

Diagnóstico no bacteriológico de la tuberculosis. Indicadores de la respuesta inmune. Parte 2

González, Claudio D.⁷; Fruhwald, Gladys E.⁶; Duré, Roberto M.⁵; Armitano, Rita I.²; Amiano, Nicolás O.¹; García, Verónica E.¹; Cerqueiro, María Cristina⁴

Grupo de Estudio Diagnóstico de TB

Amiano, Nicolás O.¹; Armitano, Rita I.²; Bisero, Elsa D.³; Cerqueiro, María Cristina⁴; Duré, Roberto M.⁵; Fruhwald, Gladys E.⁶; García, Verónica E.¹; González, Claudio D.⁷; González, Norma E.⁸; Lombardero, Lorena A.³; Luque, Graciela F.³; Melillo, Karina C.³; Símboli, Norberto F.⁹

Recibido: 17/11/2021

Aceptado: 17/03/2022

Correspondencia

Claudio Daniel González

E-mail: (claudiodgonzalez57@gmail.com)

1. DIAGNÓSTICO SOBRE LA BASE DE CRITERIOS CLÍNICOS

Claudio Daniel González

El sistema de síntomas y signos más usado para el tamizaje de sospecha de tuberculosis (TB) fue aportado por la OMS. La presencia de fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso y tos se correlaciona con el 77% de sensibilidad y el 68% de especificidad diagnóstica en pacientes que reúnen la condición de VIH reactivos.¹ Asimismo, en pacientes VIH no reactivos, se ha comparado la capacidad de detección diagnóstica de los síntomas (tos, hemoptisis, fiebre, sudores nocturnos o pérdida de peso), de la radiología y de las pruebas moleculares de diagnóstico rápido, como el Xpert, el LAMP y el Truenat. Cualquiera de los síntomas de TB referidos alcanzó una sensibilidad del 71% y una especificidad del 64%, las anomalías radiológicas una sensibilidad y especificidad del 85% y el 98%, respectivamente, y las pruebas rápidas en adultos en riesgo, el 69% y el 99%.¹

2. DIAGNÓSTICO CON BASE EN IMÁGENES EN TÓRAX

El empleo de Rx simples de tórax ha sido preconizado desde hace mucho tiempo para el tamizaje de la población con sospecha de esta patología. La sensibilidad de la radiología en el diagnóstico de TB pulmonar oscila entre

¹ Investigador/a del CONICET. Laboratorio de Inmunidad y Tuberculosis del Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (IQUIBI-CEN), Universidad de Buenos Aires (UBA), Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

² Laboratorio de Micobacterias. Hospital General de Agudos Parmenio Piñero, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

³ Servicio de Pediatría. Sección Neumonología Infantil, Hospital Nacional Prof. Dr. Alejandro Posadas, El Palomar, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

⁴ Consultora de la Sección Tisiología. Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁵ Unidad de Broncoscopia, Hospital de Infecciosas Francisco J. Muñiz, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁶ Servicio de Neumonología de la Obra Social del Personal de Edificios de Renta y Horizontal (OSPERYH).

⁷ Unidad Neumotisiología, Hospital General de Agudos José M. Ramos Mejía, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁸ Unidad Neumotisiología, Hospital General de Niños Pedro de Elizalde, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

⁹ Servicio de Micobacterias del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

el 87% y el 98% y su especificidad en el 75%.² Como dato de interés adicional, se observa que los hallazgos radiológicos pueden aparecer aun antes que los cuatro síntomas citados. La vigencia de la radiología de tórax simple se explica porque al menos el 90% de los pacientes que, luego, se confirman en su bacteriología, tenían manifestaciones radiológicas ostensibles.^{2,3}

No obstante la accesibilidad del recurso radiológico, en ciertos colectivos, puede ser necesario un tamizaje de población en gran escala. A tales efectos, la iniciativa *Stop TB Partnership* recomienda por primera vez el uso de tres productos de *software* especializado de ayuda computarizada de detección (CAD) basados en inteligencia artificial, que proporcionan una interpretación automatizada y estandarizada de las radiografías digitales de tórax para radiólogos o telerradiografías. Los resultados se expresan como puntuaciones de anormalidad, se puede utilizar para la detección o el cribado y está limitado a las radiografías simples para la TB pulmonar en individuos de 15 años o más.^{4,5}

En el apartado sobre diagnóstico de TB en niños se describen la utilidad y las limitaciones de la radiología en el diagnóstico de TB.

3. DIAGNÓSTICO DE TB EN LOS PUNTOS DE ATENCIÓN DE CLÍNICA (POC)

Gladys Esther Fruhwald

En la necesidad de facilitar el acceso de los pacientes a los métodos de diagnóstico de TB, se ha propuesto este sistema de atención descentralizado (POC).⁶ Requiere de una mínima capacitación de personal y de un equipamiento de diagnóstico sencillo y de rápidos resultados.

Con el objetivo de lograr la detección precoz de la enfermedad, en especial en pacientes vulnerables como los portadores del VIH o los niños, la OMS se propone dar con un nuevo sistema que permita el diagnóstico sin muestras de esputo o con el uso de biomarcadores. Además, preconiza una prueba de cribado que permita identificar a los que necesitan de más pruebas, las que tal vez consistan en muestras de aliento, sangre u orina. En todos los casos, el método que reemplace a la prueba de esputo debería reunir una sensibilidad equiparable al sistema XPERT, ser de realización simple y, en lo posible, no requerir de energía o controles de temperatura.⁷

Las herramientas de cribado para identificar quiénes necesitan de más pruebas puede realizarse, o bien, por síntomas (tos, sudores nocturnos, pérdida de peso, fiebre y hemoptisis) o por la Rx de tórax.⁸ En el cribado por síntomas, las poblaciones de riesgo deberían categorizarse por comunidad (vecindarios empobrecidos, inmigrantes y personas con contacto directo con casos de TB), departamentos hospitalarios y centros de atención primaria; en el cribado de personas con antecedentes de enfermedad por VIH, desnutridos, diabéticos u otros grupos con inmunosupresión); lugar de residencia (centros de detención, albergues, centros de inmigrantes); lugar de trabajo (actividades con alto riesgo de adquirir TB como la minería, los trabajadores de la salud, etc.).⁹

El cribado por Rx de tórax portátil es un método sencillo y altamente sensible, como lo demuestra una experiencia en Kenia, donde se obtuvo un 92% de sensibilidad en pacientes con VIH y un 100% en aquellos sin esa dolencia, con una especificidad del 73%.¹⁰ En este caso, la Rx se muestra más sensible que el cribado por síntomas, en especial si se considera cualquiera de ellos.

Por último, es necesario destacar que, en los algoritmos diagnósticos diseñados con el uso de estos simples recursos, la mayor utilidad de la Rx se obtiene cuando es colocada en el inicio del algoritmo.¹¹ La combinación del cribado por radiología con el de síntomas, permitiría compensar la falta de datos en este último registro, que puede faltar o perderse, lo que parece ser más frecuente en las poblaciones precisamente más vulnerables. El agregado a ambos de una prueba molecular de confirmación parecería ser la estrategia ideal para el diagnóstico precoz de la TB en las unidades POC.¹² La utilización de un sistema radiológico digital de lectura automatizada podría ser utilizado para reducir el sesgo de la interpretación por el técnico a cargo.¹³

4. DIAGNÓSTICO A TRAVÉS DE MÉTODOS INVASIVOS

Roberto Miguel Duré

4.1 Función de la broncoscopia en el diagnóstico de la TB

Se han descrito cuatro colectivos con riesgo de presentar una TB pulmonar que tienen indicación de estudio por broncoscopia.¹⁴

- i. Pacientes con formas primarias, VIH negativos, por lo general niños.
- ii. Pacientes con formas primarias o posprimarias, de condición VIH positivos, por lo general con presentación radiológica atípica.
- iii. Pacientes de condición VIH negativos que tengan formas posprimarias, típicas.
- iv. Pacientes con fracaso de tratamiento y esputo no concluyente, con sospecha de resistencia a drogas de tratamiento.

Los pacientes del grupo 2 tienen un mayor riesgo de diseminación de su padecimiento y, además, la posibilidad de otras enfermedades marcadoras, de ahí de ser prioritario en ellos la utilización de este recurso. En los pacientes adultos del grupo 3, el riesgo de contagio será indefectiblemente bajo y la posibilidad de iniciar tratamiento empírico, según el criterio anteriormente expuesto, debería ser evaluada. Por último, en los niños, el examen de lavado gástrico debería realizarse como primera opción antes que una endoscopia y la decisión de iniciar tratamiento no debería demorarse en este grupo de riesgo.

Este análisis permitiría la indicación y uso racional de la endoscopia en formas pulmonares negativas, sin desatender los riesgos de mala evolución de cada grupo.¹⁵

Indicaciones de broncoscopia según presentación clínica

Las formas clínicas en las cuales la endoscopia ha demostrado su rédito son las siguientes:

- i. TB miliar, en general detectada en el grupo 2 y, en menor medida, en pacientes del grupo 3.
- ii. Formas de TB intratorácica linfadenopática, que se observa con frecuencia en los grupos 1 y 2.
- iii. Otras formas radiológicas, típicas o atípicas, por lo general, relacionadas con el grupo 3.
- iv. Pacientes asintomáticos con antecedentes de contacto de foco y TC compatible con imagen de árbol en brote. Esta es una nueva indicación a partir del análisis de imágenes topográficas. Si bien no existe evidencia para realizar un estudio invasivo, los casos aislados que se van hallando probablemente en un futuro justifiquen su realización.^{15, 16}

Para estas formas de presentación, los procedimientos disponibles son el cepillo bronquial (CB), la biopsia bronquial (BB), la punción transbronquial con aguja (PTBA), la biopsia transbronquial (BTB) y el lavado bronquioloalveolar (LBA).¹⁷⁻²⁴

Cepillado bronquial (CB)

Si bien el uso del LBA se ha extendido más que el CB para el diagnóstico de TB. No obstante, el rendimiento por estudio del frotis más el cultivo se sitúa entre el 43% y el 57%.^{15, 16}

Biopsia bronquial (BB)

El rendimiento de la biopsia bronquial con alguna de las imágenes endoscópicas citadas es del 53%.⁴² Si bien la prevalencia de TB endobronquial es baja, un 2,5% de los casos, debe mencionarse que las formas más frecuentes, la caseosa, la hiperémica-edematosa y la granular pueden, o bien, evolucionar a la forma fibroestenótica, o bien, resolver completamente dentro de los tres primeros meses de tratamiento.^{18, 19}

Punción transbronquial con aguja (PTB)

Se recomienda su uso en formas ganglionares mediastinales, en especial los grupos paratraqueal derecho, bronquiales e hiliares derechos y subcarinales, en ese orden, porque son los más accesibles a la punción transbronquial con aguja.¹⁹ Actualmente se preconiza las agujas histológicas n.º 19, la de Wang o de Schieppatti. En un trabajo sobre 84 pacientes VIH negativos, Bilacerogu alcanza el 75% de diagnóstico con ese método sumando el aspecto histológico con el cultivo de la biopsia (examen histológico, un 57% de rédito *per se*).²¹ Con ganglios predominantemente derechos, la sensibilidad es del 83%, la especificidad el 100%, el Valor predictivo de resultado negativo (VPRN) 38%, el VPRP 100% y la precisión del 85%.²¹ La utilidad de la biopsia endobronquial por ultrasonido (EBUS-TBNA), aunque poco difundido aún como método diagnóstico de TB, podría aumentar la rentabilidad de las punciones con aguja.²²

Biopsia transbronquial (BTB)

Las formas miliares o los infiltrados segmentarios son de alta especificidad en el diagnóstico de TBC, y siempre la muestra debe ser enviada para examen histológico (5 tomas) y cultivo. El rendimiento de la BTB en TB es del 73% y se apoya principalmente en el resultado histológico.²¹

Lavado bronquioloalveolar (LBA)

El LBA es el procedimiento endoscópico más utilizado en el diagnóstico de TB pulmonar con esputo negativo.

En estudios comparativos, el LBA contribuyó con un 30% al diagnóstico de TB frente al 21% del

lavado gástrico y el 16% del esputo posbroncoscopia en una muestra de 215 pacientes.²³

El LBA tuvo una sensibilidad del 89,7%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100%, un valor predictivo negativo del 94,6% y una precisión de la prueba del 96,3% en casos sospechosos de TB pulmonar con esputo/frotis y cultivo negativos.²⁴

4.2. Diagnóstico por medición de enzima adenosina deaminasa

Rita Armitano

La TB pleural constituye la manifestación extrapulmonar más frecuente de la infección por bacterias del complejo *M. tuberculosis* y se presenta con una frecuencia variable según el país, en hasta un 30% de los pacientes independientemente de la coinfección por VIH.

El estudio anatomopatológico y el cultivo de la biopsia pleural son los métodos diagnósticos de elección. La histopatología presenta una sensibilidad del 56%-78% y una especificidad del 95%, mientras que el cultivo posee una sensibilidad que oscila entre el 69% y el 97% y una especificidad del 96%.²⁵

La prueba de adenosina deaminasa (ADA) en líquido pleural es un examen diagnóstico útil, en especial en pacientes que proceden de ámbitos con una alta prevalencia de TB. Resultan numerosos los trabajos que apoyan su determinación como prueba complementaria en el diagnóstico de la pleuresía tuberculosa.

La enzima ADA interviene en el catabolismo de bases púricas, la proliferación y diferenciación de células linfoides y, en la maduración de macrófagos. Dicha enzima es producida por monocitos y macrófagos que catalizan la conversión de adenosina y deoxi-adenosina en inosina y deoxi-inosina, respectivamente. El nivel de ADA en el líquido pleural refleja la presencia de células en el compartimiento pleural, principalmente de linfocitos T activados.²⁶

Actualmente, el método de referencia es el descrito por Giusti, que se basa en la detección del amonio liberado en la reacción enzimática y su posterior cuantificación a partir de un compuesto coloreado.²⁶

La determinación de los parámetros de la prueba de ADA, al igual que cualquier otra prueba diagnóstica, se encuentra en relación directa con la

prevalencia de la enfermedad en cuestión y de otras que pueden influir en la población estudiada, con el diseño y con la metodología del estudio. Esto lleva a que existan diferentes valores de discriminación (puntos de corte) para esta prueba, que, en datos publicados en la bibliografía internacional, varían desde 30 U/L hasta 80 U/L. De acuerdo con las recomendaciones nacionales basadas en un trabajo realizado por la Red Nacional de Bacteriología de la TB, donde se investigaron un total de 151 pacientes con derrame pleural tuberculoso mediante el método colorimétrico manual de Galanti Giusti, un valor de ADA ≥ 60 U/L tendría una sensibilidad del 84% y una especificidad del 94% para el diagnóstico de pleuresía tuberculosa.²⁷ En coincidencia con este trabajo, en el Servicio de Micobacterias INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán, se ha demostrado que ese nivel de corte agrupa al 80% de los pacientes con TB pleural, por lo que un resultado inferior a este no descartaría el diagnóstico. Como desventaja del método, debe considerarse la presencia de resultados falsos positivos, como en el caso deempiemas no tuberculosos, de las proliferaciones malignas de células T, del lupus eritematoso sistémico y la pleuresía de la artritis reumatoide. En cualquier caso, el resultado deberá analizarse en la situación clínica puntual de referencia considerando siempre que el diagnóstico de certeza exige el examen microscópico y el cultivo que confirme la presencia del complejo *M. tuberculosis*.²⁷

En un estudio realizado en un laboratorio de referencia de la Red de Atención de la Tuberculosis de CABA durante el año 2016, se evaluó el rendimiento de un método automatizado para la determinación de ADA en líquido pleural.²⁸ Se procesaron un total de 26 muestras provenientes de pacientes con sospecha de pleuresía tuberculosa. Las muestras fueron separadas en dos alícuotas. Una de estas fue derivada al Servicio de Micobacterias INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán para la determinación por el método colorimétrico manual de Galanti y Giusti, y la alícuota restante fue procesada por el método automatizado DIAZIME con el autoanalizador Plataforma COBAS 6000 - Modulo C50, según instrucciones del fabricante, en el Laboratorio Central del Hospital General de Agudos Parmenio Piñero.²⁸ Los valores de corte empleados fueron método Galanti y Giusti: 60 UI/L 37 °C, y método DIAZIME: 30 UI/L 37 °C. Para calcular el índice Kappa, los valores promedio de cada una de las muestras fueron clasificados en las

siguientes categorías consenso: método Galanti y Giusti negativo: ≤ 50 UI/L 37 °C; valor *borderline*: 50-70 UI/L 37 °C; valor positivo: ≥ 70 UI/L 37 °C. Método DIAZIME: valor negativo: $<29,4$ UI/L 37 °C; valor *borderline*: 29,4-30,4 UI/L 37 °C; valor positivo: $>30,4$ UI/L 37 °C.

De las 26 muestras procesadas, 18 (69,2%) fueron negativas y 8 (30,8%) positivas por ambos métodos. No se obtuvieron resultados considerados *borderline* por ninguno de los dos métodos. La fuerza de la concordancia en la clasificación por categorías entre los dos métodos empleados fue excelente ($k = 1,000$).

Estos resultados sugieren la utilidad del método automatizado en la determinación de ADA en líquidos pleurales, ya que, además de su alta concordancia con el método de referencia, no se detectaron falsos positivos ni negativos en este trabajo.²⁸

Como otras ventajas de la determinación de ADA se destaca que es un método sencillo, fácil de implementar y rápido, con un tiempo promedio de resultado en 2 h, valor que puede reducirse aún más con el empleo de métodos automatizados, como el mencionado previamente, con la posibilidad de ampliar el número de muestras analizadas durante una jornada laboral. Como otras potenciales desventajas, además de los casos de falsos positivos y negativos mencionados anteriormente, debe contarse con la alteración de resultados por dificultades en la conservación y el transporte de la muestra, la presencia de hemólisis y la exposición a altas temperaturas. Una limitación de la investigación de ADA que merece ser subrayada es que el método no tiene una precisión aceptable en líquido cefalorraquídeo y en otras colecciones en serosas, debido esto al estrecho margen existente entre la normalidad y los puntos de corte que se postulan para esas muestras extrapleurales.²⁸

4.3. Diagnóstico de infección por análisis de la interferón gamma (IGRA)

Nicolás Amiano y Verónica García

La infección latente por *M. tuberculosis* (LTBI) es una infección subclínica definida sobre las bases de la respuesta inmune celular contra antígenos de la micobacteria. La identificación de LTBI es importante para implementar políticas de salud

pública de control de la enfermedad mediante la identificación de individuos con riesgo elevado de desarrollar TB activa. Actualmente no existe un ensayo que sea el método de referencia (*gold standard*) para identificar LTBI. La baja carga bacteriana tisular asociada con LTBI impide cualquier diagnóstico focalizado en identificar la bacteria o sus componentes. Así, el diagnóstico de LTBI reside en evidenciar la respuesta inmune celular del individuo contra antígenos micobacterianos. En Argentina, la prueba utilizada para diagnosticar LTBI utiliza el derivado proteico purificado (PPD), pero en los últimos años, en los países desarrollados, se implementaron los ensayos de liberación de interferón gama (IGRA). Estas pruebas surgieron de la búsqueda de antígenos en regiones exclusivas del genoma de *M. tuberculosis* (ausentes en *M. bovis* BCG u otras especies de micobacterias) como principales instrumentos para desarrollar nuevos métodos de diagnóstico. La base de estos ensayos reside en que las células T de individuos previamente sensibilizados con *M. tuberculosis* liberan interferón gama (IFN- γ) al ser reestimuladas con antígenos específicos del patógeno; los más utilizados son CFP-10 y ESAT-6.²⁹

Como los pacientes con TB activa están infectados con *M. tuberculosis*, han sido utilizados como estándar en los IGRA y la PPD para determinar la sensibilidad de estos ensayos, y generalmente los IGRA superan a la PPD. Así, en pacientes con TB activa la prueba cutánea es usualmente positiva casi en el 70% de los casos, mientras que los IGRA son positivos en el 80%-85% de los casos. ¿Es esta la sensibilidad real de estas pruebas de diagnóstico de infección latente? Quizás no, porque el estado del sistema inmune de individuos que progresaron a enfermedad activa es diferente al de sujetos con infección latente, lo que podría afectar los resultados de ensayos que se basan en el funcionamiento de la inmunidad mediada por células para detectar exposición previa a *M. tuberculosis*.³⁰

Los IGRA actualmente existentes en el mercado son los siguientes:

- I. T-SPOT.TB (Oxford Immunotech, UK). En este método, las células mononucleares de sangre periférica obtenidas por centrifugación son estimuladas con CFP-10 y ESAT-6 durante 16-24 h y mediante la técnica de ELISPOT se analiza el número de puntos (*spots*) que indican células T activadas productoras de IFN- γ contra los antígenos.

- II. QuantiFERON-TB Gold (QFT-QIAGEN, EE. UU., Alemania) y QuantiFERON-TB Gold-Plus (QIAGEN, EE. UU., Alemania). En este método, una muestra de sangre periférica del individuo es estimulada con antígenos específicos de *M. tuberculosis* durante 16-24 h. Posteriormente, se realiza la centrifugación y se determinan los niveles de IFN- γ en plasma por ELISA.
- III. LIOFeron®TB/LTBI (LIONEX GmbH, Alemania). El funcionamiento de esta prueba es similar a la del QFT-QIAGEN.
- IV. VIDAS® TB-IGRA *fully automated assay* (BIOMÉRIEUX, Francia)

Sin embargo, ni el ensayo de PPD ni los IGRA disponibles permiten discriminar entre TB activa y latente. Asimismo, estas pruebas tampoco pueden utilizarse para predecir si un individuo con LTBI desarrollará TB activa o si la terapia para LTBI puede ser efectiva para disminuir el riesgo de desarrollar TB activa. Un análisis realizado con 167 individuos (pacientes con TB y convivientes de pacientes) provenientes de hospitales de la ciudad de Buenos Aires mostró un porcentaje de concordancia del 78% entre QFT y PPD y un porcentaje de discordancia del 22% ($Kappa = 0,530$. $SE\ of\ kappa = 0,067$), lo que indica una fuerza de concordancia moderada.³¹

IGRA en la identificación de contactos infectados

El seguimiento de contactos de enfermos con TB y la identificación de sujetos LTBI luego de la exposición a individuos con TB activa es un componente importante en el control de la TB. Varios estudios han proporcionado diferentes estimaciones de la tasa de progresión a enfermedad activa dos años después de la conversión de PPD/IGRA, pero el riesgo general de por vida se describe generalmente como el 10%-15%.³² Aunque ciertos estudios han sugerido un riesgo más elevado de progresión a TB activa luego de un resultado IGRA positivo, esta diferencia no resultó significativa en estudios de metaanálisis comparativos. Por lo tanto, se podría utilizar PPD o IGRA para investigar contactos de TB activa. Sin embargo, en poblaciones cuyos contactos poseen antecedentes de vacunación con BCG, la mayor especificidad de los IGRA podría permitir una mejor orientación de la terapia preventiva. De todas formas, es importante destacar que la especificidad de la PPD se ve mínimamente afectada por la inmunización con BCG si esta va-

cuna es administrada antes del año de edad.³³ Por lo mencionado, los ensayos IGRA podrían ser empleados en adultos expuestos a pacientes con TB activa (por ejemplo, para seguimiento de contactos) y sus resultados serían más confiables en contactos vacunados con BCG después del año de edad.

IGRA para identificar infección latente en pacientes inmunocomprometidos

La infección con VIH aumenta significativamente el riesgo de que la LTBI progrese a enfermedad clínica. Numerosos estudios confirman que la sensibilidad de las pruebas IGRA se ve reducida en sujetos infectados con VIH, con hallazgos similares para la PPD.³⁴ Recuentos bajos de linfocitos T CD4 ($<200\text{ cé.l./}\mu\text{L}$) están asociados a resultados de ensayos IGRA negativos o indeterminados. No obstante, estudios de metaanálisis sugieren que la prueba T-SPOT.TB presenta mayor sensibilidad que el ensayo QFT en sujetos VIH positivos para el diagnóstico de TB activa. En contraste, otros estudios muestran que ninguna de las pruebas IGRA existentes han probado ser más sensibles que la PPD en la detección de LTBI en pacientes VIH positivos, y que las pruebas IGRA en general funcionan de manera similar a la PPD.³⁵

Los pacientes con enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID) —como la artritis reumatoidea, colitis ulcerosa, y enfermedad de Crohn, entre otras— poseen un riesgo incrementado de desarrollar TB activa debido a las terapias inmunosupresoras que reciben. Varios estudios han mostrado que los IGRA no parecen ser mejores que la PPD para diagnóstico de LTBI en pacientes IMID.³⁶ Sin embargo, aún faltan estudios de metaanálisis formales o estudios longitudinales del riesgo de TB activa en estos pacientes con IGRA positivos y negativos.

En nuestro país, en el Laboratorio de Inmunidad y Tuberculosis (IQUIBICEN, CONICET - UBA) se ha desarrollado un método diagnóstico de tipo IGRA (*Diagnos-TB*) similar a QuantiFERON pero mejorado por la inclusión de un tubo extra que permite la diferenciación de individuos LTBI de individuos sanos, pacientes con TB e individuos recientemente expuestos a *M. tuberculosis*, con una sensibilidad del 79% y una especificidad del 83%.³¹ El mismo será ofrecido en un futuro próximo como Servicio Tecnológico de Alto Nivel (STAN - IQUIBICEN: www.iqubicen.fcen.uba.ar) para la comunidad a un costo netamente inferior al de las pruebas IGRA importadas. Paralelamente, se comenzarán los trámites frente a ANMAT para su aprobación.

5. EL FUTURO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TB. MÉTODOS EN INVESTIGACIÓN

María Cristina Cerqueiro

La medicina traslacional de este siglo nos ha traído grandes avances en el diagnóstico de la TB, gracias al traslado de descubrimientos realizados en la investigación básica a la práctica médica. Este proceso es lento y suele plantear muchos desafíos. A medida que nuevas pruebas surgen no es suficiente identificar variantes de significación estadística, la relevancia clínica debe estar respaldada en condiciones de validez y utilidad, en la rentabilidad, la no invasividad, la eficacia y la reducción de riesgos. La OMS utiliza a esos efectos los criterios de perfil de producto objetivo (TPP).⁷ Por ejemplo, para identificar la progresión a enfermedad se exige al método o componente que alcance una precisión mínima de sensibilidad mayor o igual al 75% y una especificidad mayor igual al 90%; para una nueva prueba de diagnóstico, se estipula una sensibilidad del 65% y una especificidad del 98%; para el cribaje, una sensibilidad mínima mayor o igual al 95% y una especificidad mayor o igual a 80%, con un costo menor o igual a USD 2 para una prueba no basada en esputo y que pueda aplicarse en los POC.

Para mejorar el diagnóstico rápido de la TB, son cruciales nuevas herramientas: pruebas no invasivas y no basadas en esputo, y dispositivos para su aplicación de manejo sencillo, portables y asequibles, además la mejora de las pruebas ya existentes. La investigación traslacional apunta al progreso en la prevención y gestión de todo el espectro de la TB, existe una necesidad apremiante de inversión y apoyo para fortalecer la capacidad de investigación y su aplicación en el campo asistencial.

El diagnóstico de la TB podría mejorarse, especialmente en los lugares con mayor incidencia de TB, con muestras clínicas de fácil acceso, como orina, materia fecal, hisopos orales, aire o aerosoles exhalados y la implementación de pruebas en los POC que no requieran una fuente de energía, baratos y fáciles de usar.³⁷ Además, tales pruebas de diagnóstico deben ser ampliamente aplicables a todos los tipos de población, incluidos los niños y los individuos inmunocomprometidos, que, a menudo, presenta esputos negativos o tienden a tener presentaciones atípicas, lo que compromete el rendimiento de las NAAT más rápidas.

LAS PLATAFORMAS “ÓMICAS” Y SUS TÉCNICAS DE APLICACIÓN

El diagnóstico de la TB requiere el conocimiento del complejo conjunto de interacciones huésped-patógeno, proceso incompletamente dilucidado hasta ahora. Los avances científicos en su conocimiento y la aplicación de tecnologías han facilitado el desarrollo de herramientas y plataformas de todo el sistema biológico. Estos enfoques «ómicos» se usan en la búsqueda de pruebas de diagnóstico de la infección tuberculosa, su progresión a enfermedad, el monitoreo de la eficacia y resultados del tratamiento y para mejorar la comprensión de la patogénesis de la enfermedad y su virulencia en la aplicación en vacunas y nuevas terapéuticas.³⁸

Los avances desde 2015 en **genómica** han permitido el uso de la secuenciación del genoma completo (WGS) y el descubrimiento de nuevos mecanismos biológicos en la TB. A diferencia de las técnicas serológicas, esta herramienta de diagnóstico puede discriminar entre reinfección vs. recaída de TB, confirmar la presencia de infección actual, proveer información para la caracterización epidemiológica y el rastreo de la transmisión.³⁹

La **epigenómica** estudia cambios en la función de los genes sin cambios en la secuencia, por ejemplo, los efectos no específicos del bacilo de Calmette-Guérin o la sensibilidad Mendeliana a las micobacterias.⁴⁰

La **proteómica** investiga la dinámica de los productos proteicos codificados por el genoma (proteoma), facilitado últimamente con la espectrometría de masas de proteínas (MS).⁴¹

Los enfoques **transcriptómicos** investigan los patrones de expresión génica para derivar firmas moleculares del huésped y fisiología del patógeno. Utilizan métodos de cuantificación de ARN, como la PCR de transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR) y la secuenciación de ARN (RNA-Seq). Analizan el ARN ribosómico (rRNA) para detectar viabilidad del bacilo, la regulación génica del micro ARN (miRNA) con la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS), y también las firmas celulares obtenidas desde bases de datos de ontología génica (GO) y citometría de flujo.⁴²

La infección de las células inmunes del huésped por *M. tuberculosis* causa varios cambios en el metabolismo, el de la glucosa y los lípidos es fundamental para definir el destino de la función de la célula huésped en el contexto de la supervivencia

de las micobacterias dentro del granuloma.³⁹ La **metabolómica** hace foco en la comprensión de las interacciones que ocurren en el entorno de enfermedad. Permite identificar metabolitos con efectos activos y pasivos sobre fenotipos de interés, caracteriza a los metabolitos de moléculas pequeñas en los sistemas biológicos, su participación en diversos procesos biológicos: la diferenciación y maduración celular, la señalización de la insulina, la supervivencia de las células T, transferencia de energía, las respuestas inmunes de los macrófagos y la comunicación de célula a célula.⁴³ La **MS** y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) son las técnicas utilizadas.

La **fluxómica** estudia la dinámica de las moléculas, mide el fenotipo metabólico del sistema biológico y proporciona una identificación los flujos de carbono y nitrógeno en el huésped.³⁸

BIOMARCADORES

El descubrimiento de biomarcadores puede basarse en metodologías diferentes, como las técnicas de imagen que muestran la fluctuación de una sustancia o la alteración en la estructura y la función (el CAD, las técnicas bioquímicas o las tecnologías ómicas, por citar algunos). Un biomarcador podría ser una célula o una molécula detectable en una muestra biológica recolectada del cuerpo que expresa exclusivamente o diferencialmente al *M. tuberculosis* o moléculas del huésped que se expresan diferencialmente en respuesta a la infección por *M. tuberculosis*.³⁹ Un ejemplo de lo que se utiliza actualmente en el campo de la TB sería el IFN- γ cuantificado por IGRA, el antígeno LAM en orina o el bacilo de Koch en la baciloscopia.

En los últimos 20 años, de los miles de biomarcadores reportados en la bibliografía, solo unos pocos ofrecen herramientas prometedoras en el momento de la toma de decisiones clínicas en TB. El enfoque ómico es un método de alto rendimiento que permite adquirir biomarcadores de múltiples dimensiones y en un solo paso.

Los biomarcadores bacterianos pueden derivar del análisis de sus genes (ADN urinario libre de células), perfiles transcriptómicos o firmas proteómicas. ESAT, CFP-10, Rv3615c, Rv3798c, MPT64, lipoproteínas, ácidos micólicos o antígenos en compuestos volátiles son detectables en esputo, plasma, aire espirado u orina.^{39, 40}

Los exosomas derivados de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtbexo) son un tipo de vesícula bioactiva que se producen por la brotación interna de los endosomas y están presentes en fluidos biológicos. La preliminar evidencia reciente sugiere que los exosomas desempeñan un papel en la comunicación de célula a célula, y modulan las respuestas inmunes e inflamatorias del huésped.^{39, 44}

Los biomarcadores del huésped estudian firmas inmunológicas celulares que tienen una alta sensibilidad diagnóstica y especificidad para la TB activa y distinguen la infección activa de latente, la expresión de antígenos en las células T, marcadores de activación, de memoria o proliferación, donde intervienen interleucinas, citoquinas diversas, el nivel de HLA-DR o moléculas enzimáticas que intervienen en las vías de señalización.^{39, 40}

Genes y firmas o registros transcripcionales de ARN, en diversos materiales, podrían distinguir la infección latente de la TB activa y predecir la progresión a enfermedad.⁴² Por ejemplo, la combinación de monocitos y macrófagos y su expresión relativa de miARN, brindan una visión más reciente sobre el mecanismo que genera la supervivencia del bacilo, la manipulación de la defensa del huésped, y el origen de la infección latente y la resistencia a la enfermedad.

La integración de múltiples niveles ómicos (*multi-omic integration*), que representan múltiples niveles de organización biológica, permite realizar una reconstrucción más precisa de las redes moleculares dinámicas que sustentan los estados sanos y enfermos, utilizando aplicaciones de inteligencia artificial con una variedad de enfoques estadísticos y de aprendizaje automático (*machine learning*).⁴²

Desde los sistemas de diagnóstico molecular, los ensayos cromatográficos de flujo lateral, la tecnología a base de plásmidos, pasando por el análisis de gases volátiles (Aenose) o el procesamiento por inteligencia artificial, la búsqueda de futuros biomarcadores de TB deberá estar encuadrada en el principio de “medicina centrada en el paciente” que propone la medicina traslacional.

DISPOSITIVOS

En los últimos años el desarrollo de investigaciones en plataformas de diagnóstico POC ha mostrado muchas ventajas en su proceso de miniaturización. Los micro/nanodispositivos basados en plataformas en chips (LOC) con técnicas micro-

fluídicas también muestran alta sensibilidad, alto rendimiento y resultados precisos, así como bajo costo y portabilidad en un formato compacto.⁴⁴ Aún se encuentran en sus primeras etapas, como el **ensayo inmuno-cromatográfico de flujo lateral (LFA)**, que utiliza membrana porosa y otras nano-tecnologías portables (Oxford Nanopore Technologies-ONT).

Los **dispositivos analíticos basados en papel (μ PAD electroquímicos)**, representan la mayor parte de los dispositivos POC porque el papel es un sustrato biocompatible y de bajo costo con alta factibilidad para integrar diferentes módulos de función, lo que favorece su uso en el diagnóstico de muestras biológicas y la identificación de biomarcadores. Otros dispositivos incluyen el desarrollo de **bioensayos**, la **citometría de flujo**, los ensayos basados en **perlas de Luminex** y los **inmunoensayos múltiples electro-quimioluminiscentes** (Meso Scale Discovery, MSD), los cuales han logrado un gran éxito en la detección de múltiples citoquinas en muestras de suero y plasma.⁴⁴

Los **aptámeros**, por su parte, son ácidos nucleicos cortos de una sola cadena que se pliegan en estructuras en tres dimensiones específicas, lo que les permite unirse a moléculas blanco a través de diferentes procesamientos, por ejemplo, la detección de IFN- γ con biosensores transistores de efecto de campo de grafeno (GFET) o con LFA.⁴⁵

El ensayo de detección de ácidos nucleicos basado en repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) que emplea la actividad de transescisión **CAS** (SHERLOCK y DETECTR) es un método de edición genómica que funciona como tijeras moleculares que cortan y modifican el ADN bacteriano con un alto grado de precisión y especificidad; su descubrimiento mereció el premio Nobel en 2020.

CRISPR-MTB detecta directamente *M. tuberculosis* en muestras clínicas, incluido esputo, LBA, LCR, líquido pleural, ascitis y pus con sensibilidad mejorada (es decir, con una copia casi única), requiere menos volumen de muestra y resultado en menos tiempo. CRISPR/Cas9 y CRISPR/Cas12a detectan ADN o ARN y se visualizan con señal luminiscente azul. También se han detectado citoquinas que se visualizan con LFA.⁴⁶

La implementación a gran escala de nuevas pruebas diagnósticas en aplicaciones clínicas y en salud pública todavía es limitada por una serie

de factores: la falta de soluciones estandarizadas, los requisitos técnicos de los laboratorios, altos costos asociados con la implementación y el mantenimiento de estas tecnologías moleculares, la infraestructura de Internet y la computación en la nube.⁴⁷

Esperamos que abordar estas barreras mejore los resultados de los pacientes, pero aún se necesita una verdadera prueba POC para superar los desafíos restantes, como la preparación de muestras y las demandas de recursos humanos.

Conflictos de intereses

Los autores de este trabajo declaran no poseer conflicto de interés alguno.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 2: screening - systematic screening for tuberculosis disease. Geneva: World Health Organization; 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022614>
2. World Health Organization. Chest radiography in tuberculosis detection: summary of current WHO recommendations and guidance on programmatic approaches. Geneva: World Health Organization; 2016. WHO/HTM/TB/2016. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241511506>
3. Frascella B, Richards AS, Sossen B, et al. Subclinical tuberculosis disease - a review and analysis of prevalence surveys to inform definitions, burden, associations and screening methodology. Clin Infect Dis. 2021;73:e830-e841. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1402>.
4. Stop TB Partnership and FIND resource center on computer-aided detection products for the diagnosis of tuberculosis. AI4HLTH website. En: <https://www.ai4hlth.org/>
5. Qin ZZ, Naheyan T, Ruhwald M et al. A new resource on artificial intelligence powered computer automated detection software products for tuberculosis programmes and implementers. Tuberculosis 2021;127:102049. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102049>.
6. Schito M, Peter TF, Cavanaugh S et al. Opportunities and challenges for cost-efficient implementation of new Point-of-Care diagnostics for HIV y Tuberculosis. J Infect Dis. 2012;205(Suppl. 2):-S169-S180. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis044>
7. World Health Organization. High-priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting. Geneva, Switzerland: WHO/HTM/TB/2014.18. World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/135617>
8. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 2: screening - systematic screening for tuberculosis disease. Geneva: World Health Organization; 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240022676> 74
9. World Health Organization. Systematic screening for active tuberculosis: principles and recommendations. WHO/HTM/TB/2013.04. 31. World Health Organization <https://apps.who.int/iris/handle/10665/84971>

10. van't Hoog AH, Meme HK, Laserson KF et al. Screening Strategies for Tuberculosis Prevalence Surveys: The Value of Chest Radiography and Symptoms. *PLoS ONE* 2012; 7(7): e38691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038691>
11. Theron G, Pooran A, Peter J et al. Do adjunct tuberculosis test, when combined Xpert MTB/RIF, improve accuracy and the cost of diagnosis in the resource-poor setting? *Eur Respir J*. 2012; 40:161-8. <https://doi.org/10.1183/09031936.00145511>
12. Philipsen RHHM, Sánchez CI, Maduskar P et al. Automated chest-radiography as a triage for Xpert testing in a resource-constrained setting: a prospective study of diagnostic accuracy and cost. *Sci Rep*. 2015; 5:12215. <https://doi.org/10.1038/srep12215>. 35.
13. Hogeweg L, Sánchez CI, Maduskar P et al. Automatic detection of tuberculosis in chest radiographs using a combination of textural, focal, and shape abnormality analysis. *IEEE Trans Med Imaging*. 2015;34:2429-42. <https://doi.org/10.1109/TMI.2015.2405761>.
14. Long R. Smear negative pulmonary tuberculosis in industrialized countries. *Chest* 2001;120:330-4. <https://doi.org/10.1378/chest.120.2.330>
15. Willcox PA, Potgieter PD, Bateman ED, Benatar SD. Rapid diagnosis of sputum negative miliary Tuberculosis using flexible fibreoptic bronchoscope. *Thorax* 1986;41:681-4. <https://doi.org/10.1136/thx.41.9.681>.
16. Willcox PA, Benatar SR, Porgierter PD. Use of flexible fiberoptic bronchoscope in the diagnosis of sputum-negative tuberculosis. *Thorax* 1982;37:598-601. <https://doi.org/10.1136/thx.37.8.598>
17. Kim YW, Kwon BS, Lim SY et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage and bronchial washing in sputum-scarce or smear-negative cases with suspected pulmonary tuberculosis: a randomized study. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26:911-6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.013>. 75.
18. Kumar R, Gupta N. Role of bronchoscopy in evaluation of cases with sputum smear negative pulmonary tuberculosis, interstitial lung disease and lung malignancy: a retrospective study of 712 cases. *Indian J Tuberc*. 2015;62:36-42. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2015.02.006>.
19. Baran R, Tor M, Tahaoglu K, Ozvaran K, Kir A, Kizkin O, Turker H. Intrathoracic tuberculosis lymphadenopathy: clinical and bronchoscopic features in 17 adults without parenchymal lesions. *Thorax* 1996;51:87-9. <https://doi.org/10.1136/thx.51.1.87>
20. Chung HS; Lee JH. Bronchoscopic assessment of the evolution of endobronchial tuberculosis. *Chest* 2000;117:385-2. <https://doi.org/10.1378/chest.117.2.385>
21. Bilaceroglu S, Günel O, Eriş N, Çağırıcı U, Mehta AC. Transbronchial needle aspiration in diagnosing intrathoracic tuberculous lymphadenitis. *Chest* 2004; 126:259-67. <https://doi.org/10.1378/chest.126.1.259>
22. Lin SM, Chung FT, Huang CD et al. Diagnostic value of endobronchial ultrasonography for pulmonary tuberculosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;138:79-84. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.04.004>.
23. Dickson SJ, Brent A, Davidson RN, Wall R. Comparison of bronchoscopy and gastric washings in the investigation of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2003;37:1649-53. <https://doi.org/10.1086/379716>
24. Ahmad M, Ibrahim WH, Sarafandi SA et al. Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in the subset of patients with negative sputum/smear and mycobacterial culture and a suspicion of pulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2019;82:96-101. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.03.021>.
25. Shaw JA, Diacon AH, Koegelenberg CFN. Tuberculous pleural effusion. *Invited Review Respirology*. 2019;24(10):962-71. <https://doi.org/10.1111/resp.13671>
26. Giusti G. "ADA in Bergmeyer H.V" ed, *Methods of enzymatic analysis*, New York Academic Press Inc, 1974; pp: 1092-1099.6. 76
27. Zerbini E, Imaz MS, R. Franco R et al. Utilidad de la determinación de la actividad de Adenosin Deaminasa en el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar. IX Congreso Argentino de Microbiología, 2001
28. Armitano RI, Cordoma NS, Pantazis S, et al. Pleuresía tuberculosa. Evaluación del rendimiento de un método automatizado para la determinación de Adenosina Deaminasa en líquido pleural. VIII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínicas SADEBAC - II Jornada de Micología Clínica - I Jornada de Parasitología Clínica, noviembre de 2018.
29. Carranza C, Pedraza-Sanchez S, de Oyarzabal-Mendez E, Torres, M. Diagnosis for Latent Tuberculosis Infection: New Alternatives. *Front Immunol*. 2020;11:2006. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02006>
30. Schluger, NW. Advances in the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. *Semin. Respir Crit Care Med* 2013;34:60-6. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1333545>
31. Amiano NO, Morelli MP, Pellegrini JM, et al. IFN- γ and IgG Responses to Mycobacterium Tuberculosis Latency Antigen Rv2626c Differentiate Remote from Recent Tuberculosis Infection. *Sci Rep* 2020;10:7472. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64428-z>
32. Herrera V, Perry S, Parsonnet J, Banaei N. Clinical Application and Limitations of Interferon- Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection. *Clin Infect* 2011;52:1031-7. <https://doi.org/10.1093/cid/cir068>
33. 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.
34. Cattamanchi, A.; Smith, R.; Steingart, K. R. et al. Interferon-Gamma Release Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection in HIV-Infected Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2011;56:230-8. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31820b07ab77>
35. Pai M; Denkinger C M; Kik SV et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Clin Microbiol Rev* 2014;27:3-20. <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-13>.
36. Smith R, Cattamanchi A, Steingart KR, et al. Interferon- γ Release Assays for Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Evidence in Immune-Mediated Inflammatory Disorders. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23:377-84. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283474d62>
37. Nathavitharana RR, Garcia-Basteiro AL, Ruhwald M, Cobelens F, Theron G. Reimagining the status quo: How close are we to rapid sputum-free tuberculosis diagnostics for all? *EBioMedicine*. 2022;78:103939. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103939>.
38. Borah K, Xu Y, McFadden J. Dissecting Host-Pathogen Interactions in TB Using Systems Based Omic Approaches. *Front Immunol* 2021;12:762315. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.762315>

39. Kanabalan RD, Lee LJ, Lee TY et al. Human tuberculosis and *Mycobacterium tuberculosis* complex: A review on genetic diversity, pathogenesis and omics approaches in host biomarkers discovery. *Microbiological Research* 2021;246:126674. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126674>.
40. Kontsevaya I, Lange C, Comella-del-Barrio P, et al. Perspectives for systems biology in the management of tuberculosis. *Eur Respir Rev* 2021;30:200377 <https://doi.org/10.1183/16000617.0377-2020>
41. Guo J, Zhang X, Chen X and Cai Y. Proteomics in Biomarker Discovery for Tuberculosis: Current Status and Future Perspectives. *Front Microbiol.* 2022;13:845229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.845229>
42. Kaforou M, Broderick C, Vito O, Levin M, Scriba TJ, Seddon JA. Transcriptomics for child and adolescent tuberculosis. *Immunol Rev* 2022;309:97-122. <https://doi.org/10.1111/imr.13116>.
43. Gong W and Wu X. Differential Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection and Active Tuberculosis: A Key to a Successful Tuberculosis Control Strategy. *Front Microbiol* 2021;12:745592. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.745592>
44. Hong JM, Lee H, Menob NV, Lim CT, Lee LP, Ong CW. Point-of-care diagnostic tests for tuberculosis disease. *Sci Transl Med* 2022;14(639):eabj4124. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj4124>.
45. Roy S, Arshad F, Eissa S et al. Recent developments towards portable point-of care diagnostic devices for pathogen detection. *Sens Diagn.* 2022;1:87-105. <https://doi.org/10.1039/d1sd00017a>
46. Rahman R, Majumder TR, Apu AI, Paul AK, Afrose A, Dash BK. CRISPR-Based Programmable Nucleic Acid-Binding Protein Technology Can Specifically Detect Fatal Tropical Disease-Causing Pathogens. *Journal of Tropical Medicine* 2022; 5390685:1-12. <https://doi.org/10.1155/2022/5390685>
47. Abdulgader SM, Okunola AO, Ndlangalavu G et al. Diagnosing Tuberculosis: What Do New Technologies Allow Us to (Not) Do? *Respiration* 2022;101:797-813. <https://doi.org/10.1159/000525142>