 entre los pacientes nunca tratados, y otros dos casos entre los pacientes que habían recibido tratamiento previo [12].

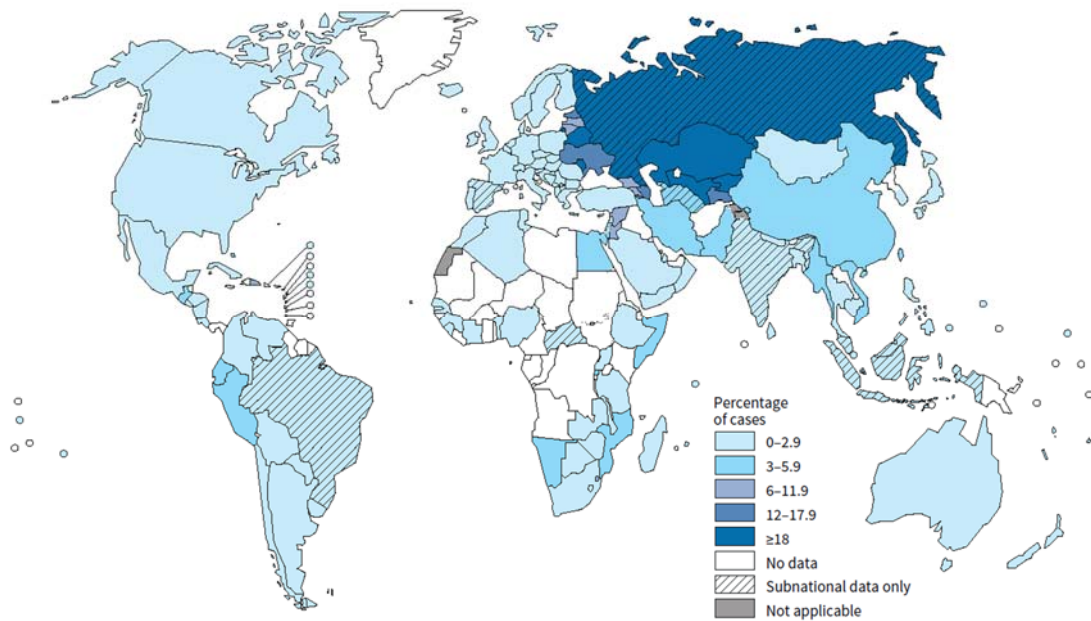


Figura 4. *Porcentaje de enfermos nunca tratados de tuberculosis con enfermedad multirresistente (resistencia a isoniácida y rifampicina).*
Fuente: World Health Organization. Global tuberculosis report 2014

1.2. PATOGENIA

1.2.1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Mycobacterium tuberculosis es el agente causante de la TB. Se trata de un bacilo débilmente Gram negativo, perteneciente al género *Mycobacterium* el cual engloba a más de 50 especies [14]. De todas ellas, solo unas pocas son capaces de producir enfermedad en la especie humana: *M. tuberculosis tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. pinnipedi* y *M. caprae* [1, 3, 15-17]. Como las restantes especies del género *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* posee una pared muy rica en lípidos (hasta un 40%), lo que le hace ser un bacilo ácido-alcohol resistente y que presente dificultades para su tinción en el laboratorio. La ácido-alcohol resistencia es una característica de alta especificidad de la bacteria, y en ella se ha basado históricamente el diagnóstico microbiológico con tinciones como la de Zielh-Neelsen [18]. En la **Figura 5** se muestra una tinción característica de esta bacteria.

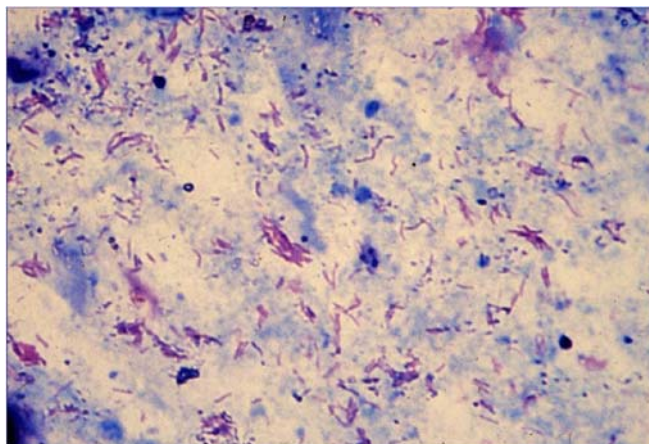


Figura 5. Tinción de Zielh-Neelsen. Se observan múltiples bacilos ácido-alcohol resistentes.

La bacteria es inmóvil, de unas 0,5 a 4 micras de diámetro, es aerobia y no produce esporas. Su velocidad de crecimiento, incluso en medios específicos es muy lenta. Su tiempo de división es de unas 18 horas, extremadamente elevado si lo comparamos con otras bacterias de alta prevalencia infecciosa como *Streptococcus pneumoniae* o *Escherichia coli* (20-30 minutos) [18]. Es precisamente esta característica, la lentitud en su replicación, junto con su capacidad de eludir la respuesta inmunitaria humana, lo que hace que esta especie presente alta dificultad para su eliminación y sea probablemente la causa de su alta prevalencia histórica.

1.2.2. TRANSMISIÓN

La TB es una enfermedad transmisible, habitualmente por vía aérea, aunque existen otros modos de transmisión como la vía digestiva, a través de la ingesta de leche proveniente de ganado infectado [19], o incluso la sexual [20]. La fuente más importante de infección es a partir de un enfermo con TB respiratoria que expulsa gotitas de 1-5 μm de diámetro (gotas de Flügge) que contienen bacilos tuberculosos. Debido al tamaño y peso de las gotitas, éstas pueden permanecer en suspensión en el aire durante algunos minutos o incluso horas. Las secreciones contaminadas de enfermos pueden ser inhaladas por otras personas que de esta forma adquieren la infección (**Figura 6**).

El riesgo de infección depende de diversos factores. Los más decisivos son la carga bacilar del enfermo, la proximidad física y el tiempo de contacto [21-23]. Los pacientes bacilíferos son aquellos en los que se visualizan bacilos directamente al microscopio tras tinción de esputo. Su capacidad de transmisión de la enfermedad es mayor que en aquellos en los que la presencia de bacilos en el esputo solo es demostrable mediante cultivo.

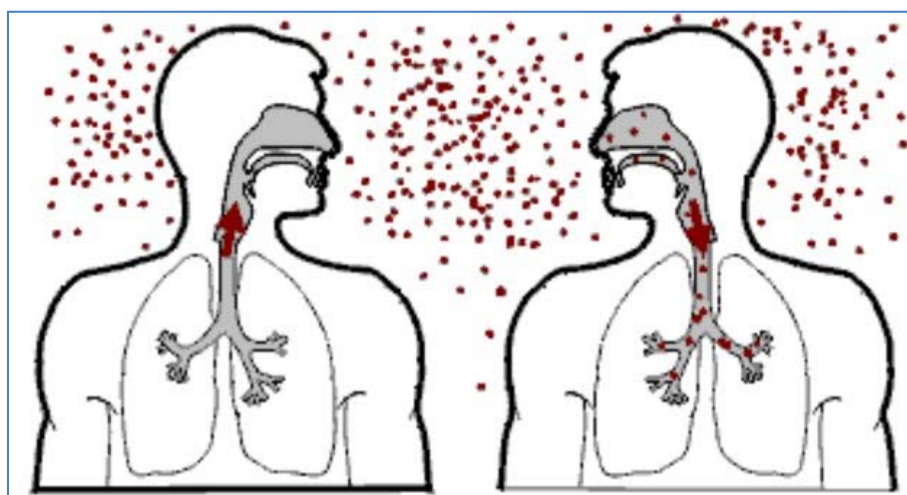


Figura 6. Transmisión por vía aérea de la tuberculosis

1.2.3. TUBERCULOSIS ACTIVA Y TUBERCULOSIS LATENTE. RESPUESTA INMUNITARIA

Tras la inhalación de *M. tuberculosis* y su llegada al espacio alveolar se pueden producir cuatro situaciones:

1. Eliminación directa del bacilo
2. Infección latente
3. Desarrollo de enfermedad tuberculosa (tuberculosis primaria)
4. Desarrollo de enfermedad tras un periodo previo de infección latente (reactivación tuberculosa).

Tras la llegada de *M. tuberculosis* a los alvéolos pulmonares, el bacilo es fagocitado por los macrófagos allí presentes. Existe evidencia indirecta de que la inmunidad innata puede eliminar directamente a la bacteria [24, 25]. En condiciones normales en un macrófago, el fagosoma que contiene los bacilos fagocitados se fusiona con el lisosoma (que contiene enzimas hidrolíticos), llevando a la destrucción de la bacteria en el interior del fago-lisosoma. Los macrófagos tienen además otros mecanismos que ayudan a la destrucción de patógenos, como es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que dañan a las bacterias.

Sin embargo, *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular y habitualmente logra evitar su destrucción en el interior del macrófago alveolar [26]. Para ello utiliza múltiples mecanismos, algunos de ellos bien conocidos como la inhibición de la unión del fagosoma con el lisosoma [27, 28], la inhibición o resistencia a la acidificación del fagosoma [29, 30], la generación de resistencia a especies intermediarias reactivas de oxígeno (ROI) (habitualmente tóxicas para otros patógenos) [31] o la inhibición de la maduración del fagosoma [32, 33].

Por otra parte, aunque la respuesta inmunitaria no sea capaz de eliminar el bacilo, sí que logra su contención en un estado de persistencia sin replicación [34], o con replicación ocasional dinámica [35, 36]. La situación final del control de la infección dependerá del equilibrio que se establezca entre la respuesta inmunitaria y la bacteria. En función del predominio de una u otra, se establecerá un estado de latencia que puede ser persistente, o la generación de enfermedad tuberculosa activa.

Con todo, el concepto de latencia-enfermedad no se entiende como compartimentos excluyentes unidireccionales. Existe un equilibrio dinámico que puede ser bidireccional, e incluso con situaciones “frontera” entre ambas situaciones para las

que se han propuesto terminologías como “*tuberculosis subclínica*” o “*tuberculosis incipiente*” [37-39] (**Figura 7**).

Se conocen múltiples factores que pueden intervenir en el equilibrio entre la respuesta inmunitaria del huésped y la bacteria, que pueden condicionar la progresión del estado de latencia a tuberculosis activa. Existen factores dependientes de la bacteria, como la carga bacilar y su virulencia, pero también del huésped, como la respuesta inflamatoria que se genera, factores genéticos, o su situación inmunitaria [40-46].

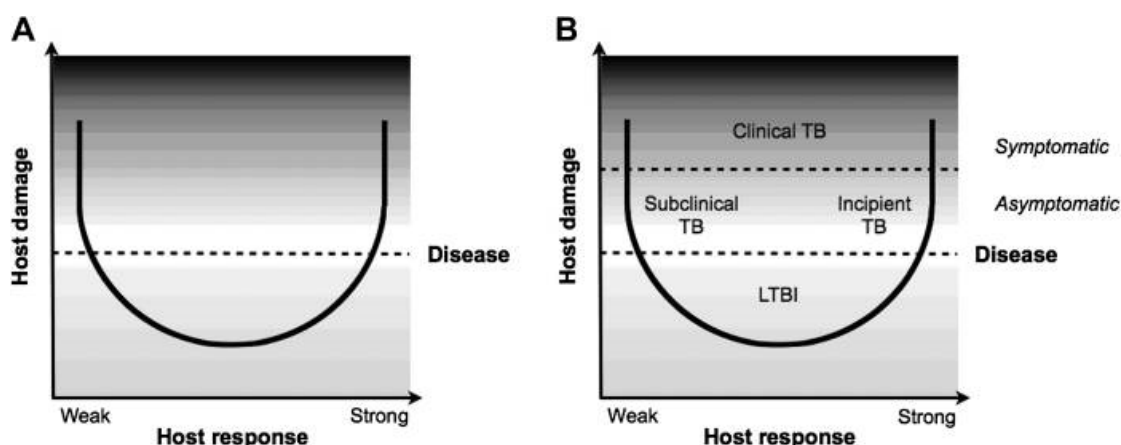


Figura 7. *Visión conceptual de la infección latente tuberculosa, enfermedad tuberculosa y situaciones subclínicas e incipientes*

Fuente: Achkar JM, et al. Journal of Infectious Diseases 2011;204:Suppl 4: S1179-86

Respuesta inmunitaria frente a *M. tuberculosis*

Como antes se comentó, los macrófagos alveolares son las principales células del sistema inmunitario innato que participan en la eliminación del bacilo tras su entrada en los alveolos pulmonares. Junto a los macrófagos alveolares, la implicación de otras células inmunitarias van a jugar un papel muy importante en la respuesta frente a la infección tuberculosa, bien participando en ayudar a su eliminación (caso de los linfocitos T helper y citotóxicos), o incluso ayudando a su diseminación. Esto último es lo que pueden realizar las células dendríticas, células especializadas en la presentación de antígenos a los linfocitos T helper. Estas células, a diferencia de los macrófagos diferenciados, tienen capacidad migratoria, lo que hace que puedan participar en la difusión por vía linfática y sanguínea de *M. tuberculosis*. Se ha descrito que la micobacteria puede impedir la maduración de las células dendríticas, afectando a su capacidad de activar la proliferación de linfocitos T y de producir citocinas [47].

Pero sin duda, el componente leucocitario crucial para controlar la infección tuberculosa por parte del sistema inmunitario es el compartimento de los linfocitos T. No solo son capaces de activarse y ayudar a que los macrófagos destruyan a los bacilos intracelulares, sino que se ha observado que las múltiples interacciones entre los linfocitos T y los macrófagos infectados, conllevan a la formación de granulomas [48].

Los linfocitos principalmente implicados en la respuesta frente a *M. tuberculosis* son los linfocitos T helper. La presentación antigénica a los linfocitos T helper CD4+ por parte de las células dendríticas induce su capacidad efectora productora de citocinas, presentando diversos fenotipos funcionales: Th1, Th2, Th3, Th17, Th22.

De todos estos posibles fenotipos, es la respuesta Th1 la predominante en situaciones de infección por *M. tuberculosis*. Los linfocitos Th1 activados migran hacia el foco de infección y son los responsables de organizar la respuesta inmunitaria celular encargada de contener al bacilo. En esta respuesta frente a la bacteria van a participar tanto células del sistema inmune innato (fundamentalmente los macrófagos) y del sistema inmune específico (sobre todo los linfocitos Th1). En situaciones en donde hay una potenciación de la respuesta inmunitaria hacia los linfocitos Th2, en lugar de hacia los Th1, como ocurre en los casos de infestación crónica por helmintos, se ha sugerido un mayor riesgo de progresión a TB activa [49], aunque no de manera concluyente [50].

Otras células también importantes en la respuesta inmunitaria frente a *M. tuberculosis* son los linfocitos T γ/δ y los linfocitos T citotóxicos (CD8+). Los linfocitos T γ/δ combinan propiedades tanto de respuestas inmunitarias de tipo innato como de tipo adaptativo. Reconocen lípidos y glicolípidos presentados por moléculas CD1, así como fosfoantígenos no peptídicos. Se ha sugerido que estas células se expandirían en etapas tempranas de la infección tuberculosa, con importante función microbicida tanto por la producción de citocinas pro-inflamatorias, como de perforinas y granzimas [47, 51].

En el caso de los linfocitos T citotóxicos CD8+, se ha observado que no sólo eliminan macrófagos infectados, sino que pueden destruir directamente a la bacteria intracelular, gracias a la producción de granulolisina [52, 53].

Infección tuberculosa

El proceso de infección se inicia tras la internalización de la micobacteria por parte de los macrófagos, con su consiguiente activación y producción de numerosas citocinas, principalmente la interleucina 12 (IL-12). Además, el propio linfocito Th1 regula la respuesta del macrófago mediante la producción de otras citocinas, entre las que destaca el interferon gamma ($\text{IFN-}\gamma$) que activa al macrófago y facilita la destrucción intracelular del bacilo (**Figura 8**). Finalmente, si el proceso de activación persiste, se forma un granuloma constituido sobre todo por macrófagos, aunque también por otras células con actividad [54] que logran la contención del bacilo [55-57]. La persistencia del granuloma evita así la progresión a enfermedad.

Se ha observado que para que se produzca la formación y contención del granuloma, es fundamental también la presencia de otra citocina, denominada factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), que es producida fundamentalmente por los macrófagos presentes en el granuloma [58]. La inhibición de $\text{TNF-}\alpha$ en terapia biológica con anticuerpos monoclonales anti-TNF o con proteínas de fusión frente a esta citocina, aumenta el riesgo de desarrollo de enfermedad tuberculosa activa [59].

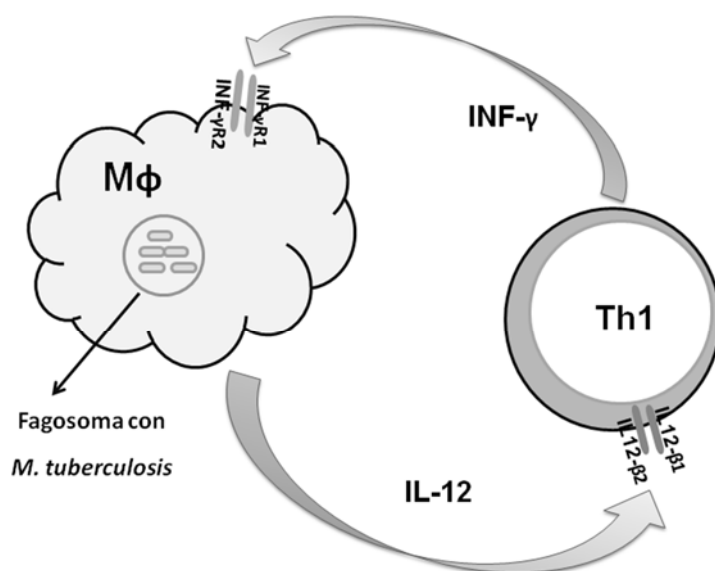


Figura 8. Esquema del eje IL-12/IFN- γ durante la respuesta inmunitaria frente al patógeno intracelular *M. tuberculosis*

Fuente: Anibarro L, Garet E, Felpeto I, del Campo V, Montes J, González-Fernández A. *Inmunología* 2011; 30:36-44

1.2.4. FACTORES DE RIESGO DE DESARROLLO DE ENFERMEDAD TUBERCULOSA

Aunque, como ya se ha señalado, la frontera entre infección latente y enfermedad tuberculosa no es siempre nítida y definida, son bien conocidos una serie de condicionantes epidemiológicos y personales que favorecen el desarrollo de enfermedad activa.

El desarrollo de tuberculosis en un paciente infectado es habitualmente un proceso que consta de dos fases: en la primera fase la respuesta inmunitaria es capaz de detener la expansión del bacilo, el cual queda contenido en las formaciones granulomatosas [60, 61]. Sin embargo, se estima que en alrededor de un 10% de las personas infectadas hay una segunda fase en la que acaban desarrollando enfermedad tuberculosa, tras la activación y proliferación continuada de *M. tuberculosis* [60, 62]. En términos globales, un 5% lo harán durante los dos primeros años después de la infección, mientras que el 5% restante pueden desarrollarla en los años posteriores.

Tras el inicio de la epidemia de infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), éste se ha constituido como el factor individual de mayor riesgo de progresión a enfermedad tuberculosa [63, 64]. Se calcula que el riesgo relativo de desarrollo de enfermedad tuberculosa es de entre 50 y 110 veces superior al de la población sana [65, 66]. Además, las características clínicas de la enfermedad en pacientes con infección por VIH son de mayor complejidad diagnóstica y severidad [67, 68]. La razón de esta alta prevalencia de infección tuberculosa es debida a la alteración que produce el virus VIH sobre los linfocitos T helper CD4+ de los pacientes seropositivos, con la consiguiente inmunosupresión sobre todo frente a patógenos intracelulares.

Otras situaciones en las que la respuesta inmunitaria celular está alterada son bien conocidas como factores de riesgo de desarrollo de enfermedad:

- Como antes se comentó, tratamiento con fármacos inhibidores del factor de necrosis tumoral alfa [59, 69]
- tratamiento sistémico con corticoides y otras inmunosupresiones [70]

- desnutrición y bajo peso [71, 72]
- diabetes mellitus especialmente en fases avanzadas [73-75]
- insuficiencia renal terminal [76-79]
- neoplasias hematológicas [80-83]

Existen otros factores que han querido también relacionarse con cierto grado de riesgo de progresión a enfermedad como las edades extremas de la vida [60], tabaquismo [84-86], consumo de alcohol [87], asociación con otras enfermedades como la silicosis [88] y enfermedad celiaca [89, 90], así como factores sociales y laborales [91-97].

Además, se ha demostrado la existencia de predisposición genética al desarrollo de enfermedad en algunos grupos étnicos y familiares [98-102]. Entre los factores genéticos descritos de susceptibilidad a infección tuberculosa, se han incluido defectos en la generación de citocinas (IFN- γ , IL-12, TNF- α), o en sus receptores [103, 104].

1.3. DIAGNÓSTICO

1.3.1. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD ACTIVA

El diagnóstico de la enfermedad tuberculosa supone en muchas ocasiones un reto debido a la frecuente aparición de sintomatología inespecífica. La presentación clínica asocia la aparición de sintomatología constitucional (astenia, anorexia, adelgazamiento) y la propia de la localización de la enfermedad. La presentación más frecuente es la respiratoria, siendo la tos prolongada el síntoma más común. La confirmación diagnóstica será siempre microbiológica demostrando la presencia en cultivos de bacilos tuberculosos. Su presencia es siempre patológica y debe ser considerada sinónimo de enfermedad.

Los métodos empleados en la práctica clínica habitual para el diagnóstico son:

1- La detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR).

La ácido-alcohol resistencia es una característica altamente específica de *M. tuberculosis*. La identificación de BAAR en microscopía directa es una técnica barata y sencilla, por lo que es ampliamente utilizada en todo el mundo para el diagnóstico de enfermedad tuberculosa. Las técnicas más comúnmente utilizadas son la tinción de Ziehl-Neelsen, que es la técnica convencional, y la tinción con auramina, que es de mayor rapidez. Sin embargo, la sensibilidad diagnóstica de estas pruebas es relativamente baja (50-60%) especialmente en el caso de niños, pacientes coinfectados por VIH y en muestras no respiratorias [105, 106]. Por otra parte, la ácido-alcohol resistencia es una característica presente también en otras especies de micobacterias no tuberculosas e incluso en otros géneros como *Actinomyces* o *Nocardias* [107]. Por ello, la presencia de BAAR no es nunca concluyente de tuberculosis, aunque en la mayor parte de los contextos sí es altamente sugestiva. Además, la presencia de BAAR en muestras respiratorias es un índice de contagiosidad del enfermo [108].

2- El cultivo y posterior identificación de *M. tuberculosis*

Este es el método de referencia para el diagnóstico de tuberculosis [62]. Existen básicamente dos sistemas de cultivo para micobacterias: los medios sólidos y los

medios líquidos. Los medios sólidos (Löwenstein-Jensen, Coletsos, etc) son de menor coste, pero de crecimiento lento (no es inhabitual la detección de colonias tras más de 6-8 semanas de incubación) (**Figura 9**).



Figura 9. Morfología de colonias de M. tuberculosis en medio de Löwenstein-Jensen.

Los medios líquidos (ESP, Middlebrook 7H9, etc) presentan crecimientos más rápidos, pero su coste es más elevado. Es interesante destacar que las pruebas de sensibilidad a fármacos de la *M. tuberculosis* se realizan sobre crecimientos en cultivos.

3- Las pruebas de amplificación y detección de ácidos nucleicos específicos de *M. tuberculosis* (y de otras micobacterias no tuberculosas).

Estas son técnicas complementarias para el diagnóstico e identificación de la especie. El uso de estas técnicas se ha generalizado en los últimos años en nuestro medio. Permiten establecer diagnósticos muy rápidos (menos de 24 horas), alcanzando valores de sensibilidad y especificidad muy próximas a las obtenidas con los cultivos.

El estudio genético permite también la detección de genes de resistencia a fármacos, que en el caso de la Rifampicina alcanza una especificidad próxima al 95% [109]. De hecho, existe desde hace unos años un método diagnóstico denominado Xpert MTB/RIF que en menos de dos horas detecta simultáneamente la presencia de ADN de *M. tuberculosis* y una eventual resistencia genética a Rifampicina que es un marcador habitual de multiresistencia [110, 111]. Su sensibilidad en muestras respiratorias es del 75% en pacientes no bacilíferos, y superior al 98% en pacientes con presencia de BAAR en esputo [112, 113].

4- Otros métodos

Existen otros métodos menos utilizados para el diagnóstico de enfermedad. La detección en orina de antígenos micobacterianos (lipoarabinomano, LAM), por ejemplo, es un campo prometedor para el diagnóstico en pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana [114-116].

1.3.2. DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN LATENTE

A diferencia de lo que ocurre para el diagnóstico de la tuberculosis activa, no existe ninguna prueba de referencia (“*gold standard*”) que asegure de manera definitiva el diagnóstico de la **Infección Latente Tuberculosa** (ILT).

Los métodos empleados en personas sin enfermedad tuberculosa se basan en la respuesta inmunitaria generada por sus células linfocitarias sensibilizadas frente a la *M. tuberculosis*, tras haber tenido un contacto previo con la bacteria. Todas las pruebas disponibles no son más que marcadores indirectos de infección, y además, ninguna de ellas distingue entre la situación de latencia con la de enfermedad activa.

Existen en la actualidad dos sistemas de detección de infección tuberculosa basados ambos en la respuesta inmunitaria del paciente:

- 1) El primero de ellos, de una antigüedad próxima a los cien años es la **Prueba cutánea de Tuberculina** (PT) que se realiza *in vivo*.
- 2) El segundo sistema se basa en la **detección “*in vitro*” de interferon- γ secretados por linfocitos T sensibilizados frente a antígenos de *M. tuberculosis***.

Con respecto al valor diagnóstico de la presencia de anticuerpos específicos frente a *M. tuberculosis*, se han realizado numerosos estudios de su valor para el diagnóstico de la enfermedad o infección tuberculosa, e incluso existen pruebas comercializadas. Sin embargo, a pesar de que existe una evidencia creciente de que los linfocitos B tienen participación en la inmunidad frente a *M. tuberculosis* [117], su validez está todavía en discusión [118].

ANTÍGENOS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Como ya se ha comentado, el diagnóstico de ILT se basa en la respuesta bien *in vivo* o bien *in vitro* frente a distintos antígenos presentes en *M. tuberculosis*. Han sido múltiples los antígenos analizados hasta el momento en búsqueda de algún marcador de infección tuberculosa, y otros muchos aún se encuentran en fase de investigación.

Los antígenos empleados actualmente en las pruebas comercializadas aprobadas por el “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) y el “European Center for Disease prevention and Control” (ECDC) son únicamente cuatro: la tuberculina, CFP-10, ESAT-6 y TB7.7.

- 1) **La tuberculina o PPD** (derivado proteico purificado) es un extracto de decenas de antígenos de *M. tuberculosis*. Son los que se emplean en la prueba cutánea de la tuberculina según la técnica de Mantoux. Estos antígenos no son específicos de *M. tuberculosis*, sino que están también presentes en otras micobacterias y en la vacuna BCG.

Existen actualmente varios tipos de tuberculinas comercializadas en el mundo para la realización de la prueba, siendo la PPD-S (*purified protein derivative* de Seibert) la de referencia. En España, el equivalente habitualmente utilizado de tuberculina es el PPD-RT23.

- 2) **ESAT-6** (del inglés “*Early Secretory Antigen Target 6*”), **CFP-10** (del inglés “*Culture Filtrate Protein 10*”) y **TB7.7**. (Proteína Recombinante Rv2654) son antígenos más específicos de la *M. tuberculosis*, ya que no están presentes en la vacuna BCG, ni son expresados por otras micobacterias, excepto *M. marinum*, *M. kansasii* y *M. szulgai*.

Son los antígenos empleados en las pruebas comercializadas de detección *in vitro* de IFN- γ (IGRA) para el diagnóstico de infección tuberculosa. Estos antígenos se expresan en las fases de replicación de la bacteria tuberculosa, aunque también en medios hipoxémicos [36]. Actualmente existen estudios prometedores que analizan la respuesta a la

inyección intradérmica de ESAT-6 y CFP-10 según la técnica de Mantoux, como sustituto de la tuberculina empleada habitualmente [119].

Además de estos antígenos, existen otros con potencial diagnóstico, pero sin aplicación práctica aún en la clínica diaria:

- 1) **TB10.4**. Se ha visto que esta proteína tiene alto poder inmunogénico, y por tanto un posible papel en el diagnóstico de infección tuberculosa [120, 121]
- 2) **Rv3425**. Se trata de un antígeno inmunodominante de *M. tuberculosis* no presente en la vacuna BCG. Este antígeno es capaz de provocar liberación de IFN- γ por parte de linfocitos sensibilizados. En base a esto, se ha propuesto como marcador de infección tuberculosa, bien alternativo o bien complementario a las pruebas convencionales ya existentes [122].
- 3) **Rv1985c**. Ha mostrado valor potencial en la detección de ILT, y como ayuda diagnóstica de TB activa, tanto en la evaluación de su respuesta humoral como antígeno de provocación de secreción de IFN- γ en pacientes con infección tuberculosa [122, 123].
- 4) **RV2628**. La expresión de este antígeno es mayor en pacientes con infección antigua que no han desarrollado enfermedad, que en los pacientes con adquisición reciente de infección tuberculosa. Se ha propuesto como marcador de protección al desarrollo de enfermedad [124].
- 5) El **lipoarabinomanano (LAM)** es un lipopolisacárido que constituye uno de los antígenos dominantes de la pared celular de *M. tuberculosis*. Como ya se ha señalado, su utilidad diagnóstica está basada en su detección directa, especialmente a nivel urinario en pacientes con infección VIH y recuentos bajos de células CD4. Sin embargo, no se encontró una clara utilidad diagnóstica en la respuesta celular ni humoral frente a este antígeno [125, 126]

- 6) **Antígenos de latencia.** Los antígenos actualmente empleados para el diagnóstico de infección tuberculosa no distinguen el grado de actividad o replicación de la bacteria. Por ello se han buscado numerosas maneras de encontrar marcadores que distingan la infección latente de la activa por *M. tuberculosis*. La respuesta linfocitaria *in vitro* a antígenos de mayor expresión en la fase latente es una de ellas.

Los antígenos **Rv2389**, **Rv2435n** y especialmente el **Rv1733** han mostrado en estudios iniciales, buena capacidad de diferenciación entre los pacientes con infección latente, los que tienen TB activa y los no infectados [127]. Además, el estudio de antígenos de mayor expresión en la fase de latencia del bacilo es una de las bases para el desarrollo no solo de nuevas potencialidades diagnósticas, sino también para el desarrollo de nuevas vacunas que refuercen la inmunidad post-exposición [128].

PRUEBA CUTÁNEA DE TUBERCULINA

La **Prueba Cutánea de Tuberculina (PT)** es la prueba diagnóstica vigente de mayor antigüedad. Ideada en un principio como medida terapéutica, es ya en la década de los 1920 cuando se descubre su valor diagnóstico e incluso pronóstico de progresión a enfermedad [129-132]. Como antígeno se emplea la tuberculina que, como ya se ha señalado, está compuesta de decenas de antígenos presentes en la *M. tuberculosis*.

La inyección intradérmica de tuberculina en el antebrazo (según la técnica de Mantoux), produce en pacientes previamente expuestos a la bacteria, una respuesta local celular retardada que se manifiesta por la formación de una induración en la zona de la inyección [133-135] (**Figura 10**). El tamaño de la induración está en relación directa con la probabilidad de infección [136].



Figura 10. Lectura de la Prueba de Tuberculina (PT).

La realización de la PT requiere cierta experiencia en su realización y lectura. Presenta además diversos inconvenientes de tipo operacional como son la ausencia de privacidad de resultado o la necesidad de una segunda visita del paciente a las 48-72 horas para la lectura de la prueba.

Por otra parte son bien conocidas sus limitaciones de fiabilidad diagnóstica. Probablemente la mayor de ellas sea su baja especificidad. Ello es debido a la alta cantidad de antígenos presentes en la tuberculina inyectada, muchos de ellos también presentes en micobacterias no tuberculosas. Existen por tanto reacciones cruzadas en pacientes infectados con otras micobacterias, y muy especialmente en pacientes con antecedentes de vacunación con BCG, una de las vacunas más empleadas en todo el mundo (**Figura 11**) [137, 138].



Figura 11. Cicatriz de vacunación BCG

En la actualidad, se están llevando a cabo ensayos clínicos que analizan la seguridad y el valor de otras tuberculinas altamente purificadas, con menor cantidad de antígenos y más específicos de *M. tuberculosis* [119, 139, 140]. Desde un punto de vista teórico, la hipotética implantación de estas pruebas solventaría en gran medida la baja especificidad diagnóstica de la actual PT.

La PT puede presentar en ciertas situaciones reacciones falsamente negativas, especialmente en pacientes inmunodeprimidos o en tratamiento inmunosupresor, en personas con desnutrición, en edades extremas de la vida, en la infección reciente, o en relación con problemas de la técnica de inyección [34, 134].

A pesar de todo ello se trata de una prueba de bajo coste económico y sobre la que se tiene una experiencia acumulada de casi 100 años. Son diversos los estudios que han demostrado el valor pronóstico de esta prueba con relación a progresión a enfermedad,

así como la eficacia del tratamiento preventivo basado en los resultados de la PT [130, 132, 141, 142].

PRUEBAS DE DETECCIÓN DE LIBERACIÓN DE INTERFERON- γ (IGRAs)

El fundamento de las pruebas de detección de liberación de interferon- γ (IGRAs, del inglés “*Interferon-gamma release assays*”) es básicamente el mismo que el de la PT. El diagnóstico de infección tuberculosa se realiza de manera indirecta, con la determinación de la producción *in vitro* de IFN- γ a partir de sobrenadantes o bien a partir del conteo de linfocitos T de sangre periférica productores de IFN- γ tras ser estimulados con determinados antígenos de *M. tuberculosis* (**Figura 12**). En caso de exposición previa al bacilo por parte del paciente, sus linfocitos T reconocerán los antígenos presentados por células presentadoras, provocando una respuesta inmunitaria con la producción de, entre otras sustancias, IFN- γ . La medida de la producción de IFN- γ , o del número de células productoras, es por lo tanto, indicador indirecto de infección tuberculosa [143, 144].

Existen en la actualidad dos métodos comercializados para la determinación de IFN- γ basados en células mononucleares de sangre periférica de los pacientes.

- 1) **Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT)**. En esta técnica se determina la cantidad de IFN- γ producida tras la activación *in vitro* de leucocitos de sangre periférica con antígenos de *M. tuberculosis* mediante un inmunoensayo enzimático denominado ELISA (del inglés “*Enzyme-linked ImmunSor bent Assay*”)
- 2) **T-SPOT.TB®**. En esta técnica se realiza un recuento del número de células productoras de IFN- γ (**Figura 12**) mediante una variante de la técnica anterior. En este caso no se detecta la citocina soluble, sino el número de células productoras, mediante un ensayo conocido como ELISPOT.

Ambas pruebas miden la respuesta frente a antígenos presentes en *M. tuberculosis complex*, pero no de antígenos presentes en la *BCG* ni de la mayoría de las

micobacterias no tuberculosas (excepto *M. marinum*, *M. szulgai* y *M. kansasii*). T-SPOT.TB[®] utiliza los antígenos ESAT-6 y CFP-10, mientras que Quantiferon[®]-TB Gold In-Tube incorpora también TB7·7 [145].

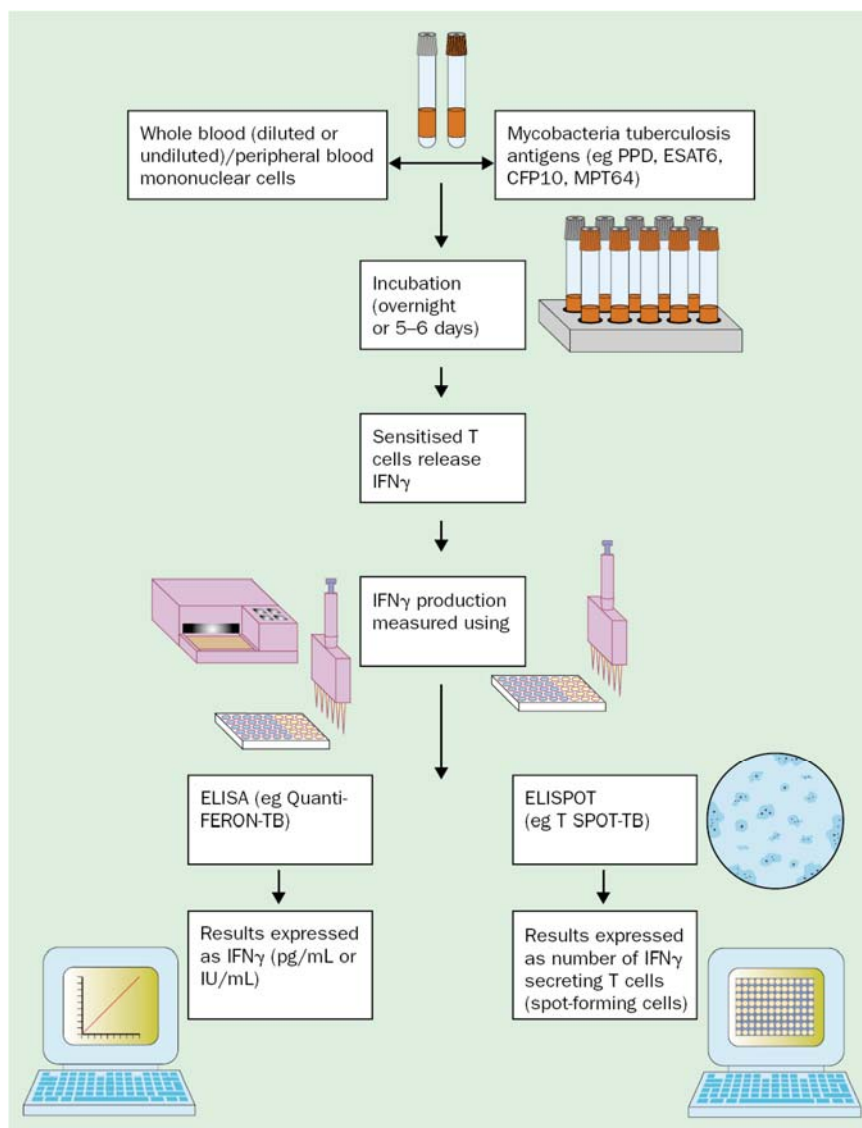


Figura 12. Esquema de la metodología de laboratorio de los IGRAs: ELISA (izquierda) y ELISPOT (derecha)

Fuente: Pai M, et al. Lancet Infectious Diseases 2004;4:761-776.

Los IGRAs presentan ciertas ventajas teóricas sobre la PT. Desde el punto de vista operativo, requieren una única visita del paciente, son de medición objetiva, reproducible y conservan la privacidad del resultado. Además, incorporan un tubo con mitógeno (control positivo) y otro con control negativo, con lo que el resultado de la secreción de IFN- γ se puede valorar en un contexto de supuesta secreción basal elevada o de anergia, como en el caso de pacientes con infección VIH o bajo tratamiento inmunosupresor.

Sin embargo, los IGRAs carecen de la experiencia acumulada con la PT y su coste es mayor. No obstante, existen múltiples estudios de coste-eficiencia que cuestionan la supuesta mayor eficiencia de la PT sobre los IGRAs en diversos contextos, bien como alternativa a la PT o bien como prueba complementaria [146-170].

Como ya se ha comentado con anterioridad, no existe ninguna prueba diagnóstica que pueda asegurar con certeza la presencia de infección por *M. tuberculosis* en una persona no enferma. Por ello, se ha recurrido a distintos marcadores sustitutivos de infección con los que evaluar el valor de los IGRAs o, lo que es más importante, su capacidad de predecir progresión a enfermedad tuberculosa.

De una manera breve, los estudios que han evaluado la validez de los IGRAs son de los siguientes tipos:

i. **Estudios que comparan los resultados obtenidos de IGRAs con la PT.**

Son los de menor calidad de evidencia. Dada la multiplicidad de estudios existentes, los resultados obtenidos son difíciles de sintetizar. En general, se puede afirmar que la concordancia entre ambas pruebas es menor en personas vacunadas con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG), en países de alta prevalencia de enfermedad y en situaciones de inmunosupresión. Los primeros estudios que analizaban el valor de los IGRAs utilizaban esta metodología [171, 172].

ii. **Estudios que evalúan los IGRAs en enfermos con confirmación microbiológica, en los que la infección es por lo tanto segura.**

Frecuentemente los pacientes con tuberculosis activa presentan algún grado de inmunodepresión, desnutrición o dificultad para la elaboración de una respuesta inmunitaria adecuada [173, 174]. Por ello, y al igual que lo que ocurre con la PT, la sensibilidad de los IGRAs en pacientes con tuberculosis confirmada microbiológicamente no es del 100% [175]. En un

meta-análisis realizado en 2011, la sensibilidad global de QFT en enfermos adultos con tuberculosis activa fue del 81%, superior a la presentada por la PT que fue del 68% [176]. En el caso de enfermos de edad pediátrica, las diferencias no son tan evidentes, especialmente en niños menores de 5 años [177].

- iii. **Estudios que evalúan los IGRAs según el riesgo clínico-epidemiológico de exposición a *M. tuberculosis*.** En este caso, dada la ausencia de un patrón para el diagnóstico de infección latente, se recurre al grado de exposición a la bacteria como marcador sustitutivo de infección. Los múltiples estudios realizados muestran en general una similar o mayor correlación de los IGRAs que la PT con el riesgo de exposición. Variables como los antecedentes de vacunación con BCG, edad, inmunosupresión o prevalencia local de la enfermedad, son factores en ocasiones claves para la interpretación de los resultados [178-181].
- iv. **Estudios que evalúan el riesgo de progresión a enfermedad en pacientes con resultados positivos, y también la ausencia de progresión a enfermedad en pacientes con IGRAs negativos en ausencia de tratamiento.** Son estudios con mayor calidad de evidencia, ya que evalúan el aspecto más práctico de estas pruebas que es su **valor predictor de progresión a enfermedad**. Existen hasta el momento más de dos decenas de trabajos que han evaluado de manera prospectiva este aspecto en distintos contextos. Todos ellos confirman el valor pronóstico de los IGRAs de desarrollo de enfermedad, aunque con valores predictivos positivos bajos, inferiores habitualmente al 20% a medio plazo [182]. Sin

embargo, la comparación de su valor pronóstico con el de la PT no muestra por el momento resultados enteramente concluyentes. Algunas revisiones o meta-análisis observan un valor pronóstico similar de ambas pruebas [183], mientras que los IGRAs muestran superioridad en otros [184].

El uso global de IGRAs (bien como prueba diagnóstica única, o complementaria a la PT) disminuye la indicación del número de tratamientos de infección latente sin que aumente el número de enfermos. Esto se ha demostrado de manera más concluyente en países con baja prevalencia de enfermedad [185].

Por otra parte, se ha sugerido que el riesgo de progresión a enfermedad activa está en relación directa con la cantidad de producción de IFN- γ [186-188].

- v. **Estudios que evalúan la eficacia del tratamiento de infección latente basada en el resultado obtenido con IGRAs.** Existen ya estudios que validan la eficacia del tratamiento de la ILT en base al resultado de IGRAs. Un estudio reciente realizado en contactos de enfermos tuberculosos en Gran Bretaña, demuestra que la realización de tratamiento preventivo basado en el resultado de QFT es eficaz en la prevención de tuberculosis, especialmente en pacientes jóvenes [182].

1.4 TRATAMIENTO

1.4.1. BASES MICROBIOLÓGICAS DEL TRATAMIENTO

Se ha postulado la existencia de tres estados metabólicos posibles de *M. tuberculosis*: 1) bacterias con crecimiento y replicación activa 2) bacilos en situación de replicación lenta o intermitente; y 3) bacilos en estado latente, sin actividad replicante [65, 189, 190].

Los fármacos de primera línea empleados en el tratamiento antituberculoso tienen un mecanismo de acción selectivo frente a cada una de estas subpoblaciones bacterianas. Así, la isoniacida es activa y bactericida frente a bacilos en fase de crecimiento activo, la pirazinamida frente a los bacilos en replicación lenta en las fases iniciales de tratamiento, mientras que la rifampicina tiene también su mecanismo de acción frente a bacilos de replicación lenta [191, 192].

Históricamente, la introducción en 1944 de monoterapia con estreptomina y años después con isoniacida, conducía a una mejoría clínica y bacteriológica inicial de los pacientes, por lo que se depositaron en su momento grandes esperanzas [193, 194]. Sin embargo, la mejoría inicial iba seguida meses después de una recaída con aparición de resistencia al fármaco empleado [195, 196]. La introducción de esquemas de tratamiento con al menos tres fármacos, logró evitar la generación de resistencias, comenzando entonces la era de un tratamiento eficaz frente a la tuberculosis [197, 198].

La carga bacilar total presente en un paciente con TB activa se ha calculado entre $10^8 - 10^{10}$ bacilos, ampliamente superior a la estimada en la ILT ($10^3 - 10^4$). La población bacilar necesaria para la generación de resistencias espontáneas por mutación cromosómica es de 10^6-10^8 bacilos para la isoniacida y de 10^8-10^{10} en el caso de la rifampicina [196, 199, 200]. Se precisaría en consecuencia una población mayor o superior a 10^{14} bacilos para la generación de una doble resistencia antimicrobiana [201, 202]. Por tanto, el tratamiento de la ILT en monoterapia con isoniacida o rifampicina es adecuado, ya que el riesgo de generación de resistencias es prácticamente nulo. Consecuentemente, la base del tratamiento de la TB activa es la combinación de fármacos.

1.4.2. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS ACTIVA

Los fármacos considerados de primera línea en el tratamiento de la TB son la isoniacida (INH, H), rifampicina (RIF, R), etambutol (EMB, E) y pirazinamida (PZ, Z). La pauta de tratamiento estándar recomendada por las organizaciones más significativas a nivel mundial y nacional, tales como la Organización Mundial de la Salud, la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, y las sociedades españolas de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y Patología Respiratoria), es la de dos meses asociando INH, RIF, PZ y EMB, seguida de cuatro meses más con INH y RIF (pauta 2HRZE+4HR) [136, 203-205] . La intención es que en la fase inicial o intensiva de tratamiento (los dos primeros meses), se eliminen los bacilos de crecimiento rápido que son porcentualmente los de mayor presencia en la TB activa. En la fase de continuación se intenta eliminar a los bacilos intracelulares de crecimiento intermitente o lento, con lo que se logra prevenir los fracasos de tratamiento y las recaídas tras la finalización del mismo.

En los pacientes con cepas sensibles a los fármacos de primera línea (aproximadamente el 95% en el caso de pacientes nunca tratados en Galicia) [206], y en ausencia de toxicidad, son escasas las situaciones en las que se deba modificar esta pauta. Con el objeto de evitar recaídas, se debe valorar la prolongación del tratamiento más allá de 6 meses en casos de lenta respuesta bacteriológica (persistencia de cultivos de esputo positivos en el segundo mes de tratamiento), silicosis y en pacientes coinfectados por el VIH sin tratamiento antirretroviral asociado [207-212]. La utilización de preparados comerciales con dosis fijas de 3 ó 4 fármacos simplifica la toma de medicación para el paciente, con lo que se logra una mejoría de la adherencia y prevención de resistencias [213-216]. Las tasas de curación con estas pautas en pacientes con cepas sensibles, con adherencia correcta y en ausencia de toxicidad farmacológica, son superiores al 95% [217].

1.4.3. TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS LATENTE

El objetivo del tratamiento de la ILT es la eliminación de *M. tuberculosis* en fase latente, prevenir su activación y de esta manera evitar el desarrollo de enfermedad y eventual transmisión a terceros. Estudios realizados en los años 1950 y 1960, demostraron que la monoterapia con isoniacida durante periodos de 6 a 12 meses

lograban prevenir de manera eficaz el desarrollo de enfermedad tuberculosa [130, 132, 218-220] y que esta protección se mantenía durante años [221]. Desde entonces, el tratamiento preventivo de la TB, después más conocido como tratamiento de la Infección Latente Tuberculosa, es uno de los pilares del control de la enfermedad en países con avanzado desarrollo económico y tasas bajas o medias de prevalencia de enfermedad.

Existen en la actualidad 3 pautas reconocidas eficaces de tratamiento de infección latente tuberculosa: pautas de 6 a 12 meses con isoniacida, de 4 a 6 meses con rifampicina o de 3 meses con la combinación de ambos [136, 222]. Aunque con diferencia las más evaluadas y conocidas son las pautas que usan isoniacida en monoterapia, las otras alternativas gozan de popularidad creciente debido a la menor duración del tratamiento [223-225].

En términos generales, se estima que únicamente un 10% de los pacientes con infección latente acabarán desarrollando enfermedad [56]. Por este motivo, y dado que el tratamiento preventivo puede ocasionar efectos secundarios potencialmente graves, el tratamiento no se debe recomendar de manera universal a todos los pacientes con ILT, sino que debe restringirse únicamente a aquellos en los que el riesgo de progresión sea lo suficientemente elevado para asumir los riesgos derivados del tratamiento y las molestias propias de la toma de medicación en una persona sana.

Como se ha descrito anteriormente, son múltiples las situaciones conocidas de riesgo de progresión a enfermedad (y por tanto con mayor indicación de tratamiento preventivo en caso de ILT). La infección por VIH, el antecedente de exposición reciente a una persona con TB pulmonar con capacidad de transmisión, la silicosis, la enfermedad radiológica cicatricial y el tratamiento inmunosupresor, especialmente con fármacos anti-TNF, son las entidades de mayor riesgo en las que se debe ofrecer y persuadir al paciente para la toma de tratamiento preventivo [63, 226].

En el resto de condiciones con factores de riesgo de progresión, se debe considerar también el tratamiento de la ILT, aunque se deben valorar otros factores personales y médicos para la decisión final. En caso de no indicación (o rechazo del paciente) es necesario vigilar la presencia de posibles signos clínicos de alarma de

presentación de enfermedad tuberculosa. Se ha recomendado también la realización de controles radiológicos seriados durante dos años.

La eficacia del tratamiento de la ILT se estima entre el 60% y 90%. El grado de adherencia del paciente y la duración del tratamiento (en las pautas con isoniacida), son los factores condicionantes del éxito final de esta terapia [227].

1.5. PREVENCIÓN

1.5.1. VACUNAS

La vacuna con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG) compuesta por bacilos atenuados de la especie *M. bovis* perteneciente al complejo *M. tuberculosis*, es hoy día la única disponible y autorizada para la prevención de desarrollo de enfermedad. Su instauración data ya de la década de los 1920 [228] y es aún hoy día una de las vacunas más administradas en niños a nivel mundial. Sin embargo, su eficacia está lejos de alcanzar los niveles de otras, especialmente en la prevención de la TB pulmonar (la causante de transmisibilidad) en adolescentes y adultos, y en poblaciones de países tropicales (los países de mayor prevalencia de enfermedad).

El efecto protector de la vacuna BCG es variable, y se ha cifrado entre un 0 y 80% [229]. No es bien conocida la causa, pero esta enorme variabilidad se ha relacionado con la exposición previa a micobacterias ambientales, virulencia de las distintas cepas de *M. tuberculosis*, edad de vacunación o la coinfección con parásitos y helmintos que provocan una a respuesta inmunitaria celular predominante hacia los linfocitos T helper 2 (Th2) o de células T reguladoras (Treg), interfiriendo con la eficacia protectora de las células Th1 [230].

La falta de eficacia protectora de la BCG y su contraindicación en niños infectados por VIH [231], ha promovido la investigación en nuevas vacunas en TB. Actualmente existen dos vías prioritarias de investigación [232-234]:

- 1) La primera de ellas pretende **sustituir a la BCG**, bien mediante la creación de nuevas cepas con BCG recombinante que ofrezca mayor seguridad y poder inmunógeno, o bien con nuevas cepas genéticamente atenuadas de *M. tuberculosis* [235, 236].
- 2) Una segunda vía de investigación consiste en la búsqueda y desarrollo de vacunas que **amplifiquen el efecto protector de la BCG** [237].

- 3) Una estrategia alternativa consiste en una **vacuna terapéutica**, consistente en la combinación de una vacuna con un tratamiento corto de ILT [238-240].

1.5.2. PREVENCIÓN PRIMARIA

La prevención primaria de la tuberculosis es la base de las estrategias de los programas de Salud Pública. Su objetivo es evitar la transmisión de la bacteria desde la fuente de infección, interrumpiendo así la cadena de transmisión en la comunidad. Consta de dos pilares básicos, que a su vez son considerados los más importantes en el control de la enfermedad [11, 203]:

- Diagnóstico precoz del enfermo
- Tratamiento eficaz.

Diagnóstico precoz del enfermo

Es bien conocida la existencia de una demora diagnóstica importante desde la aparición de síntomas hasta la realización del diagnóstico e instauración del tratamiento antituberculoso. Existen causas atribuibles al enfermo y otras atribuibles al sistema sanitario. Distintos estudios en España y en otras partes del mundo muestran invariablemente retrasos diagnósticos desde la instauración de síntomas. En España existen trabajos que han analizado de manera estructurada este aspecto [241]. Un estudio realizado en una unidad monográfica de TB en Barcelona, encontró una media de 82 días desde el inicio de los síntomas hasta la instauración del tratamiento. Es remarcable el hecho de que 39 días eran demoras atribuibles al sistema sanitario [242]. La falta de sospecha clínica de enfermedad es causa asimismo de brotes de transmisión intrahospitalaria [243-247]. En Galicia no existen estudios que hayan analizado de forma sistemática el retraso diagnóstico, aunque se cifra en 52,5 días en el caso de las tuberculosis respiratorias [206].

Se considera que el periodo de transmisibilidad de la enfermedad comienza, como término medio, 3 meses antes de la presentación de los primeros síntomas [248].

Tratamiento eficaz

El tratamiento eficaz, una vez ya diagnosticada la enfermedad, es el segundo gran pilar en el que se basa el control de la tuberculosis. Para ello son necesarias tanto la disponibilidad del personal sanitario y social del sistema sanitario, como la adecuada y eficaz adherencia del paciente. Se estima que para la disminución de la incidencia de TB en un país, es preciso diagnosticar de manera precoz por lo menos a un 70% de los pacientes con enfermedad transmisible (especialmente bacilíferos) y lograr la curación en el 85% de ellos [249, 250].

En el año 1991 la Organización Mundial de la Salud lanzó y recomendó la conocida estrategia DOTS (del inglés “*Directed Observed Therapy Short course*”) para implantación en los programas nacionales de control de la TB (*WHO (1991) Forty-fourth World Health Assembly. TB Control Programme, Resolution WHA44.8, 13 May 1991. Geneva, World Health Organization*).

Los puntos básicos de esta estrategia son 5:

- 1) Compromiso de las autoridades políticas y sanitarias, con financiación adecuada y sostenida.
- 2) Acceso a medidas de diagnóstico microbiológicas de calidad que permitan diagnóstico precoz.
- 3) Tratamiento eficaz con supervisión y apoyo al paciente.
- 4) Acceso y disponibilidad de fármacos eficaces y de calidad.
- 5) Sistema de vigilancia y evaluación epidemiológica con medida del impacto de la enfermedad.

Se ha demostrado que la implantación efectiva de esta estrategia viene acompañada de una disminución significativa en la incidencia de la enfermedad tuberculosa [251, 252].

1.5.3. PREVENCIÓN SECUNDARIA. ESTUDIO DE CONTACTOS.

Un paciente con TB activa de vías respiratorias (*f fuente de infección*) puede transmitir la enfermedad a diversas personas (“*contactos*”) durante meses antes del diagnóstico de su enfermedad. La infección reciente es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de la TB, por ello el objetivo del estudio de las personas con exposición reciente a *M. tuberculosis* es doble:

- La **detección de enfermos en fases iniciales de la enfermedad**, asintomáticos o paucisintomáticos. Con ello se logra un diagnóstico precoz y por tanto la instauración de tratamiento eficaz que logre disminuir la transmisibilidad de la enfermedad. Se obtiene además un beneficio para el enfermo, ya que al detener la progresión de la TB, se disminuye la morbilidad e incluso mortalidad. No obstante, en la mayoría de series analizadas, el porcentaje de enfermos encontrados en estudios de cribados, rara vez es superior al 2-3% [13, 206, 253, 254].
- La **detección de pacientes ya infectados, pero aún en estado de infección latente**. En situaciones de exposición reciente al bacilo, el riesgo de progresión a enfermedad se considera lo suficientemente elevado como para indicar la instauración de tratamiento que prevenga el desarrollo de enfermedad (y por tanto la continuidad del ciclo de transmisión de la TB). Es bien sabido que el riesgo de infección es dependiente de tres variables [108]:
 - 1) La capacidad infectiva del caso fuente. En general, a mayor carga bacilar del enfermo, mayor es su capacidad de contagio. La presencia de cavitación en la Rx de tórax se ha relacionado directamente con la carga bacilar, y por tanto con una mayor transmisibilidad de la enfermedad.
 - 2) El tiempo de contacto con el enfermo. A mayor tiempo de contacto, mayor es la posibilidad de contagio.

- 3) El lugar de contacto con el caso fuente de infección. Espacios pequeños y poco ventilados son los más propensos para adquirir la infección.

El estudio de contactos y el tratamiento de la infección latente en los infectados es una medida de aplicación habitual en los países de prevalencias bajas y medias de enfermedad [254]. Sin embargo, su eficacia es cuando menos dudosa en situaciones de alta prevalencia, probablemente en relación con la gran probabilidad de exposición continua a la bacteria tuberculosa, para lo que el tratamiento preventivo previo no ofrece protección [255].

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En el Complejo Hospitalario de Pontevedra se introdujo la metodología IGRA (QFT) en el año 2008. En aquel momento, ya se habían consensuado las primeras guías clínicas o recomendaciones de uso a nivel internacional [256] y se estaban ya preparando a nivel nacional [257]. A pesar de ello, y debido a que su introducción en la práctica clínica era aún muy reciente (especialmente en comparación con la PT con cerca de un siglo de uso), existían una serie de circunstancias en los que la evidencia científica disponible era aún insuficiente y el empleo de los IGRAs estaba por definir de forma concreta.

Una de estas situaciones era la que se presentaba durante la realización del estudio de contactos de personas que habían estado expuestas a un enfermo con capacidad de contagio. En aquel momento existía ya evidencia de que la correlación con el grado de exposición a la bacteria tuberculosa era superior con los IGRAs que con la PT [258, 259]. Sin embargo, **no existía ningún trabajo que hubiera estudiado la existencia de un periodo de conversión de los IGRAs** (“periodo ventana”) tras la adquisición de infección por *M. tuberculosis*. En el caso de la PT estaba bien establecido que el periodo ventana era de entre 2 y 12 semanas, que es el tiempo que tarda la PT en ser positiva tras la adquisición de la infección. Sin embargo, la existencia de este periodo en los IGRAs era completamente desconocida. En consecuencia, había incertidumbre en la utilidad de los IGRAs en personas con exposición reciente a la bacteria y con resultado negativo en este test. Mientras que en el caso de la PT, se recomienda repetir la prueba pasadas 8-12 semanas después de la última exposición posible al bacilo, en el caso de los IGRAs **no existía ninguna evidencia científica** que apoyara esta recomendación. **Más aún no existía ni siquiera la evidencia de la existencia de un “periodo ventana” en este tipo de determinaciones.**

La ausencia total de trabajos que hubieran evaluado la posible existencia de un periodo ventana en el estudio de despistaje de infección tuberculosa con los IGRAs fue **lo que motivó la puesta en marcha de un estudio prospectivo de contactos que analizara este aspecto con la prueba de QFT.**

En la Unidad de Tuberculosis (UTB) de Pontevedra concurren una serie de circunstancias favorables para la realización de este estudio:

- ***La actividad asistencial cotidiana de la Unidad*** se encuadra en el desarrollo del Programa Gallego de Prevención y Control de la Tuberculosis en donde se aborda la enfermedad de una manera integral y centralizada, tanto del enfermo como de sus contactos [227].
- ***La prevalencia relativamente elevada de enfermedad en nuestra área de actuación.***
- ***Y finalmente, la existencia de una Unidad de Tuberculosis consolidada,*** con personal cualificado y experimentado, lo que permitía realizar el estudio con todas las garantías entre los contactos de personas con TB con capacidad de contagio.

Por otra parte, en el año 2010, iniciado ya el estudio entre los contactos de pacientes con TB, se diagnosticó un caso de TB bacilífera en un trabajador sanitario que atendía de forma regular en la sala de Hemodiálisis de nuestro hospital. Se presentaba con ello una oportunidad única para el estudio de despistaje de infección tuberculosa entre los pacientes con insuficiencia renal terminal sometidos a programa de hemodiálisis, ya que hasta ese momento se había descrito únicamente un único episodio de características similares de brote de TB en este tipo de población [260].

Así pues, se planteó la realización de tres estudios en dos grupos de población:

Estudio 1. *Determinación de la existencia de un “periodo ventana” con la prueba de QFT* entre las personas adultas sanas con contacto reciente con un enfermo con tuberculosis pulmonar con capacidad de contagio.

Estudio 2. *Correlación de QFT y PT con el grado de exposición a la bacteria tuberculosa antes y después del “periodo ventana”.*

Estudio 3. *Comparación de QFT y PT en pacientes con insuficiencia renal terminal sometidos a programa de Hemodiálisis,* después de una exposición prolongada a *M. tuberculosis*.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Las hipótesis de trabajo fueron las siguientes para cada estudio

3.1.1. IDENTIFICACIÓN DE LA EXISTENCIA DEL PERIODO VENTANA EN LOS IGRAS EN PERSONAS SANAS CON EXPOSICIÓN RECIENTE A UN ENFERMO CON TUBERCULOSIS PULMONAR

Es conocido que el tiempo de conversión de negativa a positiva de la prueba de tuberculina tras la adquisición de la infección puede demorarse hasta 8-12 semanas, lo que corresponde al tiempo de desarrollo de la hipersensibilidad retardada. Sin embargo, se desconocía la existencia de este tiempo en las pruebas de detección *in vitro* de IFN- γ .

La hipótesis de trabajo se basa en que **debe existir también un periodo de tiempo entre la adquisición de la infección y la conversión del IGRA de negativo a positivo (“periodo ventana”)**. Sin embargo, dado que la secreción de IFN- γ por los linfocitos sensibilizados forma también parte de la respuesta inmunitaria efectora (de menor tiempo de aparición que la retardada), es de esperar que en algunos pacientes el periodo de conversión tras la infección sea inferior con los IGRAS que con la PT.

3.1.2. VALORACIÓN DE LA CORRELACIÓN DE LA PT Y QFT EN PERSONAS SANAS EXPUESTAS A M. TUBERCULOSIS ANTES Y DESPUÉS DEL “PERIODO VENTANA”

En base a la anterior hipótesis, una vez transcurrido el tiempo suficiente para la respuesta positiva de la PT y el QFT, **la correlación y concordancia entre ambas pruebas debe ser superior a la establecida en la primera visita** del enfermo, momento en el que varias personas estarán ya infectadas pero sin capacidad aún de dar un resultado positivo en una o ambas pruebas.

3.1.3. ESTUDIO DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN TUBERCULOSA EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS EXPUESTOS A M.TUBERCULOSIS

Es conocido que los pacientes en insuficiencia renal terminal presentan deterioro de la inmunidad celular que condiciona una respuesta subóptima a la PT. Se sabe también por diversos estudios previos, que la sensibilidad diagnóstica para la detección

de ILT es superior con los distintos IGRAs que con la PT. Es de esperar, en teoría, que **la sensibilidad del IGRA (QFT en el presente estudio) sea también superior a la de la PT ante un brote de TB en una sala de diálisis con pacientes con insuficiencia renal.**

3.2. OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis doctoral consiste en determinar el comportamiento de QFT frente a la PT en los dos grupos de población: en personas adultas sanas y en pacientes en programa de diálisis que estuvieron en contacto con un enfermo de TB pulmonar. Los resultados obtenidos podrán proporcionar bases para la práctica clínica diaria en el estudio de contactos adultos sanos con un enfermo con TB, así como en brotes de la enfermedad en pacientes con insuficiencia renal terminal en programa de diálisis.

Los objetivos específicos de cada estudio son:

Estudio 1:

- Determinación de la existencia de un “periodo ventana” con la prueba de QFT entre las personas adultas sanas con contacto reciente con un enfermo con tuberculosis pulmonar con capacidad de contagio.
- Determinar cuál de las dos pruebas de diagnóstico de infección latente (QFT o PT) se convierte antes positiva tras infección reciente por *M. tuberculosis*.

Los resultados que se obtengan de este estudio permitirán averiguar el mejor momento para la realización de dicha prueba en contactos de pacientes.

- Estudio 2:

- Determinar la concordancia de QFT y PT en personas sanas expuestas a *M. tuberculosis* antes y después del “periodo ventana”.
- Determinar la correlación de ambas pruebas con el gradiente de exposición a TB antes y después del “periodo ventana”.

Con estos datos, se permitirá establecer las bases para la práctica clínica diaria con contactos de pacientes con TB.

- Estudio 3:

- Comparación de QFT y PT en pacientes con insuficiencia renal terminal sometidos a programa de Hemodiálisis, después de una exposición prolongada a *M. tuberculosis*.
- Identificar los factores asociados al diagnóstico de infección latente tras la exposición.
- Evaluación a largo plazo de la progresión a TB entre los pacientes estudiados.

Con el análisis de los resultados, se permitirá proporcionar bases para la práctica clínica diaria ante brotes de la enfermedad en pacientes con insuficiencia renal terminal en programa de diálisis.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ÁMBITO DE ESTUDIO

Todos los estudios estuvieron coordinados y dirigidos desde la Unidad de Tuberculosis (UTB) del servicio de Medicina Interna del Complejo hospitalario de Pontevedra. La Unidad es responsable de la atención clínica y epidemiológica de las actuaciones referidas a la enfermedad tuberculosa y a su prevención. En ella se aborda de una manera integral y centralizada todos los aspectos derivados de la infección por *M. tuberculosis* según está establecido en el Programa Gallego de Prevención y Control de la tuberculosis [13].

La UTB en Pontevedra está en pleno funcionamiento desde el año 1996. Está constituida por un equipo de médicos, diplomados universitarios en enfermería, auxiliar de clínica y un trabajador social cuya actividad básica consiste en proporcionar atención clínica y social a enfermos con tuberculosis y personas no enfermas con riesgo de progresión a enfermedad. La actividad se realiza a nivel hospitalario, ambulatorio (consultas externas) y extrahospitalario en caso de estudios de colectivos y soporte social. Existe una relación fluida y estrecha con los servicios de Radiología y Microbiología, aspecto clave para el control de la enfermedad tuberculosa.

4.2. DISEÑO

Los estudios con contactos adultos sanos (**Estudios 1 y 2**) fueron parte de un diseño prospectivo y longitudinal entre adultos que habían estado en contacto reciente con un caso de tuberculosis pulmonar con confirmación microbiológica, esto es con capacidad de contagio a terceros. La inclusión de contactos se llevó a cabo entre enero de 2008 y febrero de 2009. El estudio de los pacientes incluía la realización de la PT y QFT en el momento de la primera visita y la repetición de las pruebas en caso de que la inicial fuera negativa dos meses después, una vez transcurrido el tiempo necesario conocido para la conversión de la PT tras la infección (*“Periodo Ventana”*).

El estudio realizado con los pacientes en diálisis fue descriptivo observacional realizado en enero de 2011, a raíz del diagnóstico de tuberculosis pulmonar bacilífera en un trabajador de la Unidad de Diálisis. El estudio entre los contactos se realizó trece semanas después del último contacto posible con el caso índice e incluía la realización simultánea de la PT e IGRA. No se consideró la repetición de las pruebas, ya que el tiempo transcurrido entre el último momento posible de la infección y la realización de las pruebas era superior al tiempo necesario para la conversión de ambas en caso de haber adquirido la infección tuberculosa. Además, se realizó un seguimiento activo para descartar el desarrollo de enfermedad tuberculosa entre los sujetos estudiados hasta julio de 2012.

4.3. POBLACIÓN A ESTUDIO

Los **estudios 1 y 2** se realizaron sobre el mismo grupo de pacientes. Todos ellos eran adultos no inmunosuprimidos que habían estado en contacto con un caso de TB pulmonar con confirmación microbiológica. Se excluyeron para el estudio aquellos pacientes con antecedentes de tuberculosis o de infección latente tuberculosa (aquellos en los que se hubiera realizado una PT con anterioridad y esta hubiera resultado positiva).

El **estudio 3** se realizó en pacientes adultos que acudían regularmente a sesiones de hemodiálisis en la sala en donde trabajaba la persona que sería finalmente diagnosticada de TB pulmonar bacilífera. Los antecedentes de tuberculosis o de PT positiva previa fueron también motivo de no inclusión en el estudio.

4.4. RECOGIDA DE DATOS

Para cada estudio se diseñó una hoja de recogida de datos sobre la que se elaboró una base de datos informática específica. Las variables recogidas para los estudios en adultos sanos incluían:

- Variables demográficas.
- Antecedentes personales.
- Datos de contagiosidad del caso índice.
- Variables relacionadas con el riesgo de exposición a la bacteria tuberculosa (lugar y duración del contacto con el enfermo).
- Antecedentes epidemiológicos de tuberculosis o de otros contactos con la propia enfermedad.
- Antecedentes por vacunación BCG, bien mediante inspección cuidadosa de cicatriz vacunal (principalmente, aunque no limitado, en regiones deltoideas y zona escapular) o bien mediante revisión de la cartilla de vacunación en aquellas personas que la conservaban.
- Resultados de la PT (mm de induración transversal). En el estudio entre los pacientes de hemodiálisis, además de la induración de la PT se anotó también la medición del eritema resultante.
- Resultado de QFT (UI/ml).

En el estudio de los pacientes en programa de diálisis se realizó un seguimiento clínico activo de desarrollo de enfermedad, contando para ello con la colaboración de los médicos del servicio de Nefrología, que atienden de manera regular y continua a estos pacientes.

4.5. DETERMINACIONES

4.5.1. PRUEBA DE TUBERCULINA

Se realizó la PT en todos los pacientes de ambas poblaciones de estudio según la técnica convencional (técnica de Mantoux). Consiste en la inyección intradérmica en la parte anterior del antebrazo no dominante de 0,1 ml de la solución que contienen 2 UI de derivado proteico purificado (PPD) RT-23 (Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca). La presencia durante unos minutos de una pápula intradérmica inmediatamente después de la inyección era indicativo que ésta había sido realizada correctamente (**Figura 13**). La lectura de la prueba se realizó a las 48-72 horas mediante la medición en mm de la induración transversal. En los pacientes en hemodiálisis se realizó también lectura del eritema.



Figura 13. *La existencia de una pápula inmediatamente después de la inyección es indicativa de su correcta realización*

La PT se repitió dos meses después de la última exposición posible al caso índice (“periodo ventana”) en el caso de que hubiera resultado negativa en la primera ocasión en los pacientes correspondientes a los estudios de contactos sanos (estudios 1 y 2). En el estudio de contactos de pacientes en hemodiálisis (estudio 3) no se consideró el periodo ventana, ya que la PT fue realizada cuando habían transcurrido 13 semanas desde la última exposición posible al bacilo. En aquellos pacientes que la PT inicial hubiera resultado negativa, sí se realizó una segundo PT, buscando un posible efecto activador o booster [261-263]

4.5.2. QUANTIFERON®-TB GOLD IN-TUBE

Inmediatamente antes de la PT, se realizó la extracción sanguínea para la realización de QFT. El proceso se realizó según el protocolo propuesto por el fabricante (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia) De la misma manera que con la PT, tanto la extracción como los procesos de manipulación inmediata tras la extracción, transporte al laboratorio, almacenaje, centrifugación y análisis, fue realizado por personal con experiencia en la materia (enfermería, técnicos de laboratorio y microbióloga). A pesar de tratarse de una técnica relativamente de reciente introducción en nuestro hospital, se poseía ya cierta experiencia por trabajos colaborativos en estudios anteriores [264].

Para la realización del protocolo de QFT, se añade 1 ml de sangre a cada uno de los tres tubos diferentes del kit de QFT. El primero es el que contiene los antígenos de alta especificidad para *M. tuberculosis* ESAT-6, CFP-10 y TB7·7; el segundo es el tubo con mitógeno con fitohemaglutinina (PHA) –control positivo- y un tercer tubo “nulo” o control negativo que permite valorar la secreción basal de IFN- γ . Tras la extracción se realiza una agitación vigorosa de los tubos que permitan el contacto de la sangre del paciente con las paredes del tubo. Posteriormente, y dentro de las 4 horas siguientes a la extracción (habitualmente pocos minutos), los tubos se incuban en posición vertical durante 16-24 horas para después centrifugarlos a 2000-3000 rcf y separar el plasma de los componentes celulares de la sangre. Se extraen unos 200 μ L de plasma de cada uno de los tubos y se almacenan a -80°C durante un tiempo inferior a 3 semanas, hasta la descongelación para realización del análisis de la concentración de IFN- γ mediante la técnica de ELISA tipo Sandwich (**Figura 14**).

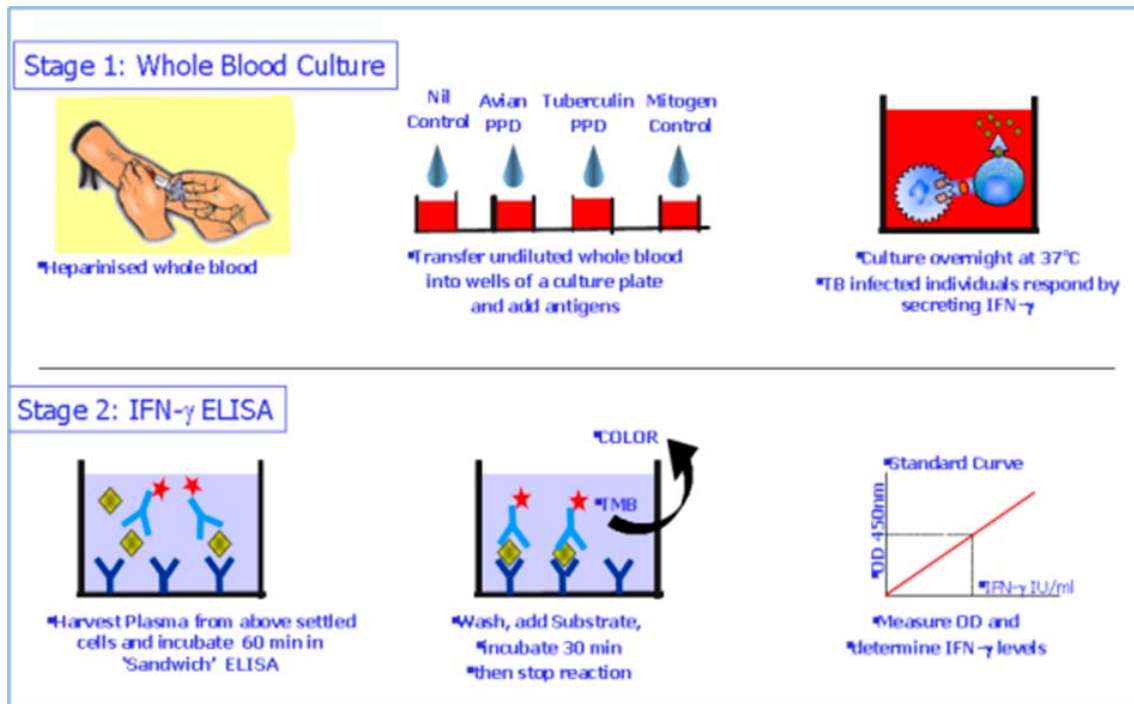


Figura 14. Técnica de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia)

El ELISA tipo sándwich tiene una gran especificidad y sensibilidad. Se realizó siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial. Brevemente, en este ensayo los pocillos están recubiertos con un primer anticuerpo anti-Interferón γ , que captura el IFN- γ soluble presente en la muestra. Después de lavados para eliminar el material no retenido, se aplica el segundo anticuerpo anti-Interferón γ , en este caso conjugado a un enzima. Se añade posteriormente un sustrato incoloro que por acción de la enzima se convierte en una solución coloreada que puede ser medida en un espectrofotómetro. A mayor cantidad de IFN- γ , más color en el pocillo. La medida de la absorbancia de esta muestra, comparada con las obtenidas con cantidades conocidas de IFN- γ representadas en una recta patrón, permite conocer la cantidad exacta del interferón en la muestra. Los resultados se interpretaron como positivos, negativos o indeterminados según los criterios establecidos por el fabricante (**Figura 15**).

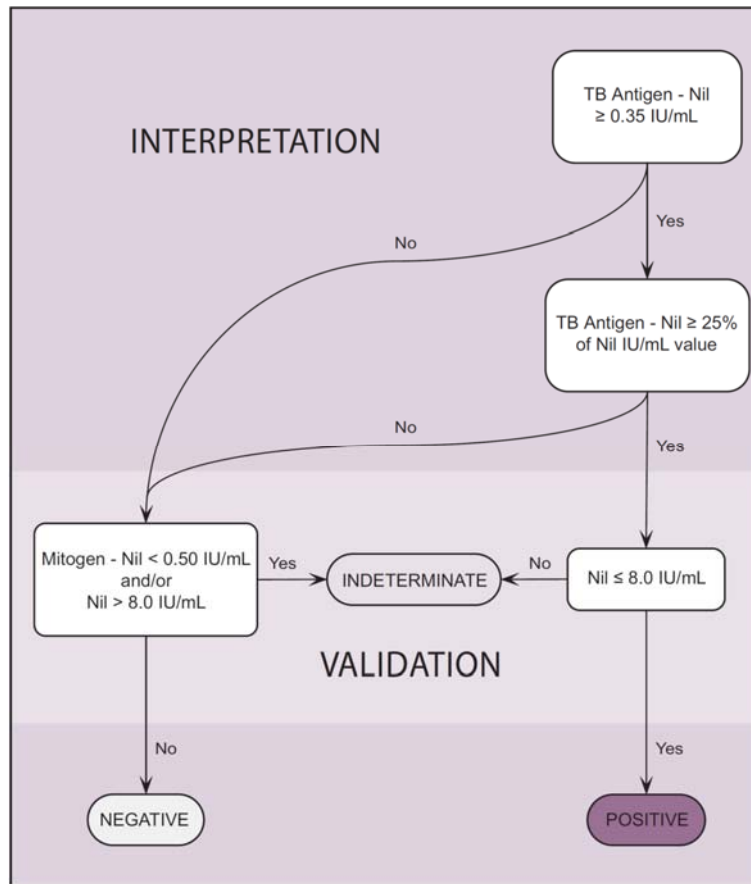


Figura 15. Interpretación de los resultados de Quantiferon®-TB Gold In-Tube según criterios del fabricante.

Al igual que lo realizado con la PT, se repitió el QFT dos meses después en aquellos contactos con QFT inicial negativa, sin tener en cuenta el resultado de la PT o si estaban ya recibiendo tratamiento de infección latente tuberculosa.

4.6. DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN LATENTE

En el estudio de contactos, el diagnóstico de infección tuberculosa y en consecuencia las recomendaciones de tratamiento, se basaron exclusivamente en el resultado de la PT, ya que el médico responsable del paciente estaba ciego a los resultados de QFT. Se consideró positiva toda induración mayor o igual de 5 mm, independientemente del estado vacunal de cada paciente. En el estudio de pacientes con insuficiencia renal, se consideraron de manera combinada tanto la medida de la PT como de QFT, atendiendo preferentemente a aumentar la sensibilidad en los resultados discordantes.

En aquellos pacientes con presencia de síntomas sugestivos de tuberculosis, o con PT positiva (o QFT en el caso de pacientes en diálisis) se realizó una radiografía de tórax y analítica general para descartar actividad, y como prueba previa a la recomendación de tratamiento de infección latente tuberculosa. No fue necesaria en ningún caso la realización de pruebas microbiológicas de detección de *M. tuberculosis* (pruebas de amplificación de ácidos nucleicos o cultivos).

A las personas finalmente diagnosticadas de infección latente tuberculosa y sin contraindicaciones, se recomendó tratamiento, habitualmente isoniacida 300 mg/día durante un periodo de 6 meses, o preferentemente 9 meses en los pacientes con insuficiencia renal.

4.7. ESTUDIO DEL PERIODO VENTANA

Dada la ausencia de referencias en la literatura sobre el tiempo de conversión de los IGRAs, se consideró la realización tanto de la PT como de QFT según lo establecido con la PT, que es la práctica clínica habitual. No se consideró por motivos económicos y de aplicabilidad práctica la realización de pruebas seriadas con menor tiempo de intervalo.

El diseño final de realización se esquematiza en la **figura 16**.

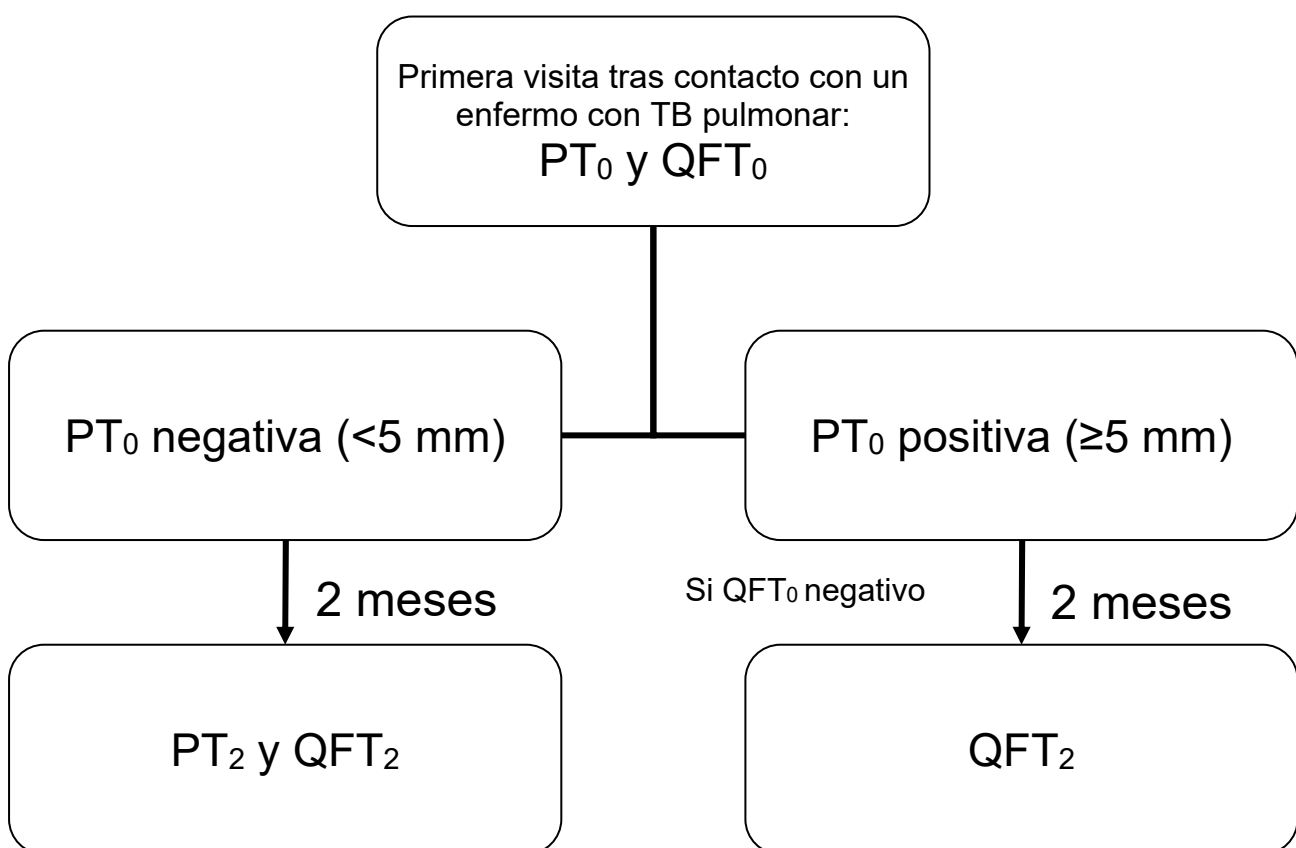


Figura 16. *Diseño del estudio para la determinación del “periodo ventana”.*

*PT*₀, Prueba de tuberculina tras la exposición a tuberculosis. *QFT*₀, Quantiferon®-TB Gold In-Tube tras la exposición a tuberculosis; *PT*₂, Prueba de tuberculina 2 meses después de la exposición; *QFT*₂, Quantiferon®-TB Gold In-Tube 2 meses después de la exposición.

4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada población de estudio, la comparación de proporciones entre los resultados de cada prueba se realizó mediante la prueba de McNemmar. Las comparaciones entre variables categóricas entre grupos se realizaron mediante la prueba de χ^2 de Pearson o el test de Fisher.

Para la comparación de medias en variables cuantitativas se empleó el test t de Student's o el de Mann-Whitney, en función de tratarse de variables paramétricas o no respectivamente, lo que se comprobó mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Todas las variables con significación estadística ($p < 0.05$) o clínicamente relevantes con $p < 0.2$ en el análisis univariante, se incluyeron en un modelo de regresión logística multivariante.

La validez del análisis multivariante se verificó mediante la Prueba de bondad de ajuste de Husmer-Lemeshov. Todos los resultados estadísticos se consideraron bilaterales. La concordancia entre la PT y QFT se realizó usando el coeficiente Kappa (κ), indicando una concordancia débil (≤ 0.40), moderada (0.41-0.60), buena (0.61-0.80), o excelente (> 0.80). Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS para Windows (SPSS versión 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

4.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los estudios fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (CEIC). Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron informados verbalmente y por escrito de la naturaleza y objetivos del mismo y otorgaron su consentimiento escrito (**ver Anexo 4**).

En el caso del estudio del brote en la sala de hemodiálisis, aunque en ningún momento se identificó al caso índice ni se aportó ninguna otra información que la estrictamente necesaria para la realización del estudio de contactos, era posible en la práctica su identificación por parte de distintas personas usuarias del servicio de Nefrología o del propio hospital. Con tal motivo, se solicitó y se obtuvo su consentimiento informado para la realización y difusión del estudio.

5. RESULTADOS

5.1. ESTUDIO 1

EXISTENCIA DE PERIODO VENTANA EN PACIENTES QUE ESTUVIERON EN CONTACTO CON UN ENFERMO CON TUBERCULOSIS PULMONAR

PUBLICACIÓN (ver Anexo 1)

Autores: Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, Cortizo S, Sande D, Pazos RA, González-Fernández A.

Título: Interferon- γ release assays in tuberculosis contacts: is there a window period?

Revista: European Respiratory Journal 37:215-217 (2011)

Durante el periodo de estudio, **184 contactos**, personas sanas que habían estado en contacto reciente con un paciente con TB respiratoria activa, aceptaron la participación en el estudio. Finalmente se excluyeron a 32 de ellos, 28 por antecedentes de TB previa o PT positiva documentada, y otros 4 por no disponer de datos suficientes del caso índice.

Las características basales de los **152 pacientes incluidos** finalmente en el estudio se señalan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Características basales de 152 pacientes adultos sanos que estuvieron en contacto con una persona con tuberculosis pulmonar*

CARACTERÍSTICAS BASALES	
Edad en años, mediana (rango IC)	44 (32-55)
Género masculino, n (%)	65 (42.8)
Vacunación BCG n (%)	55 (36.2)
PT previa (%)	34 (22.4)
Caso índice bacilífero (%)	137 (90.1)
Caso índice con Rx tórax cavitada (%)	84 (55.3)
Relación con el caso índice (%)	
Familiar conviviente	48 (31.6)
Familiar no conviviente	43 (28.3)
Laboral / escolar	52 (34.2)
Otro	9 (5.9)
Lugar de contacto con el caso índice (%)	
Como una habitación o menor	50 (32.9)
Como un salón	66 (43.4)
Como una oficina	22 (14.5)
Como una nave o mayor (aire libre)	14 (9.2)
Horas de contacto con el caso índice (%)	
1 a 8 horas	47 (30.9)
9 a 24 horas	27 (17.8)
25 a 100 horas	38 (25.0)
Más de 100 horas	40 (26.3)

IC. Intercuartil. PT: Prueba de tuberculina. Rx: Radiografía

De los **152** contactos restantes, a todos ellos se les realizaron las dos pruebas en su primera consulta en nuestra Unidad, la PT y QFT (considerado tiempo 0: PT₀ y QFT₀, respectivamente) (**Figura 16**).

En **62** (40,8%) de ellos, la PT₀ fue positiva (≥ 5 mm), mientras que QFT₀ ($\geq 0,35$ UI/ml) lo fue en **57** casos (37,5%) en su primera visita a la Unidad de Tuberculosis

(Figura 17). Ningún paciente fue diagnosticado de TB activa durante el estudio de contactos.

La recomendación de instaurar tratamiento de infección latente en los contactos se basó en la positividad de la PT (independientemente del resultado de QFT), que iniciaron 41 de los 62 pacientes con PT positiva. En 38 de ellos se indicó tratamiento con isoniacida durante 6 meses, mientras que en los otros tres pacientes iniciaron la combinación de isoniacida y rifampicina durante 3 meses.

Dos meses después de la primera visita (o alternativamente dos meses después del último contacto posible con el caso índice) se indicó repetir la PT (PT₂) en aquellos que había sido inicialmente negativa (Figura 16). Además, se solicitó repetir QFT (QFT₂) en los pacientes en los que el primer QFT hubiera resultado negativo, independientemente de si estaban ya recibiendo tratamiento de ILT o no, y del resultado de la PT inicial.

Entre los **90 pacientes con PT inicial negativa**, 81 acudieron a la realización y lectura de la segunda PT. En **24 de ellos** se objetivó una conversión de la PT, indicando que **casi un 30% de los contactos** (29,6%; IC 95%:19,1-40,2%), habían desarrollado respuesta inmunitaria frente a la tuberculina durante este tiempo (Figura 17).

Por otra parte, entre los 95 pacientes con QFT inicial negativo, en 80 de ellos se repitió la prueba dos meses después. En este caso se objetivaron **17 conversiones positivas**, lo que representa un 21,2% (IC95%:11,7-30,8%) de los contactos estudiados.

De esta manera, se demuestra la existencia de un periodo ventana tras la exposición e infección por *M. tuberculosis*, tanto en la PT como en el IGRA a estudio, en este caso el QFT.

Es de reseñar que entre los 24 pacientes en los que se objetivó conversión de la PT, **en 9 de ellos** (37,5%; IC 95%:1,60-59,0%) **el QFT era ya positivo** desde el primer momento, lo que es sugestivo de que hubo una **conversión más precoz de la QFT que de la PT.**

A la inversa, entre los **17 pacientes con conversión de QFT**, se objetivó que en **3 de ellos** (17,6%; IC95%: 3,8-43,4%) **la PT era ya positiva** en la primera visita. Este

resultado, en principio, podría ser también sugestivo de una conversión anterior de la PT (**Figura 17**). Otros **12 pacientes** con conversión de QFT presentaron también conversión de PT.

Los otros dos pacientes con conversión de QFT, tenían PT negativas, tanto al inicio como dos meses después, aunque ambos tuvieron resultados de QFT muy próximos al punto de corte propuesto por el fabricante: 0,37 y 0,45 UI/ml, respectivamente.

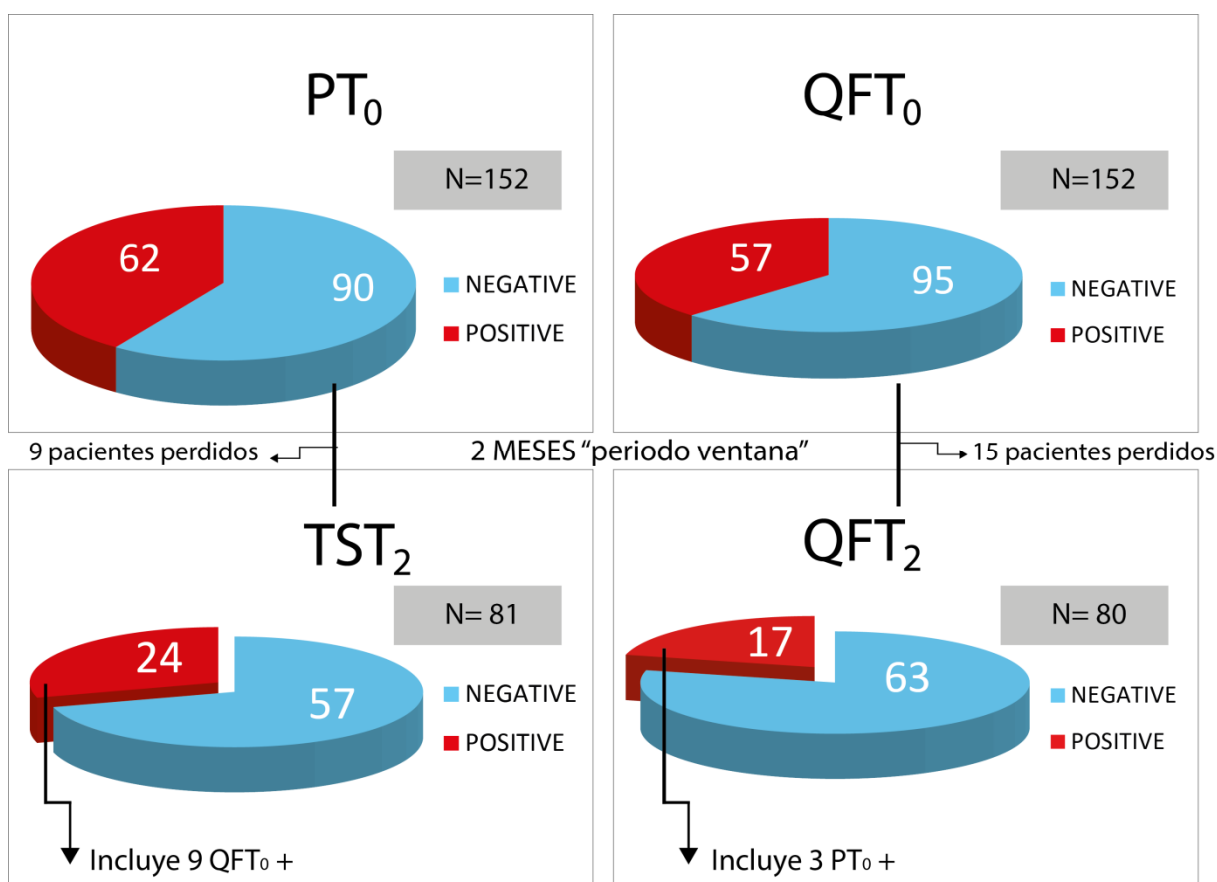


Figura 17. Resultados de la prueba de tuberculina (PT) y de la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT) tras contacto reciente con un caso índice con tuberculosis (PT₀ y QFT₀) y después del periodo ventana, dos meses más tarde (PT₂ y QFT₂)

23 de los 24 pacientes con conversión de PT iniciaron tratamiento de ILT, 22 de ellos con pauta de Isoniacida, mientras que al otro paciente se le indicó pauta con combinación de isoniacida/rifampicina.

La discusión de todos estos resultados se expone de forma conjunta tras la presentación de los trabajos.

5.2. ESTUDIO 2

CONCORDANCIA DE QFT Y PT EN PERSONAS SANAS EXPUESTAS A *M. TUBERCULOSIS* ANTES Y DESPUÉS DEL PERIODO VENTANA.

PUBLICACIÓN (ver Anexo 2)

<i>Autores:</i>	<i>Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, González-Fernández, A.</i>
<i>Título:</i>	<i>Tuberculin skin test and interferon-γ release assay show better correlation after the tuberculin ‘window period’ in tuberculosis contacts.</i>
<i>Revista:</i>	<i>Scandinavian Journal of Infectious Diseases 43:424-429 (2011)</i>

Una vez verificada la existencia del “periodo ventana” en QFT en los contactos, se investigó la concordancia entre ambas pruebas (QFT y PT) antes y después del periodo ventana, en la misma población que en el Estudio 1.

Por otra parte, y ante la inexistencia de un “*gold standard*” que determine con certeza el diagnóstico de ILT, se buscó también la correlación de ambas pruebas con el gradiente de exposición a *M. tuberculosis*, como marcador indirecto de infección. Estos análisis se realizaron también antes y después de la finalización del periodo ventana.

PT₀ y QFT₀

En la primera visita a la Unidad, **los resultados entre la PT₀ y QFT₀ coincidieron en 123 pacientes (80,9%)**: 45 con ambas pruebas positivas y otros 78 con ambas negativas. Los 29 casos discordantes fueron 17 por PT positiva y QFT negativa, mientras que 12 pacientes fueron PT negativa y QFT positiva (**Tabla 3**).

El grado de concordancia entre la PT y QFT fue moderada (K=0,60) entre los 152 pacientes que iniciaron el estudio. Al analizar separadamente el grupo de los contactos

vacunados con BCG y los no vacunados, la concordancia fue **débil entre los pacientes vacunados** ($K=0,457$) y **buena entre los no vacunados** ($K=0,687$) (Tabla 3).

Tabla 3. Concordancia entre los resultados de prueba de tuberculina (PT) y de la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT) tras contacto reciente con un caso índice con tuberculosis respiratoria

	Total (n=152)		BCG (n=55)		No BCG (n=97)	
	QFT -	QFT +	QFT -	QFT +	QFT -	QFT +
PT -	51%	8%	42%	7%	57%	8%
PT +	11%	30%	20%	31%	6%	29%
valor κ	0.60		0.457		0.687	

PT: prueba de tuberculina. QFT: prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube. Pacientes vacunados con BCG (BCG) o sin vacunar (no BCG)

Las variables asociadas al **resultado positivo de la PT (≥ 5 mm)** fueron la **realización previa de otra PT** (con resultado siempre negativo por definición para la inclusión en el estudio) ($p=0,042$) y **el lugar de contacto con el caso índice** (a menor tamaño del lugar, mayor posibilidad de PT positiva) ($p=0,017$). **La vacunación previa con BCG**, se aproximó como variable a la significación estadística ($p=0,056$).

Sin embargo, la única variable asociada a positividad de QFT fue el lugar de contacto con el caso índice ($p=0,002$).

Entre los 62 pacientes con PT inicial positiva (≥ 5 mm), en 3 de ellos la induración de la PT fue 5-9 mm; en 13 de 10-14 mm y en el resto la lectura fue en todos ≥ 15 mm (Figura 18).

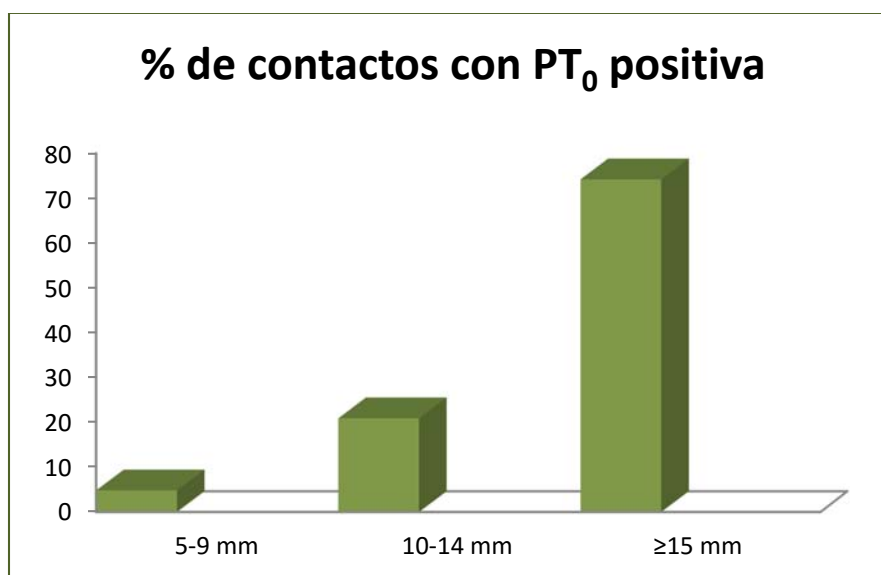


Figura 18. *Medida de la Prueba de tuberculina en pacientes con resultado positivo PT₀. Resultado de la Prueba de tuberculina realizada en la primera visita a la Unidad*

Resultados definitivos de PT y QFT

En las personas con pruebas iniciales negativas (PT₀ y/o QFT₀), se indicó su repetición **dos meses después (denominados PT₂ y QFT₂)** del último contacto posible con la persona enferma. Se consideró resultado **definitivo** (tanto para PT como para QFT) los resultados obtenidos en la primera visita si estos habían sido positivos, o los obtenidos dos meses después, si los primeros habían sido negativos.

El análisis final de la concordancia entre ambas pruebas y la correlación con el grado de exposición a la micobacteria se realizó únicamente en aquellas personas que hubieran finalizado correctamente ambos estudios. Un **total de 136 contactos** completaron de manera correcta **ambas determinaciones**.

La PT fue definitivamente positiva en **81 contactos (59,6%)**. La induración fue entre 5 y 9 mm en tan solo 2 pacientes; en 15 casos fue de 10-14 mm y en los restantes 64 contactos, la induración fue ≥ 15 mm.

El QFT fue definitivamente positivo en **73 contactos (53,7%)**.

Los porcentajes de los resultados obtenidos en cada una de las determinaciones se muestran en la **Figura 19**.

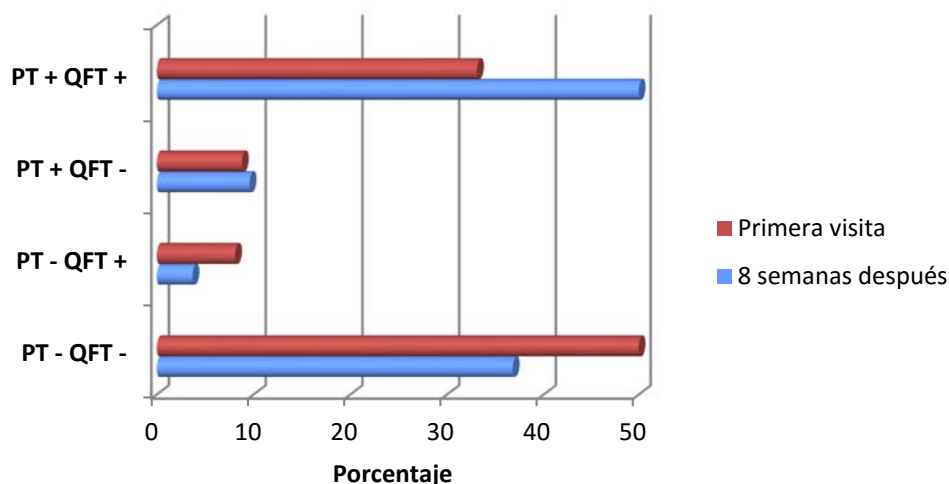


Figura 19. Resultados de la prueba de tuberculina (PT) y de la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT) tras contacto reciente con un caso índice con tuberculosis en la primera visita y después del periodo ventana, 8 semanas más tarde.

La concordancia final global entre las dos pruebas se consideró buena ($K=0,73$). Fue excelente entre las personas no vacunadas con BCG (91% de concordancia; $K=0,81$) y moderada (80% de concordancia; $K=0,59$) entre los vacunados (Tabla 4).

El número de horas compartido con el caso índice y el lugar de contacto se relacionaron ambos con la positividad tanto de PT como de QFT ($p=0,006$ y $0,007$ respectivamente para el número de horas; y $p=0,022$ y $0,02$ respectivamente, en lo referente al lugar de contacto).

Tabla 4. Concordancia entre los resultados definitivos de prueba de tuberculina (PT) y de la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT) tras contacto con un caso índice con tuberculosis respiratoria

	Total (n=136)		BCG (n=49)		No BCG (n=87)	
	QFT -	QFT +	QFT -	QFT +	QFT -	QFT +
PT -	37%	4%	33%	6%	39%	2%
PT +	10%	50%	14%	47%	7%	52%
valor κ	0.73		0.59		0.81	

PT: Prueba de tuberculina. QFT: Prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT). BCG: Bacilo de Calmette y Guérin.

5.3. ESTUDIO 3

COMPARACIÓN DE QFT Y PT EN PACIENTES EN PROGRAMA DE HEMODIÁLISIS TRAS CONTACTO CON UN CASO DE TB PULMONAR. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LA INFECCIÓN Y SEGUIMIENTO A LARGO PLAZO

PUBLICACIÓN (ver Anexo 3)

Autores: Luis Anibarro, Matilde Trigo, Diana Feijoó, Mónica Ríos, Luisa Palomares, Alberto Pena, Marta Núñez, Carlos Villaverde and África González-Fernández

Título: Value of the tuberculin skin testing and of an interferon-gamma release assay in haemodialysis patients after exposure to M. tuberculosis.

Revista: BMC Infectious Diseases 12:195 (2012)

En la sala de Hemodiálisis del Complejo hospitalario de Pontevedra se detectó un caso de TB pulmonar en un trabajador que atendía regularmente la sala en turnos alternativos de mañana y tarde. Desde cinco meses antes del diagnóstico de TB, presentaba un cuadro progresivo de tos con expectoración y sintomatología constitucional. Había dejado de acudir al hospital 9 semanas antes del diagnóstico debido a baja laboral, sin que volviera desde entonces a establecer contacto con ninguno de los pacientes en hemodiálisis.

En el momento del diagnóstico, el paciente presentaba TB pulmonar bacilífera (++++, máximo grado de bacilos por campo microscópico) y radiografía de tórax con cavitación unilateral. La cepa fue identificada como *M. tuberculosis complex* y era sensible a todos los fármacos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol, pirazinamida y estreptomycin).

Inicialmente se consideraron para el estudio a **58 pacientes** que estaban en programa de hemodiálisis y que habían estado en contacto con esta persona enferma. De las 58 personas expuestas, una declinó la realización de estudios y otros cinco no se incluyeron por haber constancia de una PT positiva previa.

De los **52 pacientes** finalmente incluidos para el estudio, 46 (88,5%) se consideró que habían estado en contacto durante las 17 semanas estimadas de capacidad de contagio. La edad media de los pacientes era de $62 \pm 16,8$ años y el 59,6% eran varones.

En 7 pacientes se constató antecedentes de vacunación por BCG, en todos ellos por observación de la cicatriz por parte del personal de enfermería de la Unidad de tuberculosis. El resto de características basales de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 5**.

La **PT inicial fue positiva únicamente en 3 pacientes (5,8%)**. En todos ellos la induración fue ≥ 10 mm. En otros 3 pacientes se documentó **eritema sin induración**.

Tabla 5. Características basales de los 52 pacientes en hemodiálisis con contacto con un caso de tuberculosis pulmonar bacilífera.

CARACTERÍSTICAS BASALES	GRUPO DE ESTUDIO
Edad en años, media \pm DE (rango)	62 ± 16.8 (rango 24 a 89 años)
Género masculino, n (%)	31 (59.6)
Vacunación BCG n (%)	7 (13.5)
IMC, media \pm DE	27.1 ± 5.0
Hemoglobina (mg/dL), media \pm DE	11.5 ± 1.4
Albúmina (mg/dL) media \pm DE	2.8 ± 0.4
Diabetes mellitus, n (%)	8 (15.4)
Exposición al caso índice (semanas, %)	
17 semanas	46 (88.5)
< 17 semanas	6 (11.5)
Rx tórax cicatriz sugestiva de TB, n (%)	5 (9.6)

IMC. Índice de masa corporal. DE: desviación estándar

En un segundo paso, realizado dos semanas después con el fin de buscar un refuerzo a la respuesta inmunitaria frente a la tuberculina o “efecto *booster*”, la **PT se**

había vuelto positiva en 8 (16,3%) de los 49 pacientes con PT inicial negativa, incluyendo los 3 pacientes que habían presentado únicamente eritema en el primer paso. Todos estos pacientes presentaron también una induración de la PT ≥ 10 mm. Además, se vio que entre los 41 pacientes restantes con PT negativa, 9 presentaban una respuesta con eritema cutáneo en la zona de la punción, sin ningún tipo de induración.

La prueba de QFT se realizó en todos los pacientes inmediatamente antes de la primera PT y fue positiva en 18 enfermos (34,6%). La concordancia entre ambas pruebas fue débil (K=0,21), si consideráramos únicamente la primera PT y moderada (K=0,49) si consideramos ambas PT (Tabla 6).

Tabla 6. Concordancia entre los resultados de la prueba de tuberculina de la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube en pacientes en programa de hemodiálisis tras contacto con tuberculosis pulmonar.

			PT-1		PT global		Total
			negativa	positiva	negativa	positiva	
QFT	negativo	n	34	0	32	2	34
		(%)	65.4%	0%	61.5%	3.8%	65.4%
	positivo	n	15	3	9	9	18
		(%)	28.8%	5.8%	17.3%	17.3%	34.6%
Total		n	49	3	41	11	52
		(%)	94.2%	5.8%	78.8%	21.2%	100%
<i>valor kappa</i>			0.21		0.49		

PT: Prueba de tuberculina. PT-1: Prueba de tuberculina realizada por primera vez. PT global: Resultado global incluyendo la PT-1 y una segunda prueba realizada 15 días después de la primera. QFT: Prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube.

Debido al elevado número de pacientes con PT negativa pero que presentaban eritema sin induración en la respuesta tuberculínica, se planteó la hipótesis de que la sola presencia de eritema sin induración, podría considerarse también como prueba PT positiva. En este caso, 20 contactos habrían tenido la PT positiva y la concordancia PT-QFT subiría hasta K=0,67 (concordancia fuerte entre ambas pruebas) (Tabla 7), lo que es sugestivo del importante valor que tendría la presencia del eritema en la prueba cutánea, aún en ausencia de induración, en este grupo de pacientes.

Tabla 7. Concordancia entre los resultados de prueba de tuberculina y presencia de eritema con la prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube en pacientes en programa de hemodiálisis tras contacto con un caso índice con tuberculosis respiratoria

			PT / eritema		
			PT (-) eritema (-)	PT (+) o eritema (+)	Total
QFT	negativo	n	29	5	34
		%	55.8%	9.6%	65.4%
	Positivo	n	3	15	18
		%	5.8%	28.8%	34.6%
	total	n	32	20	52
		%	61.5%	38.5%	100%
<i>valor kappa</i>				0.67	

PT: Prueba cutánea de tuberculina. QFT: Prueba de Quantiferon®-TB Gold In-Tube

No se encontró relación entre la positividad de la PT y ninguna de las variables analizadas como factores de riesgo de infección tuberculosa, aunque la presencia de imagen en la radiografía de tórax radiográfica sugestiva de cicatriz de origen tuberculoso antiguo, se aproximó a los límites de la significación estadística ($p=0,057$), que sí alcanzó en el caso de QFT ($p=0,043$). Ninguna otra variable analizada se relacionó con la positividad de QFT.

No se detectó ningún paciente con TB activa durante el estudio de contactos.

En 20 pacientes el diagnóstico final fue de ILT: 9 en base a los valores positivos de QFT, 2 por la PT positiva y en los otros 9 por presentar ambas pruebas positivas.

Entre los 20 pacientes con ITL, 11 comenzaron tratamiento con isoniacida 300 mg/día, finalizándolo correctamente 8 personas. Otros dos presentaron toxicidad que obligó a la retirada de la medicación y el otro enfermo falleció por causas no relacionadas con TB ni con toxicidad medicamentosa.

Seguimiento de los contactos

Se realizó un **seguimiento activo durante 18 meses** a todos los pacientes, mediante controles clínicos y analíticos seriados. En caso de indicación clínica por parte de los médicos con responsabilidad asistencial sobre los pacientes (servicios de Nefrología y en la propia Unidad de Tuberculosis) se realizaban también pruebas de

imagen, especialmente radiografías de tórax. **Ninguno de ellos desarrolló TB** durante el periodo de seguimiento. Nueve pacientes (5 con ILT y otros 4 sin infección) fallecieron antes de la finalización del periodo de seguimiento, aunque ninguno de ellos en relación con enfermedad tuberculosa ni su tratamiento.

6. DISCUSIÓN

En este proyecto quisimos evaluar el comportamiento de las nuevas pruebas de liberación de interferon gamma (IFN- γ) y compararlas con la convencional PT, ante situaciones en las que apenas existían estudios (enfermos en programas de hemodiálisis con exposición reciente a *M. tuberculosis*) o incluso ninguno (la valoración de la existencia de un “periodo ventana” en personas sanas también expuestas a la micobacteria).

De manera global, nuestros resultados demuestran la existencia de un periodo de tiempo (“periodo ventana”) que los IGRAS precisan para la conversión de negativo a positivo tras la infección, y la mayor sensibilidad de los IGRAS en pacientes con insuficiencia renal terminal con exposición reciente a TB. Si trasladamos nuestros resultados a la práctica clínica, se puede concluir que es necesario considerar la existencia de un periodo de conversión (“periodo ventana”) en el estudio de personas que han estado en contacto con un enfermo de TB y que se debe realizar un IGRA en el estudio de contactos de pacientes en diálisis, cuando menos ante un resultado negativo de la PT.

6.1. EXISTENCIA DE UN PERIODO VENTANA TRAS LA INFECCIÓN POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

A lo largo de las décadas de experiencia acumulada con la PT, era un hecho bien conocido que el tiempo necesario para descartar razonablemente una infección tuberculosa tras contacto con un enfermo era aproximadamente de 8 semanas [262]. La negatividad de la PT después de este periodo de tiempo permitía descartar razonablemente infección en la mayor parte de personas expuestas y por tanto con un riesgo mínimo de desarrollo de enfermedad [44, 265]. **Sin embargo, nunca se había estudiado este aspecto con ninguno de los IGRAs comercializados.**

En nuestro estudio, comparamos la respuesta de ambas pruebas en la primera visita del paciente y posteriormente, tras las 8 semanas establecidas como periodo ventana. Se encontraron conversiones de ambas pruebas, tanto con la PT tal y como era de esperar, como con QFT, lo que era el objeto del estudio.

Sin embargo, las tasas y tiempos de conversiones fueron distintas para cada prueba. Entre los 24 pacientes que mostraron conversión de la PT (sugestivo por lo tanto de infección reciente), 9 de ellos (37,5%) ya presentaban QFT positivo en la primera determinación, lo que sugiere una conversión más precoz de QFT que con la prueba cutánea. Por otro lado, entre los 17 pacientes que presentaron conversión de QFT en la determinación realizada a los dos meses, solamente 3 (17,6%) presentaban ya la PT positiva con anterioridad.

Se ha sugerido que los IGRAs evalúan la respuesta efectora celular, de aparición más rápida que la respuesta de hipersensibilidad retardada de los linfocitos T memoria (en la que se basa la PT), lo que al menos en teoría podría explicar la mayor precocidad de la respuesta de QFT en nuestro estudio [266].

Es de destacar el hecho de que entre los pacientes con conversión de QFT, en dos de ellos las dos PT realizadas fueron negativas, existiendo por tanto discordancia PT-QFT. Las discordancias son un hecho frecuente en todos los estudios que han analizado el comportamiento de cada una de estas dos pruebas, tanto durante los estudios de

contactos, como en otras situaciones con riesgo de progresión a enfermedad [265, 267]. Sin embargo, en nuestro estudio es de resaltar que en estos dos pacientes el resultado de QFT (0,37 y 0,45 UI/ml) se aproximara al nivel de positividad establecido por el fabricante (0,35 UI/ml).

Existe cierta controversia sobre el punto de corte de para considerar positiva esta prueba, y especialmente sobre la conveniencia de que sea un valor único definido para todas las situaciones en las que se indica su realización. En estudios seriados, realizados en personal sanitario o en pacientes con tratamiento continuo inmunosupresor, se observan conversiones y reversiones de QFT sin relación con exposición conocida a *M. tuberculosis* y habitualmente en valores próximos a los puntos de corte de cada prueba [268, 269]. En base a ello, se sugiere la existencia de una “zona gris” en la que la incertidumbre diagnóstica de infección latente tuberculosa (y consecuentemente la incertidumbre del riesgo de desarrollo de enfermedad) es mayor.

Algunos autores sugieren que se realice una nueva determinación de QFT en casos con valores entre 0,2 y hasta 1 ó 1,11 UI/ml [270-272]. En nuestro estudio, ninguno de los dos pacientes con discordancia PT negativa / QFT positiva había recibido tratamiento de ILT (en base a la negatividad de la PT) y a pesar de ello no desarrollaron enfermedad tras dos años de seguimiento (revisión del Registro del Plan Gallego de Tuberculosis). Además, como ya se discutirá más adelante, no se puede descartar de manera definitiva la existencia de un efecto booster de la primera PT sobre el resultado de QFT realizado 8 semanas después [273].

Por otro lado, tampoco es posible distinguir si el resultado positivo de cualquiera de las pruebas realizadas fue debida a infección reciente por el contacto con el enfermo fuente de infección reconocida o por un contacto antiguo no reconocido, especialmente en un contexto como el de nuestra región (Galicia) con una prevalencia histórica de TB elevada para el contexto económico y social [13, 274]. Una vez que los linfocitos se encuentran ya sensibilizados frente a los antígenos de *M. tuberculosis*, estos mantienen permanentemente su capacidad de respuesta frente a los antígenos contenidos en la tuberculina o en los tubos de QFT.

Los estudios que realizaron un seguimiento de la respuesta de los IGRAs al menos a medio plazo, demuestran que esta permanece mayoritariamente positiva incluso tras la

administración de tratamiento específico [275-277]. Sin embargo, debido a que el tiempo de su utilización en la práctica clínica diaria es aún escaso, no existen seguimientos a largo plazo. En nuestro trabajo, **34 pacientes** (22%) tenían antecedentes documentados de PT negativa previa. Son los únicos (además de los pacientes que presentaron conversión), en los que la posibilidad de que la infección hubiera sido transmitida por el caso índice conocido es mayor.

Con posterioridad a la publicación de nuestro estudio, se dio a conocer otro trabajo realizado en Corea del Sur. En este estudio se realizaron QFT seriados a las 2, 4, 8, 14 y 30 semanas del último contacto posible con un enfermo con TB. Al igual que los resultados que obtuvimos en nuestro estudio, se objetivó la existencia de un periodo ventana tras la infección por *M. tuberculosis*. Además, no se detectó ninguna conversión de QFT en las pruebas realizadas a las 30 semanas del contacto con el enfermo [278].

En base a esta publicación y a nuestros resultados, hoy en día es práctica habitual establecer el periodo ventana en los estudios de contactos con IGRAS, de la misma forma que lo que ya estaba establecido anteriormente con la PT: hacia la 8^a semana después de la última exposición posible [279].

6.2. CONCORDANCIA Y ASOCIACIÓN CON EL RIESGO DE INFECCIÓN DE LA PT Y QFT ANTES Y DESPUÉS DEL “PERIODO VENTANA”.

En una segunda fase del estudio, se comparó la concordancia de ambas pruebas (PT y QFT) antes y después del “periodo ventana”. En base a los resultados obtenidos, se demuestra que la correlación entre la PT y QFT en personas sanas con riesgo de infección por *M. tuberculosis* es mayor cuando se tiene en consideración el periodo ventana (es decir, cuando la valoración de la respuesta inmunitaria está ya establecida) y en personas no vacunadas con BCG. Además, tanto la PT como QFT se correlacionan mejor con el riesgo de infección después del periodo ventana que en la primera visita a la Unidad.

Hasta la publicación de nuestro trabajo, numerosos estudios trataron de establecer concordancia entre ambas pruebas. Pero en muchos casos no se especificaba el tiempo transcurrido entre la realización de la prueba y el momento del último contacto, o no estaban adecuadamente controlados [280-284]; en otros casos se esperaba un mínimo de 8 semanas para la realización de la prueba [285-287]. Al igual que lo que hemos encontrado en nuestro trabajo, en estos últimos casos la correlación entre ambas pruebas es buena o incluso excelente.

A nivel práctico, en base a estos resultados, parece prudente mantener la PT como la prueba de elección en el estudio de contactos en personas sanas (especialmente en ausencia de vacunación por BCG), ya que ambas son pruebas comparables y la PT es de menor coste económico.

En este sentido, existen diversos trabajos de coste-efectividad del uso de PT frente al uso de IGRAs o su utilización secuencial, con distintos resultados [147, 167, 288]. Sin embargo, su aplicabilidad depende de múltiples factores, especialmente de la prevalencia local de la enfermedad y de la cobertura vacunal con BCG. Hasta la fecha, en España solo dos estudios han evaluado el uso de las dos pruebas desde el punto de vista de coste-eficacia [157, 289]. Ambos se realizaron entre personal sanitario hospitalario por lo que estimamos que sus resultados no son aplicables a la población general. Si se llegara a demostrar en nuestro medio una mejor o similar ratio de coste-

efectividad, o se considerasen otros aspectos de tipo operacional, estimamos que los IGRAs serían igualmente una alternativa válida a la PT en el estudio de contactos. La necesidad de al menos dos visitas para la realización de la PT, la mayor posibilidad de no conocer el resultado por no acudir a la lectura de la segunda cita, la menor confidencialidad del resultado, la peor reproducibilidad de la PT y la mayor dificultad para la búsqueda de resultados en el historial clínico, son factores que pueden incidir de manera negativa en la práctica clínica diaria en la realización de la técnica de Mantoux.

Al igual que lo descrito por otros autores, encontramos que tanto la PT como QFT se relacionan de manera directa con la intensidad de exposición a la bacteria [290, 291]. En general, son tres los factores que inciden en el riesgo de infección: las características del caso índice (en nuestro caso más del 90% eran bacilíferos), la duración del contacto y el lugar del contacto [292].

En nuestra serie, el resultado definitivamente positivo de ambas pruebas (teniendo en cuenta los dos periodos de realización) se relacionó con el lugar de contacto con el caso índice (mayor probabilidad de prueba positiva cuanto menor el tamaño del lugar de contacto) y con el número de horas compartidas con el enfermo. Este hallazgo es compartido con otros estudios que analizan este aspecto [280, 281, 285], aunque en otros no se ha encontrado especial correlación con el grado de exposición, posiblemente debido a exposiciones previas al bacilo [293].

6.3. VALIDEZ DE LA PRUEBA DE QFT ENTRE PACIENTES EN PROGRAMAS DE HEMODIÁLISIS CON EXPOSICIÓN RECIENTE A M.TUBERCULOSIS.

En esta parte del estudio, estudiamos otro grupo de pacientes con doble riesgo de desarrollo de enfermedad tuberculosa. Se trata de enfermos con insuficiencia renal en fase terminal, lo que por sí mismo es un factor reconocido de riesgo de TB [79, 294, 295]. Además, estos pacientes habían estado en contacto durante un periodo prolongado de tiempo en una sala cerrada con una persona con alta capacidad de contagio [254].

Como ya era conocido con anterioridad incluso a la utilización de los IGRAs, nuestro estudio demuestra **la baja sensibilidad de la PT como marcador de infección tuberculosa** en estos pacientes [296, 297]. Aún en ausencia de un “*gold standard*” que valide esta afirmación, son varios los resultados que hemos encontrado en nuestro estudio que apoyan esta teoría:

1. El alto número de pacientes en los que la PT solo se mostró positiva tras la búsqueda de efecto booster (5,8% de pruebas positivas en la primera determinación y 21,2% dos semanas después).
2. Incluso tras la realización de la segunda prueba cutánea, el número de PT positivas fue menor que las QFT (21,2% frente a 34,6%).
3. El hallazgo inesperado del valor del eritema sin induración: resultado teóricamente negativo pero sugestivo de infección.

La presencia de eritema no es habitualmente valorada a la hora de interpretar la PT según la técnica de Mantoux. Sin embargo, sí que se ha sugerido como posible criterio de positividad en ciertas situaciones [298], incluso existen guías que sí valoran la presencia del eritema en la respuesta frente a los antígenos tuberculínicos [299].

La mayor tasa de resultados positivos tras realizar la segunda inoculación de la tuberculina, indicaría una respuesta inmunitaria celular deficiente inicial [262], lo que ya se ha sugerido que ocurre de forma más significativa en los pacientes con insuficiencia renal terminal [261, 300-302].

La presencia de eritema sin induración en un elevado número de pacientes y la mejor correlación de la PT con QFT si se considera su valor en la interpretación de la PT como positiva, es posiblemente otra manifestación de la respuesta inmunitaria deficiente en este grupo de enfermos [303-305]. La respuesta inmunitaria frente a los antígenos tuberculínicos sería capaz de provocar eritema (evidencia de inflamación local con vasodilatación), pero no induración en estos pacientes inmunodeprimidos. Son muy escasos los estudios que hayan analizado el valor del eritema en la interpretación de la respuesta tuberculínica. En nuestro conocimiento tan solo un estudio realizado entre población estudiantil japonesa encontró correlación del eritema (independientemente de la induración) con el riesgo de infección por *M. tuberculosis* [306].

En nuestro estudio, se podría plantear la posibilidad de que la presencia de una segunda PT positiva se deba a la conversión tras contacto con el enfermo bacilífero en vez de a la presencia de un efecto booster. Sin embargo, estimamos que esto no es así, ya que el tiempo transcurrido desde la última exposición (más de 12 semanas) es superior al tiempo necesario para la conversión tras la infección (el “periodo ventana”), por lo que no se debe atribuir la presencia de una segunda PT positiva a la conversión tras contacto.

Al contrario que lo encontrado en los estudios 1 y 2 realizados entre población sana de contactos de pacientes con tuberculosis, en el brote de la sala de hemodiálisis no se encontró relación de la positividad de las pruebas con los factores de riesgo de infección, con excepción de la presencia de radiografía de tórax sugestiva de enfermedad tuberculosa remota cicatricial. La explicación a este hecho puede ser múltiple: por una parte se trata de enfermos con contacto continuo con el medio hospitalario, lo que hace probable que muchos de ellos hubieran adquirido la infección anteriormente a la exposición (ni QFT ni PT distinguen entre infección reciente o antigua); otra posible explicación estaría basada en la homogeneidad de varias variables de riesgo, ya que la distancia a la fuente de infección, el tiempo de contacto y el lugar del contacto fueron idénticos en la mayor parte de los casos, lo que invalidaría su análisis estadístico.

6.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los estudios realizados presentan algunas limitaciones que deben ser tenidas en consideración.

En los estudios 1 y 2 realizados en el grupo de contactos adultos sanos, no se efectuaron determinaciones seriadas (realización periódica de las pruebas), buscando el momento de la conversión, ya que estaba fuera del alcance de los objetivos planteados.

Es muy difícil en la práctica determinar el momento preciso de la infección, especialmente en aquellos pacientes con PT y/o IGRA positivo en la primera visita. Esta respuesta inicial podría deberse bien a una infección antigua no conocida ni detectada, o bien a la exposición reciente en las semanas anteriores, pero ya con tiempo suficiente para que la prueba sea positiva en la primera visita. El tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas (o la capacidad de contagio) y el diagnóstico, es frecuentemente de varios meses de duración [242, 243]. Esta limitación es inherente a la mayor parte de estudios “sobre el terreno” de contactos, con la posible excepción de los escasos trabajos en los que el momento de la infección esté bien determinado por la existencia de una exposición única bien definida como ocurre en casos de vuelos en avión o en otro medio de transporte [307].

En la práctica clínica, ante una prueba positiva en la primera visita durante un estudio de contactos, se debe considerar en principio la posibilidad de infección reciente y por tanto un mayor riesgo que el paciente tiene de enfermar

Otra limitación de los estudios 1 y 2 es el posible efecto de inmunización o booster que puede ejercer la introducción de antígenos de tuberculina en la PT sobre el test QFT, incrementando así el porcentaje de contactos positivos para esta segunda prueba. Algunos estudios han encontrado que los antígenos del PPD contenidos en la tuberculina serían capaces de inducir cierto grado de respuesta linfocitaria al estímulo antigénico posterior en los IGRAs, si estos se realizan unas semanas después [273, 308, 309]. Sin embargo, otros autores no han observado este efecto [310]. La ausencia de adyuvantes en la PT hace de todas formas que esta prueba no sea capaz de generar una potente respuesta inmunitaria, sino que su efecto inmunizante lo llevaría a cabo

activando a las células T memoria, y no a iniciar una respuesta activa en linfocitos no previamente sensibilizados.

En cualquier caso, este hecho podría ser especialmente significativo en los dos pacientes con discordancia PT negativa / QFT positivo en las segundas pruebas, especialmente teniendo en cuenta los bajos niveles encontrados con QFT, próximos al punto de corte establecido por el fabricante. Desde un punto de vista teórico, el QFT podría no ser válido como marcador de infección reciente por *M. tuberculosis* en estas situaciones. Para evitar esta posible confusión, se recomienda la realización del IGRA simultáneamente a la PT o bien inmediatamente después de la lectura de la PT (a las 48-72 horas), ya que el efecto de la posible inmunización no tendría lugar durante en este corto periodo de tiempo [311].

Por último, cabe considerar la posibilidad de que los pacientes que presentaron conversión de QFT y que ya tenían PT positiva inicial, no se deba a que el cambio sea más precoz en la PT, sino que podría deberse al efecto booster de una anterior PT y/o por vacunación con BCG. Efectivamente, la prueba inicial positiva de PT se relacionaba tras el análisis multivariante con la realización de una PT previa (que por definición era negativa), lo que podría ser indicativo de una infección antigua solo detectada con una segunda PT [262]. Por otra parte, una PT positiva inicial se relaciona también con los antecedentes de vacunación con BCG de una forma cercana a la significación estadística ($p=0,056$), lo que sería sugestivo también de un posible "falso positivo" de la prueba.

El estudio 3 presenta también limitaciones que deben tenerse en consideración. La primera es inherente a todos los estudios que comparan ambas pruebas para el diagnóstico de ILT. En ausencia de un método "*gold standard*" que defina con certeza la presencia o no de ILT, no es posible delimitar con seguridad si el resultado de las pruebas se corresponde con una verdadera ILT, o si por el contrario se trata de resultados falsamente positivos o negativos.

Existen distintos métodos que intentan solventar este problema: comparación del resultado del IGRA con la prueba la PT que es la prueba previamente establecida; correlación con el riesgo de infección, o incluso el resultado de ambas pruebas ante ciertos casos de infección en enfermos con confirmación microbiológica. Pero todos ellos no son más que medidas indirectas de aproximación diagnóstica a la ILT.

Sin embargo, como ya se ha señalado, es un hecho conocido que la PT no es un buen marcador de ILT en enfermos en programa de diálisis [296, 297]. Por otra parte, cada vez es mayor la evidencia del valor de los IGRAs como marcador de riesgo de progresión a enfermedad, o más aún, su alto valor predictivo negativo que en numerosos estudios se aproximan al 100%, incluso en situaciones con inmunidad comprometida [184, 312-314].

El escaso número de pacientes incluidos en el estudio es otra limitación en la interpretación de los resultados. En este sentido, sería deseable un mayor número de estudios que validen nuestros hallazgos, especialmente en lo referente al valor diagnóstico de la presencia de eritema sin induración en estos pacientes.

Y por último, se debe tener en cuenta que se analizó únicamente uno de los dos IGRAs comercializados. Algunos autores han estudiado el valor de T-SPOT.TB® en pacientes con insuficiencia renal, encontrando tasas más altas de resultados positivos, sugestivo que esta técnica diagnóstica tendría mayor sensibilidad [315]. Sin embargo en los estudios realizados por otros grupos, no se encontraron estas diferencias [316, 317].

7. CONCLUSIONES

Estudio 1. Estudio de la existencia de un periodo ventana con QFT

1. En el estudio prospectivo de contactos con pacientes enfermos de tuberculosis se constata la presencia de conversiones de QFT ocho semanas después de una primera prueba inicial negativa. **Se demuestra por vez primera la existencia de un “periodo ventana” de conversión de QFT tras exposición reciente a *M. tuberculosis*.**
2. En la mayor parte de los casos, el **periodo ventana es más corto o similar al de la PT**. Sin embargo, al existir el “periodo ventana” tanto en la PT como en QFT, **este se debe tomar en consideración al realizar estudios de contactos cuando la primera prueba, bien la PT o bien las nuevas pruebas de IGRA, sea negativa.**

Estudio 2. Comparación de la concordancia entre PT y QFT y su correlación con factores de riesgo de infección por *M. tuberculosis* antes y después del “periodo ventana”

1. La concordancia entre las dos pruebas PT y QFT mejora tras considerar el “periodo ventana”. De este hecho se deduce que **PT y QFT tienen una validez similar para el diagnóstico de infección latente tuberculosa en contactos sanos con riesgo de infección por *M. tuberculosis***. Esta afirmación es **especialmente cierta en personas no vacunadas con BCG**, donde la correlación entre ambas pruebas es excelente.
2. La correlación de PT y QFT con los factores de riesgo de infección por *M. tuberculosis* también mejora tras considerar el “periodo ventana”. **De este hecho se deduce que con ambas pruebas debe tenerse en consideración que haya transcurrido al menos 8 semanas tras la última posible exposición a la bacteria, para descartar así la adquisición de infección reciente.**
3. En ausencia de estudios de coste-eficacia o de tipo operacional que avalen el uso único o secuencial de los IGRAs en los estudios de contactos en nuestro medio, **la PT parece adecuada que continúe siendo el método**

diagnóstico de elección para descartar infección latente tuberculosa, especialmente en pacientes no vacunados con BCG.

Estudio 3. Diagnóstico de infección tuberculosa en pacientes en hemodiálisis expuestos a *M. tuberculosis*

1. La menor prevalencia de resultados con PT positivos respecto a QFT, incluso tras la realización de un booster, es sugestiva de menor sensibilidad de la PT en pacientes con insuficiencia renal terminal expuestos a un enfermo con TB con capacidad infecciosa. **La QFT debe ser el método de referencia para el diagnóstico de infección tuberculosa en estos pacientes, al menos si el resultado de la PT es negativo.**
2. La concordancia de PT con QFT es mejor si se tiene en cuenta el eritema al valorar la respuesta cutánea al PPD. **El eritema en ausencia de induración en estos pacientes puede ser también indicativo de infección tuberculosa.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:1536-41.
2. Hansen N, Seiler C, Rumpf J, et al. Human tuberculous meningitis caused by *Mycobacterium caprae*. *Case Rep Neurol* 2012; 4:54-60.
3. González-Martín J. Microbiología de la tuberculosis. Seminarios de la Fundación Española de Reumatología 2014; 15:25-33.
4. Global tuberculosis report 2014; WHO/HTM/TB/2014.08. Vol. WHO/HTM/TB/2014.08. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2014.
5. Caylà JA, Caminero JA, Ancochea J. Tuberculosis y solidaridad. *Arch Bronconeumol* 2008; 44:657-9.
6. Criado-Alvarez JJ, Sanz Cortés J. El consumo de pirazinamida como indicador de la situación epidemiológica de la tuberculosis en Castilla-La Mancha. *Rev Clin Esp* 2004; 204:298-302.
7. Yuguero O, Serna MC, Real J, Galván L, Riu P, Godoy P. Cumplimiento terapéutico para determinar la infranotificación de tuberculosis en una región sanitaria durante los años 2007-2009. *Aten Primaria* 2012; 44:703-8.
8. García Rodríguez JF, de Juan Prego J, Vázquez Castro J. ¿Cuántos casos de tuberculosis no son declarados? *Med Clin (Barc)* 1994; 103:490-3.
9. Múñiz-González F, Guerra-Laso J, García-García S, et al. Aproximación a la incidencia real de tuberculosis en el Área de Salud de León: aplicación del método captura-recaptura para comparar 2 fuentes de información. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:82-7.
10. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2014. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2014.

11. Rodrigo T, Cayla JA. Efectividad de los programas de control de tuberculosis en España. *Med Clin (Barc)* 2003; 121:375-8.
12. Informe da tuberculose en Galicia. Evaluación do periodo 1996-2013. Xunta de Galicia. Consellería de Sanidade, 2014.
13. Cruz-Ferro E, Ursúa-Díaz MI, Taboada-Rodríguez JA, et al. Epidemiology of tuberculosis in Galicia, Spain, 16 years after the launch of the Galician tuberculosis programme. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:134-40.
14. Grange JM. The genus *Mycobacterium* and the *Mycobacterium tuberculosis* complex. In: Schaaf HS ZA, Zumla A. ed. *Tuberculosis A comprehensive clinical reference*: Elsevier Inc, 2009; 44-59.
15. Assam Assam JP, Penlap Beng V, Cho-Ngwa F, et al. *Mycobacterium tuberculosis* is the causative agent of tuberculosis in the southern ecological zones of Cameroon, as shown by genetic analysis. *BMC Infect Dis* 2013; 13:431
16. Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, et al. Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. *Tuberculosis (Edinb)* 2014; 94:15-9.
17. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. *Mycobacterium africanum*--review of an important cause of human tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4:e744.
18. FitzGerald D, Sterling T, Hass D. *Mycobacterium tuberculosis*. In: Mandell, Douglas, Bennett, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed: Churchill Livingstone, Elsevier, 2010:3129-63.
19. Dhanashekar R, Akkinapalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germs*. Vol. 2, 2012:101-9.
20. Angus BJ, Yates M, Conlon C, Byren I. Cutaneous tuberculosis of the penis and sexual transmission of tuberculosis confirmed by molecular typing. *Clin Infect Dis* 2001; 33:E132-4.

21. Lienhardt C. From exposure to disease: the role of environmental factors in susceptibility to and development of tuberculosis. *Epidemiol Rev* 2001; 23:288-301.
22. Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003; 362:887-99.
23. Hill P, Brookes R, Fox A, et al. Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis* 2004; 38:966-73.
24. Ewer K, Millington K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A. Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:831-9.
25. Verrall AJ, Netea MG, Alisjahbana B, Hill PC, van Crevel R. Early clearance of *Mycobacterium tuberculosis*: a new frontier in prevention. *Immunology* 2014; 141:506-13.
26. Hernandez-Pando R, Orozco H, Aguilar D. Factors that deregulate the protective immune response in tuberculosis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2009; 57:355-67.
27. Armstrong JA, Hart PD. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* 1971; 134:713-40.
28. Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 1975; 142:1-16.
29. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994; 263:678-81.

30. Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 1998; 160:1290-6.
31. Yuan Y, Lee RE, Besra GS, Belisle JT, Barry CE. Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:6630-4.
32. Philips JA. Mycobacterial manipulation of vacuolar sorting. *Cell Microbiol* 2008; 10:2408-15.
33. Sun J, Wang X, Lau A, Liao TY, Bucci C, Hmama Z. Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages. *PLoS One* 2010; 5:e8769.
34. Chee CB, Sester M, Zhang W, Lange C. Diagnosis and treatment of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Respirology* 2013; 18:205-16.
35. Cardona PJ. A dynamic reinfection hypothesis of latent tuberculosis infection. *Infection* 2009; 37:80-6.
36. Salgame P, Geadas C, Collins L, Jones-López E, Ellner JJ. Latent tuberculosis infection - Revisiting and revising concepts. *Tuberculosis (Edinb)* 2015; 95:373-84.
37. Cardona PJ, Ivanyi J. The secret trumps, impelling the pathogenicity of tubercle bacilli. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 Suppl 1:14-9.
38. Achkar JM, Jenny-Avital ER. Incipient and subclinical tuberculosis: defining early disease states in the context of host immune response. *J Infect Dis* 2011; 204 Suppl 4:S1179-86.
39. Esmail H, Barry CE, 3rd, Wilkinson RJ. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. *Drug Discov Today* 2012; 17:514-21.

40. Wilkinson RJ. Human genetic susceptibility to tuberculosis: time for a bottom-up approach? *J Infect Dis* 2012; 205:525-7.
41. Horne DJ, Randhawa AK, Chau TT, et al. Common polymorphisms in the PKP3-SIGIRR-TMEM16J gene region are associated with susceptibility to tuberculosis. *J Infect Dis* 2012; 205:586-94.
42. Ribeiro SC, Gomes LL, Amaral EP, et al. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2615-24.
43. Di Pietrantonio T, Schurr E. Host-pathogen specificity in tuberculosis. *Adv Exp Med Biol* 2013; 783:33-44.
44. O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MP. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:475-527.
45. Zhao J, Lin G, Zhang WH, Ge M, Zhang Y. Contribution of CD14-159C/T polymorphism to tuberculosis susceptibility: a meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013; 17:1472-8.
46. Meyer CG, Thye T. Host genetic studies in adult pulmonary tuberculosis. *Semin Immunol* 2014; 26:445-53.
47. Meraviglia S, El Daker S, Dieli F, Martini F, Martino A. $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011:587315.
48. Smith I. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:463-96.
49. Brown M, Miiro G, Nkurunziza P, et al. Schistosoma mansoni, nematode infections, and progression to active tuberculosis among HIV-1-infected Ugandans. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 74:819-25.

50. Chatterjee S, Kolappan C, Subramani R, et al. Incidence of active pulmonary tuberculosis in patients with coincident filarial and/or intestinal helminth infections followed longitudinally in South India. *PLoS One* 2014; 9:e94603.
51. Havlir DV, Ellner JJ, Chervenak KA, Boom WH. Selective expansion of human gamma delta T cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 1991; 87:729-33.
52. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; 282:121-5.
53. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Modlin RL. CTL-mediated killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol* 2000; 165:5773-9.
54. Orme IM, Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin Immunol* 2014; 26:601-9.
55. Young DB, Gideon HP, Wilkinson RJ. Eliminating latent tuberculosis. *Trends Microbiol* 2009; 17:183-8.
56. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:845-55.
57. Pai M. Spectrum of latent tuberculosis - existing tests cannot resolve the underlying phenotypes. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8:242; author reply
58. Salgado E, Gómez-Reino JJ. The risk of tuberculosis in patients treated with TNF antagonists. *Expert Rev Clin Immunol* 2011; 7:329-40.
59. Winthrop KL. Risk and prevention of tuberculosis and other serious opportunistic infections associated with the inhibition of tumor necrosis factor. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:602-10.
60. Narasimhan P, Wood J, Macintyre CR, Mathai D. Risk factors for tuberculosis. *Pulm Med* 2013; 2013:828939.

61. Gengenbacher M, Kaufmann SH. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev* 2012; 36:514-32.
62. Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med* 2013; 368:745-55.
63. Corbett EL, Watt CJ, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* 2003; 163:1009-21.
64. Caminero JA. A Tuberculosis Guide for Specialist Physicians. International Union against Tuberculosis and Lung Disease, 2003.
65. Yew WW, Lange C, Leung CC. Treatment of tuberculosis: update 2010. *Eur Respir J* 2011; 37:441-62.
66. Lobue P, Menzies D. Treatment of latent tuberculosis infection: An update. *Respirology* 2010; 15:603-22.
67. Collins KR, Quiñones-Mateu ME, Toossi Z, Arts EJ. Impact of tuberculosis on HIV-1 replication, diversity, and disease progression. *AIDS Rev* 2002; 4:165-76.
68. Badri M, Ehrlich R, Wood R, Pulerwitz T, Maartens G. Association between tuberculosis and HIV disease progression in a high tuberculosis prevalence area. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5:225-32.
69. Gómez-Reino JJ, Carmona L, Angel Descalzo M, Group B. Risk of tuberculosis in patients treated with tumor necrosis factor antagonists due to incomplete prevention of reactivation of latent infection. *Arthritis Rheum* 2007; 57:756-61.
70. Bumbacea D, Arend SM, Eyuboglu F, et al. The risk of tuberculosis in transplant candidates and recipients: a TBNET consensus statement. *Eur Respir J* 2012; 40:990-1013.

71. Cegielski JP, McMurray DN. The relationship between malnutrition and tuberculosis: evidence from studies in humans and experimental animals. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:286-98.
72. Chandra RK. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr* 1997; 66:460S-3S.
73. Baker MA, Lin HH, Chang HY, Murray MB. The risk of tuberculosis disease among persons with diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2012; 54:818-25.
74. Faurholt-Jepsen D, Range N, Praygod G, et al. Diabetes is a risk factor for pulmonary tuberculosis: a case-control study from Mwanza, Tanzania. *PLoS One* 2011; 6:e24215.
75. Kuo MC, Lin SH, Lin CH, Mao IC, Chang SJ, Hsieh MC. Type 2 diabetes: an independent risk factor for tuberculosis: a nationwide population-based study. *PLoS One* 2013; 8:e78924.
76. García-Leoni ME, Martín-Scapa C, Rodeño P, Valderrábano F, Moreno S, Bouza E. High incidence of tuberculosis in renal patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990; 9:283-5.
77. Sasaki S, Akiba T, Suenaga M, et al. Ten years' survey of dialysis-associated tuberculosis. *Nephron* 1979; 24:141-5.
78. Sen N, Turunc T, Karatasli M, Sezer S, Demiroglu YZ, Oner Eyuboglu F. Tuberculosis in patients with end-stage renal disease undergoing dialysis in an endemic region of Turkey. *Transplant Proc* 2008; 40:81-4.
79. Dobler CC, McDonald SP, Marks GB. Risk of tuberculosis in dialysis patients: a nationwide cohort study. *PLoS One* 2011; 6:e29563.
80. Chen CY, Sheng WH, Cheng A, et al. Clinical characteristics and outcomes of *Mycobacterium tuberculosis* disease in adult patients with hematological malignancies. *BMC Infect Dis* 2011; 11:324.

81. Kamboj M, Sepkowitz KA. The risk of tuberculosis in patients with cancer. *Clin Infect Dis*. Vol. 42. United States, 2006:1592-5.
82. Kaplan MH, Armstrong D, Rosen P. Tuberculosis complicating neoplastic disease. A review of 201 cases. *Cancer* 1974; 33:850-8.
83. Wu CY, Hu HY, Pu CY, et al. Aerodigestive tract, lung and haematological cancers are risk factors for tuberculosis: an 8-year population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:125-30.
84. Shang S, Ordway D, Henao-Tamayo M, et al. Cigarette smoke increases susceptibility to tuberculosis--evidence from *in vivo* and *in vitro* models. *J Infect Dis* 2011; 203:1240-8.
85. Yen YF, Yen MY, Lin YS, et al. Smoking increases risk of recurrence after successful anti-tuberculosis treatment: a population-based study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:492-8.
86. Nijenbandring de Boer R, Oliveira e Souza Filho JB, Cobelens F, et al. Delayed culture conversion due to cigarette smoking in active pulmonary tuberculosis patients. *Tuberculosis (Edinb)* 2014; 94:87-91.
87. Lönnroth K, Williams BG, Stadlin S, Jaramillo E, Dye C. Alcohol use as a risk factor for tuberculosis - a systematic review. *BCM Public Health* 2008; 8:289.
88. Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet* 2012; 379:2008-18.
89. Ludvigsson JF, Wahlstrom J, Grunewald J, Ekbohm A, Montgomery SM. Coeliac disease and risk of tuberculosis: a population based cohort study. *Thorax* 2007; 62:23-8.
90. Ludvigsson JF, Sanders DS, Maeurer M, Jonsson J, Grunewald J, Wahlstrom J. Risk of tuberculosis in a large sample of patients with coeliac disease--a nationwide cohort study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 33:689-96.

91. Anibarro L, Lires J, Iglesias F, et al. Factores sociales de riesgo para la falta de cumplimiento terapéutico en pacientes con tuberculosis en Pontevedra. *Gac Sanit* 2004; 18:38-44.
92. Lönnroth K, Jaramillo E, Williams BG, Dye C, Raviglione M. Drivers of tuberculosis epidemics: the role of risk factors and social determinants. *Soc Sci Med* 2009; 68:2240-6.
93. O'Grady J, Maeurer M, Atun R, et al. Tuberculosis in prisons: anatomy of global neglect. *Eur Respir J*. 2011; 38:752-4.
94. Pesqueira P, Ros A, Paz J, Santos F, López-Monteagudo MT, Anibarro L. Elevada incidencia de tuberculosis en marineros de altura. *Medicina Marítima* 2007; 7:50-3.
95. Rodríguez S, Sande D, Lamelo MC, Pazos RA, Paz J, Vilariño C, Anibarro L. Influencia de la inmigración en la incidencia de tuberculosis en un área con bajas tasas de inmigración y alta prevalencia de enfermedad. *Pneuma* 2008; 10:4-9.
96. Sandgren A, Schepisi MS, Sotgiu G, et al. Tuberculosis transmission between foreign and native-born populations in the EU/EEA: a systematic review. *Eur Respir J* 2014; 43:1159-71.
97. García-García JM, Blanquer R, Rodrigo T, et al. Social, clinical and microbiological differential characteristics of tuberculosis among immigrants in Spain. *PLoS One* 2011; 6:e16272.
98. Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, McAdam KP, Whittle HC, Hill AV. Variations in the NRAMP1 gene and susceptibility to tuberculosis in West Africans. *N Engl J Med* 1998; 338:640-4.
99. Yim JJ, Selvaraj P. Genetic susceptibility in tuberculosis. *Respirology*. Vol. 15. Australia, 2010:241-56.

100. Li X, Yang Y, Zhou F, et al. SLC11A1 (NRAMP1) polymorphisms and tuberculosis susceptibility: updated systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6:e15831.
101. Meilang Q, Zhang Y, Zhang J, et al. Polymorphisms in the SLC11A1 gene and tuberculosis risk: a meta-analysis update. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012; 16:437-46.
102. de Albuquerque AC, Rocha LQ, de Moraes Batista AH, Teixeira AB, Dos Santos DB, Nogueira NA. Association of polymorphism +874 A/T of interferon-gamma and susceptibility to the development of tuberculosis: meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:2887-95.
103. Pedraza-Sánchez S, Herrera-Barrios M, Aldana-Vergara R, et al. Bacille Calmette-Guérin infection and disease with fatal outcome associated with a point mutation in the interleukin-12/interleukin-23 receptor beta-1 chain in two Mexican families. *Int J Infect Dis* 2010; 14 Suppl 3:e256-60.
104. Filipe-Santos O, Bustamante J, Chapgier A, et al. Inborn errors of IL-12/23- and IFN-gamma-mediated immunity: molecular, cellular, and clinical features. *Semin Immunol* 2006; 18:347-61.
105. Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis* 2007; 196 Suppl 1:S15-27.
106. Aliyu G, El-Kamary SS, Abimiku A, et al. Prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections among tuberculosis suspects in Nigeria. *PLoS One* 2013; 8:e63170.
107. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: Updated Clinical Review and Experience at a Tertiary Center. *Infection* 2010; 38:89-97.
108. Menzies D. Issues in the management of contacts of patients with active pulmonary tuberculosis. *Can J Public Health* 1997; 88:197-201.

109. Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:1320-30.
110. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010; 363:1005-15.
111. Lawn SD. Diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2013; 19:280-8.
112. Chang K, Lu W, Wang J, et al. Rapid and effective diagnosis of tuberculosis and rifampicin resistance with Xpert MTB/RIF assay: a meta-analysis. *J Infect* 2012; 64:580-8.
113. Muñoz L, Moure R, Porta N, et al. GeneXpert® for smear-negative pulmonary tuberculosis: does it play a role in low-burden countries? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75:325-6.
114. Peter JG, Theron G, van Zyl-Smit R, et al. Diagnostic accuracy of a urine lipoarabinomannan strip-test for TB detection in HIV-infected hospitalised patients. *Eur Respir J* 2012; 40:1211-20.
115. Lawn SD, Dheda K, Kerkhoff AD, et al. Determine TB-LAM lateral flow urine antigen assay for HIV-associated tuberculosis: recommendations on the design and reporting of clinical studies. *BMC Infect Dis* 2013; 13:407.
116. Drain PK, Losina E, Coleman SM, et al. Diagnostic accuracy of a point-of-care urine test for tuberculosis screening among newly-diagnosed HIV-infected adults: a prospective, clinic-based study. *BMC Infect Dis* 2014; 14:110.
117. Achkar JM, Chen J, Casadevall A. B cells and antibodies in the defense against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Rev* 2015; 264:167-81.
118. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis. Vol. WHO/HTM/TB/2011.5. World Health Organization, 2011.

119. Aggerbeck H, Giemza R, Joshi P, et al. Randomised clinical trial investigating the specificity of a novel skin test (C-Tb) for diagnosis of *M. tuberculosis* infection. *PLoS One* 2013; 8:e64215.
120. Kassa D, Ran L, Geberemeskel W, et al. Analysis of immune responses against a wide range of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2012; 19:1907-15.
121. Sutherland JS, Lalor MK, Black GF, et al. Analysis of host responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens in a multi-site study of subjects with different TB and HIV infection states in sub-Saharan Africa. *PLoS One* 2013; 8:e74080.
122. Wang S, Chen J, Zhang Y, et al. *Mycobacterium tuberculosis* region of difference (RD) 2 antigen Rv1985c and RD11 antigen Rv3425 have the promising potential to distinguish patients with active tuberculosis from *M. bovis* BCG-vaccinated individuals. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:69-76.
123. Chen J, Wang S, Zhang Y, et al. Rv1985c, a promising novel antigen for diagnosis of tuberculosis infection from BCG-vaccinated controls. *BMC Infect Dis* 2010; 10:273.
124. Goletti D, Butera O, Vanini V, et al. Response to Rv2628 latency antigen associates with cured tuberculosis and remote infection. *Eur Respir J* 2010; 36:135-42.
125. Sarkar P, Biswas D, Sindhwani G, Rawat J, Kotwal A, Kakati B. Application of lipoarabinomannan antigen in tuberculosis diagnostics: current evidence. *Postgrad Med J* 2014; 90:155-63.
126. Julián E, Matas L, Ausina V, Luquin M. Detection of lipoarabinomannan antibodies in patients with newly acquired tuberculosis and patients with relapse tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2663-4.

127. Serra-Vidal MM, Latorre I, Franken KL, et al. Immunogenicity of 60 novel latency-related antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Microbiol* 2014; 5:517.
128. Singh S, Saraav I, Sharma S. Immunogenic potential of latency associated antigens against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2014; 32:712-6.
129. Snider DE. The tuberculin skin test. *Am Rev Respir Dis* 1982; 125:108-18.
130. Mount FW, Ferebee SH. Preventive effects of isoniazid in the treatment of primary tuberculosis in children. *N Engl J Med* 1961; 265:713-21.
131. Ferebee SH, Mount FW, Murray FJ, Livesay VT. A Controlled trial of Isoniazid prophylaxis in mental institutions. *Am Rev Respir Dis* 1963; 88:161-75.
132. Comstock GW, Ferebee SH, Hammes LM. A controlled trial of community-wide isoniazid prophylaxis in Alaska. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95:935-43.
133. Sokal JE. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med* 1975; 293:501-2.
134. Huebner R, Schein M, Bass JJ. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993; 17:968-75.
135. Sester M, Sester U, Clauer P, et al. Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004; 65:1826-34.
136. González-Martín J, García-García J, Anibarro L, et al. Documento de consenso sobre el diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:297.e1-20.
137. 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; 10:1192-204.

138. Tissot F, Zanetti G, Francioli P, Zellweger JP, Zysset F. Influence of bacille Calmette-Guérin vaccination on size of tuberculin skin test reaction: to what size? *Clin Infect Dis* 2005; 40:211-7.
139. Arend SM, Franken WP, Aggerbeck H, et al. Double-blind randomized Phase I study comparing rdESAT-6 to tuberculin as skin test reagent in the diagnosis of tuberculosis infection. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88:249-61.
140. Sun QF, Xu M, Wu JG, et al. Efficacy and safety of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a phase II trial. *Med Sci Monit* 2013; 19:969-77.
141. Samandari T, Agizew TB, Nyirenda S, et al. 6-month versus 36-month isoniazid preventive treatment for tuberculosis in adults with HIV infection in Botswana: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2011; 377:1588-98.
142. Comstock G, Livesay V, Woolpert S. The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. *Am J Epidemiol* 1974; 99:131-8.
143. Pai M, Riley LW, Colford JM. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:761-76.
144. Muñoz L, Stagg HR, Abubakar I. Diagnosis and Management of Latent Tuberculosis Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015. Jun 8. pii: a017830. doi: 10.1101/cshperspect.a017830.
145. Thillai M, Pollock K, Pareek M, Lalvani A. Interferon-gamma release assays for tuberculosis: current and future applications. *Expert Rev Respir Med* 2014; 8:67-78.
146. Diel R, Nienhaus A, Loddenkemper R. Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay screening for latent tuberculosis infection treatment in Germany. *Chest* 2007; 131:1424-34.

147. Oxlade O, Schwartzman K, Menzies D. Interferon-gamma release assays and TB screening in high-income countries: a cost-effectiveness analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11:16-26.
148. Marra F, Marra CA, Sadatsafavi M, et al. Cost-effectiveness of a new interferon-based blood assay, QuantiFERON-TB Gold, in screening tuberculosis contacts. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008; 12:1414-24.
149. Burgos J, Kahn J, Strathdee S, et al. Targeted screening and treatment for latent tuberculosis infection using QuantiFERON-TB Gold is cost-effective in Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:962-8.
150. de Perio MA, Tsevat J, Roselle GA, Kralovic SM, Eckman MH. Cost-effectiveness of interferon gamma release assays vs tuberculin skin tests in health care workers. *Arch Intern Med* 2009; 169:179-87.
151. Deuffic-Burban S, Atsou K, Viget N, Melliez H, Bouvet E, Yazdanpanah Y. Cost-effectiveness of QuantiFERON-TB test vs. tuberculin skin test in the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:471-81.
152. Hardy AB, Varma R, Collyns T, Moffitt SJ, Mullarkey C, Watson JP. Cost-effectiveness of the NICE guidelines for screening for latent tuberculosis infection: the QuantiFERON-TB Gold IGRA alone is more cost-effective for immigrants from high burden countries. *Thorax* 2010; 65:178-80.
153. Kowada A, Deshpande GA, Takahashi O, Shimbo T, Fukui T. Cost effectiveness of interferon-gamma release assay versus chest X-ray for tuberculosis screening of BCG-vaccinated elderly populations. *Mol Diagn Ther* 2010; 14:229-36.
154. Pooran A, Booth H, Miller R, et al. Different screening strategies (single or dual) for the diagnosis of suspected latent tuberculosis: a cost effectiveness analysis. *BMC Pulm Med* 2010; 10:7.

155. Kowada A. Cost effectiveness of interferon-gamma release assay for tuberculosis screening of rheumatoid arthritis patients prior to initiation of tumor necrosis factor- α antagonist therapy. *Mol Diagn Ther* 2010; 14:367-73.
156. Linas BP, Wong AY, Freedberg KA, Horsburgh CR. Priorities for screening and treatment of latent tuberculosis infection in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:590-601.
157. del Campo MT, Fouad H, Solís-Bravo MM, Sánchez-Uriz MA, Mahillo-Fernández I, Esteban J. Cost-effectiveness of different screening strategies (single or dual) for the diagnosis of tuberculosis infection in healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33:1226-34.
158. Kowada A. Cost effectiveness of interferon-gamma release assay for school-based tuberculosis screening. *Mol Diagn Ther* 2012; 16:181-90.
159. Mandalakas AM, Hesselning AC, Gie RP, Schaaf HS, Marais BJ, Sinanovic E. Modelling the cost-effectiveness of strategies to prevent tuberculosis in child contacts in a high-burden setting. *Thorax* 2013; 68:247-55.
160. Pareek M, Bond M, Shorey J, et al. Community-based evaluation of immigrant tuberculosis screening using interferon γ release assays and tuberculin skin testing: observational study and economic analysis. *Thorax* 2013; 68:230-9.
161. Shah M, Miele K, Choi H, et al. QuantiFERON-TB gold in-tube implementation for latent tuberculosis diagnosis in a public health clinic: a cost-effectiveness analysis. *BMC Infect Dis* 2012; 12:360.
162. Kowada A. Cost effectiveness of the interferon- γ release assay for tuberculosis screening of hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:682-8.
163. Kowada A. Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay for entry tuberculosis screening in prisons. *Epidemiol Infect* 2013; 141:2224-34.

164. Kowada A. Cost effectiveness of interferon- γ release assay for TB screening of HIV positive pregnant women in low TB incidence countries. *J Infect* 2014; 68:32-42.
165. Laskin BL, Goebel J, Starke JR, Schauer DP, Eckman MH. Cost-effectiveness of latent tuberculosis screening before steroid therapy for idiopathic nephrotic syndrome in children. *Am J Kidney Dis* 2013; 61:22-32.
166. Oxlade O, Pinto M, Trajman A, Menzies D. How methodologic differences affect results of economic analyses: a systematic review of interferon gamma release assays for the diagnosis of LTBI. *PLoS One* 2013; 8:e56044.
167. Steffen RE, Caetano R, Pinto M, et al. Cost-effectiveness of Quantiferon®-TB Gold-in-Tube versus tuberculin skin testing for contact screening and treatment of latent tuberculosis infection in Brazil. *PLoS One* 2013; 8:e59546.
168. Swaminath A, Bhadelia N, Wang YC. Cost-effectiveness of QuantiFERON testing before initiation of biological therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:2444-9.
169. Greveson K, Goodhand J, Capocci S, et al. Yield and cost effectiveness of mycobacterial infection detection using a simple IGRA-based protocol in UK subjects with inflammatory bowel disease suitable for anti-TNF α therapy. *J Crohns Colitis* 2013; 7:412-8.
170. Capocci S, Smith C, Morris S, et al. Decreasing cost effectiveness of testing for latent TB in HIV in a low TB incidence area. *Eur Respir J* 2015; 46:165-74.
171. Converse PJ, Jones SL, Astemborski J, Vlahov D, Graham NM. Comparison of a tuberculin interferon-gamma assay with the tuberculin skin test in high-risk adults: effect of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997; 176:144-50.
172. Desem N, Jones SL. Development of a human gamma interferon enzyme immunoassay and comparison with tuberculin skin testing for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:531-6.

173. Pai M, Menzies D. Interferon-gamma release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis? *Clin Infect Dis* 2007; 44:74-7.
174. Menzies D. Using tests for latent tuberculous infection to diagnose active tuberculosis: can we eat our cake and have it too? *Ann Intern Med* 2008; 148:398-9.
175. Kwon YS, Kim YH, Jeon K, et al. Factors that Predict Negative Results of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Test in Patients with Culture-Confirmed Tuberculosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *PLoS One* 2015; 10:e0129792.
176. Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011; 37:100-11.
177. Machingaidze S, Wiysonge CS, Gonzalez-Angulo Y, 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; 30:694-700.
178. Talati NJ, Seybold U, Humphrey B, et al. Poor concordance between interferon-gamma release assays and tuberculin skin tests in diagnosis of latent tuberculosis infection among HIV-infected individuals. *BMC Infect Dis* 2009; 9:15.
179. Wolf T, Goetsch U, Oremek G, et al. Tuberculosis skin test, but not interferon- γ -releasing assays is affected by BCG vaccination in HIV patients. *J Infect* 2013; 66:376-80.
180. Tsolia MN, Mavrikou M, Critselis E, et al. Whole blood interferon- γ release assay is a useful tool for the diagnosis of tuberculosis infection particularly among Bacille Calmette Guèrin-vaccinated children. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29:1137-40.

181. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Clin Microbiol Rev* 2014; 27:3-20.
182. Haldar P, Thuraisingam H, Patel H, et al. Single-step QuantiFERON screening of adult contacts: a prospective cohort study of tuberculosis risk. *Thorax* 2013; 68:240-6.
183. Rangaka MX, Wilkinson KA, Glynn JR, et al. Predictive value of interferon- γ release assays for incident active tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2012; 12:45-55.
184. Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Predictive value of interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for progression from latent TB infection to disease state: a meta-analysis. *Chest* 2012; 142:63-75.
185. Muñoz L, Santin M. Interferon- γ release assays versus tuberculin skin test for targeting people for tuberculosis preventive treatment: an evidence-based review. *J Infect* 2013; 66:381-7.
186. 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; 177:1164-70.
187. Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2002; 40:704-6.
188. Higuchi K, Harada N, Fukazawa K, Mori T. Relationship between whole-blood interferon-gamma responses and the risk of active tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2008; 88:244-8.
189. Mitchison DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1979; 76:771-81.

190. Hall RG, Leff RD, Gumbo T. Treatment of active pulmonary tuberculosis in adults: current standards and recent advances. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 2009; 29:1468-81.
191. Mitchison DA. Role of individual drugs in the chemotherapy of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:796-806.
192. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7:6-21.
193. Streptomycin Treatment of Pulmonary Tuberculosis. *BMJ* 1948; 2:769-82.
194. Treatment of pulmonary tuberculosis with isoniazid; an interim report to the Medical Research Council by their Tuberculosis Chemotherapy Trials Committee. *Br Med J* 1952; 2:735-46.
195. Seldon JB, Devadatta S, Kulkarni KG, et al. The emergence of Isoniazid-resistant cultures in patients with pulmonary tuberculosis during treatment with Isoniazid alone or Isoniazid plus PAS. *Bull World Health Organ* 1964; 31:273-94.
196. Mitchison DA. Prevention of drug resistance by combined drug treatment of tuberculosis. *Handb Exp Pharmacol* 2012; 211:87-98.
197. Crofton J. Chemotherapy of pulmonary tuberculosis. *Br Med J* 1959; 1:1610-4.
198. The international investigation of the efficacy of chemotherapy in previously untreated patients with pulmonary tuberculosis. *Bull Int Un Tuberc* 1966; 34:83-96
199. Shima T. Drug resistance in tuberculosis control. *Tubercle* 1987; 68:5-18.
200. Pérez-Camacho I, Rivero-Juárez A, Kindelán JM, Rivero A. Present-day treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29 Suppl 1:41-6.

201. Colijn C, Cohen T, Ganesh A, Murray M. Spontaneous emergence of multiple drug resistance in tuberculosis before and during therapy. *PLoS One* 2011; 6:e18327.
202. Mitchison D, Davies G. The chemotherapy of tuberculosis: past, present and future. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012; 16:724-32.
203. International Standards for Tuberculosis Care. 3 ed. The Hague: World Health Organization. TB CARE, 2014. pág: 34-50.
204. World, Health, Organization. Treatment of Tuberculosis Guidelines. WHO/HTM/TB/2009.420. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2010.
205. Ait-Khaled N, Alarcón E, Armengol R. Management of tuberculosis : A guide to the essentials of good practice. Paris, France: International Unión Against Tuberculosis and Lung Diseases, 2010.
206. Informe da tuberculose en Galicia. Evaluación do periodo 1996-2012. Xunta de Galicia. Consellería de Sanidad, 2013.
207. Mitchison DA. Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147:1062-3.
208. Hesselning AC, Walzl G, Enarson DA, et al. Baseline sputum time to detection predicts month two culture conversion and relapse in non-HIV-infected patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:560-70.
209. Narayanan S, Swaminathan S, Supply P, et al. Impact of HIV infection on the recurrence of tuberculosis in South India. *J Infect Dis* 2010; 201:691-703.
210. Wallis RS, Wang C, Meyer D, Thomas N. Month 2 culture status and treatment duration as predictors of tuberculosis relapse risk in a meta-regression model. *PLoS One* 2013; 8:e71116.
211. Millet JP, Orcau A, Casals M, Garcia de Olalla P, Caylà JA. Recurrences in tuberculosis in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients: the

influence of highly active antiretroviral therapy. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:227-9.

212. Jo KW, Yoo JW, Hong Y, et al. Risk factors for 1-year relapse of pulmonary tuberculosis treated with a 6-month daily regimen. *Respir Med* 2014; 108:654-9.

213. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council. Acceptability, compliance, and adverse reactions when isoniazid, rifampin, and pyrazinamide are given as a combined formulation or separately during three-times-weekly antituberculosis chemotherapy. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140:1618-22.

214. Hong Kong Chest Service/British Medical Research Council. Controlled trial of 2, 4, and 6 months of pyrazinamide in 6-month, three-times-weekly regimens for smear-positive pulmonary tuberculosis, including an assessment of a combined preparation of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide. Results at 30 months. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143:700-6.

215. Mitchison DA. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:10-5.

216. Monedero I, Caminero JA. Evidence for promoting fixed-dose combination drugs in tuberculosis treatment and control: a review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:433-9.

217. Lienhardt C, Cook SV, Burgos M, et al. Efficacy and safety of a 4-drug fixed-dose combination regimen compared with separate drugs for treatment of pulmonary tuberculosis: the Study C randomized controlled trial. *JAMA* 2011; 305:1415-23.

218. Lincoln EM. The effect of antimicrobial therapy on the prognosis of primary tuberculosis in children. *Am Rev Tuberc* 1954; 69:682-9.

219. Ferebee S. Controlled chemoprophylaxis trials in tuberculosis. A general review. *Bibl Tuberc* 1970; 26:28-106.

220. Ferebee SH, Mount FW. Tuberculosis morbidity in a controlled trial of the prophylactic use of isoniazid among household contacts. *Am Rev Respir Dis* 1962; 85:490-510.
221. Comstock GW, Baum C, Snider DE. Isoniazid prophylaxis among Alaskan Eskimos: a final report of the Bethel isoniazid studies. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119:827-30.
222. Parekh MJ, Schluger NW. Treatment of latent tuberculosis infection. *Ther Adv Respir Dis* 2013; 7:351-6.
223. Aspler A, Long R, Trajman A, et al. Impact of treatment completion, intolerance and adverse events on health system costs in a randomised trial of 4 months rifampin or 9 months isoniazid for latent TB. *Thorax* 2010; 65:582-7.
224. Pina JM, Clotet L, Ferrer A, et al. Cost-effectiveness of rifampin for 4 months and isoniazid for 6 months in the treatment of tuberculosis infection. *Respir Med* 2013; 107:768-77.
225. Salinas C, Pascual Erquicia S, Diez R, et al. Pauta de tres meses de rifampicina e isoniácida para el tratamiento de la infección latente tuberculosa. *Med Clin (Barc)* 2010; 135:293-9.
226. Keane J, Gershon S, Wise RP, et al. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N Engl J Med* 2001; 345:1098-104.
227. Anibarro L, Casas S, Paz-Esquete J, et al. Treatment completion in latent tuberculosis infection at specialist tuberculosis units in Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010; 14:701-7.
228. Iseman MD. Vaccination to prevent tuberculosis and immunomodulatory therapy for persons with active tuberculosis. In: Iseman MD ed. *A Clinician's Guide to Tuberculosis*. Lippincott Williams Wilkins. pp 399-430. ISBN 0-7817-1749-3.

229. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* 2014; 58:470-80.
230. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002607.
231. Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, et al. The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. *Vaccine* 2007; 25:14-8.
232. Gopal R, Khader SA. Vaccines against tuberculosis: moving forward with new concepts. *Expert Rev Vaccines* 2013; 12:829-31.
233. Marinova D, Gonzalo-Asensio J, Aguilo N, Martin C. Recent developments in tuberculosis vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2013; 12:1431-48.
234. Kaufmann SH, Lange C, Rao M, et al. Progress in tuberculosis vaccine development and host-directed therapies-a state of the art review. *Lancet Respir Med* 2014; 2:301-20.
235. Arbues A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, et al. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 2013; 31:4867-73.
236. Solans L, Uranga S, Aguilo N, et al. Hyper-attenuated MTBVAC erp mutant protects against tuberculosis in mice. *Vaccine* 2014; 32:5192-7.
237. Dye C, Fine PE. A major event for new tuberculosis vaccines. *Lancet* 2013; 381:972-4.
238. Vilaplana C, Gil O, Cáceres N, Pinto S, Díaz J, Cardona PJ. Prophylactic effect of a therapeutic vaccine against TB based on fragments of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2011; 6:e20404.
239. Nell AS, D'lom E, Bouic P, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of the novel antituberculous vaccine RUTI: randomized, placebo-controlled

phase II clinical trial in patients with latent tuberculosis infection. *PLoS One* 2014; 9:e89612.

240. Gröschel MI, Prabowo SA, Cardona PJ, Stanford JL, Werf TS. Therapeutic vaccines for tuberculosis-A systematic review. *Vaccine* 2014; 32:3162-8.

241. Andueza Orduna J, Perez Trullen A, Moreno Iribas C. Estudio de las características clínicas de la tuberculosis respiratoria y su demora diagnóstica *Aten Primaria* 2000; 26:26-9.

242. Altet Gomez MN, Alcaide Megias J, Canela Soler J, et al. Estudio del retraso diagnóstico de la tuberculosis pulmonar sintomática *Arch Bronconeumol* 2003; 39:146-52.

243. Mostaza JL, Garcia N, Fernandez S, Bahamonde A, Fuentes MI, Palomo MJ. Análisis y factores predictores del retraso en la sospecha diagnóstica y tratamiento de los pacientes hospitalizados con tuberculosis pulmonar *An Med Interna* 2007; 24:478-83.

244. Vázquez-Gallardo R, Anibarro L, Fernández-Villar A, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in a low-incidence region shows a high rate of transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11:429-35.

245. Samper S, Martin C, Pinedo A, et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Aids* 1997; 11:1237-42.

246. Guerrero A, Cobo J, Fortun J, et al. Nosocomial transmission of *Mycobacterium bovis* resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. *Lancet* 1997; 350:1738-42.

247. Palmero D, Ritacco V, Ambroggi M, et al. Multidrug-resistant tuberculosis in HIV-negative patients, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:965-9.

248. Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54:1-47.
249. Stýblo K, Meijer J, Sutherland I. Tuberculosis Surveillance Research Unit Report No. 1: the transmission of tubercle bacilli; its trend in a human population. *Bull Int Union Tuberc* 1969; 42:1-104.
250. Migliori GB, Sotgiu G. Measuring the effect of tuberculosis control: a step forward. *Lancet* 2014; 383:2026-8.
251. Hopewell PC. Updating the international standards for tuberculosis care. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:253.
252. Wang L, Zhang H, Ruan Y, et al. Tuberculosis prevalence in China, 1990-2010; a longitudinal analysis of national survey data. *Lancet* 2014; 383:2057-64.
253. Salinas C, Capelastegui A, Altube L, et al. Incidencia longitudinal de la tuberculosis en una cohorte de contactos: factores asociados a la enfermedad. *Arch Bronconeumol* 2007; 43:317-23.
254. Fox GJ, Barry SE, Britton WJ, Marks GB. Contact investigation for tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2013; 41:140-56.
255. Churchyard GJ, Fielding KL, Lewis JJ, et al. A trial of mass isoniazid preventive therapy for tuberculosis control. *N Engl J Med* 2014; 370:301-10.
256. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54:49-55.
257. Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe J, et al. Diagnosis and treatment of tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 2008; 44:551-66.
258. Diel R, Nienhaus A, Lange C, Meywald-Walter K, Forssbohm M, Schaberg T. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-

incidence population containing a high proportion of BCG-vaccinated persons. *Respir Res* 2006; 7:77.

259. Domínguez J, Ruiz-Manzano J. Prueba de la tuberculina. ¿Es la hora del cambio? *Arch Bronconeumol* 2006; 42:47-8.

260. Winthrop KL, Nyendak M, Calvet H, et al. Interferon-gamma release assays for diagnosing mycobacterium tuberculosis infection in renal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:1357-63.

261. Cengiz K, Seker A. Boosted tuberculin skin testing in hemodialysis patients. *Am J Infect Control* 2006; 34:383-7.

262. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:15-21.

263. Akcay A, Erdem Y, Altun B, et al. The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Infect Control* 2003; 31:371-4.

264. Casas S, Andreu A, Juanola X, et al. Diagnosis of tuberculosis infection by tuberculin skin test and a whole-blood interferon-gamma release assay in patients considered for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71:57-65.

265. Getahun H, Matteelli A, Chaisson RE, Ravigliione M. Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *N Engl J Med* 2015; 372:2127-35.

266. Andersen P, Munk ME, Pollock JM, Doherty TM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356:1099-104.

267. González-Moreno J, García-Gasalla M, Gállego-Lezaun C, et al. Role of QuantiFERON(®)-TB Gold In-Tube in tuberculosis contact investigation: experience in a tuberculosis unit. *Infect Dis (Lond)* 2015; 47:244-51.

268. Zellweger JP, Rieder HL. Serial screening for latent tuberculosis infection in healthcare workers in low-risk settings. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189:3-4.
269. Dorman SE, Belknap R, Graviss EA, et al. Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189:77-87.
270. Ringshausen FC, Schablon A, Nienhaus A. Interferon-gamma release assays for the tuberculosis serial testing of health care workers: a systematic review. *J Occup Med Toxicol* 2012; 7:6.
271. Thanassi W, Noda A, Hernandez B, et al. Delineating a Retesting Zone Using Receiver Operating Characteristic Analysis on Serial QuantiFERON Tuberculosis Test Results in US Healthcare Workers. *Pulm Med* 2012; 2012:291294.
272. Fong KS, Tomford JW, Teixeira L, et al. Challenges of interferon- γ release assay conversions in serial testing of health-care workers in a TB control program. *Chest* 2012; 142:55-62.
273. O'Shea MK, Fletcher TE, Beeching NJ, et al. Tuberculin skin testing and treatment modulates interferon-gamma release assay results for latent tuberculosis in migrants. *PLoS One* 2014; 9:e97366.
274. Anibarro García L, Vázquez-Gallardo R, Toubes Navarro M, et al. Epidemiología de la tuberculosis en Galicia. *An Med Interna* 1999; 16:290-6.
275. Bartalesi F, Goletti D, Spinicci M, et al. Serial QuantiFERON TB-gold in-tube testing during LTBI therapy in candidates for TNF treatment. *J Infect* 2013; 66:346-56.
276. Chiappini E, Bonsignori F, Mangone G, et al. Serial T-SPOT.TB and quantiFERON-TB-Gold In-Tube assays to monitor response to antitubercular treatment in Italian children with active or latent tuberculosis infection. *Pediatr Infect Dis J* 2012; 31:974-7.

277. Seo KW, Ahn JJ, Ra SW, Kwon WJ, Jegal Y. Persistently retained interferon-gamma responsiveness in individuals with a history of pulmonary tuberculosis. *Tohoku J Exp Med* 2014; 233:123-8.
278. Lee SW, Oh DK, Lee SH, Kang HY, Lee CT, Yim JJ. Time interval to conversion of interferon-gamma release assay after exposure to tuberculosis. *Eur Respir J* 2011; 37:1447-52.
279. Pai M, Menzies D. Interferon-gamma release assays for diagnosis of latent tuberculosis infection: Uptodate, 2015. <http://www.uptodate.com>. Topic 15352. Version 32.0. Accessed on 2015, July 14th.
280. Hesseling A, Mandalakas A, Kirchner H, et al. Highly discordant T cell responses in individuals with recent exposure to household tuberculosis. *Thorax* 2009; 64:840-6.
281. Shams H, Weis S, Klucar P, et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1161-8.
282. Domínguez J, Ruiz-Manzano J, De Souza-Galvão M, et al. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:168-71.
283. Adetifa I, Ota M, Jeffries D, et al. Commercial interferon gamma release assays compared to the tuberculin skin test for diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in childhood contacts in the Gambia. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29:439-43.
284. Machado AJ, Emodi K, Takenami I, et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:446-53.
285. Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In

Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 2009; 135:1010-8.

286. Arend S, Thijsen S, Leyten E, et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:618-27.

287. Janssens J, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Contribution of a IFN-gamma assay in contact tracing for tuberculosis in a low-incidence, high immigration area. *Swiss Med Wkly* 2008; 138:585-93.

288. Nienhaus A, Schablon A, Costa JT, Diel R. Systematic review of cost and cost-effectiveness of different TB-screening strategies. *BMC Health Serv Res* 2011; 11:247.

289. Linertová R, Alvarez-León EE, García-Pérez L, Serrano-Aguilar P. Costs of QuantiFERON-TB Gold versus tuberculin skin test in Spanish healthcare workers. *J Hosp Infect* 2010; 75:52-5.

290. Tieu HV, Suntarattiwong P, Puthanakit T, et al. Comparing interferon-gamma release assays to tuberculin skin test in Thai children with tuberculosis exposure. *PLoS One* 2014; 9:e105003.

291. Grinsdale JA, Ho CS, Banouvong H, Kawamura LM. Programmatic impact of using QuantiFERON®-TB Gold in routine contact investigation activities. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15:1614-20.

292. Sepkowitz KA. How contagious is tuberculosis? *Clin Infect Dis* 1996; 23:954-62.

293. Torres Costa J, Sá R, Cardoso M, et al. Tuberculosis screening in Portuguese healthcare workers using the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Eur Respir J* 2009; 34:1423-8.

294. Andrew OT, Schoenfeld PY, Hopewell PC, Humphreys MH. Tuberculosis in patients with end-stage renal disease. *Am J Med* 1980; 68:59-65.

295. Ahmed AT, Karter AJ. Tuberculosis in California dialysis patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8:341-5.
296. Woeltje KF, Mathew A, Rothstein M, Seiler S, Fraser VJ. Tuberculosis infection and anergy in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998; 31:848-52.
297. Smirnoff M, Patt C, Seckler B, Adler JJ. Tuberculin and anergy skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Chest* 1998; 113:25-7.
298. Kimura M, Comstock GW, Mori T. Comparison of erythema and induration as results of tuberculin tests. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9:853-7.
299. Koike R, Takeuchi T, Eguchi K, Miyasaka N, Rheumatology JCo. Update on the Japanese guidelines for the use of infliximab and etanercept in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007; 17:451-8.
300. Dogan E, Erkoc R, Sayarlioglu H, Uzun K. Tuberculin skin test results and the booster phenomenon in two-step tuberculin skin testing in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2005; 27:425-8.
301. Habesoğlu MA, Torun D, Demiroglu YZ, et al. Value of the tuberculin skin test in screening for tuberculosis in dialysis patients. *Transplant Proc* 2007; 39:883-6.
302. Soysal A, Toprak D, Koc M, Arikan H, Akoglu E, Bakir M. Diagnosing latent tuberculosis infection in haemodialysis patients: T-cell based assay (T-SPOT.TB) or tuberculin skin test? *Nephrol Dial Transplant* 2011.
303. Alvarez-Lara MA, Carracedo J, Ramírez R, et al. The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:3084-90.
304. Wauters A, Peetermans WE, Van den Brande P, et al. The value of tuberculin skin testing in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:433-8.

305. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH. Uremia and host defenses. *N Engl J Med* 1990; 322:770-2.
306. Toivgoogiin A, Toyota M, Yasuda N, Ohara H. Validity of using tuberculin skin test erythema measurement for contact investigation during a tuberculosis outbreak in schoolchildren previously vaccinated with BCG. *J Epidemiol* 2005; 15:56-64.
307. Kenyon TA, Velway SE, Ihle WW, Onorato IM, Castro KE. Transmission of tuberculosis during a long airplane flight. *N Engl J Med* 1996; 334:933-8.
308. Choi J, Shin J, Kim J, Park I, Choi B, Lee M. The effect of previous tuberculin skin test on the follow-up examination of whole-blood interferon-gamma assay in the screening for latent tuberculosis infection. *Chest* 2008; 133:1415-20.
309. Vilaplana C, Ruiz-Manzano J, Gil O, et al. The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell interferon-gamma release assays. *Scand J Immunol* 2008; 67:610-7.
310. Richeldi L, Bergamini B, Vaienti F. Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J* 2008; 32:524-5.
311. Pai M, Kunimoto D, Frances J, Dick M. *Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. Canadian Tuberculosis Standards. 7th ed: Canadian Thoracic Society, 2013.*
312. Muñoz L, Casas S, Juanola X, et al. Prevention of anti-tumor necrosis factor-associated tuberculosis: a 10-year longitudinal cohort study. *Clin Infect Dis* 2015; 60:349-56.
313. Sester M, van Leth F, Bruchfeld J, et al. Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET study. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 190:1168-76.

314. Sauzullo I, Vullo V, Mastroianni CM. Detecting latent tuberculosis in compromised patients. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28:275-82.
315. Chung WK, Zheng ZL, Sung JY, et al. Validity of interferon- γ -release assays for the diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis patients. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16:960-5.
316. Lee SS, Chou KJ, Su IJ, et al. High prevalence of latent tuberculosis infection in patients in end-stage renal disease on hemodialysis: Comparison of QuantiFERON-TB GOLD, ELISPOT, and tuberculin skin test. *Infection* 2009; 37:96-102.
317. Triverio PA, Bridevaux PO, Roux-Lombard P, et al. Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for detection of latent tuberculosis in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1952-6.

ANEXOS

ANEXO 1. ARTÍCULO 1.

Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, Cortizo S, Sande D, Pazos RA, González-Fernández A.

Interferon- γ release assays in tuberculosis contacts: is there a window period?

European Respiratory Journal 2011; 37:215-217

Respiratory Society/World Association of Sarcoidosis and other Granulomatous Disorders. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 1999; 16: 149–173.

- 5 Huez S, Retailleau K, Unger P, *et al.* Right and left ventricular adaptation to hypoxia: a tissue Doppler imaging study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H1391–H1398.
- 6 Garcia MJ, Rodriguez L, Ares M, *et al.* Myocardial wall velocity assessment by pulsed Doppler tissue imaging: characteristic findings in normal subjects. *Am Heart J* 1996; 132: 648–656.
- 7 Lindqvist P, Waldenström A, Wikström G, *et al.* The use of isovolumic contraction velocity to determine right ventricular state of contractility and filling pressures: A pulsed Doppler tissue imaging study. *Eur J Echocardiogr* 2005; 6: 264–270.

- 8 Nunes H, Humbert M, Capron F, *et al.* Pulmonary hypertension associated with sarcoidosis: mechanisms, haemodynamics and prognosis. *Thorax* 2006; 61: 68–74.
- 9 Lamberto C, Nunes H, Le Toumelin P, *et al.* Membrane and capillary blood components of diffusion capacity of the lung for carbon monoxide in pulmonary sarcoidosis: relation to exercise gas exchange. *Chest* 2004; 125: 2061–2068.
- 10 Hunter KS, Lee PF, Lanning CJ, *et al.* Pulmonary vascular input impedance is a combined measure of pulmonary vascular resistance and stiffness and predicts clinical outcomes better than pulmonary vascular resistance alone in pediatric patients with pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2008; 155: 166–174.

DOI: 10.1183/09031936.00065210

Interferon- γ release assays in tuberculosis contacts: is there a window period?

The tuberculin skin test (TST) is the established procedure for diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI) among the contacts of an infectious tuberculosis (TB) case. TST may convert to positive ≤ 8 weeks after *Mycobacterium tuberculosis* infection, an interval that is usually referred to as the “window period”. A negative TST obtained < 8 weeks before does not exclude infection, and a second test is recommended [1, 2]. However, TST has some limitations, such as cross-reactivity with Bacille Calmette–Guérin (BCG) and with nontubercular mycobacterial infections.

T-cell interferon- γ release assays (IGRA) are emerging as new screening tools for LTBI diagnosis. IGRAs incorporate specific antigens of *M. tuberculosis* that are absent in BCG strains and in the majority of nontubercular mycobacteria, offering enhanced specificity for detecting *M. tuberculosis* infection [3]. In addition, their use has been approved for screening of infection in contacts [1, 4]. Most TB contact studies have shown a better correlation of IGRA with the intensity of *M. tuberculosis* exposure than that obtained using TST, particularly in patients previously vaccinated with BCG [5]. Yet, to our knowledge, no study has considered carefully the window period after *M. tuberculosis* exposure while simultaneously evaluating responses for TST and IGRA. The aim of this study was to find out which of the two tests converts earlier to positive in persons with recent infection after contact with an infectious TB case.

We used a longitudinal prospective analysis to study 184 healthy adults, all having had recent contact with a microbiologically confirmed pulmonary TB index patient. The setting was a specialized TB clinic in Pontevedra, Spain, where the incidence of TB has historically been among the highest in Western Europe. In 1996, a TB control programme was established, and incidence has steadily dropped from 72.3 to 32.6 per 100,000 in 2008.

TST and a commercially available IGRA, Quantiferon®-TB Gold In-Tube (QFT; Cellestis, Carnegie, Australia), were both

carried out at the first visit of the contacts to our clinic after TB exposure (time 0: TST₀ and QFT₀, respectively). The attending physician was blind to the QFT result, and medical advice was offered to the patient only on the basis of the TST result. Patients with positive TST were offered to start LTBI chemotherapy after active TB was excluded. For those contacts with a negative TST₀, a repeat TST and QFT were undertaken 2 months later (time 2: TST₂ and QFT₂, respectively), at the end of the window period. In addition, patients with a positive TST₀ but negative QFT₀ were recalled to have a second QFT 2 months later, irrespective of whether the patient was receiving treatment for LTBI.

Peripheral blood was processed for the QFT assay according to the manufacturer’s instructions. Samples were frozen and stored at -70°C for analysis 3–4 weeks later. The cut-off value for a positive test was $0.35 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$. TST was carried out according to the Mantoux method, with 2 units of tuberculin RT-23 (purified protein derivative; State Serum Institute, Copenhagen, Denmark), following the standardised protocol. A positive TST was defined as an induration of $\geq 5 \text{ mm}$. We excluded from the study HIV-infected persons or those with other immunosuppressive conditions, pregnant females, and those with a previous documented positive TST. Institutional ethical approval was obtained from the Ethical Committee of Clinical Research (Xunta de Galicia, Spain). All participants included in the study gave their written informed consent.

Initially, 184 participants, recent contacts of microbiologically confirmed pulmonary TB patients were enrolled in the study, but 32 were excluded due to a history of a previous positive TST (28 cases) or because of incomplete data for the index TB case (four cases). The remaining 152 participants had a median age of 44 yrs (interquartile range 32–55 yrs) and were contacts of 48 different index TB patients. None had ever previously received TB or LTBI treatment. 55 (36.2%) contacts had had a previous BCG vaccination. For 137 (90.1%) contacts, the index TB case was acid-fast bacilli positive.

The results of our study are summarised in figures 1 and 2. At the first visit, 62 (40.8%) contacts showed a positive TST₀, while 57 (37.5%) contacts had a positive QFT₀. A total of 90 contacts with an initial negative TST₀ (0 mm) were called 2 months later for TST₂ and QFT₂ studies, which were finally performed on 81 patients (nine patients did not return after 2 months). Of those contacts, 24 converted to a positive TST₂, representing 29.6% (95% CI 19.1–40.2%). It is worth noting that nine of them (37.5%, 95% CI 16.0–59.0%) had already been positive in QFT₀, suggesting an earlier conversion of QFT than TST.

In 80 participants with an initial negative QFT₀ (12 with positive TST₀ and 68 with negative TST₀), a second QFT₂ was also carried out. Of this group, 17 converted to positive (21.2%, 95% CI 11.7–30.8%), including three who had had a positive TST₀ (17.6%, 95% CI 3.8–43.4%), while a further 12 showed

both TST and QFT conversion. In two cases, negative at TST₀ and TST₂, both had QFT₂ results slightly above the diagnostic cut-off limit suggested by the manufacturer (0.37 and 0.45 IU·mL⁻¹, respectively).

Our results indicate that, as for TST, QFT has a window period of conversion after exposure to *M. tuberculosis*. Time of conversion may differ between the two, but still has to be clearly determined for QFT. Nevertheless, QFT conversion preceded that of TST in 37.5% of participants with documented TST conversion, while TST was found to be positive at the first visit after exposure in only three out of 17 cases with QFT conversion, suggesting that an earlier TST conversion is also possible. In at least two of these cases, we cannot rule out that a positive TST₀ could be related to previous TB infections or BCG vaccination.

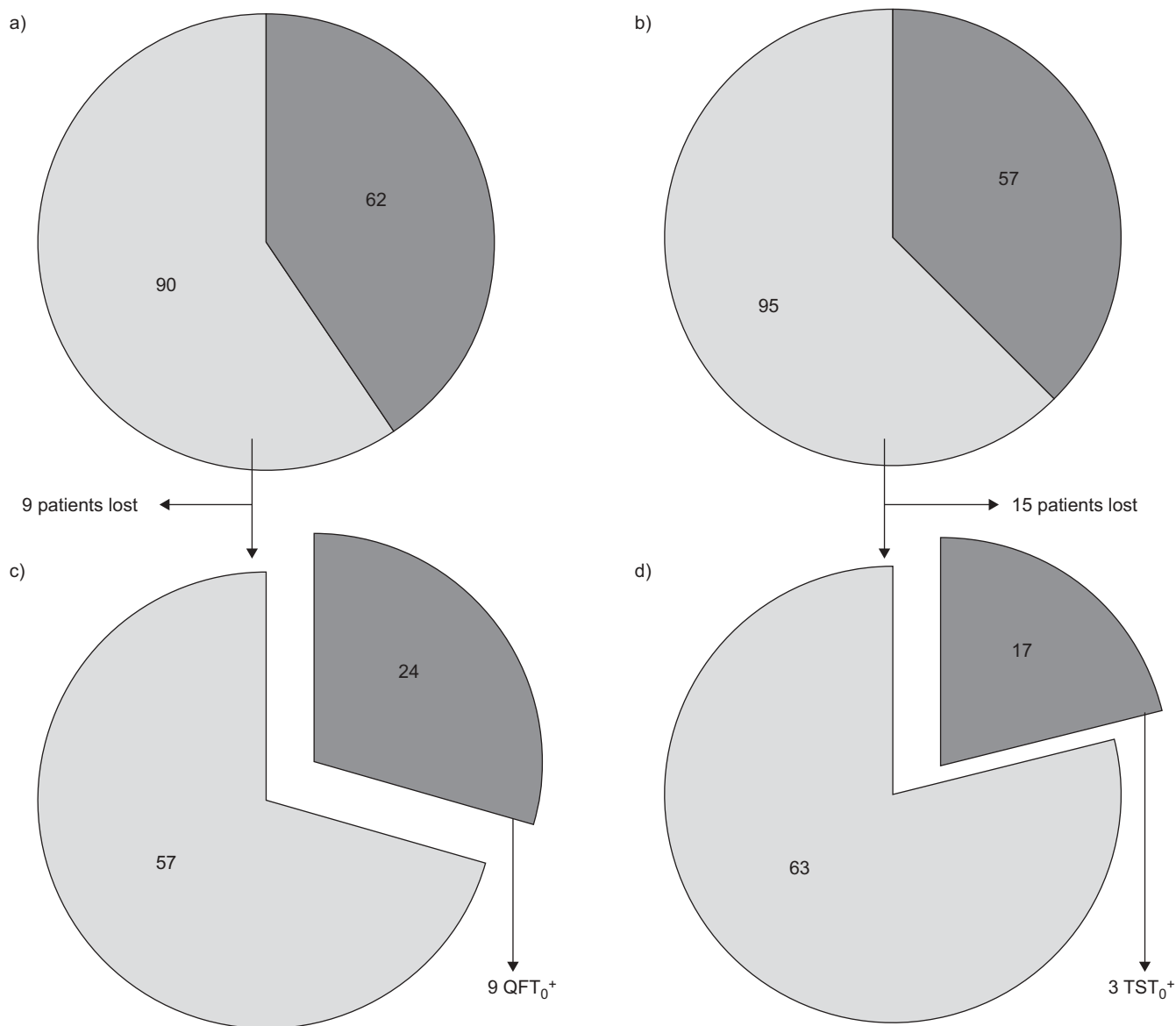


FIGURE 1. Results of a, c) tuberculin skin test (TST) and b, d) Quantiferon[®]-TB Gold In-Tube (QFT) assay after a, b) recent contact with a tuberculosis index case (TST₀ and QFT₀) and c, d) after the 2-month window period (TST₂ and QFT₂). a) n=152. b) n=152. c) n=81. d) n=80. Data are presented as contacts n. ■: negative test result; ■: positive test result.

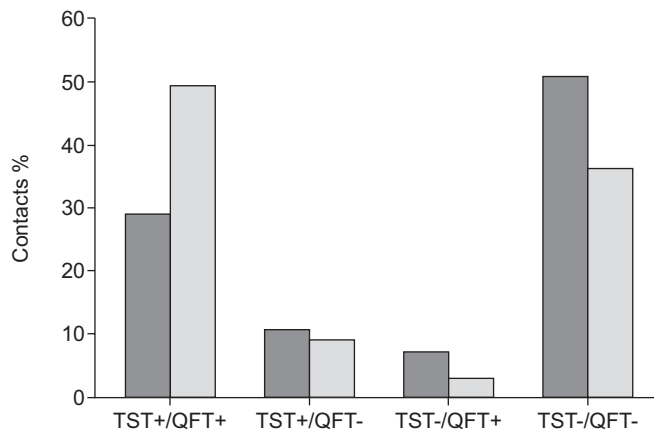


FIGURE 2. Results of tuberculin skin test (TST) and Quantiferon[®]-TB Gold In-Tube assay (QFT) after recent contact with a tuberculosis index case (■) and 8 weeks later (▨).

Our findings suggest that IGRAs could be a valid alternative to TST in the study of TB contacts, especially with increasing evidence that a positive IGRA result is a predictive factor for progression to TB [6, 7]. Nevertheless, to the best of our knowledge, this is the first study that simultaneously compares TST and an IGRA, looking for a possible conversion in both tests. Although the time of QFT conversion still has to be clearly determined, our work contributes towards clarifying the time for studying contacts with IGRAs.

Our study has some limitations that deserve comment. First, there is some concern about the possibility that a prior skin test could boost the response of subsequent IGRAs [8]. In theory, this could invalidate some of the positive IGRA responses obtained 2 months after the TST, but other authors have reported no effect [9]. A second limitation is that QFT reversion to negative in patients with an initial positive QFT₀ cannot be ruled out. In addition to the spontaneous reversion reported for TST responses, IGRA reversion has also been described in TB contacts, and its significance is still a matter of debate [10].

From the results of our study, we conclude that QFT has a “window period” after exposure to *M. tuberculosis*. Therefore, for those cases with an initially negative result with QFT after recent exposure, a later second test must be carried out to definitely exclude infection. Alternatively, when QFT is the only technique used, the last possible exposure time to the index case can be assessed, and blood is only drawn for the QFT after an 8-week interval.

L. Anibarro*, M. Trigo[#], C. Villaverde[†], A. Pena*, S. Cortizo[#], D. Sande*, R.A. Pazos* and Á. González-Fernández⁺

*Tuberculosis Unit, Dept of Infectious Diseases and Internal Medicine, [#]Dept of Microbiology, Pontevedra Hospital Complex, Pontevedra, [†]Dept of Statistics and Operational Research, and ⁺Immunology and Joint Immunology Unit, Vigo University Teaching Hospital, University of Vigo, Vigo, Spain.

Correspondence: L. Anibarro, Unidade de Tuberculose, Complexo Hospitalario de Pontevedra, Hospital Provincial, Rúa Loureiro Crespo no. 2. 36001-Pontevedra, Spain. E-mail: luis.anibarro.garcia@sergas.es

Support Statement: The study received financial support from the SUDOE-FEDER (IMMUNONET-SOE1/1P1/E014) and Spanish Ministry of Science and Innovation (Consolider Ingenio 2010, CSD2006-12, NANOBIOIMED).

Statement of Interest: None declared.

REFERENCES

- 1 National Tuberculosis Controllers Association, Centers for Disease Control and Prevention, Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep* 2005; 54: 1–47.
- 2 Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 15–21.
- 3 Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008; 149: 177–184.
- 4 Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe J, *et al.* [Diagnosis and treatment of tuberculosis]. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 551–566.
- 5 Arend S, Thijsen S, Leyten E, *et al.* Comparison of two interferon- γ assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 618–627.
- 6 Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, *et al.* Predictive value of a whole blood IFN- γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1164–1170.
- 7 Kik S, Franken W, Mensen M, *et al.* Predictive value for progression to tuberculosis by IGRA and TST in immigrant contacts. *Eur Respir J* 2010; 35: 1346–1353.
- 8 van Zyl-Smit R, Zwerling A, Dheda K, *et al.* Within-subject variability of interferon- γ assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. *PLoS One* 2009; 4: e8517.
- 9 Leyten E, Prins C, Bossink A, *et al.* Effect of tuberculin skin testing on a *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon- γ assay. *Eur Respir J* 2007; 29: 1212–1216.
- 10 Pai M, Joshi R, Dogra S, *et al.* T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13: 84–92.

DOI: 10.1183/09031936.00030610

ANEXO 2. ARTÍCULO 2.

Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, González-Fernández A.

Tuberculin skin test and interferon-gamma release assay show better correlation after the tuberculin window period in tuberculosis contacts.

Scandinavian Journal of Infectious Diseases 2011; 43:424-429

ORIGINAL ARTICLE

Tuberculin skin test and interferon- γ release assay show better correlation after the tuberculin ‘window period’ in tuberculosis contacts

LUIS ANIBARRO¹, MATILDE TRIGO², CARLOS VILLAVERDE³, ALBERTO PENA¹ & ÁFRICA GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ⁴

From the ¹Tuberculosis Unit, Department of Infectious Diseases and Internal Medicine, Pontevedra Hospital Complex, Pontevedra, ²Department of Microbiology, Pontevedra Hospital Complex, Pontevedra, ³Department of Statistics and Operational Research, University of Vigo, Vigo, and ⁴Immunology, Biomedical Research Centre (CINBIO), University of Vigo, Vigo, Spain

Abstract

Background: T-cell interferon-gamma release assays (IGRAs) have been shown to be effective tools for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection, offering an enhanced specificity compared to the tuberculin skin test (TST). Most tuberculosis (TB) contact studies have shown a better correlation of IGRA with the intensity of M. tuberculosis exposure than that obtained using the TST. However, the correlation between tests performed before and after the tuberculin ‘window period’ (time between infection and when the immunological response becomes measurable) remains to be studied. **Methods:** A longitudinal prospective analysis was performed in TB contacts. We analyzed the correlation between a commercially available IGRA (QuantiFERON[®]-TB Gold in-Tube, QFT) and the TST before and after the tuberculin window period (2 months). Concordance between both tests was assessed using the Kappa coefficient (κ). Correlation of both tests with the degree of TB exposure was also analyzed. **Results:** One hundred and fifty-two TB contacts were included in the study. Agreement between the TST and IGRA was better after the window period ($\kappa = 0.60$ at the first visit and $\kappa = 0.73$ after 2 months), especially for non-BCG vaccinated subjects ($\kappa = 0.81$). Both a positive TST and QFT were correlated, after the window period, with the size of place of contact (the smaller the place of contact, the higher the probability of having a positive test) ($p = 0.022$ and $p = 0.02$, respectively) and with the total numbers of hours spent with the index case ($p = 0.006$ for TST and $p = 0.007$ for QFT). **Conclusions:** IGRAs are a good alternative to the TST in contact tracing studies, especially after the tuberculin window period.

Keywords: Contact tracing, interferon- γ release assay, latent tuberculosis infection, tuberculin skin test, tuberculosis

Introduction

Both contact tracing and early treatment of latent tuberculosis infection (LTBI) are essential components of the tuberculosis (TB) control strategy in low-prevalence countries. It is known that treatment of LTBI interrupts TB transmission by preventing the development of active disease in high-risk people, such as those recently infected by an infectious TB patient [1].

The tuberculin skin test (TST) has been the standard tool for the diagnosis of LTBI among the contacts of an infectious TB case. However, the value of the TST is limited by its lack of specificity, due to cross-reactive immune responses caused by bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccination or infection

with non-tuberculous mycobacteria. In an attempt to overcome these limitations, T-cell interferon-gamma (IFN- γ) release assays, known as IGRAs, are emerging as new screening tools for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection. IGRAs incorporate specific antigens of M. tuberculosis that are absent in BCG strains and in the majority of non-tuberculous mycobacteria [2]. Currently, 2 ex vivo assays are available: the ELISpot test that directly counts the number of IFN- γ secreting T-cells (T-SPOT[™].TB, Oxford Immunotec, Abingdon, UK) and the whole-blood enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that measures IFN- γ production of activated peripheral blood mononuclear cells (QuantiFERON[®]-TB Gold in-Tube, QFT).

IGRAs offer enhanced specificity for detecting *M. tuberculosis* infection, and their use has been approved for screening of infection in contacts [3,4]. However, because there is no 'gold standard' method for detecting LTBI, the intensity of exposure to *M. tuberculosis* has been used as a surrogate marker of LTBI [5–9]. Most TB contact studies have shown that correlation with the intensity of *M. tuberculosis* exposure is better for the IGRA than that obtained using the TST, particularly in patients who have previously been vaccinated with BCG [5,6,8]. Yet, studies analysing the correlation between IGRAs and the degree of exposure to *M. tuberculosis* have so far not taken into account, neither before nor after, the tuberculin 'window period' – the time between infection with *M. tuberculosis* and the test becoming positive. This window period is up to 8 weeks in the case of the TST [10], and our group has recently shown that it also exists for IGRAs [11].

The aims of this study were: (1) To evaluate the concordance between the results of the TST and IGRA in TB contacts, before and after the tuberculin window period; (2) to study the correlation of both tests with the degree of TB exposure, also before and after the window period.

Patients and methods

Study setting

Our study was conducted in a specialized TB clinic in Pontevedra, Galicia (Spain), where the incidence of TB has historically been among the highest in Western Europe. In 1996, a TB control programme was established, and incidence has steadily dropped from 72.3 per 100,000 to 31.0 per 100,000 in 2009. The TB control programme is now well established and, among its functions, contact studies are offered to exclude TB and LTBI [12]. The present report is part of an ongoing project evaluating the TST and IGRAs in TB contacts [11].

Study design

We have studied TB contacts in a longitudinal prospective analysis.

TST and QFT were both carried out at the first visit of the contact to our clinic following TB exposure ('time 0': TST₀ and QFT₀, respectively) (Figure 1).

The attending physician was blind to the QFT result, and medical advice was offered to the patient only on the basis of the TST result. Patients with a positive TST were offered LTBI chemotherapy after active TB was excluded. According to local guidelines, no primary chemoprophylaxis was given to any contact.

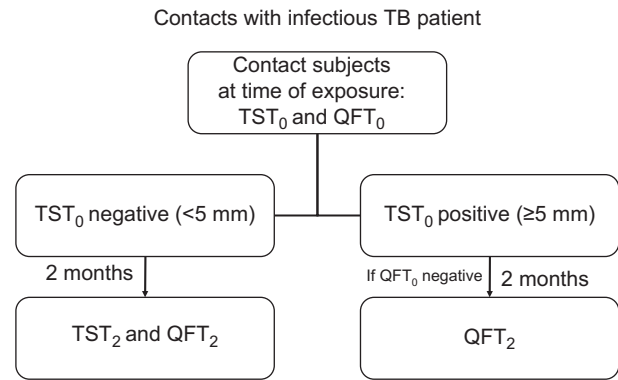


Figure 1. Study design (Abbreviations: TST₀, tuberculin skin test after TB exposure; QFT₀, Quantiferon-TB Gold in-Tube after TB exposure; TST₂, tuberculin skin test 2 months after TB exposure; QFT₂, Quantiferon-TB Gold in-Tube 2 months after TB exposure).

A second test was undertaken 2 months later ('time 2': TST₂ and QFT₂, respectively), at the end of the window period, for those contacts with a negative TST₀. In addition, patients with a positive TST₀, but negative QFT₀, were recalled to have a second QFT 2 months later, irrespective of whether the patient was or was not receiving treatment for LTBI (Figure 1).

A 'definitive' diagnosis was made once the results for before and after the window period of both procedures were analysed. Positive TST_{def} or QFT_{def} results were established when either TST₀ or TST₂, and QFT₀ or QFT₂ were positive, respectively. Conversely, for a definitive negative result, each test had to be negative at both analysed time-points (at 'time 0' and at 'time 2').

Methods

Peripheral blood was processed for the IGRA using the QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay (QFT) according to the manufacturer's instructions (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia). Samples were frozen and stored at -70°C until analysis, 3–4 weeks later. The cut-off value for a positive test was 0.35 IU/ml, as recommended by the manufacturer. No indeterminate results were found.

The TST was carried out according to the Mantoux method, with 2 units of tuberculin RT-23 (PPD; Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), following the standardized protocol. The induration diameter was measured at 48–72 h. A positive TST was defined as an induration of ≥ 5 mm, following Spanish national guidelines [4]. TST conversion to positivity was indicated by an increase in induration diameter of at least 10 mm over a previously negative TST₀ result.

Study subjects

From January 2008 to the end of June 2009, 152 healthy adults aged ≥ 18 y were recruited, all having had recent contact with a microbiologically-confirmed pulmonary TB index patient. Those excluded from the study were: HIV-infected persons or those with other immunosuppressive conditions, pregnant women and those with a previous documented positive TST.

Intensity of exposure to the TB index patient was assessed by a questionnaire with a directed and detailed interview. The following data were obtained: age, gender, previous BCG vaccination, origin (from a country with or without a high prevalence of TB), previous TST, total time (h) of exposure to the TB index case after the beginning of cough, and place of exposure.

BCG status was determined by careful revision of the BCG scar or by vaccination certificate. Place of exposure to the patient with TB was categorized according to the size of the place of contact (such as a car, bedroom, living room, office, shelter or outdoors) [7].

Characteristics of the index case were obtained by a questionnaire with detailed interview. Duration of cough was carefully assessed. Chest films were categorized as with or without cavitation. The intensity of sputum smear was graduated from 0 to 3+.

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, data are reported as mean \pm standard deviation (SD). Concordance between TST and QFT was assessed using the Kappa coefficient (κ) from respective cross-tabulation analyses. Kappa values indicate weak (≤ 0.40), moderate (0.41–0.60), strong (0.61–0.80) and excellent (> 0.80) agreement. Associations between test results and exposure were assessed by correlation tests, including measurements of the strength of association with p -values and odds ratio (OR) results. Multivariate case–control analyses were carried out using binary logistic regression. SPSS statistical software for windows (SPSS version 15.0; IBM-SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used in the analyses.

Ethics issues

Institutional ethics approval was obtained from the Ethics Committee for Clinical Research (Xunta de Galicia, Spain). All participants included in the study gave their written informed consent.

Results

Contacts and index cases: characteristics

A total of 152 participants, all contacts of 48 different index TB patients, were included in the study

(Table I). An overwhelming majority of the contacts were Spanish born, with only 2 immigrants, while 55 (36.2%) had a previous BCG vaccination. Some 34 contacts (22.4%) had a previous documented negative TST; none had ever previously received TB or LTBI treatment. The number of contacts for each index case ranged from 1 to 15. The mean cumulative exposure time to the index case (\pm SD) was 133.2 ± 365.4 h (range 1–3640; $p < 0.001$).

For 137 contacts (90.1%), the index TB case was acid-fast bacilli (AFB)-positive and in 84 of these contacts (55.3%) cavitation on chest X-ray was present. Cough was present in the index case of 145 contacts (95.4%), with a median duration of 5 weeks (interquartile range 4–8) before the diagnosis of TB. Other characteristics of contacts and index cases are summarized in Table I.

TST and QFT results at the first visit after contact with the index case (TST₀ and QFT₀)

At the first visit, 62 contacts (40.8%) showed a positive TST₀, while 57 (37.5%) had a positive QFT₀. Agreement between the 2 tests was 80.9% ($\kappa = 0.60$) (Table II).

A significant relationship for positive TST₀ (≥ 5 mm) results was found for those patients who had had a previous skin test ($p = 0.042$; OR 1.534, 95% confidence interval (CI) 1.047–2.247), and for place of exposure (the smaller the size of the place of contact, the higher the probability of having a positive

Table I. Characteristics of 152 healthy contacts of patients with pulmonary tuberculosis and their index cases.

Characteristic	Value (%)
<i>Contacts</i>	
Age, y, median (IQR)	44 (32–55)
Gender male, n (%)	65 (42.8)
Documented previous negative TST, n (%)	34 (22.4)
BCG vaccination, n (%)	55 (36.2)
Immigrant, n (%)	2 (1.3)
Place of exposure to a TB index case, n (%)	
Size:	
of a car	5 (3.3)
of a bedroom	45 (29.6)
of a living room	66 (43.4)
of an office	22 (14.5)
of a shelter	11 (7.2)
Or:	
Outdoors	3 (2.0)
<i>Index cases</i>	
Index sputum density, n (%)	
AFB-negative	15 (9.9)
AFB-positive	137 (90.1)
Cavitation on chest X-ray, n (%)	84 (55.3)
Cough, weeks, median (IQR)	5 (4–8)

IQR, interquartile range; BCG, bacille Calmette–Guérin; TST, tuberculin skin test; TB, tuberculosis; AFB, acid-fast bacilli.

Table II. Comparison of TST₀ and QFT₀ responses in healthy adults in recent contact with a pulmonary tuberculosis index case.

	All (n = 152) (%) ^a		BCG vaccinated (n = 55) (%) ^a		BCG unvaccinated (n = 97) (%) ^a	
	QFT-neg	QFT-pos	QFT-neg	QFT-pos	QFT-neg	QFT-pos
TST-neg	51	8	42	7	57	8
TST-pos	11	30	20	31	6	29
κ-Value	0.60		0.457		0.687	

TST, tuberculin skin test performed after the first visit (time 0) following exposure to a TB patient; QFT, QuantiFERON-TB Gold in-Tube performed after the first visit (time 0) following exposure to a TB patient; BCG, bacille Calmette–Guérin.

^aPercentage of contacts showing positive (pos) or negative (neg) results in the tests.

test; $p = 0.017$). BCG vaccination also approached significance ($p = 0.056$; OR 1.922, 95% CI 0.980–3.768). In contrast, no statistically significant association was found between TST₀ results and age, gender, hours of exposure to the index case, place of exposure, duration of cough of the index case, or cavitation on the chest X-ray film. Intensity of the sputum smear of the TB index case was found not to be related to the TST₀ result, neither by AFB smear grade nor by simple ‘positive and negative’ grading.

When considering a cut-off value of ≥ 10 mm for TST positivity, BCG vaccination reached significance ($p = 0.05$; OR 1.959, 95% CI 1.000–3.855), while no additional substantial changes were found for the remaining parameters.

For QFT₀, a positive correlation was found with the place of exposure ($p = 0.02$), while no other parameters analysed were correlated to a positive result at QFT₀.

For the 55 contacts with BCG vaccination, TST₀ was positive in 28 participants (50.9%), whereas QFT₀ was positive in 21 (38.2%) (Table II). Agreement between the 2 tests was of 72.7% ($\kappa = 0.457$). In contacts without BCG vaccination (97 cases), TST₀ was positive in 34 (35.1%) and QFT₀ in 36 (37.1%). Agreement between the 2 tests was considerably better than for the vaccinated contacts (85.6%; $\kappa = 0.687$).

TST and QFT results at the second visit (2 months after the first visit; TST₂ and QFT₂)

Patients with negative TST₀. Of the 90 contacts with an initial negative TST₀, 81 returned for a second TST (TST₂), and 24 of these 81 converted to a positive TST₂, representing 29.6% (95% CI 19.1–40.2%).

Patients with negative QFT₀. In 80 participants with an initial negative QFT₀, a second QFT₂ was carried out. Of this group, 17 converted to positive (21.2%; 95% CI 11.7–30.8%). Agreement between patients in whom both TST₂ and QFT₂ were performed was 88% ($\kappa = 0.73$).

Definitive results (TST_{def} and QFT_{def})

The TST and QFT results were considered definitive (TST_{def} and QFT_{def} respectively) once a definitive diagnosis was made, after taking into account the 2 studies at ‘time 0’ (first visit after contact with the TB index case) and those conducted 2 months later (second visit after the window period). Nine patients with negative TST₀, and 7 others with negative QFT₀ results, did not return for the test 2 months later, and were excluded from further analysis. Hence, definitive results were obtained for the remaining 136 contacts.

TST_{def} was positive (≥ 5 mm) in 81 participants (59.6%), 57 at their first visit and 24 after the window period. Very similar figures were obtained for QFT_{def} being positive in 73 participants (53.7%), 56 at the time of their first visit and 17 after 2 months. Agreement between the 2 tests was 86.8% ($\kappa = 0.73$) (Table III). Concordance was excellent in patients without BCG vaccination (total agreement: 91%; $\kappa = 0.81$), while in patients with previous BCG vaccination, concordance was much lower (total agreement: 80%; $\kappa = 0.59$).

Both positive TST_{def} and QFT_{def} were correlated with place of contact and total number of hours spent with the index case. In the first case, there was a correlation between the size of place of contact (the smaller the place of contact, the higher the probability of having a positive test; $p = 0.022$ for TST and $p = 0.02$ for QFT). In the case of total number of hours spent with the index case before diagnosis, both tests also showed a correlation ($p = 0.006$ for TST and $p = 0.007$ for QFT).

When considering a cut-off value of ≥ 10 mm for TST positivity, the variable place of contact did not reach statistical significance ($p = 0.087$), while no additional substantial changes were found for the remaining parameters.

Discussion

TST and a commercially available IGRA (QFT) were compared in the routine setting of a contact study of TB cases. The setting was a European location with

Table III. Comparison of definitive TST_{def} and QFT_{def} responses in healthy adults after contact with a pulmonary tuberculosis index case.

	All (<i>n</i> = 136) (%) ^a		BCG vaccinated (<i>n</i> = 49) (%) ^a		BCG unvaccinated (<i>n</i> = 87) (%) ^a	
	QFT _{def} -neg	QFT _{def} -pos	QFT _{def} -neg	QFT _{def} -pos	QFT _{def} -neg	QFT _{def} -pos
TST _{def} -neg	37	4	33	3	39	2
TST _{def} -pos	10	50	14	47	7	52
κ-Value	0.73		0.59		0.81	

TST, tuberculin skin test; QFT, QuantiFERON-TB Gold in-Tube; BCG, bacille Calmette–Guérin.

^aPercentage of contacts showing positive (pos) or negative (neg) results in the tests.

medium incidence of TB and a low proportion of immigrants. The tuberculin window period was taken into account.

Our results indicate that QFT and TST have high agreement between them, and a better correlation with the intensity of exposure to *M. tuberculosis*, after the tuberculin window period.

It is well known that conversion of the TST response after infection with *M. tuberculosis* may take up to 8 weeks, usually referred as the ‘window period’ [10]. However, the conversion time required for IGRAs to become positive after a new infection has still not been clearly determined. This has been a limiting factor in the practical use of IGRAs for the study of contacts. In the same cohort of patients as that used in the present study, we have previously shown that QFT also has a window period of conversion after exposure to *M. tuberculosis*, which must be taken into account in contact tracing studies [11].

Several contact tracing studies have directly compared TST and IGRAs [5–7,9,13–16], but these studies have not taken into account the window period in a formal and systematic way. To the best of our knowledge, this is the first study to directly compare the TST and an IGRA before and after the tuberculin window period. In a German prospective community-based study of contacts with recent exposure to *M. tuberculosis*, contacts had blood drawn for the IGRA at least 8 weeks after exposure, i.e. after the tuberculin window period [13]. They obtained an excellent agreement between IGRAs (T-SPOT.TB and QFT) in TST-positive contacts. Similar study designs (comparing tests performed after the window period) have been used to compare the TST with IGRAs [6,9], while in other studies, the time of testing after exposure has not been stated or has not been well controlled [5,7,14–16]. As with our results, most groups have found a high agreement between both tests, especially in unvaccinated contacts.

The increasing evidence that a positive IGRA result is a factor predicting progression to TB [17,18], the operational limitations of the TST, such as the requirement of 2 visits (to evaluate skin reaction 48–72 h after tuberculin injection), as well as the potential

cost-effectiveness of IGRAs in contact tracing [19,20] are all factors that strengthen the case for using IGRAs in the study of contacts in countries with a low–intermediate prevalence of TB. The results obtained in our study support the view that IGRAs could be a valid alternative to the TST in the study of TB contacts, and while the timing of QFT conversion remains to be established, the test should be carried out 2 months after exposure, either for the first time or as a confirmatory analysis in cases with a positive TST. Some countries have already included these recommendations in their national guidelines [3].

In our study, a moderate association was found for the 2 tests with the intensity of exposure or infectiousness of the index patients. A correlation was only found for place of exposure and number of hours spent with the index case. Although most studies have shown a good correlation between a positive IGRA and intensity of exposure [5–7,13], other authors have found no association or only a very weak one [9,21].

Our study has several limitations that deserve further comment. First, there is some concern about the possibility that a prior skin test could boost the response of subsequent IGRAs [22,23]. In theory, this could invalidate some of the positive IGRA responses obtained 2 months after the TST. However, other authors have reported no effect of TST on the IGRA responses [24]. Blood drawn for QFT either on first visit or on day 3 after TST may be a good option to avoid the possible booster effect of tuberculin on IGRA. Thus, some guidelines are already taking this problem into account and recommend this protocol [25]. A second limitation is that QFT reversion to negative in patients with an initial positive QFT₀ cannot be ruled out. Spontaneous IGRA reversion has been described in TB contacts, and its significance is still a matter of debate [26]. Nevertheless, we have assumed a positive QFT₀ test as a definitive positive test, in the same way that it is well established that a positive TST₀ is considered to be a definitive positive test in contact studies. At present, there is insufficient evidence to recommend that contacts with a positive IGRA wait for a spontaneous reversion to negative. Therefore, such patients must be considered as infected and be offered treatment

for LTBI. Moreover, in our study no QFT reversion was detected in the 10 patients who were discordant TST₀-negative/QFT₀-positive, who had a second QFT₂ performed, all well above the cut-off limit for the diagnostic test.

In conclusion, agreement between the TST and QFT, and correlation with the intensity of exposure to *M. tuberculosis*, are both better after the window period. While the QFT window period remains to be established, QFT could be a good alternative to the TST in contact tracing studies, especially after the tuberculin window period.

Declaration of interest: The study received financial support from the SUDOE (IMMUNONET-SOE1/1P1/E014) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (Consolider Ingenio 2010, CSD2006-12, NANOBIOMED). The authors declare no competing financial interest.

References

- [1] Erkens C, Kamphorst M, Abubakar I, Bothamley G, Chemtob D, Haas W, et al. Tuberculosis contact investigation in low prevalence countries: a European consensus. *Eur Respir J* 2010;36:925–49.
- [2] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med* 2008;149:177–84.
- [3] Mazurek M, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection—United States, 2010. *MMWR Recomm Rep* 2010;59(RR-5):1–25.
- [4] González-Martín J, García-García J, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, et al. Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28:297.e1–20.
- [5] Hesseling A, Mandalakas A, Kirchner H, Chegou N, Marais B, Stanley K, et al. Highly discordant T cell responses in individuals with recent exposure to household tuberculosis. *Thorax* 2009;64:840–6.
- [6] Arend S, Thijsen S, Leyten E, Bouwman J, Franken W, Koster B, et al. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:618–27.
- [7] Shams H, Weis S, Klucar P, Lalvani A, Moonan P, Pogoda J, et al. Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1161–8.
- [8] Aissa K, Madhi F, Ronsin N, Delarocque F, Lecuyer A, Decludt B, et al. Evaluation of a model for efficient screening of tuberculosis contact subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1041–7.
- [9] Janssens J, Roux-Lombard P, Perneger T, Metzger M, Vivien R, Rochat T. Contribution of an IFN-gamma assay in contact tracing for tuberculosis in a low-incidence, high immigration area. *Swiss Med Wkly* 2008;138:585–93.
- [10] Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:15–21.
- [11] Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, Cortizo S, Sande D, et al. Interferon-gamma release assays in tuberculosis contacts: is there a window period? *Eur Respir J* 2011;37:215–7.
- [12] Cruz-Ferro E, Fernández-Nogueira E. Epidemiology of tuberculosis in Galicia, Spain, 1996–2005. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:1073–9.
- [13] Diel R, Loddenkemper R, Meywald-Walter K, Gottschalk R, Nienhaus A. Comparative performance of tuberculin skin test, QuantiFERON-TB-Gold In Tube assay, and T-Spot.TB test in contact investigations for tuberculosis. *Chest* 2009;135:1010–8.
- [14] 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;15:168–71.
- [15] Adetifa I, Ota M, Jeffries D, Hammond A, Lugos M, Donkor S, et al. Commercial interferon gamma release assays compared to the tuberculin skin test for diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection in childhood contacts in the Gambia. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:439–43.
- [16] Machado AJ, Emodi K, Takenami I, Finkmoore B, Barbosa T, Carvalho J, et al. Analysis of discordance between the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:446–53.
- [17] Yoshiyama T, Harada N, Higuchi K, Sekiya Y, Uchimura K. Use of the QuantiFERON-TB Gold test for screening tuberculosis contacts and predicting active disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:819–27.
- [18] Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A. Negative and positive predictive value of a whole-blood IGRAs for developing active TB—an update. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:88–95.
- [19] Deuffic-Burban S, Atsou K, Viget N, Melliez H, Bouvet E, Yazdanpanah Y. Cost-effectiveness of QuantiFERON-TB test vs. tuberculin skin test in the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:471–81.
- [20] Diel R, Schaberg T, Loddenkemper R, Welte T, Nienhaus A. Enhanced cost-benefit analysis of strategies for LTBI screening and INH chemoprevention in Germany. *Respir Med* 2009;103:1838–53.
- [21] Torres Costa J, Sá R, Cardoso M, Silva R, Ferreira J, Ribeiro C, et al. Tuberculosis screening in Portuguese healthcare workers using the tuberculin skin test and the interferon-gamma release assay. *Eur Respir J* 2009;34:1423–8.
- [22] Choi J, Shin J, Kim J, Park I, Choi B, Lee M. The effect of previous tuberculin skin test on the follow-up examination of whole-blood interferon-gamma assay in the screening for latent tuberculosis infection. *Chest* 2008;133:1415–20.
- [23] Vilaplana C, Ruiz-Manzano J, Gil O, Cuchillo F, Montané E, Singh M, et al. The tuberculin skin test increases the responses measured by T cell interferon-gamma release assays. *Scand J Immunol* 2008;67:610–7.
- [24] Richeldi L, Bergamini B, Vaienti F. Prior tuberculin skin testing does not boost QuantiFERON-TB results in paediatric contacts. *Eur Respir J* 2008;32:524–5.
- [25] Canadian Tuberculosis Committee. Recommendations on interferon gamma release assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection—2010 update. *Can Commun Dis Rep* 2010;36(ACS-5):1–21.
- [26] Pai M, Joshi R, Dogra S, Zwerling A, Gajalakshmi D, Goswami K, et al. T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:84–92.

ANEXO 3. ARTÍCULO 3.

Anibarro L, Trigo M, Feijoó D, Ríos M, Palomares L, Pena A, Núñez M, Villaverde C, González-Fernández A.

Value of the tuberculin skin testing and of an inteferon-gamma release assay in haemodialysis patients after exposure to M. tuberculosis.

BMC Infectious Diseases 2012; 12:195-202.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Value of the tuberculin skin testing and of an interferon-gamma release assay in haemodialysis patients after exposure to *M. tuberculosis*

Luis Anibarro^{1*}, Matilde Trigo², Diana Feijó³, Mónica Ríos⁴, Luisa Palomares³, Alberto Pena¹, Marta Núñez⁴, Carlos Villaverde⁵ and África González-Fernández⁶

Abstract

Background: Patients with end-stage renal disease (ESRD) and *Mycobacterium tuberculosis* infection pose a high risk of developing active TB disease. It is therefore important to detect latent TB infection (LTBI) to be able to offer treatment and prevent progression to TB disease. We assessed the value of the tuberculin skin test (TST) and of an interferon-gamma release assay (Quantiferon[®]-TB Gold in-Tube, QFT) for diagnosing LTBI in ESRD patients, after prolonged exposure to a highly contagious TB case in a haemodialysis unit. As a high number of patients presented erythema without induration in the TST response, this type of reaction was also analysed.

Method: The TST and QFT were simultaneously performed twelve weeks after the last possible exposure to a bacilliferous TB patient. If the first TST (TST-1) was negative, a second TST (TST-2) was performed 15 days later to detect a booster response. A comparison was made between the TST responses (including those cases with erythema without induration) and those for the QFT. The correlation with risk of infection and the concordance between tests were both analysed.

Results: A total of 52 patients fulfilled the inclusion criteria. Overall, 11 patients (21.2%) had a positive TST response: 3 for TST-1 and 8 for TST-2, and 18 patients (34.6%) showed a positive QFT response ($p = 0.065$). Erythema without induration was found in 3 patients at TST-1 and in a further 9 patients at TST-2. The three patients with erythema without induration in TST-1 had a positive TST-2 response. Concordance between TST and QFT was weak for TST-1 ($\kappa = 0.21$); it was moderate for overall TST ($\kappa = 0.49$); and it was strong if both induration and erythema ($\kappa = 0.67$) were considered.

Conclusions: In patients with ESRD, erythema without induration in the TST response could potentially be an indicator of *M. tuberculosis* infection. The QFT shows better accuracy for LTBI diagnosis than the TST.

Background

Patients with end-stage renal disease (ESRD) have an increased risk for developing tuberculosis (TB) disease. It is estimated that once the infection is produced, the risk for developing active TB is 6 to 25 times higher than that in the general population [1,2]. It is difficult to diagnose TB disease in such cases, as there are frequently extrapulmonary locations and nonspecific symptoms. Moreover, they present a high mortality rate [3].

Patients with *Mycobacterium tuberculosis* infection after a recent exposure also have an increased risk for developing TB disease [4,5]. Hence, the risk of TB infection and disease is even higher in ESRD patients after a recent exposure to *M. tuberculosis* [6]. It is therefore crucial to detect latent TB infection (LTBI) in these patients and to offer early treatment that can prevent progression to active TB disease.

The Tuberculin Skin Test (TST) is based on a delayed-type hypersensitivity response against a purified protein derivative (PPD) from *M. Tuberculosis*, and has for many years been the standard tool for detecting LTBI. However, the value of this test is limited by its lack of specificity, due to cross-reactive immune responses

* Correspondence: luis.anibarro.garcia@sergas.es

¹Unidade de tuberculose, Servizo de Medicina Interna, Complexo hospitalario de Pontevedra (CHOP). SERGAS, Mourente s/n, Pontevedra 36071, Spain
Full list of author information is available at the end of the article

caused by previous bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination, or by infection with non-tuberculous mycobacteria [7]. Moreover, TST has shown limited sensitivity for detecting *M. tuberculosis* infection in ESRD patients [8-12].

T-cell Interferon-gamma (IFN- γ) release assays, known as IGRAs, are emerging as new screening tools for the detection of *M. tuberculosis* infection. They incorporate specific antigens from *M. tuberculosis* to induce secretion of IFN- γ as a marker of immune responses by T-cells. Such specific antigens are absent in the BCG strains and in the majority of non-tuberculous mycobacteria, avoiding antigenic cross-reactivity. IGRAs also incorporate an internal positive control, so that a failure of response may reflect an underlying anergy [13]. Two commercial tests are available: the QuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube (QFT) test (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia), which uses ELISA to detect IFN- γ in the culture supernatants, and the T-SPOT[®].TB (Oxford Immunotec, Abingdon, UK), which is based on the enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay.

As there is no gold-standard method for the diagnosis of LTBI, it is difficult to estimate the value of IGRA (and TST) for detecting asymptomatic *M. tuberculosis* infection. Correlation with the degree of exposure has been proposed as a surrogate marker of infection. In ESRD patients, IGRAs have shown a better correlation with risk factors for *M. tuberculosis* infection, and their use has recently been proposed instead of the TST in the British Thoracic Society Guidelines for prevention and management of TB infection and disease in patients with chronic kidney disease [14]. In addition, IGRAs show better correlation than TST in TB outbreaks in immunocompetent populations [15]. However, very few studies have directly compared the TST with an IGRA in haemodialysis patients after a prolonged exposure to a bacilliferous patient [16,17].

After the notification of the diagnosis of a bacilliferous pulmonary TB case in a nurse working at a dialysis unit, we evaluated patients with ESRD who were attending the dialysis centre, with the TST and an IGRA test (QFT). The aims of the present study were to compare the results of an IGRA with those for the TST in patients with ESRD after a TB outbreak at the dialysis centre, as well as to identify factors associated with positive test results. The study also included an 18-month follow-up of the cohort of patients.

Methods

Description of the outbreak

A 52-year-old nurse working in a renal dialysis unit was diagnosed with bacilliferous pulmonary TB. Five months before diagnosis, the worker developed a cough and dysphonia. For nine weeks prior to diagnosis, the worker

was off sick and she did not attend the work place. Therefore, she had no more contact with the patients attending the dialysis unit. Microscopic examination of sputum was 4+ positive of acid-fast bacilli, indicating infectiousness, and sputum culture yielded *M. tuberculosis* susceptible to all first-line anti-TB medications. The nurse had been working at the renal dialysis unit on week-long alternating morning and evening shifts. Each shift consisted of four hours of contact time with patients on haemodialysis treatment. The worker was considered to be infectious 17 weeks before she left her workplace [4]. All patients who attended the dialysis unit during this period were considered to be contacts and were evaluated. Twelve weeks after the last possible exposure to *M. tuberculosis*, initial screening was undertaken by simultaneously performing the tuberculin skin test (TST) and the QFT assay.

Tuberculin skin test

Trained personnel performed the TST according to the Mantoux method following the standardized protocol: 0.1 mL (2 TU) of purified protein derivative of tuberculin RT 23 (Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark) was injected intradermally to the volar surface of the forearm. The TST results were read after 72 hours, and the maximum transverse diameter of the induration was estimated. TST values ≥ 5 mm were judged positive according to Spanish national guidelines [18]. A two-step TST was performed: if the first TST (TST-1) was negative (< 5 mm induration), a second TST (TST-2) was conducted 15 days later to determine the development of a booster phenomenon. Patients without induration in the TST response, but with presence of erythema, were recorded as "erythema without induration".

Interferon-gamma release assay

Peripheral blood was processed for the IGRA, using the QuantiFERON[®]-TB Gold in-Tube Assay (QFT) according to the manufacturer's instructions (Cellestis Ltd, Carnegie, Australia). One ml of whole blood was added to each of the three QFT tubes: TB antigen (containing ESAT-6, CFP-10 and TB7.7 antigens); mitogen positive control (containing phytohemagglutinin); and a negative control. Samples were frozen and stored at -70°C until analysis. The cut-off value for a positive test was 0.35 IU/mL as recommended by the manufacturer. Blood was collected for QFT immediately before TST-1, and before the start of the haemodialysis session.

Data analysis

The following data were obtained: gender, age, body mass index (BMI), laboratory values (haemoglobin, urea, creatinine, albumin), BCG vaccination status, aetiology of renal disease, diabetes mellitus, immunosuppressive

therapy, weeks of exposure to the index case, and the presence of old healed TB in chest radiography. BCG vaccination status was evaluated by the careful revision of the BCG scar by an expertise nurse or by the BCG vaccination certificate.

Follow-up

Patients with either a positive TST or a positive QFT response were considered for treatment for LTBI after active TB disease was excluded. No cases of active TB were found during the study period. The possibility of TB symptoms was carefully monitored throughout the long-term 18-month follow-up period.

Statistical analyses

Unless otherwise indicated, data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Associations between test results and variables were assessed by Pearson's χ^2 -square test or Fisher's exact for categorical variables, and with Student's *t* test or Mann-Witney U rank test for continuous variables. All statistically significant factors ($P < 0.05$) or clinically relevant factors with a $P < 0.2$ determined by univariate analysis were included in models of multivariate logistic regression analysis. Comparison between test results was performed using the McNemar test. All reported *P* values were two-sided. Concordance between TST and QFT was assessed using the Kappa coefficient (κ). Kappa values indicate weak (≤ 0.40), moderate (0.41-0.60), strong (0.61-0.80), or excellent (>0.80) agreement. The SPSS statistical software for Windows (SPSS version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used in the analyses.

Institutional ethical approval was obtained from the Ethical Committee of Clinical Research (*Xunta de Galicia*, Spain) and written informed consent was obtained from the index case.

Results

Characteristics of the contacts

Initially, the contact investigation included 58 patients with ESRD attending the haemodialysis unit during the 17-week infectious period of the TB index case. One patient refused to be included in the study, and a previous positive TST was documented for five other patients, who were also excluded from further analysis. Hence, a total of 52 patients were included in the study.

The mean age of these patients was 62 ± 16.8 years. Seven patients (13.5%) had been vaccinated with BCG. The aetiology of the end-stage renal failure was hypertensive nephrosclerosis (31%), diabetic nephropathy (19%), others (29%), and unknown (21%). Eight patients were receiving immunosuppressive therapy. Two patients recalled previous contact with a TB patient, but both had had a negative TST result.

Each patient attended the dialysis ward for about 4 hours for three days a week, except for one patient who had dialysis on a daily basis. A total of 46 patients (88.5%) had been in contact with the index case for the whole 17-week infectious period. The control unit (where the health personnel work) is located at the centre of the room, so the degree of exposure to the index case was considered to be almost identical for all patients. The other 6 patients with a shorter period of exposure had been in contact with the index case for 4, 6, 11, 12 (two patients) and 13 weeks each.

Other demographic, clinical characteristics and laboratory findings are shown in Table 1.

TST and QFT results

TST results

Of the 52 patients who had been in contact with the index case, 3 (5.8%) had a positive TST result for the first test (TST-1) (Figure 1). Fifteen days later, the remaining 49 patients had a second TST (TST-2) and the TST-2 was positive in 8 patients (16.3%). Overall, 11 patients (21.2%) had a final positive TST. In BCG-vaccinated individuals, the TST was positive in only 1 patient, and this was detected at TST-2. In the five patients with radiographic findings suggesting possible old healed TB, the TST was positive in three cases (one at TST-1 and the other two at TST-2). The induration measurement of tuberculin reaction was >10 mm in every patient with a positive result.

Three patients (6.1%) out of 49 with a negative TST-1 only had erythema. The frequency of patients showing erythema without induration even increased at the

Table 1 Basic demographic characteristics of 52 patients with end-stage renal disease from a haemodialysis unit, all contacts of a healthcare worker who had active pulmonary tuberculosis while working at the dialysis centre

CHARACTERISTICS	STUDY GROUP
Age in years, mean \pm SD (range)	62 \pm 16.8 (24 to 89)
Male gender, n (%)	31 (59.6)
BCG vaccination, yes, n (%)	7 (13.5)
BMI, mean \pm SD	27.1 \pm 5.0
Hemoglobin (mg/dL), mean \pm SD	11.5 \pm 1.4
Albumin level (mg/dL) mean \pm SD	2.8 \pm 0.4
Diabetes mellitus, yes, n (%)	8 (15.4)
Exposure to index case (weeks, %)	
17 week	46 (88.5)
< 17 weeks	6 (11.5)
Radiographic evidence of healed TB, n (%)	5 (9.6)

BMI: Body mass index.

Infectiousness of the Index Case was estimated for 17 weeks before last exposure.

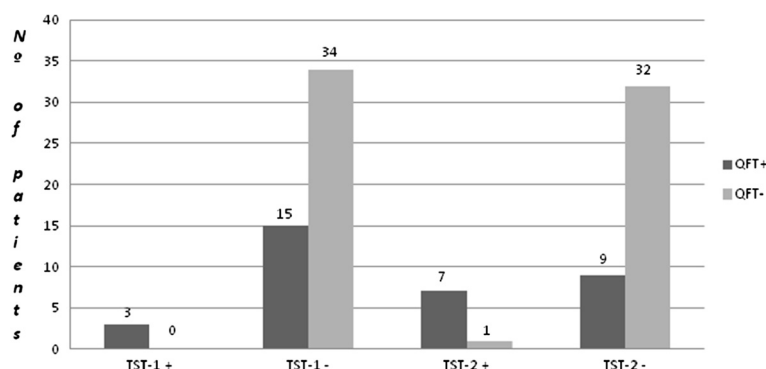


Figure 1 Results of the Tuberculin Skin Test and of the Quantiferon®-TB Gold in-Tube assay. TST-1: Tuberculin skin test result in the first-step testing. TST-2: Tuberculin skin test result in the second-step testing (15 days after TST-1). QFT: Quantiferon®-TB Gold in-tube assay.

second TST, with it being observed in 9 out of the 41 patients with a negative TST-2 (22.0%). It is worth noting that for the three patients with erythema but a negative TST-1, the second TST performed 15 days later was clearly positive (Table 2).

A positive TST result was not associated with any of the variables analysed, although the presence of an old healed TB in chest radiography approached statistical significance ($p = 0.057$).

QFT results

The QFT was performed at the same time as the TST-1 in all the 52 patients, and it was positive in 18 cases (34.6%). No indeterminate results were found. In BCG-vaccinated individuals, the QFT result was positive in only one patient, who had both negative TST-1 and TST-2 results. In the five patients with radiographic findings suggesting possible old healed TB, QFT was positive in three cases (all with positive TST results) and it was negative in the other two patients, who also had a negative TST result. A positive QFT result was only significantly associated with the presence of old healed TB in chest radiography ($p = 0.043$).

- Agreement between the TST and QFT results was found to be weak when taking into account only the initial TST ($\kappa = 0.21$), whereas it was moderate when both TST results (TST-1 and TST-2) were considered ($\kappa = 0.49$) (Table 3).

Table 2 Relationship between the tuberculin skin test results and erythema

	TST (+)	TST(-) erythema (+)	TST (-) erythema (-)
TST-1	3	3*	46
TST-2	8	9	32

TST-1: Tuberculin skin test result in the first-step testing.

TST-2: Tuberculin skin test result in the second-step testing (15 days after TST-1).

* The three patients with a negative TST-1 result and erythema boosted to a positive TST-2 result.

- Overall, the QFT was positive in 18 patients (34.6%), while the TST was positive in 11 patients (21.2%) ($p = 0.065$).

Value of erythema without induration in the TST response

As an unexpectedly high number of patients presented erythema without any induration in the TST response, we attempted to verify if erythema alone could be a valuable marker for LTBI. Of the 12 patients with erythema and no induration in the TST, 8 had a positive QFT result (2 out of 3 cases with a negative TST-1 result and 6 out of 9 cases with a negative TST-2 result). If both responses (the presence of erythema without induration or a positive TST result) were considered to be positive test results, agreement between the QFT and TST improved to $\kappa = 0.67$ (strong agreement), as shown in Table 4.

Contact follow-up

All contacts with a positive result for either the TST or the QFT were considered to have LTBI, after active TB was excluded. Preventive treatment with isoniazid for 9 months was considered for these patients.

Twenty patients (38.5%) were considered to have LTBI (two on the basis of a positive TST result, nine on the basis of a positive QFT result, and nine with positive results for both TST and QFT). Preventive treatment was started for 11 patients, of which 8 patients completed the treatment. Isoniazid treatment was stopped in two patients because of toxicity, and the final patient in this group died during LTBI treatment, from causes unrelated to either TB or isoniazid toxicity. The remaining 9 patients did not start LTBI treatment: four of them due to poor basal performance, while five declined to receive the treatment.

Eighteen months after the outbreak, none of the 20 patients with LTBI developed active TB. Five patients

Table 3 Agreement between the results of tuberculin skin testing with those for the Quantiferon[®]-TB Gold in-tube assay

			TST-1			Overall TST		
			negative	positive	Total	negative	positive	Total
QFT	negative	n	34	0	34	32	2	34
		(%)	65.4%	0%	65.4%	61.5%	3.8%	65.4%
	positive	n	15	3	18	9	9	18
		(%)	28.8%	5.8%	34.6%	17.3%	17.3%	34.6%
Total		n	49	3	52	41	11	52
		(%)	94.2%	5.8%	100%	78.8%	21.2%	100%
<i>kappa value</i>			0.21			0.49		

TST-1: Tuberculin skin test result in the first-step testing.

Overall TST: Tuberculin skin test result after TST-1 and second-step testing (15 days after first testing).

QFT: Quantiferon[®]-TB Gold in-tube assay.

died during the follow-up period (one during LTBI treatment and four patients without treatment). No death was related to TB.

The remaining 32 patients with negative results for both QFT and TST were considered to be not infected, and did not receive LTBI treatment. After the 18-month follow-up period of close clinical monitoring, no case of active TB was found among this group. Four patients died during the follow-up period, none of the deaths were related to TB.

Discussion

The present study assessed the value of TST and QFT in haemodialysis patients after prolonged exposure to a highly contagious pulmonary TB patient. The results obtained showed three major findings. First, a single TST has low sensitivity in detecting LTBI and a two-step strategy must be carried out to gain sensitivity. Second, erythema alone (without induration) may be a valuable marker when interpreting TST in haemodialysis patients.

Table 4 Agreement between the results of tuberculin skin testing and presence of erythema with those for the Quantiferon-TB Gold in-tube assay

			TST/Erythema		Total
			TST (-) Erythema (-)	TST (+) or erythema (+)	
QFT	negative	n	29	5	34
		%	55.8%	9.6%	65.4%
	positive	n	3	15	18
		%	5.8%	28.8%	34.6%
total		n	32	20	52
		%	61.5%	38.5%	100
<i>kappa value</i>			0.67		

TST: Tuberculin Skin Test.

QFT: Quantiferon[®]-TB Gold in-Tube assay.

And third, the QFT shows better sensitivity than the TST in detecting LTBI in haemodialysis patients.

TST has been shown to be unreliable in patients with advanced chronic kidney disease, and although a positive test may be useful for LTBI diagnosis, a negative one cannot be assumed to be a true negative [8,10,11]. Uraemia is a well-known risk factor for impaired immune cellular response [9,19], and this fact is decisive for both a lower sensitivity of the TST and a higher risk of progression from LTBI to TB disease [12]. It has been shown that immune cells can be activated in ESRD patients, but the functionality of these cells is impaired. This is especially true for the subpopulation of T helper 1 (TH1) lymphocytes, which are the cells mainly responsible for cellular immunity and delayed hypersensitivity responses. Moreover, there is a decrease in the number of B cells in a pro-inflammatory environment (complement activation, inflammatory cytokines), together with an imbalance in the ratio of TH1/TH2 lymphocytes [20]. The suppression of the immune TH1 status entails a higher rate of anergy, eventually leading to lower positive TST responses compared to the QFT results. Although limited by the absence of a gold-standard method to confirm LTBI, in our study QFT has shown a higher response than TST, which approaches statistical significance.

Two-step testing in TST has been shown to be crucial for LTBI diagnosis in patients with ESRD, in the absence of a known recent exposure to a contagious index case [21,22]. In our study, 8 patients with an initially negative TST had a second positive TST 15 days later; thereby, highlighting the importance of the booster effect in ESRD patients. The booster effect is believed to result from recall of waned cell-mediated immunity, akin to the anamnestic response. A first tuberculin test may boost cell-mediated immunity in patients with otherwise impaired immune response, such as patients with ESRD [23]. Several studies have addressed the booster phenomenon in ESRD patients

without known recent exposure to a TB index case [21,22,24-26]. Cengiz et al. detected a boosted response in a second TST, performed seven days after a first TST, in 24.3% of patients on haemodialysis [22]. Similarly, Habesglu et al. found the booster phenomenon in 29.7% of patients undergoing haemodialysis treatment and with no epidemiologically recognised factors for LTBI [25]. Our study has addressed the booster response in the context of a recent exposure to a highly contagious TB index case. Therefore, it could be difficult to distinguish between a booster effect from a real conversion after the tuberculin "window period". Nevertheless, this is very unlikely, because both TST and QFT were performed 12 weeks after the last possible exposure to the Index Case, which would make very unlikely a conversion attributable to the "window period" [27]. Our findings support the view that two-step TST must be performed in patients with ESRD, even in the context of a recent exposure to *M. tuberculosis*.

An unexpected finding of our study was the high number of patients with erythema, but without induration, in the TST responses. Erythema without induration is not generally considered in the interpretation of the TST in most International Guidelines. However, some Japanese guidelines suggest taking erythema without induration into consideration when the measurement is over 20 mm [28]. In a contact tracing study carried out with 566 BCG-vaccinated school students in Japan, the erythema measurement was correlated with both the induration measurement and the degree of exposure to the index case. These results suggest that erythema (irrespective of the induration response) could have a significant value in the interpretation of the TST results. However, in this study, no concomitant IGRA testing was performed [29]. In our study, joint assessment of induration and erythema has shown better correlation with the QFT results than when only induration was taken into account in the TST response. All 3 patients with erythema, but with a negative result in the initial TST-1, developed a positive TST response 15 days later. Moreover, of the 9 patients with erythema without induration in the second TST, six (66.7%) had a positive QFT result. Overall, our results suggest that in patients with impaired cell-mediated immune response, such as patients with ESRD, erythema without induration could be indicative of a weak immune response to *M. tuberculosis* antigens, even though it did not yield skin induration. Our findings indicate that *M. tuberculosis* infection could be considered in patients with ESRD and with no induration erythema shown in the TST response, particularly in situations of high epidemiological risk of infection. Nevertheless, more studies and a higher number of patients than those presented in our study are required to fully verify this statement.

As there is no gold-standard method to confirm diagnosis of LTBI, the accuracy of tests for evaluating LTBI relies on indirect evidence of infection. There is increasing evidence that IGRA results have a better correlation with known risk factors for LTBI than the TST responses [13]. In addition, several studies have assessed this issue in patients with chronic kidney disease, indicating that for these groups of patients, IGRAs have a greater accuracy than TST in the diagnosis of LTBI [30-34]. However, only a few studies have compared TST and IGRA results in haemodialysis patients after a recent exposure to a bacilliferous TB patient [16,17]. Winthrop et al. found a better correlation with risk exposure using Quantiferon-TB-Gold[®] test (an older generation of QFT) than when using the TST after exposure to a pulmonary TB patient in a haemodialysis centre [16]. Yet, they found that the rates of positive results using the TST and the IGRA were not significantly different, whereas we found a value close to statistical significance ($p=0.065$). The conclusion derived from the above cited study and from our current findings (using the new generation of QFT) is that IGRAs may offer greater accuracy for the diagnosis of LTBI in ESRD patients, after exposure to an infectious TB patient [14].

Our study has several limitations that require further comments. First, due to the limited number of patients included in the study, our results must be interpreted with caution, and larger series of patients are necessary to confirm our findings. This is especially true for the value of erythema, as very few studies have previously assessed this item. Second, as there is no gold-standard method for diagnosing true LTBI, it cannot be ruled out that higher positivity rates for the QFT could include some false positive results. Nevertheless, there is increasing evidence about the value of an IGRA as a marker for LTBI, and even as a marker for the risk of progression to active TB [35]. Finally, only one commercial IGRA (QFT) has been evaluated in our study. It has been suggested that the other commercially available IGRA (T-SPOT.TB[®]) may have an improved sensitivity in patients with immunodeficiency disorders [36]. There are several previous studies that have compared different commercially available IGRAs in ESRD patients [30,32,33]. In a Korean study comparing the performance of TST, QFT and T-SPOT.TB in patients undergoing haemodialysis, the positive rates were 23.5%, 45.9% and 60.4% respectively, suggesting a higher sensitivity for the T-SPOT.TB test. In addition, the frequency of indeterminate results was higher for the QFT compared with the T-SPOT.TB test [32]. In contrast, two other studies failed to demonstrate significantly better sensitivities with the T-SPOT.TB test than with the QFT: 47% vs. 40%, respectively, using an older generation of QFT in a Taiwanese study

[30], or 22% vs. 46%, respectively, in 62 Swiss patients deemed to have LTBI [33].

Conclusions

Our results indicate that the QFT shows better sensitivity than the TST in detecting LTBI in haemodialysis patients, after exposure to *M. tuberculosis*. Nevertheless, if the TST is used for detecting LTBI, a single TST result has low sensitivity and a two-step strategy must be performed to gain sensitivity.

Although the relatively small number of patients included in the present study limits, to some extent, the significance of the conclusions, it can still be emphasized that special care should be taken in patients with ESRD, who show erythema after the TST, because erythema alone (without induration) may be a marker of LTBI when interpreting TST in these patients.

Consent statement

Institutional ethical approval for the study was obtained from the Ethical Committee of Clinical Research (*Xunta de Galicia*, Spain) and written informed consent for publication was obtained from the index case. A copy of the written consent is available for review by the Series Editor of the journal.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LA provided patient care and was responsible for data management, design of the study and drafting of the manuscript. MT and AP performed laboratory tests and were involved in writing the draft version. DF, MR, LP and MN made substantial contributions to the acquisition of data, participated in recruitment of subjects, provided patient care and were involved in writing the draft version. CV performed the statistical analysis. AGF revised the draft carefully for important intellectual content. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the University of Vigo and SUDOFE-FEDER (IMMUNONET-SOE1/P1/E014) for financial support.

Author details

¹Unidade de tuberculose, Servizo de Medicina Interna, Complexo hospitalario de Pontevedra (CHOP). SERGAS, Mourente s/n, Pontevedra 36071, Spain.

²Servizo de Microbioloxía, Complexo hospitalario de Pontevedra (CHOP).

SERGAS, Mourente s/n, Pontevedra 36071, Spain. ³Servizo de Nefroloxía, Complexo hospitalario de Pontevedra (CHOP). SERGAS, Mourente s/n, Pontevedra 36071, Spain. ⁴Servizo de Neumoloxía, Complexo hospitalario de Pontevedra (CHOP). SERGAS, Mourente s/n, Pontevedra 36071, Spain.

⁵Unidade de estatística. Universidade de Vigo, Campus de Lagoas, Marcosende, Vigo, Pontevedra 36310, Spain. ⁶Área de Inmunoloxía, Centro de Investigacións Biomédicas (CINBIO), Universidade de Vigo, Campus Lagoas Marcosende, Vigo, Pontevedra 36310, Spain.

Received: 28 November 2011 Accepted: 15 August 2012

Published: 20 August 2012

References

- García-Leoni ME, Martín-Scapa C, Rodeño P, Valderrábano F, Moreno S, Bouza E: High incidence of tuberculosis in renal patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990, **9**:283–285.

- Sasaki S, Akiba T, Suenaga M, Tomura S, Yoshiyama N, Nakagawa S, Shoji T, Sasaoka T, Takeuchi J: Ten years' survey of dialysis-associated tuberculosis. *Nephron* 1979, **24**:141–145.
- Segall L, Covic A: Diagnosis of tuberculosis in dialysis patients: current strategy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010, **5**:1114–1122.
- National Tuberculosis Controllers Association, Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for the investigation of contacts of persons with infectious tuberculosis. Recommendations from the National Tuberculosis Controllers Association and CDC. *MMWR Recomm Rep* 2005, **54**:1–47.
- Reichler MR, Reves R, Bur S, Thompson V, Mangura BT, Ford J, Valway SE, Onorato IM, Group CIS: Evaluation of investigations conducted to detect and prevent transmission of tuberculosis. *JAMA* 2002, **287**:991–995.
- (CDC) CfDCaP: Tuberculosis transmission in a renal dialysis center—Nevada, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2004, **53**:873–875.
- Santin M, Dominguez J: Diagnosis of tuberculosis infection using interferon-gamma based assays. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011, **29**:26–33.
- Shankar MS, Aravindan AN, Sohal PM, Kohli HS, Sud K, Gupta KL, Sakhuja V, Jha V: The prevalence of tuberculin sensitivity and anergy in chronic renal failure in an endemic area: tuberculin test and the risk of post-transplant tuberculosis. *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20**:2720–2724.
- Wauters A, Peetermans WE, Van den Brande P, De Moor B, Evenepoel P, Keuleers H, Kuypers D, Stas K, Vanwalleghem J, Vanrenterghem Y, Maes BD: The value of tuberculin skin testing in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**:433–438.
- Woeltje KF, Mathew A, Rothstein M, Seiler S, Fraser VJ: Tuberculosis infection and anergy in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1998, **31**:848–852.
- Smirnoff M, Patt C, Seckler B, Adler JJ: Tuberculin and anergy skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Chest* 1998, **113**:25–27.
- Sester M, Sester U, Clauer P, Heine G, Mack U, Moll T, Sybrecht GW, Lalvani A, Köhler H: Tuberculin skin testing underestimates a high prevalence of latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004, **65**:1826–1834.
- Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, Lange C, Losi M, Markova R, Migliori GB, 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**:88–99.
- Milburn H, Ashman N, Davies P, Doffman S, Drobniewski F, Khoo S, Ormerod P, Ostermann M, Snelson C, Committee BTSSoCCaJT: Guidelines for the prevention and management of Mycobacterium tuberculosis infection and disease in adult patients with chronic kidney disease. *Thorax* 2010, **65**:557–570.
- Arend S, Thijsen S, Leyten E, Bouwman J, Franken W, Koster B, Cobelens F, van Houte A, Bossink A: Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**:618–627.
- Winthrop KL, Nyendak M, Calvet H, Oh P, Lo M, Swarbrick G, Johnson C, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM, Mazurek GH: Interferon-gamma release assays for diagnosing mycobacterium tuberculosis infection in renal dialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008, **3**:1357–1363.
- Connell DW, Singanayagam A, Charif R, George PM, Molyneux PL, McCrudden C, Magtoto M, Harden E, Seneviratne SL, Duncan ND, Kon OM: A comparison between interferon gamma release assays and the tuberculin skin test in the contact tracing of patients with chronic kidney disease. *Thorax* 2011, **66**:729–730.
- González-Martín J, García-García J, Anibarro L, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz-Manzano J: [Consensus document on the diagnosis, treatment and prevention of tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010, **28**:297. e291–e220.
- Touraine JL, Touraine F, Revillard JP, Brochier J, Traeger J: T-lymphocytes and serum inhibitors of cell-mediated immunity in renal insufficiency. *Nephron* 1975, **14**:195–208.
- Alvarez-Lara MA, Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Madueño JA, Aljama P: The imbalance in the ratio of Th1 and Th2 helper lymphocytes in uraemia is mediated by an increased apoptosis of Th1 subset. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**:3084–3090.
- Dogan E, Erkoc R, Sayarlioglu H, Uzun K: Tuberculin skin test results and the booster phenomenon in two-step tuberculin skin testing in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2005, **27**:425–428.

22. Cengiz K, Seker A: Boosted tuberculin skin testing in hemodialysis patients. *Am J Infect Control* 2006, **34**:383–387.
23. Menzies D: Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, **159**:15–21.
24. Akcay A, Erdem Y, Altun B, Usalan C, Agca E, Yasavul U, Turgan C, Caglar S: The booster phenomenon in 2-step tuberculin skin testing of patients receiving long-term hemodialysis. *Am J Infect Control* 2003, **31**:371–374.
25. Habesoglu MA, Torun D, Demiroglu YZ, Karatasli M, Sen N, Ermis H, Ozdemir N, Eyuboglu FO: Value of the tuberculin skin test in screening for tuberculosis in dialysis patients. *Transplant Proc* 2007, **39**:883–886.
26. Soysal A, Toprak D, Koc M, Arkan H, Akoglu E, Bakir M: Diagnosing latent tuberculosis infection in haemodialysis patients: T-cell based assay (T-SPOT.TB) or tuberculin skin test? *Nephrol Dial Transplant* 2012, **27**:1645–1650.
27. Anibarro L, Trigo M, Villaverde C, Pena A, González-Fernández A: Tuberculin skin test and interferon- γ release assay show better correlation after the tuberculin 'window period' in tuberculosis contacts. *Scand J Infect Dis* 2011, **43**:424–429.
28. Koike R, Takeuchi T, Eguchi K, Miyasaka N, Rheumatology JCo: Update on the Japanese guidelines for the use of infliximab and etanercept in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2007, **17**:451–458.
29. Toivongojin A, Toyota M, Yasuda N, Ohara H: Validity of using tuberculin skin test erythema measurement for contact investigation during a tuberculosis outbreak in schoolchildren previously vaccinated with BCG. *J Epidemiol* 2005, **15**:56–64.
30. Lee SS, Chou KJ, Su IJ, Chen YS, Fang HC, Huang TS, Tsai HC, Wann SR, Lin HH, Liu YC: High prevalence of latent tuberculosis infection in patients in end-stage renal disease on hemodialysis: Comparison of QuantiFERON-TB GOLD, ELISPOT, and tuberculin skin test. *Infection* 2009, **37**:96–102.
31. Seyhan EC, Sökücü S, Altin S, Günlüoğlu G, Trablus S, Yılmaz D, Koksalan OK, Issever H: Comparison of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test with the tuberculin skin test for detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients. *Transpl Infect Dis* 2010, **12**:98–105.
32. Chung WK, Zheng ZL, Sung JY, Kim S, Lee HH, Choi SJ, Yang J: Validity of interferon- γ -release assays for the diagnosis of latent tuberculosis in haemodialysis patients. *Clin Microbiol Infect* 2010, **16**:960–965.
33. Triverio PA, Bridevaux PO, Roux-Lombard P, Niksic L, Rochat T, Martin PY, Saudan P, Janssens JP: Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin testing for detection of latent tuberculosis in chronic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009, **24**:1952–1956.
34. Passalent L, Khan K, Richardson R, Wang J, Dedier H, Gardam M: Detecting latent tuberculosis infection in hemodialysis patients: a head-to-head comparison of the T-SPOT.TB test, tuberculin skin test, and an expert physician panel. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007, **2**:68–73.
35. Diel R, Loddenkemper R, Niemann S, Meywald-Walter K, Nienhaus A: Negative and Positive Predictive Value of a Whole-Blood Interferon- γ Release Assay for Developing Active Tuberculosis: An Update. *Am J Respir Crit Care Med* 2011, **183**:88–95.
36. Piana F, Codecasa LR, Cavallerio P, Ferrarese M, Migliori GB, Barbarano L, Morra E, Cirillo DM: Use of a T-cell-based test for detection of tuberculosis infection among immunocompromised patients. *Eur Respir J* 2006, **28**:31–34.

doi:10.1186/1471-2334-12-195

Cite this article as: Anibarro et al.: Value of the tuberculin skin testing and of an interferon-gamma release assay in haemodialysis patients after exposure to *M. tuberculosis*. *BMC Infectious Diseases* 2012 **12**:195.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ANEXO 4. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS
ESTUDIOS 1 Y 2 (CASTELLANO)

INFORMACIÓN AL PACIENTE

ESTUDIO: UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE INTERFERÓN-GAMMA IN VITRO Y PRUEBAS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE INFECCIÓN LATENTE TUBERCULOSA EN PERSONAS CON EXPOSICIÓN RECIENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.

Naturaleza y objetivo del estudio.

El estudio en el cual se le propone participar se llevará a cabo en la Unidad de Tuberculosis perteneciente al Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario de Pontevedra en el marco de un proyecto de investigación en Ciencias de la Salud para el estudio de la tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, producida por el Bacilo de la Tuberculosis de alta incidencia en Galicia. Se sabe que un enfermo de tuberculosis puede contagiar a otras personas por vía aérea.

Cuando una persona se contagia, no enferma inmediatamente, sino que pasa antes por una fase de infección latente, en la que la persona está infectada pero no enferma.

El estudio de los contactos de una persona ya enferma, pretende detectar las personas que están infectados antes de que desarrollen enfermedad, y así tomar medidas preventivas que eviten el desarrollo de tuberculosis.

Hasta ahora, la Prueba de Tuberculina (también conocida como “Mantoux”) ha sido la única manera disponible para saber si una persona está infectada o no por el bacilo tuberculoso.

Pero la Prueba de Tuberculina es una prueba muy antigua (posiblemente la prueba diagnóstica más antigua entre las que todavía se encuentran en activo) y de utilidad limitada para asegurar si un paciente está infectado o no por el bacilo tuberculoso.

Por otra parte, tarda hasta 8-10 semanas en positivizarse después de que se haya dado el contagio por el bacilo de la tuberculosis, por lo que caso de que la Prueba fuera negativa, está indicado repetir la misma pasado ese tiempo. Todo ello supone más molestias y además cierto riesgo de que se desarrolle la enfermedad en este periodo de tiempo.

Por eso, surge la necesidad de nuevas pruebas que eviten todas las limitaciones de la Prueba de Tuberculina.

Recientemente se están estudiando nuevos métodos diagnósticos que puedan obviar todas las desventajas de la Prueba de Tuberculina en el estudio de contactos de enfermos con tuberculosis. Estos nuevos métodos diagnósticos se basan en la detección de una sustancia denominada “Interferón Gamma” que producen algunas células sanguíneas en el caso de que haya infección por el bacilo tuberculoso. Aunque son de mayor coste, estudios recientes parecen muy prometedores, estando ya aprobado su uso, como alternativa a la Prueba de Tuberculina en algunos países como los Estados Unidos.

Además de las citadas pruebas basadas en la detección de “Interferón Gamma” es posible que otras, basadas en la detección de anticuerpos frente al bacilo de la tuberculosis en sangre, puedan ser también alternativas diagnósticas válidas.

Pero, por tratarse de una prueba nueva, de la que aún se carece de la experiencia necesaria, muchas cuestiones quedan por resolver.

Una de ellas es el tiempo que tarda en positivizarse una vez la persona está infectada por el bacilo tuberculoso. No se sabe si estas nuevas técnicas se positivizan antes que las 8-10 semanas que tarda la Prueba de Tuberculina.

Una segunda cuestión no resuelta es averiguar si estas nuevas técnicas se negativizan después de haber recibido un tratamiento de infección latente.

Por último, está también por determinar la utilidad diagnóstica de los anticuerpos que se producen en sangre frente a ciertas proteínas del Bacilo de la Tuberculosis.

Estudio

Este estudio no se realiza normalmente en todos los pacientes. En caso de participar en él, se le harán las pruebas estándar (Prueba de Tuberculina) y además se le pedirá una muestra de sangre entre 1 y 3 veces, según los resultados obtenidos.

Se le requerirá para acudir a consulta de la Unidad de Tuberculosis y realizar una extracción de sangre según los procedimientos habituales. Los resultados serán procesados

mediante programas informáticos específicos para el análisis de datos. En ningún caso se le someterá a pruebas complementarias para la obtención de muestras que no estén indicadas para los fines anteriormente mencionados.

Los datos obtenidos se destinarán al desarrollo de este estudio y no se incluirán en otros estudios sin la previa autorización y especificación del destino de los mismos.

Participación en el estudio

Su participación en el estudio es completamente voluntaria y la decisión de no participar o revocar su participación y retirar su consentimiento en cualquier momento del estudio, no afectará a su tratamiento y atenciones que debe recibir por parte del equipo médico que le atiende.

Es posible que no obtenga ningún beneficio de su participación en este estudio, pero los resultados derivados del mismo podrán contribuir a beneficiar en un futuro a otros pacientes, así como a adecuar la conducta de diagnóstico y tratamiento.

Riesgos. Su participación en el estudio conlleva únicamente los riesgos propios de una extracción analítica habitual: Ocasionalmente puede producirse hematomas locales, dolor o molestias en el lugar de la punción. La toma de muestra de sangre será siempre realizada por profesionales acreditados y con amplia experiencia en la obtención de muestras sanguíneas.

Confidencialidad. Los datos obtenidos se limitarán para el análisis del estudio.

La actividad de gestión de los datos recogidos durante el estudio así como el manejo de las historias clínicas cumplirá en todo momento con las exigencias de la Ley Orgánica 15/1999 de Regulación del Tratamiento Automático de Datos (LOTARD) y el R.D. 994/99.

Para ampliar la información recibida si así lo desea, tanto antes como una vez iniciado el estudio, usted puede contactar con el Dr. Luis Anibarro, médico investigador de la Unidad de Tuberculosis del Complejo Hospitalario de Pontevedra. (Tlf: 986-807005).

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estudio: **UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE INTERFERÓN-GAMMA IN VITRO Y PRUEBAS DE INMUNIDAD HUMORAL PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE INFECCIÓN LATENTE TUBERCULOSA EN PERSONAS CON EXPOSICIÓN RECIENTE A MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

El paciente D./Dña.....

con D.N.I. nº:.....y domicilio en

En nombre propio o D./Dña

como representante legal del paciente

y ante el testigo D./Dña

MANIFIESTO que:

He sido informado(a) por el Dr./Dra.....del Servicio de Medicina Interna del Complejo Hospitalario de Pontevedra, y que me asiste en el citado servicio médico, que se va a realizar un estudio sobre el diagnóstico de infección tuberculosa tras contacto con un enfermo de tuberculosis.

He podido hacer preguntas sobre el estudio y he recibido respuestas satisfactorias a las mismas.

Comprendo que la participación es voluntaria y que la no participación en el estudio no va a modificar en nada el tratamiento ni las atenciones que voy a recibir.

En base a ello, otorgo mi conformidad para el análisis de las muestras en el mencionado estudio.

Pontevedra, a..... de

El Voluntario/Representante

El Testigo

El Médico

ANEXO 5. OTROS ARTÍCULOS QUE NO FORMAN PARTE DE
LA TESIS.

1. Caylà JA, Rodrigo T, Ruiz-Manzano J, Caminero JA, Vidal R, García JM, Blanquer R, Casals M, **Anibarro L**, (como miembro del Working Group on Completion of Tuberculosis Treatment in Spain, Study ECUTTE.), et al. Tuberculosis treatment adherence and fatality in Spain. **Respir Res.** 2009 **10:121**.
2. González-Martín J, García-García JM, **Anibarro L**, Vidal R, Esteban J, Blanquer R, Moreno S, Ruiz-Manzano J. Documento de consenso sobre diagnóstico, tratamiento y prevención de la tuberculosis. Documento publicado simultáneamente en **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2010;**28:297.e1-e20** y en **Archivos de Bronconeumología** 2010; **46:255-74**.
3. **Anibarro L**, Casas S, Paz-Esquete J, González L, Pena A, Guerra MR, Sande D, Calviño L, Santín M. Treatment completion in latent tuberculosis infection at specialist tuberculosis units in Spain. **Int J Tuberc Lung Dis** 2010; **14(6): 701-707**.
4. García-García JM, Blanquer R, Rodrigo T, Caylà JA, Caminero JA, Vidal R, Casals M, **Anibarro L** (como miembro del Working Group on Completion of Tuberculosis Treatment in Spain, Study ECUTTE), et al. Social, clinical and microbiological differential characteristics of tuberculosis among immigrants in Spain. **PLoS ONE** 2011; **6 (1): e16272**.
5. Casas S; Andreu A; Juanola X; Bordas X; Alcaide F; Moure R; **Anibarro L**; Cuchi E; Esteve M; Ortiz V; Guerra MR; Rodriguez J; Reina D; Salvador G; Guardiola J; Suris X; Pascual MA; Marti C; Martinez-Lacasa X; Cuquet J; Gonzalez L; Santin M. Diagnosis of tuberculosis infection by tuberculin skin test and a whole-blood interferon-gamma release assay in patients considered for anti-TNF- α therapy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 2011; **71(1):57-65**.
6. **Anibarro L**, Garet E, Felpeto I, del Campo V, Montes J, González-Fernández A. Eje interleucina 12 / interferon gamma en pacientes de tuberculosis en una región europea con alta incidencia de enfermedad. **Inmunología** 2011; **30:36-44**
7. Rodrigo T, Caylà J, Casals M, García-García JM, Caminero JA, Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Vidal R, Altet N, Calpe JL, Penas A, **Anibarro L** (como miembro del Working Group on Completion of Tuberculosis Treatment in Spain.) et al. A predictive

- scoring instrument for tuberculosis lost to follow-up outcome. **Respiratory Research** **2012; 13:75**
8. Hervada X, Cruz E, Taboada JA, Ursua MI (coordinadores). Colaboradores: **Anibarro L**, Chouciño N, Cortizo LE, Díaz D, Gorís AI, Otero MI, Otero M, Penas A, Pérez del Molino ML, Rodríguez A, Túnñez V, Vázquez MT, Vázquez E, Vereá H. Programa Gallego de Prevención y Control de tuberculosis 2012-2015. Xunta de Galicia, Consellería de Sanidade, Santiago de Compostela 2012. ISBN: 978-84-695-6895-8.
 9. Sánchez-García EM, Gamallo R, Blanco-Moure A, Viejo MA, Amador L, **Anibarro L**. Toxicity and adherence to treatment for latent tuberculosis infection in patients with hematologic malignancies. **Infection** **2013; 41:903-907**. doi:10.1007/s15010-013-0489-0.
 10. Posada C, Pena A, **Anibarro L**, Pardavila RM, de la Torre C, González-Fernández A. Erythema induratum of Bazin induced by tuberculin skin test. **International Journal of Dermatology** **2013**: doi: 10.1111/ijd.12363.
 11. Cruz-Ferro E, Ursua-Díaz MI, Taboada-Rodríguez JA, Hervada-Vidal X, **Anibarro L**, Túnñez V. Epidemiology of tuberculosis in Galicia, Spain 16 years after the launch of the Galician tuberculosis programme. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases** **2014; 18(2):134-140**.
 12. **Anibarro L**, Pena A. Tuberculosis in Patients with Haematological Malignancies. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases** **2014 6 (1): e2014026**. DOI: 10.4084/MJHID.2014.026
 13. Cruz-Ferro E, Ursua-Díaz MI, Taboada-Rodríguez JA, Hervada-Vidal X, **Anibarro L**, Túnñez V. In reply to Effect of smear-negative pulmonary tuberculosis on transmission. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases** **2014; 18(6):751-753** (letter)