

Quantiferon®

Screening di popolazioni ospedaliere mediante test Quantiferon® per la valutazione dell'infezione da *M. Tuberculosis*

Magrini A.

Coppeta L.

Pietroiusti A.

Pannunzio L.

Babbucci A.

Università degli Studi di Roma Tor Vergata

Bergamaschi E.

Università degli Studi di Parma

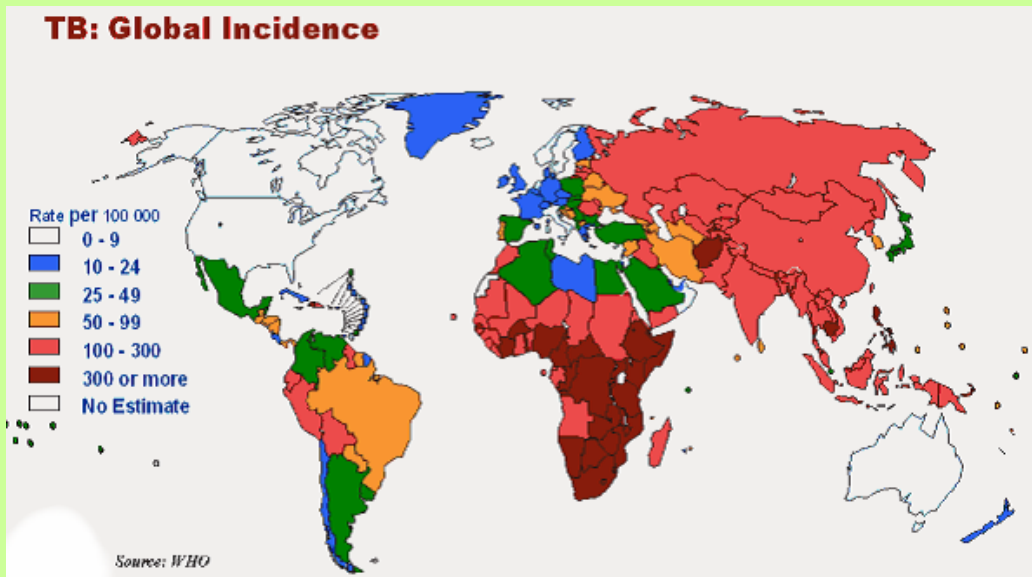
Bergamaschi A.

Università Cattolica del Sacro Cuore - Roma

La tubercolosi

nel MONDO

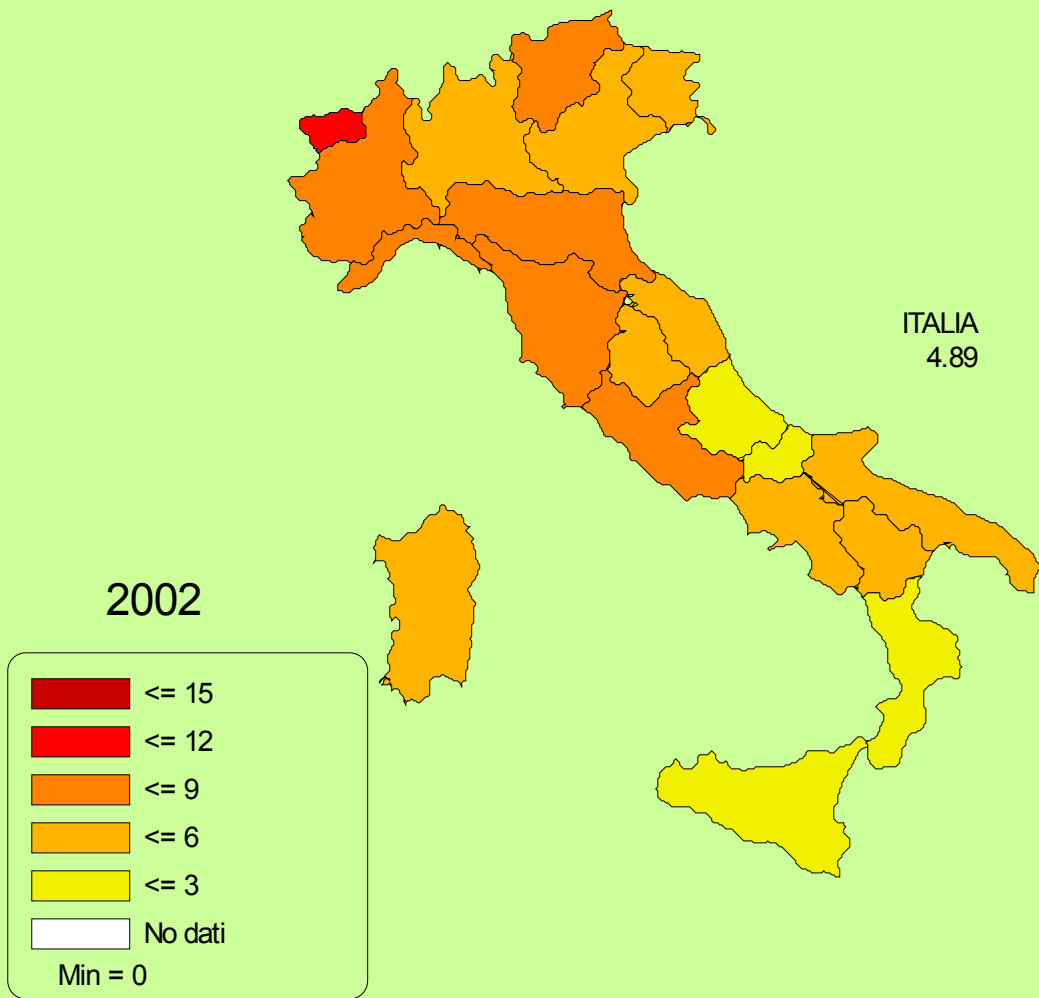
- 2.000.000 morti all'anno
- 8.000.000 nuovi casi all'anno
- 1/3 della popolazione mondiale infettato



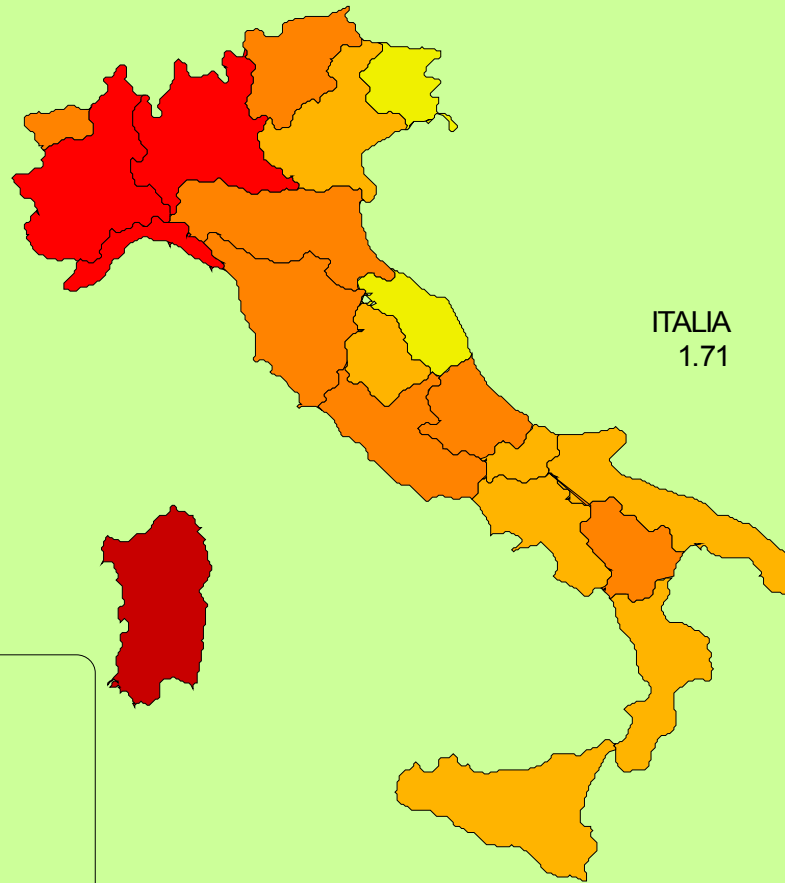
in ITALIA

- 4.287 casi notificati nel 2001

Tasso std tubercolosi polmonare M+F



Tasso dimissioni tubercolosi M+F



ITALIA
1.71

2002



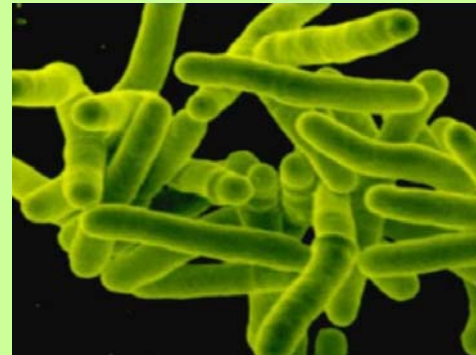
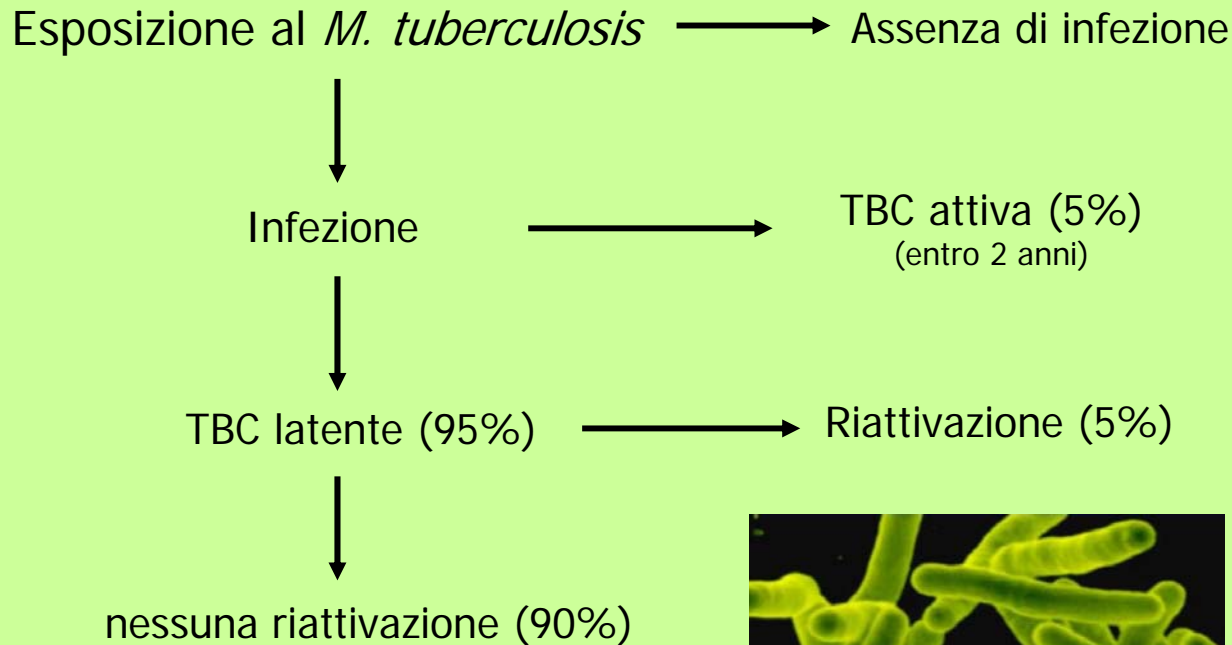
Infezione da *M. tuberculosis*

Isolamento
del
Micobatterio

- Malattia tubercolare
 - se il sistema immunitario non riesce a controllare l'infezione
- Infezione latente (assenza di malattia - ITBL)
 - se l'infezione rimane sotto il controllo del sistema immunitario

Test
di
Mantoux

M. tuberculosis, infezione



E' stato stimato che circa 1/3 della popolazione mondiale ospita il MTB allo stato di latenza.

Le stime dell'OMS indicano per l'Italia una prevalenza di ITBL del 12%.

Nei soggetti immunocompetenti con ITBL il rischio di sviluppare una malattia attiva è del 10% nel corso dell'intera vita, evenienza che nella metà dei casi si verifica nei primi 2-5 anni dall'esposizione/infezione.

In Italia, la tutela dei soggetti venuti a contatto con malati di TBC in fase attiva prevede l'esecuzione di un test cutaneo al PPD (G.U. 18/2/99: "Documento di linee-guida per il controllo della malattia tubercolare").

Diagnosi di ITBL (infezione tubercolare latente)

Test cutaneo tubercolinico (intradermo di Mantoux)

Test QuantiFERON-TB

T-Spot-TB

Test cutaneo tubercolinico

Il test cutaneo alla tubercolina (TCT, noto anche come test di Mantoux) è probabilmente il più antico dei presidi diagnostici sviluppati nel corso del diciannovesimo secolo ancora in uso sostanzialmente immutato nella pratica clinica.

Il suo utilizzo per l'identificazione della ITBL fu inizialmente descritto da von Pirquet nel 1907.

- Test in vivo
- 2 accessi
- Operatore-dipendente
- Cross-reattività con BCG e NTM
- Effetto booster
- Antigeni: PPD
- Risposta: ipersensibilità ritardata
- Risultato: infiltrato cutaneo
- **Sensibilità:** 75-90% nella popolazione generale
40-60% HIV+

il TCT presenta una bassa specificità a causa della cross reazione antigenica del derivato proteico purificato (PPD) con i ceppi vaccinali di *M. bovis* BCG, e con i micobatteri non tubercolari (MNTB) eventualmente presenti nell'ambiente.

Reazioni falso-positive alla tubercolina

Pregressa vaccinazione con
bacillo di Calmette-Guérin (BCG)

Infezione con micobatteri
non tubercolari



Errori nell'esecuzione
e/o lettura del test

Reazioni falso-negative alla tuberculina

Fattori relativi al soggetto

- infezioni
- disordini metabolici
- fattori nutrizionali
- terapia immunosoppressiva
- età
- stress
- recente infezione micobatterica

Fattori relativi alla tuberculina

- conservazione inadeguata
- diluizioni improprie
- contaminazione

Fattori relativi alla modalità di esecuzione del test

- dose inadeguata dell'antigene
- iniezione troppo profonda o troppo superficiale
- somministrazione ritardata rispetto alla preparazione della siringa

Fattori relativi alla lettura del test

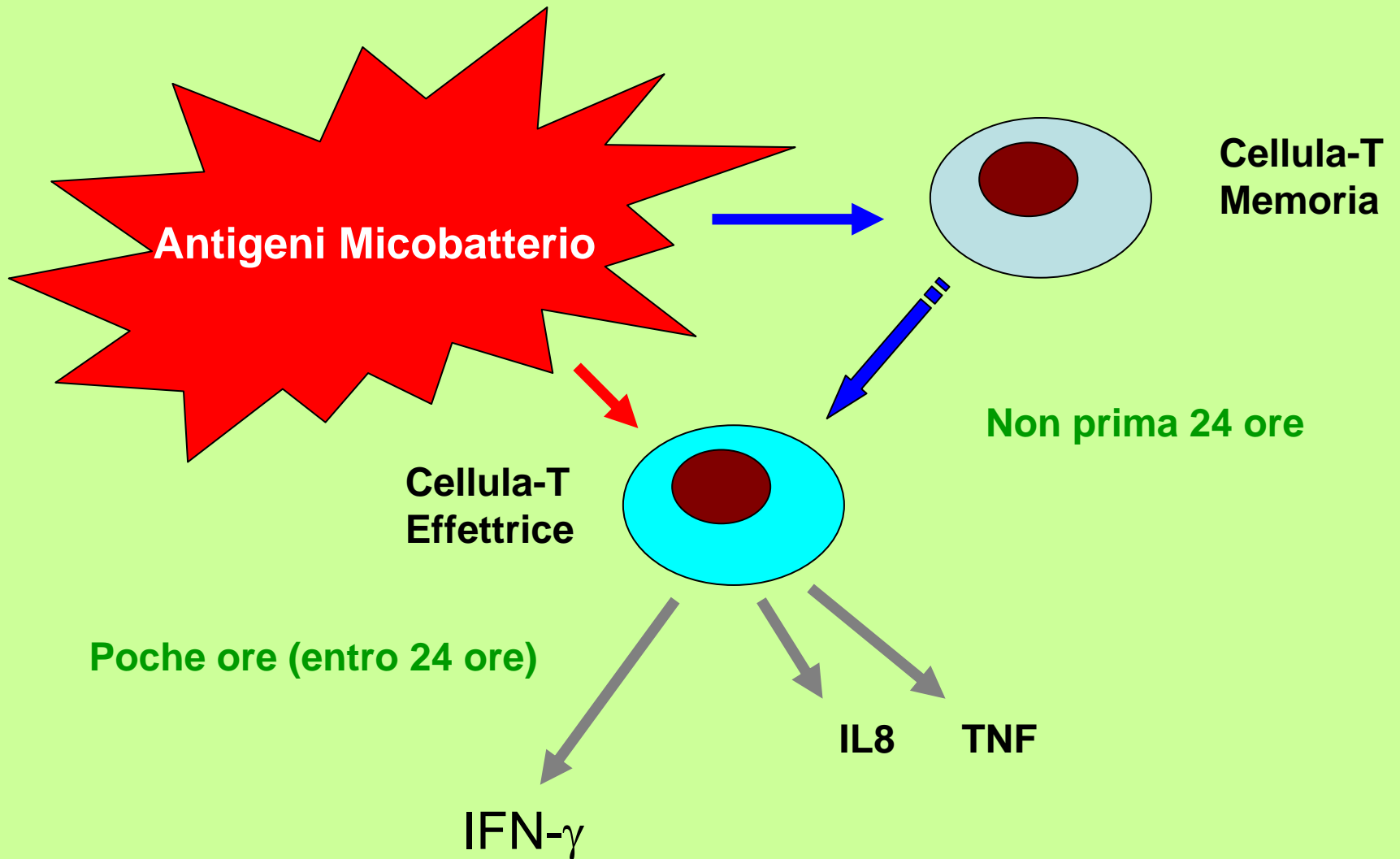
- lettore inesperto
- condizionamento del lettore
- lettura errata

QuantiFERON-TB

- Sangue venoso
- Misura la quantità di IFN- γ prodotta dai linfociti T in risposta ad antigeni specifici (ESAT-6 e CFP10 prodotti genici) del gene RD1)
- RD1 non presente in NTM né in BCG

Produzione di interferone- γ (IFN- γ)

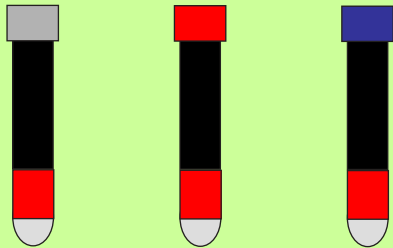
- L'infezione tubercolare stimola la risposta della cellule T
- Le cellule-T attivate secernono citochine
 - IFN- γ
 - TNF
 - IL8
- Le cellule-T effettrici producono IFN- γ entro poche ore dalla stimolazione
- Le cellule-T memoria devono prima proliferare trasformandosi in cellule effettrici, non sono quindi in grado di produrre IFN- γ prima di 24h
- L'IFN- γ non è normalmente presente in circolo, è stabile e misurabile



IFN- γ non è normalmente presente in circolo, è stabile e misurabile

Metodo ELISA *in-tube*

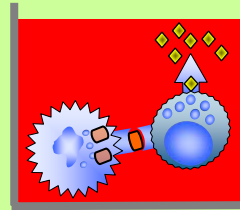
Raccolta del sangue in provette eparinate



K neg

ESAT6 + CFP10

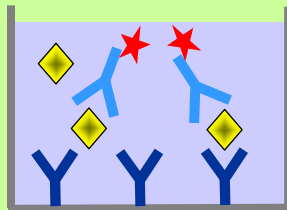
mitogeno



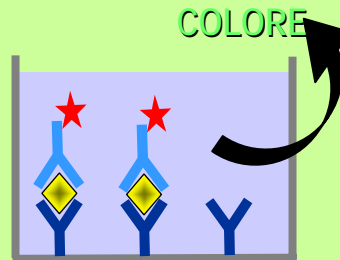
Incubazione per 16-24h a 37°C



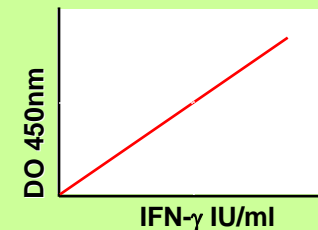
centrifugazione



Recupero del plasma e dosaggio dell'IFN- γ ('sandwich' ELISA, incubazione 120 min)



Lavaggio, aggiunta di substrato e lettura



Misura della DO e dosaggio dell'IFN- γ contro una curva di taratura

I test basati sull'interferone- γ

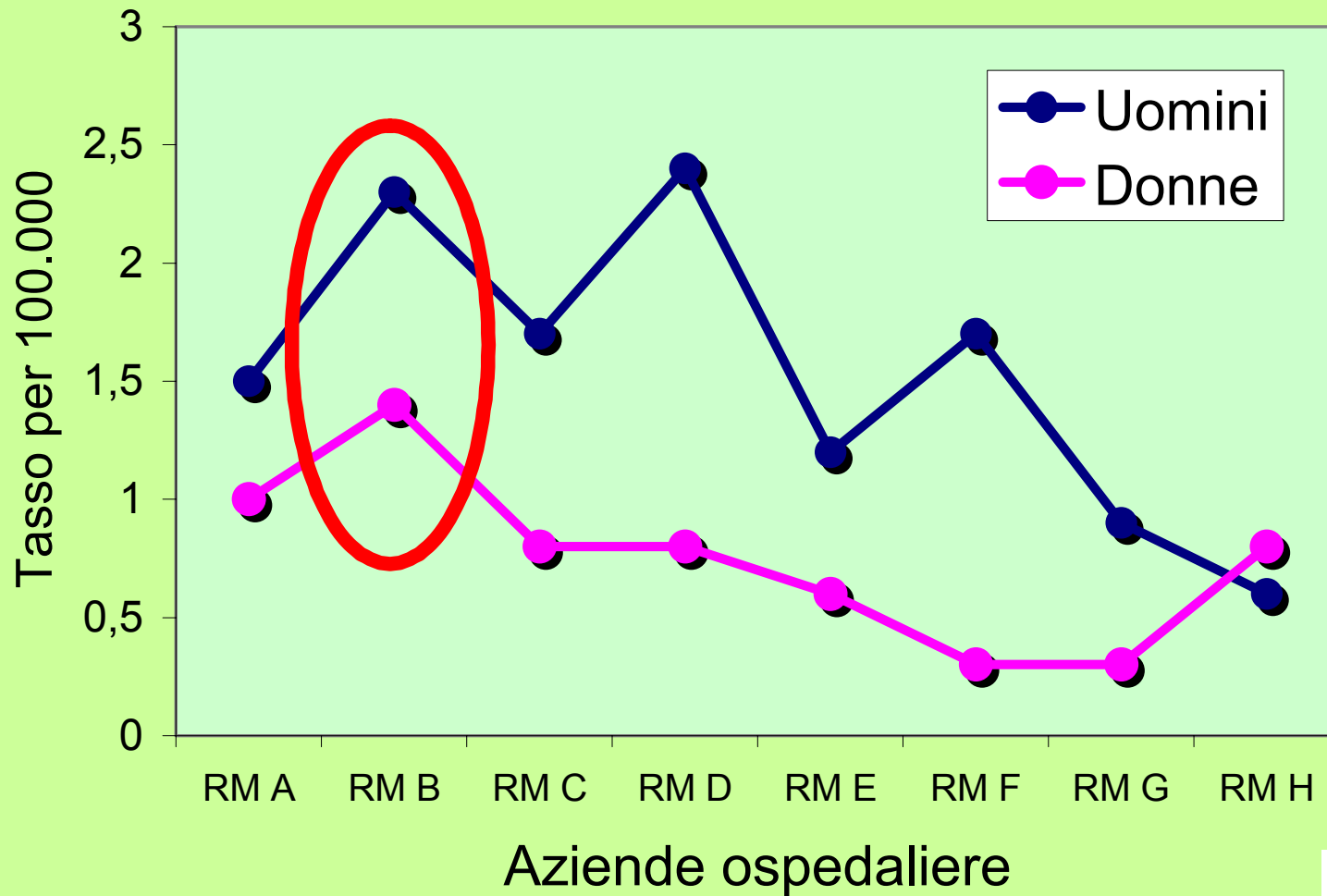
- I linfociti del soggetto in esame vengono posti in contatto con l'antigene, con un controllo negativo privo di antigene e con un controllo positivo contiene fitoemoagglutinina
- Ricerca dell'IFN- γ dopo opportuna incubazione
 - assenza di IFN- γ = ASSENZA DI INFEZIONE
 - presenza di IFN- γ = INFEZIONE
 - presenza di IFN- γ nel controllo NEG = TEST NON VALIDO
 - assenza di IFN- γ nel controllo POS = DEFICIT IMMUNITARIO

QuantiFERON-TB

- Test in vitro
- 1 solo accesso
- Non cross-reattività
- Non effetto booster
- Antigeni ESAT-6 e CFP-10
- Produzione di γ IFN- (risposta)
- Concentrazione di γ IFN
- **Sensibilità: ~90%**
- **Specificità: 98%**

- L'utilizzo del test nella diagnostica dei casi di ITBL e Tuberculosis attiva è stato approvato nel maggio 2005 dalla FDA (Food and Drug Administration) e recentemente (Dicembre 2005) raccomandato dal CDC di Atlanta in alternativa al test cutaneo secondo Mantoux nello screening dei contatti con caso di infezione attiva.

Tasso standardizzato notifiche di malattia tubercolare (anno 2005)



Lo studio è stato condotto mediante raccolta su tutti i soggetti di un campione di sangue (1ml) e successiva determinazione dei valori di INF-gamma antigene-specifico condotta mediante test QuantiFERON®-TB Gold (QFT-G, Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia).

Gli esiti del test sono stati classificati, in accordo con le linee guida interpretative fornite dal produttore come “positivi” o “negativi” rispettivamente se superiori o inferiori al cut-off di 0.35 UI/ml di INF-gamma antigene specifico rispetto al controllo negativo.

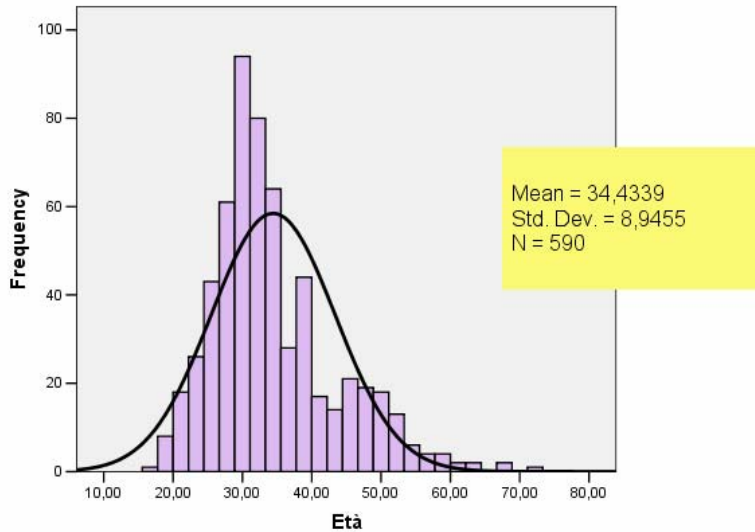
In caso di esito positivo del test, prima di classificare i soggetti si è provveduto ad una conferma mediante ripetizione del test su un altro campione ematico raccolto successivamente;

in caso di discordanza si è provveduto ad una terza determinazione, il cui esito è stato utilizzato per classificare il paziente.

Per tutti i test è stata anche condotta una verifica mediante controllo positivo per l'identificazione dei test “indeterminati”. Nessun esito individuale è rientrato in tale categoria.

Caratteristiche della popolazione

Distribuzione per età



Motivo della visita

Sorveglianza sanitaria

Procedure post esposizione

Visite preventive

Mansione

Infermieri

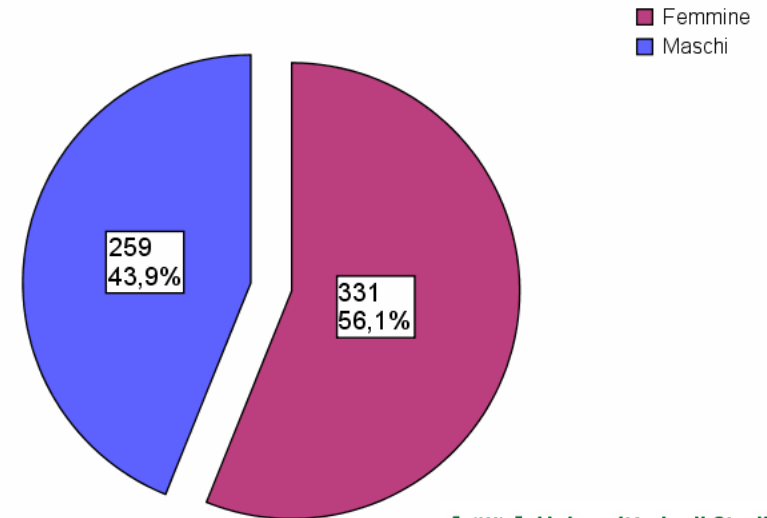
Medici

Tecnici di laboratorio

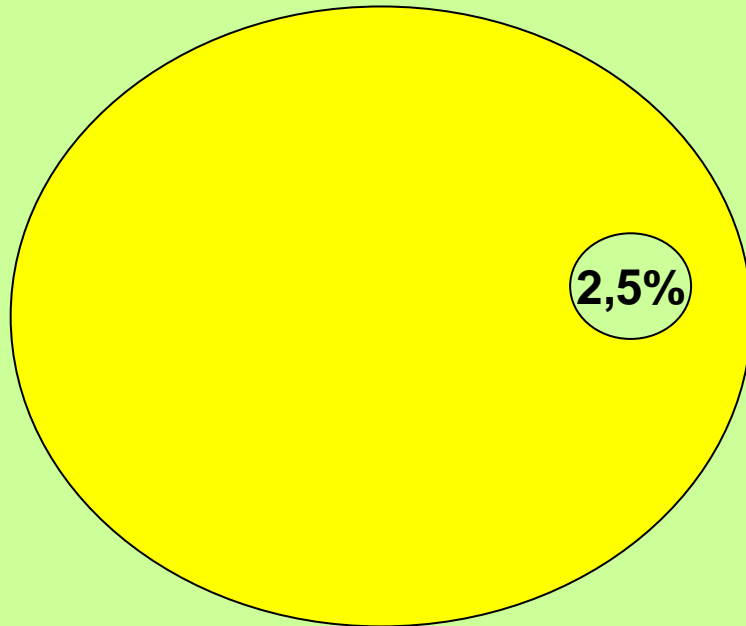
Personale OTA

Altre figure sanitarie

Distribuzione per sesso



Risultati



15 operatori sanitari sono risultati positivi al primo controllo

1 operatore è risultato negativo al secondo controllo

Nessun test indeterminato

Gli Rx del torace sono risultati negativi

Gestione dei risultati indeterminati

- Un risultato si definisce indeterminato quando la risposta al mitogeno aspecifico (PHA), utilizzato quale controllo positivo del test, è inferiore all'atteso o negativa.
- Generalmente, un risultato indeterminato è espressione di:
 - i) errori tecnici (ad esempio, scorretta conservazione e/o gestione del campione; tempi e/o temperature di incubazione non adeguati; reagenti o componenti ricostituiti scaduti);
 - ii) condizione di immunodepressione del soggetto in esame.

Potenzialità d'impiego dei nuovi test

Vantaggi dei test immunologici verso il test cutaneo alla tubercolina

- Elevata specificità per la mancata risposta a *M. bovis* BCG ed ai MNTB, con l'eccezione di *M. kansasii* e *M. szulgai*)
- Buona concordanza con TCT in soggetti immunocompetenti, in assenza di fattori confondenti, quali la vaccinazione BCG)
- Nessun effetto boosting
- Maggiore correlazione con il livello di esposizione (in caso di contatto con caso di TB attiva bacillifera)
- Nessuna necessità di visita di ritorno del paziente per la lettura del risultato

Potenzialità d'impiego dei nuovi test

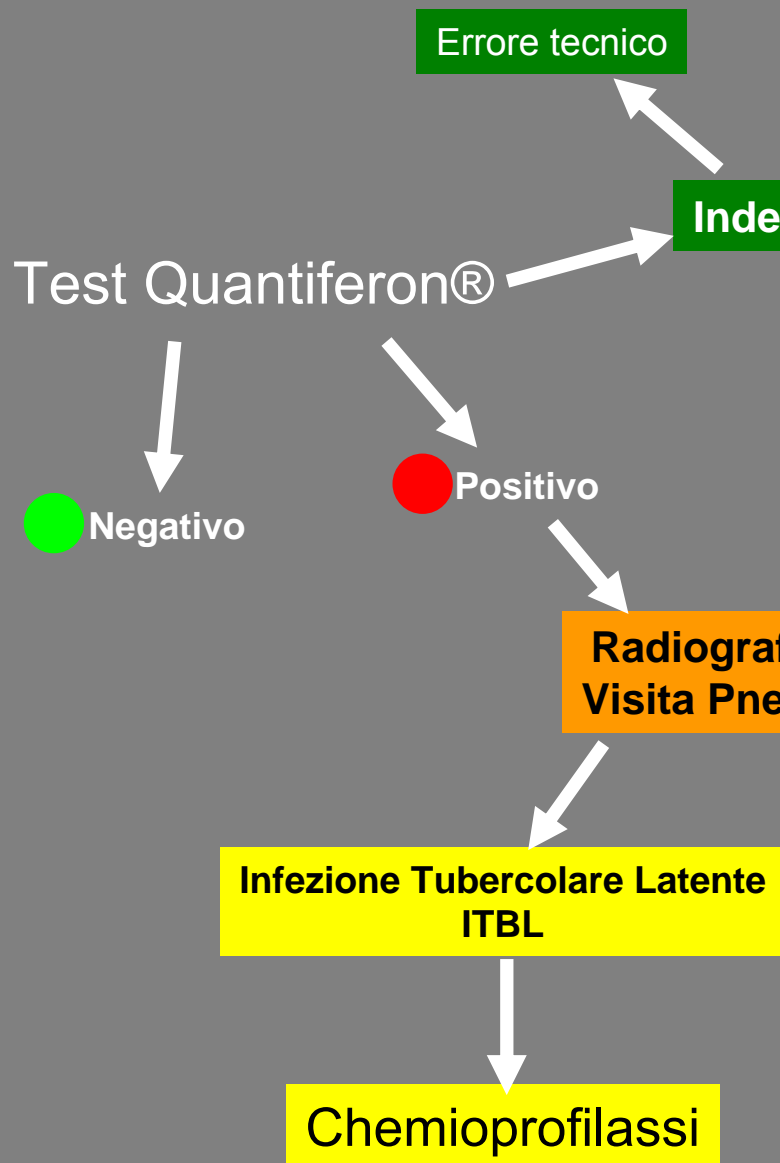
Vantaggi dei test immunologici verso il test cutaneo alla tubercolina

- Minore variabilità di lettura del risultato (operatore dipendente)
- Rapida disponibilità del risultato, in relazione al volume di lavoro del laboratorio
- Presenza di un controllo negativo, che in caso di risposta positiva consente di considerare eventuali errori tecnici)
- Presenza di un controllo positivo, che in caso di risposta negativa consente di considerare l'eventualità di concomitante immunodeficienza
- Possibilità di testare un numero maggiore di individui per seduta
- Standardizzazione dei reagenti e delle procedure di esecuzione dei test

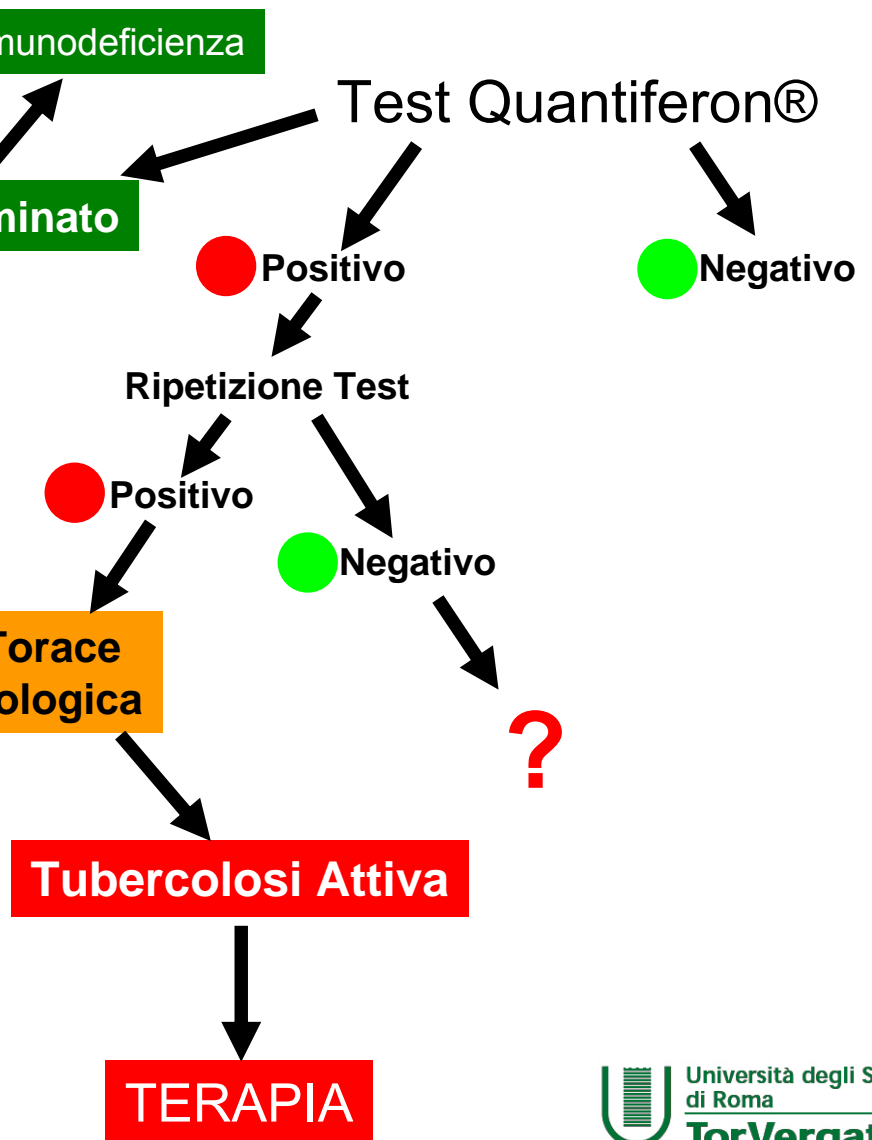
Test IFN- γ vs. Mantoux

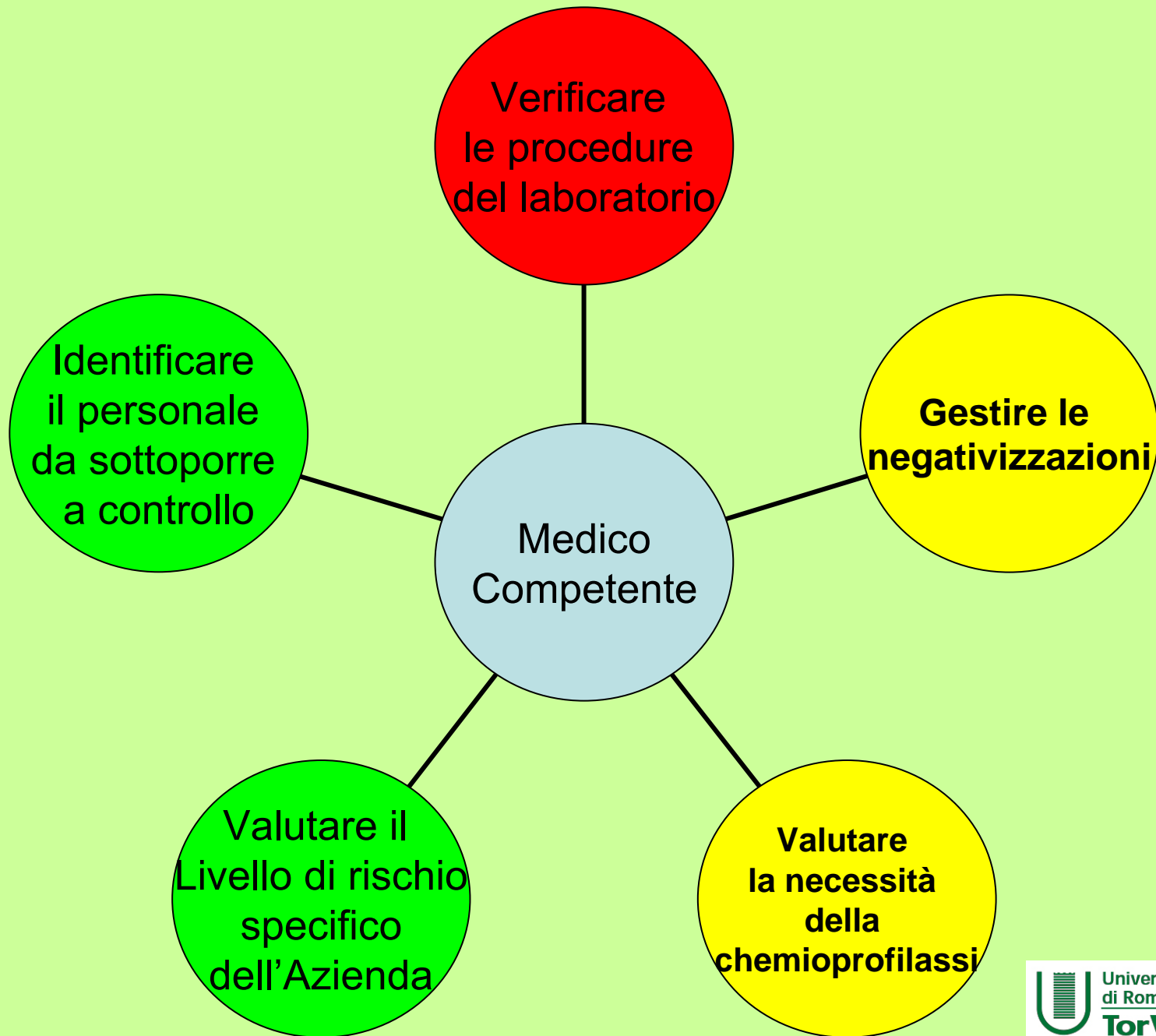
- Sensibilità relativa ai casi di TBC attiva:
SOVRAPPONIBILE
- Sensibilità nei casi di sospetta infezione latente:
MAGGIORE per IFN- γ
- I casi con Mantoux NEG e IFN- γ POS sono generalmente associati con l'esposizione
- I casi con Mantoux POS e IFN- γ NEG non sono generalmente associati con l'esposizione

Sorveglianza Sanitaria



Controllo Post-Esposizione





Conclusioni

La positività ad un test sul sangue deve essere seguita dall'attivazione delle procedure diagnostiche, cliniche e radiologiche necessarie ad escludere la presenza di una tubercolosi attiva, e ove non siano presenti controindicazioni anagrafiche o cliniche, dall'instaurazione della terapia dell'infezione latente, o chemioprolifassi, con isoniazide .

La dimostrata maggiore specificità rispetto al test cutaneo, rende preferibili i test su sangue rispetto al test tubercolinico cutaneo in tutte le popolazioni caratterizzate da significativa prevalenza di vaccinazione con BCG, **come gli operatori sanitari.**

Per il corretto impiego dei test su sangue è necessario garantire un adeguato addestramento del personale addetto alle procedure corrette di prelievo, conservazione, trasporto ed incubazione dei campioni, la disponibilità di un laboratorio facilmente raggiungibile e con una massa critica di test sufficiente a garantire l'analisi e la risposta in tempi brevi.



“Una delle Malattie più diffuse è la Diagnosi.”

(K. Kraus)