



# XLVII CONGRESSO NAZIONALE AMCLI

10-13 Novembre 2018  
Palacongressi Rimini

Workshop DiaSorin

**DOMENICA 11 NOVEMBRE 2018**

***Tubercolosi, malattia riemergente:  
il contributo del Laboratorio nella  
prevenzione e nella diagnosi dell'infezione***

**LIAISON® QuantiFERON®-TB  
Gold Plus: flessibilità, velocità e  
affidabilità di un nuovo test per la  
diagnosi dell'infezione da  
Tubercolosi Latente**

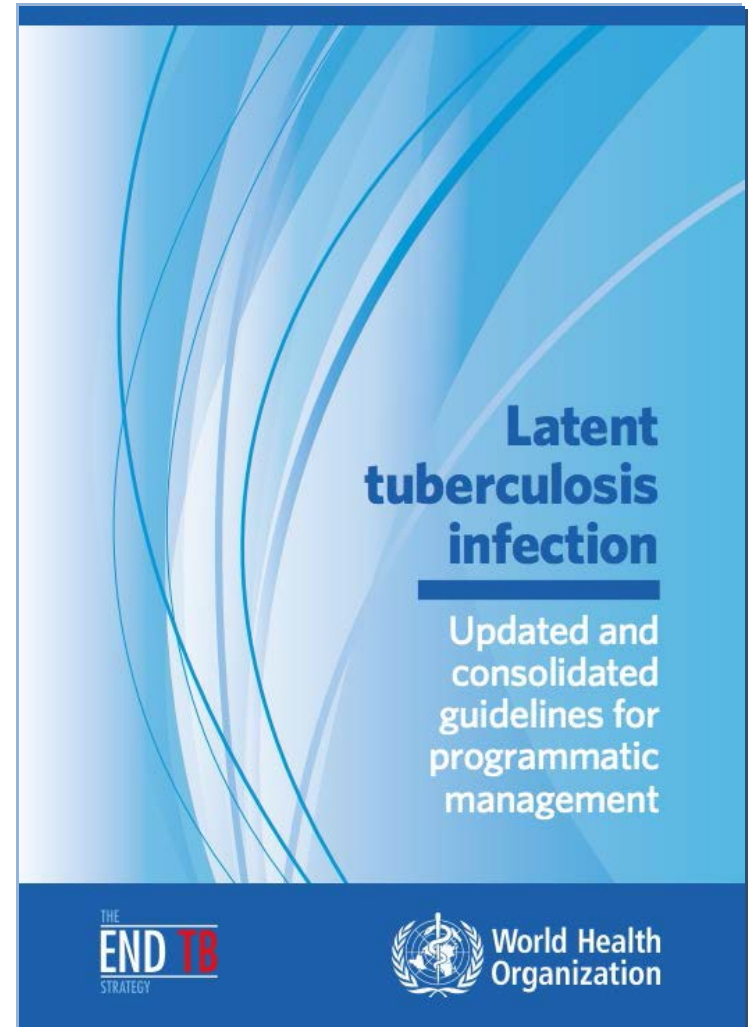
**Claudio Scarparo**  
UOC di Microbiologia  
AULSS 3 Serenissima - Mestre - Venezia

# Latent Tuberculosis Infection (LTBI)

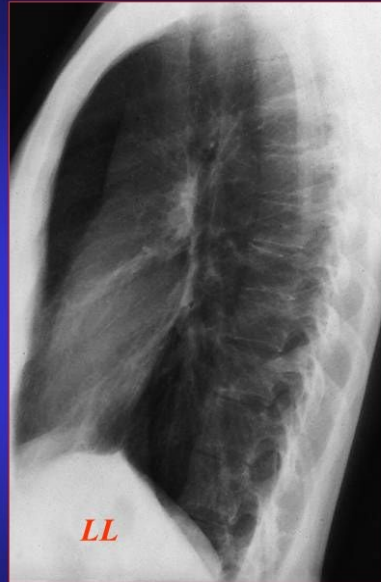
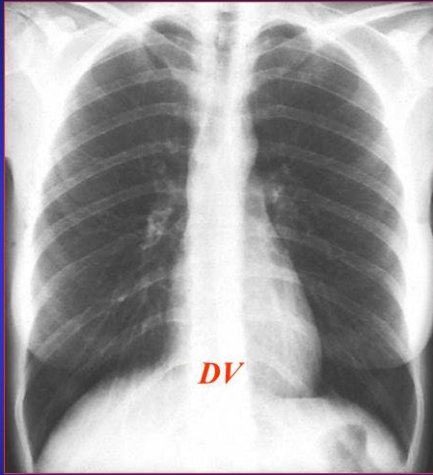
## DEFINITION

Latent tuberculosis infection (LTBI) is defined as a state of persistent immune response to stimulation by *Mycobacterium tuberculosis* antigens with no evidence of clinically manifest active TB.

As there is no “gold standard” test for LTBI, the global burden is not known with certainty; however, up to one third of the world’s population is estimated to be infected with *M. tuberculosis*, and the vast majority have no signs or symptoms of TB disease and are not infectious, although they are at risk for active TB disease and for becoming infectious.



# Latent Tuberculosis Infection (LTBI)



Presence of *M. tuberculosis* organisms (tubercle bacilli) without signs and symptoms or radiographic or bacteriologic evidence of TB disease

and



Evidence of immunological sensitisation to MTB antigens

# RISK FACTORS FOR LATENT TB INFECTION

## **EXPOSURE** (leads to LTBI):

- without exposure there is no risk
- *difficult to identify, difficult to prevent*

## **PROGRESSION** (leads to TB):

- host and environmental factors
- *almost fully preventable*



Risk Factor and Study	Relative Risk (95% CI)
	%
Advanced, untreated HIV infection	
Moss et al. <sup>10</sup>	9.9 (8.7–11)
Pablos-Méndez et al. <sup>16</sup>	9.5 (3.6–25)
Close contact with a person with infectious tuberculosis†	
Ferebee <sup>17</sup>	6.1 (5.5–6.8)
Radiographic evidence of old, healed tuberculosis that was not treated	
Ferebee <sup>17</sup>	5.2 (3.4–8.0)
Treatment with $\geq 15$ mg of prednisone per day‡	
Jick et al. <sup>18</sup>	2.8 (1.7–4.6)
Chronic renal failure	
Pablos-Méndez et al. <sup>16</sup>	2.4 (2.1–2.8)
Treatment with TNF- $\alpha$ inhibitor	
Askling et al. <sup>19</sup>	2.0 (1.1–3.5)
Poorly controlled diabetes	
Pablos-Méndez et al. <sup>16</sup>	1.7 (1.5–2.2)
Weight $\geq 10\%$ below normal	
Palmer et al. <sup>20</sup>	1.6 (1.1–2.2)
Smoking	
Bates et al. <sup>21</sup>	1.5 (1.1–2.2)

Based on *N Engl J Med* 2011; 364: 1441-8

# LIMITATIONS OF THE CURRENT DIAGNOSTIC METHOD FOR LTBI

## *Tuberculin skin test (Mantoux test)*

- Antigenic cross-reactivity of PPD with BCG and environmental mycobacteria: **POOR SPECIFICITY**
- Positive in 75-90% of active TB, not a diagnostic gold standard for LTBI: **SUBOPTIMAL SENSITIVITY**

**Paradoxically**, the skin test is less sensitive exactly in the high-risk groups (e.g. newborns, immunosuppressed)

*Reflected in current guidelines, based on robust (pre-INH) evidence of large Randomized Controlled Trials*

# TUBERCULIN SKIN TEST

## INTRADERMOREAZIONE TUBERCOLINICA SECONDO MANTOUX

### ➤ Reagenti:

- ✓ Iniezione intradermica di 5UI di PPD (Purified Protein Derivative) comunemente presenti in differenti micobatteri (*M. tuberculosis*, *BCG* e *micobatteri non tubercolari*)

### ➤ Variabilità:

- ✓ Riproducibilità del test
- ✓ Soggettività nella lettura del test

### ➤ Logistica

- ✓ Necessità di 2 visite
- ✓ Risultati dopo 3 giorni



***Possibili risultati: ????***

# Candidates for Treatment of Latent Tuberculosis Infection (LTBI)



- Test only persons at high risk for tuberculosis infection.
- Support adherence to ensure successful treatment completion.
- Do not begin LTBI treatment until active TB disease (pulmonary and extrapulmonary) has been ruled out.

Category of Person Tested	Tuberculin Skin Test (TST) Result (induration)				IGRA positive
	< 5 mm	≥ 5 mm	≥ 10 mm	≥ 15 mm	
Child < 5 years of age <b>and recent close contact</b> <sup>2</sup>	Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
HIV-infected <b>and recent close contact</b> <sup>2</sup>	Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
Immunosuppressed <b>and recent close contact</b> <sup>2</sup>	Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
Recent contact of infectious TB case	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
HIV-infected	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
Immunosuppressed or organ transplant recipient	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
Fibrotic changes on chest x-ray (old inactive TB)	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat	Treat
Foreign-born from (or extensive travel to) high-prevalence country <sup>3</sup>	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
Injection drug user	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
Resident/employee of high-risk congregate setting or health care worker <sup>4</sup>	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
Mycobacteria lab personnel <sup>4</sup>	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
High-risk clinical conditions <sup>5</sup>	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
Child < 4 years of age	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
Child or adolescent exposed to high-risk adults	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat	Treat
No risk factors (TB screening discouraged)	Do Not Treat	Do Not Treat	Do Not Treat	Treat	Treat
<b>Pregnancy:</b> Candidates for therapy per criteria in table should be treated during pregnancy if either HIV-infected or recently infected.					

# TUBERCULIN SKIN TEST

## INTRADERMOREAZIONE TUBERCOLINICA SECONDO MANTOUX

### SENSIBILITY

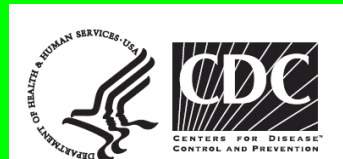
#### False-Negative Reactions

- Cutaneous anergy (*anergy* is the inability to react to skin tests because of a weakened immune system)
- Recent TB infection (within 8-10 weeks of exposure)
- Very old TB infection (many years)
- Very young age (less than 6 months old)
- Recent live-virus vaccination (e.g., measles and smallpox)
- Overwhelming TB disease
- Some viral illnesses (e.g., measles and chicken pox)
- Incorrect method of TST administration
- Incorrect interpretation of reaction

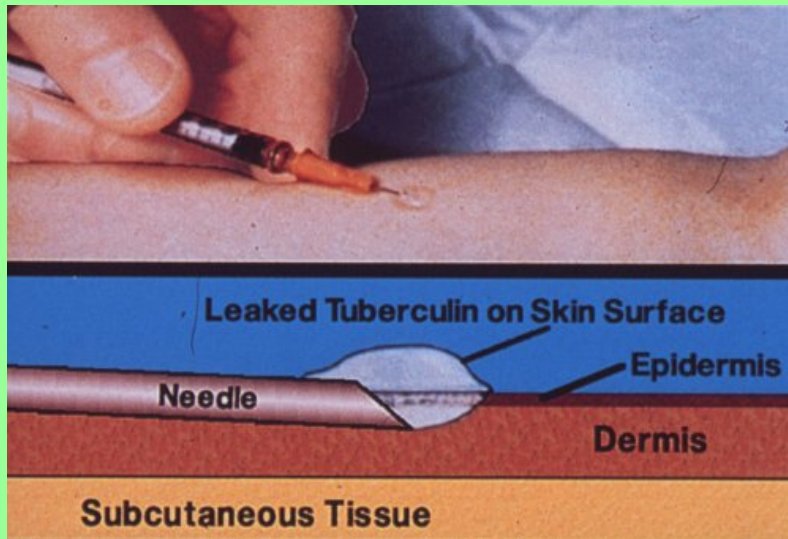
### SPECIFICITY

#### False-Positive Reactions

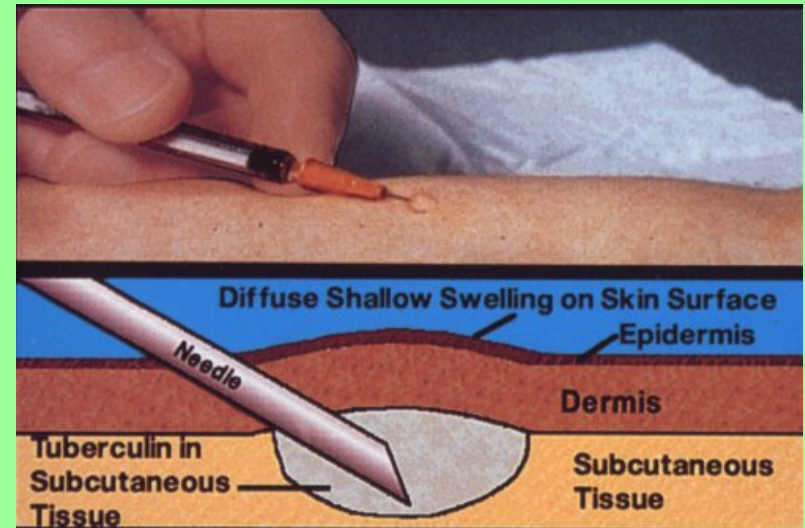
- Infection with nontuberculosis mycobacteria
- Previous BCG vaccination
- Incorrect method of TST administration
- Incorrect interpretation of reaction
- Incorrect bottle of antigen used



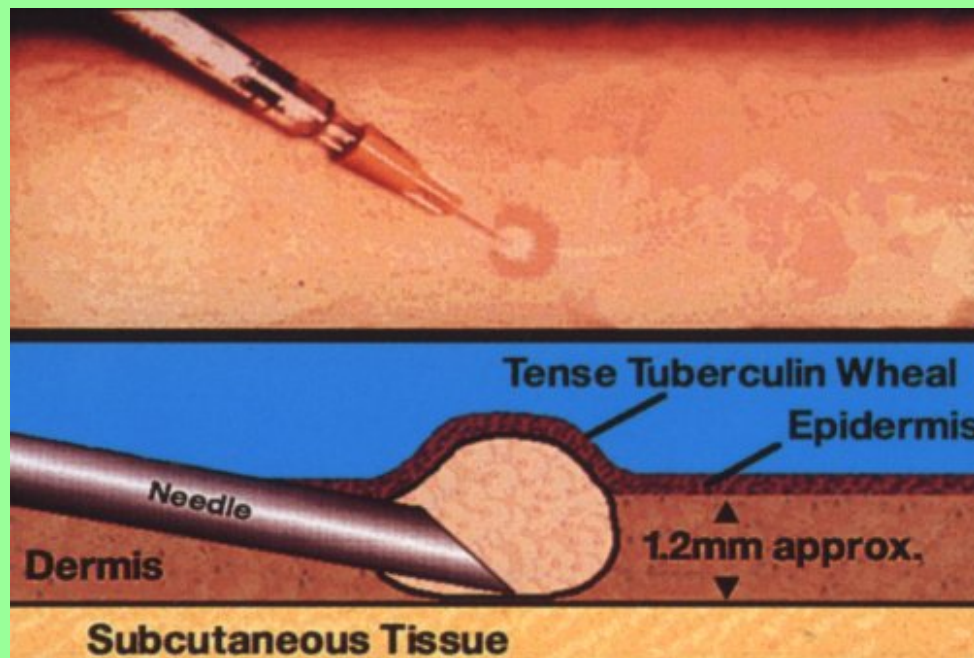
**Needle Too Shallow**



**Needle Too Deep**



**Inserted Properly**



# Effetto della vaccinazione con BCG sul TST

INT J TUBERC LUNG DIS 10(11):1192–1204  
© 2006 The Union

REVIEW ARTICLE

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

M. Farhat,<sup>\*†</sup> C. Greenaway,<sup>\*‡</sup> M. Pai,<sup>\*§</sup> D. Menzies<sup>\*</sup>

- Analisi di 24 studi con N = 240,243 soggetti
- Quando il BCG è somministrato nell'infanzia, 6% falsi-positivi nei risultati del TST a causa del BCG
- Quando il BCG è somministrato dopo l'infanzia, 40% falsi-positivi a causa del BCG

# The Interferon-Gamma Release Assays

**Detect** and **quantify** the amount of IFN- $\gamma$  released by T lymphocytes (mainly CD4+) after in vitro stimulation with M. tuberculosis-specific antigens.

## QuantiFERON-TB Gold In Tube (3G) (Cellestis - QIAGEN, Germany) CE marketed, FDA approved

- 2 (or 3) tubes
- 3 antigens MTB-specific (ESAT-6, CFP10 and TB 7.7) in one tube
- single cut-off at 0.35 IU IFN- $\gamma$  (antigens tube)

Possible results:

- **positive**:  $\geq 0.35$  IU/ml
- **negative**:  $< 0.35$  IU/ml
- **indeterminate**: low PHA response



# The Interferon-Gamma Release Assays

**Detect** and **quantify** the amount of IFN- $\gamma$  released by T lymphocytes (mainly CD4+) after in vitro stimulation with M. tuberculosis-specific antigens.

**T-SPOT.TB** (Oxford Immunotec, UK)

***CE marketed, FDA approved***

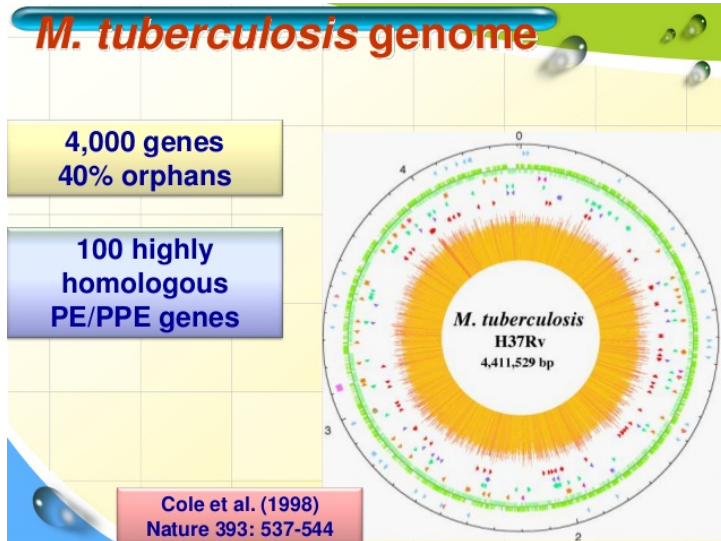
- 96 wells plate
- 2 antigens MTB-specific (ESAT-6 and CFP10) in 2 separate wells
- single cut-off at 6 SFC (any antigen)

Possible results:

- **positive**:  $\geq 6$  SFUs
- **negative**:  $< 6$  SFUs
- **indeterminate**: low PHA response



# Specificity of IGRA



Dipende dalla risposta cellulo-mediata verso proteine codificate nella “Region of Difference 1” del genoma di MTB: ESAT-6, CFP-10, TB 7.7

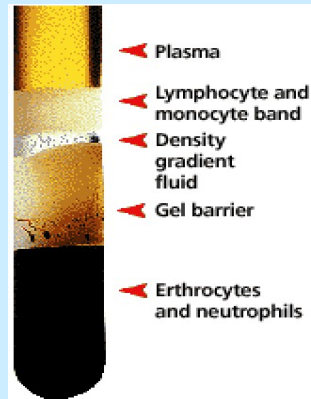
RD1 è assente nel BCG e nella maggior parte dei Micobatteri non tubercolari

Gli antigeni presenti nel QFT-TB Gold-IT evocano principalmente una risposta di tipo CD4+, altamente specifica verso MTB

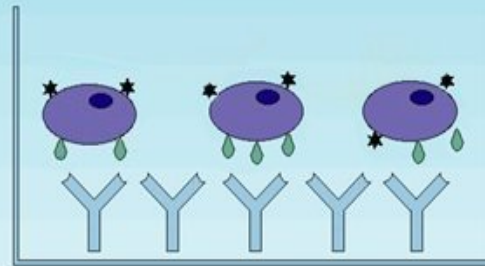
Gli antigeni presenti nel QFT-TB Gold Plus evocano una risposta sia di tipo CD4+ che CD8+, altamente specifica verso MTB

# Species specificity of ESAT-6 and CFP-10

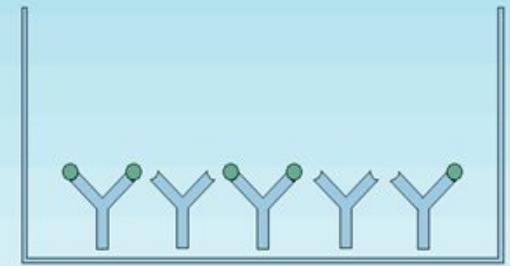
Tuberculosis complex	Antigens		Environmental strains	Antigens	
	ESAT	CFP		ESAT	CFP
<b>M tuberculosis</b>	+	+	M abcessus	-	-
<b>M africanum</b>	+	+	M avium	-	-
<b>M bovis</b>	+	+	M branderi	-	-
BCG substrain			M celatum	-	-
gothenburg	-	-	M chelonae	-	-
moreau	-	-	<b>M flavescens</b>	+	+
tice	-	-	M fortuitum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



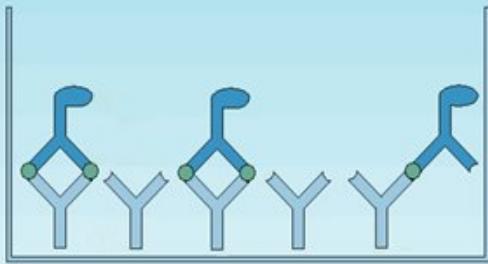
Raccogliere i linfociti usando i tubi vacutainer BD CPT o l'estrazione con Ficoll.



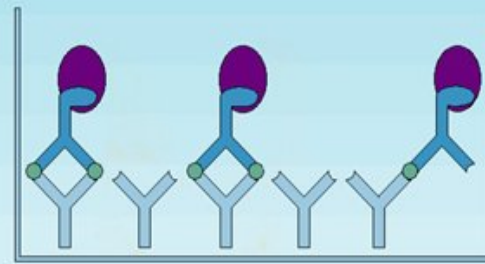
Aggiungere i linfociti e gli antigeni tubercolari ai pozzetti. I linfociti T rilasciano IFN- $\gamma$ .



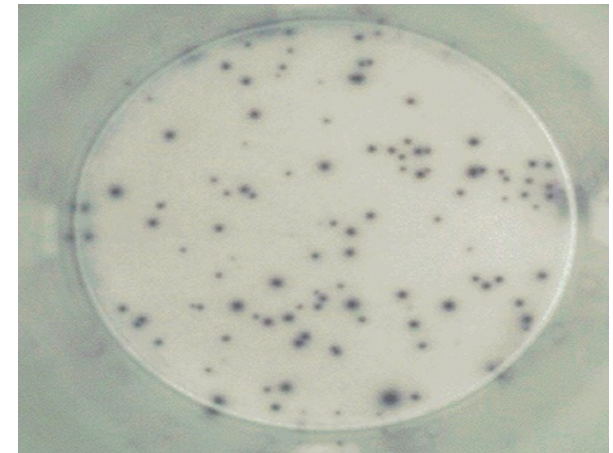
L' IFN- $\gamma$  viene catturato dagli anticorpi.



Incubare, lavare ed aggiungere il coniugato (anticorpi anti IFN- $\gamma$ ).



Aggiungere il substrato e contare gli spot colorati in ciascun pozzetto.



Ciascuno spot costituisce un singolo linfocita T che ha rilasciato IFN- $\gamma$ .

## 1<sup>st</sup> GENERATION:

### QuantiFERON-TB

Approvato FDA nel 2001.

Misura l'immunità cellulo-mediata utilizzando gli stessi stimoli utilizzati per il TST (PPD).



## 2<sup>nd</sup> GENERATION:

### QuantiFERON-TB Gold

Approvato FDA nel 2004.

Versione con antigeni liquidi: antigeni ricombinanti specifici (ESAT 6, CFP 10, TB 7.7) per MTB per misurare immunità cellulo-mediata. Non cross-reattività con BCG.



## 3<sup>rd</sup> GENERATION:

### QuantiFERON-TB Gold In Tube

Approvato FDA nel 2007.

Incubazione con antigeni ricombinanti specifici (ESAT 6, CFP 10, TB 7.7) per MTB avviene direttamente nelle provette utilizzate per il prelievo.



## 4<sup>th</sup> GENERATION:

### QuantiFERON-TB Gold Plus

Approvato FDA nel 2016.

Introduzione della provetta che misura anche l'attività dei linfociti CD8+ (TB2).



# I TUBI

***Nil***

- Controllo negativo del paziente
- Valuta il «rumore di fondo» o il livello di IFN- $\gamma$  non specifico nel campione di sangue

***TB1***

- Contiene antigeni TB altamente specifici: ESAT-6, CFP-10
- I peptidi sono costruiti per stimolare la risposta CMI dei linfociti T helper o CD4+

***TB2***

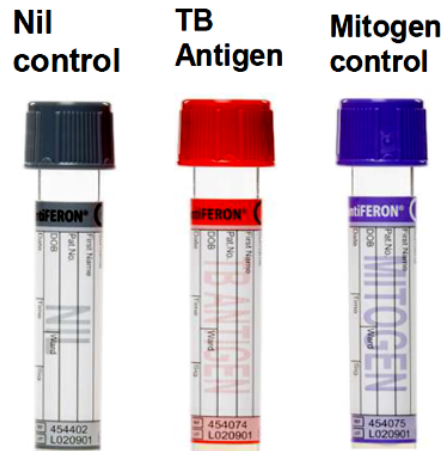
- Contiene antigeni TB altamente specifici: ESAT-6, CFP-10, gli stessi del TB1
- Contiene altri peptidi che inducono una risposta CMI dai linfociti T citotossici o CD8+

***Mit***

- Controllo positivo del paziente
- Valuta la risposta immunitaria del paziente e la correttezza delle fasi di campionamento e/o incubazione del campione



## QuantiFERON® TB Gold In tube



Cells stimulated

none

CD4+  
T-Cells

All

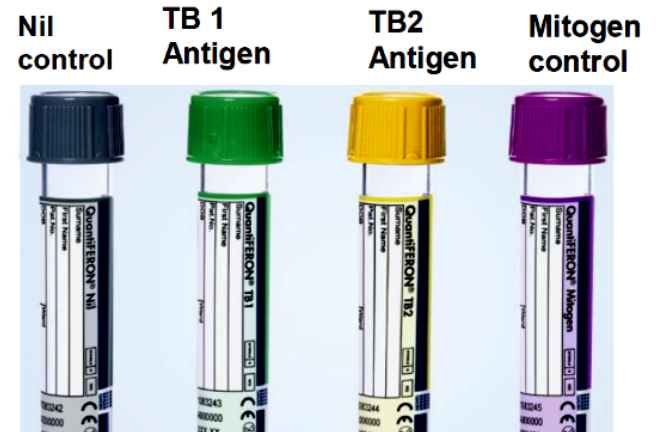
Polypeptide

Antigens

Long peptides  
(MHC class II)

- ESAT-6
- CFP-10
- TB7.7

## QuantiFERON® TB Gold Plus



none

CD4+  
T-Cells

CD4+ and  
CD8+  
T-Cells

All

Long peptides  
(MHC class II)

- ESAT-6
- CFP-10
- TB7.7

Long peptides  
(MHC class II)

- ESAT-6
- CFP-10
- TB7.7

+

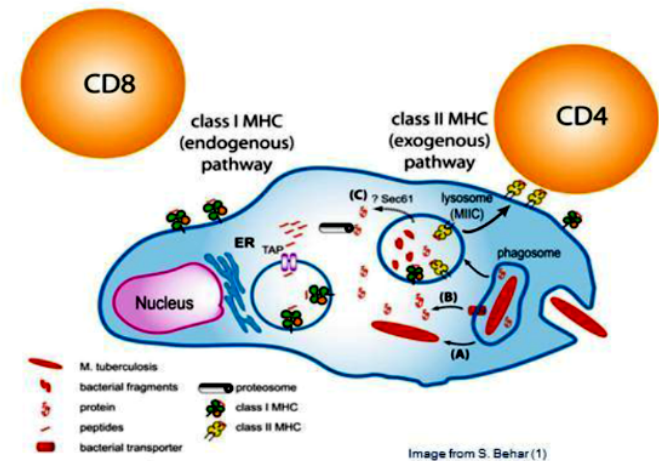
Additional 6 short  
peptides  
(MHC class I)

## CD8+ T cells and role in *TB* immunity:

*MTB*-specific CD8<sup>+</sup> T cells secrete IFN- $\gamma$  and other soluble factors to (1–3):

- Suppress *MTB* growth
- Kill infected cells
- Directly lyse intracellular *MTB*

BIOMARKER for intracellular burden



TB-specific CD8<sup>+</sup> T cells that produce IFN- $\gamma$  have been:

- More frequently detected in those with active TB disease vs. latent infection (4, 5)
- Associated with recent exposure to TB (6)
- Detectable in active TB subjects with HIV co-infection and young children (7, 8)
- Observed to decline when patients are exposed to anti-tuberculosis treatment (9)

**References:** 1. Turner, J. et al. (1996) *Immunology* **87**, 339. 2. Brookes, R.H. et al. (2003) *Eur. J. Immunol.* **33**, 3293. 3. Stenger, S. et al. (1998) *Science* **282**, 121. 4. Day, C.L. et al. (2011) *J. Immunol.* **187**, 2222. 5. Rozot, V. et al. (2013) *Eur. J. Immunol.* **43**, 1568. 6. Nikolova, M. et al. (2013) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 277. 7. Chiacchio, T. et al. (2014) *J. Infect.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2014.06.009>. 8. Lanicioni, C. et al. (2012) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 206. 9. Nyendak M. Et al. (2014) *PLoS ONE* **8**, e81564. Epub.

# La fase preanalitica

# MODALITA' DI PRELIEVO DEL CAMPIONE

- Il prelievo dovrebbe essere effettuato tra 17-25 °C
- I tubi dedicati sono sottovuoto
- I tubi sono validati per contenere da 0.8 a 1.2 ml di sangue
- Il volume di sangue validato è indicato dalle linee nere
- Se il volume di sangue è superiore o inferiore alle indicazioni è necessario un nuovo prelievo
- Il tubo deve rimanere sull'ago per 2-3 secondi dopo che il flusso cessa perché si riempie con relativa lentezza



# MANIPOLAZIONE – TRASPORTO INCUBAZIONE – CENTRIFUGAZIONE



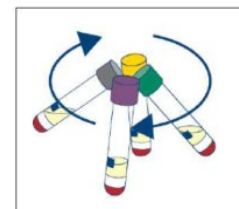
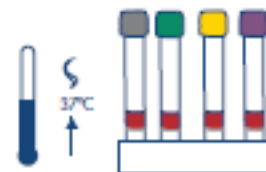
## Agitazione dei tubi

Immediatamente dopo il prelievo invertire 10 volte i tubi per fare aderire il sangue alla superficie interna, in modo da dissolvere gli antigeni presenti



## Incubazione in laboratorio

Agitare nuovamente i tubi 10 volte immediatamente prima dell'incubazione  
Incubare i tubi in posizione verticale a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 16 -24 ore



## Centrifugazione

Centrifugazione dei tubi a 2000 – 3000 g per 15 minuti

## Trasporto

I tubi devono essere trasportati tra  $17-27^{\circ}\text{C}$   
**NON REFRIGERARE**  
I tubi devono essere incubati appena possibile e comunque entro 16 ore

**LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold  
Plus**

# LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus

Calibratore A e  
Calibratore B

Integrale contiene:

- Particelle magnetiche
- Diluente
- Tampone del saggio

Coniugato  
Iiofilo



Tampone per ricostituire  
il coniugato

## Caratteristiche

200 test = 50 pazienti

Stabilità a bordo  
4 settimane

Stabilità calibrazione  
4 settimane

Volume minimo di plasma  
210  $\mu$ L  
(60  $\mu$ L di campione + 150  $\mu$ L  
di volume morto)

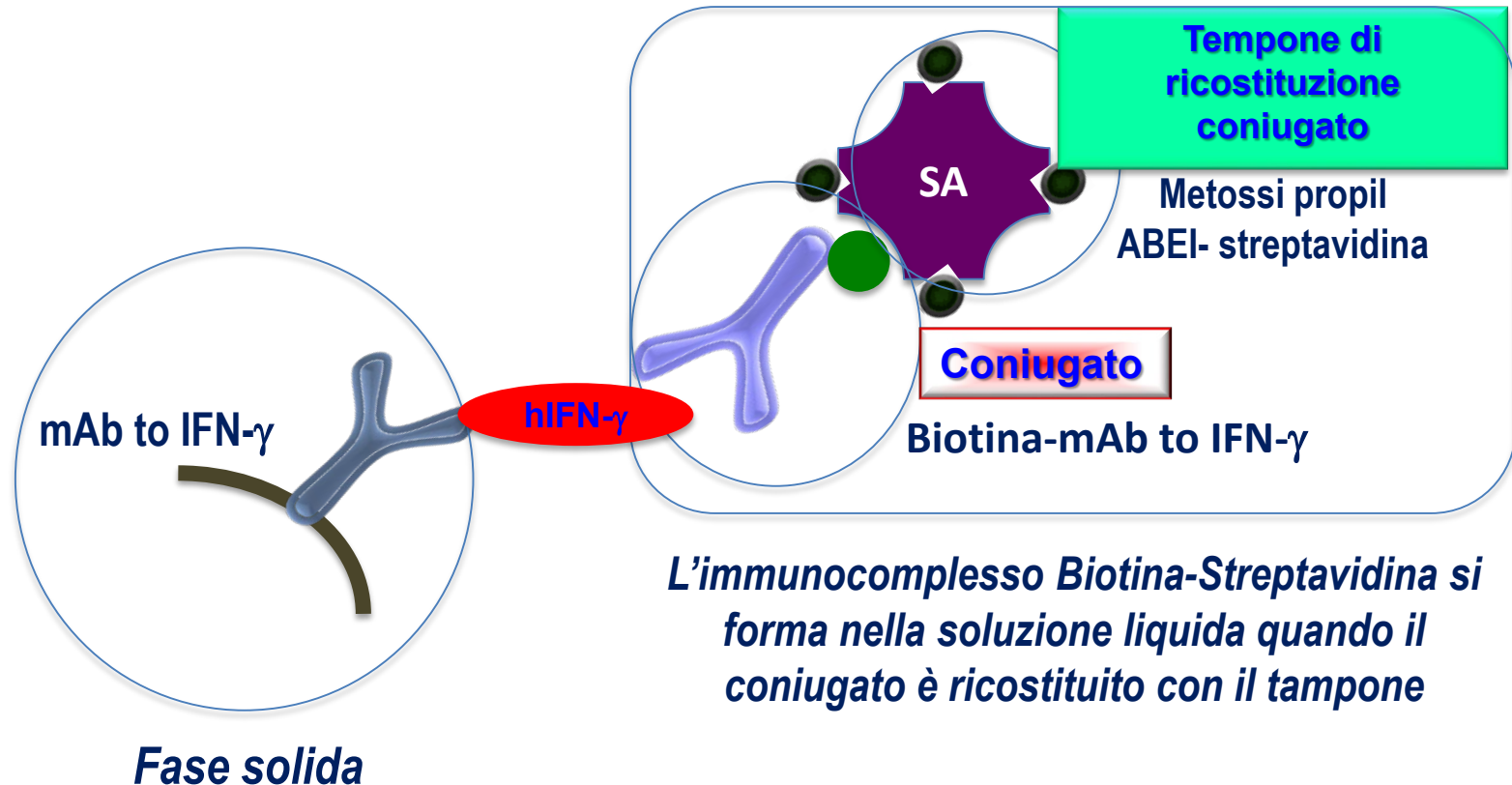
# LIAISON® QuantiFERON®-TB Gold Plus

Controllo basso

Controllo alto



# FORMATO DI SAGGIO



ABEI: molecola di isoluminolo utilizzata nella chemiluminescenza

# CONFRONTO CLIA - ELISA

**Tempistiche più veloci**



**Fase preanalitica**  
**22 pazienti = 88 tubi**



**216**  
**minuti**  
**per avere**  
**i risultati**



**105 minuti**  
**per avere i**  
**risultati**

# CONFRONTO CLIA – ELISA: Random access vs Batch

## Maggior flessibilità

Arrivo in laboratorio  
di 11 pazienti = 44  
tubi  
al giorno,  
5 giorni su 7



ELISA Automatizzata

LUNEDÌ

Non si esegue

Eventuali retest ELISA:

- Sessione successiva
- Tutti e 4 i tubi

MARTEDÌ

Test eseguiti

MERCOLEDÌ

Non si esegue

GIOVEDÌ

Test eseguiti

VENERDÌ

Non si esegue

Calibrazione ogni run



CLIA Automatizzato

Test eseguiti

Eventuali retest CLIA:

- Possono essere eseguiti nello stesso giorno
- Solo i tubi interessati

Test eseguiti

Test eseguiti

Test eseguiti

Test eseguiti

Calibrazione stabile  
4 settimane

# CONFRONTO CLIA – ELISA: Affidabilità del sistema



**ELISA manuale**

**Rischio errore umano  
scambio provette**

**Rischio errore umano  
scambio provette**

**Controlli analitici non  
obbligatori**

**Scarso controllo del  
processo analitico**



**ELISA Automatizzata**

**Lettore codice a barre**

**Rischio errore umano  
gestione reagenti**

**Controlli analitici non  
obbligatori**

**Maggior controllo del  
processo analitico**



**CLIA Automatizzato**

**Lettore codice a barre**

**Completa tracciabilità di  
reagenti e consumabili**

**Controlli analitici  
obbligatori**

**Massimo controllo del  
processo analitico**

# CONFRONTO CLIA – ELISA: Affidabilità del dato

		ELISA		
		positivo	negativo	indeter.
LIAISON XL	positivo	14		
	negativo		109	2
	indeter.			3

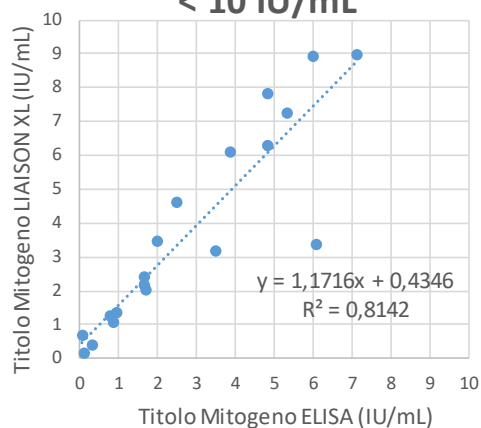


Paziente 1					
	Nil	TB1	TB2	Mitogen	
ELISA	0,02	0,02	0,03	0,09	indeter.
LSN XL	0,0337	0,152	0,143	10	negativo

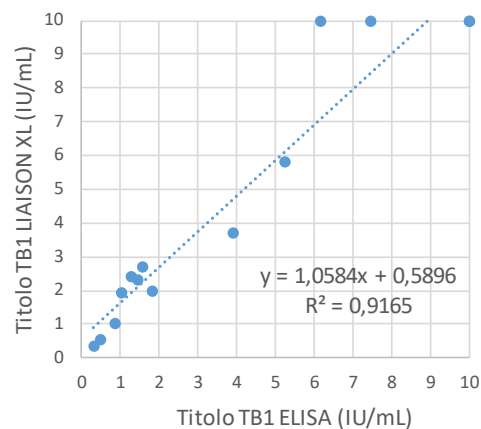
Paziente 2					
	Nil	TB1	TB2	Mitogen	
ELISA - I run	0,03	0,02	0,02	0,02	indeter.
ELISA - II run	0	0,02	0,03	0,045	indeter.
LSN XL	0,0317	0,0349	0,0344	0,679	negativo

# CONFRONTO CLIA – ELISA: Affidabilità del dato

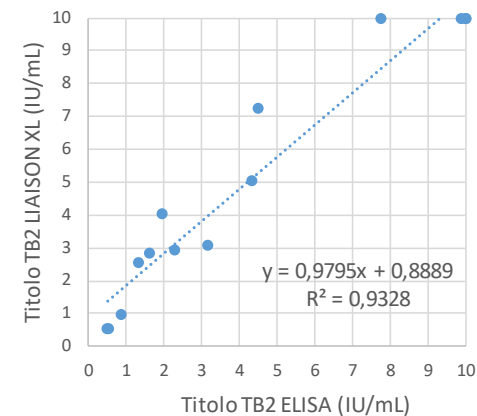
Confronto valori Mitogeno  
< 10 IU/mL



Confronto valori TB1



Confronto valori TB2



**OTTIMA CORRELAZIONE**

# LIAISON<sup>®</sup> QuantiFERON<sup>®</sup> Software (LQS)

# LIAISON® QuantiFERON® Software (LQS)

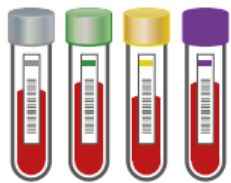


LQS è uno strumento flessibile per il laboratorio che può essere installato tra l'analizzatore LIAISON® XL e il LIS, e permette:

- Check-in dei tubi con lettore codice a barre
- Duplicazione di un solo codice a barre quando necessario
- Trasferire le richieste del LIS allo strumento
- Interpretazione automatica dei risultati
- Gestione retest dei tubi singoli o multipli
- Trasmissione dei risultati al LIS

**CERTIFICATO CE IVD**

# LQS - WORKFLOW INFORMATICO



Loading samples



Loading reagents and consumables



**LIAISON® XL**



4 read-outs



QFT worklist



**LQS**

Combined Patient Report







Host-query

**LIS**



**QuantiferON®-TB Gold Plus Blood Collection Tubes**

-  Nil - Negative Control
-  TB1
-  TB2
-  Mitogen - Positive Control



# XLVII CONGRESSO NAZIONALE AMCLI

10-13 Novembre 2018  
Palacongressi Rimini

