

**DOCUMENTO SULL'UTILIZZO DEI NUOVI TEST IMMUNOLOGICI PER LA  
DIAGNOSI DI INFEZIONE TUBERCOLARE LATENTE**

**Elaborato dai Gruppi di Studio Infezioni e Tubercolosi  
dell'Associazione Italiana Pneumologi Ospedalieri (AIPO)  
e della Società Italiana di Medicina Respiratoria (SIMeR).**

Con il contributo dell'Associazione di Microbiologia Clinica Italiana (AMCLI) e della Federazione Italiana per le Malattie Polmonari Sociali e la Tubercolosi (FIMPST).

**Introduzione e rationale del documento.**

La tubercolosi (TB) costituisce la malattia infettiva a più elevata mortalità nel mondo da singolo agente patogeno, rappresentando uno dei maggiori problemi sanitari nei Paesi in via di sviluppo. Tuttavia, facendo seguito alla diffusione della infezione da virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV), alla crescente immigrazione dai Paesi ad alta endemia tubercolare, ed alla emergenza di ceppi di *M. tuberculosis* (MTB) multi-farmaco resistenti, essa rappresenta motivo di preoccupazione per la sanità pubblica anche nelle aree geografiche industrializzate. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (O.M.S.) ha riportato 8.8 milioni di nuovi casi di malattia attiva nel 2003, di cui la metà potenzialmente contagiosi, e 1.7 milioni di decessi [1]. È stato stimato che il contagio di 10 contatti per ogni singolo caso produrrebbe circa 40 milioni di nuove infezioni in un dato intervallo temporale [1]. L'identificazione ed il trattamento dei casi di malattia attiva costituiscono le strategie più salienti dei programmi di controllo della TB in tutti i Paesi del mondo. Ciononostante, poiché la trasmissione dell'infezione avviene precocemente, ovvero prima della formulazione della diagnosi nel caso indice, i nuovi casi di malattia attiva, soprattutto se non prontamente riconosciuti, rappresentano la forza portante della persistente epidemia tubercolare. E' stato stimato che anche in contesti geografici a bassa

prevalenza tubercolare, il 30-40% circa dei nuovi casi di malattia attiva è causato dalla recente trasmissione di MTB [2].

L'esito dell'infezione tubercolare è largamente determinato dalla risposta immunitaria dell'organismo ospite. Le manifestazioni cliniche che ne conseguono oscillano tra la condizione di infezione latente (ITBL), in assenza di alcuna evidenza microbiologica e radiologica di malattia attiva, le forme lievi di malattia, ovvero quelle pauci-sintomatiche a bassa carica bacillare, e le forme più severe di TB polmonare estesa ad elevata carica micobatterica. E' stato stimato che circa 1/3 della popolazione mondiale ospita il MTB allo stato di latenza. Le stime dell'OMS indicano per l'Italia una prevalenza di ITBL del 12% [1]. Nei soggetti immuno-competenti con ITBL il rischio di sviluppare una malattia attiva è del 10% nel corso dell'intera vita, evenienza che nella metà dei casi si verifica nei primi 2-5 anni dall'esposizione/infezione. Diversamente, il suddetto rischio è significativamente più elevato nei soggetti immuno-compromessi, essendo del 5-10% per anno di vita negli individui co-infettati da HIV [3]. Il trattamento della ITBL (precedentemente indicato come terapia preventiva o chemiopprofilassi) in selezionate categorie di soggetti a rischio sarebbe di grande beneficio per la sanità pubblica in quanto comporterebbe una significativa riduzione non solo del rischio individuale, ma contribuirebbe a ridurre il serbatoio di soggetti infettati, che rappresentano la fonte primaria per il potenziale sviluppo di nuovi casi di TB attiva nei tempi futuri [4].

Il test cutaneo alla tubercolina (TCT, noto anche come test di Mantoux) è probabilmente il più antico dei presidi diagnostici sviluppati nel corso del diciannovesimo secolo ancora in uso sostanzialmente immutato nella pratica clinica. Il suo utilizzo per l'identificazione della ITBL fu inizialmente descritto da von Pirquet nel 1907 [5]. Idealmente, esso rappresenta un approccio ottimale in quanto semplice e sicuro da somministrare a fronte di una esigua spesa economica; tuttavia, la gestione dei soggetti con risposta positiva al test non è del tutto univoca. Infatti, il TCT presenta una bassa specificità a causa della cross-reazione antigenica del derivato proteico purificato (PPD)

con i ceppi vaccinali di *M. bovis* BCG, il cui effetto confondente può perdurare sino a 10-15 anni dopo la somministrazione del vaccino [6], e con i micobatteri non tubercolari (MNTB) eventualmente presenti nell'ambiente. Sebbene la dimensione dell'area di infiltrazione cutanea sia utilizzata per definire la condizione di infezione nell'ambito di categorie di individui con diverso rischio, va sottolineato che la sensibilità del test è comunque bassa nei soggetti immunocompromessi, quali gli individui con co-infezione da HIV, quelli che per condizioni patologiche concomitanti di varia natura sono candidati a trattamenti a lungo termine con farmaci immunosoppressori, citotossici o biologici, i soggetti recentemente infettati, i soggetti anziani od in età pediatrica [7]. Inoltre, la stessa malattia tubercolare, se estesa, può essere causa di depressione temporanea della risposta immunitaria, producendo paradossalmente una risposta falsamente negativa del TCT. Altri limiti del test includono la necessità di una visita di ritorno per la verifica del risultato, a distanza di 72 ore dalla somministrazione, e la variabilità di lettura dello stesso. E' stato stimato che la variabilità di lettura tra operatori (sanitari) diversi produce una deviazione standard di 2.3-2.5 mm, che è invece di 1.3-1.9 mm in caso di lettura da singolo operatore [7]. Inoltre, il risultato prodotto dal test tubercolinico non è costante nel tempo; infatti, la dimensione dell'infiltrato può aumentare sia a causa del verificarsi di una nuova infezione (conversione) e sia a causa della ripetizione seriale del test in soggetti con precedente risposta positiva (fenomeno di boosting). Inoltre, la dimensione dell'infiltrato può anche diminuire (reversione) sia a causa di fenomeni fisiologici, quali l'invecchiamento, che per condizioni patologiche concomitanti che comportino una qualche compromissione della risposta immunitaria [7-9]. In ultimo, differenze nella modalità di somministrazione dell'antigene possono ulteriormente contribuire alla variabilità dei risultati ottenuti, essendo questa maggiore con il test multipuntura (Tine test) che non con il metodo della iniezione intradermica secondo tecnica di Mantoux [7].

In conclusione, per rendere più efficienti i programmi di *screening* della ITBL è necessario introdurre nella pratica clinica strumenti diagnostici, sia più sensibili che più specifici, che consentano di applicare il trattamento mirato di tale condizione in

selezionate popolazioni a rischio. Questa problematica è particolarmente stringente nei Paesi sviluppati dove oltre la metà dei casi di TB attiva (ed i relativi contatti) è rappresentato da soggetti immigrati da Paesi ad alta prevalenza, presso i quali la profilassi vaccinic con BCG e l'esposizione ambientale a MNTB sono fenomeni piuttosto comuni [10, 11]. Va infatti sottolineato che la *British Thoracic Society* non raccomanda la somministrazione del TST in soggetti con recente esposizione tubercolare, se vaccinati con BCG [12].

## **I nuovi test immunologici per la diagnosi di infezione tubercolare.**

### ***Principi***

Recenti studi di analisi genomica comparativa hanno consentito l'identificazione di proteine specifiche di MTB, codificate da regioni geniche che sono selettivamente espresse nel genoma micobatterico tubercolare, ma assenti da quello di *M. bovis* BCG e dei MNTB [13]. In particolare, l'utilizzo di due proteine secretorie codificate dalla regione RD1 [la regione RD (*region of differentiation*)-1 è condivisa da *M. szulgai*, *M. marinum* e *M. kansasii*], denominate ESAT-6 (*early secretory antigen target-6*) e CFP-10 (*culture filtrate protein-10*), quali *target* della risposta immunitaria, ha portato allo sviluppo di nuovi test per la diagnosi immunologica dell'infezione tubercolare, dotati di elevata sensibilità e specificità [14-16]. Questi test si basano sulla capacità dei linfociti T effettori circolanti di produrre interferone gamma (IFN- $\gamma$ ) a seguito di stimolazione specifica *in vitro*.

### ***Aspetti metodologici***

I due test immunologici attualmente disponibili in commercio, evoluzione di precedenti varianti, sono il QuantiFERON-TB Gold (QFT-TB) (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia), approvato dalla *Food and Drug Administration* (FDA) nel maggio 2005, e il T-SPOT.TB (TS.TB) (Oxford Immunotec, Abingdon, Gran Bretagna).

I due test presentano alcune differenze metodologiche [17]: il QFT-TB viene eseguito direttamente su campione di sangue venoso intero: la stimolazione antigenica, che si basa sull'utilizzo di peptidi di ESAT-6 e CFP-10, avviene a 37 °C per 16-24 ore. (La versione "In Tube" contiene anche un peptide denominato TB7.7). Il test dispone di un controllo negativo e di un controllo positivo, rappresentato dal mitogeno aspecifico fitoemoagglutinina (PHA). Un importante vantaggio del test è rappresentato dalla possibilità di conservazione dei campioni da analizzare. Infatti, al termine del periodo di incubazione, i campioni di plasma possono venire conservati a 2-8°C fino a 8 settimane, consentendo di effettuare la lettura del test su un numero più ampio di campioni. La concentrazione di IFN- $\gamma$  prodotto con modalità antigene-specifica viene misurata su plasma con metodica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). L'elaborazione del risultato del test viene effettuata attraverso l'analisi di un algoritmo che misura la produzione della citochina sia nel controllo negativo che in quello positivo. Il test è positivo se la produzione antigene-specifica di IFN- $\gamma$  è superiore al valore soglia (*cut-off*) prefissato.

Il test TS.TB, diversamente dal QFT-TB, viene eseguito usando cellule mononucleate purificate, isolate da un campione di sangue venoso periferico. La stimolazione antigenica viene eseguita su piastra mediante peptidi di ESAT-6 e CFP-10 cui un numero prefissato di cellule viene esposto per 16-24 ore, in pozzetti separati per ciascun antigene, a 37°C in un atmosfera controllata di anidride carbonica al 5%. Il test dispone di un controllo negativo e di un controllo positivo (PHA). La produzione di IFN- $\gamma$  viene analizzata con la tecnica dell'*enzyme-linked immuno-SPOT* (ELISPOT), che consente di rilevare ogni singolo linfocita che produce la citochina sotto forma di *spot* o impronta lasciata dall'IFN- $\gamma$  prodotto dalle cellule e legato dagli anticorpi anti-IFN- $\gamma$  che rivestono la piastra stessa. La quantificazione del risultato viene effettuata mediante conta del numero di *spot* con un apposito lettore di piastre (oppure un microscopio od una lente di ingrandimento). Anche in questo caso vengono definiti dei *cut-off* di riferimento in base alla risposta osservata nel controllo negativo (e positivo).

### *Sensibilità, specificità e potere predittivo dei test.*

Complessivamente, la sensibilità dei test *in vitro*, valutata in soggetti immunocompetenti con TB attiva - come controllo positivo d'infezione tubercolare - varia per i due test dal 90 al 95% [17]. Due studi condotti in Inghilterra hanno dimostrato che in soggetti immunocompetenti affetti da TB attiva, polmonare ed extra-polmonare, il test ELISPOT (nella variante con solo ESAT-6 ricombinante + peptidi) presenta una sensibilità diagnostica maggiore (92-96%) del TST (69%) [18, 19], uno studio condotto recentemente in Germania con la versione commerciale del test, TS.TB, ha dimostrato una sensibilità del 96% [20] ed uno condotto in Zambia una sensibilità del 100% con il test TS.TB (ESAT-6 e CFP-10 peptidi) [21].

Due studi condotti con il test QTF-TB (utilizzanti rispettivamente la variante su piastra con ESAT-6 e CFP-10 ricombinanti o sotto forma di peptidi) hanno descritto sensibilità dell'82% e dell'85% [22, 23]. Non sono ancora disponibili in letteratura dati sulla sensibilità della versione commerciale "In Tube".

Numerosi studi condotti con QTF-TB (variante su piastra) che con TS.TB (varianti ESAT-6 e ESAT-6/CFP-10, ricombinanti e/o sotto forma di peptidi) hanno dimostrato che, contrariamente al TCT, i test immunologici *in vitro* non sono stimolati dalla vaccinazione con *M. bovis* BCG, risultandone una specificità del 98-100% [18, 22, 22, 24-33].

Per quanto riguarda l'identificazione dei contatti con recente esposizione ad un caso di TB batteriologicamente attiva, uno studio condotto in India su 700 soggetti con esposizione professionale ha dimostrato una concordanza dell'81.4% tra TCT e QTF-TB (variante "In Tube") [25]. Peraltro, sia gli studi condotti con il test QTF-TB (variante su piastra con antigeni ricombinanti) che quelli condotti con il test TS.TB (varianti ESAT-6 e ESAT-6/CFP-10) in soggetti esposti a casi indice di TB attiva hanno dimostrato una elevata concordanza con il TCT in soggetti esposti non vaccinati [26] ed una correlazione

maggiore, e statisticamente significativa, tra risposte positive e livello di esposizione [18, 26-29 per QFT-TB e 30-32, 34 per TS.TB].

A riguardo dell'infezione tubercolare in presenza di co-infezione da virus HIV, la performance del test TS.TB non è influenzata dal livello di linfociti T CD4<sup>+</sup> ematici [35]. Conseguentemente, la sua sensibilità (ESAT-6 e CFP-10 ricombinanti + peptidi) risulta significativamente maggiore (>90%) rispetto al TCT in soggetti con TB attiva e co-infezione da HIV, sia adulti che in età pediatrica [35, 36]. Una revisione dell'applicabilità dei test immunologici su sangue nell'algoritmo diagnostico dell'infezione tubercolare (latente ed attiva) in soggetti con infezione da HIV nei Paesi in via di sviluppo è stata recentemente proposta da Dheda e coll. [36].

È stata segnalata l'utilità dei test *in vitro* nella diagnosi precoce di TB attiva in soggetti sottoposti a trattamento con farmaci immunosoppressori con TCT negativo [23], e nella identificazione precoce di casi di TB-MDR in soggetti esposti [37].

### **Gestione dei test su sangue.**

#### **QFT-TB: interpretazione dei risultati**

- Il risultato del test viene espresso sottraendo alla concentrazione di IFN- $\gamma$  prodotto in risposta alla stimolazione antigenica il livello di citochina rilevato nel controllo negativo;
- il *cut-off* del test è pari a 0.35 UI/ml;
- il risultato del test è positivo se la produzione antigene-specifica di IFN- $\gamma$  è superiore a 0.35 UI/ml;
- il risultato del test è negativo se la produzione antigene-specifica di IFN- $\gamma$  è inferiore a 0.35 UI/ml;
- il risultato del test è indeterminato se il controllo positivo è inferiore al *cut-off* pre-definito.

## **TS.TB: interpretazione dei risultati**

- Il controllo positivo deve avere almeno 20 spot, o mostrare saturazione;
- il controllo negativo deve avere <5 spot. Un controllo negativo con più di 10 spot è da considerarsi sospetto;
  - quando il controllo negativo ha da 0 a 5 spot, un campione è considerato positivo (ad ESAT-6 e/o CFP-10) se il numero di spot nei rispettivi pozzetti è  $\geq 6$  rispetto al controllo negativo;
  - quando il controllo negativo ha più di 6 spot, un campione è considerato reattivo ad ESAT-6 e/o CFP-10 se il numero di spot nei rispettivi pozzetti è  $\geq$  al doppio degli spot presenti nel controllo negativo;
  - alcuni pazienti potrebbero avere linfociti T con una limitata risposta alla PHA, ma se i pozzetti con ESAT-6 e CFP-10 sono positivi, il campione dovrebbe essere considerato valido.

### ***Gestione dei risultati indeterminati***

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

La percentuale di risultati indeterminati, osservata con il test QTF-TB, oscilla dallo 0-0.3% nei soggetti immunocompetenti [24, 25] al 21.4% in soggetti con test cutaneo tubercolinico negativo (0 mm) o sottoposti a trattamenti anti-neoplastici o immunosoppressivi [38]. In aggiunta, Matulis e coll. hanno segnalato in uno studio condotto su 142 soggetti affetti da malattie autoimmuni che il riscontro di un risultato indeterminato (5.6%) si associava al trattamento con farmaci anti-TNF- $\alpha$  [39]. In ultimo, su 599 soggetti



con infezione da HIV, un risultato indeterminato veniva osservato nel 3.7% dei casi in correlazione con un valore di linfociti T CD4<sup>+</sup> inferiore a 100/ml [22]. In caso di risultato indeterminato, è consigliabile la ripetizione del test.

Un recente studio prospettico comparativo di QFT-TB e TS.TB utilizzati nella medesima popolazione ha fornito un'iniziale indicazione di una differenza nel tasso di risultati indeterminati tra i due test ematici. Pur essendo entrambi i test influenzati negativamente da una condizione di immunodepressione, il QFT-TB fornisce più spesso risultati indeterminati, in particolare nei bambini al di sotto dei 5 anni di età [FERRARA LANCET 2006]: questo dato sulla popolazione pediatrica è stato poi confermato da un ulteriore studio [CONNELL THORAX 2006]. È possibile che almeno una parte di questa diversa incidenza di risultati indeterminati sia attribuibile a differenze tecniche nel formato dei due test. Un ulteriore studio ha confermato questa osservazione, fornendo anche indicazioni iniziali circa la possibilità che i cut-off ideali dei test ematici possano essere diversi rispetto a quelli attualmente in uso [LEE ERJ 2006]: questa osservazione però richiederà certamente di essere confermata da ulteriori studi prima di portare a modifiche nell'interpretazione dei risultati..

### **Potenzialità d'impiego dei nuovi test**

#### ***Vantaggi dei test immunologici verso il test cutaneo alla tubercolina***

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

- Minore variabilità di lettura del risultato (operatore-dipendente)
- Rapida disponibilità del risultato, in relazione al volume di lavoro del laboratorio

- Presenza di un controllo negativo, che in caso di risposta positiva consente di considerare eventuali errori tecnici)

- Presenza di un controllo positivo, che in caso di risposta negativa consente di considerare l'eventualità di concomitante immunodeficienza

- Possibilità di testare un numero maggiore di individui per seduta
- Standardizzazione dei reagenti e delle procedure di esecuzione dei test

### *Limiti dei test immunologici*

- Necessità di laboratori attrezzati e di personale tecnico addestrato
- Necessità processare un elevato numero d'esami per evitare spreco di reagenti e per mantenere un rapido *turnover*

- Elevato costo unitario
- Disponibilità economica adeguata per garantire la continuità delle prestazioni
- Potenziale rischio professionale per i laboratoristi per manipolazione di materiale biologico

### *Criticità*

- Riproducibilità dei risultati
- Valutazione costo/beneficio
- Valore predittivo del test per la riattivazione di TB
- Valutazione sensibilità nei soggetti con immunodepressione severa iatrogenica
- Valutazione sensibilità nei soggetti in età pediatrica
- Applicabilità nel percorso diagnostico della TB polmonare attiva sputo-negativa e della TB extra-polmonare

- Applicabilità nel monitoraggio del trattamento anti-tubercolare (in corso di TB attiva, TB-MDR, ITBL)
- Valutazione comparativa varie tipologie di test immunologici nei diversi campi di applicazione clinica
- Sviluppo di nuovi test che consentano di discriminare tra ITBL e TB attiva

### **Le linee guida esistenti.**

Nel dicembre 2005 sono state pubblicate le linee guida dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) statunitensi [41] sull'utilizzo del test QFT-TB, come aggiornamento del precedente documento pubblicato nel 2003. In questo documento si raccomanda l'uso possibile del QFT-TB (unico test approvato dall'FDA negli USA) in tutte le circostanze in cui è attualmente usato il test cutaneo tubercolinico. Il test su sangue rappresenterebbe un'alternativa con rapporto costo-efficacia favorevole nella sorveglianza periodica di lavoratori esposti a rischio di infezione tubercolare per la sua maggiore specificità rispetto al test cutaneo per l'assenza dell'effetto boosting. In quest'ultimo documento si suggerisce particolare attenzione nell'interpretare risultati discordanti tra test cutaneo e test su sangue: si suggerisce comunque di eseguire il test immunologico su sangue basale in tutti gli operatori sanitari, a prescindere dal precedente risultato del test cutaneo. Il test QFT-TB ha alcune limitazioni in comune con il test cutaneo, che per i test su sangue sono state meno studiate: in particolare, per quanto riguarda la tubercolosi attiva, la sensibilità inferiore all'80% non permette, secondo i CDC di escludere la diagnosi sulla base di un test su sangue negativo, soprattutto in alcuni gruppi (soggetti con infezione da HIV, bambini, anziani, immunodepressi). Il documento raccomanda infine che, se adottati, i test immunologici su sangue siano utilizzati in sostituzione, e non in aggiunta, al test cutaneo tubercolinico.

Nel marzo 2006 il National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) britannico ha pubblicato sul proprio sito Internet un documento di linea guida sulla tubercolosi, da applicare ad Inghilterra e Galles [42]. Sulla base di un'analisi di costo-

efficacia si raccomanda per la diagnosi di infezione tubercolare latente di considerare l'uso dei test immunologici su sangue, se disponibili, allo scopo di confermare una positività al test cutaneo oppure nel caso in cui il risultato del test cutaneo sia considerato non attendibile (ad esempio in caso di sospetto di un risultato falsamente negativo). In questa analisi costo-efficacia si confrontano 3 strategie in diverse situazioni di prevalenza dell'ITBL: 1) uso del solo TCT, 2) uso dei soli test su sangue, 3) uso del TCT con conferma dei positivi col test su sangue; in nessun caso la strategia basata sul solo TCT rivela un rapporto costo/efficacia accettabile rispetto alle altre. Ove la prevalenza dell'infezione latente sia superiore al 10%, la strategia TCT/test su sangue appare nettamente più vantaggiosa, mentre ove la prevalenza sia superiore al 40%, la strategia basata sul test su sangue appare vantaggiosa rispetto alle altre strategie. Questa analisi di costo-efficacia si basa tuttavia su una serie di assunzioni (tra cui un'elevata aderenza al trattamento dell'infezione latente, un elevato tasso di vaccinazione con il BCG, la vaccinazione con BCG dei soggetti cuti-negativi con elevata capacità di protezione), che potrebbero non essere esattamente riproducibili in altri contesti. Per quanto riguarda la diagnosi di tubercolosi attiva il documento suggerisce un possibile ruolo dei test immunologici su sangue nell'escludere la diagnosi, rinviando a più precise raccomandazioni in successivi aggiornamenti.

Occorre sottolineare che entrambe le linee guida consentono ed incoraggiano l'applicazione dei test immunologici su sangue (in alternativa od in combinazione con il test cutaneo) per la diagnosi di infezione tubercolare latente, solo in gruppi ad alto rischio e quando sia praticabile con una ragionevole adesione la terapia preventiva. Inoltre sono espressamente indicate diverse aree (la diagnosi di tubercolosi, l'impiego nei soggetti con infezione da HIV, i bambini, tra le altre) in cui sono necessari ulteriori studi.

### **Possibili strategie per l'applicazione dei nuovi test.**

In mancanza di studi che abbiano chiaramente documentato il rapporto di costo-efficacia delle varie strategie di applicazione dei nuovi test nella situazione Italiana,

riferendoci al citato modello operativo del NICE, appare ragionevole identificare alcuni possibili scenari operativi sulla base dei dati finora disponibili e della situazione epidemiologica Italiana in considerazione della probabilità che la pubblicazione di documenti di linea guida statunitensi ed europei stimoli l'utilizzo dei nuovi test ed, eventualmente, studi di costo beneficio anche nel nostro Paese.

### **Raccomandazioni generali per l'utilizzo dei test su sangue.**

Le seguenti raccomandazioni, basate sull'esame della letteratura scientifica disponibile, rappresentano il consenso di un gruppo di esperti e sono applicabili nel contesto della differenti strategie di implementazione dei nuovi test.

1. Non sono al momento disponibili dati conclusivi che consentano di identificare sicure differenze sostanziali di sensibilità e di specificità tra i due test su sangue commercialmente disponibili (QFT-TB Gold e TS.TB); pertanto al momento i test devono al momento essere considerati equivalenti e non necessariamente mutuamente esclusivi: si raccomanda che ogni Centro scelga sulla base delle risorse disponibili e della tipologia di pazienti da valutare.
2. La dimostrata maggiore specificità rispetto al test cutaneo, rende preferibili i test su sangue rispetto al test tubercolinico cutaneo in tutte le popolazioni caratterizzate da significativa prevalenza di vaccinazione con BCG od infezione da micobatteri non tubercolari, residenti, come gli operatori sanitari, o immigrate come i nativi dell'Africa francofona e dell'Est Europeo.
3. La dimostrata maggiore sensibilità di uno dei due test su sangue nella diagnosi di ITBL in pazienti immunocompromessi, rende questi test preferibili nello screening dei pazienti con immunodeficienza primaria od acquisita.
4. La positività ad un test sul sangue deve essere seguita dall'attivazione delle procedure diagnostiche, cliniche e radiologiche necessarie ad escludere la presenza di una tubercolosi attiva, e ove non siano presenti controindicazioni anagrafiche o

cliniche, dall'instaurazione della terapia dell'infezione latente, o chemioprolifassi, con isoniazide .

5. Non è ad oggi disponibile dimostrazione che i test sul sangue possano essere affidabili per supportare la diagnosi di TB attiva. Come il test tubercolinico, essi possono peraltro avere un ruolo di supporto nella diagnosi di TB attiva nei pazienti con espettorato batteriologicamente negativo ed una presentazione clinico-radiologica compatibile: documentando la presenza dell'ITBL, il test aumenta la probabilità della diagnosi di tubercolosi e giustifica un approccio diagnostico invasivo ed un tentativo diagnostico ex-adiuvanibus.
6. Per lo screening dell'ITBL, nel caso in cui si usino i test su sangue, valgono le stesse considerazioni applicabili alle procedure basate sul test cutaneo: in particolare, è raccomandato di non attivare programmi di screening in soggetti o gruppi ad alto rischio se non è possibile garantire le procedure per la diagnosi, l'isolamento ed il trattamento della malattia attiva ed il trattamento dell'infezione latente.
7. I test su sangue, non richiedendo il secondo accesso per la lettura del test, consentono una maggiore flessibilità nella gestione dei soggetti con test positivo.
8. Per il corretto impiego dei test su sangue è necessario garantire un adeguato addestramento del personale addetto alle procedure corrette di prelievo, conservazione, trasporto ed incubazione dei campioni, la disponibilità di un laboratorio facilmente raggiungibile e con una massa critica di test sufficiente a garantire l'analisi e la risposta in tempi brevi.
9. Nel caso si valuti di potere adottare i test su sangue è necessario monitorare attentamente i risultati a breve e a lungo termine, i costi e i problemi di gestione.
10. È auspicabile, con il diffondersi dell'uso di queste nuove metodiche, un sostanziale abbattimento dei costi unitari e la soluzione dei problemi tecnici connessi (ad esempio la massa critica dei test, le difficoltà di conservazione dei campioni, le scadenze dei reattivi). È necessario in ogni caso che sia garantita la continuità del supporto finanziario ed organizzativo nel tempo in modo che, dopo avere

implementato una procedura sostitutiva, non si sia costretti ad abbandonarla per problemi finanziari ed organizzativi senza essere più in grado di tornare alla precedente (perdita di organizzazione e di expertise).

### **Possibili strategie per l'applicazione dei nuovi test.**

In mancanza di studi che abbiano documentato il rapporto di costo-efficacia delle varie strategie di applicazione dei nuovi test, nessuna scelta è, al momento, sostenuta di evidenze tali da poter essere raccomandata. Peraltro, data la disponibilità sia del test tubercolinico cutaneo che dei test in vitro basati sul rilascio specifico dell'interferone-gamma, la prevalenza dell'infezione latente nella popolazione in esame rappresenta il fattore chiave nella determinazione del rapporto costo-beneficio delle diverse strategie di screening [42]. Ove la prevalenza dell'infezione latente sia inferiore all'8%, nessuna strategia ha un rapporto costo-beneficio accettabile; ove la prevalenza dell'infezione latente sia superiore all'8%, l'uso del test cutaneo seguito dall'impiego dei test in vitro nei soggetti con test cutaneo positivo appare la più vantaggiosa; infine, ove la prevalenza sia superiore al 40%, l'impiego dei test in vitro appare vantaggioso rispetto alle altre strategie [42].

In considerazione della probabilità che la pubblicazione di documenti di linea guida statunitensi ed europei stimoli l'utilizzo dei nuovi test ed, eventualmente, studi di costo-beneficio, appare ragionevole identificare alcuni possibili scenari operativi sulla base dei dati finora disponibili e della situazione epidemiologica Italiana.

**STRATEGIA "A": USO DEL TEST CUTANEO ED UTILIZZO DEI TEST SU SANGUE SOLAMENTE IN SPECIFICI GRUPPI DI POPOLAZIONE O PAZIENTI CON CONDIZIONI CLINICHE PARTICOLARI.**

Per questa strategia, che ha un rapporto costo-beneficio sfavorevole secondo l'analisi dei modelli britannici, sono da considerare i problemi procedurali connessi con la necessità di richiamare il paziente per un controllo a 48 ore, il rischio per l'operatore di un

test in vivo, la variabilità di esecuzione e di lettura del test oltre ai limiti di sensibilità e di specificità, soprattutto quando si prendano in esame popolazioni provenienti da aree ove la vaccinazione con BCG è diffusamente praticata. Questa strategia ha il vantaggio di essere basata su di una procedura ben nota, largamente sperimentata con tassi di errore conosciuti. Per quanto attiene il minor costo del test cutaneo, ad esse va aggiunto, nei modelli operativi, il costo dell'esame clinico e radiografico dei soggetti falsamente positivi al test cutaneo.

**STRATEGIA "B": UTILIZZO DEI TEST SU SANGUE PER LA CONFERMA DEI TEST CUTANEI POSITIVI O CON RISULTATO NON AFFIDABILE.**

La procedura è considerata dalle linee guida Inglesi NICE quella a miglior rapporto costo-beneficio, almeno in situazioni di prevalenza di ITBL non particolarmente elevata (quali quella Inglese e quella Italiana). Riduce contemporaneamente sia il costo complessivo dei test sia il numero di trattamenti e provvedimenti inutili. Permette di evitare un riesame complessivo degli esposti per una nuova situazione basale essendo sufficiente rivalutare con i test su sangue solo i soggetti con risultato cutaneo positivo o quelli con risultato considerato potenzialmente falsamente negativo (ad esempio immunodepressi). Tuttavia questa strategia è gravata da potenziali problemi metodologici ed organizzativi legati soprattutto al mantenimento in atto di entrambe le metodiche diagnostiche, richiedendo inoltre il sovrapporsi di due tipologie organizzative, l'una basata sui tradizionali servizi di prevenzione, l'altra sul laboratorio.

**STRATEGIA "C": SOSTITUZIONE TOTALE DEL TEST CUTANEO CON I TEST SU SANGUE.**

Questa strategia, che ha un buon rapporto costo-beneficio in situazioni ad elevata prevalenza di ITBL, richiede una riorganizzazione dei servizi di prevenzione della TB, attualmente non orientati al laboratorio. Deve essere tenuto conto degli elevati costi unitari attuali e dell'esigenza di un elevato numero di test per garantire standard di qualità e tempi di risposta accettabili. Si rende inoltre necessario un periodo di uso prolungato per



acquisire confidenza con il test. È necessario ricostruire dall'inizio le situazioni "basali" in caso di osservazioni ripetute su coorti (per esempio gli operatori sanitari in strutture a rischio). In ragione della maggiore specificità è prevedibile un risparmio di interventi diagnostici e di trattamenti inutili.

### **Conclusioni.**

Nella situazione epidemiologica Italiana, la strategia "B" (utilizzo del test tubercolinico cutaneo con successiva conferma dei test cutanei positivi usando i test su sangue) appare quella in generale potenzialmente dotata di un migliore rapporto costo-beneficio. Nei gruppi di popolazione ove si attenda un tasso di positività del test tubercolinico superiore al 40% e nei soggetti immunodepressi, la strategia dotata di miglior rapporto costo-beneficio pare essere, sulla base dei dati finora disponibili, la strategia "C" (sostituzione totale del test cutaneo con i test su sangue). Come il test cutaneo tubercolinico, anche i test su sangue non sono diagnostici di tubercolosi attiva: peraltro essi possono rientrare nel percorso diagnostico dei pazienti con sospetta tubercolosi.

## Bibliografia

1. [www.who.int/tb/publications/2004/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/2004/en/index.html)
2. Small PM, Hopewell PC, Singh SP, *et al.* The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1703-1709.
3. Parrish NM, Dick JD, Bishai WR. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; 6: 107-112.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: (RR-6): 1-5.
5. von Pirquet C. Frequency of tuberculosis in childhood. *JAMA* 1907; 52: 675-678.
6. Wang L, Turner MO, Elwood RK, *et al.* A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurement. *Thorax* 2002; 57: 804-809.
7. Menzies D. Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 15-21
8. Fine PE, Bruce J, Ponnighaus JM, *et al.* Tuberculin sensitivity: conversions and reversions in a rural African population. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 962-975.
9. Johnson JL, Nyole S, Okwera A, *et al.* Uganda-Case western reserve University Research Collaboration. Instability of tuberculin and Candida skin test reactivity in HIV-infected Ugandans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 824-828.
10. Zuber PL, McKenna MT, Binkin NJ, *et al.* Long-term risk tuberculosis among foreign-born persons in the United States. *JAMA* 1997; 278: 304-307.
11. Rose AM, Watson JM, Graham C, *et al.* Tuberculosis at the end of the 20<sup>th</sup> century in England and Wales: results of a national survey in 1998. *Thorax* 2001; 56: 173-179.
12. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. Control and prevention of tuberculosis in the United Kingdom: code of practice 2000. *Thorax* 2000; 55: 887-901.

13. Andersen P, Munk ME, Pollock JM. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1099-1104.
14. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, *et al.* Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *M. tuberculosis* and virulent *M. bovis* and for its absence in *M. bovis* BCG. *Infect Immun* 1996; 64: 116-122.
15. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, *et al.* Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *M. tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1710-1717.
16. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, *et al.* *M. tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrated protein CFP-10. *Microbiology* 1998; 144: 3195-3203.
17. Rothel JS, Andersen P. Diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: is the demise of the Mantoux test imminent? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; 3: 981-993.
18. Lalvani A, Pathan AA, McShane E, *et al.* Rapid detection of *M. tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 824-828.
19. Pathan AA, Wilkinson K, Klenerman P, *et al.* Direct ex vivo analysis of antigen-specific IFN $\gamma$ -secreting CD4 T cells in *M.tuberculosis*-infected individuals: Associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001; 167: 5217-5225.
20. Meier T, Eulenbruch HP, Wrighton-Smith P, *et al.* Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T-SPOT.TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 529-536.
21. Chapman AL, Munkanta M, Wilkinson KA, *et al.* Rapid detection of active and latent tuberculosis infection in HIV-positive individuals by enumeration of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cells. *AIDS* 2002; 16: 2285-2293.
22. Kang YA, Lee WH, Yoon HI, *et al.* Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon- $\gamma$  assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis-burden country. *J Am Med Ass* 2005; 293: 2756-2761.
23. Ravn P, Munk ME, Andersen AB, *et al.* Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 491-496.
24. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, *et al.* Specific detection of tuberculosis infection : an interferon-gamma assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 59-64.

25. Pai M, Gokhale K, Joshi R, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infection in health care workers in rural India: comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin testing. *JAMA* 2005; 293: 2746-2755.
26. Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, *et al.* Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 65-69.
27. Harada N, Mori T, Shishido S, *et al.* Usefulness of a novel diagnostic method of tuberculosis infection. *Kekkaku* 2004; 79: 637-643.
28. Funayama K, Tsujimoto A, Mori M, *et al.* Usefulness of QuantiFERON TB-2G in contact investigation of a tuberculosis outbreak in a university. *Kekkaku* 2005; 80: 527-534.
29. Shams H, Weis SE, Klucar P, *et al.* Enzyme-linked immunospot and tuberculin skin testing to detect latent tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1161-1168.
30. Lalvani A. Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001; 357:2017-2021.
31. Ewer K, Deeks J, Alvarez L, *et al.* Comparison of T-cell based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168-1173.
32. Richeldi L, Ewer K, Losi M, *et al.* T cell-based tracking of multidrug resistant tuberculosis infection after brief exposure. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 288-295.
33. Johnson PD, Stuart RL, Grayson ML, *et al.* Tuberculin purified protein derivative-, MPT-64-, and ESAT-6-stimulated gamma interferon responses in medical students before and after *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and in patients with tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:934-937.
34. Hill PC, Brookes RH, Fox A, *et al.* Large-scale evaluation of enzyme-linked immunospot assay and skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection against a gradient of exposure in The Gambia. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 966-973.
35. Dheda K, Lalvani A, Miller RF, *et al.* Performance of a T-cell-based diagnostic test for tuberculosis infection in HIV-infected individuals is independent of CD4 cell count. *AIDS* 2005; 19: 2038-2041.
36. Dheda K, Udawadia ZF, Huggett JF, *et al.* Utility of the antigen-specific interferon- $\gamma$  assay for the management of tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11: 195-202.
37. Richeldi L, Ewer K, Losi M, *et al.* Early diagnosis of subclinical multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Intern Med* 2004;140: 709-713.

38. Ferrara G, Losi M, Meacci M, *et al.* Routine hospital use of a commercial whole blood interferon-gamma assay for tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 631-635.
39. Matulis G, Juni P, Villiger P, *et al.* Evaluation of a novel whole-blood interferon-gamma assay for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection in patients receiving immunosuppressive therapy. *Proceedings American College of Rheumatologists Meeting*, 2005; Abstract L21.
40. Liebeschuetz S, Bamber S, Ewer K, *et al.* Diagnosis of tuberculosis in South African children with a T-cell-based assay: a prospective cohort study. *Lancet* 2004; 364: 2196-2203.
41. Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, Iademarco MF, Metchock B, Vernon A. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States. *MMWR Recomm Rep* 2005;54(RR-15):49-55.
42. National Collaborating Centre for Chronic Conditions. *Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control*. London: Royal College of Physicians, 2006 ([www.rcplondon.ac.uk](http://www.rcplondon.ac.uk)).