



## Quantiferon-TB Gold Plus: il punto di vista del microbiologo



WORKSHOP DIASORIN  
10 novembre 2019

Dott.ssa Paola Dal Monte  
U.O. Microbiologia  
Policlinico S. Orsola-Malpighi  
Bologna

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi



Ospedale Universitario con  
1,450 posti letto

- Circa 72,000 pazienti ricoverati annualmente
- 8 ICU + Ematologia
- Attività trapiantologica (fegato, cuore, polmone, rene, intestino)

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

SERVIZIO SANITARIO REGIONALE  
EMILIA-ROMAGNA  
Azienda Ospedaliera - Università di Bologna  
Policlinico S. Orsola-Malpighi

**U.O. Microbiologia - S.Orsola-Malpighi**

**Bacino di utenza:**

- ✓ 4 aziende ospedaliere
- ✓ 12 strutture ospedaliere
- ✓ 30 punti prelievo
- ✓ Circa 1 milione di abitanti
- ✓ Area di oltre 3.700 km<sup>2</sup>

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

**QuantiFERON-TB Gold Plus (QFT Plus)**

- ☐ Provetta Nil, controllo negativo
- ☐ Provetta TB1 contenente gli antigeni specifici ESAT-6 e CFP-10 (rimosso TB7.7) per i linfociti T CD4+
- ☐ Provetta TB2 contenente gli antigeni specifici ESAT-6 e CFP-10 per i linfociti T CD4+ e per i linfociti T CD8+
- ☐ Provetta Mitogeno, controllo positivo

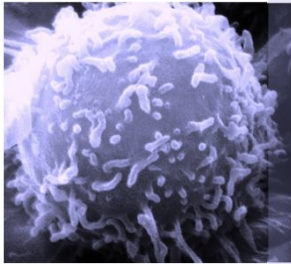
**Contributo dei CD8+: (TB2-TB1)**

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA  
IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## Ruolo dei CD8+ nell'immunità della TB

Linfociti T CD8+ specifici per MTB che producono IFN- $\gamma$  sono:



- Più frequentemente ritrovati in soggetti con TB attiva vs. LTBI (1, 2)
- Contatti recenti hanno una risposta CD8+ più alta rispetto a TB attiva, operatori sanitari, vaccinati (3)
- Ritrovabili anche in soggetti con co-infezione TB/HIV e nei bambini piccoli (4, 5)
- Diminuiscono in corso di terapia anti-tubercolare (6)

1. Day, C.L. et al. (2011) *J. Immunol.* **187**, 2222.
2. Rozot, V. et al. (2013) *Eur. J. Immunol.* **43**, 1568.
3. Nikolova, M. et al. (2013) *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 277.
4. Chicchio, T. et al. (2014) *J. Infect.* doi:10.1016/j.jinf.2014.06.009. Epub
5. Lanicioni, C. et al. (2012) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 206.
6. Nyendak M. Et al. (2014) *PLoS ONE* **8**, e81564. Epub

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## QFT Plus: organizzazione del servizio

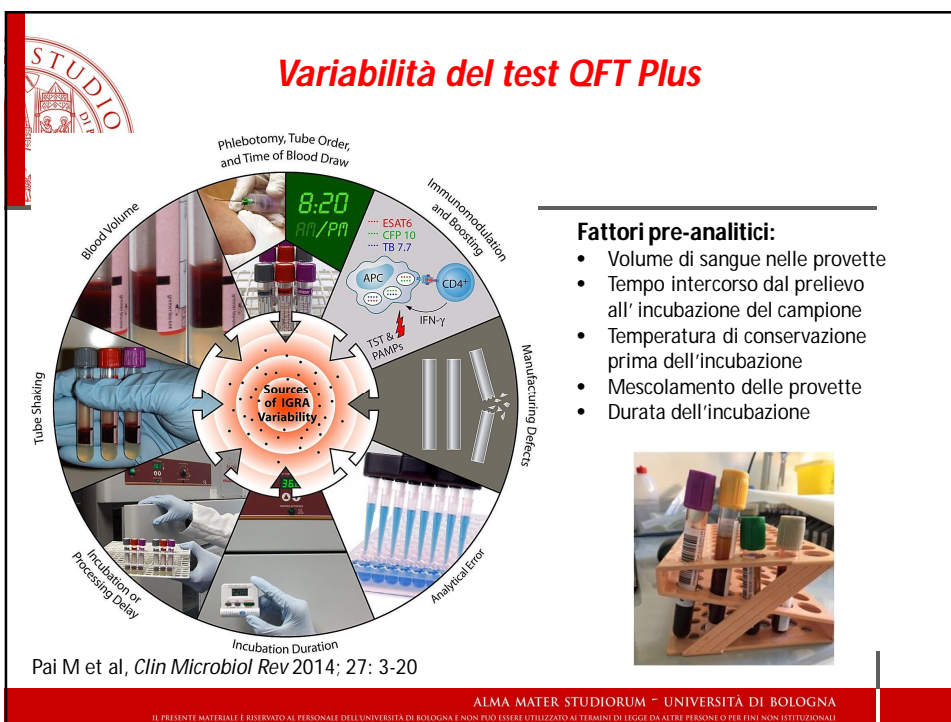
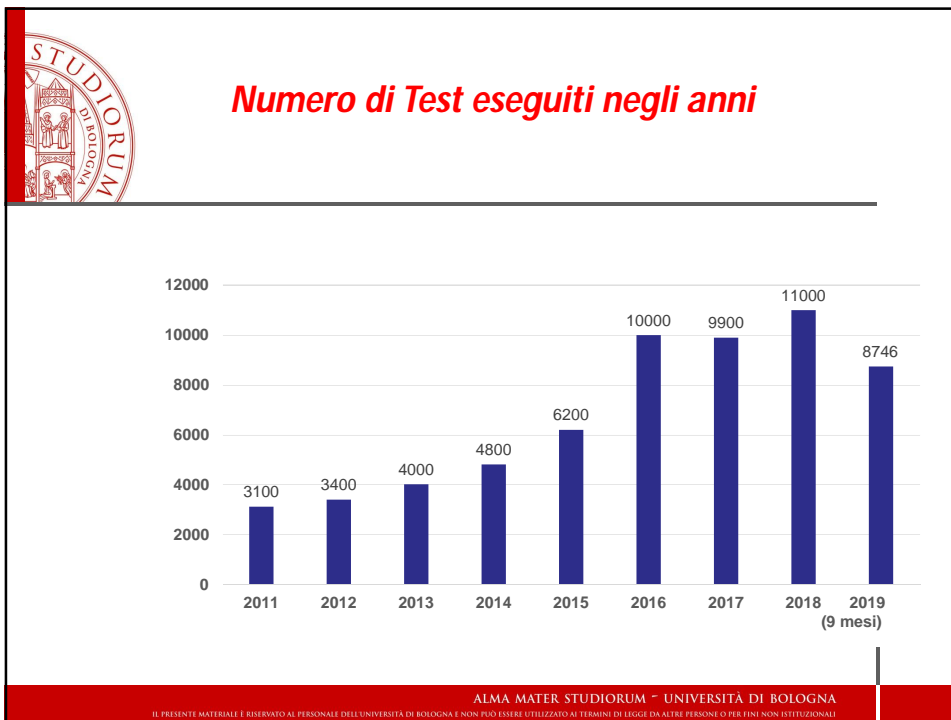
4 aziende Ospedaliere  
12 strutture ospedaliere  
30 Punti prelievo esterni

Organizzazione servizio: lun-ven circa 300 campioni a settimana (circa 14 piastre settimana)

Quante seduta a settimana: 4 (da 3 o 4 piastre)  
Tempi di refertazione: 2-4 gg  
Risorse impiegate: 1 tecnico

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI





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

- **Positivo:** TB1-Nil e/o TB2-Nil  $\geq 0,35$  UI IFN- $\gamma$ /ml
- **Negativo:** TB1 e TB2-Nil  $< 0,35$  UI IFN- $\gamma$ /ml
- **Indeterminato** → bassa risposta al mitogeno PHA (**IND-BAS**)  
Mit-Nil  $< 0,5$  UI IFN- $\gamma$ /ml  
→ elevato Nil ( $>8$  UI IFN- $\gamma$ /ml) (**IND-ALT**)



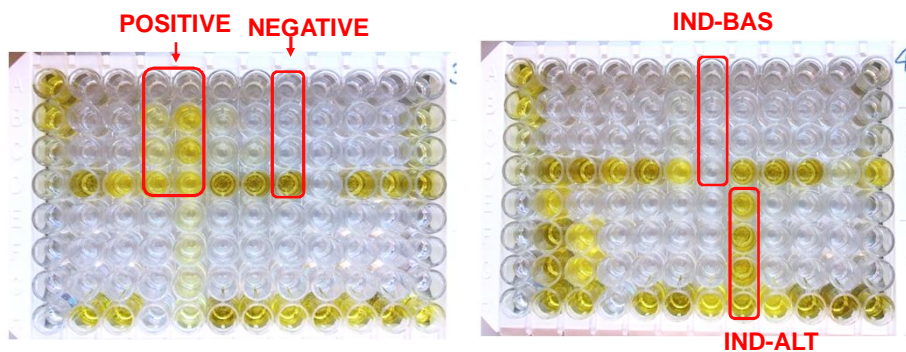
**Zona grigia: 0,20-0,70 UI/ml**

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## **QFT-Plus:** **misurazione IFN- $\gamma$ mediante ELISA**



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI





## Esempi di referti Negativi

[6] Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)

RISULTATO		NEGATIVO		
[6]	Antigeni TB1 (CD4+)	0.0	UI/mL	< 0.35 UI/ml
[6]	Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)	0.0	UI/mL	< 0.35 UI/ml
[6]	Controllo Negativo	0.05	UI/mL	<= 8 UI/ml
[6]	Valutazione Mitogeno	16.13	UI/mL	>= 0.50 UI/ml

[6] Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)

RISULTATO		NEGATIVO		
<i>Attenzione: valore vicino al cutoff. Si consiglia di ripetere il test tra un mese per conferma.</i>				
[6]	Antigeni TB1 (CD4+)	0.21	UI/mL	< 0.35 UI/ml
[6]	Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)	0.25	UI/mL	< 0.35 UI/ml
[6]	Controllo Negativo	0.96	UI/mL	<= 8 UI/ml
[6]	Valutazione Mitogeno	0.57	UI/mL	>= 0.50 UI/ml

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## Esempi di referti Positivi

[6] Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)

RISULTATO		POSITIVO		
[6]	Antigeni TB1 (CD4+)	Valutazione TB2-TB1 non possibile	12.69	UI/mL < 0.35 UI/ml
[6]	Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)	16.21	>10	UI/mL < 0.35 UI/ml
[6]	Controllo Negativo	0.07		UI/mL <= 8 UI/ml
[6]	Valutazione Mitogeno	25.77		UI/mL >= 0.50 UI/ml

[6] Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)

RISULTATO		POSITIVO		
[6]	Antigeni TB1 (CD4+)	Valutazione TB2-TB1 possibile	2.24	UI/mL < 0.35 UI/ml
[6]	Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)	4.21		UI/mL < 0.35 UI/ml
[6]	Controllo Negativo	0.18		UI/mL <= 8 UI/ml
[6]	Valutazione Mitogeno	12.66		UI/mL >= 0.50 UI/ml

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## Esempi di risultato Indeterminato

[6] Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)

RISULTATO

INDETERMINATO

IND-BAS

All'attenzione del medico curante: il risultato indeterminato di questo test potrebbe indicare una insufficiente risposta immunitaria del paziente. Se non noti i motivi di immunodepressione, si consiglia di ripetere il test per conferma.

[6] Antigeni TB1 (CD4+)

0.0

UI/mL

< 0.35 UI/ml

[6] Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)

0.0

UI/mL

< 0.35 UI/ml

[6] Controllo Negativo

0.12

UI/mL

<= 8 UI/ml

[6] Valutazione Mitogeno

-0.01

UI/mL

>= 0.50 UI/ml

Infezione tubercolare (metodica QuantiferonTB-PLUS)		IND-ALT	
RISULTATO	INDETERMINATO		
All'attenzione del medico curante: il risultato indeterminato di questo test potrebbe indicare una attivazione linfocitaria aspecifica. Si prega di contattare il nostro reparto al numero 051-2145293 per approfondimenti.			
Antigeni TB1 (CD4+)	0.05	UI/mL	< 0.35 UI/ml
Antigeni TB2 (CD4+ CD8+)	0.12	UI/mL	< 0.35 UI/ml
Controllo Negativo	0.06	UI/mL	<= 8 UI/ml
Valutazione Mitogeno	0.59	UI/mL	>= 0.50 UI/ml

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI



## QFT-Plus: la nostra esperienza (aprile 2017-giu 2019)

- 20.858 test effettuati
  - 2570 (12,4%) positivi
  - 17.168 (82,3%) negativi
  - 1110 (5,3%) indeterminati
    - 64 casi (5,8%) di IND-ALT

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Concordanza TB1 e TB2

- Totale test determinati: 19.738

- Su 2565 positivi:

- TB1 only: 119 (4,6%)
  - mediana TB1 0,46 UI/ml
  - mediana TB2 0,24 UI/ml
- TB2 only: 176 (6,9%)
  - mediana TB1 0,24 UI/ml
  - mediana TB2 0,45 UI/ml

	TB1+	TB1-
TB2+	2270	176
TB2-	119	17.173

Concordanza TB1 e TB2 = 98,4%



## QFT-PLUS: analisi quantitativa

QFT-PLUS positivi	n.	%	Mediana differenza
TB1=TB2 (>10 UI/ml)	418/2565	16,3%	
TB1>TB2	913/2565	35,5%	0,28 UI/ml
TB2>TB1	1239/2565	48,2%	0,40 UI/ml
$\Delta$ TB2-TB1>0,6 UI/ml	453/2565	17,6%	1,70 UI/ml
TB2 only	176/2565	6,9%	0,45 UI/ml
TB1 e/o TB2 0,2-0,7 UI/ml (zona grigia)	1068/19.738	5,4%	0,025 UI/ml

Secondo le indicazioni  
AMCLI sono da ripetere





## TB1 e/o TB2 0,2-0,7 UI/ml (zona grigia)

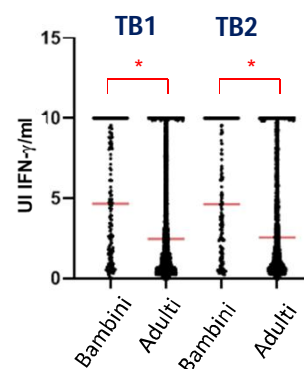
Antigene in zona grigia (0,2-0,7 UI/ml)		n.	%	Mediana differenza (UI/ml)
TB1 eTB2		577/1068	54,0%	0,01
TB1	TB2 <0,2 UI/ml	135/1068	12,6%	0,11
TB1	TB2 >0,7 UI/ml	105/1068	9,8%	0,3
TB2	TB1 <0,2 UI/ml	187/1068	17,5%	0,17
TB2	TB1 >0,7 UI/ml	64/1068	6,0%	0,315

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Qft-Plus positivi ed età (I)

- totale **BAMBINI** POS 172
  - mediana TB1 4,655
  - mediana TB2 4,63
  - TB2 Only 7/172 4,10%
- totale **ADULTI** POS 2398
  - mediana TB1 2,47
  - mediana TB2 2,55
  - TB2 Only 169/2398 7,04%

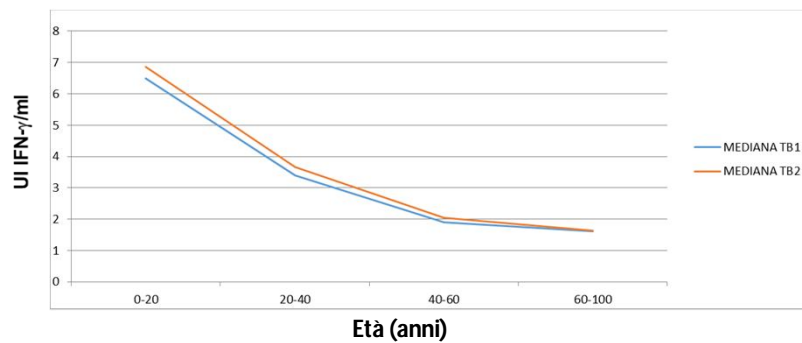


ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Qft-Plus positivi ed età (II)

MEDIANE PER FASCE DI ETÀ*					
	tot	MEDIANA TB1	MEDIANA TB2	TB2 only (n°, %)	TB2-TB1>0.6 (n°, %)
0-20	361	6,5	6,87	15/247 = 6,07%	77/247 = 31,17%
20-40	745	3,39	3,66	45/590 = 7,62%	132/590 = 22,37%
40-60	832	1,91	2,04	66/741 = 8,9%	151/741 = 20,37%
60-100	632	1,605	1,64	52/590 = 8,81%	93/590 = 15,76%



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Qual è il contributo del QFT-Plus nella diagnosi di infezione latente e malattia attiva?

Studio retrospettivo: Aprile 2017 – Novembre 2018



### 322 pazienti con ITL

	ITL	
		Età media $\pm$ DS
TOTALE	322	37,1 $\pm$ 18,2
Femmine	114 (35,4%)	41,4 $\pm$ 17,5
Maschi	208 (64,6%)	34,7 $\pm$ 18,2
Nati in Italia	72 (22,4%)	59,0 $\pm$ 16,0
Nati all'estero	250 (77,6%)	30,8 $\pm$ 13,2



### 169 pazienti con TB attiva, confermati con coltura

	TB	
		Età media $\pm$ DS
TOTALE	169	40,3 $\pm$ 20,3
Femmine	61 (36,1%)	44,3 $\pm$ 22,6
Maschi	108 (63,9%)	38,0 $\pm$ 18,7
Nati in Italia	44 (26,0%)	64,2 $\pm$ 22,3
Nati all'estero	125 (74,0%)	31,9 $\pm$ 10,6

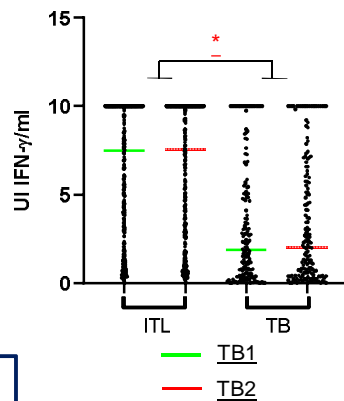
ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Confronto ITL e TB: dati quantitativi

	ITL n= 322	TB attive n= 169	p
NIL	0,12	0,20	0,0009
TB1	7,49	1,87	<0,0001
TB2	7,55	2,03	<0,0001
(TB2-TB1)>0.6	(N=39/200) 19.5%	(N=25/117) 21.4%	ns
TB2 ONLY	5	6	ns

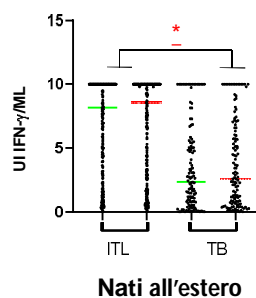
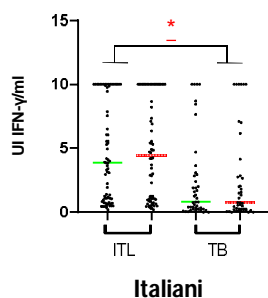
Mediane più elevate sia TB1 che TB2  
nell'Infezione latente rispetto alla malattia



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## ITL e TB: confronto fra Italiani e nati all'estero



Questa differenza si mantiene anche  
dividendo i soggetti per origine

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Qual è il contributo del QFT-Plus nella diagnosi di tubercolosi nel bambino?

- Difficoltà/impossibilità a raccogliere l'espettorato
- Malattia frequentemente paucibacillare (isolamento colturale difficile)
- Sintomi del tutto aspecifici (febbricola, tosse, calo ponderale)
- Bassa sensibilità e specificità dei test diagnostici applicati alla popolazione pediatrica

I bambini soprattutto in età inferiore ai 5 anni sono maggiormente a rischio di **evoluzione** dall'infezione latente alla malattia attiva (40-15%) rispetto all'adulto (5%)  
e di sviluppare **complicanze** della malattia tubercolare quali meningite e disseminazione miliare (20-5%) con alta mortalità e sequele neurologiche

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Sensibilità del QFT-IT: ADULTI vs BAMBINI con TB attiva

Studio multicentrico dal 2007 al 2015  
722 pazienti con tubercolosi attiva polmonare ed extrapolmonare che hanno eseguito il test QuantiFERON-TB

### ADULTI (n: 521)

Positivi: **76,8%**  
Negativi: **18%**  
Indeterminati: 5,2%

SENSIBILITA'  
(rispetto alla coltura)

**81%**

**Lombardi G. et al JCM 2019**

### BAMBINI (n: 201)

Positivi: **95,5%**  
Negativi: **2,5%**  
Indeterminati: 2%

SENSIBILITA'  
(rispetto alla coltura)

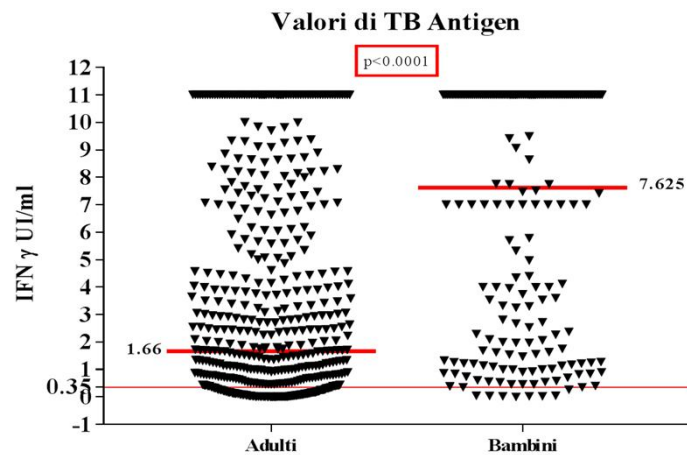
**97,5%**

**P<0.0001**

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## TB-Antigen: ADULTI VS BAMBINI con TB attiva



o Lombardi G. et al JCM 2019

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## QFT-PLUS: ADULTI vs BAMBINI con TB attiva

	Adulti (n. 176)	Bambini (n. 12)
Negativo	34 (19,3%)	0 (13,3%)
Positivo	135 (76,7 %)	12 (100%)
Indeterminato	7 (4%)	0 (0 %)

	Adulti (mediane IFN $\gamma$ UI/ml)	Bambini (mediane IFN $\gamma$ UI/ml)
Nil	0,19	0,22
TB1-Nil	1,87	10
TB2-Nil	2,03	9,19
TB2-TB1>0,6	25/117 (21,4%)	N.E.
TB2 only	6 (3,4%)	1 (8,3%)

$P < 0.0001$

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



### **Riassumendo: Quanto è rilevante ai fini diagnostici la stimolazione dei linfociti CD8+ in aggiunta ai CD4+?**

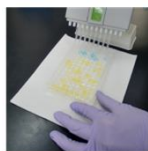
- Concordeza TB1 e TB2 elevata (98,4%)
- Contributo dei CD8+:
  - $\Delta(TB2-TB1) > 0,6$  UI IFN  $\gamma$ /ml : 17,6%
  - TB2 only : 6,9%
- Zona grigia (0,20-0,70 IU IFN  $\gamma$ /ml): 5,4%
- Mediane più elevate sia TB1 che TB2 nell'Infezione latente rispetto alla malattia, anche dopo stratificazione per Paese d'origine
- I valori mediani di IFN-  $\gamma$  sono più elevati nei bambini rispetto agli adulti, anche in caso di TB attiva



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



### **Evoluzione tecnologica**



2006



2011 Plab (ADALTIS)



2017 SKYLAB (DASIT)

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA





## Pazienti testati con **LIAISON® QuantiFERON®- TB Gold Plus**

4 sedute analitiche su strumentazione Liaison® eseguite nelle seguenti date: 19, 20 e 23 settembre e 16 ottobre 2019



197 campioni testati, di cui 20 con campione insufficiente (no test per uno o più tubi)



**177** campioni valutati



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Il confronto: dati qualitativi

		ELISA			
		POS	IND	NEG	
LSN	POS	26		3	29
	IND	2	12		14
	NEG		13	121	134
		28	25	124	<b>177</b>

CONCORDANZA POS	26 vs 28	92,9%
CONCORDANZA IND	12 vs 25	48,0%
CONCORDANZA NEG	121 vs 124	97,6%
CONCORDANZA TOTALE	159 vs 177	89,8%

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## I discordanti

Negative/CUT RIP

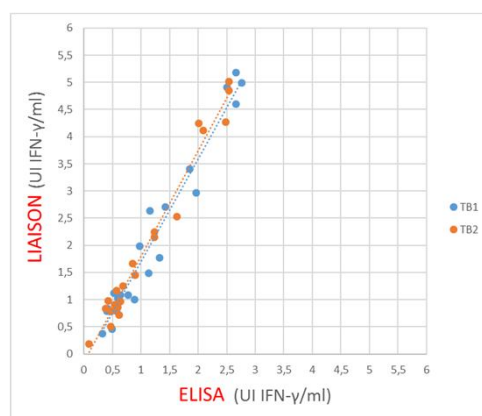
ID campione	ELISA	LSN
64139999	positivo	indeterminato
13235476	positivo	indeterminato
17633571	indeterminato	negativo
17637200	indeterminato	negativo
17589233	indeterminato	negativo
12819322	negativo	positivo
64139996	negativo	positivo
91055640	negativo	positivo
17641418	indeterminato	negativo
64140942	indeterminato	negativo
64141790	indeterminato	negativo
17661544	indeterminato	negativo
17653581	indeterminato	negativo
20261990	indeterminato	negativo
17657740	indeterminato	negativo
17658604	indeterminato	negativo
41691882	indeterminato	negativo
12832667	indeterminato	negativo

IND-ALT

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Il confronto: dati quantitativi



All'interno della fascia di linearità del test, il sistema LIAISON presenta dati quantitativi più elevati dell'ELISA

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Conclusioni prove comparative

- Metodica piu' sensibile:
  - Circa 50% indeterminati in ELISA per basso mitogeno risultano determinati con LIAISON
  - I campioni negativi in ELISA con valori vicino al cut-off che diventano positivi con LIAISON rimangono nella zona grigia ( $< 0,7$  IU IFN  $\gamma$ /ml)
  - Sui campioni positivi, aumentano quelli  $>10$  IU IFN  $\gamma$ /ml per i quali non è possibile fare la valutazione della differenza TB2-TB1
  - I campioni positivi con alti valori di Nil  $> 5$  IU IFN  $\gamma$ /ml in ELISA diventano indeterminati-ALT con LIAISON
  - All'interno della fascia di linearità del test, il sistema LIAISON presenta dati quantitativi piu' elevati dell'ELISA
- Buona concordanza risultati qualitativi:
  - negativi (97,6%)
  - positivi (92,9%)

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



## Grazie per l'attenzione

### UO Microbiologia

Prof.ssa Maria Carla Re

Giulia Lombardi  
Francesco Bisognin  
Caterina Vocale  
Silvia Felici  
Paola Monari  
Eleonora Gatti  
Alessandro De Filippo



### UO Malattie Infettive

Prof. Pier Luigi Viale

Marina Tadolini  
Luciano Attard  
Elisa Vanino

### UO Pediatria

Prof. Marcello Lanari

Ilaria Corsini

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA