



Network di Microbiologia e Virologia del Nord Est

**INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs) NELLA
DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE MALATTIE INFETTIVE**

Trento, 19 aprile 2013

**IGRAs test: criteri clinici di
appropriatezza della richiesta**

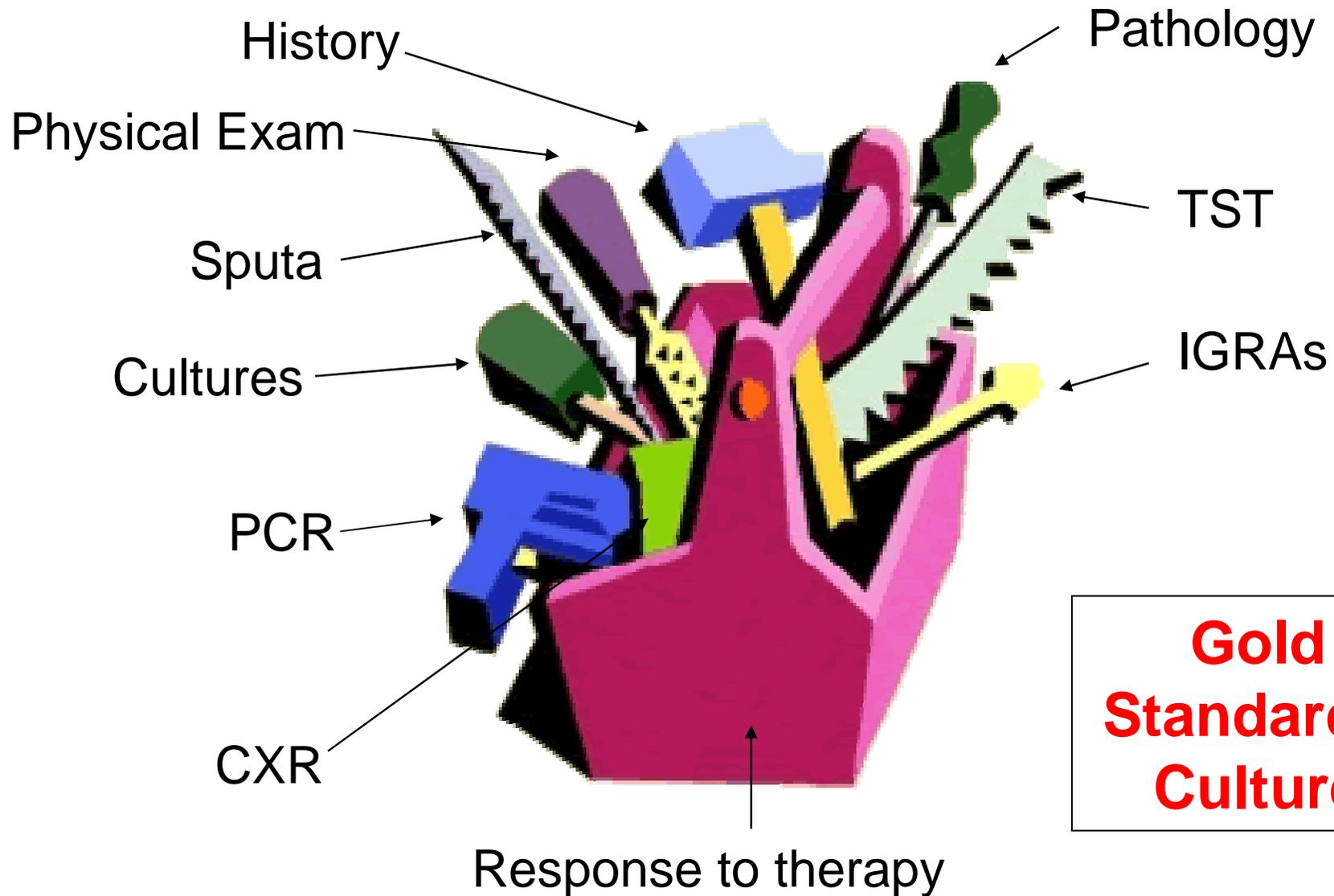
*Claudio Paternoster
Malattie Infettive - Trento*

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

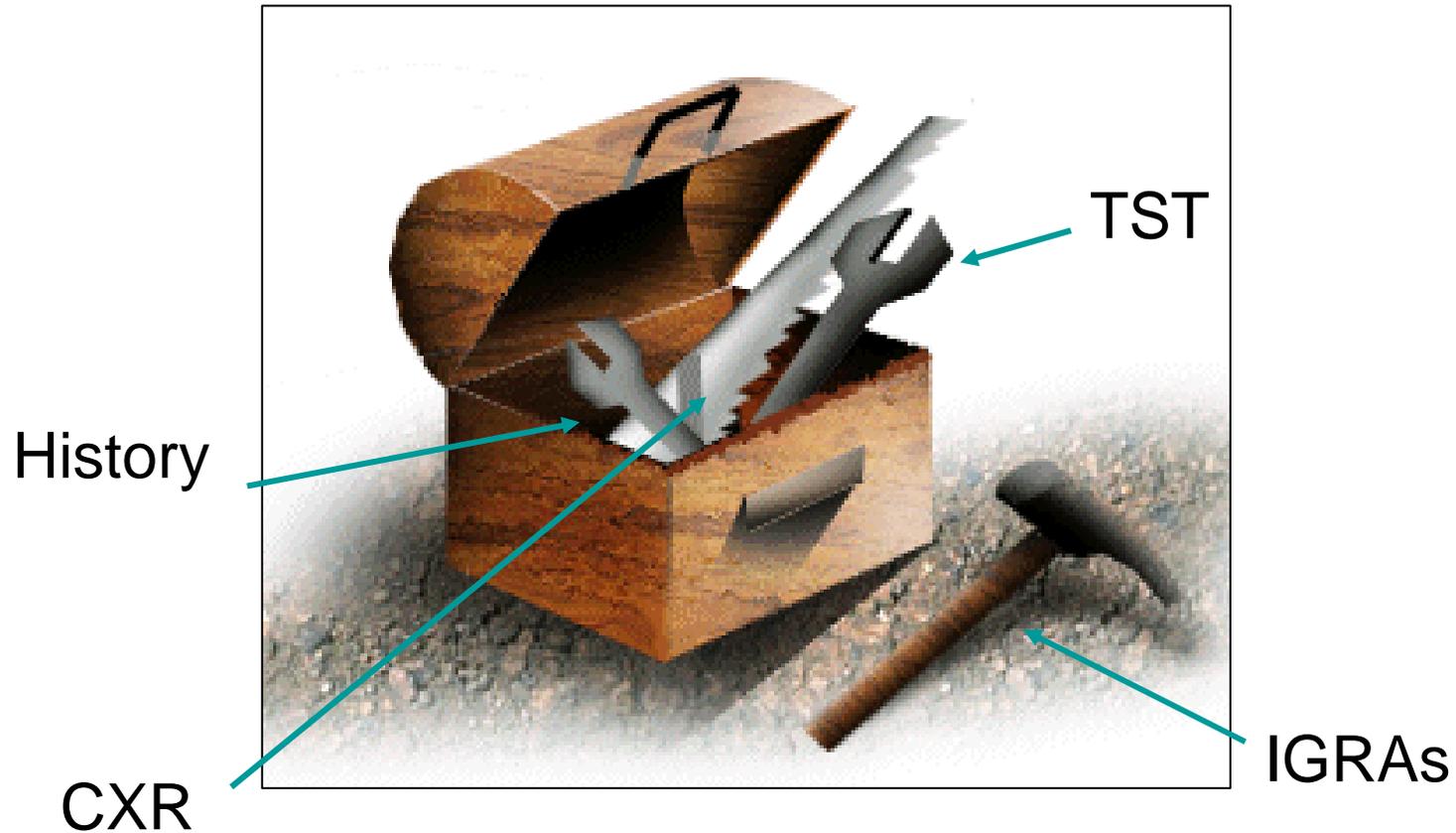
Gli Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs) sono test diagnostici in vitro utilizzabili per la diagnosi di infezione tubercolare latente (LTBI)

- I test IGRA sono **marcatori surrogati** di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* e indicano la presenza di una risposta immunitaria cellulo-mediata nei confronti di tale patogeno
- Non sono in grado di distinguere tra infezione latente (LTBI) e malattia attiva e non devono essere utilizzati per la diagnosi di TB attiva, che rimane una diagnosi microbiologica
- Un test IGRA positivo non indica necessariamente la presenza di una TB attiva, così come un test negativo non la esclude

Toolbox for Diagnosis of TB Disease

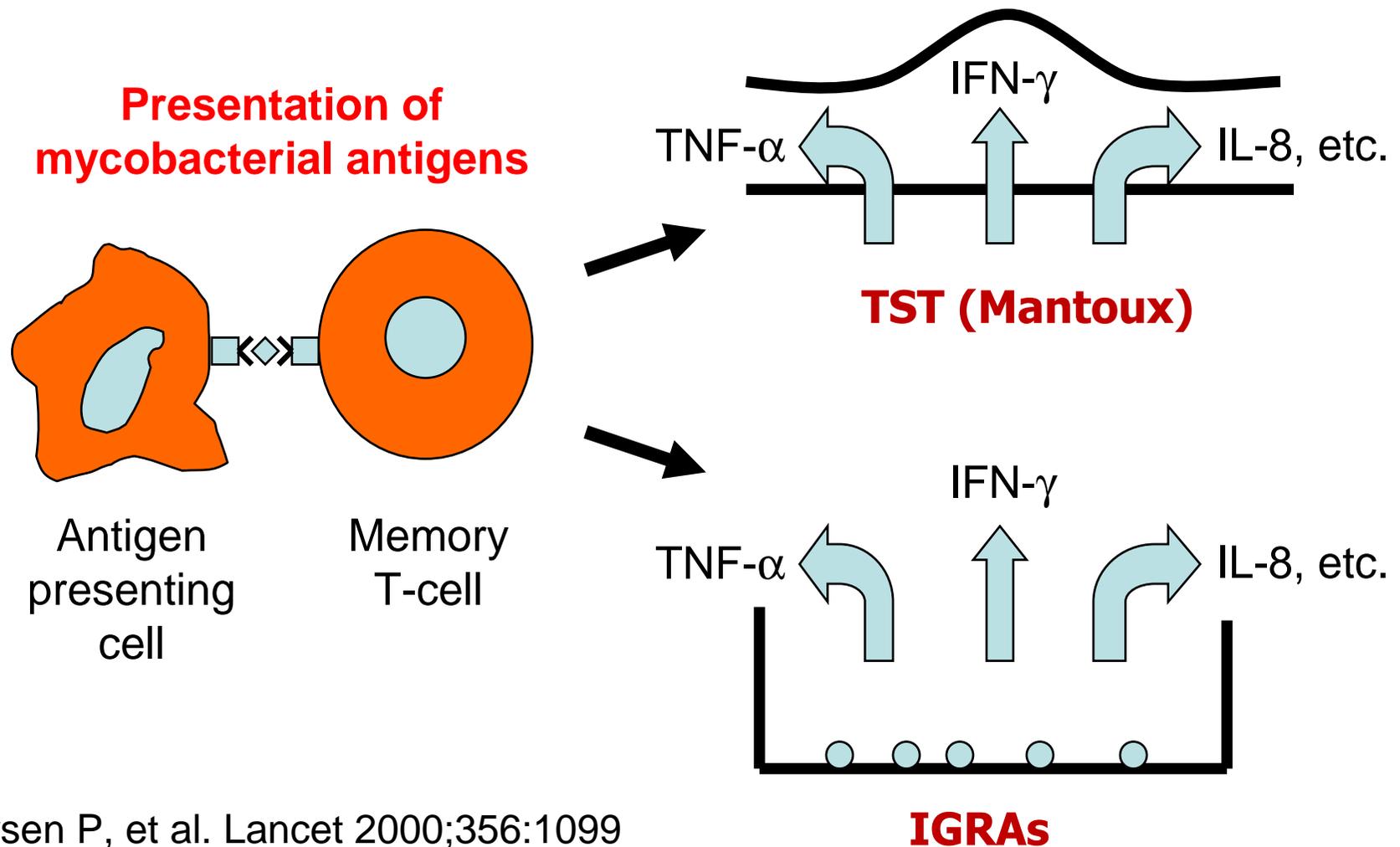


Toolbox for Diagnosis of Latent TB



No Gold Standard!

In Vivo and *In Vitro* Diagnostic Tests



INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

INDICAZIONI AL TEST:

- L'obiettivo di un test diagnostico per la diagnosi di LTBI è quello di **identificare gli individui a rischio** di sviluppare la tubercolosi attiva e che, di conseguenza, potrebbero giovare del trattamento dell'infezione latente
- La decisione di effettuare il test presuppone la decisione di trattare in caso di risultato positivo
- **Andrebbe testato solo chi può beneficiare del trattamento**

**INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs):
QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE**

DOMANDE CHIAVE:

- Chi testare ?
- Con quale test ?

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

CHI TESTARE ?

- Gli individui con sospetta **nuova infezione** → tutte le età
 - ✓ contatti chiusi (es. familiari di pazienti con TB polmonare attiva)
 - ✓ contatti casuali (es. operatori sanitari)

- Gli individui a rischio di **riattivazione***
 - ✓ rischio elevato ($> 6 \times$) → tutte le età
 - ✓ rischio moderato (3-6 \times) → età < 65 anni
 - ✓ basso rischio (1.5-3 \times) → età < 50 anni

* Rischio annuale di riattivazione in individuo in buona salute con LTBI = 0.1%

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

INDIVIDUI A RISCHIO DI RIATTIVAZIONE TUBERCOLARE

ELEVATO	MODERATO	BASSO
<ul style="list-style-type: none">▪ Infezione da HIV▪ Trapiantati▪ Neoplasie testa-collo▪ Chemioterapia▪ Leucemia, linfoma▪ Silicosi▪ Dializzati▪ Terapia con TNF-alfa▪ Esiti radiologici fibro-nodulari apicali	<ul style="list-style-type: none">▪ Diabete mellito▪ Terapia steroidea (> 15mg/die per più di un mese)	<ul style="list-style-type: none">▪ Calo ponderale (< 85% peso ideale)▪ Fumo di sigaretta (≥ 1 pacco/die)

**INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs):
QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE**

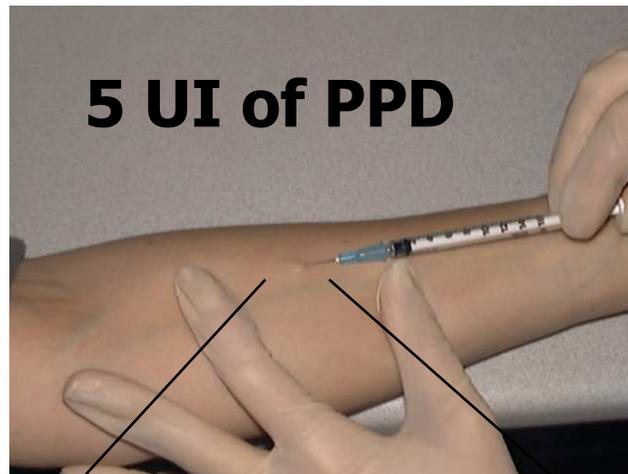
DOMANDE CHIAVE:

- Con quale test ?

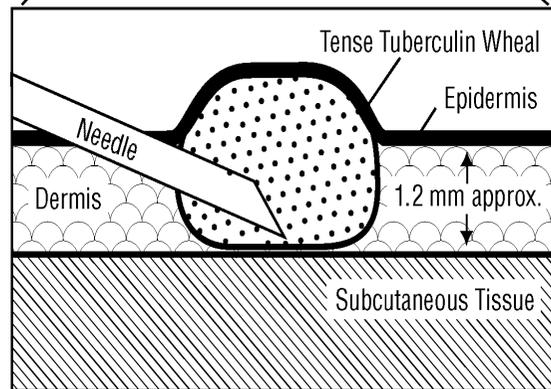
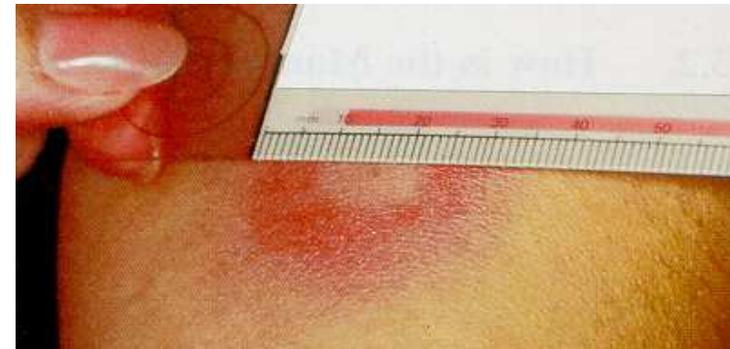
TST – IGRAs – ENTRAMBI ?

Tuberculin Skin Testing (TST)

Intradermoreazione alla Mantoux



48 to 72 hours



**Interpretation depends on
person's risk factors**

The TST...A Very Old, and Not-So-Perfect Test

- R. Koch 1890, Mantoux 1908, standardizzato nel 1976

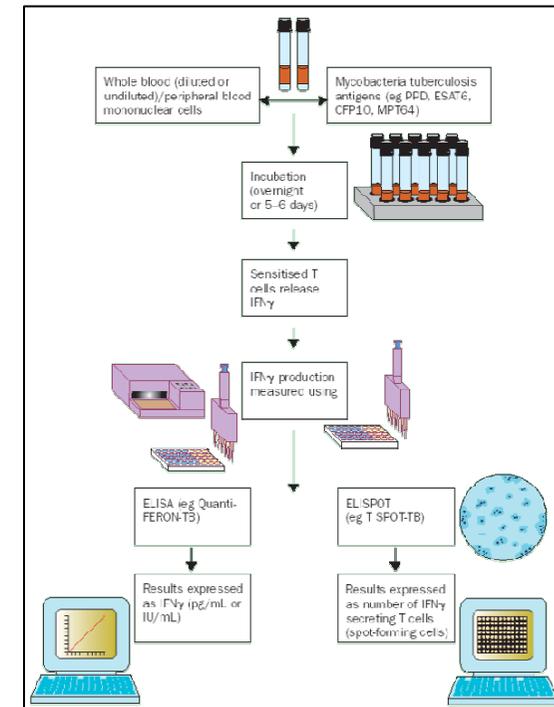
FALSI NEGATIVI	FALSI POSITIVI
<ul style="list-style-type: none">✓ Anergia (immunosoppressione, malnutrizione, TB attiva)✓ Infezione tubercolare recente (entro 8-10 settimane)✓ Età < 6 mesi✓ Recenti vaccinazioni con virus vivi✓ Errori di somministrazione✓ Errori di lettura/interpretazione	<ul style="list-style-type: none">✓ Infezione con micobatteri non tubercolari✓ Vaccinazione con BCG✓ Somministrazione di una dose scorretta di antigene✓ Errori di lettura/interpretazione

Richiede due visite.....significativo numero di individui che non si presentano per la lettura.....

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

**SONO ATTUALMENTE DISPONIBILI DUE
DISTINTI TEST IGRA:**

- **QuantiFERON®** - TB Gold In-Tube test (QFT-GIT)
 - ✓ ELISA-based whole-blood assay
- **T-SPOT®** - TB test (T-spot)
 - ✓ Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay



INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

Differences in Currently Available IGRAs

	QFT-GIT	T-spot
Initial Process	Process whole blood within 16 hours	Process peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) within 8 hours, or if T-Cell Xtend [®] is used, within 30 hours
M. tuberculosis Antigen	Single mixture of synthetic peptides representing ESAT-6, CFP-10 and TB7.7	Separate mixtures of synthetic peptides representing ESAT-6 and CFP-10
Measurement	IFN- γ concentration	Number of IFN- γ producing cells (spots)
Possible Results	Positive, negative, indeterminate	Positive, negative, indeterminate, borderline

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

- I test IGRA non sono influenzati da una precedente vaccinazione con Bacillo di Calmette-Guerin (**BCG**), in particolare nelle situazioni in cui il vaccino è somministrato dopo l'infanzia o in dosi ripetute
- Allo stesso modo i test IGRA non sono influenzati dalla maggior parte delle infezioni con **micobatteri non tubercolari** (NTM) ambientali
- Due principali NTM potenzialmente patogeni per l'uomo contengono sequenze che codificano per gli antigeni ESAT-6 e CFP-10:
Mycobacterium marinum e *M. kansasii*

Species specificity of ESAT-6 and CFP-10

Tuberculosis complex	Antigens		Environmental strains	Antigens	
	ESAT	CFP		ESAT	CFP
M tuberculosis	+	+	M abcessus	-	-
M africanum	+	+	M avium	-	-
M bovis	+	+	M branderi	-	-
BCG substrain			M celatum	-	-
gothenburg	-	-	M chelonae	-	-
moreau	-	-	M flavescens	+	+
tice	-	-	M fortuitum	-	-
tokyo	-	-	M gordonii	-	-
danish	-	-	M intracellulare	-	-
glaxo	-	-	M kansasii	+	+
montreal	-	-	M malmoense	-	-
pasteur	-	-	M marinum	+	+
			M oenavense	-	-
			M scrofulaceum	-	-
			M smegmatis	-	-
			M szulgai	+	+
			M terrae	-	-
			M vaccae	-	-
			M xenopi	-	-

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

SENSIBILITA' E SPECIFICITA':

	T-SPOT	QFT-GIT	TST
Sensibilità	~ 90%	~ 80%	~ 80%
Specificità	> 95%	> 95%	60-97%

Pai M et al. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. Ann Intern Med 2008;149-177.

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

QFT-GIT: POSSIBILI ESITI DEL TEST

RISULTATO	INTERPRETAZIONE
Positivo	Infezione tubercolare probabile
Negativo	Infezione tubercolare improbabile ma non escludibile specialmente se: <ol style="list-style-type: none">1. Paziente con segni e sintomi di TB attiva2. Paziente con antica infezione ad elevato rischio di sviluppare TB attiva
Indeterminato	Il test non è in grado di fornire informazioni sulla presenza di una infezione tubercolare. Opzioni: ripetere il test, eseguire TST, non fare nulla

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

IGRAs e TST:

- Il TST può influenzare l'esito di un successivo test IGRA: l'effetto si manifesta dopo pochi giorni e sembra persistere per almeno tre mesi
- Se si utilizza un test IGRA per confermare il risultato del TST è opportuno eseguire il prelievo ematico entro tre giorni dall'esecuzione del TST (es. al momento della lettura del test)

Van Zyl-Smit RN et al. Within-subject variability of interferon-g assay results for tuberculosis and boosting effect of tuberculin skin testing: a systematic review. PLoS One 2009; 4:8517

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

IGRAs e CAPACITA' DI PREVEDERE LO SVILUPPO DI MALATTIA TUBERCOLARE ATTIVA:

Numerosi studi longitudinali hanno dimostrato che l'incidenza di malattia attiva nei soggetti IGRA positivi è bassa (< 5%), similmente a quanto osservato negli individui TST positivi

Ciò rende necessario il futuro sviluppo di **biomarkers** in grado di identificare i soggetti a rischio di progressione a TB attiva

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): LINEE GUIDA DI UTILIZZO

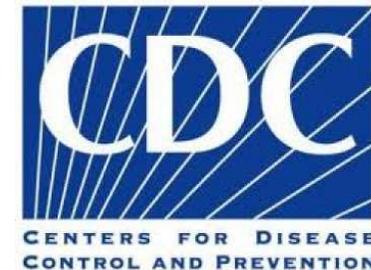
LINEE GUIDA: USA (CDC 2010)

I test IGRA possono essere usati **in alternativa** (ma non in aggiunta) al TST in tutte le situazioni in cui tale test è indicato come ad es:

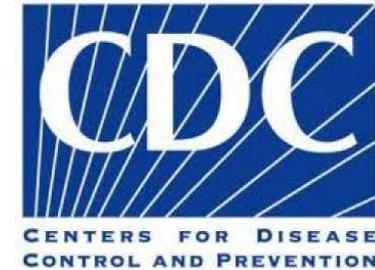
- indagine nei contatti di TB attiva
- screening operatori sanitari

Situazioni in cui i test IGRA vanno preferiti al TST

- vaccinati o trattati con BCG
- individui poco propensi a ritornare per la lettura del TST



LINEE GUIDA: USA (CDC 2010)



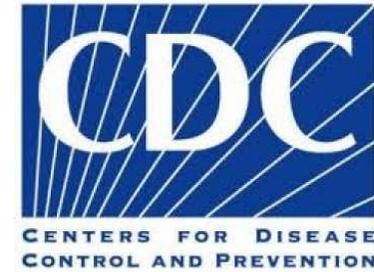
L'utilizzo routinario di entrambi i test (TST e IGRA) non è raccomandato tranne nelle seguenti situazioni:

- test iniziale **negativo** in soggetti ad elevato rischio di infezione e progressione di malattia (HIV positivi, bambini di età < 5 anni esposti a individui con TB polmonare attiva)

- test iniziale **positivo** ma:
 - ✓ individuo a basso rischio di infezione e/o progressione di malattia

 - ✓ necessità di maggior evidenza per convincere un individuo a sottoporsi a profilassi per LTBI

LINEE GUIDA: USA (CDC 2010)



- Ripetere un test IGRA o effettuare un TST può essere utile in caso di risultato indeterminato, se esiste un valido motivo clinico per farlo
- Multipli risultati negativi di qualsiasi combinazione di test non escludono la possibilità di una infezione tubercolare
- La scelta del test più adatto o della combinazione di test per la diagnosi di infezione tubercolare deve basarsi sulle motivazioni dell'esame, sul contesto clinico, sulla disponibilità ed i costi dei singoli test

LINEE GUIDA: CANADA
(The Canadian Tuberculosis Committee 2010)



Indicazioni utilizzo IGRAs:

- **Test di conferma** in individui TST positivi con bassa probabilità di recente infezione tubercolare
- Test di conferma in individui TST negativi ad elevato rischio di progressione a TB attiva
- Test di conferma in individui immunocompromessi con TST negativo
- Nei bambini come test diagnostico supplementare in aggiunta al TST, alle indagini microbiologiche e agli altri accertamenti del caso

LINEE GUIDA: UK (NICE 2011)



- **Il TST deve essere usato come test di primo livello** nella valutazione dei contatti e nello screening degli immigrati da Paesi ad elevata endemia → se TST positivo considerare IGRAs nei soggetti vaccinati con BCG
- HIV positivi con CD4 < 200/mcL: IGRA + TST
- HIV positivi con CD4 tra 200 e 500/mcL: IGRA da solo o IGRA + TST
- Immunocompromessi non HIV: IGRA da solo o IGRA + TST
- Situazioni epidemiche e gruppi ad alto rischio: preferibile IGRA

LINEE GUIDA EUROPEE

ECDC 2011



- I test IGRA non devono essere utilizzati per la diagnosi di TB attiva e un test IGRA negativo non esclude la diagnosi di TB attiva
- I test IGRA **possono essere utilizzati** nella diagnosi di LTBI come parte della valutazione per identificare i soggetti da sottoporre a trattamento profilattico (es. immunocompromessi, bambini, contatti chiusi, recenti esposizioni)

LINEE GUIDA EUROPEE

ECDC 2011



- Nei Paesi ad elevata incidenza di TB i test IGRA non trovano indicazione per l'elevato numero di soggetti con LTBI → i programmi di prevenzione si devono basare sull'identificazione e trattamento dei casi di TB attiva
- Nei Paesi a bassa incidenza di TB i test IGRA possono essere utilizzati nei programmi di screening dei contatti **come conferma** nei soggetti TST positivi
- Negli individui **immunocompromessi** viene consigliato l'uso combinato di TST ed IGRA

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

«SERIAL TESTING»

- In alcune situazioni sono indicate ripetute esecuzioni di test per la diagnosi di LTBI (es. operatori sanitari)
- Sia il TST che i test IGRA si comportano in modo dinamico nel tempo con possibili conversioni e reversioni
- L'uso dei test IGRA è ulteriormente complicato dal fatto che non esiste un cut-off definito che consenta l'interpretazione dei risultati in chiave dinamica
- La reversione dei test IGRA è più frequente nei soggetti con positività vicina al cut-off e in quelli discordanti (TST-negativi/IGRA positivi)

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): RIPRODUCIBILITA' dei TEST IGRA

Fattori che possono influenzare l'esito dei test IGRA:

- **Pre-analitici** → es. tempo intercorso prima dell'incubazione del campione, durata dell'incubazione etc.

Doberne D et al. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB Gold in Tube assay for detection of latent tuberculosis infection. J Clin Microbiol 2011; 49:3061

- **Variabilità intra-laboratorio** → uno studio su 1.086 test su 543 individui eseguiti nello stesso giorno ha evidenziato una discordanza nel secondo test dell'8%

Metcalfe JZ et al. Test Variability of the QuantiFERON-TB Gold in Tube Assay in the Clinical Practice. Am J Resp Crit Care Med 2013; 187:206

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): RIPRODUCIBILITA' dei TEST IGRAs

Fattori che possono influenzare l'esito dei test:

- **Variabilità tra laboratori** → discordanza tra test eseguiti sullo stesso campione, lo stesso giorno in laboratori diversi

Withworth WC et al. Within-subject interlaboratory variability of QuantiFERON-TB Gold in Tube tests. PLoS One 2012; 7:e43790

- **Variabilità individuale** → in uno studio su 48 operatori sanitari sottoposti mensilmente a test IGRA per un anno conversioni e reversioni sono state osservate nel 52% dei partecipanti

Park JS et al. Monthly follow-ups of interferon- γ release assay among healthcare workers in contact with TB patients. Chest 2012

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUESTIONI IRRISOLTE dei TEST IGRA

- **Risultato indeterminato del test** → ripetere il test per escludere errori di laboratorio, se nuovo test indeterminato escludere anergia
- **Periodo finestra** → ci sono pochi dati sul tempo di conversione dei test IGRAs dopo esposizione a TB. Quelli disponibili suggeriscono un tempo medio di **4-7 settimane** con possibili conversioni dopo 3 mesi
 - nello screening post-esposizione un test IGRAs non va ripetuto prima di 6-8 settimane
- **Monitoraggio della risposta al trattamento antitubercolare** → pochi studi con risultati discordanti: in base alle conoscenze attuali i test IGRAs non devono essere utilizzati per monitorare la risposta al trattamento antitubercolare

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

	TST	IGRAs
VANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Non richiede laboratorio ✓ Meno costoso ✓ Disponibilità di studi longitudinali e trial randomizzati che ne dimostrano l'utilità nella gestione dei pazienti con LTBI 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Non necessaria visita di follow-up ✓ Risultato disponibile entro 24-48 ore ✓ Risultato non influenzato da precedente vaccinazione con BCG o sensibilizzazione con micobatteri non tubercolari
SVANTAGGI	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necessità di somministrazione intradermica e lettura ✓ Possibili falsi positivi e negativi ✓ Interpretazione complicata da effetto booster, conversioni e reversioni ✓ Possibili reazioni avverse 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Necessità di un laboratorio attrezzato ✓ Costo ✓ Sensibilità ridotta nei pazienti HIV positivi e nella TB attiva ✓ Interpretazione complicata in caso di test seriati ✓ Cut-off ottimale non definito

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs): QUELLO CHE IL CLINICO DEVE SAPERE

CONCLUSIONI

- Lo sviluppo di test diagnostici basati sul rilascio di Interferon gamma (IGRAs) ha rappresentato un importante progresso nella diagnosi di infezione tubercolare latente (LTBI)
- I test IGRA non sono perfetti e per questo motivo i clinici devono essere consapevoli dei loro limiti
- E' giunto il momento di abbandonare la «vecchia tuberculina»?



Network di Microbiologia e Virologia del Nord Est

**INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAYS (IGRAs) NELLA
DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLE MALATTIE INFETTIVE**

Grazie per l'attenzione

*Claudio Paternoster
Malattie Infettive - Trento*