

Applicazioni del QuantiFERON[®] TB GOLD nella malattia tubercolare

Maria Saladino, Salvatore Nisticò, Annelisa Borelli, Vincenzina Caruso, Vilma Vilella, Domenico Caruso, Maria Piccoli, Antonella Nicolazzo, Rosa Anna Leone

Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, A.S.P. Catanzaro, P.O. Lamezia Terme, Italy

Summary

QuantiFERON[®] TB GOLD' s applications in the tuberculosis disease.

Background. Tuberculosis is the most frequent cause of death from a single infectious agent in humans and remains a serious global health problem. The latent tuberculosis (LTBI) treatment can prevent progression to active disease. People infected with LTBI are a dangerous reservoir, since any immunosuppressive factor can cause a reactivation of *Mycobacterium* leading to overt disease. Recent production and introduction into the healthcare system, on the other hand, are the IGRAs (Interferon-Gamma Release Assay).

Materials and Methods. The QuantiFERON-TB Gold test is an ELISA assay of IFN- γ produced by sensitized lymphocytes that allows to overcome some limitations of Mantoux test, being an *in vitro* test with specific antigens for *M. tuberculosis*. In the present study we examined a population of 150 patients tested with the Mantoux test and the QuantiFERON-TB Gold test. The patients were divided into categories (contacts of the case, immigrants, health care personnel, and immunocompromised subjects in biological therapy).

Results. The analysis of the obtained results from the comparison of the two tests showed a good concordance rate (47.3%) in the case of double positivity and detected the highest percentage of discrepancy in the profile QuantiFERON negative/Mantoux positive.

Conclusions. Our results allow to state that remains valid and effective use of the QuantiFERON test, provided it is flanked by the Mantoux test and a medical history of patients.

Correspondence: Maria Saladino, Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, A.S.P. Catanzaro, P.O. di Lamezia Terme, via Senatore Arturo Perugini, Italy.

Tel.: +39.392.8793360.

E-mail: maria_saladino@live.it

Key words: tuberculosis, QuantiFERON[®] TB GOLD, IFN- γ .

Contributions: the authors contributed equally.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

©Copyright M. Saladino et al., 2014

Licensee PAGEPress, Italy

Microbiologia Medica 2014; 29:4662

doi:10.4081/mm.2014.4662

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License (by-nc 3.0) which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited.

Introduzione

La tubercolosi (TB) rappresenta un importante problema di salute pubblica. Il "Global Tuberculosis Report" del 2013 stima che nell'anno 2012 si sono verificati 8.6 milioni di nuovi casi di TB. Da un decennio i tassi di incidenza di TB stanno diminuendo, raggiungendo i Millennium Development Goals (MDGs) del 2015, anche se la percentuale di riduzione resta molto bassa (circa il 2% all'anno) (6).

In Italia, i tassi di incidenza di TB negli ultimi 10 anni sono rimasti stabili. Le fasce maggiormente a rischio nella nostra penisola sono gli anziani e i cittadini stranieri (7).

La tubercolosi latente (LTBI) rappresenta uno stato di equilibrio nel quale le difese immunitarie dell'ospite riescono a controllare l'infezione, senza eradicare il batterio.

I bacilli "dormienti" possiedono la capacità di riattivarsi e favorire l'insorgenza di tubercolosi attiva.

Identificare i soggetti infetti non è semplice, in quanto il decorso è asintomatico e non vi sono ancora test specifici per l'identificazione (3).

Dal 1980 nella pratica clinica è comune l'utilizzo dell'intradermoreazione secondo Mantoux o TST (Tuberculosis Skin Test) per la diagnosi di LTBI. Tale test identifica la risposta locale di ipersensibilità di tipo ritardato al derivato proteico della tubercolina, conosciuto come PPD (Purified Proteic Derivative).

Il test presenta però problematiche di natura pratica: l'inoculo intradermico non è sempre facile da eseguire, il test è poco riproducibile e standardizzabile, la misurazione dell'infiltrato viene eseguita dopo 72 ore, e questo comporta la possibile perdita del paziente nella fase di lettura del risultato (4).

Recentemente sono stati introdotti nel sistema sanitario i test IGRA (Interferon-Gamma Release Assay) che prevedono in un primo tempo la stimolazione linfocitaria con antigeni micobatterio-specifici (codificati da geni presenti nella "Region of Difference 1", RD-1, del *Mycobacterium tuberculosis*). In un secondo tempo si esegue il dosaggio di IFN- γ secreto in risposta da tali linfociti attivati.

La produzione di IFN- γ è segnale di una precedente sensibilizzazione dell'individuo (1).

Materiali e Metodi

In un periodo di tempo compreso tra gennaio 2013 e luglio 2014 sono stati sottoposti al test QuantiFERON TB GOLD e al test di Mantoux 150 pazienti. Il test cutaneo (Mantoux o TST) è stato eseguito sulla superficie volare dell'avambraccio iniettando per via intradermica 0.1 mL di PPD, equivalenti a 5 unità (Tubertest, Aventis). Dopo 72 h la misurazione è stata eseguita considerando solo la parte indurita nella sede di inoculo. In base alle dimensioni dell'indurimento misurato e all'inquadramento in determinate categorie di rischio, il

test può essere interpretato come positivo (≥ 5 mm) o negativo. Il QuantiFERON-TB GOLD prodotto dalla ditta Cellestis (Carnegie, Victoria, Australia) è un test che si basa sul rilascio e successivo dosaggio di IFN- γ prodotto dai linfociti T attivati dopo stimolazione con antigeni tubercolari specifici, ESAT-6, CFP-10 e TB7.7.

Si esegue su sangue intero eparinizzato ed è dotato di un controllo positivo [fitoemoagglutinina (PHA)]. I pazienti immunocompetenti sono stati sottoposti al test utilizzando le provette contenenti gli antigeni specifici (Antigen) e quelle contenenti il solo anticoagulante (Nil), per i soggetti immunodepressi è stata utilizzata anche la provetta contenente la fitoemoagglutinina (Mitogen), che naturalmente stimola la produzione di IFN- γ .

Le provette, adeguatamente inoculate con il 1 mL di sangue intero, sono state incubate a 37°C per 16-18 h e alla fine dell'incubazione, sono state centrifugate a 3000 gpm per 15 minuti. I campioni di plasma sono stati testati per il dosaggio dell'IFN- γ con test ELISA. Sono stati inoculati in pozzetti, ai quali aderiscono anticorpi monoclonali murini anti-IFN- γ umano. In seguito è stato aggiunto un coniugato con nuovi anticorpi anti-IFN- γ e un substrato cromogeno che determinano lo sviluppo di colore. La densità ottica dei pozzetti è stata letta con l'ausilio di un lettore dotato di un filtro di 450 nm e di un filtro di riferimento da 620 nm a 650 nm e i valori di OD ottenuti sono stati caricati sul software (QuantiFERON-TB Gold In Tube Analysis) sviluppato e fornito dalla ditta Cellestis.

Il risultato del test è dato dalla differenza tra la concentrazione di IFN- γ delle provette Antigen o Mitogen e la concentrazione di IFN- γ della provetta Nil ed è positivo se la quantità di IFN- γ della provetta Antigen è ≥ 0.35 UI/mL alla provetta Nil (2).

La nostra ricerca ha avuto come scopo la valutazione dei risultati dell'intradermoreazione di Mantoux e del test QuantiFERON-TB Gold e la concordanza, o discordanza, dei dati ottenuti per le varie categorie di rischio oggetto di studio. Il tutto è stato analizzato basandosi sui recenti studi scientifici inerenti la sensibilità e specificità dei due test nella diagnosi di LTBI (2, 3, 5).

Risultati

Presso il laboratorio di Micobatteriologia dell'U.O. di Microbiologia e Virologia di Lamezia Terme, "Centro di Riferimento Regionale sulla diagnostica dei Micobatteri e della Tuberculosis", è stata presa in esame una popolazione di 150 pazienti, in un periodo compreso tra gennaio 2013 e luglio 2014. L'80% dei pazienti era costituito da cittadini italiani, il 13% da pazienti provenienti dall'Africa e dal Medioriente, il 7% dall'Est Europa, solo 1 paziente era Spagnolo. L'età media del gruppo esaminato era di 45 anni per i maschi e 44 anni per le femmine. La prevalenza risulta maggiore per i maschi nelle 3 fasce d'età comprese tra 0-70 anni, mentre per le femmine nelle 2 fasce comprese tra 31-70 anni. I pazienti sono stati, inoltre, suddivisi per categoria: contatti di caso; personale sanitario; immigrati; pazienti HIV+; pazienti da sottoporre a terapia biologica; "altri" non appartenenti alle categorie sopra citate.

Intradermoreazione di Mantoux

Dei 150 pazienti analizzati, il test di ha rilevato 14 pazienti negativi, 125 positivi e 11 dubbi. Tra i 71 operatori sanitari abbiamo riscontrato 3 risultati dubbi, 2 negativi, 66 positivi (con un infiltrato ≥ 5 mm per 11 pazienti, ≥ 10 mm per 6 pazienti e ≥ 15 mm per 29 pazienti). Dei 7 contatti di caso esaminati 1 è risultato dubbio, 2 sono risultati negativi e 3 positivi (con un infiltrato ≥ 10 mm per 1 paziente). Dei 28 pazienti immigrati studiati, 5 sono risultati dubbi, 2 negativi e 21 positivi (con un infiltrato ≥ 5 mm per 1 paziente, ≥ 10 mm per 3 pazienti e ≥ 15 mm per 1 paziente).

I pazienti immunodepressi studiati sono stati 8, di cui 1 dubbio al

test e 7 positivi. Tra i 5 pazienti sottoposti a terapia biologica 4 sono risultati negativi e 1 dubbio. Sono stati sottoposti alla Mantoux 34 pazienti non appartenenti alle categorie studiate, tra questi si sono osservati 4 negativi e 30 positivi (con un infiltrato ≥ 5 mm per 3 pazienti, ≥ 10 mm per 1 paziente e ≥ 15 mm per 4 pazienti).

I pazienti vaccinati, con Mantoux positiva, sono stati 5 appartenenti al personale sanitario (con un infiltrato ≥ 5 mm per 3 pazienti e ≥ 15 mm per 2 pazienti) e 1 immigrato.

Un solo paziente vaccinato facente parte del personale sanitario ha presentato Mantoux dubbio.

Sono, inoltre, riportati i dati riguardanti i 2 pazienti HIV+ oggetto del nostro studio, di cui 1, immigrato, è risultato Mantoux-positivo e 1, immunodepresso, Mantoux-dubbio.

Entrambi i risultati indicano una forte compromissione del sistema immunitario.

QuantiFERON TB GOLD

Il test effettuato sul sangue dei 150 pazienti ci ha permesso di rilevare 76 negativi e 74 positivi, suddivisi per categorie. Tra i 71 operatori sanitari abbiamo osservato 37 negativi e 34 positivi. Sono 3 i contatti di caso negativi e 3 i positivi. Solo un paziente QuantiFERON-positivo appartiene sia alla categoria "contatti di caso" sia alla categoria "immigrati". Dei 28 immigrati, 14 sono risultati negativi e 11 positivi; in più si aggiungono, tra i positivi al test immuno-enzimatico, 2 pazienti immigrati e appartenenti anche alla categoria "immunodepressi" di cui 1 HIV+. Un solo paziente immunodepresso e HIV+ è risultato negativo, mentre 5 sono positivi al QuantiFERON.

Abbiamo rilevato tra i pazienti sottoposti a terapia biologica 4 negativi e 1 positivo. Nella categoria "altri", i risultati negativi sono stati 16 e quelli positivi 18. I vaccinati del personale sanitario hanno mostrato 5 risultati negativi e 1 positivo. Il singolo paziente immigrato e vaccinato ha un risultato positivo al test QuantiFERON. Dei due individui HIV+, 1 è risultato positivo al test, l'altro è QuantiFERON-negativo.

Discussione

Sono stati confrontati i dati da noi ottenuti sottoponendo i 150 pazienti all'intradermoreazione di Mantoux e al test QuantiFERON-TB GOLD.

Riguardo l'intradermoreazione di Mantoux, sui 150 pazienti analizzati, 11 sono risultati dubbi, 14 negativi e 125 positivi (Tabella 1).

Il test QuantiFERON-TB GOLD eseguito sugli stessi soggetti ha dato come risultati 74 positivi e 76 negativi. Nel confrontare i dati abbiamo esaminato 6 diverse condizioni, indicando i due test rispettivamente come Q e M: Q+/M; Q+/-: discordanza attribuibile all'età avanzata; Q+/M dubbio; Q-/M+: casi spiegabili, secondo la letteratura, in migranti vaccinati con BCG, pazienti non vaccinati affetti da micobatteri non tubercolari e contatti di pazienti bacilliferi in rapporto alla durata di esposizione; Q-/M-; Q-/M dubbio. Come mostrato in Tabella 1 si evidenzia una concordanza dei risultati nel 47.3% dei soggetti, in caso di positività di entrambi i test. Nel nostro studio, inoltre, è emersa discordanza nel 36% dei casi, esaminando la categoria Q-/M+, maggiormente riscontrata.

Nei 71 operatori sanitari abbiamo rilevato un 46% di Q+/M+ (33 pazienti), un 46% di Q-/M+ (33 pazienti), un 4.2% di Q-/M dubbio (3 pazienti) e un 1.4% sia per Q+/M- (1 paziente) sia per Q-/M- (1 paziente). Tra gli 8 pazienti immunodepressi del nostro campione abbiamo ottenuto un 87.5% di Q+/M+ e un 12.5% di Q-/M dubbio. Gli immigrati presi in esame sono stati 28 con una percentuale del 46% di Q+/M+ che indica una buona concordanza tra i test nell'individuazione dell'infezione tubercolare, un 28% di Q-/M+, un 7% di Q-/M- e un 18% di Q-/M dubbio. Abbiamo riscontrato per i 7 contatti un 28% di Q+/M+ e un 14% per tutti gli altri profili studiati (escluso Q+/M dubbio per il quale non vi sono stati risultati).

Tabella 1. Risultati ottenuti nei due test divisi per categorie di pazienti.

	Q+/M+ %	Q+/M- %	Q+/M dubbio %	Q-/M+ %	Q-/M- %	Q-/M dubbio %
Operatori sanitari	46	1.4	-	46	1.4	4.2
Immunodepressi	87.5	-	-	-	-	123.5
Immigrati	46	-	-	28	7	18
Contatti di caso	28	14	-	14	14	14
Terapia biologica	-	-	20	-	80	-
Altri	53	-	-	35	12	-

Tra i pazienti sottoposti a terapia biologica i casi studiati sono stati 5, dei quali un 80% Q-/M- e un 20% Q+/M dubbio. Per i restanti 34 pazienti, appartenenti al gruppo "altri" e provenienti dal Dispensario Funzionale e dai Reparti di Microbiologia e Virologia delle ASP regionali, abbiamo ottenuto un 53% di Q+/M+, un 35% di Q-/M+ e un 12% di Q-/M-. I nostri dati confermano l'elevata specificità e sensibilità di entrambi i test, attestata secondo alcuni recenti studi al 60-80%. Essendo un test molto valido, rispetto all'intradermoreazione di Mantoux, il QuantiFERON presenta anche il vantaggio di essere un test *in vitro* con lettura strumentale che non richiede che il paziente si ripresenti dopo 72 h per la lettura del risultato (situazione ottimale nel caso in cui il paziente non si ripresenti e/o sia scarsamente raggiungibile). Dai nostri dati emergono altri vantaggi dell'utilizzo del QuantiFERON-TB Gold; la categoria più rappresentativa negli studi sulle discordanze è stata la Q-/M+. Nel nostro studio il 36% dei pazienti appartiene a questo profilo. Questo mette in evidenza alcuni limiti della Mantoux, infatti essendo un test fortemente dipendente dall'operatore, potrebbe fornire falsi positivi dovuti a errori di esecuzione o a un effetto booster dei ripetuti test (l'inoculo di tubercolina può fungere da micro-vaccinazione). Essendo presenti, inoltre, nel purificato proteico di PPD antigeni non strettamente specifici, i risultati dubbi o positivi, con un risultato del QuantiFERON negativo, potrebbero anche essere dovuti a Micobatteri non tubercolari o a una antecedente vaccinazione con BCG. I risultati negativi, comunque, potrebbero positizzarsi a distanza di tempo (la cuticonversione è abbastanza frequente negli operatori sanitari). Il test IGRA presenta il vantaggio di possedere nel suo cocktail antigeni specifici per il Micobatterio, che non provocano reazioni crociate in pazienti vaccinati o affetti da Micobatteri non tubercolari. Essendo, inoltre, un test *in vitro* non presenta lo svantaggio di sensibilizzare il paziente (5).

Possiamo affermare, quindi, che per gli operatori sanitari, immigrati e contatti di caso, eseguire un solo test non conferma, o meno, il contatto con l'agente infettivo. Quindi i test devono essere affiancati. Ad esempio, nei contatti IGRA-negativi ancora non è noto quanto tempo occorra per la positivizzazione dal momento del contatto, è quindi raccomandato ripetere il test dopo 8-10 settimane.

Anche per i pazienti immunodepressi la validità degli IGRA non è stata ancora confermata. In tali soggetti un risultato negativo del test QuantiFERON-TB Gold, con un test di intradermoreazione dubbio, deve essere considerato "indeterminato" ed è preferibile ripeterlo a distanza di tempo, visto che il sistema immunitario gravemente indebolito potrebbe fornire falsi negativi. L'attendibilità, la rapidità di esecuzione, la diagnosi più specifica (e secondo alcuni studi più sensibile) rendono valido e vantaggioso l'uso del test IGRA, che potrebbe essere utilizzato come unico test solo su soggetti di scarsa reperibilità (immigrati, senzatetto). In tutti gli altri casi, a oggi, il test deve essere supportato dall'intradermoreazione di Mantoux e dall'anamnesi clinica del paziente, per una corretta diagnosi individuale e una terapia più mirata.

Bibliografia

- Goletti D, Carrara S, Vincenti D, et al Accuracy of an immune diagnostic assay based on RD1 Selected epitopes for active tuberculosis in a clinical setting. A pilot study. Clin Microbiol Infect 2006; 12: 544-50.
- Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2011; 37: 88-99.
- Ling Lin J, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a Moving Target. J Immunol 2010; 185: 15-22.
- Regione Calabria. Documento Tecnico per la prevenzione e la gestione della tubercolosi. 2013: 19-22.
- Tortoli E, Piersimoni C, Scarparo C. Micobatteriologia clinica, CEA Selecta Medica 2013, Cap. 17.
- WHO. Countdown to 2015. Global tuberculosis report 2013. Geneve, WHO.
- WHO. Regional Office for Europe. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2013, Geneve, WHO.