



REGIONE DEL VENETO

## **Giornata di formazione per operatori sanitari coinvolti nella Tb nelle carceri**

**Padova -16 aprile 2012**

### **Diffusione e progressione dell'infezione tubercolare**

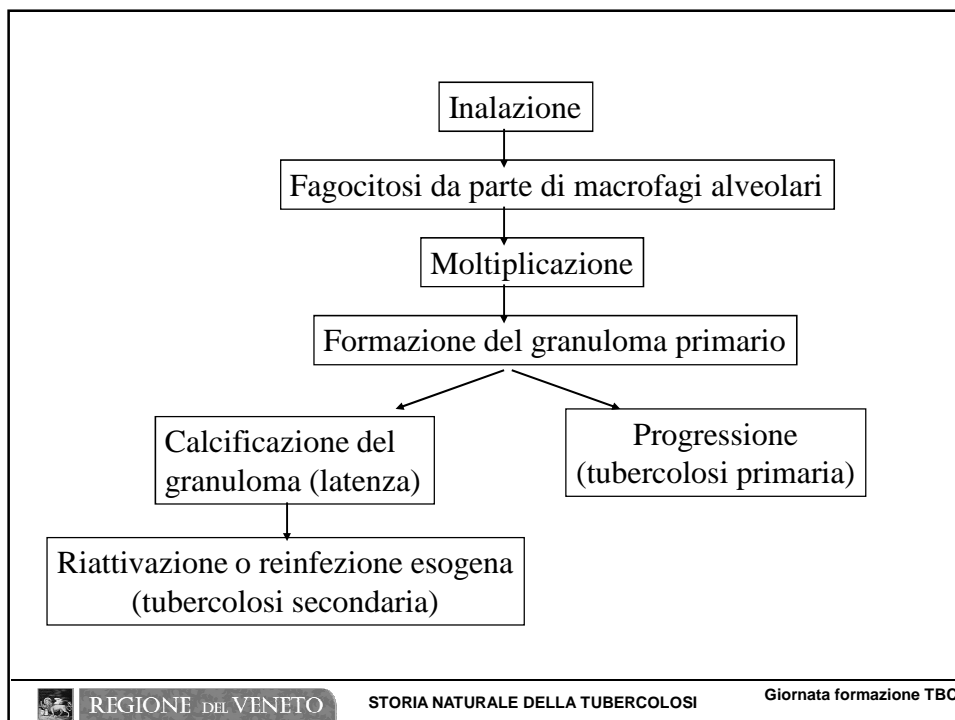
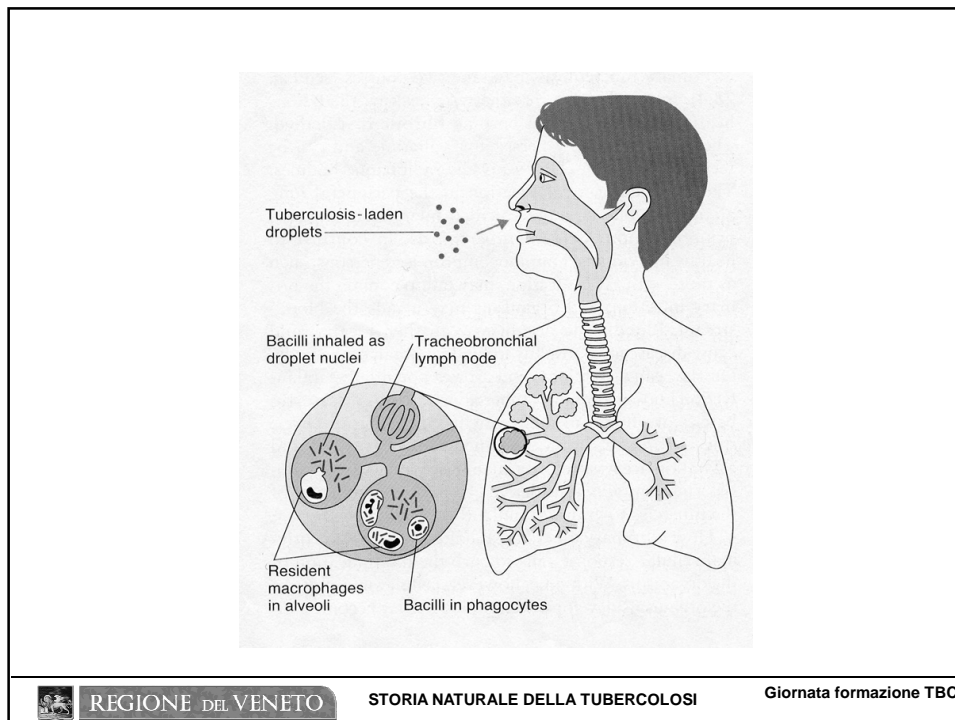
- *M. tuberculosis* é immesso nell'ambiente attraverso l'aerosol prodotto con la tosse da individui infetti
- E' molto resistente all'essiccamento e diviene parte di particelle di polvere risultato dell'essiccamento dell'aerosol
- Viene acquisito respirando direttamente l'aerosol infetto o le particelle di polvere da esso derivanti
- La tubercolosi può manifestarsi in due forme: primaria e secondaria



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC



## Tuberculosi primaria

- I bacilli vengono fagocitati dai macrofagi alveolari (I)
- *M. tuberculosis* inizia a replicarsi all'interno del macrofago fino a che questo non muore rilasciando la progenie batterica all'esterno
- I bacilli vengono di nuovo fagocitati da altri macrofagi alveolari ed altri macrofagi richiamati nel luogo dell'infezione

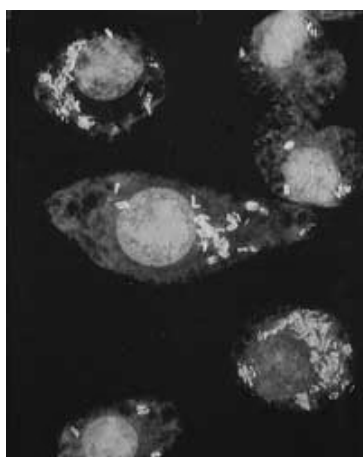


REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

## Macrofagi infettati da *Mtb*

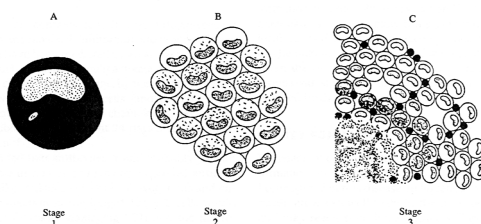


REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

- Inizio della formazione del granuloma. **(II)** Nel frattempo alcuni macrofagi contenenti bacilli migrano nei linfonodi: inizio dello sviluppo della risposta immunitaria e diffusione tramite le vie linfatiche in altre parti dell'organismo

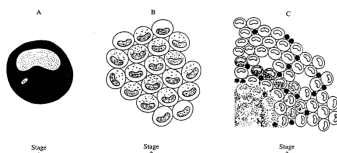


REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

- Dopo circa 3 settimane dall'inizio dell'infezione iniziano a svilupparsi l'ipersensibilità ritardata e l'immunità cellulo-mediata. Uccisione dei macrofagi infetti (caseificazione del granuloma) e presenza di macrofagi attivati e linfociti intorno alla zona caseificata **(III)**.
  - *M. tuberculosis* non é normalmente capace di replicarsi all'interno di macrofagi attivati.
  - *M. tuberculosis* non é capace di replicarsi nel tessuto caseificato, ma vi sopravvive



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

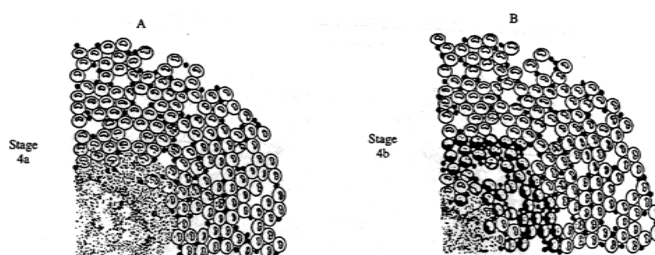
- L'infezione può prendere due strade a seconda dell'intensità della risposta immunitaria cellulo- mediata.
  - Risposta cellulo-mediata non sufficiente: il granuloma continua ad espandersi: tubercolosi primaria (IV A)
  - Risposta cellulo-mediata sufficiente: i bacilli sono contenuti all'interno della zona caseificata, la lesione regredisce e calcifica (tubercolosi latente) (IV B)



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC



**Fig. 3** The sketch of Stage 4A depicts an established tubercle 4 to 5 weeks of age representing one found in Lurie's susceptible rabbits. It has an enlarging caseous center. The bacilli escaping from the edge of this center are ingested by nonactivated incompetent macrophages. In such macrophages, the bacilli again find a favorable intracellular environment in which to multiply. They do so until again the tissue-damaging immune response kills these new bacilli-laden macrophages and the area of caseous necrosis enlarges. This sequence may be repeated many times. The lung is destroyed, and the bacilli spread by the lymphatic and hematogenous routes to other sites, where the tissue destruction continues. Several partly activated macrophages (lightly shaded) are included to show that these susceptible rabbits develop only weak CMI. (This pattern of tuberculosis is seen in immunosuppressed individuals, including nonterminal AIDS patients.) The sketch of Stage 4B depicts an established tubercle 4 or 5 weeks of age representing one found in Lurie's resistant rabbits. The caseous center remains small because the bacilli escaping from its edge are ingested by highly activated (competent) macrophages (darkly shaded) which surround the caseum. In such activated macrophages, the bacilli cannot multiply and are eventually destroyed. Such effective (activated) macrophages are produced by T cells and their lymphokines. If the caseous center remains solid and does not liquefy, the disease will be arrested by this CMI process, because further tissue destruction does not occur. (This scenario occurs in healthy immunocompetent human beings who show positive tuberculin reactions and yet no clinical and often no X-ray evidence of the disease.) Reprinted from reference 10.



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

## Tubercolosi secondaria

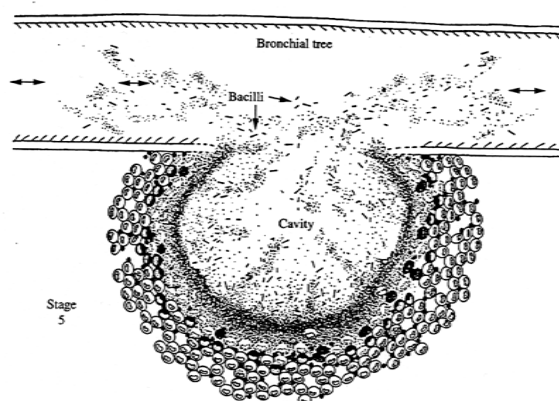
- Causata da riattivazione di una tubercolosi latente da una reinfezione esogena
- Normalmente in seguito ad un episodio di immunodepressione (età, trattamento con corticosteroidi, AIDS, chemioterapia ecc.)
- Le lesioni divengono di nuovo attive, necrotizzano crescono fino a coalescere. Con il tempo l'interno del granuloma può liquefarsi.
- Formazione di cavità
- Fase infettiva



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

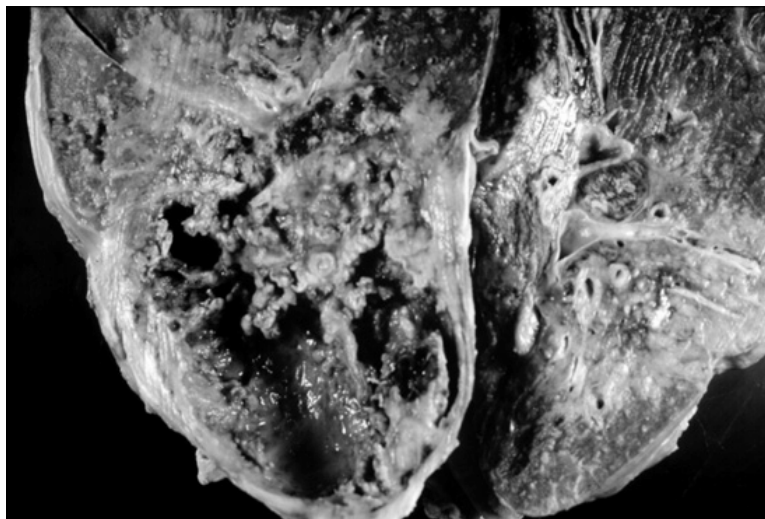
Giornata formazione TBC



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

## Come fronteggiamo l'emergenza TB

### Diagnosi e trattamento dell'infezione in atto

- Identificazione dei casi
- Identificazione dei casi "smear positive"
- Trattamento idoneo (farmaci, schema terapeutico, *compliance* e durata)

#### TBC attiva

~8 milioni di nuovi casi per anno

### Diagnosi e trattamento dell'infezione latente

- Identificazione degli esposti
- Profilassi prima dello sviluppo di infezione attiva

TBC latente  
Due miliardi di persone



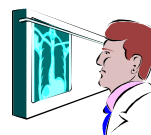
REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Diagnosi di infezione

- **Infezione attiva:**  
**Diagnosi diretta**: clinica e microbiologica
- **Infezione latente:**  
**Diagnosi indiretta**



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## DIAGNOSI INDIRETTA



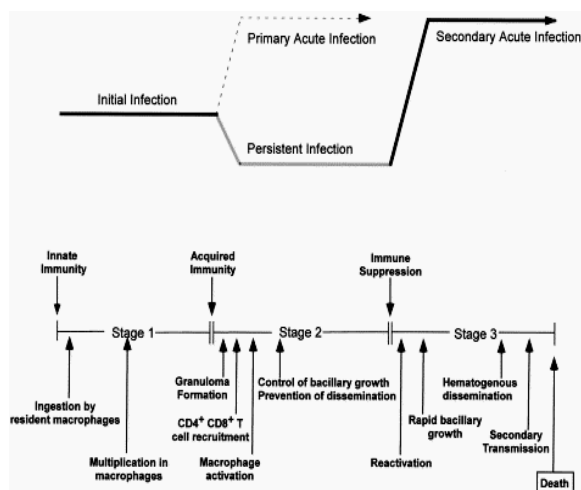
REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC



## Storia naturale dell'infezione



REGIONE DEL VENETO

STORIA NATURALE DELLA TUBERCOLOSI

Giornata formazione TBC

## L' infezione tubercolare latente

- I soggetti infetti non sono malati
- Non sono contagiosi
- Possono sviluppare la malattia in futuro se non assumono farmaci preventivi e se il sistema immunitario non controlla il microrganismo



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Test disponibili

- Intradermoreazione alla tubercolina (Mantoux, PPD, TST)
- Test di nuova generazione basati sulla produzione di INF- $\gamma$  in risposta ad antigeni tubercolari specifici
  - Quantiferon (test ELISA)
  - T SPOT-TB (ELISPOT)
- Non specifici per la tubercolosi latente



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Intradermoreazione alla tubercolina

- Il più vecchio test diagnostico ancora in uso (100 anni).
- Specificità: bassa, cross-reattività con BCG e micobatteri atipici
- Sensibilità: 75-90% in forme attive, più bassa in soggetti immunodepressi, non valutabile per infezione latente



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Test alla tubercolina

### Svantaggi

- Cross reattività antigenica con ceppi vaccinali e micobatteri non tubercolari
- Bassa sensibilità nei pazienti immunocompromessi
- Necessità di una seconda visita per la lettura del risultato
- Soggettività della lettura stessa
- Risultato non costante nel tempo
- Variabilità a seconda della modalità di somministrazione
- Possibile effetto *booster* in test ripetuti



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Ma ...

- Numerosi *trial* hanno dimostrato che il trattamento della TB latente, diagnosticato sulla base di un test cutaneo positivo riduce il rischio di malattia attiva del 60%
- Il test è a basso costo e non richiede attrezzatura di laboratorio



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Metodi basati sul rilascio di IFN- $\gamma$

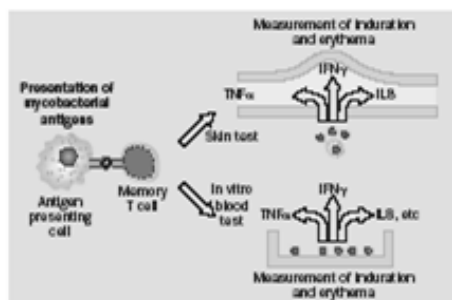


Figure 1. Biological basis of the tuberculin skin test and Interferon- $\gamma$  assay. TNF $\alpha$ : Tumour necrosis factor  $\alpha$ ; IFN $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ ; IL6: Interleukin 6. Reproduced with permission from Elsevier.

### Quantiferon Gold: QFT-TB-G

ELISA su sangue intero

### T-SPOT.TB:

ELISPOT

Si basano sul rilascio di IFN- $\gamma$  in seguito a stimolazione con proteine presenti in *M. tuberculosis*, ma assenti nel ceppo vaccinale *M. bovis BCG*:

-ESAT-6

-CFP10

-TB7.7

MAGGIOR SPECIFICITA'

NO EFFETTO BOOSTER

Pai et al Lancet ID 4,2004:761-776



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## T-SPOT.TB /QFT-TB-G/TST

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE TUBERCULIN SKIN TEST AND OF THE NEW BLOOD TESTS

|   | T-SPOT.TB   | Quantiferon-TB Gold   | TST                         |
|---|---|---|-----------------------------|
| Antigens  | ESAT-6 and CFP10  | ESAT-6 and CFP10  | PPD                         |
| Positive internal control                       | Yes   | Yes   | No                          |
| Uniformity of methods and reagents              | Yes   | Yes   | No <sup>3</sup>             |
| Potential for boosting effect in repeated tests | No  | No  | Yes                         |
| Need for return visit                           | No  | No  | Yes                         |
| Time required for results                       | 16–20 h*  | 16–24 h <sup>2</sup>  | 48–72 h <sup>1</sup>        |
| Setting of test                                 | In vitro  | In vitro  | In vivo                     |
| Interpretation of test                          | Objective (instrument-based)  | Objective (instrument-based)                                    | Subjective (operator-based) |
| Readout units                                   | IFN- $\gamma$ spot-forming cells  | International units of IFN- $\gamma$                            | Millimeters of induration   |
| Technological platform                          | ELISPOT   | ELISA   | NA                          |
| Test's substrate                                | PBMC  | Whole blood   | NA                          |
| Outcome measure                                 | Number of IFN- $\gamma$ -producing T cells  | Serum concentration of IFN- $\gamma$ produced by T cells        | NA                          |
| Readout system                                  | Enumeration of spots by naked eye, magnifying lens, or automated counter <sup>4</sup> | Measurement of optical density values using an automated reader | Palpable induration         |

Richeldi, Am J Respir Crit Care Med Vol.174. pp736-742, 2006



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Sensibilità e specificità

TABLE 2. PUBLISHED STUDIES ON SENSITIVITY AND SPECIFICITY OF THE NEW BLOOD TESTS FOR THE DIAGNOSIS OF LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

|   | T-SPOT.TB (TS.TB)                                     |                  |  | QuantiferON-TB Gold (QFT-G)                               |      |                                  |
|---|---|------------------|--|---|------|----------------------------------|
|   | Study Design  | Size             | Sensitivity                            | Study Design  | Size | Sensitivity                      |
| Sensitivity in active TB cases<br>HIV-negative adults | Prospective (38)                                      | 22               | 97%                                    | Case-control (39)   | 118  | 89%                              |
|   | Case-control (14)                                     | 47               | 96%                                    | Case-control (34)   | 54   | 81%                              |
|   | Case-control (23)                                     | 36               | 92%                                    | Prospective (47)  | 48   | 85%                              |
|   | Prospective (28)                                      | 24               | 83%                                    | Prospective (28)  | 23   | 74%                              |
|   | Prospective (29) <sup>†</sup>                         | 87               | 95%                                    | Prospective (29) <sup>†</sup>                             | 87   | 70%                              |
|   | Subtotal  | 266              |  | Subtotal  | 330  |                                  |
| Children with high prevalence of HIV-co-infection     | TS.TB is more sensitive than TST                      |                  |  | QFT-G is more sensitive than TST                          |      |                                  |
|   | Blinded prospective (17)                              | 293 <sup>‡</sup> | 83%                                    |   |      |                                  |
| HIV-co-infected adults                                | TS.TB is more sensitive than TST                      |                  |  | No published data available for QFT-G                     |      |                                  |
|   | Case-control (36)                                     | 39               | 90%                                    | No published data available for QFT-G                     |      |                                  |
| Sensitivity in people with LRA <sup>*</sup>           | TS.TB is highly sensitive                             |                  |  |   |      |                                  |
|   | Study Design  | Size             | Correlation with Exposure              | Study Design  | Size | Correlation with Exposure        |
|   | Contact tracing (19)                                  | 535              |  | Contact tracing (33)                                      | 125  | Same as TST                      |
|   | Contact tracing (21)                                  | 413              |  | Case-control (34)   | 48   | Higher than TST                  |
|   | Contact tracing (32)                                  | 91               |  | Subtotal  | 173  |                                  |
|   | Contact tracing (22)                                  | 88               | Higher than TST <sup>‡</sup>           |   |      |                                  |
| Specificity in BCG-vaccinated unexposed controls      | Contact tracing (15)                                  | 50               |  | QFT-G has similar correlation with exposure to MTB as TST |      |                                  |
|   | Subtotal  | 1,136            |  |   |      |                                  |
|   | TS.TB correlates with exposure to MTB better than TST |                  |  |   |      |                                  |
|   | Study Design  | Size             | Specificity                            | Study Design  | Size | Specificity                      |
|   | Case-control (23)                                     | 28               | 100%                                   | Case-control (39)   | 216  | 98%                              |
|   | Case-control (17)                                     | 40               | 100%                                   | Case-control (34)   | 99   | 96%                              |
| Specificity in BCG-vaccinated exposed contacts        | Case-control (16)                                     | 33               | 100%                                   | Subtotal  | 315  |                                  |
|   | Case-control (14)                                     | 26               | 100%                                   |   |      |                                  |
|   | Subtotal  | 127              |  | QFT-G is more specific than TST                           |      |                                  |
|   | TS.TB is more specific than TST                       |                  |  |   |      |                                  |
|   | Study Design  | Size             | Association with BCG Vaccination       | Study Design  | Size | Association with BCG Vaccination |
|   | Contact tracing (19)                                  | 467              |  | Contact tracing (44)                                      | 309  | Independent of BCG status        |
|   | Contact tracing (21)                                  | 413              |  | Subtotal  | 309  |                                  |
|   | Contact tracing (32)                                  | 91               | Independent of BCG status <sup>‡</sup> |   |      |                                  |
|   | Contact tracing (15)                                  | 41               |  |   |      |                                  |
|   | Subtotal  | 1,012            |  | QFT-G is more specific than TST                           |      |                                  |

Definition of abbreviations: BCG = bacille Calmette-Guérin; MTB = Mycobacterium tuberculosis; TB = tuberculosis; TST = tuberculin skin test.

<sup>\*</sup> In the absence of a gold standard for LTB, these studies used degree of exposure to infectious index cases as a surrogate reference standard.

<sup>†</sup> These studies included HIV-negative patients, but with some other immunosuppressive conditions.

<sup>‡</sup> Of these, 30 were HIV-co-infected and with active TB.

<sup>§</sup> Statistically significant ( $p = 0.03$  and  $p = 0.007$ ) difference between ELISpot and TST in (19).

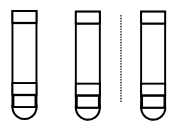
<sup>||</sup> Statistically significant ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.0001$ ,  $p = 0.0003$ ,  $p = 0.03$ , respectively) difference between ELISpot and TST.

Richeldi, Am J Respir Crit Care Med Vol.174. pp736-742, 2006

## 1° fase: raccolta del campione

### QFT-TB-G

#### 1. Prelievo di sangue venoso nelle provette idonee

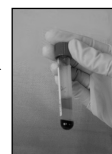


Nil TB Specific Antigens Mit  
ESAT-6  
CFP-10  
TB7.7

#### 2. Mescolare bene i tubi ed incubare per 16-24 ore a 37°C



#### 3. Centrifugare



Conservare a 2-8°C (8 settimane) o a -20°C



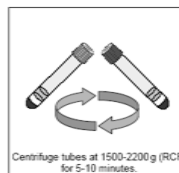
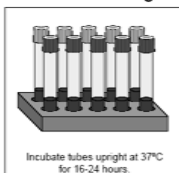
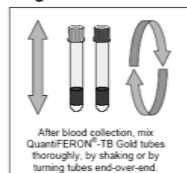
REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

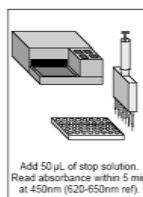
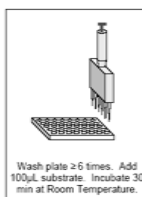
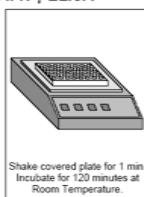
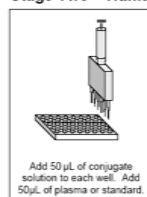
Giornata formazione TBC

## 2° fase: determinazione dell'IFN- $\gamma$

### Stage One – Blood Incubation and Harvesting



### Stage Two – Human IFN- $\gamma$ ELISA



**Tempi di risposta**  
**1 settimana**



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## QFT-TB Gold: l'interpretazione

### Test positivo

Possibile infezione da *M. tuberculosis*; valutazione medica richiesta

### Test negativo

Infezione da *M. tuberculosis* improbabile, anche se non può essere esclusa

### Test indeterminato

Impossibile determinare la possibilità di infezione da *M. tuberculosis* dal campione di sangue in esame



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Mantoux vs IFN- $\gamma$ test

| Clinica                     | Presenza del microrganismo | Mantoux        | IFN- $\gamma$ |
|-----------------------------|----------------------------|----------------|---------------|
| TB trattata                 | NO(di solito)              | <b>Pos</b>     | <b>Neg</b>    |
| VaccinazioneBCG             | No                         | <b>Pos/Neg</b> | <b>Neg</b>    |
| Micobatteri non tubercolari | ?                          | <b>Pos</b>     | <b>Neg</b>    |
| TB attiva                   | Si                         | <b>Pos</b>     | <b>Pos</b>    |
| LTBI                        | Si                         | <b>Pos</b>     | <b>Pos</b>    |

ada



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## I risultati indeterminati

### QUANDO??

0-0,3% soggetti immunocompetenti per presenza di Ac eterofili

#### ➤ Condizione di immunosoppressione

- 21,4% soggetti in trattamento antineoplastico o immunosoppressivo
- 5,5% trattamento con anti-TNF- $\alpha$
- 3,7% soggetti HIV+ con conte CD4 <100/ml

#### ➤ Errori tecnici

- mancato rispetto delle procedure operative
- inadeguato tempo intercorso tra prelievo ed incubazione



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC

## Quando utilizzare i nuovi test su sangue?

**In tutte le situazioni in cui si usa il TST, ma trovano particolare indicazione nei seguenti casi:**

- Aumentato rischio di progressione a TB attiva in immunodepressi noti o presunti tali
- Operatori Sanitari ad alto rischio d'infezione
- Soggetti vaccinati con BCG
- Sospetta infezione da NTM
- Soggetti clinicamente dubbi, negativi al TST
- Soggetti esposti con TST positivo noto
- Pregressa reazione avversa al TST

*Linee Guida per il controllo della  
Tubercolosi nella Regione Veneto- 2007*



REGIONE DEL VENETO

DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

Giornata formazione TBC



REGIONE DEL VENETO

## Grazie per l'attenzione