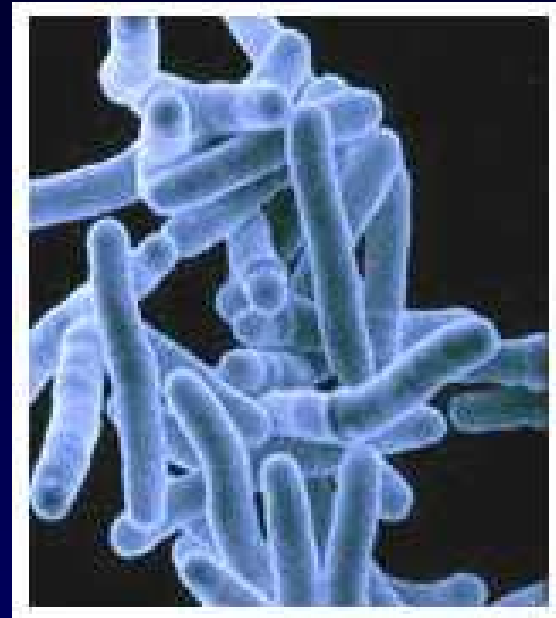


IGRAs test

metodologie e problematiche di laboratorio

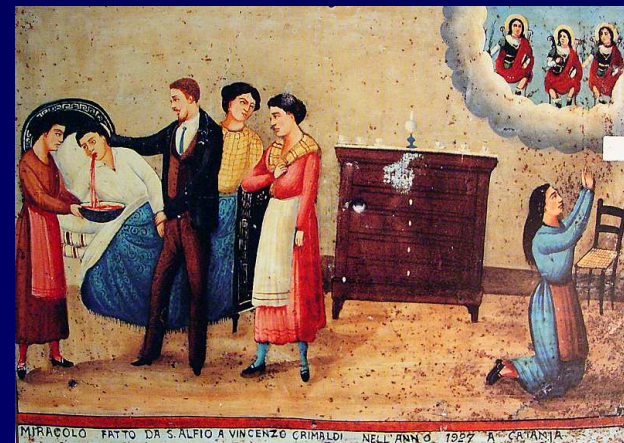


Dott.ssa Patrizia Rossi

Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia

Settore Sierologia

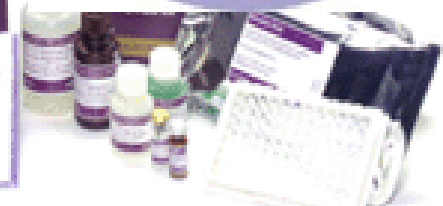
Azienda Sanitaria dell'Alto Adige
Comprensorio Sanitario di Bolzano
Area Ospedaliera



Trento 19 Aprile 2013

Come identificare i casi di infezione tubercolare?

TST/Mantoux
IGRA



test immunologici

evidenziano **precedente contatto** con *M. tuberculosis*
attraverso una risposta immunologica specifica che avviene anche
in presenza di batteri "dormienti" in grado di riattivarsi
in assenza di batteri vitali

Test in vivo

Il test cutaneo tubercolinico (TST/Mantoux)

Limiti di
accuratezza e praticità

FALSI POSITIVI

- Vaccinazione BCG*
- Infezioni da NTM
- Effetto Booster

FALSI NEGATIVI

- Anergia
- Errori di inoculo di PPD
(Derivato Proteico Purificato)

NECESSITA' DI DUE INCONTRI CON IL PAZIENTE

- Prima visita (somm. PPD)
- Seconda visita (48-72 h. lettura)



RISCHIO DI MANCATA LETTURA DEL TEST IN TEMPO UTILE

- 30% - 60% pz non ritorna per la lettura del risultato
- Costo (follow up e re-test)

INACCURATEZZA DELLA LETTURA

- Non c'è standardizzazione tra PPD
- Interpretazione soggettiva
- Test in vivo: effetti collaterali



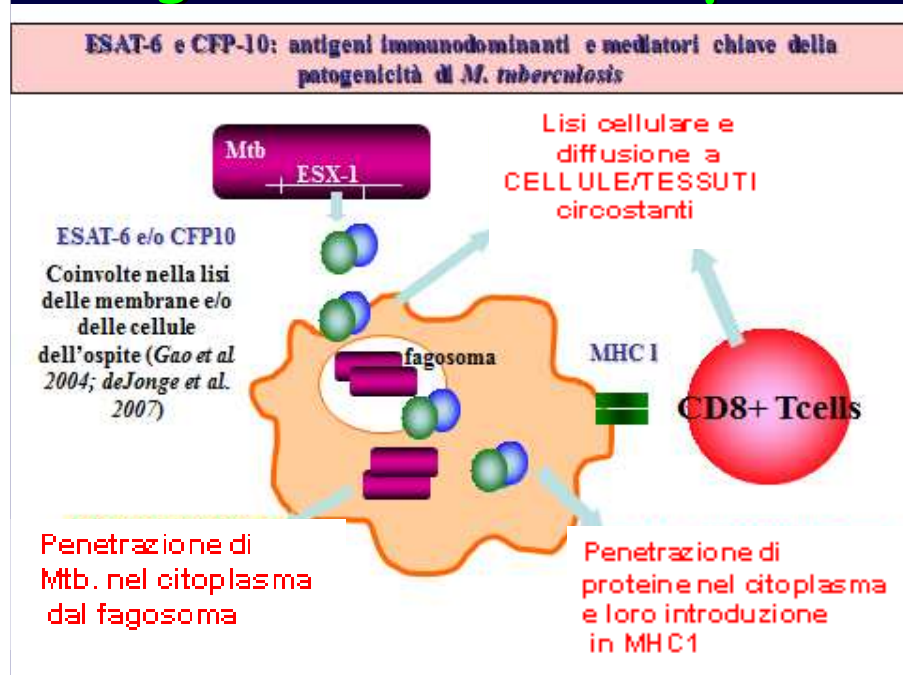
** = BCG (Bacillus Calmette-Guerin) is a vaccine based on a bacteria isolated from cattle which is closely related to the TB organism that infects humans. It does not cause disease, because it has lost some genes that were no longer required for growth under laboratory conditions.*

Test in vitro: IGRA Interferon Gamma Release Assay TEST IMMUNOLOGICI

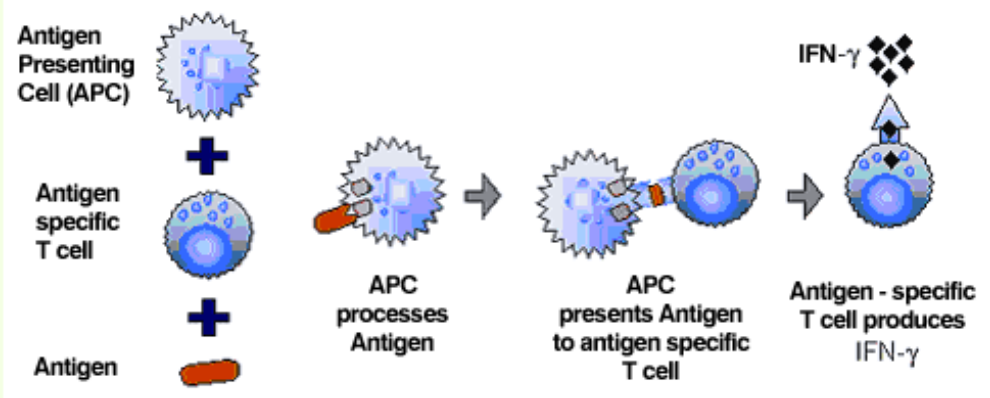
saggiano il rilascio di : **Interferon - γ (IFN- γ)**
in presenza di :
Antigeni tubercolari specifici

da parte di :

Linfociti T (Cellule T effettrici)
sensibilizzati da un contatto precedente



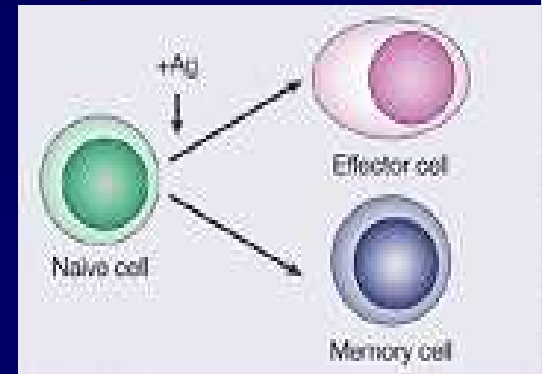
REGIONE RD1



The presence of IFN-G can then be quantified using a single step enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-IFN-G antibodies.

Interferone- γ (IFN- γ) dosato è quello prodotto da cellule T effettrici

- L'IFN- γ non è normalmente presente in circolo
- Un'infezione tubercolare in atto stimola la risposta delle cellule T che attivate secernono citochine - IL8
- TNF
- IFN- γ
- La cellula-T effettrice deriva dalla cellula-T nativa stimolata dall'Ag specifico ed è in grado di produrre Interferon rapidamente, entro le 24 ore. (Incubazione da 16 a 24ore)
- Il sistema immunitario dopo il primo contatto con il micobatterio ha prodotto anche cellule T di memoria.
Le cellule-T memoria costituiscono una riserva; non sono in grado di produrre IFN- γ prima di 24 h in quanto devono prima proliferare e produrre cellule T effettrici.



IGRA

Cellestis
QuantiFERON-TB Gold In-Tube



Oxford Immunotec
T-SPOT.TB



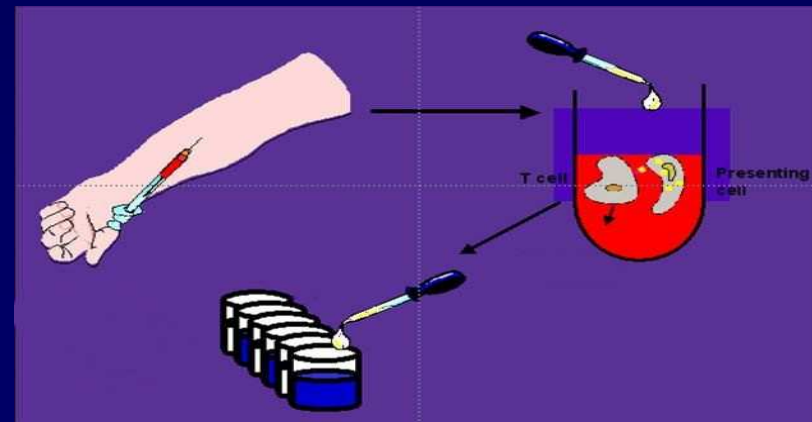
IGRA

Interferon Gamma Release Assay

- I linfociti del soggetto in esame vengono posti in contatto:
 - 1) con antigeni specifici
 - 2) con un controllo negativo privo di antigene specifico.
 - 3) con un controllo positivo contenente fitoemoagglutinina.(Ag aspecifico)
- Dopo opportuna incubazione → ricerca dell'IFN- γ
 - 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**



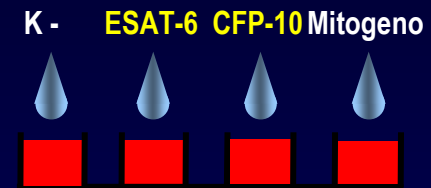
Metodo ELI-Spot



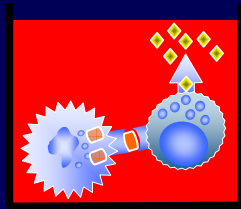
Sangue eparinato



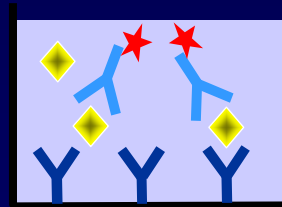
Separazione e conteggio dei leucociti mononucleati



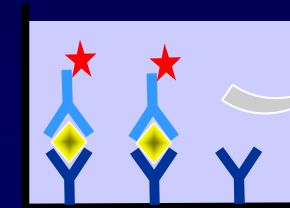
Trasferimento dei linfociti (250.000 cell.) in pozzetti coated con Ab anti-IFN- γ e aggiunta dell'antigene



Incubazione overnight a 37°C



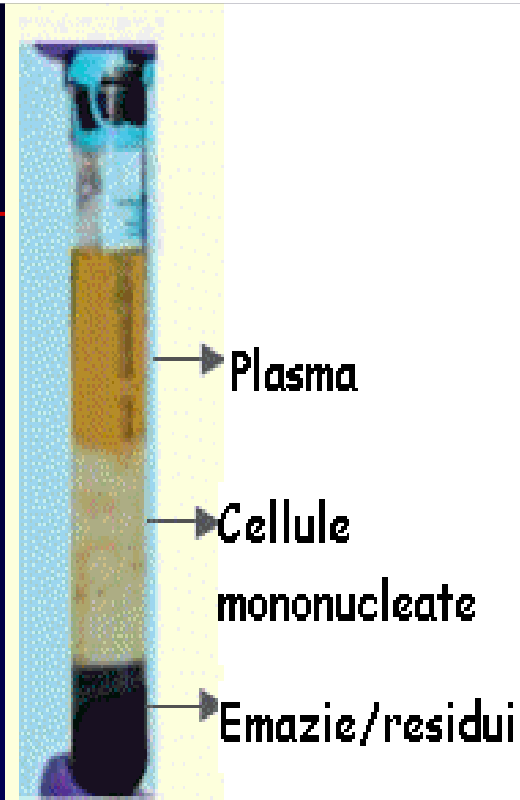
Lavaggio e dosaggio dell'IFN- γ ('sandwich' ELISA, incubazione 120 min)



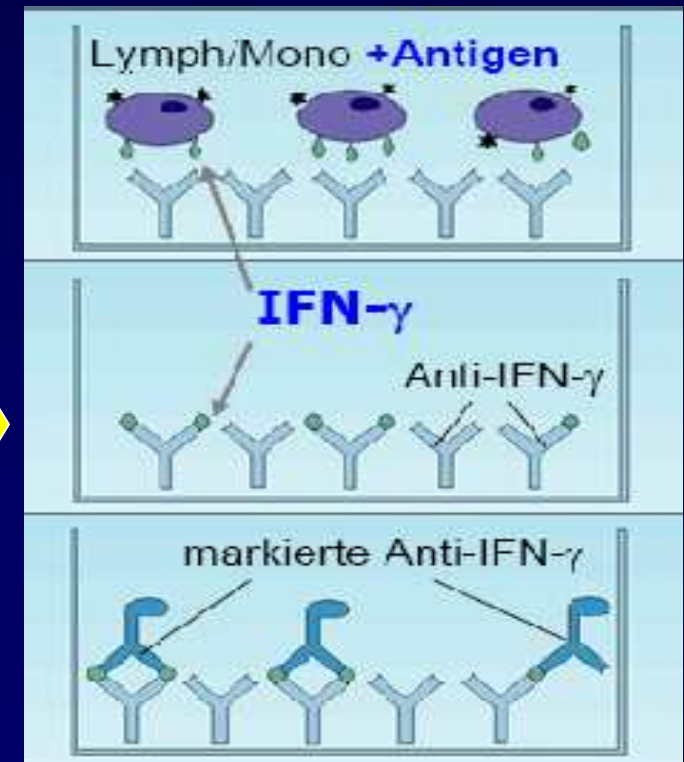
Conteggio degli spot, al microscopio o con lettore automatico

T SPOT - TB

Step 1 – Preparazione delle cellule

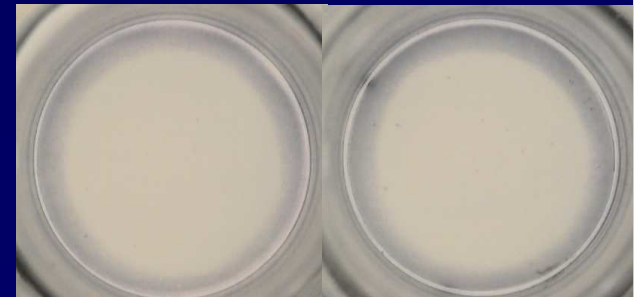
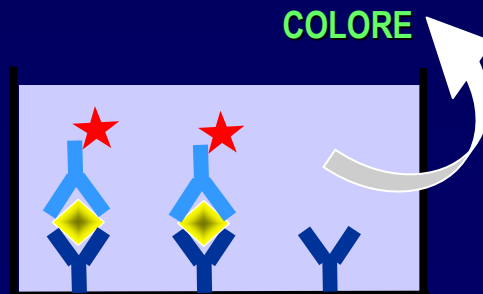
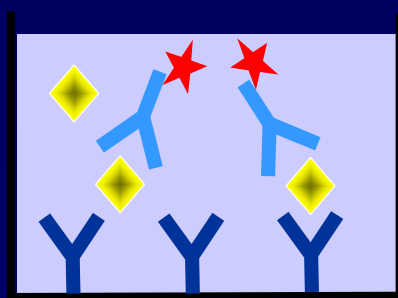


- 1) 8 cc di sangue raccolto in tubi Vacutainer CPT™
- 2) Le cellule mononucleate (PBMC) vengono separate attraverso **centrifugazione** dei tubi e **rimozione dell'anello** linfocitario.
- 3) **Lavaggio e conta cellule**
- 4) Cellule (250.000) trasferite su piastra a 96 pozzetti
- 5) Aggiunta degli antigeni TBC-specifici ESAT-6 e CFP-10 nei pozzetti
- 6) Incubazione “overnight”



Step 2 – Formazione degli spot

- Lavaggio della piastra
- Aggiunta di soluzione coniugato per 60 minuti
- Lavaggio della piastra
- Aggiunta del substrato; formazione di spot dopo 7 minuti
- Lavaggio ed asciugatura della piastra

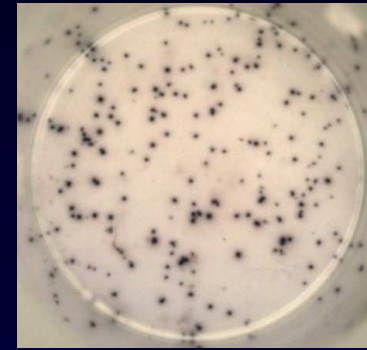


Step 3 – Conta degli spots

- Conta visiva degli spot (linfociti T che hanno prodotto IFN- γ) utilizzando una lente di ingrandimento o un microscopio a dissezione
- Come alternativa, utilizzare un elispot reader automatizzato
 - Piastra inserita nel reader per lettura automatica
 - Il computer registra tutte le immagini, compila in maniera non modificabile un registro di controllo, e **calcola il numero di spot in ogni pozzetto**
 - Fotocamera e criteri di analisi sono predisposti automaticamente



Above: Automated T-SPOT plate reader



Man mano che una cellula secerne IFN- γ questo viene legato dagli Ab sottostanti, si forma quindi uno spot

Introducing the new **T-Cell Xtend™**

A graphic for T-Cell Xtend featuring a white background with several overlapping circles in shades of blue and purple. One circle in the center is a solid red color.

The use of **T-Cell Xtend™** allows the T-SPOT®.TB assay to be performed on blood samples up to 32 hours after venepuncture without any change in accuracy of the test

Differenze fra T-Spot e QuantiFERON

- T-Spot
 - La concentrazione dei linfociti è standardizzata (250.000 cell.)
 - Antigeni TBC-specifici ESAT-6 e CFP-10
 - Complessità di esecuzione
 - Costo molto elevato
- QuantiFERON
 - Un risultato negativo può essere dovuto, oltre che all'assenza di cellule sensibilizzate, alla bassa concentrazione di linfociti nel sangue del paziente. (Indeterminato)
 - Antigeni TBC-specifici ESAT-6 , CFP-10 e TB7.7
 - Semplicità di esecuzione
 - Costo elevato

QuantiFERON®:

... UN APPROCCIO ALTERNATIVO
PER IL CONTROLLO DELLA TB ...



*Un nuovo standard
a supporto della diagnosi
dell'infezione da
M.tuberculosis*

test **breve**ttato, certificato **CE**, approvato **FDA**, che, attraverso la
misurazione

dell' IFN- γ rilasciato dai linfociti del paziente

a seguito di una

stimolazione linfocitaria (T) specifica* in sangue intero,

assicura un prezioso supporto alla diagnosi delle **infezioni da M. tuberculosis**

QuantiFERON-TB Gold In-Tube

- 1ml di sangue intero viene esposto agli antigeni ESAT6, CFP10 and TB7.7, al controllo negativo (nulla) e positivo (mitogeno) in tre diverse provette

Nil **TBAg** MIT

- Dopo incubazione “overnight” in cui i linfociti producono IFN- γ se precedentemente sensibilizzati, il plasma viene estratto e la concentrazione di IFN- γ determinata mediante metodo ELISA.
- Dato un Cut-off arbitrario per determinare i risultati positivi (Stabilito considerando TB attive)



OPZIONI DEL TEST: 2 Provette (2P) – 3 Provette (3P)

Pazienti "Clinici"

- Bambini
- Pazienti con sintomi specifici
- TB non polmonare
- Ricerca (monitoraggio terapia, etc.)

3 P



Screening di comunità

Secondo i fondi disponibili progetti diversi

- Operatori Sanitari: (Ospedali, Università, etc.)
- Militari, Immigrati, Carcerati, etc.
- Associazioni assistenziali governative e non, etc.
- Personale viaggiante: (linee aeree, linee ferroviarie, trasporto pubblico urbano)
- Servizio pubblico: (Polizia, Pompieri, Assistenti ambulanze, etc.)

2 P



Immunocompetenti

Pazienti "Immunocompromessi"

- HIV/AIDS
- Reumatologia e Dermatologia
- Dialisi
- Candidati a Trapianti
- Pazienti con morbo di Chron, etc.

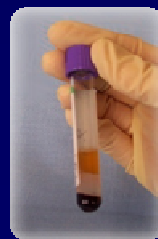
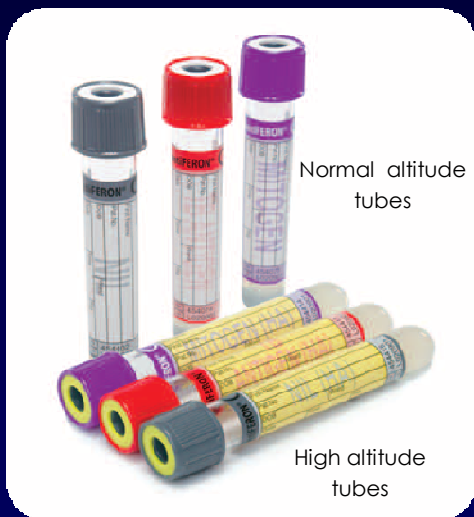
Screening dei contatti

- Personale reparti a rischio (pronto soccorso, etc.)
- Ambienti familiari, di lavoro, etc.
- Controllo sul territorio

QuantiFERON®:

1° Step: Prelievo

Guida al prelievo corretto distribuita dalla ditta



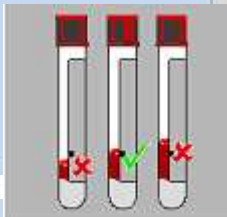
QFT

QuantiFERON-TB Gold – Prelievo del Campione

Opzione 2: Incubazione presso il Laboratorio



1. PRELIEVO DEL CAMPIONE



Prelevare 1 ml di sangue in ciascuna delle provette dedicate.

Durante la fase di riempimento, le provette devono essere ad una temperatura compresa fra 17 e 25°C.

I tubi si riempiono lentamente - al termine del flusso del sangue, mantenere la provetta collegata all'ago per altri 2-3 secondi.

Se il livello del sangue non raggiunge la fascia nera di riferimento sul lato dell'etichetta della provetta, ripetere il prelievo.

Suggerimento tecnico

Aghi a fatola - prima di utilizzare i tubi dedicati QFT riempire un tubo di "spurgo" (non in dotazione).



2. PRELIEVO DEL CAMPIONE



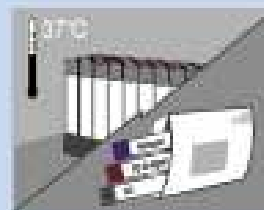
Immediatamente dopo aver eseguito il prelievo, miscelare il contenuto delle provette per dieci (10) volte con fermezza ma cautela: al fine di assicurarsi di ricoprire la superficie interna delle provette (per solubilizzare gli antigeni presenti sulle loro pareti interne).

Un'agitazione eccessiva potrebbe causare un danneggiamento del gel di separazione del plasma con la conseguenza di risultati aberranti.

Etichettare i tubi in modo appropriato.



3. TRASPORTO, INCUBAZIONE



Incubazione presso il Laboratorio

Trasportare i tubi al laboratorio a 17-27 °C. Il sangue deve essere incubato a 37°C il prima possibile (massimo entro le 16 ore dal prelievo).

Rimescolare i tubi per inversione 10 volte immediatamente prima dell'incubazione.

Suggerimento tecnico

Identificare le provette con la nota: "prelievo non incubato".

Provetta TB Antigene

Valuta la risposta di INF- γ
Verso gli antigeni TB altamente specifici



Provetta Mitogeno (Controllo Positivo)

Può essere utile per definire:
Lo stato immunitario del paziente
La corretta manipolazione e incubazione del campione

Provetta Nil (Controllo negativo)

Corregge il rumore di fondo
dell' INF- γ non specifico



Etichettare correttamente !!!!

SPECIFICITA' DEL TEST: TB Ag (ESAT-6, CFP-10, TB 7.7)

ESAT-6 e CFP-10 sono codificati in una regione genica (RD1) che manca nel BCG e in quasi tutti i MNT

		Antigeni		Ceppi ambientali	Antigeni
		ESAT-6*	CFP-10*		ESAT-6*
		CFP-10*	TB7.7		CFP-10*
		TB7.7			TB7.7
Tuberculosis complex				M abcessus	-
M tuberculosis		+		M avium	-
M africanum		+		M branderi	-
M bovis		+		M celatum	-
BCG substrain	gothenburg	-		M chelonae	-
	moreau	-		M fortuitum	-
	tice	-		M gordonii	-
	tokyo	-		M intracellulare	-
	danish	-		M kansasii	+
	glaxo	-		M malmoense	-
	montreal	-		M marinum	+
	pasteur	-		M oenavense	-
				M scrofulaceum	-
				M smegmatis	-
			M szulgai	+	
			M terrae	-	
			M vaccae	-	
			M xenopi	-	

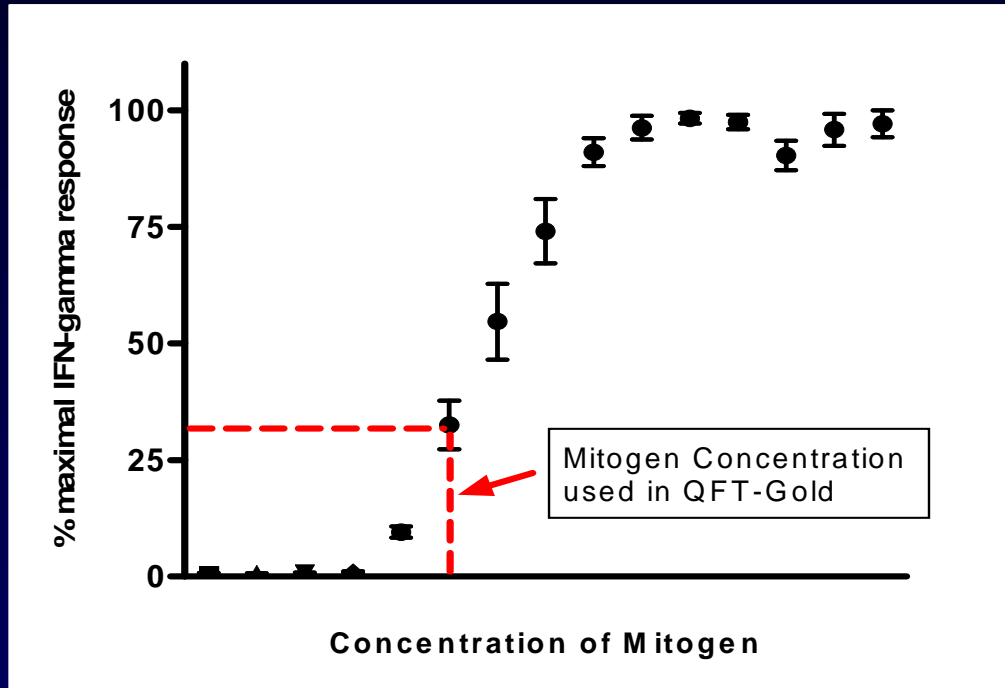


- Antigeni specifici brevettati (SSI, Denmark)
- Cellestis con diritti a livello mondiale

*: ESAT-6 (early secretory antigenic target-6)
 *: CFP-10 (culture filtrate protein-10)

TB7.7 Nuovo Antigene dalla regione di delezione 11

ACCURATEZZA DEL TEST: MIT (mitogeno)



PHA

Fitoemoagglutinina

a concentrazione critica in modo da avere risposta interferon nel range di lettura.

Un controllo della funzionalità immunitaria del Paziente:

Nei pazienti **immunocompetenti** il contatto con mitogeno stimola una produzione di Interferon-gamma **aspecifica**.

Risposta al Mit inversamente proporzionale all'immunocompromissione del Paziente

MITOGENO ≤ 0.5 UI/mL IFN- γ \longrightarrow Test INVALIDO

www.adaweb.it

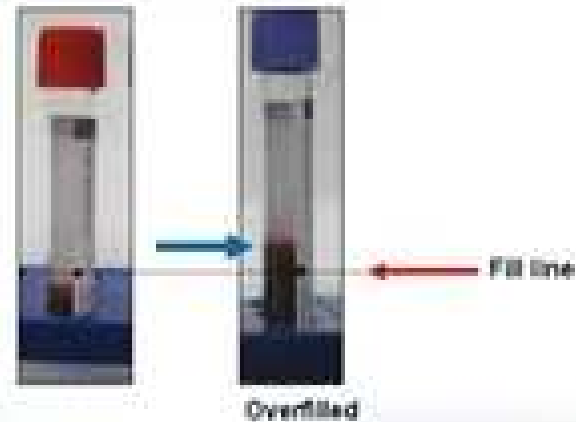
Blood Collection

- Do not underfill or overfill!

Correct!



Incorrect



QuantFERON

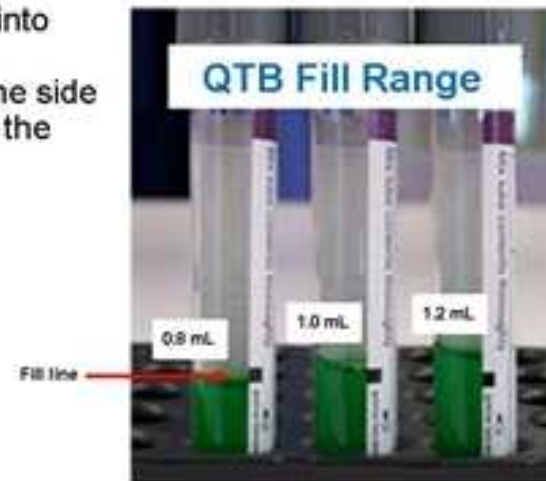
© 2010 Abbott Laboratories. All rights reserved.

Blood Collection

- Draw 1 mL of blood into each of the 3 tubes (the black mark on the side of the tube indicates the 1-mL fill line)

Valid range is 0.8–1.2 mL

Range di tollerabilità

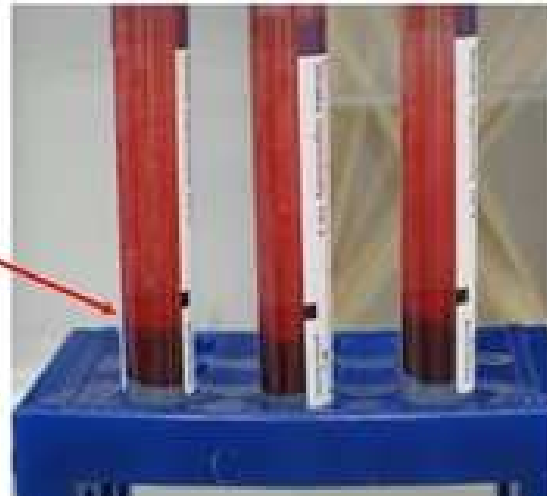


Mixing of Blood Collection Set

- Mix blood collection tubes by **shaking vigorously** for 5 seconds or about 10 times

Mixing of Blood Collection Set

- After shaking, the entire inner surface of each tube should be coated with blood
- Proper shaking will lead to frothing of the blood, which is required for correct performance of the test



Le provette devono essere trasferite a temperatura ambiente, il più presto possibile al Laboratorio di MICROBIOLOGIA e VIROLOGIA di BOLZANO. (in giornata)

Prelievi da LUNEDI' a GIOVEDI' (NO PREFESTIVI)

INCUBAZIONE (Stimolazione)

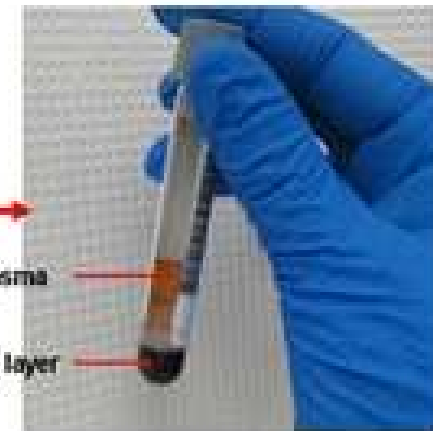
Appena arrivati in laboratorio (max 16 ore dal prelievo)
i tubi vengono incubati a 37°C per 16-24 ore.

- Ripetere la miscelazione di 5 secondi immediatamente prima dell'incubazione a 37°C.
- Mantenere i campioni a temperatura ambiente (25°C) durante il trasporto
N.B. Non refrigerare o congelare prima di incubare.

E' proprio durante
questa incubazione
che avviene la
produzione di
interferone- γ
da parte delle
cellule effettrici
ev. sensibilizzate da
una precedente
infezione

Centrifugation of Collection Tubes

- Centrifuge the tubes for 15 minutes at 3000 RCF (g) after the incubation step
- This separates the plasma from the cell layer



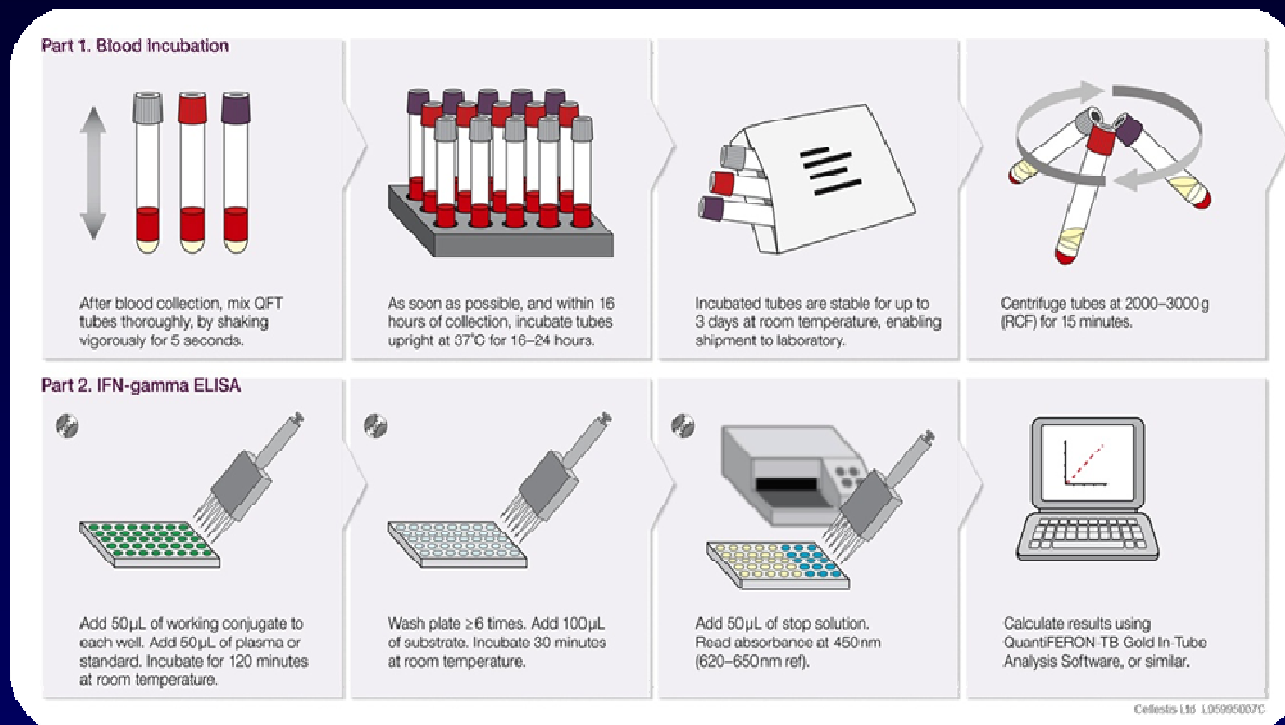
QuantIFERON

©2008 West Foundation for Medical Education and Research, Inc.

Dopo la centrifugazione il plasma si mantiene a 2-8 °C fino a 4 settimane.

QuantIFERON®:

2° Step: IFN- γ ELISA



50µl Coniugato +
50µl Plasma/Standard
120min. Incubazione TA
in pozzetti sensibilizzati con
Ab. Anti interferon

↓
Lavaggio
100µl TMB

30min. Incubazione TA

↓
50µl Stop
Lettura 450nm /620-650nm

Completamente automatizzabile,

Direttamente dal tubo primario

Riproducibilità 99.3%

QuantiFERON®:

3° Step:
Calcolo dei risultati
Interpretazione
Cutoff=0,35 UI/ml
arbitrario

Software Multi-lingua:

- Test a 2 Provette
- Test a 3 Provette

(valutazione della funzionalità immunitaria)

Guida di riferimento rapido al software* di analisi

Inserirle le informazioni sul test.

Copiere e incollare i dati oppure inserirle i valori manualmente.

Creare e salvare il formato (metodo standard o manuale).

Inserire il nome del soggetto. Calcolare i risultati.

Visualizzare il controllo di qualità del test.

Visualizzare i risultati del test.

Stampare i risultati del test o salvarli in formato PDF.

Esportare i risultati, Apri file, Salva file, Esporta dati

Per istruzioni complete fare riferimento alla guida per l'uso del software d'analisi (Analysis Software Instructional Guide).

America del Nord / America del Sud
Email: customer.service@cellestis.com
Fax: +1 981 775 7479
Tel: +1 661 775 7480 (al di fuori degli USA)
Numero verde: 800 519 4621 (solo negli USA)

Europa / Medio Oriente / Africa
Email: europa@cellestis.com
Fax: +49 6151 428 59 110
Tel: +49 6151 428 59 0

Asia / Oceania
Email: quanti@cellestis.com
Fax: +61 3 9569 6623
Tel: +61 3 9527 3500

*Versione non-USA
LUG 2010

cellestis
www.cellestis.com

Risultato Qualitativo: Negativo : ≤ 0.2 UI/mL IFN- γ

> 0.2 UI/mL IFN- γ – Grayzone - ≤ 0.7 UI/mL IFN- γ

Positivo : > 0.7 UI/mL IFN- γ

Indeterminato : Risposta al MITOGENO ≤ 0.5 UI/mL IFN- γ

Risultato Quantitativo: IFN- γ UI/mL

Interpretazione: Neg- Infezione latente improbabile < 0.2 UI/mL IFN- γ

Interpretazione: Pos - Infezione latente probabile ≥ 0.7 UI/mL IFN- γ

Cutoff del test = 0,35 (arbitrario)

POS. > 0,35

NEG. < 0,35

- **Conversione** NEG. ➡ POS.
 - **Reversione** POS. ➡ NEG.
- Ben documentate

- Japan
 - n=311
 - conversion 5 out of 284 = 2%
 - reversion 13 out of 27 = 43%
 - Yoshiyama et al. Epidemiol Infect 2009:1-8



- India
 - n=216
 - conversion 17 out of 147 = 12%
 - reversion 9 out of 38 = 24%
 - Pai et al. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13(1):84-92



Grey zone around cut-off 0.2 – 0.7 IU/ml

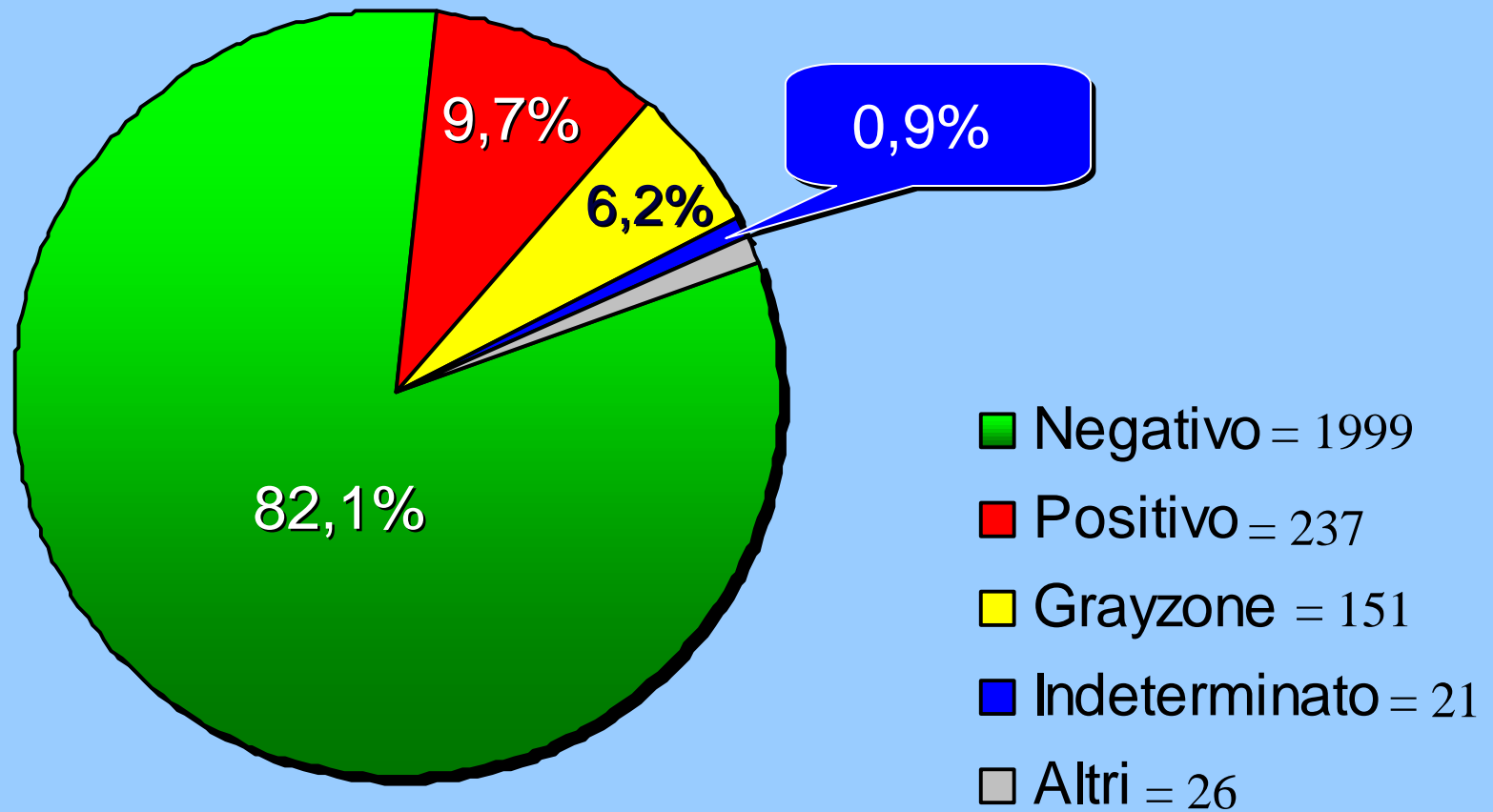
Torres Costa et al. IAOEH 2010
online first
Portugal

first QFT		conversion			
		no		yes	
INF- γ	IU/ml	N	%	n	%
<0.1		318	96.7	11	3.3
0.1- <0.2		31	79.5	8	20.5
0.2- <0.35		19	52.8	17	47.2
first QFT		reversion			
		no		yes	
0.35- <0.5		15	51.7	14	48.3
0.5- <0.7		11	52.4	10	47.6
0.7- <1		19	82.6	4	17.4
1- <3		40	81.6	9	18.4
≥ 3		65	98.5	1	1.5

TEST QFT

dal 01-01-2010 al 19-09-2011

Tot = 2434



Su 151 GZ

81 sono stati ritestati (53,6 %)

3 paz. POS. GZ	2 POS. < 1	1 trattato??
15 paz. GZ GZ	Saranno da tenere sotto controllo	
40 paz. GZ NEG.	Rientrati 49,4 %	REVERSIONI
8 paz. NEG. GZ	Saranno da rivedere	
15 paz. GZ POS.	7 POS. > 2	Contatti Profilassi
	18,5 %	CONVERSIONI
2 paz. NEG. POS.	1 POS. 0,9 e 1 Contatto accertato Mantoux +	
7 paz. POS. POS.	Riconfermati	Alcuni trattati

Che significato hanno?

REVERSIONI POS.  NEG.

- Alcune reversioni potrebbero riflettere la **scomparsa dell'infezione**
- Alcune reversioni potrebbero semplicemente essere dovute a **variazioni biologiche** (“oscillazione”) negli IGRA-positivi, e noi selezioniamo pazienti che si trovano nella fase di diminuzione della risposta all'infezione
- Alcune reversioni potrebbero essere dovute a variazioni nelle **procedure di laboratorio** (manipolazione del campione, lavaggio nell'ELISA, etc.)

CONVERSIONI NEG.  POS.

- **A seconda del cut-off usato** per la conversione, i livelli variano molto!
- La maggior parte delle conversioni è probabilmente dovuta a variazioni minori non specifiche intorno al cut-off (Pai et al, AJRCCM 2006; Pai et al. IJTLD 2009)
- Un cut-off (più alto) più stringente per la conversione potrebbe aiutare ad evitare di interpretare variazioni minori come conversioni

NEG. < 0,2 < GRAYZONE < 0,7 < POS.



Grazie per l'attenzione



Azienda Sanitaria dell'Alto Adige
Comprensorio Sanitario di Bolzano
Area Ospedaliera



Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia

Settore Sierologia

Dott.ssa Patrizia Rossi



Trento 19 Aprile 2013

Riflessioni conclusive

- NON ci sono dati sufficienti per i bambini in particolare inferiori a 2 anni
- NON differenzia i casi di malattia attiva da quelli di infezione.
- NON approvato per la diagnosi o la gestione di casi di malattia attiva poiché in questi casi si ritrovano diversi Falsi Neg.
- NON dimostrata utilità nel monitoraggio della terapia
- NON è dimostrato che soggetti con marcato aumento di risposta IFN-gamma abbiano maggiore probabilità di progredire verso la malattia (questo potrebbe non essere vero per la riattivazione della TBC).
- Necessari altri studi per definire PPV e NPV
- I test basati su linfociti T sono dinamici e inclini a conversioni e reversioni per cui si dovrà definire la soglia di conversione e significato.

Effetto della vaccinazione con BCG sul TST

A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guérin vaccination on tuberculin skin test measurements

L Wang, M O Turner, R K Elwood, M Schulzer, J M Fitzgerald

Thorax 2002;57:904-909

Background: The accurate diagnosis of latent tuberculosis infection (LTBI) is an important component of any tuberculosis control programme and depends largely on tuberculin skin testing. The appropriate categorisation of skin test results requires knowledge of the possible confounding factors such as previous BCG vaccination. Uncertainty about the effect of BCG vaccination on tuberculin skin testing and the strength with which previous studies are made to include patients searching for a test of 10 IU have identified a need to analyse the available data on the effect of BCG on skin testing. A meta-analysis of the evidence for the effect of BCG vaccination on tuberculin skin testing in subjects without active tuberculosis was therefore performed.

Methods: Medline was searched for English language articles published from 1966 to 1999 using the key words "BCG vaccine", "tuberculin test (TST)", and "skin testing". Bibliographies of relevant articles were reviewed for additional data which may have been missed at the literature search. Articles were considered for inclusion in the meta-analysis if they had recorded tuberculin skin test results in subjects who had received BCG vaccination more than 5 years previously and had a concurrent control group.

See end of article for authors' declarations

INT J TUBERC LUNG DIS 10(11):1152-1204
© 2006 The Union

REVIEW ARTICLE

False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?

M. Farhat,** C. Greenaway,** M. Pai,*† D. Menzies*

*Respiratory Epidemiology and Clinical Research Unit, Montreal Chest Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; †Massachusetts General Hospital, Harvard University, Boston, Massachusetts, USA; ‡Division of

Analisi di 24 studi con N = 240,243 soggetti

A causa del BCG :

- **6% falsi-positivi** nel TST quando il vaccino è somministrato **nell'infanzia**
- **40% falsi-positivi** per TST quando il vaccino è somministrato **dopo l'infanzia**

Principali differenze tra test per la diagnosi di infezione tubercolare

	TST	QFT
Formato Test	in vivo effetto booster falsi pos. come microvaccinazione	in vitro (provette dedicate, no effetti collaterali, No effetto booster solo aspettare 3 giorni dopo Mantoux)
Accuratezza	Lettura Soggettiva ritorno del paziente 2A volta	Lettura Strumentale un prelievo
	Specificità Bassa PPD = miscela di antigeni non definita compresi quelli del vaccino BCG e MOTT	Specificità Alta Antigeni Specifici (ESAT6, CFP10, TB7.7) PRESENTI nel MTB complex (RD1) ASSENTI nel BCG ASSENTI nella maggior parte dei MOTT
	Sensibilità Paragonabile	Sensibilità Paragonabile
	Controllo risposta immunitaria No. Possibili falsi neg. nei soggetti anergici.	Controllo risposta immunitaria Si. Mitogeno valuta risposta sistema immunitario.
Costi	Basso costo unitario	Alto costo unitario ma riduzione dei costi globali (esami di approfondimento-terapie inappropriate)

Cosa sappiamo delle conversioni IGRA?

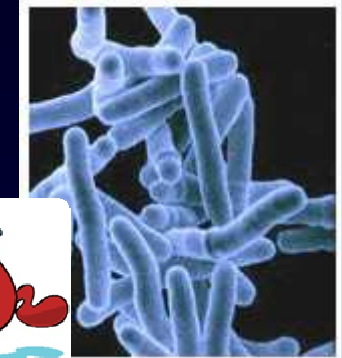
- Le conversioni sono ben documentate
- **A seconda del cut-off usato** per la conversione, i livelli variano molto!
- Se per definire le conversioni si usa un semplice cut-off negativo-positivo, allora le conversioni saranno maggiori con IGRA che con TST (Pai et al, 2006; Pai et al, 2009 & Corbett et al, 2006)
 - Ciò può indicare una maggiore sensibilità per le “conversioni” (non necessariamente per “diagnosi”)
 - Ad ogni modo, parte dei maggiori livelli di conversioni è probabilmente dovuta a variazioni minori non-specifiche intorno al cut-off (Pai et al, AJRCCM 2006; Pai et al. IJTLD 2009)
 - Un cut-off (più alto) più stringente per la conversione potrebbe aiutare ad evitare di interpretare variazioni minori come conversioni

Cosa sappiamo della reversione IGRA?

- Le reversioni sono ben documentate
- Le reversioni sono meno probabili quando i risultati baseline sono doppi-positivi (TST+/IGRA+) dove ci si attende una marcata risposta IFN-gamma
- Le reversioni sono più probabili quando i livelli basali sono discordanti (TST-/IGRA+)
 - I risultati discordanti sono in genere risposte deboli con bassi livelli di IFN-gamma vicini al cut-off
 - variazioni non-specifiche intorno al cut-off possono portare a reversione
- Perché le reversioni avvengono?
 1. Alcune reversioni potrebbero riflettere la **scomparsa dell'infezione**
 2. Alcune reversioni potrebbero semplicemente essere dovute a **variazioni biologiche** (“oscillazione”) negli IGRA-positivi, e noi selezioniamo pazienti che si trovano nella fase di diminuzione della risposta all'infezione
 3. Alcune reversioni potrebbero essere dovute a variazioni nelle **procedure di laboratorio**
(manipolazione del campione, lavaggio nell'ELISA, etc.)

IGRA

Test immunologici nella diagnosi di infezione tubercolare



- **Tubercolosi**

- Infezione e Malattia
- Strategie di controllo
- Mantoux (TST)

- **Linee guida IGRA: CDC**

Utilizzo del test QFT/IGRA
nella rilevazione dell'infezione da *M. tuberculosis*

- **QuantiFERON**

- Premessa / Principio
- Specificità / Accuratezza
- Opzioni / Fasi del test
- QFT vs. TST

- **Performance IGRA: Meta-analisi**

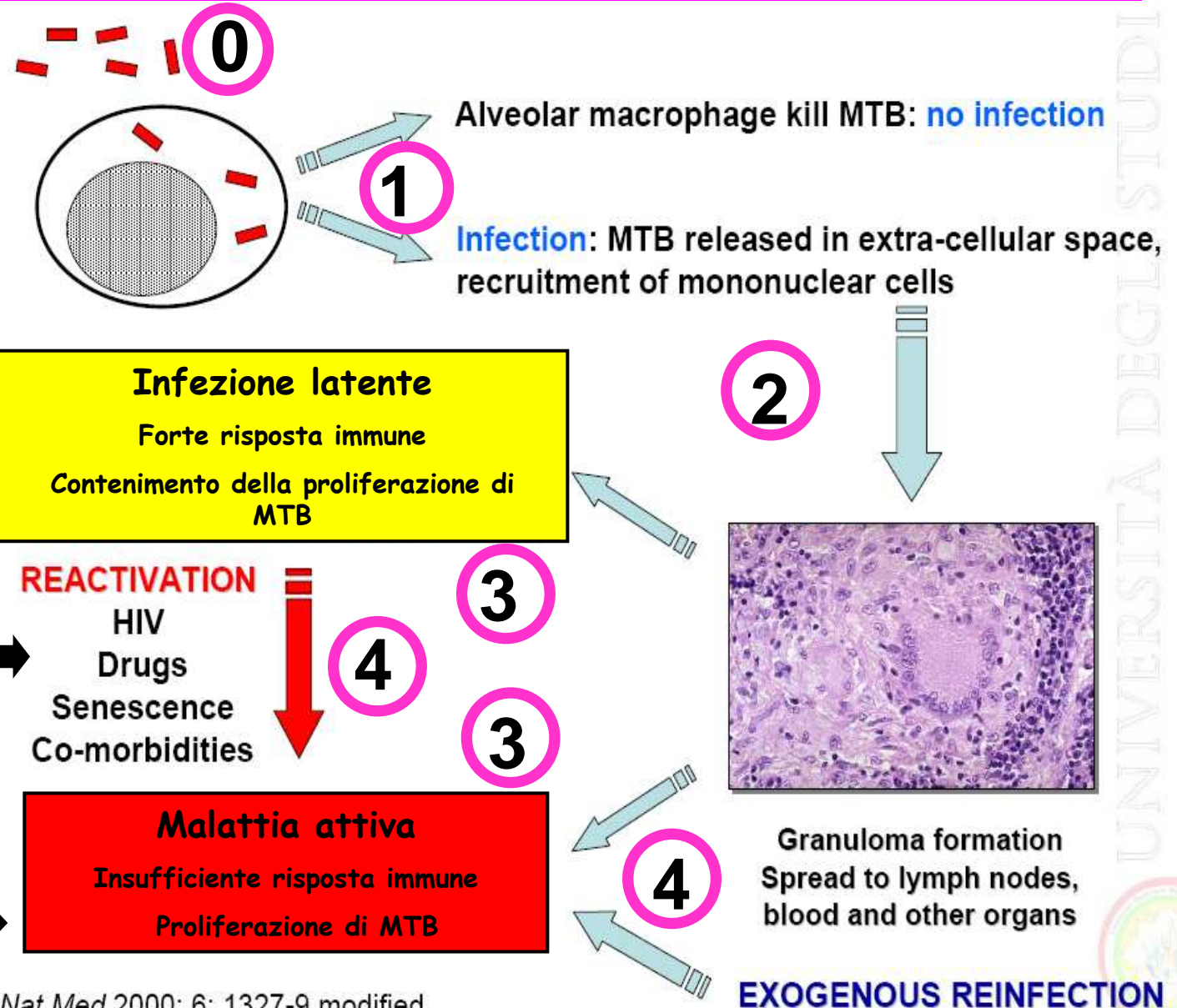
Journal: Chest - Publication Date: Volume 137 - Issue 4 - Apr-2010
PPV % & NPV% dei test IGRA

- **Controllo TBC
in ambiente ospedaliero**

- **Nuovi studi
per una corretta
diagnosi di laboratorio**

Interazioni organismo-MT

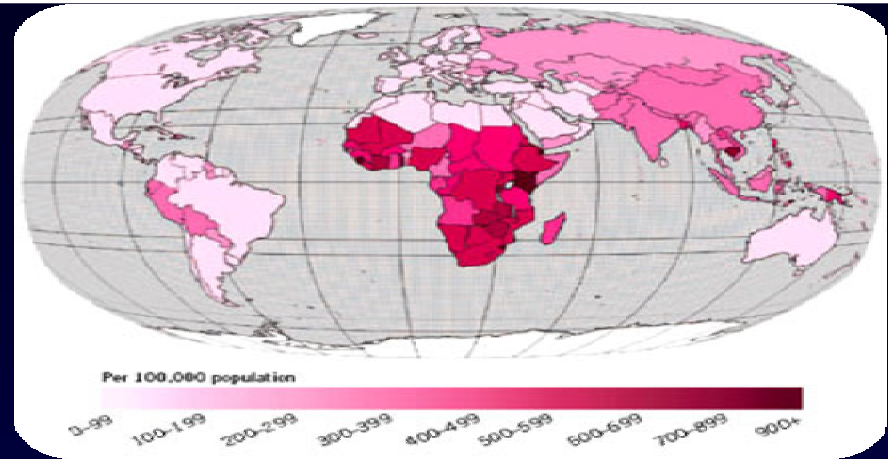
Raffinato sistema di equilibri



Nat Med 2000; 6: 1327-9 modified

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI

TUBERCOLOSI ATTIVA



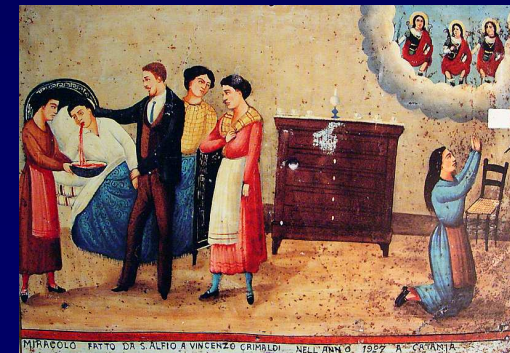
Identificazione precoce

Esame radiografico

(Sufficientemente sensibile e pratico per identificare anomalie compatibili con quadro di TBC respiratoria.)

Sintomi clinici

Reperti batteriologici positivi.



Infezione tubercolare latente

ITBL” (Infezione TuBercolare Latente)

“LTBI” (Latent TB Infection)

Condizione per la quale il *Mycobacterium Tuberculosis* (MT) si è insediato nell’organismo :

- senza sintomi clinici,
- senza anomalie radiografiche
- con reperti batteriologici negativi.

(Non è possibile isolare *M. tuberculosis* da soggetti con TB latente)

I soggetti infetti:

- Non sono malati.
- Non sono contagiosi.
- Possono sviluppare la malattia in futuro

(senza terapia preventiva e se non c’è controllo del sistema immunitario).

Probabilità di evoluzione dopo esposizione

Esposizione al BK

**Assenza di infezione
90%**

M.tuberculosis eliminato con o senza
l'intervento delle cellule T

**Infezione
10%**

**Assenza di malattia
9%**

Precoce

(50% rischio di progressione entro i 2 anni)






**Malattia
1%**

Tardiva

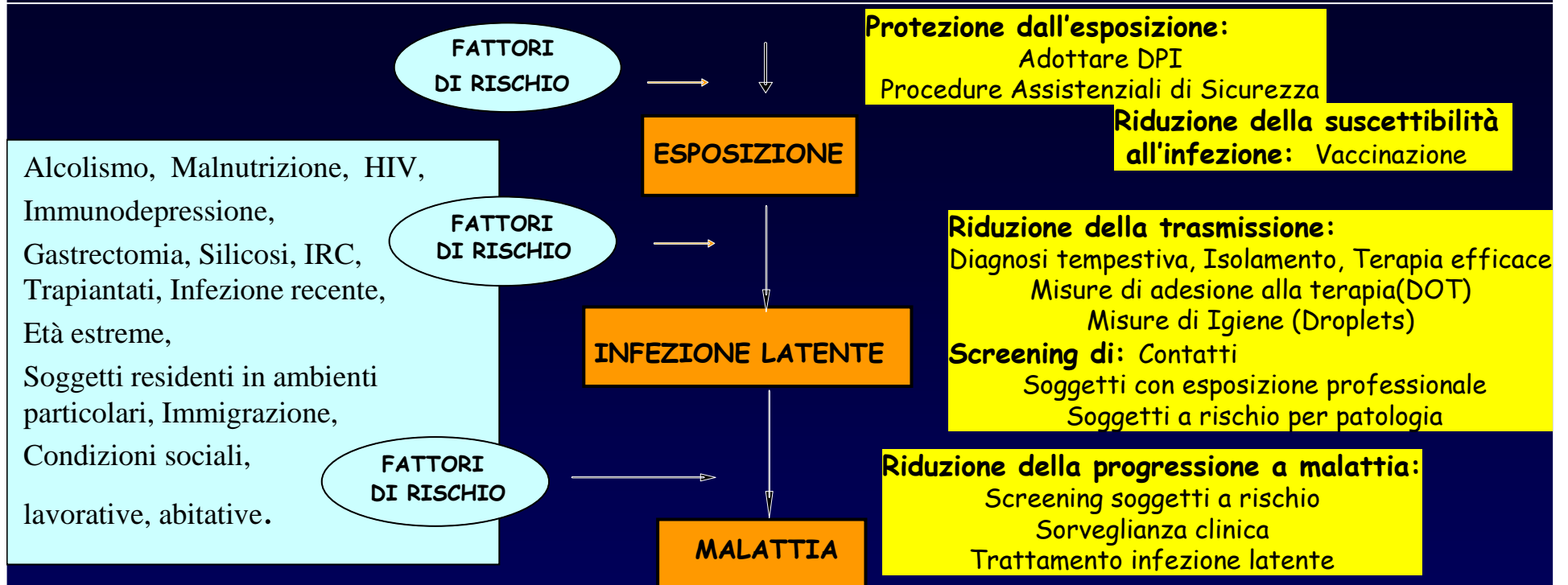
(50% rischio di progressione durante la vita)

“Dopo l'infezione, l'incubazione della tubercolosi può variare da poche settimane ad una vita intera.”

Fattori di rischio in soggetti Mantoux positivi *influenzano* incidenza di TBC (casi/1.000 soggetti) e rischio progressione

Fattore di rischio	Incidenza	PATOLOGIA	Rischio Relativo
RECENTE INFEZIONE TUBERCOLARE: meno di 1 anno tra 1 e 7 anni	12.9 1.6	Silicosi 	30
HIV POSITIVITA' 	35 - 162	Diabete mellito	2 - 4
USO DI DROGHE: e sieropositività  e sieronegatività o non noto	76.0 10.0	Insufficienza renale cronica	10 - 25
SILICOSI	38	Gastrectomia	2 - 5
SEGNI RADIOLOGICI DI PREGRESSA TB NON TRATTATA	2.0-13.6	By-pass digiuno-ileale 	27 - 63
DEVIAZIONE DAL PESO STANDARD	1 - 2.6	Trapianti di organi solidi: rene  cuore	37 20 - 74
		Tumore testa-collo	16

FATTORI DI RISCHIO E STRATEGIE D'INTERVENTO



I PROVVEDIMENTI PIU' IMPORTANTI

Malattia attiva : Diagnosi precoce e trattamento in particolare dei casi polmonari bacilliferi

Infezione : Identificazione precoce dell'infezione tubercolare latente attraverso lo SCREENING e trattamento preventivo.

Perché?

Un caso contagioso lasciato a se' infetta altre 10 persone all'anno, delle quali a sua volta una si ammalerà di TBC.

INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

Nel mondo:

Ogni giorno **5.000** persone muoiono di TB

Ogni secondo **1** persona contrae l'infezione MTB

20 milioni di casi TBC attiva

2 miliardi di persone infette,

da cui deriveranno

8 milioni di nuovi casi all'anno

I **nuovi casi** di tubercolosi derivano dal **"serbatoio"** rappresentato dalle **persone con infezione latente**.

Se vogliamo **ridurre i casi di tubercolosi attiva**, dobbiamo incidere sul **"serbatoio"** di infezione.



Considerazioni sulla diagnostica dell'Infezione Tuberculare Latente

La **decisione di testare** per ITBL deve presupporre
l'intenzione a trattare, altrimenti :

Spesa inutile Ansia e confusione.

Inutile ricercare l'ITBL se :

- esistono controindicazioni al trattamento
- è poco probabile il completamento del ciclo di cura proposto.

Le campagne di screening devono essere mirate su persone a rischio per identificare soggetti con ITBL che possono:

- ➡ Trarre beneficio da un trattamento preventivo
- ➡ Limitare la diffusione della malattia.

Strategie di controllo:

(intervenire sulla parte sommersa)

Screening



The NEW ENGLAND
JOURNAL of MEDICINE

Persone a rischio aumentato per LTBI che devono essere testate

- Recenti **contatti di un caso indice**
- **Operatori Sanitari** - al momento dell'assunzione e 1/anno se in reparti a rischio
- **Militari** - al momento dell'arruolamento e dopo le missioni in zone ad alto rischio
- **Carcerati** - all'ingresso in prigione
- Pazienti con condizioni mediche di **immunodepressione** (pazienti oncologici, silicosi, diabete, insufficienza renale, droghe d'abuso, ...), testati regolarmente se a rischio
- Soggetti candidati per una **terapia immunosoppressiva** - prima della terapia (Reumatici)
- **HIV infetti**
- **Immigrati da aree ad alta prevalenza**
- **Senza tetto**

Jasmer et all NEJM 1860, 2002



Terapia dell'ITBL

Prima di iniziare il trattamento per l' ITBL, deve essere stata **esclusa la presenza di una TBC attiva**, mediante esecuzione contemporanea di:

- ✓ anamnesi mirata e attenta,
- ✓ radiografia al torace,
- ✓ qualsiasi altro esame utile, sulla base dei dati anamnestici, clinici e radiologici disponibili ad escludere/accertare la presenza di una forma attiva di TB.



Linee guida



CDC Guidelines 2005

QFT-G può essere usato in tutte le situazioni in cui si usa il TST

CDC Guidelines on the Use of IGRAs - 2010

June 25, 2010



- **IGRA sono da preferire rispetto al TST:**

- Per testare **persone vaccinate** con BCG (comprese le vaccinate per terapia anticancro).
- Per diagnosi di infezione tubercolare in **gruppi** che storicamente hanno bassa probabilità di tornare per la lettura di TST.

- **IGRA può essere usato al posto del TST:**

- (non oltre al TST) in tutte le situazioni in cui i CDC raccomandano di testare ed è considerato test valido nella pratica della Salute pubblica.
- (senza preferenza) per testare **recenti contatti** con persone affette da TBC.
- (senza preferenza) per eseguire **screening** periodici mirati all'esposizione professionale alla TBC.

- **Bambini:** TST è preferibile per testare bambini <ai 5 anni.

- **Alcuni esperti sostengono che l'uso di un IGRA in congiunzione con il TST incrementa la sensibilità** diagnostica in questa fascia di età.

- Raccomandazioni riguardo all'uso del IGRAs nei bambini pubblicati anche dalla American Academy of Pediatrics .

Infezione tubercolare latente: Raccomandazioni

Ministero del Lavoro della Salute e delle Politiche Sociali - Italia, 2009

- Il **test di riferimento per la diagnosi di infezione tubercolare** nei contatti rimane il **test tuberculinico con il metodo Mantoux (TST)**.
- Negli **individui vaccinati con BCG**, l'uso di test basati sul rilascio di interferon-gamma (IGRA) è **raccomandato** come **test di conferma nei** pazienti risultati **positivi al TST**.
 - **Nelle persone con infezione da HIV** e bassa conta dei linfociti CD4 e negli altri pazienti con grave **compromissione del sistema immunitario** l'utilizzo del test **IGRA è raccomandato in tutti i soggetti TST negativi**.
- L'uso del test IGRA in alternativa al test di Mantoux non è attualmente supportato dalle evidenze disponibili.
 - **Nei bambini di età inferiore o uguale a 5 anni** e nei soggetti gravemente immunodepressi è consigliata una **valutazione clinica completa** compresa la radiografia del torace, anche in presenza di un TST e/o IGRA negativo.

Confronto delle Linee Guida

CDC 2005	NICE 2006	SIMeR/AIPO
Limiti		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sensibilità non determinata in bambini ed immunocompromessi ▪ Necessari tempi brevi di trasporto ▪ Necessità di confermare il test nei contatti di caso 8-10 settimane dopo. ▪ Attenzione alla qualità del Laboratorio. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dati insufficienti per l'utilizzo dei nuovi test negli HIV, immunodepressi in genere e bambini ▪ Costi 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessità di Laboratori attrezzati e di personale tecnico addestrato. ▪ Necessità di processare un'elevato numero di esami per seduta. ▪ Elevato costo unitario. ▪ Disponibilità economica adeguata per garantire la continuità delle prestazioni
Vantaggi		
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maggiore specificità nei vaccinati con BCG e negli esposti ai micobatteri atipici. ▪ Non c'è effetto booster 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Maggiore specificità nei vaccinati con BCG ▪ Migliore correlazione con l'esposizione nei contesti a bassa prevalenza, contatti di caso ed epidemie. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Elevata specificità ▪ Nessun effetto booster ▪ Maggiore correlazione con il livello di esposizione di TBC. ▪ No seconda visita ▪ Minore variabilità di lettura del risultato e sua rapida . ▪ Presenza di contr. pos. e neg.

Confronto delle Linee Guida

	ITALIA 2011	CDC 2010	CTC 2010	NICE 2011	ECDC 2011
Sospetta TBC	---	TST e IGRA	TST e/o IGRA	TST e/o IGRA	TST e/o IGRA
Contatti Adulti/bambini >5a	TST(+) ↓ IGRA	TST o IGRA	TST(+) ↓ IGRA	TST(+) ↓ IGRA	TST(+) ↓ IGRA
Contatti Bambini <5a		TST o (TST e IGRA)		TST(-) ↓ IGRA	TST
Negatività non esclude TB attiva					
Operatori sanitari	TST(+) ↓ IGRA*	TST o IGRA	---	TST(+) ↓ IGRA**	---
HIV/ Immunodepressi	TST(-) ↓ IGRA	TST e IGRA	TST e IGRA	TST(-) ↓ IGRA	TST e IGRA
Outbreak/ popolazioni "difficili"		IGRA		IGRA	

*Vaccinati con BCG

**Solo IGRA se da paesi ad alta endemia

Performance



Non esiste un gold standard per diagnosi infezione tubercolare latente

Sensibilità - Valutazione approssimata
Proporzione dei **POSITIVI** fra i soggetti con tubercolosi confermata dalla coltura
(coltura come gold standard)

Specificità - Valutazione approssimata
Proporzione dei **NEGATIVI** nei soggetti senza fattori di rischio per l'infezione tubercolare
(fattore di rischio come gold standard)

Title: Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis.

Authors: Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A

Journal: Chest - Publication Date: Volume 137 - Issue 4 - **Apr-2010**

- This **metaanalysis** critically appraises studies investigating sensitivity and specificity of the commercial T-Spot.TB and the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay (QFT-IT) among definitely confirmed TB cases.
- We searched Medline, EMBASE, and Cochrane bibliographies of relevant articles. Sensitivities, specificities, and indeterminate rates were pooled using a fixed effect model. Sensitivity of the tuberculin skin test (TST) was evaluated in the context of IGRA studies. In addition, the rates of indeterminates of both IGRAs were assessed.

“The newest commercial IGRAs are superior, in comparison with the TST, for detecting confirmed active TB disease, especially when performed in developed countries” (a bassa prevalenza)

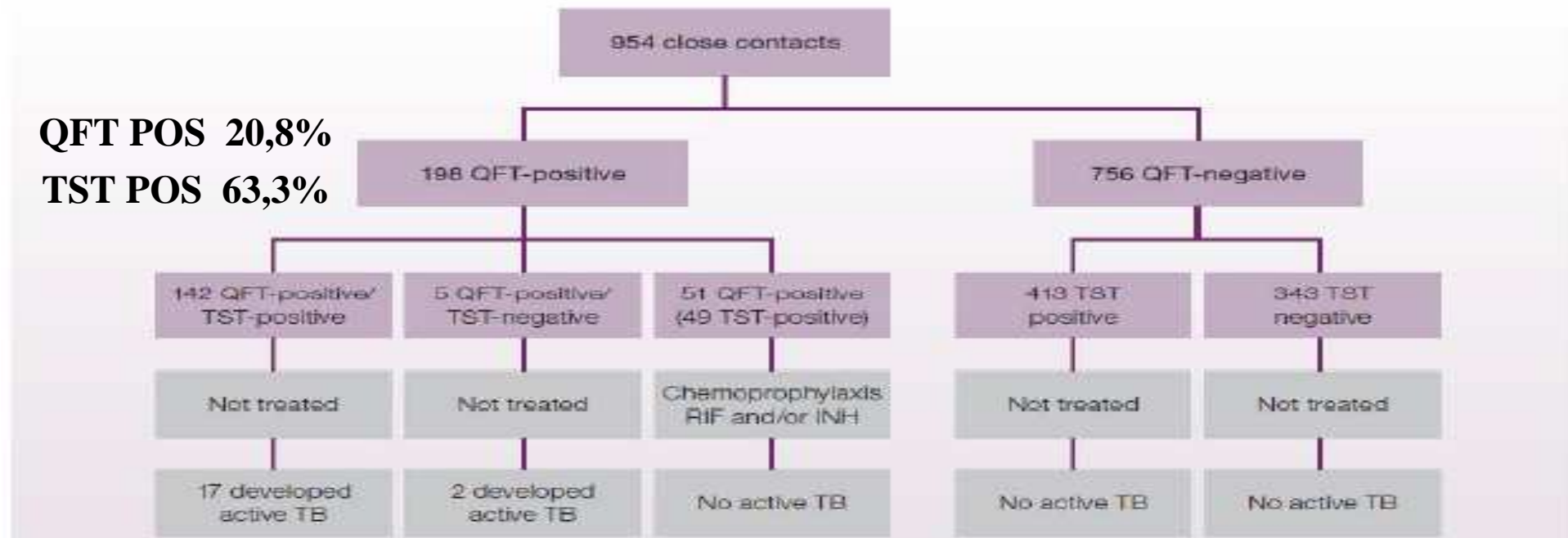
- ✓ **Sensitivity**, when restricted to performance in **developed countries**, increased to 84.5% for the QFT-IT and **88.5% for T-Spot.TB**, TST was 71.5%
- ✓ **Specificity** of the **QFT-IT was 99.2%** vs 86.3% for the T-Spot.TB .
- ✓ **Indeterminate results** was low, 2.1% for the QFT-IT and 3.8% for the T-Spot.TB, increasing to 4.4% and 6.1% respectively, among immunosuppressed .

Negative and Positive Predictive Value of a Whole-Blood Interferon- γ Release Assay for Developing Active Tuberculosis

An Update

Roland Diel¹, Robert Loddenkemper², Stefan Niemann³, Karen Meywald-Walter⁴, and Albert Nienhaus⁵

¹Department of Pneumology, Hannover Medical School, Hannover; ²German Central Committee against Tuberculosis, Berlin; ³National Reference Center for Mycobacteria, Research Center Borstel, Borstel; ⁴Public Health Department Hamburg Central, Hamburg; and ⁵Institution for Statutory Accident Insurance and Prevention in the Health and Welfare Services, Hamburg, Germany



> Sensibilità di progressione a malattia

QFT ha rilevato tutti i contatti che hanno progredito a malattia attiva

TST (cut-off > 5mm) non ha rilevato 2/19 contatti che hanno progredito a malattia attiva

Due anni di follow up

QFT è più affidabile del TST nell'identificare i soggetti 19/19 (100%) che progrediscono entro breve a malattia attiva."

Tasso di progress.: QFT pos: 12,9% (Adulti 10% - <16 anni 29%) TST >5mm: 3,1%

Riduce i costi complessivi dello screening dei contatti

Abbatte il numero delle analisi di approfondimento e dei trattamenti preventivi inappropriati.

from Diel et al, Chest, 2010
test most accurate

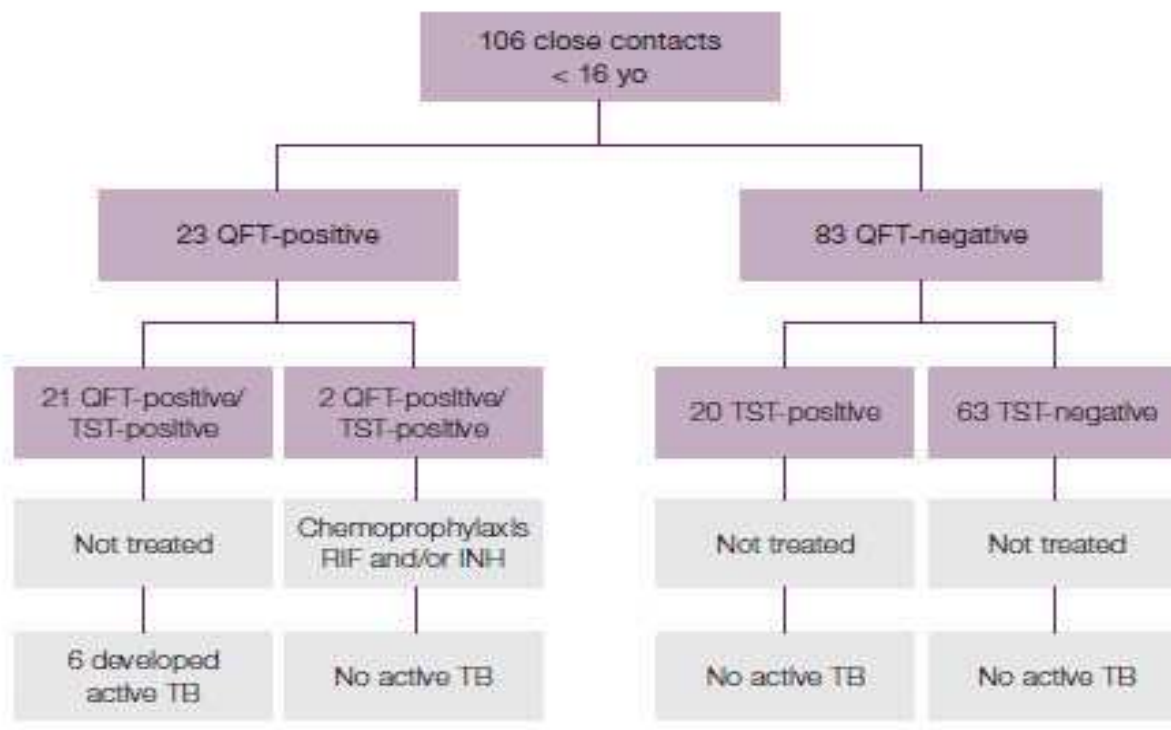
TEST	PPV (%)	NPV (%)	Accuracy (%)
QFT	84.8%	99.2%	98.5%
T-Spot	25.4%	99.3%	86.4%
TST	14.6%	98.1%	77.7%

QFT is far more accurate than either the TST or T-Spot.TB, providing the correct answer for 985 of the hypothetical 1,000 people (only **15 people incorrect**)

If these calculations are performed for different prevalences (0 up to 50%), QFT remains the more accurate test.

Dove l'infezione da TB ha una prevalenza relativamente bassa è importante utilizzare un test con alta specificità che ridurrà molti falsi positivi.

Per 106 dei 141 bambini (<16 anni), *follow up per 3.5 anni*
test in vitro QFT e test in vivo TST



Tasso di progressione a malattia

QFT+ : 28.6%

TST > 5 mm: 15.0%

Tutti i 6 bambini che progrediscono a malattia attiva sono QFT-positivi

Il QFT è almeno paragonabile al TST nell'identificare la progressione a malattia nei bambini

Da uno studio su 207 bambini:

- QuantiFERON-TB Gold In-Tube POS. risulta associato con l'incremento di esposizione al M tuberculosis .
- Bambini piccoli (< 5 anni) producono bassi livelli di Interferon.
- Riguardo alla sensibilità, soprattutto per bambini piccoli è necessaria un'ulteriore valutazione „ long-term”. (Pediatrics 2009;123:30–37)

Raccogliere tutti i dati disponibili e trattare

Per i bambini terapia risulta meno tossica

Quantiferon *NON* consigliato

nella Diagnosi di Tuberculosis attiva nel bambino perché:

- Nella TB attiva le **cellule T sono reclutate nella sede di infezione** lasciando il circolo dove rimane solo il 2-5% del pool dei linfociti.
Le cellule T produttrici di INF- γ TB specifiche sono presenti quindi in numero limitato **nel plasma del bambino** e di conseguenza producono **livelli più bassi di INF- γ** .
- A differenza dell'adulto nel quale la TB è generalmente causata da riattivazione o reinfezione e basta solo un'espansione clonale dal pool di cellule T memory già presenti, la **tuberculosis** del bambino è **sempre primaria**.
Le **cellule T effettrici antigene-specifiche** sono quindi **generate ex novo** ed anche la **produzione di INF- γ** risulta molto rallentata.
- I risultati dei tests che basano la loro risposta sulle cellule T effettrici possono essere **più probabilmente falsi neg. nel bambino** che nell'adulto. (Sistema immune immaturo)

C Lange et al, 2009

IGRA e HIV



- Hiv è il maggiore fattore di rischio conosciuto per la riattivazione di TBC latente.
- Nella co-infezione TB-HIV il **rischio** di riattivazione è **50-200 volte aumentato**
- TB è nel mondo la > causa di morte in persone infette HIV/AIDS

Diversi recenti studi dimostrano che QFT risulta avere > **sensibilità** rispetto al TST anche in HIV positivi con **TBC attiva**. 77-85% verso 15-46%

Forte **riduzione di falsi positivi** rispetto **al test TST** che prende anche **MOTT e/o vaccinati** e spesso induce inutili trattamenti per TBC con deleterie conseguenze in questi soggetti.

Falsi negativi si riscontrano in particolare nei pazienti con conta CD4<100/ul, ma a differenza del TST, il QFT è in grado di riconoscere pazienti realmente negativi da quelli anergici attraverso il Controllo positivo. (INDETERMINATI)

Stephan et al AIDS 2008

- Scopo del lavoro: valutazione incidenza e fattori di rischio in HIV+ e paragone tra i test.
286 pazienti in paese a bassa prevalenza
Entrambi IGRA più sensibili di TST ma meno sensibili che in HIV neg.



IGRA e farmaci biologici

Aumento del rischio di sviluppare TB attiva

4-8 volte maggiore per i pazienti in terapia con **Inibitori del (TNF- α)**

5 volte maggiore per i pazienti in terapia con **ormoni steroidei**

Gli IGRA sono di aiuto nella diagnosi delle infezioni da
Mycobacterium tuberculosis

e devono essere utilizzati in associazione alle informazioni
relative alla **storia clinica ed alla radiografia toracica del paziente**

Linee Guida internazionali e Raccomandazioni per pazienti in terapia con farmaci biologici

Uso solo di IGRA	Germania Svizzera Giappone Bulgaria Polonia Austria
Uso di IGRA o TST	–Australia , Danimarca (preferenza IGRA) , Francia (preferenza IGRA) , USA (US CDC)28* Bosnia ed Erzegovina29
Uso sia di IGRA che TST	–European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) UK (in alternativa solo IGRA) USA (può essere considerato se uno dei test è negativo; US CDC)4**, Portogallo, Repubblica Ceca, Croazia, Slovacchia, Corea del Sud, Olanda, Irlanda (preferenza TST)
se TST è negativo \Rightarrow IGRA	–Canada, Italia, Spagna , Arabia, Saudita
se TST è positivo \Rightarrow IGRA	– Spagna, Norvegia
Solo TST	–Brasile
Nessuna raccomandazione	–Finlandia, Australia (National TB Advisory Committee)

Più accurato del TST nei pazienti immuno-soppressi⁹⁻¹⁰

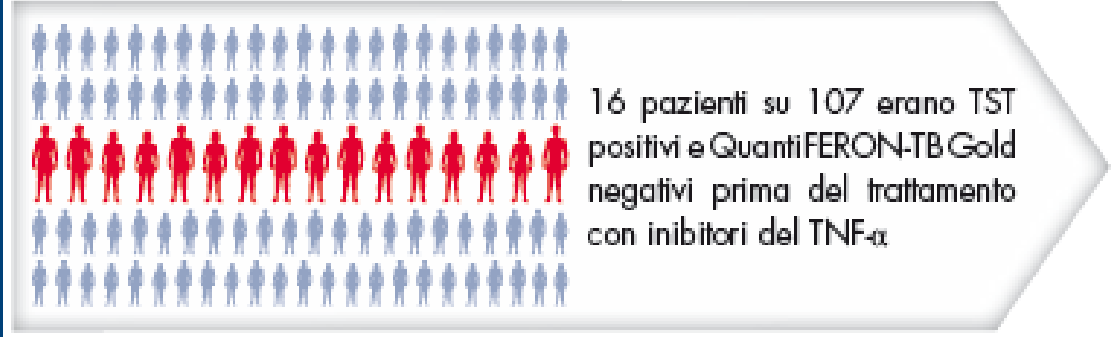
Psoriasi da moderata a severa¹¹



Nessuno ha sviluppato TB attiva entro 12 mesi



Malattie reumatiche¹²



Nessuno ha sviluppato TB attiva entro 24,5 mesi

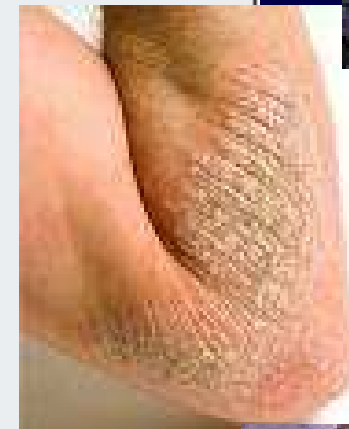


Riduce i trattamenti non necessari dei falsi-positivi al TST



QFT-Risultati affidabili in pazienti immuno-soppressi

Gruppo Pazienti	QuantIFERON-TB Gold Differenziazione	QuantIFERON-TB Gold Benefici
Pazienti con precedente vaccinazione BCG	A differenza del TST, i risultati non sono influenzati da precedente vaccinazione con BCG ^{12-14,15}	Elimina i risultati falsi-positivi associati al BCG ¹²⁻¹⁵
Pazienti con patologie reumatiche <ul style="list-style-type: none"> ■ Artrite reumatoide ■ Spondilite anchilosante ■ Artrite reumatoide giovanile Pazienti in terapia immuno-soppressiva <ul style="list-style-type: none"> ■ Methotrexate ■ Prednisolone ■ S-ASA ■ Azatioprina ■ Iniezioni intramuscolari di betametasona, triamicolon o metil-prednisolone 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Meno influenzato rispetto al TST dalle terapie immunosoppressive in pazienti con malattie reumatiche⁹⁻¹⁶ ■ Identifica i TST falsi negativi⁹⁻¹⁷ ■ Il controllo positivo fornisce indicazioni sulla capacità del paziente di rispondere ad una stimolazione immunologica⁸ 	Identifica più accuratamente i pazienti con infezione TB che sono a rischio accresciuto di sviluppare una TB attiva ^{9-11,16-17}
Pazienti con precedente QuantiFERON-TB Gold test	A differenza del TST, assenza di effetto booster nei risultati per un precedente test analogo ¹⁸	Ideale per screening seriali
Pazienti con storia di TST*	A differenza del TST, assenza di effetto booster nei risultati in pazienti LTB negativi ¹⁸	Ideale per screening seriali





Tuberculosis in Ospedale

- TB è un problema tra gli operatori sanitari
- TB screening degli operatori sanitari
 - TST verso IGRA , studi di comparazione
 - Costoefficacia di TB screening

HCW are at risk for TB infection

Active TB in a HCW: What is the chance that it is work related?

Quale è la dimostrazione che la trasmissione è avvenuta da un paziente?

case	age	sex	IS6110-DNA-Fingerprint
1	25	m	 Index
2	68	m	 ENT-doctor

- A waiter from Bali was seen one time for throat problems
- 3 weeks later, the waiter was diagnosed with TB
- 3 years later, the physician (ENT-doctor) developed TB


2 European HCW studies with fingerprint and interview

- Germany / Hamburg
- 8 out of 10 (80%) caused by patient contact (Diel et al Resp Research 2005;6:35)
- The Netherlands
- 28 out of 67 (42%) caused by patient contact.
- main cause of transmission: **delayed diagnosis** of the index case, especially in elderly patients. (de Vries et al Eur Respir J 2006;28(6):1216-21)

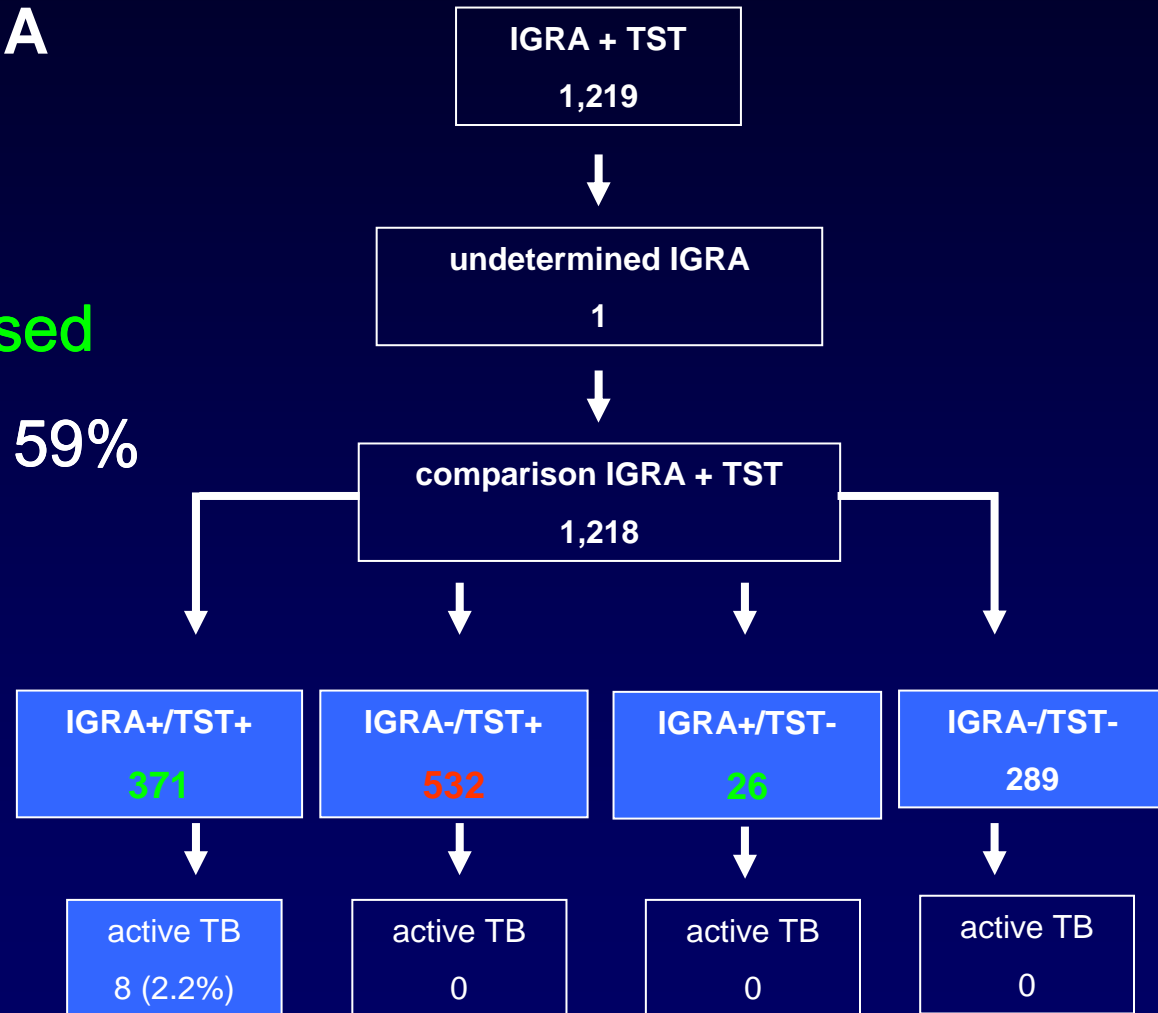


Hospital de São João, Porto, Portugal

Screening with IGRA
since 2007

 **No active TB missed**
X-ray reduced by 59%

$IGRA + = 371 + 26 = 397$
 $TST + = 371 + 532 = 903$



Available evidence concerning cost of screening

- 11 publications available on cost
 - 4 cost analysis of screening or LTBI-detection
 - Costs for test, chemoprevention and chest x-ray
 - 7 cost-effectiveness analysis of TB-prevention
 - additional costs for treatment of active TB
 - Cohort follow-up: 2 years to life long
 - Survival analysis with Markow Model

Conclusion: Introduction of IGRAs reduces cost

how can this be explained?

- high progression to active TB for QFT+ contacts
 - 15% for QFT+ and 2% for TST+ in two years
- low specificity of TST
 - 15% in Japan with BCG repeated in adults

La TBC tra gli operatori sanitari è un grosso problema

Vantaggi degli IGRA's nei test seriali

- ❖ **Una più alta specificità**
mancanza di effetti dovuti al BCG e Mott
- ❖ **Sensibilità e buon valore predittivo positivo per TB attiva nei contatti.**
- ❖ **Incremento del costo-efficacia negli screening per TB**
- ❖ **Non necessita di un protocollo a 2-step**
- ❖ **Il boosting non rappresenta un problema**
(Effetto Booster del TST su IGRA's : Il prelievo va effettuato entro tre giorni dal TST)

Azienda Sanitaria di Bolzano

Controllo individuale antitubercolare con QFT-G per operatori sanitari dipendenti e tirocinanti
(**stessi gruppi testati sino ad oggi con TST**)

Operatori sanitari (OS) neoassunti dipendenti e tirocinanti: **QFTG baseline**

OS a livello 3-4 di rischio : **QFTG annuale**

QFTG Neg: archiviazione del dato; non ulteriori accertamenti

QFTG Pos: invio con richiesta al Servizio Pneumologico (SPI) × valutazione medica, Rx grafia torace ed ev. terapia LTBI, consegna di foglio informativo su sintomi suggestivi di TB

Ricerca epidemiologica nei **casi contatto** - livello 5 di rischio-:

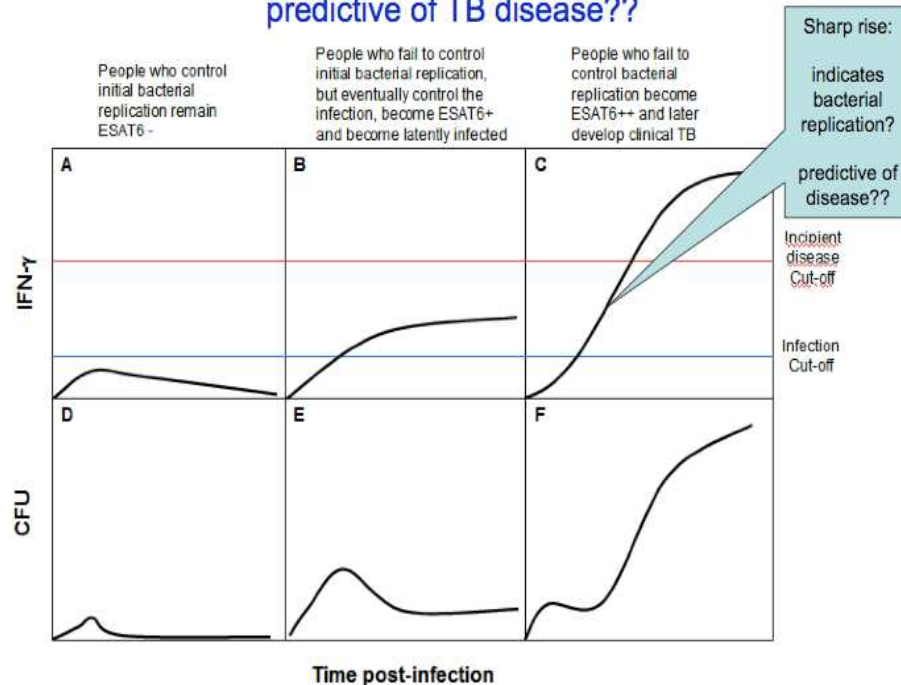
OS e tirocinanti : QFTG e scheda anamnestica

QFTG-Neg e scheda anamnestica negativa: archiviazione del dato e ripetizione QFTG con scheda anamnestica **dopo 2 mesi**

QFTG Pos: invio con richiesta al Servizio Pneumologico (SPI) × valutazione medica, Rx grafia torace ed ev. terapia LTBI, consegna di informativo su sintomi suggestivi di TB.

- **Un forte incremento di IFN-gamma nella risposta linfocitaria T agli antigeni RD1 potrebbe essere predittivo di TBC attiva**

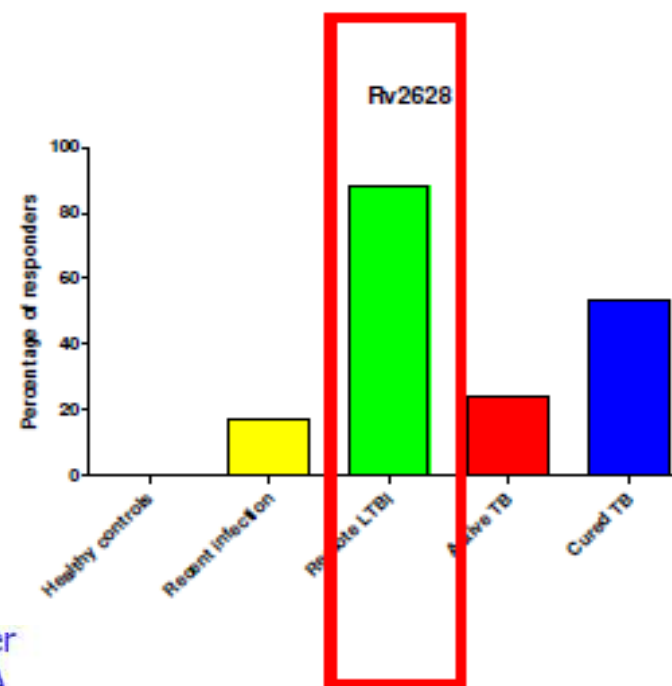
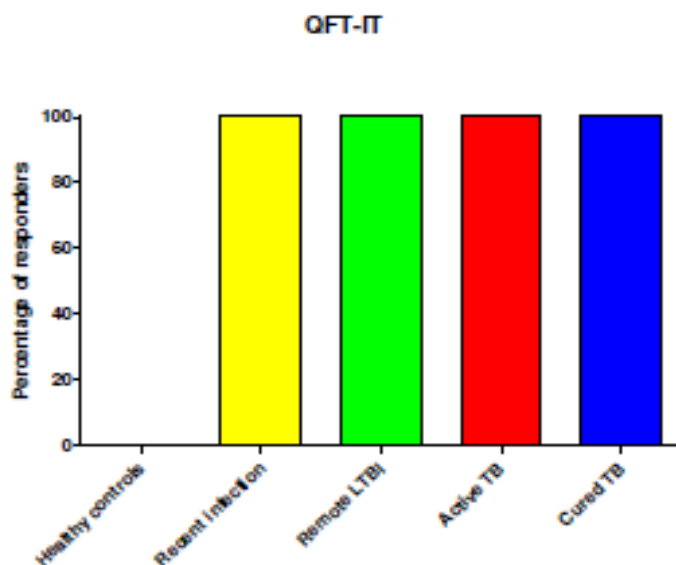
A sharply rising level of IFN-g after exposure could be predictive of TB disease??



Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K; *Trends Mol Med* 2007

Questo dev'essere ancora confermato sebbene siano disponibili dati verosimili supportati da alcuni dati indiretti.

IFN- γ response to the antigen of latency Rv2628 is associated to remote LTBI

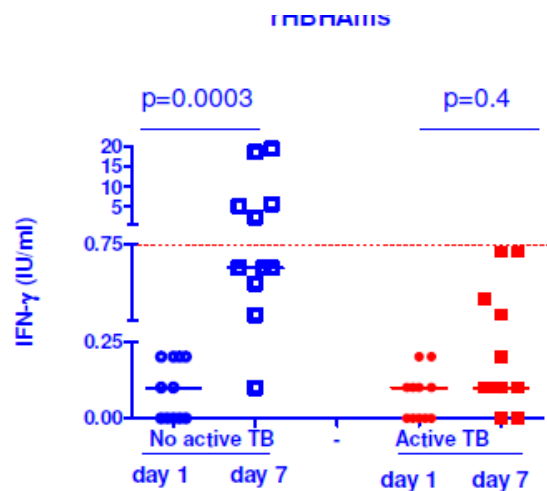
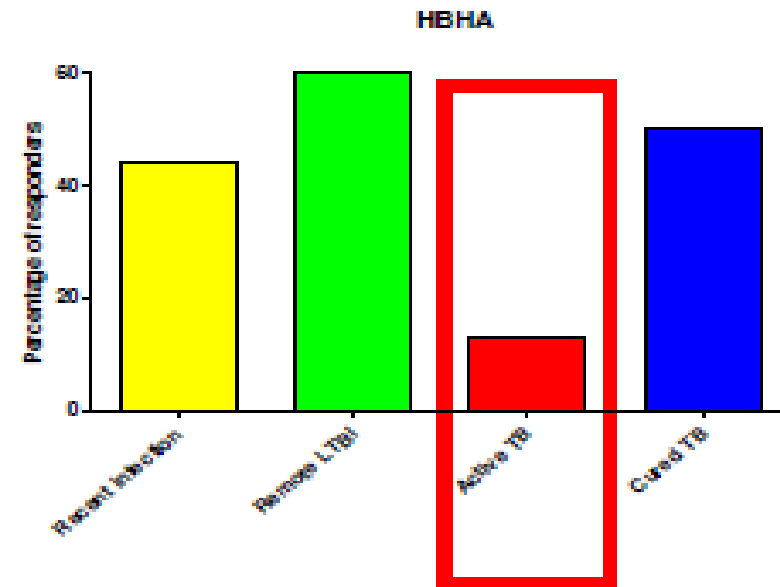
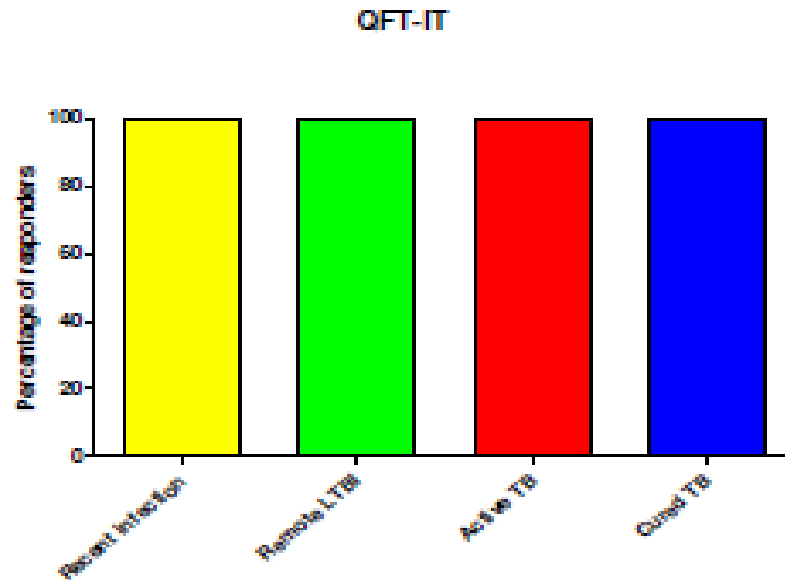


- Screening of contacts of patients with active TB, after exclusion of Active TB, among those positive to IGRA

Goletti et al, ERJ 2010

	IGRA-positive	
	Rv2628+	Rv2628-
	Likely	Likely
	Remote LTBI	Recent Infection
		Higher need of chemoprophylaxis

IFN- γ response to the methylated HBHA of *M. tuberculosis* produced in *M. smegmatis* is significantly reduced in patients with active tuberculosis



Delogu, et al and Goletti, in press PloS One

- Screening of subjects suspected of active TB, among those positive to IGRA

	IGRA-positive	
	mHBHA-	mHBHA+
	Likely Active TB	Likely No active TB: Recent Infection, Remote Infection, past cured TB

Marker different from IFN- γ (IP-10, MCP-2, IL-2)

- **Detection of IP-10 (citochina) in the plasma from QuantiFERON-TB Gold In-tube in samples from patients with active TB with a negative QFT results**

**INCREASE OF SENSITIVITY
in active TB!**

–Interferon-gamma-inducible 10 kD protein

Biological sample different from blood (BAL, pleural fluid, CSF, urine, skin)

- **IGRA at the site of TB disease: BAL vs blood**
- **IP-10 decreases in the urine of TB patients after successful therapy**
- **Skin test (test cutaneo) based on rdESAT-6**

Immunità naturale (Innata)

- Macrofagi alveolari sono la prima barriera atta a distruggere il germe appena arrivato in sede di infezione prima che possa moltiplicarsi. (Potere battericida e virulenza bacillo)
- Fattori genetici o acquisiti.
Differenze etniche nella suscettibilità allo sviluppo di TBC.
Popolazioni caucasiche e Nord Europa da secoli soggette ad epidemie letali che le hanno selezionate e rese più resistenti dei neri africani, indiani americani e asiatici.
- Sembra che un **gene Nramp-1** (Natural Resistance Associated Macrophage Protein-1) conferisca nell'uomo, resistenza al micobatterio.
Proteina macrofagica che influisce sul trasporto dei metalli Fe e Manganese.
Sequestra Fe dall'ambiente circostante impedendo la replicazione.
Difetti genetici di Nramp-1 responsabili di > suscettibilità.
- Si cerca di individuare le proteine che il micobatterio esprime nelle fasi precoci dell'infezione in fase di stress da mancanza di Ferro.
- Selezionati set di geni che rende la popolazione meno suscettibile.

-A) Algoritmo per:

a. Tutti gli operatori sanitari (OS) neoassunti dipendenti e tirocinanti: QFTG baseline

b. OS a livello 3-4 di rischio con precedente QFTG Neg o QFTG mai fatto in precedenza: QFTG annuale

- QFTG Neg: archiviazione del dato; non ulteriori accertamenti;
- QFTG Pos: invio con richiesta al Servizio Pneumologico (SPI) x valutazione medica, Rx grafia torace ed ev. terapia LTBI, consegna di foglio informativo su sintomi suggestivi di TB (OS entra in protocollo di controllo passivo della malattia cioè è informato di richiedere visita al SPI).

Percorso ed attori:

1. Richiesta di QFTG: Med Lav per neoassunti; Dir. ospedaliera o territoriale per test annuale;

2. Prelievo: Laboratorio ospedaliero o Lab Microbiologia

3. Eventuale trasporto materiale ematico dal laboratorio ospedaliero al Lab. Microbiologia

4. Esecuzione QFTG e refertazione: Lab. Microbiologia;

5. Invio referto da Lab. Microbiologia a: Servizio richiedente e copia alla Med Lav;

6. Qualora il richiedente è Med Lav: invio di copia da Med Lav a direzione competente;

7. Selezione degli operatori sanitari QFTG-Neg dai QFTG-Pos: a cura del servizio richiedente;

8. Informazione-comunicazione al OS del QFTG-Pos per suo invio a SPI con richiesta di visita pneumologica: a cura del servizio richiedente;

9. Accertamenti al SPI: (vedi algoritmo-punto b.-QFTG-Pos);

10. Comunicazione del SPI sull'esito degli avvenuti accertamenti ed ev. terapia della LTBI (referto medico) a: al servizio richiedente e Med Lav.

11. Qualora venga accertato un caso di tubercolosi attiva: invio di primo certificato medico a INAIL per malattia professionale dalla Med Lav.



B) Algoritmo per:

Ricerca epidemiologica nei casi contatto - livello 5 di rischio-:

OS con precedente QFTG-Neg o che non ha mai eseguito QFTG: QFTG e somministrazione di scheda anamnestica

QFTG-Neg e scheda anamnestica negativa: archiviazione del dato e ripetizione QFTG con scheda anamnestica dopo 2 mesi;

QFTG-Pos: accertamenti al SPI (vedi A algoritmo-punto b.-QFTG-Pos)

QFTG-Neg e scheda anamnestica positiva: accertamenti al SPI (vedi A algoritmo-punto b.-QFTG-Pos)

OS con precedente QFTG-Pos: accertamenti al SPI (vedi A algoritmo-punto b.-QFTG-Pos).

percorso ed attori:

dopo invio di lista del personale coinvolto dalla Direzione medica o territoriale al SPI:

1. Richiesta di QFTG e raccolta anamnestica nei casi contatto individuati: SPI;

2. Prelievo, trasporto materiale ematico dal laboratorio ospedaliero al Lab. Microbiologia, esecuzione QFTG e refertazione: come sopra ai punti 2-3;

3. Invio referto dal Lab. Microbiologia a: a cura di SPI richiedente;

4. Selezione degli OS QFTG-Neg/scheda anamn.-Neg vs. QFTG-Neg/scheda anamn.-Pos o QFTG-Pos, informazione-comunicazione agli OS QFTG-Neg/scheda anamn.-Pos e QFTG-Pos di recarsi al SPI: a cura di SPI

5. Accertamenti al SPI: (vedi A algoritmo-punto b.-QFTG-Pos)

6. Comunicazione del SPI sull'esito di tutti i QFT-G, degli avvenuti accertamenti e terapie (referto medico) a: Servizio inviante la lista del personale e Med Lav.

7. Qualora venga accertato un caso di tubercolosi attiva: come sopra al punto 11.



Prima che gli IGRA possano essere usati efficacemente nel test seriale vi sono alcune domande a cui è necessario rispondere

1. Cos'è una “reversione” IGRA e qual è il valore soglia per definire una reversione?
2. Cos'è una “conversione” IGRA e qual è il valore soglia per definire una conversione?
3. Qual è l'associazione tra una conversione IGRA e il rischio di progressione a malattia?
4. Il trattamento dei casi di conversione IGRA riduce il rischio di progressione a malattia?

Conversioni

- Domande chiave:
 - Quale aumento nella concentrazione di IFN-gamma è biologicamente indicativo di una nuova infezione, e quanto è dovuto al solo test o è oscillazione biologica?
 - Dovremmo usare il cut-off diagnostico anche per le conversioni?
 - Qual è il miglior modo per stabilire i cut-off?

TEST PER LA DIAGNOSI DI INFEZIONE TUBERCOLARE: CARATTERISTICHE A CONFRONTO

1 Test per la diagnosi di infezione tubercolare: caratteristiche a confronto

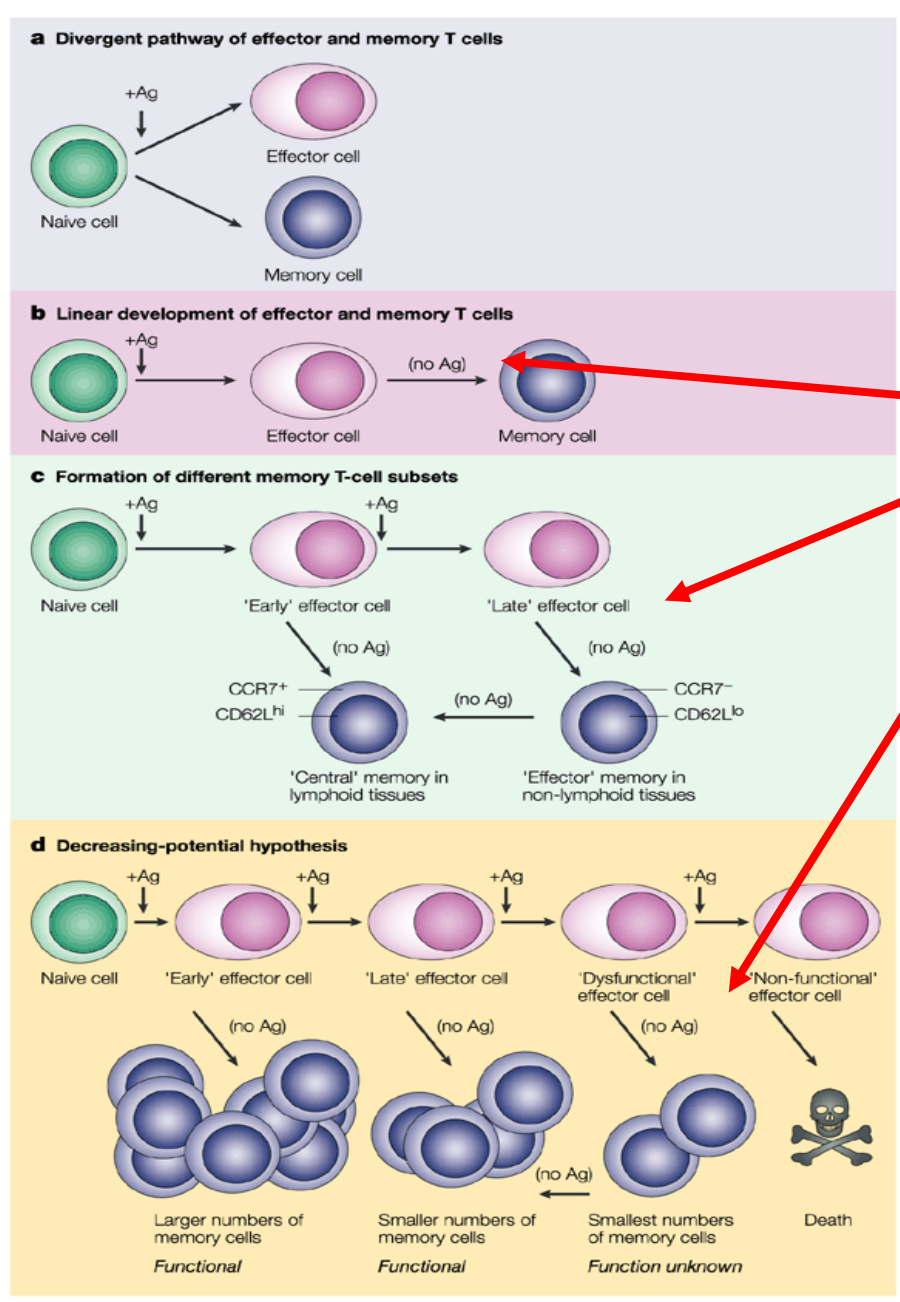
	Test cutaneo tuberculinico	QuantIFERON® TB GOLD	T Spot®-TB
Esecuzione	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>
Visita di ritorno	SI	NO	NO
Cross-reattività			
- BCG	SI	NO	NO
- micobatteri non tubercolari	SI	NO	NO
Effetto booster	SI	NO	NO
Tipo di antigeni	PPD	ESAT-6 e CFP-10	ESAT-6 e CFP-10
Tipo di risposta	Ipersensibilità ritardata	Produzione di IFN- γ	Produzione di IFN- γ
Tipo di risultato	Infiltrato cutaneo (diametro in mm)	Concentrazione di IFN- γ	n° di linfociti antigene-specifici
Sensibilità			
- popolazione generale	75-90%[38]	89%[34]	92-96%[37]
- HIV +	40-60% [35]	-	90%[35]
Specificità			
- popolazione generale	-	98%[34]	-
- HIV +	-	-	92%[39]

Nota: non esistendo un gold-standard per la diagnosi di infezione tubercolare latente, i dati relativi a sensibilità e specificità dei nuovi test immunologici si basano su studi condotti in pazienti con TB attiva confermata microbiologicamente.

Terapia dell'ITBL

Prima di iniziare il trattamento per l'ITBL, deve essere stata esclusa la presenza di una TBC attiva, mediante esecuzione contemporanea di:

- **anamnesi mirata e attenta,**
- **radiografia al torace,**
- **qualsiasi altro esame utile, sulla base dei dati anamnestici, clinici e radiologici disponibili, ad escludere/accertare la presenza di una forma attiva di TB.**



Tutte le teorie sullo sviluppo della *memoria cellulare* suggeriscono che la **formazione di cellule T di memoria, è in funzione della diminuzione di Antigene.**

(Kaeche et al 2002)



Strategie di controllo della TBC

1 – INTERRUZIONE--RIDUZIONE DELLA TRASMISSIONE DELL'INFEZIONE

Diagnosi e trattamento dei casi di malattia attiva, in particolare dei casi polmonari bacilliferi

**E' IL PROVVEDIMENTO PIU' IMPORTANTE
IN ASSOLUTO**

2 – DIMINUIZIONE DELLA SUSCETTIBILITA' ALL'INFEZIONE

Vaccinazione con BCG

- efficacia limitata e variabile
- solo per alcune categorie di individui

3 – IDENTIFICAZIONE PRECOCE DELL'INFEZIONE: SCREENING

Identificazione delle persone con infezione tubercolare latente e trattamento preventivo.

Perché?

Un caso contagioso lasciato a sè infetta altre 10 persone all'anno, delle quali a sua volta una si ammalerà di TBC.

L'infezione tubercolare latente

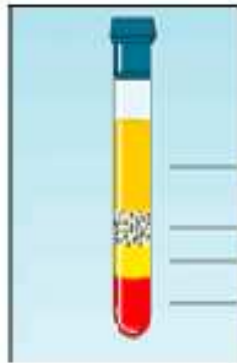
è una situazione pericolosa legata ad una condizione di **quiescenza** del micobatterio tubercolare che può successivamente riattivarsi causando la malattia attiva.

Occasionalmente può essere anche solo un ricordo immunologico di presunta infezione risolta, senza quindi micobatteri vivi (Mack et al, ERJ 2009)

COME SI POSSONO IDENTIFICARE I CASI DI INFEZIONE TUBERCOLARE?

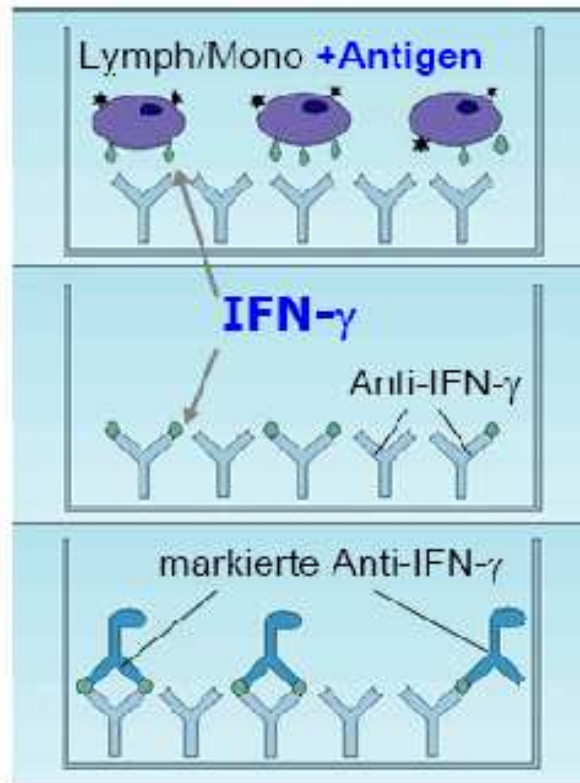
- Il test **TUBERCOLINICO** è il metodo in vivo usato per identificare i soggetti venuti in contatto con il bacillo tubercolare. (Mantoux 5 UI)
- Il test **QUANTIFERON TB Gold** e il test **T SPOT-TB** sono i metodi diagnostici in vitro su un campione di sangue periferico

T SPOT-TB[®]

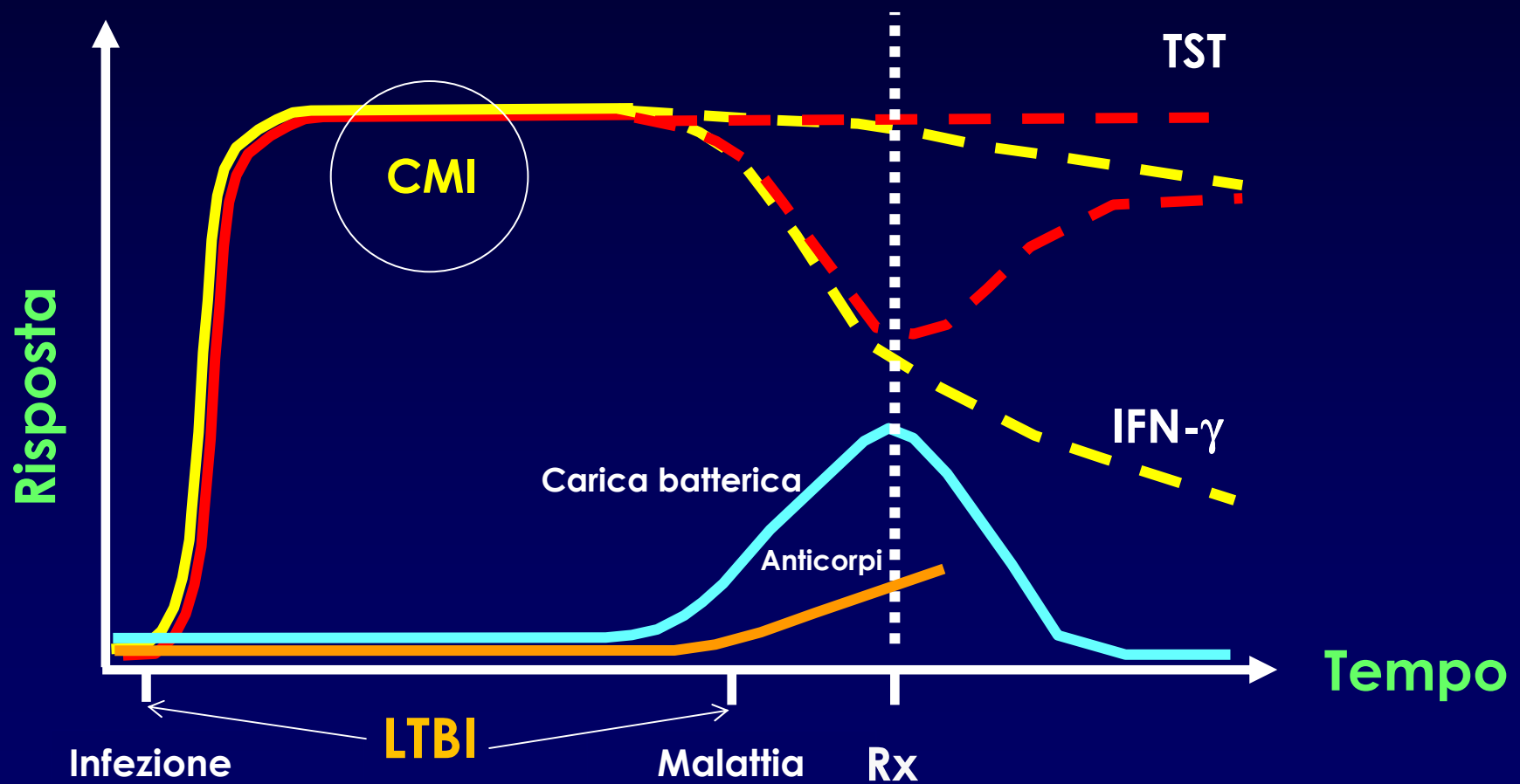


Plasma
Lymph/Mono
Gel
Ec+Granulo

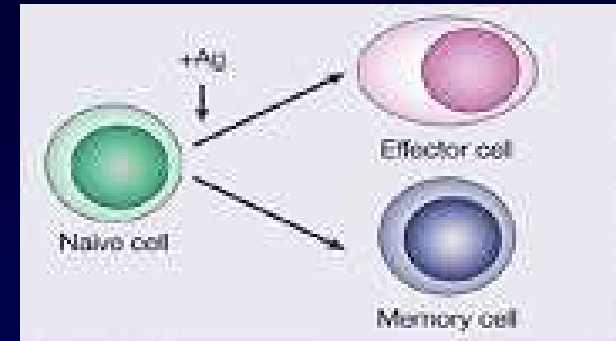
Oxford Immunotec launches
T SPOT-TB tuberculosis blood test



PREMESSA: Infezione e Risposta CMI (cellule T)



Attraverso i tests che dosano l' IFN- γ possiamo valutare l'entità delle **cellule effettrici marcatori** dell'infezione



- Le cellule **EFFETTRICI** producono IFN- γ entro alcune ore dalla stimolazione. (Cellule a risposta pronta)
- Le cellule di **MEMORIA** devono proliferare ed impiegano più di 24 ore prima di produrre livelli significativi di IFN- γ .
- I test in vitro per IFN- γ richiedono un' incubazione di meno di 24 ore.

⇒ **IFN- γ deriva dalle cellule T effettrici**



CDC Guidelines on the Use of QuantiFERON Gold - 2005

December 16, 2005



- “the antigens impart greater specificity than is possible with PPD”
- “as sensitive as TST in detecting infection” in untreated TB
- “QFT-G can be used in all circumstances in which TST is currently used”
- Specific caution is indicated in “vulnerable populations” because no immunologic test can exclude the possibility of TB

•Nelle “Guidelines for the Investigation of Contacts of Persons with Infectious Tuberculosis” (CDC Atlanta, 2005) si suggerisce che :

•il QFT-G assay **POTREBBE** essere usato al posto del TST.

(Dr. Vernon)

On May 2, 2005, a new in vitro test QuantiFERON-TB GOLD (QFT-G, manufactured by Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia), received final approval from the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as an aid in diagnosing Mycobacterium tuberculosis infection, including both latent tuberculosis infection (LTBI) and tuberculosis (TB) disease

“The newest commercial **IGRAs** are **superior**, in comparison with the **TST**, for detecting confirmed active TB disease, especially when performed in developed countries” (a bassa prevalenza)

Pooled **Sensitivity**, when restricted to performance in **developed countries**, increased to 84.5% and 88.5% for the QFT-IT and T-Spot.TB, respectively. TST was 71.5% (*)

In contrast, **Specificity** of the QFT-IT was 99.2% vs 86.3% for the T-Spot.TB .

The pooled rate of **Indeterminate results** was low, 2.1% (95% CI, 0.02-0.023) for the QFT-IT and 3.8% (95% CI, 0.035-0.042) for the T-Spot.TB, increasing to 4.4% (95% CI, 0.039-0.05) and 6.1% (95% CI, 0.052-0.071), respectively, among immunosuppressed hosts.

PPV e NPV

Poichè nella maggior parte delle situazioni, l'infezione da TB ha una prevalenza relativamente bassa è importante utilizzare un test con alta specificità che ridurrà molti falsi positivi.

I parametri che il clinico deve prendere in considerazione quando deve decidere quale test usare.

➤ Valore Predittivo Positivo

(PPV: probabilità che un paziente con un test positivo risulti avere realmente le condizioni per cui il test è stato eseguito.)

➤ Valore Predittivo Negativo

(NPV: probabilità che un paziente con un test negativo risulti realmente essere libero dalle condizioni per cui il test è stato eseguito.)

-Menzies et al. Meta-analysis: New test for the diagnosis of LTBI: areas of uncertainty and recommendations for research. Ann Int Med 2007;146:340-54

-I nuovi test IGRA si rivelano **un'importante promessa** e posseggono un **eccellente specificità**. Ulteriori studi sono necessari per una più accurata valutazione delle performance in popolazioni ad alto rischio e nel testing seriale.
Studi longitudinali sono necessari per definire il valore predittivo degli IGRA test.

Evidenze IGRA Tests: specificità

Pai M, Zwerling A, Menzies D. Ann Int Med 2008; 149:
177-84

- Review sistematica e aggiornata
- Eccellente specificità del QFT
(meno dati disponibili sul T-spot commerciale)
- Alta specificità del TST in soggetti non-BCG vaccinati ma
bassa e variabile in soggetti BCG vaccinati

T-spot più sensibile del QFT/TST

TST for diagnosing LTBI

pro

- inexpensive
- no Lab needed

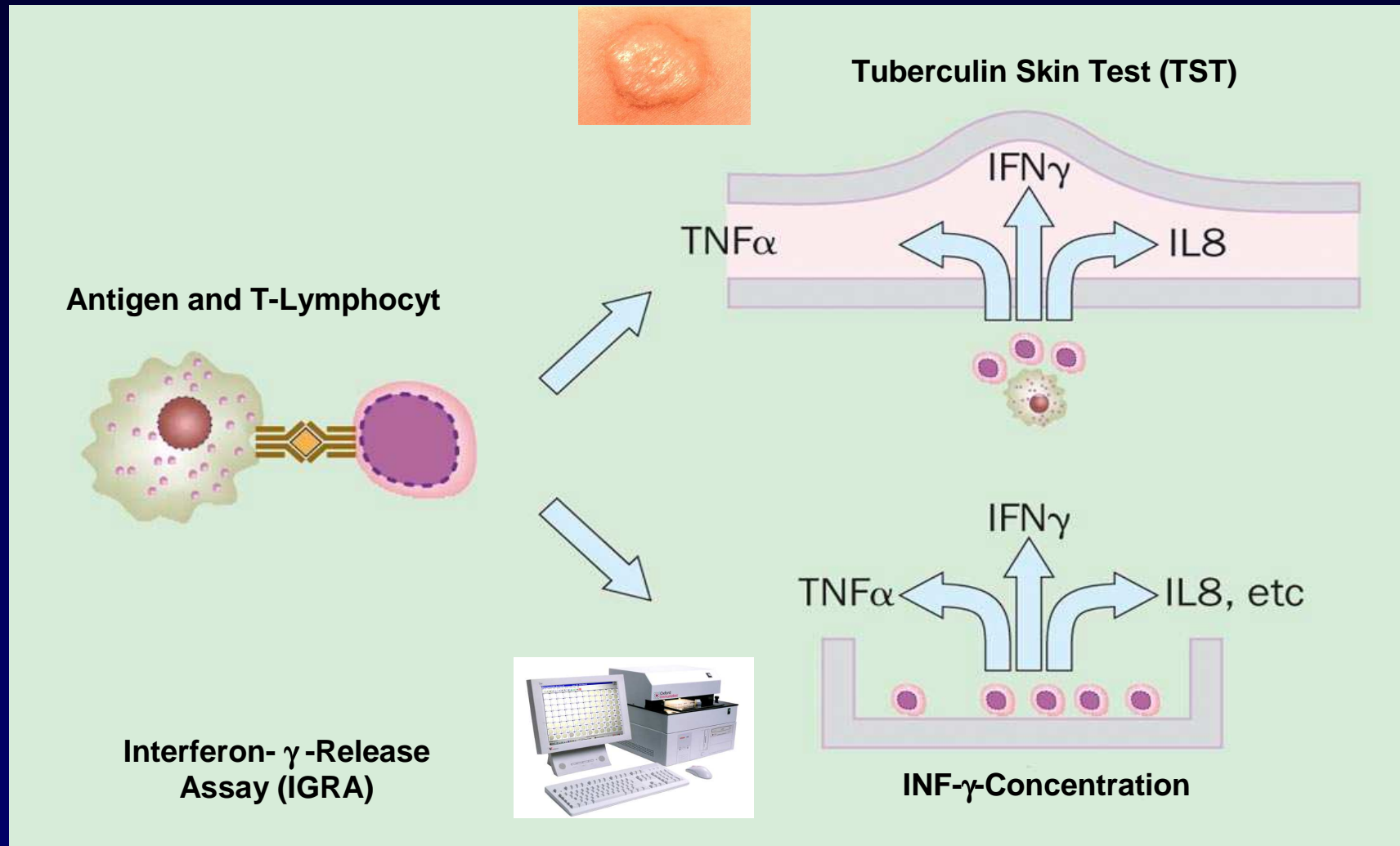


contra

- cross reaction with
 - BCG vaccination
 - NTM
- strong reaction
- second appointment
- boosting in serial testing
- no simple interpretation
 - > 5 mm
 - ≥ 10 mm
 - > 15 mm
 - increase by 10 mm



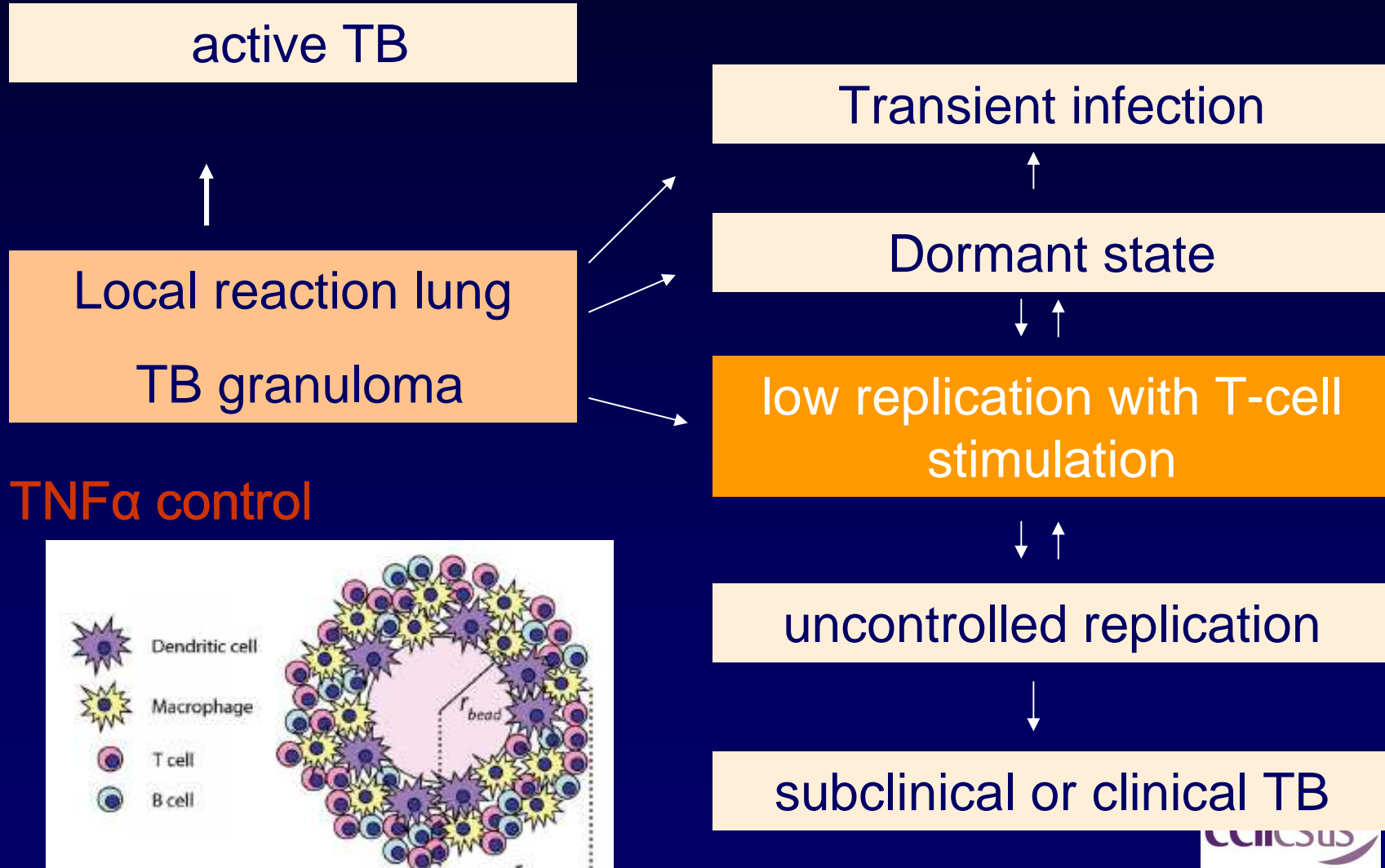
IGRA – ex vivo blood test



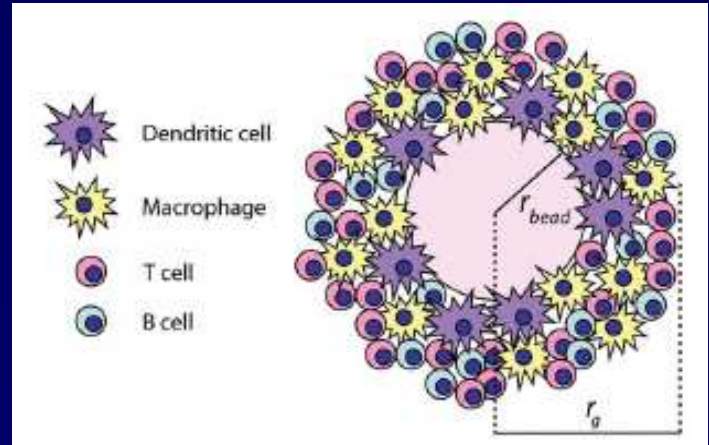
Alcune questioni fondamentali ancora poco chiare

- **Qual è l'interpretazione delle conversioni e delle reversioni del test IGRA?**
- **Qual è la prognosi di una conversione IGRA?**
- **Possiamo utilizzare i livelli di IFN-gamma per diagnosticare la malattia?**
- **Può un TST “boosterare” successive risposte IGRA?**

Reaction after infection



TNF α control



Serial testing of HCW with QFT

- Japan

- n=311
- conversion 5 out of 284 = 2%
- reversion 13 out of 27 = 43%

- Yoshiyama et al. Epidemiol Infect 2009:1-8

- India

- n=216
- conversion 17 out of 147 = 12%
- reversion 9 out of 38 = 24%



- Pai et al. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13(1):84-92

Cosa sappiamo della reversione IGRA?

- Le reversioni sono ben documentate
- Le reversioni sono meno probabili quando i risultati baseline sono doppi-positivi (TST+/IGRA+) dove ci si attende una marcata risposta IFN-gamma
- Le reversioni sono più probabili quando i livelli basali sono discordanti (TST-/IGRA+)
 - I risultati discordanti sono in genere risposte deboli con bassi livelli di IFN-gamma vicini al cut-off
 - variazioni non-specifiche intorno al cut-off possono portare a reversione
- Perché le reversioni avvengono?
 1. Alcune reversioni potrebbero riflettere la **scomparsa dell'infezione**
 2. Alcune reversioni potrebbero semplicemente essere dovute a **variazioni biologiche** (“oscillazione”) negli IGRA-positivi, e noi selezioniamo pazienti che si trovano nella fase di diminuzione della risposta all'infezione
 3. Alcune reversioni potrebbero essere dovute a variazioni nelle **procedure di laboratorio**
(manipolazione del campione, lavaggio nell'ELISA, etc.)

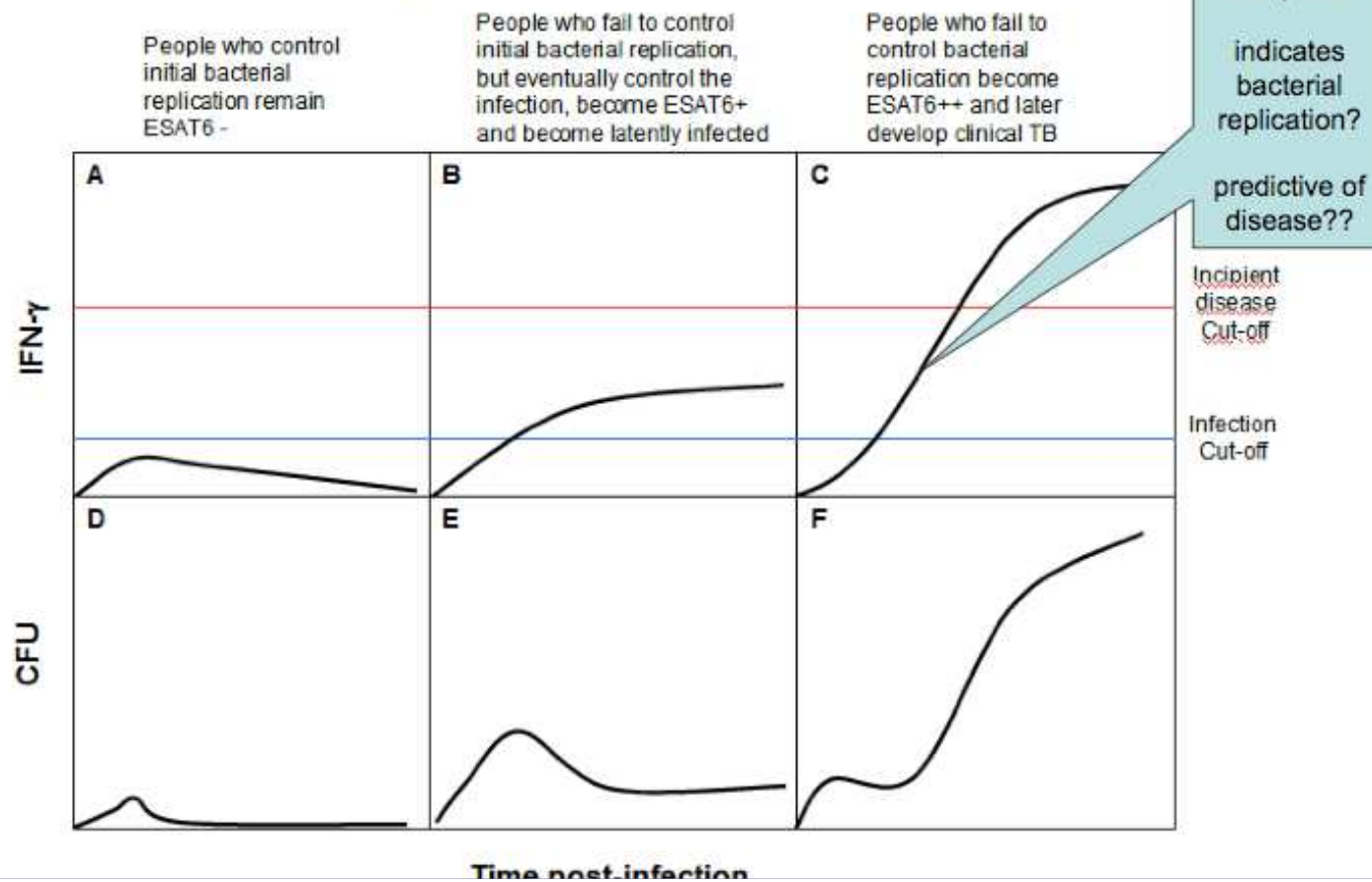
Cosa sappiamo delle conversioni IGRA?

- Le conversioni sono ben documentate
- **A seconda del cut-off usato** per la conversione, i livelli variano molto!
- Se per definire le conversioni si usa un semplice cut-off negativo-positivo, allora le conversioni saranno maggiori con IGRA che con TST (Pai et al, 2006; Pai et al, 2009 & Corbett et al, 2006)
 - Ciò può indicare una maggiore sensibilità per le “conversioni” (non necessariamente per “diagnosi”)
 - Ad ogni modo, parte dei maggiori livelli di conversioni è probabilmente dovuta a variazioni minori non-specifiche intorno al cut-off (Pai et al, AJRCCM 2006; Pai et al. IJTLD 2009)
 - Un cut-off (più alto) più stringente per la conversione potrebbe aiutare ad evitare di interpretare variazioni minori come conversioni

Associazione tra i livelli di IFN-gamma e il rischio di progressione a malattia

- Evidenza diretta limitata nell'uomo
 - La correlazione con la carica batterica e la patologia può essere solo dedotta
- Però, è stato **suggerito che il forte incremento nella risposta linfocitaria T agli antigeni RD1 potrebbe essere predittivo di TBC attiva**
 - Questo dev'essere ancora confermato sebbene siano disponibili dati verosimili e supportati da alcuni dati indiretti

A sharply rising level of IFN-g after exposure could be predictive of TB disease??



QuantiFERON® vs. TST:

Accuratezza

- Sensibilità e Specificità > TST
- Test *in vitro*, no effetto booster
- Unico “cut-off” di riferimento
- No soggettività lettura del TST

Sicurezza

- Test *in vitro*, provette dedicate
- Test *in vitro*, no effetti collaterali
- No manipolazione del sangue

CE certificato, **FDA** approvato - **MMWR/CDC** linee guida, etc.

Praticità

- Semplice da eseguire:
 - sangue intero/no separazione cellule T
 - automatizzabile da provetta primaria
 - adatto alla centralizzazione

Costi e salute

- Riduzione dei costi globali:
 - riduzione degli esami di approfondimento dei positivi
 - riduzione di trattamenti farmacologici inappropriati (tossicità)

Note: non esistendo un gold-standard per la diagnosi di infezione tubercolare latente, i dati relativi a sensibilità e specificità dei nuovi test immunitari oggi si basano su studi condotti in pazienti con TB attiva confermata microbiologicamente.

B) Algoritmo per:

Ricerca epidemiologica nei casi contatto - livello 5 di rischio-:

- a. OS con precedente QFTG-Neg o che non ha mai eseguito QFTG: QFTG e scheda anamnestica

QFTG-Neg e scheda anamnestica negativa: archiviazione del dato e ripetizione QFTG con scheda anamnestica dopo **2 mesi**;

QFTG-Pos: accertamenti al SPI



QFTG-Neg e scheda anamnestica positiva: accertamenti al SPI

- b. OS con precedente QFTG-Pos: accertamenti al SPI

HCW are at risk for TB infection

- Annual Infection Rate (TST conversion) in Torino before and after introduction of TB control in 2000
 - Nurses
 - Laboratory services
- | | before | after |
|---------------------|--------|-------|
| Nurses | 2.3% | 0.9% |
| Laboratory services | 4.2% | 1.7% |

Active TB in a HCW: What is the chance that it is work related?

case	age	sex	IS6110-DNA-Fingerprint
1	25	m	 Index
2	68	m	 ENT-doctor

- A waiter from Bali was seen one time for throat problems
- 3 weeks later, the waiter was diagnosed with TB
- 3 years later, the physician (ENT-doctor) developed TB

INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE

Nel mondo:

**2 miliardi di persone infette,
da cui deriveranno
8 milioni di nuovi casi all'anno**



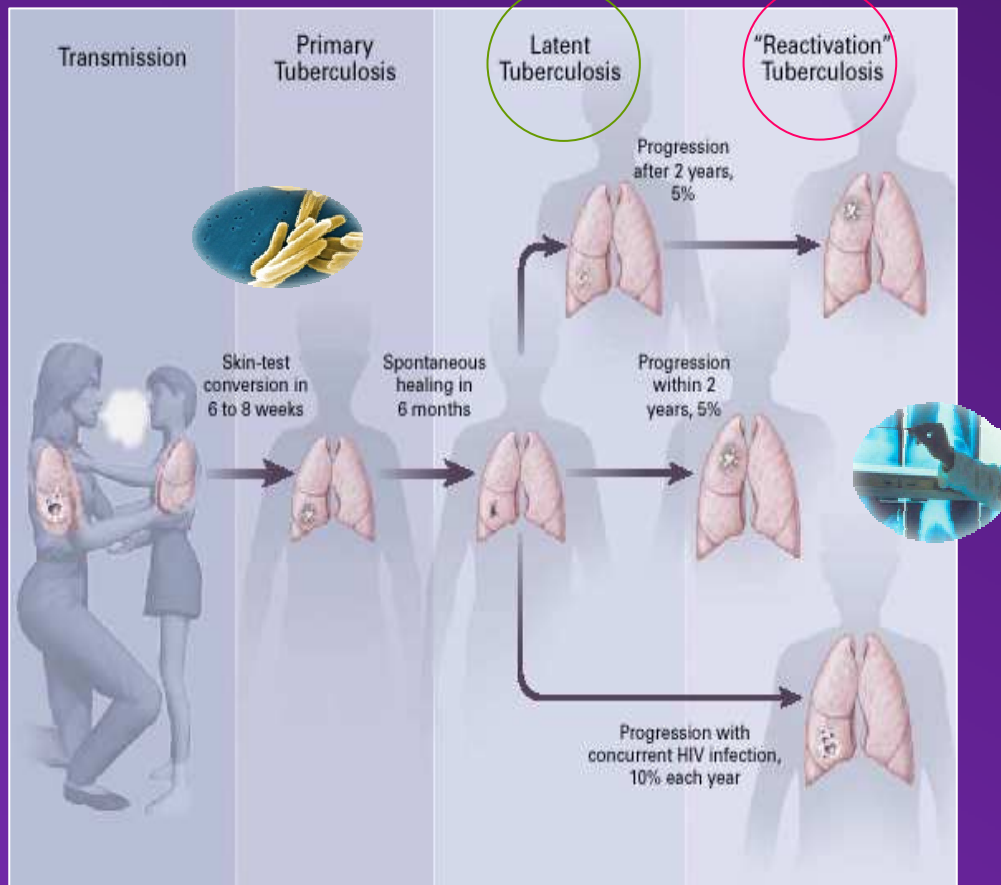
I nuovi casi di tubercolosi derivano dal “serbatoio” rappresentato dalle persone con infezione latente.

Se vogliamo ridurre i casi di tubercolosi attiva, dobbiamo incidere sul “serbatoio” di infezione.

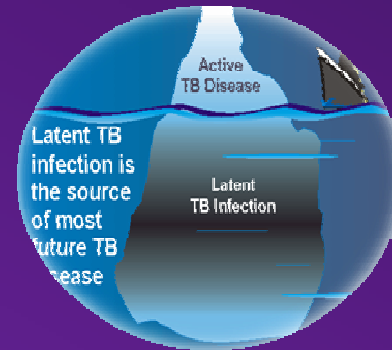
Infezione e Malattia:

Infezione latente
LTBI

Malattia
TB

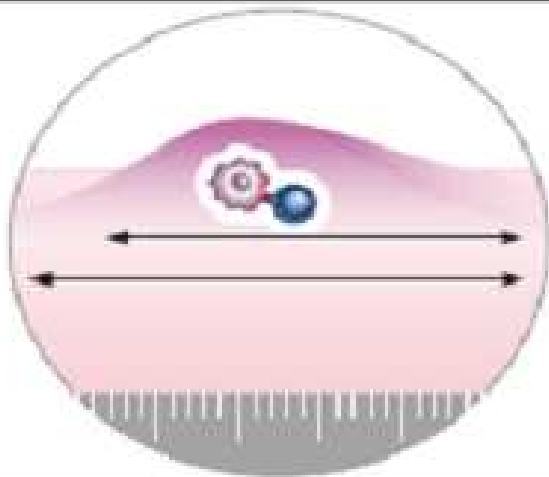
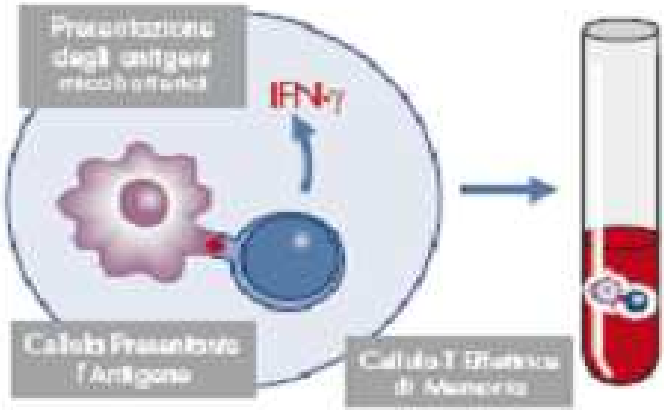


- Ogni giorno
5.000 persone muoiono di TB



- Ogni secondo
1 persona contrae l'infezione MTB
(stima di 2 miliardi di persone con LTBI)

“Dopo l’infezione, l’incubazione della tubercolosi può variare da poche settimane ad una vita intera.” Comstock GW et al, Am J Epidemiol 1974; 99: 131-138

	TST	QuantIFERON-TB Gold
		
	Risposta generale alla tubercolina. (PPD mix)	Test della risposta delle cellule T effettrici per la TB utilizzando proteine specifiche presenti solo nel TBcomplex.
Crossreazione con BCG	Possibile/probabile	No
Crossreazione con NTB	Si	No
Test di controllo	No	Si (Controllo positivo e negativo nel kit)
Oggettività	Misurazione dell'indurimento cutaneo, altamente soggettivo, elevata variabilità, intra/inter osservatore.	Determinazione quantitativa di Interferon-gamma

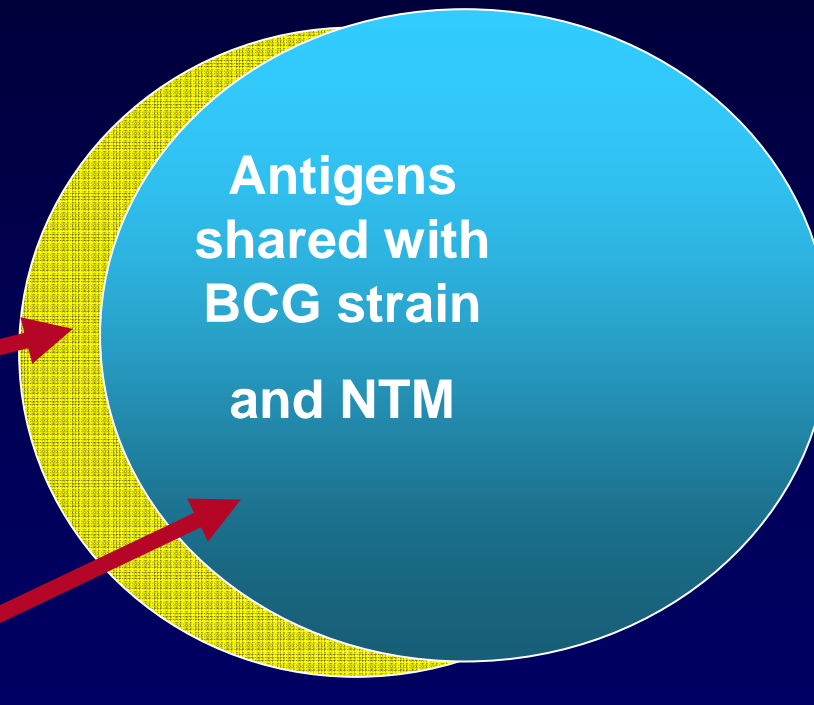
Aim: No cross-reaction with BCG and NTM



- QuantiFERON®-Gold In Tube (QFT) (Elisa)
- TSPOT-TB® (Elispot)

3 Antigens from the Region of Difference (RD1)

- ESAT-6
- CFP-10
- TTD7.1



TST uses Tuberculin with about 200 antigens

Probabilità di evoluzione dopo esposizione

Esposizione al BK

Assenza di infezione
90%

M.tuberculosis eliminato con o senza
l'intervento delle cellule T

Infezione
10%

Assenza di malattia
9%

Malattia
1%

Precoce

(50% rischio di progressione entro i 2 anni)

Tardiva

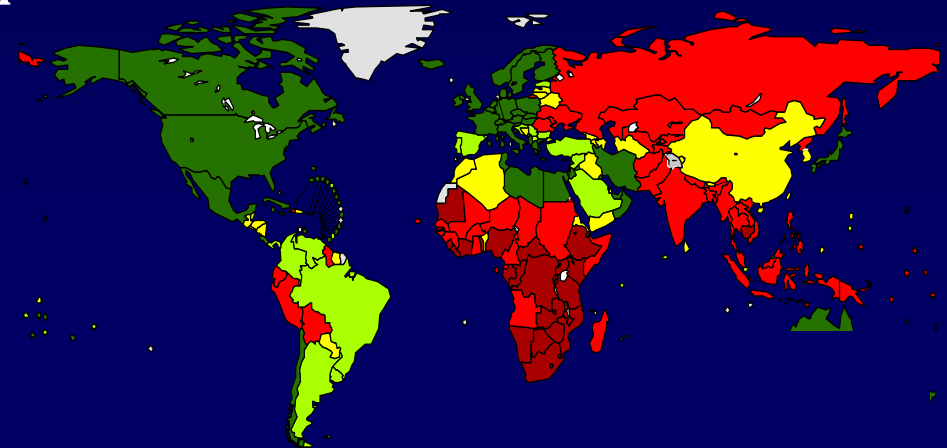
(50% rischio di progressione durante la vita)



Institute for Epidemiology and Health
Service Research for Healthcare Workers

Tubercolosi in Ospedale

- TB è un problema tra gli operatori sanitari
- TB screening degli operatori sanitari
 - TST verso IGRA
 - Costoefficacia di TB screening
 - Test seriali



Test nei bambini



Da uno studio su 207 bambini:

(Pediatrics 2009;123:30–37)

- a) Eccellente correlazione tra TST NEG. e QuantiFERON-TB Gold In-Tube NEG.
- b) Solo il 23 % dei bambini con TST POS. risultavano POS. anche al QuantiFERON-TB Gold In-Tube.
- c) QuantiFERON-TB Gold In-Tube POS. risulta associato con l'incremento di esposizione al *M tuberculosis* .
- d) Bambini piccoli (< 5 anni) producono bassi livelli di Interferon.

CONCLUSIONI

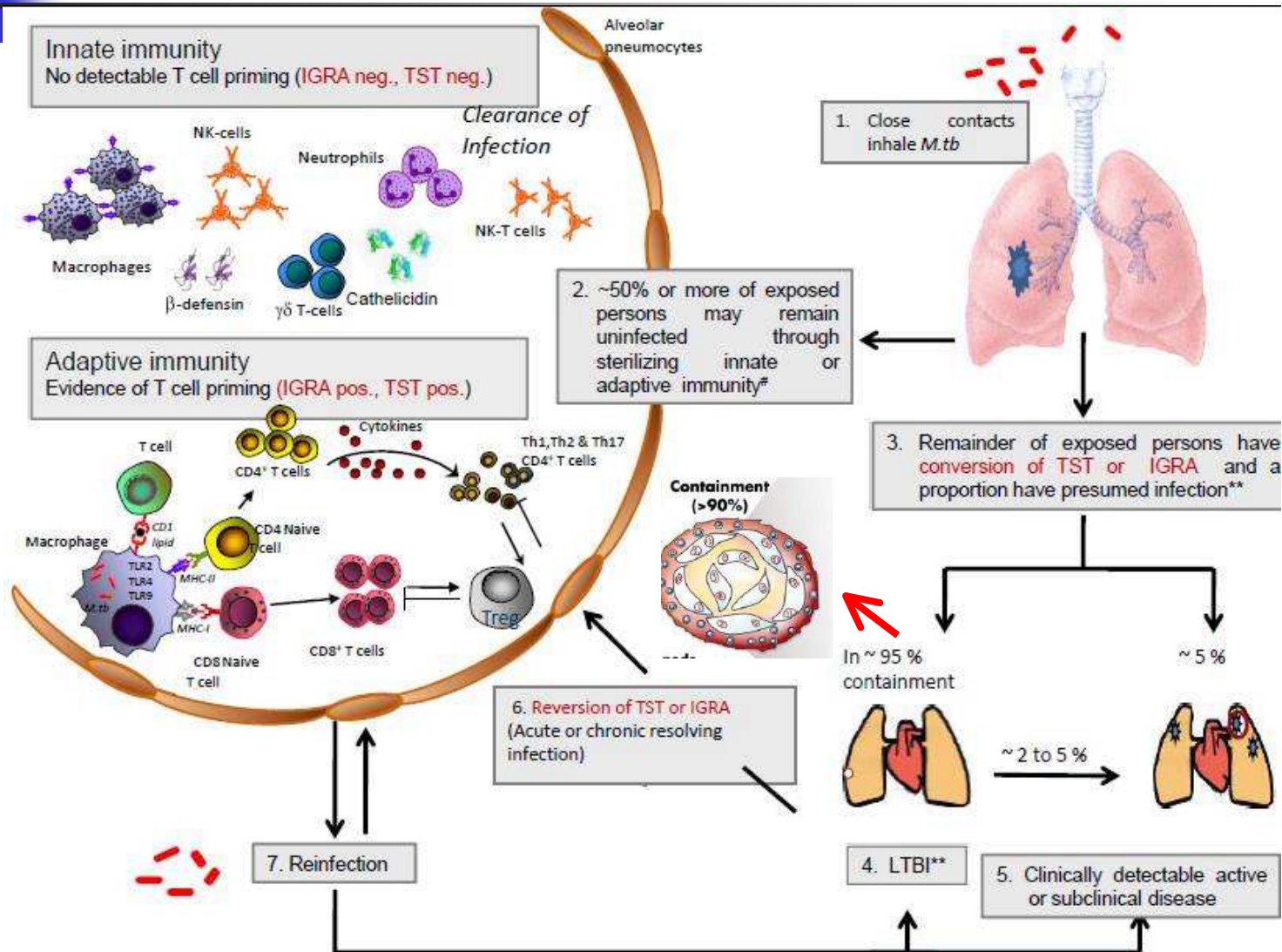
- A. Il QuantiFERON-TB Gold In-Tube test è un test specifico per l'esposizione a *M.tuberculosis* nei bambini.
- B. Nei paesi a bassa endemia le performans sono simili a quelle per gli adulti.
- C. Riguardo alla sensibilità, soprattutto per bambini piccoli è comunque necessaria un'ulteriore valutazione „ long-term”.

Raccogliere tutti i dati disponibili e trattare

Per i bambini terapia risulta meno tossica



Immunity against *M. tuberculosis*



Screening della popolazione

Costo efficacia

- **NESSUNA** strategia è costo efficace se l'incidenza della LTBI $< 10\%$.
- **Con** incidenza della LTBI del 10-40%, il test della tubercolina a 2-step, seguito da un test IGRA sui pazienti positivi alla tubercolina, è costo efficace
- **L'uso del solo IGRA test è costo efficace SOLO SE** l'incidenza della LTBI è $\geq 40\%$.

FATTORI DI RISCHIO E STRATEGIE D'INTERVENTO

Alcolismo, Malnutrizione, HIV, Immunodepressione, Gastrectomia, Silicosi, IRC, Trapiantati Immigrazione, infezione recente.. Età estreme, soggetti residenti in ambienti particolari, Condizioni sociali, lavorative, abitative.

IL PROVVEDIMENTO PIU' IMPORTANTE

Diagnosi e trattamento dei casi di malattia attiva, in particolare dei casi polmonari bacilliferi

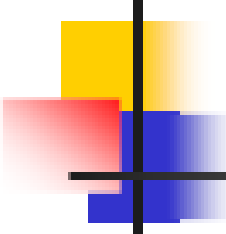


IDENTIFICAZIONE PRECOCE DELL'INFEZIONE: SCREENING

Identificazione delle persone con infezione tubercolare latente e trattamento preventivo.

Perché?

Un caso contagioso lasciato a se' infetta altre 10 persone all'anno, delle quali a sua volta una si ammalerà di TBC.



Why is it important to distinguish between latent infection and active TB disease?

- To provide a correct diagnosis:
 - Active TB disease:
 - Organ destruction and/or death
 - Spread of infection in the community
 - Latent infection
- To provide a correct and efficacious therapy:
 - Active TB disease: 2 months therapy with 4 drugs and then 4 months therapy with 2 drugs
 - Latent TB infection: 6 months therapy with one drug
- To save human and economic costs avoiding complex evaluations (i.e. clinical, radiological and surgery procedures).
Ex: extra-pulmonary TB

NICE 2006

- “National Institute for Health and Clinical Excellence TB guidelines” (Regno Unito, 2006) consiglia :
- **Screening iniziale** con **TST** seguito da un **test IGRA** per i casi **TST + / dubbio**.

2007 Canadian Guidelines

IGRA Raccomandati:

1. Contatti di TB attiva:

Contatti chiusi (HIGH RISK) possono essere fatti entrambi, TST e IGRA e se uno dei due è positivo --- trattare per LTBI

Contatti casuali (LOW RISK) Il test IGRA può essere usato come conferma se TST è positivo per verificare che non ci sia infezione vs BCG or MOTT

2. **Immunodepressi** : Eseguire prima il **TST** , se negativo fare IGRA e se questo è positivo --- trattare per LTBI

3. **Persone a basso rischio** con **TST positivo**: Fare IGRA e se positivo considerare come LTBI

IGRA non Raccomandati

1. Test seriali
2. Bambini
3. Screening degli immigrati
4. Diagnosi di TBC attiva

La sensibilità dell'IGRA rispetto al TST nella TBC attiva risulta essere leggermente inferiore. Ciò è dovuto alla diminuita risposta immune nei pazienti con Tuberculosis attiva in particolare in quelli con malattia in stato avanzato, malnutrizione ed età avanzata.

- Song 2008

QFT-G 48 EP-TB casi confermati (110 totali)

Sensibilità 69%

Specificità 87%

**Non può essere utilizzato come unico criterio per
la diagnosi di EP-TB (extrapolmonare)**

IGRA e anti TNF alfa

- Raccomandazioni per lo screening della TBC prima di una terapia anti-TNF-alfa, in **Svizzera**:
 - Swiss Med Wkly 2007; 137:621-622. (November 3, 2007) (Official journal of the Swiss ID, GIM and Resp. Societies)
- A. **Screening** raccomandato utilizzando la storia del paziente e **IGRA test invece del TST.**

IGRA Interferon Gamma Release Assay

TEST IMMUNOLOGICI in vitro che saggiano il rilascio di INTERFERONE-g (IFN-g) specifico (T SPOT-TB e Quantiferon Gold)

Marcatori di infezione

TEORIA:

I linfociti T precedentemente sensibilizzati da un contatto con antigeni tubercolari producono alte concentrazioni di IFN-gamma quando riesposti allo stesso antigene.

Alcune premesse:

L'infezione tubercolare stimola la risposta delle cellule T (CD4Tcell)

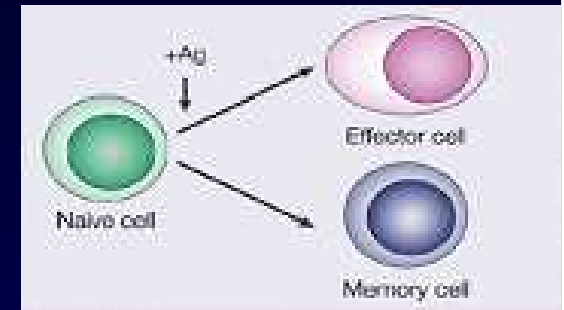
Cellule T effettrici

in grado di produrre IFNgamma entro poche ore dalla stimolazione. (Risposta pronta)

Cellule T di memoria

che non sono in grado di produrre IFNgamma prima di 24 ore poiché devono prima proliferare e trasformarsi in cellule effettrici.

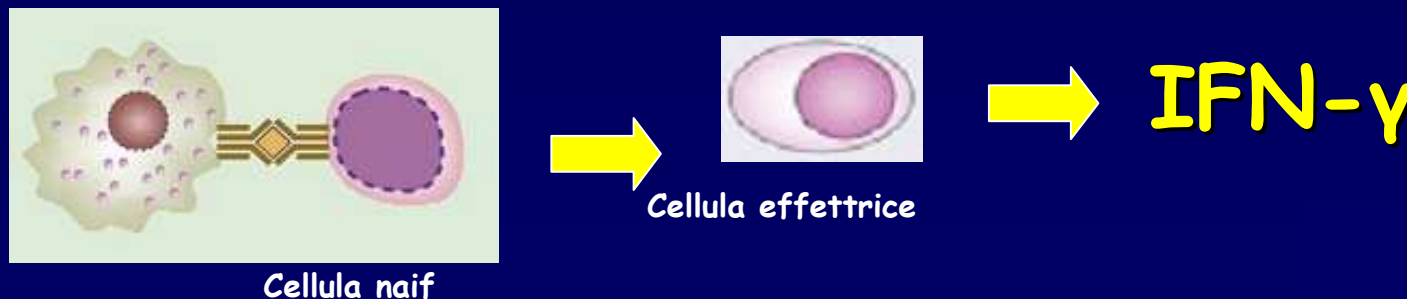
IFNgamma non è normalmente presente in circolo.



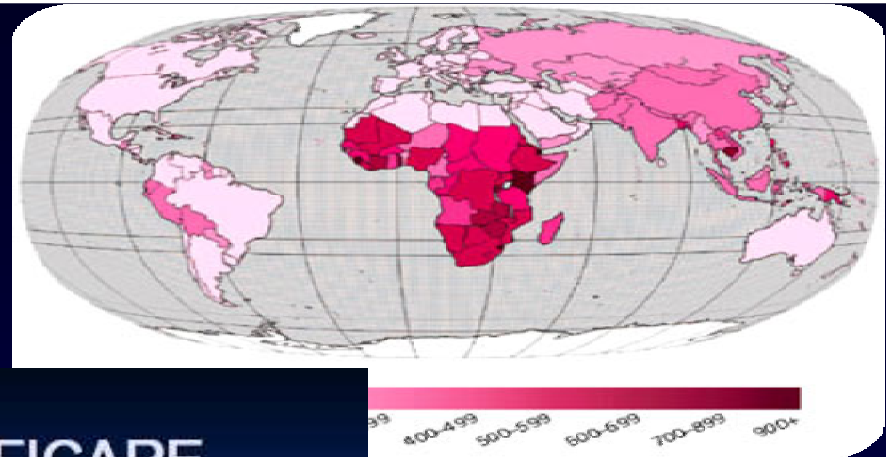
Risposta Cellulo Mediata CD4 specifica

Se un individuo è esposto al micobatterio TBC

- Le cellule CD4 naif reagiscono agli Antigeni tubercolari trasformandosi in cellule effettrici di pronta risposta e cellule di memoria a risposta più lenta.
- Sono le cellule **effettrici** che, se sensibilizzate da un precedente contatto, nel test, in presenza di Ag. Specifici ESAT6 CFP10 e TB 7.7, producono IFN- γ dosabile nel plasma (QFT GOLD).



TUBERCOLOSI ATTIVA

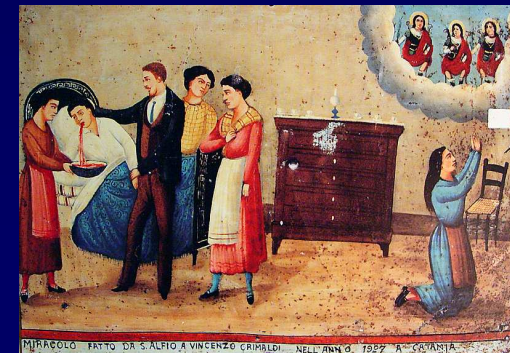


COME SI POSSONO IDENTIFICARE
PRECOCEMENTE I CASI DI MALATTIA
TUBERCOLARE ATTIVA?

L'esame radiografico del torace rimane ad oggi un mezzo sufficientemente sensibile, e sicuramente il più pratico, per identificare le anomalie compatibili con un quadro di tubercolosi dell'apparato respiratorio

– sintomi clinici

– reperti batteriologici positivi.



Confronto delle Linee Guida

	Italia 2011	CDC 2010	CTC 2010	NICE 2011	ECDC2011
Sospetta TB*	--	TST e IGRA	TST e/o IGRA	TST e/o IGRA	(TST e/o) IGRA
Contatti Adulti / bambini >5 a	TST(+) → IGRA	TST o IGRA	TST(+) → IGRA	TST(+) → IGRA	TST(+) → IGRA
Contatti Bambini <5a		TST(o TST e IGRA)		TST(-) → IGRA	TST
Negatività non esclude TB attiva					
Operatori sanitari	TST(+) → IGRA *	TST o IGRA	----	TST(+) → IGRA **	---
HIV/ Immuno-depressi	TST(-) → IGRA	TST e IGRA	TST e IGRA	TST(-) → IGRA	TST e IGRA
Outbreak/ popolazioni "difficili"		IGRA		IGRA	

*Vaccinati con BCG

**Solo IGRA se da paesi ad alta endemia

La TBC tra gli operatori sanitari è un grosso problema

Vantaggi degli IGRA's nei test seriali

❖ Una più alta specificità

mancanza di effetti dovuti al BCG

24 studi con N = 240,243 soggetti

Se il BCG è somministrato nell'infanzia, 6% falsi-positivi nei risultati del TST

Se il BCG è somministrato dopo l'infanzia, 40% falsi-positivi a causa del BCG

❖ **Sensibilità e buon valore predittivo positivo per TB attiva nei contatti.**

❖ **Incremento del costo-efficacia negli screening per TB**

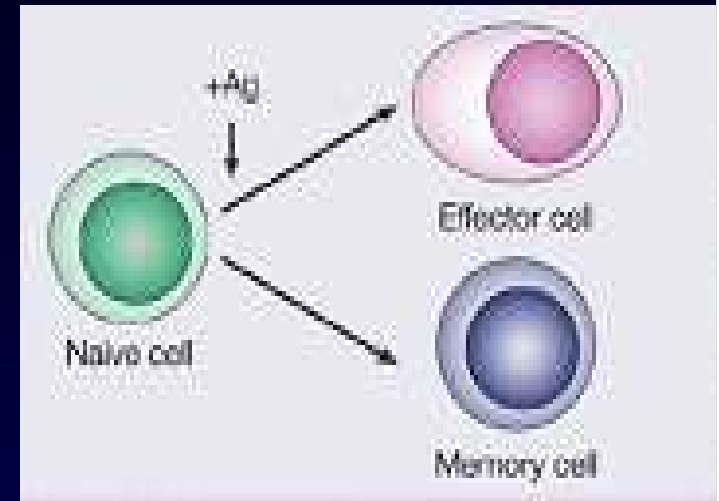
❖ **Non necessita di un protocollo a 2-step**

❖ **Il boosting non rappresenta un problema**

(Effetto Booster del TST su IGRA's : Il prelievo va effettuato entro tre gior

Marcatori di infezione

I linfociti T



- Cellula-T nativa = non venuta in contatto con l'Ag
- Cellula-T effettrice = cellula-T nativa venuta in contatto con l'Ag in grado di produrre Interferon precocemente.
- Cellula-T memoria = cellula effettrice dopo l'allontanamento dell'antigene

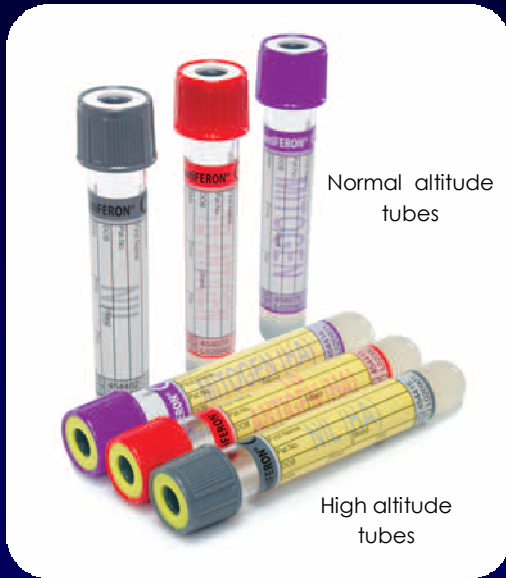
In occasione di un nuovo contatto con l'Ag le cellule-T memoria proliferano producendo cellule-T effettrici

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 producendo cellule effettrici, non sono quindi in grado di produrre IFN- γ prima di 24 h
- L'IFN- γ non è normalmente presente in circolo

QuantiFERON®:

1° Step: Prelievo



Dopo stimolazione:
Plasma conservabile
a 2-8° per 4 settimane

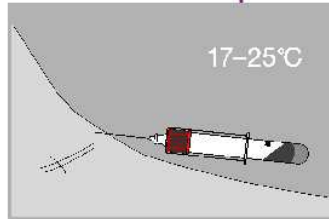
QFT

Il test su sangue per l'infezione TB

Prelievo del campione ed utilizzo delle provette

Il QuantiFERON®-TB Gold (QFT®) è un test su sangue, semplice ed accurato, per l'identificazione dell'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, l'agente responsabile della tubercolosi. Il QFT® è la moderna alternativa al test cutaneo tubercolinico (TST) in uso da più di 100 anni e non è influenzato dalla vaccinazione con BCG (Bacillus Calmette-Guérin).

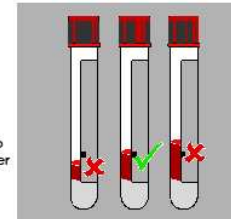
1. Prelievo del campione



Prelevare 1 mL di sangue in ciascuna delle provette dedicate.

Al termine del flusso di sangue, mantenere la provetta collegata all'ago per altri 2-3 secondi.

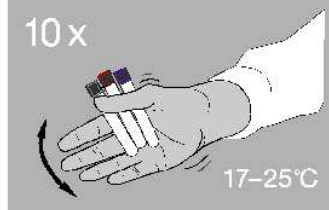
Se il livello di sangue non raggiunge o supera la **tacca nera di riferimento** per il corretto riempimento, posizionata sull'etichetta, ripetere il prelievo.



Attenzione

- ⇒ **PRIMA DEL PRELIEVO**, conservare le provette a 4-25°C, fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.
- ⇒ **AL MOMENTO DEL PRELIEVO**, le provette devono essere ad una temperatura compresa fra 17-25°C.

2. Agitazione delle provette

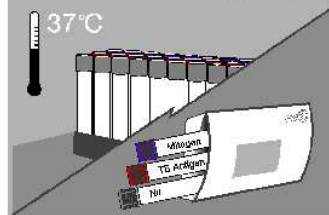


Immediatamente dopo aver eseguito il prelievo, miscelare il contenuto delle provette **agitandole verticalmente con cautela per 10 volte** (vedi figura):

Attenzione

- ⇒ verificare che l'intera superficie interna della provetta sia ricoperta di sangue così da garantire la solubilizzazione dell'anticoagulante e degli antigeni di stimolazione.
- ⇒ un'agitazione eccessiva potrebbe causare un danneggiamento del gel di separazione del plasma con la conseguenza di risultati aberranti.

3. Incubazione/Trasporto



Opzione 1: Incubazione presso il sito di raccolta del campione.

- incubare le provette in posizione verticale a 37°C per 16-24 ore;
- inviarle al laboratorio a 4-27°C, con la nota: "**prelievo già incubato**".

oppure

Opzione 2: Incubazione presso il laboratorio.

- inviare le provette in laboratorio a 17-27°C, con la nota: "**prelievo da incubare**".
- in laboratorio il campione deve essere incubato a 37°C appena possibile: al massimo entro 16 ore dal prelievo.

Per ulteriori dettagli, contattare:



+39.049.870.3662 • e-mail: info@adaweb.it

QFT® e QuantiFERON® sono marchi registrati di Cellestis Limited - M05995193A July 2010

