

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA AMBIENTALE E SANITÀ

PUBBLICA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN TERRITORIO, AMBIENTE,

RISORSE E SALUTE

INDIRIZZO

MEDICINA AMBIENTALE: NUTRIZIONE E INQUINAMENTO

XXI CICLO

ANALISI DI UNA NUOVA METODICA DI LABORATORIO PER

LO STUDIO DELLA RISPOSTA IMMUNOLOGICA

ALL'INFEZIONE LATENTE DA *MYCOBACTERIUM*

TUBERCULOSIS

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Vasco Boatto

Coordinatore d'Indirizzo e Supervisore: Ch.mo Prof. Bruno Saia

Dottorando: Silvia Fiorio

INDICE

1. ABSTRACT	3
2. ABBREVIAZIONI	4
3. INTRODUZIONE	5
3.1 Epidemiologia della Tubercolosi	5
3.2 La trasmissione del Mycobacterium tuberculosis e la risposta immune	7
3.3 L' infezione tubercolare latente e la malattia attiva	11
3.4 Il test tubercolinico cutaneo	12
3.5 I test immunologici in vitro	16
3.6 Sensibilita' e specificita' nella diagnosi di infezione tubercolare latente	23
3.7 Gli operatori sanitari e ripetizione seriale degli IGRAs	25
4. SCOPO DELLO STUDIO	27
5. STUDIO 1	28
5.1 Soggetti e metodi-	28
5.1.1 Disegno dello studio e popolazione	28
5.1.2 Procedura per il TST	28
5.1.3 Procedura per il test QF-GIT	28
5.1.4 Analisi statistica	31
5.2 Risultati	32
5.3 Discussione e Conclusioni	36
6. STUDIO 2	38
6.1 Soggetti e metodi	38
6.1.1 Disegno dello studio e popolazione	38
6.1.2 Procedura per il test QF-GIT	38
6.1.3 Analisi statistica	41
6.2 Risultati	42
6.3 Discussione	53
6.4 Conclusioni	61
7. RINGRAZIAMENTI	63
8. BIBLIOGRAFIA	64

1. ABSTRACT

Identification and treatment of individuals with latent tuberculosis infection (LTBI) is an important component of tuberculosis elimination strategies in low incidence countries. In this context, health care workers (HCWs) represent an important target population for LTBI screening programmes and serial testing is recommended for HCWs. Interferon-gamma release assays (IGRAs) are alternatives to the tuberculin skin test (TST) and have been recommended for serial testing, but data are scarce on the interpretation of repeated IGRAs results. Existing studies, although limited, suggest that conversions, reversions and non-specific variations occur. However, there is no definitive consensus on how to define and interpret IGRA conversions and reversions.

At Padua Hospital (Italy) we conducted two different studies. In the first, run during 2006, 1715 HCWs were requested to perform both a TST and a blood sample for QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QF-GIT) to compare the effectiveness and qualitative reproducibility of the QF-GIT *versus* TST for screening HCWs for LTBI. In the second investigation, which lasted three years since 2006 and was recently concluded, 530 HCWs were repeatedly screened (three or more times) for LTBI only with QF-GIT. The occurrence of consistently positive (or negative) results and different QF-GIT variations were thoroughly studied, and the variability and reproducibility of quantitative results evaluated. An analysis of association between consistently positive (or negative) results and personal characteristics was also performed, showing that the probability of being affected by LTBI is positively correlated with gender, age and professional qualification. Based on our results, it emerges that the QF-GIT test is reliable, its results are reproducible over time making it a valuable tool in selected populations, such as the HCWs, in surveillance programs and control of LTBI.

Key Words: latent tuberculosis infection; interferon gamma release assay; tuberculin skin test; QuantiFERON-TB Gold In-Tube; reproducibility; serial testing; health care workers.

2. ABBREVIAZIONI

BCG Bacillo di Calmette-Guerin
CDC Centre for Disease Control
CFP10 Colture Filtrate Protein 10
CFUs Colony Forming Units
DPR Decreto del Presidente della Repubblica
CE Comunità Europea
ELISA Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ELISPOT Enzyme-Linked Immunospot
ESAT6 Early Secreted Antigen Target 6
FDA Food and Drug Administration
HIV Human Immunodeficiency Virus
IFN- γ Interferone- γ
IGRAs Interferon Gamma Release Assays
IL Interleuchina
LTBI Latent TB Infection
MDR Multi Drug Resistance
Mt Mycobacterium tuberculosis
PPD Protein Purificate Derivative
QF-GIT QuantiFERON-TB Gold In-Tube
RD Region of Difference
RNI Intermedi reattivi dell'azoto
ROI Intermedi reattivi dell'ossigeno
TB Tubercolosi
TNF Tumor Necrosis Factor
UFC Unità Formanti Colonie
UI Unità Internazionali
WHO World Health Organization;

3. INTRODUZIONE

3.1. Epidemiologia della Tuberculosis

Il WHO nell'ultimo rapporto "*Global Tuberculosis Control 2009*" ha dichiarato che nel 2007 sono stati registrati 9 milioni 270 mila nuovi casi di tubercolosi nel mondo. Sebbene il numero totale di casi incidenti di tubercolosi sia aumentato in termini assoluti rispetto al passato, a causa della crescita della popolazione, il numero pro capite continua lentamente a diminuire di poco meno dell'1% annuo.

La maggior parte dei casi stimati nel 2007 era concentrata in Asia (55%) e in Africa (31%). Minori erano le percentuali riscontrate nella regione Oms del Mediterraneo orientale (6%), nella regione europea (5%) e nella regione delle Americhe (3%)(WHO, 2009).

Secondo il rapporto "*Tuberculosis surveillance in Europe 2007*" dell'European Centre for Disease Prevention and Control e del WHO Europa, nel 2007 sono stati segnalati 477.327 casi di tubercolosi (TB) in Europa: l'equivalente di 55 nuove diagnosi ogni ora. Il tasso di notifica medio è stato di 54 casi su 100.000 abitanti. (European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe, 2009)

I dati per l'Italia provengono dal sistema di notifica dei casi di tubercolosi del Ministero del Lavoro, Salute e Politiche Sociali che costituisce il flusso ufficiale, cui si fa riferimento per il monitoraggio dell'andamento della malattia in Italia.

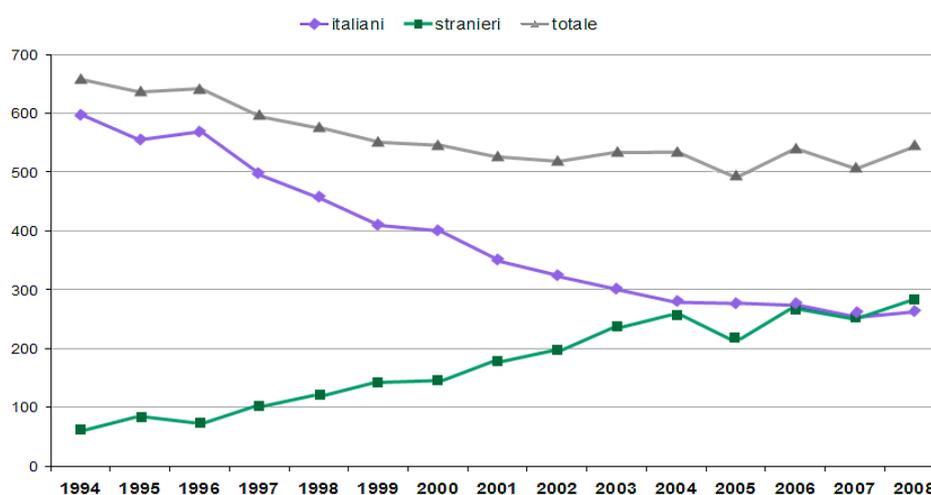
Dalla seconda metà del Novecento agli anni Ottanta si è assistito ad una progressiva riduzione della frequenza della TB nella popolazione italiana, mentre negli ultimi venti anni il trend è stato sostanzialmente stabile. L'attuale situazione epidemiologica della tubercolosi in Italia, analizzata nel rapporto del Ministero del Lavoro, Salute e Politiche Sociali "*Epidemiologia della tubercolosi in Italia (periodo 1995-2007)*" del 29/03/2009, è caratterizzata da una bassa incidenza nella popolazione generale, dalla concentrazione della maggior parte dei casi in alcuni gruppi a

rischio e in alcune classi di età (incidenza più elevata negli ultrasessantacinquenni: 13 casi per 100.000 nel periodo 1995-2007), e dall'emergere dei ceppi tubercolari multiresistenti.

Tra il 1995 e il 2007 l'incidenza della tubercolosi ha registrato un decremento del 19%, passando da 10 casi ogni 100.000 abitanti (1995) a 7,7 casi ogni 100.000 abitanti nel 2007, un tasso leggermente più alto rispetto al 2006 (7,4 per 100.000), che pone l'Italia al di sotto del limite che definisce la classificazione di Paese a bassa prevalenza (10 casi per 100.000 abitanti). (www.ministerosalute.it/malattieInfettive/malattieInfettive.jsp)

Dal rapporto "TB nella Regione Veneto. Dati al 31 dicembre 2009" della Direzione per la Prevenzione della Regione Veneto (www.regione.veneto.it/Servizi+alla+Persona/Sanita/Prevenzione/Malattie+Infettive/Tubercolosi) risulta che l'incidenza della malattia tubercolare nel 2007 si è attestata su 11,3 casi ogni 100.000 abitanti: dal 2002 il tasso di incidenza è rimasto pressoché costante, variando al massimo di una unità per 100.000 abitanti. La andamento della frequenza della TB nella popolazione veneta nel periodo 1994-2008 è evidenziata in Figura 1.

Figura 1: Frequenza della TB nella popolazione Veneta. Anni 1994-2008.



3.2. La trasmissione del *Mycobacterium tuberculosis* e la risposta immune

Dal punto di vista tassonomico i micobatteri appartengono all'ordine degli *Actinomycetales*, alla famiglia delle *Mycobacteriaceae* e al genere *Mycobacterium* (Murray *et al*, 2005).

Tra i vari micobatteri, quelli patogeni per l'uomo sono raggruppati nel *Mycobacterium tuberculosis complex* e comprendono il *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, il *Mycobacterium africanum*, il *Mycobacterium canettii* e il *Mycobacterium microti*. Il *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) è responsabile della maggior parte dei casi di TB umana nel mondo, mentre gli altri micobatteri rivestono sporadicamente un ruolo patogeno per l'uomo.

Il *Mycobacterium tuberculosis* è un microrganismo bastoncellare aerobio obbligato, asporigeno protetto da una membrana cellulare composta da acidi grassi a lunga catena, glicolipidi e altri componenti. Questo robusto involucro da un lato contribuisce alla capacità del *Mycobacterium tuberculosis* di sopravvivere all'interno dei fagociti, dall'altra costituisce una fonte di antigeni glicolipidici in grado di stimolare i T linfociti.

Sebbene la tubercolosi possa potenzialmente manifestarsi in qualsiasi distretto, il polmone rappresenta sia la principale porta di entrata del microrganismo, sia un' importante sede di manifestazione della malattia. La tubercolosi extra-polmonare si sviluppa in meno del 10% dei casi (Kaufmann, 2001)

Il Mt si trasmette quasi esclusivamente per contagio interumano, per via aerea, attraverso goccioline di saliva contenenti doplet nuclei, particelle da 1 a 5 μ immessi nell'ambiente, soprattutto con la tosse dall'individuo affetto da tubercolosi bacillifera polmonare, bronchiale, tracheale o laringea. I bacilli che restano lungamente in sospensione nell'aria dopo l'essiccazione delle goccioline, possono essere inalati dai soggetti sani. Alcuni trattamenti medici o interventi diagnostici possono favorire la produzione di aerosol, così come la manipolazione e la processazione di materiale biologico infetto.

In particolare la trasmissibilità interumana dell'infezione da Mt dipende dai seguenti fattori:

- 1) grado di infettività del paziente-fonte, correlato al numero e alla virulenza del *Mycobacterium tuberculosis*. I soggetti con malattia polmonare cavitaria rappresentano infatti la maggior fonte di esposizione (American Thoracic Society *et al*, 2005);
- 2) tempo di esposizione al paziente con TB contagiosa;
- 3) caratteristiche dell'ambiente in cui si verifica il contatto (dimensioni della stanza, tipo di ventilazione, ecc);
- 4) integrità funzionale del sistema immunitario e da altre variabili biologiche del soggetto esposto (American Thoracic Society, 2000; Flynn and Chan, 2001). I soggetti affetti da HIV o che presentano un deficit dell'immunità cellulo-mediata presentano una maggiore suscettibilità all'infezione rispetto ai soggetti con un sistema immunitario efficiente (Havlir *et al*, 1999).

La prima fase dell'infezione tubercolare si ha quando il Mt raggiunge gli alveoli e viene fagocitato dai macrofagi alveolari. Il *Mycobacterium tuberculosis* è un microrganismo intracellulare che vive generalmente nei macrofagi: è un tipico esempio di patogeno per il quale la risposta immune protettiva è basata sull'immunità cellulo-mediata.

Una volta internalizzato nei fagosomi macrofagici il micobatterio mette in opera il primo meccanismo di immunoevasione. A differenza di altri patogeni, è in grado di bloccare la fusione del fagosoma con il lisosoma (Houben *et al*, 2005). E'infatti in grado di inibire la sfingosinchinasi, enzima macrofagico capace di promuovere l'aumento dei livelli citoplasmatici di calcio, processo necessario per la formazione del fagolisosoma (Kusner, 2005). In tal modo il Mt elude il primo meccanismo di difesa dell'ospite, non viene lisato e rimane libero di replicarsi all'interno dei macrofagi. Le cellule dendritiche contenenti il Mt migrano verso i linfonodi locoregionali dove producono IL-12 ed attivano i linfociti T CD4+ e CD8+ contro gli antigeni micobatterici (Tufariello *et al*, 2003).

I T-linfociti giocano un ruolo fondamentale. I linfociti T CD4+ sono coinvolti nel riconoscimento degli antigeni processati nei fagosomi e

presentati come epitopi sulla superficie dei macrofagi infettati e delle cellule dendritiche, amplificano la risposta immune verso il Mt, soprattutto attraverso la produzione di interferone gamma (IFN- γ) e reclutando altre cellule immunitarie nel sito di flogosi. Altri linfociti sono stati studiati nella TB e sembrano avere un ruolo nel fenomeno di resistenza o tolleranza immunologica. I T-linfociti CD8⁺ influenzano il controllo dell'infezione tubercolare attraverso l'uccisione diretta delle cellule infettate da Mt. Affinchè la risposta macrofagica nei confronti del Mt sia efficace, i linfociti CD8⁺ devono determinare la lisi delle cellule infettate e la produzione di citochine, in particolare IFN γ . In studi recenti è stato dimostrato che i T linfociti CD8⁺ che esprimono perforina e granulicina sono in grado di uccidere direttamente il Mt. La granulicina è responsabile dell'uccisione micobatterica e presumibilmente arriva a contatto con il Mt all'interno dei macrofagi attraverso i pori nella membrana cellulare creati dalla perforina. (Kaufmann, 1999; Stenger *et al*, 1998) Anche i T linfociti γ/δ , anch'essi capaci di produrre IFN γ , svolgono un'azione citotossica per i macrofagi infettati e possono contribuire al contenimento della crescita del Mt, riconoscendo specifiche molecole micobatteriche.

La migrazione dei T-linfociti e dei macrofagi nel sito di infezione, generalmente nel polmone, culmina nella formazione del granuloma. Il granuloma è composto da macrofagi (che possono differenziarsi in macrofagi epitelioidi o cellule giganti multinucleate), da linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, da cellule dendritiche e linfociti B ed ha lo scopo di delimitare la sede di danno. Inoltre ha la funzione di creare un microambiente in grado di facilitare l'interazione dei T linfociti con i macrofagi e le citochine: pertanto rappresenta la prima vera forma di difesa efficace dell'ospite contro il Mt poiché oltre a limitarne la replicazione ne impedisce la disseminazione (Tufariello *et al*, 2003) L'interazione tra macrofagi alveolari e le varie sottopopolazioni linfocitarie attiva i meccanismi di uccisione dei bacilli intracellulari. L'induzione dell'apoptosi delle cellule infettate, la fusione del fagosoma con il lisosoma, la produzione di intermedi reattivi di ossido nitrico (RNI) e di radicali liberi dell'ossigeno (ROI) sembrano essere i

principali meccanismi di resistenza (Schaible *et al*, 1999). In molti casi il granuloma contiene l'infezione, ma una certa quota di micobatteri può comunque sopravvivere passando ad uno stadio di quiescenza in cui persiste in uno stato di attività metabolica molto ridotta che non risente della privazione di sostanze nutrienti e di ossigeno. Durante lo stato di quiescenza, attraverso uno switch metabolico con attivazione del catabolismo lipidico, il Mt può infatti utilizzare come sostanza nutritiva i lipidi di cui è ricco il granuloma caseoso (Kaufmann, 2001). La rapida replicazione dei micobatteri, qualora avvenga, comporta la perdita dell'integrità strutturale del granuloma e lo sviluppo di necrosi e colliquazione con la formazione di cavitazioni nel contesto del parenchima polmonare e la conseguente disseminazione dell'infezione (Figura 2.) con la manifestazione clinica della malattia tubercolare.

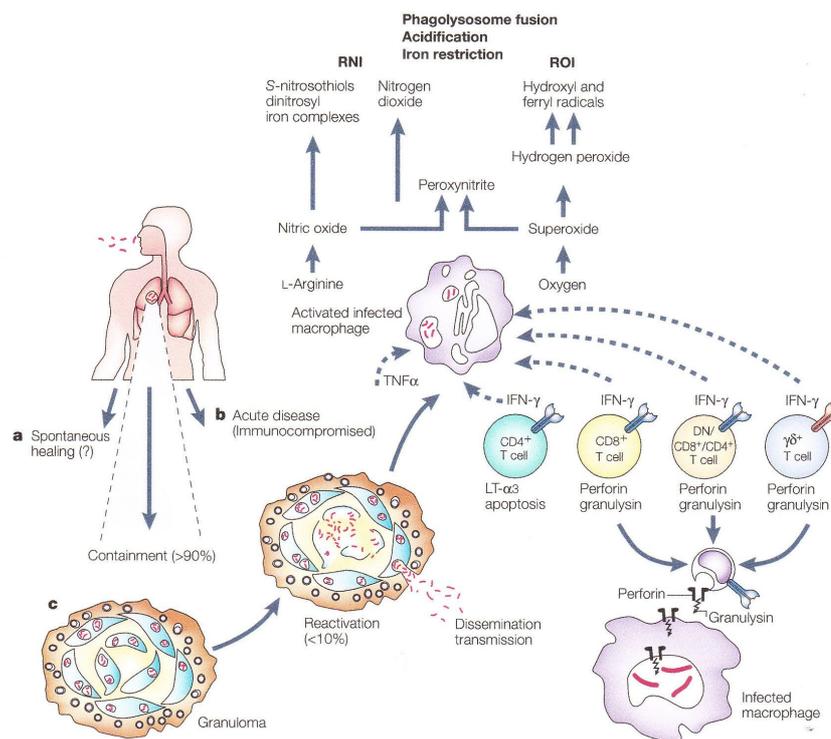


Figura 2. Principali manifestazioni della TB, dall'infezione alla difesa dell'ospite:

- infezione abortiva con guarigione spontanea;
 - malattia acuta che può manifestarsi nei soggetti immunodepressi subito dopo l'infezione tubercolare;
 - contenimento del *Mycobacterium tuberculosis* all'interno del granuloma mentre la malattia si può sviluppare in un secondo momento, quale risultato di una riattivazione (situazione più frequente).
- (da Kaufmann, 2001)

3.3. L'infezione tubercolare latente e la malattia attiva

La tubercolosi (TB) è la patologia infettiva causata nell'uomo principalmente dal *Mycobacterium tuberculosis* che si presenta in due condizioni cliniche, l'infezione tubercolare latente (LTBI) e la malattia attiva (TB attiva), che corrispondono, nella maggior parte dei casi, a due fasi distinte della storia naturale dell'infezione.

Le differenze tra le due condizioni comprendono:

- la quantità di Mt presente nell'organo bersaglio, l'apparato respiratorio (bassa nella LTBI, elevata nella TB attiva);
- la contagiosità (assente nella LTBI, potenziale nella TB attiva);
- la sintomatologia clinica (assente nella LTBI, spesso presente nella TB attiva);
- gli esami microbiologici e radiologici (normali nella LTBI, alterati nella TB attiva).

In seguito ad un contatto con il *Mycobacterium tuberculosis* nel 90% dei casi il sistema immunitario è in grado di contenere l'infezione e l'individuo può rimanere completamente asintomatico e non contagioso anche per tutta la vita. (Tufariello *et al*, 2003).

L'infezione progredisce invece verso la malattia attiva in circa il 10% dei soggetti: il 5% nei primi due anni dopo l'infezione, se non trattata con adeguata terapia preventiva e del 5% nel corso dell'intera vita e diminuirà con il passare del tempo, a meno che non sopraggiungano fattori che indeboliscono il controllo immune del Mt (American Thoracic Society, 2000b; Bloom *et al*, 1992). Negli anni più recenti, il crescente numero di pazienti immunodepressi per varie cause, tra cui l'infezione da HIV, il fisiologico invecchiamento o la concomitanza di altre patologie o terapie (ad esempio la chemioterapia antineoplastica o la terapia con antagonisti recettoriali citochinici (Gardam *et al*, 2003) hanno in parte modificato questo quadro epidemiologico.

La clinica della malattia tubercolare è caratterizzata da sintomi e segni che sono conosciuti ormai da millenni, ma la loro scarsa specificità fa sì che il

sospetto diagnostico, immediato e talora sovrastimato in aree di alta incidenza, sia invece spesso trascurato in ambiti geografici caratterizzati da bassa incidenza. Sintomi di sospetto della malattia, indipendentemente dalla localizzazione, ma in genere più accentuate nelle forme polmonari e disseminate, sono: febbre soprattutto serotina, astenia, calo ponderale.

Il sintomo più comune della TB polmonare è la tosse produttiva e persistente. La tosse non è un sintomo specifico e compare in un ampio spettro di malattie respiratorie. Nei paesi a bassa prevalenza è più verosimile che la tosse persistente sia attribuibile ad altre patologie croniche; tuttavia il sospetto di TB non va tralasciato soprattutto se è presente un'espettorazione purulenta e, a volte, emoftoica, che può essere presente diversi mesi prima di un sospetto diagnostico.

Il gold standard nella diagnosi della malattia tubercolare rimane a tutt'oggi l'esame colturale per micobatteri, eseguito su vari terreni di coltura, solidi o liquidi (American Thoracic Society, 2000a)

La diagnosi precoce e il trattamento della malattia, la diagnosi e il trattamento dell'infezione tubercolare latente costituiscono priorità assolute nei soggetti a rischio in paesi a bassa prevalenza al fine di controllare la diffusione della TB (Jasmer *et al*, 2002; Jensen *et al*, 2005).

3.4. Il test tubercolinico cutaneo

Fino ad alcuni anni fa il test tubercolinico cutaneo (TST), più noto come Test Mantoux, era l'unico test disponibile per la diagnosi di infezione tubercolare latente. Storicamente la nascita del TST viene fatta risalire al 1891, quando Robert Koch osservò che l'inoculazione di un filtrato da brodo di coltura da bacilli tubercolari, la vecchia tubercolina, provocava una tipica reazione febbrile solo nei pazienti affetti da TB. Sebbene l'utilizzo da parte di Koch della tubercolina a fini terapeutici non ebbe il successo sperato, la sua scoperta diede inizio alla diagnostica della TB. La tecnica fu affinata nei vent'anni successivi in modo tale che la reazione conseguente all'inoculazione cutanea o intradermica potesse provocare solo una reazione

cutanea. Il principio su cui si basa il TST dipende dalla reazione in vivo di ipersensibilità nei confronti di componenti antigenici contenuti in estratti di colture filtrate, denominate “tubercoline” dopo inoculazione intradermica quando il soggetto è già venuto a contatto con il Mt, ossia quando si è già instaurata l’infezione tubercolare.

Successivamente la vecchia tubercolina fu sostituita da una versione standardizzata chiamata PPD (Derivato Proteico Purificato) nel 1934, costituita da piccole proteine a basso peso molecolare, polisaccaridi e lipidi (Huebner *et al*, 1993). Nel 1939 il PPD, conosciuto come PPD-S, fu prodotto da Steibert e Glenn: questa formulazione è rimasta la versione standard internazionale di riferimento fino ai nostri giorni (American Thoracic Society, 2000a).

Le raccomandazioni internazionali prevedono che il TST sia somministrato solo con metodo di Mantoux mediante iniezione intradermica di 0,1 ml (5 Unità Internazionali di PPD-Siebert) sulla superficie volare dell’avambraccio con formazione di un pomfo di 6-10 millimetri di diametro e lettura dopo 48-72 ore dall’inoculazione, espressa in diametro di indurimento (American Thoracic Society, 2000a).

L’attuale conoscenza relativa all’utilità del TST deriva in larga misura da una serie di ampi studi in popolazioni ben definite: in soggetti affetti da tubercolosi, soggetti a rischio molto basso di infezione tubercolare latente e nei soggetti contatti stretti di pazienti affetti da tubercolosi attiva. Rieder ha descritto questi studi nel dettaglio (Rieder, 1999).

Sebbene il TST sia stato diffusamente utilizzato per circa cent’anni e sia il test universalmente riconosciuto per la diagnosi di infezione tubercolare latente presenta importanti limiti.

L’infezione da *Mycobacterium tuberculosis* provoca una risposta immunitaria cellulo-mediata ad opera dei T linfociti (sia CD4+ che CD8+) precedentemente venuti a contatto con antigeni micobatterici. In seguito all’iniezione intradermica il PPD provoca una reazione di ipersensibilità ritardata, 48 o 72 ore dopo l’inoculazione, mediata dai T linfociti precedentemente sensibilizzati che si manifesta con la produzione di un

indurimento cutaneo. Il PPD però è costituito da una miscela di circa 200 diversi antigeni, molti dei quali sono presenti oltre che nel *Mycobacterium tuberculosis*, anche nel *Mycobacterium bovis* BCG e in molti altri micobatteri non tubercolari. La cross-reattività antigenica esistente tra PPD, micobatteri non tubercolari e BCG è responsabile di una certa quota di falsi positivi al TST. Questa cross-reattività limita di molto la specificità del TST (Farhat *et al*, 2006).

In più, la sensibilità del TST è ridotta proprio in alcune categorie di soggetti potenzialmente a maggior rischio di sviluppare una TB attiva a seguito di una riattivazione di un'infezione tubercolare. Questo è il caso di pazienti con immunodepressione (in modo particolare l'infezione HIV o in trattamento con farmaci immunosoppressivi) in cui il TST può produrre un risultato falsamente negativo (American Thoracic Society, 2000b).

Altri limiti del TST sono rappresentati dal fatto che è un test in vivo, che necessita di una visita di ritorno per la lettura del risultato. Inoltre sia l'inoculazione che la lettura del test sono operatore-dipendente ed entrambe sono affette da una notevole variabilità (Chaparas *et al*, 1985; Pouchot *et al*, 1997; Menzies, 1999).

In diversi Paesi sono utilizzati diversi cut-off per la lettura del TST. Per superare alcuni limiti del TST, le Linee Guida dell'American Thoracic Society hanno stabilito diversi cut-off per l'interpretazione dell'esito del test, a seconda del livello di rischio di infezione tubercolare o di riattivazione di una precedente infezione (American Thoracic Society, 2000b). Un indurimento ≥ 5 mm è definito positivo nei soggetti ad alto rischio di infezione o riattivazione (ad esempio nei contatti recenti con pazienti affetti da TB attiva o in corso di infezione HIV), un indurimento ≥ 10 mm è definito positivo per i soggetti a rischio medio (ad esempio nei paziente con patologie croniche o nei residenti o lavoratori in strutture residenziali ad alto rischio quali carceri, ospedali e strutture sanitarie, case di riposo), infine un indurimento ≥ 15 mm è considerato positivo nei soggetti non a rischio. Questi cut-off sono quelli più diffusamente utilizzati, anche in Italia

nell'interpretazione dei risultati non considerano l'effetto della pregressa vaccinazione con BCG (Tabella 2).

Tabella 1. Criteri di positività tubercolinica, a seconda del gruppo di rischio (American Thoracic Society, 2000a)

Reazione \geq 5 mm infiltrato	Reazione \geq 10 mm infiltrato	Reazione \geq 15 mm infiltrato
Soggetti HIV positivi	Immigrati di recente (< 5 anni) da paesi ad alta prevalenza di TB	Soggetti senza fattori di rischio per TB
Recente esposizione a casi di tubercolosi (TB)	Tossicodipendenti per via endovenosa	Lavoratori che sono a basso rischio, testati in assunzione
Esiti radiografici fibro (calcifici) di pregressa TB	Residenti e lavoratori in strutture residenziali ad alto rischio: carceri, residenze per anziani, ospedali e strutture sanitarie, residenze per pazienti con AIDS, strutture per indigenti	
Pazienti trapiantati e altri pazienti in terapia immunosoppressiva (in trattamento equivalente a 15 mg prednisone \geq 1 mese)	Personale di laboratori di micobatteriologia	
	Soggetti con condizioni cliniche ad alto rischio: silicosi, diabete mellito, IRC, alcune emopatie (es. leucemie, linfomi), altre neoplasie maligne (es. distretto capo-collo e polmone), perdita di peso > 10% del peso ideale, gastrectomia, bypass digiuno-ileale	
	Neonati e bambini di età < 4 anni e adolescenti esposti a soggetti adulti appartenenti a gruppi ad alto rischio	

Nella maggior parte degli individui la reattività del TST si mantiene per tutta la vita, sebbene la misura dell'intensità della risposta cutanea possa decrescere nel corso del tempo e addirittura scomparire, come nei soggetti portatori di infezione tubercolare acquisita in passato, soggetti con reazioni crociate ad antigeni micobatterici non tubercolari, immigrati provenienti da paesi ad alta prevalenza di TB, anziani e vaccinati con BCG (Menzies, 1999). In soggetti con ridotta reattività cutanea al PPD, la risposta del test iniziale (1° TST) può essere minima o assente, ma la ripetizione di un secondo test con una nuova dose di PPD (2° TST) può stimolare (boost) la

sensibilità di tali individui al test. L'effetto booster, pertanto, è definito come l'incremento della risposta al TST in seguito della ripetizione del test in assenza di una nuova infezione e viene attribuito al richiamo immunologico di una precedente ipersensibilità agli antigeni micobatterici (Menzies, 1999). Tale fenomeno è di particolare rilevanza operativa nei programmi di screening periodico, in quanto l'effetto booster può condurre ad una errata interpretazione delle risposte del TST (Bass *et al*, 1981).

Alla luce di tutte queste problematiche connesse all'utilizzo del TST alla fine degli anni Novanta una linea di ricerca si è orientata allo studio del possibile utilizzo di anticorpi specifici nei confronti del *Mycobacterium tuberculosis* per la diagnosi di LTBI, ma è stato presto abbandonato in quanto è emersa sin da subito una notevole variabilità nel numero e nel tipo di anticorpi che entrano in gioco in corso di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* (Lysashchenko *et al*, 1998).

Malgrado tutti i suoi limiti il TST è rimasto nell'uso clinico per molti anni in quanto non si è riusciti a trovare un valido test alternativo per la diagnosi di infezione tubercolare latente.

3.5. I test immunologici in vitro

Recentemente sono stati sviluppati una nuova generazione di test immunologici rapidi su sangue per la diagnosi di LTBI (IGRAs: Interferon gamma release assays): il QuantiFERON-TB e il QuantiFERON-TB Gold (Cellestis Limited, Carnegie, Victoria, Australia) e il T SPOT-TB (Oxford Immunotec, Oxford, UK), accumulati da alcuni principi fondamentali che li differenziano in maniera sostanziale dal TST (Tabella 1).

Nel 1990 venne applicato per la prima volta un test su sangue che utilizzava il PPD per la ricerca di IFN- γ in risposta a specifici antigeni, allo scopo di diagnosticare la tubercolosi bovina (Wood *et al*, 1990). Successivamente fu introdotto un test immunoenzimatico per il dosaggio di IFN- γ in corso di

tubercolosi bovina, semplificando il test e permettendo un utilizzo più agevole e diffuso del test (Rothel *et al*, 1990). Il test si dimostrò più sensibile e specifico rispetto al test tubercolinico intradermico, pertanto successivamente fu accreditato in Australia per la diagnosi della tubercolosi bovina. Nel 1995 il test fu utilizzato per la prima volta nell'uomo per la diagnosi di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium avium complex* e fu denominato QuantiFERON-TB. Nel 2001 questo test ottenne l'approvazione per l'uso clinico negli Stati Uniti dalla Food and Drug Administration (FDA), quale valido strumento per la diagnosi di LTBI in selezionate condizioni cliniche ed avvalorato dalle Linee Guida dei Centers for Disease Control of Prevention (CDC) di Atalanta (USA) nel dicembre 2002 (Mazurek and Villarino, 2003).

In modo simile al TST il QuantiFERON-TB rilevava l'immunità cellulo-mediata alla tubercolina. A differenza del TST, il sangue intero del soggetto era incubato con il PPD e l'IFN- γ rilasciato dai T-linfociti sensibilizzati era successivamente quantificato con un test ELISA (Mazurek *et al*, 2001). Poiché gli antigeni del PPD sono condivisi con altre specie micobatteri, un test QuantiFERON-TB positivo, così come succedeva per il TST, presentava ridotta specificità per l'infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, in quanto poteva riflettere sia un'infezione da micobatteri non tubercolari, sia l'effetto della vaccinazione con BCG (Black *et al*, 2002).

Per molti anni gli studi hanno fatto emergere la necessità di orientare la ricerca verso l'individuazione di antigeni tubercolari specifici, utilizzabili in questo tipo di diagnostica che potessero discriminare, in particolare, il *Mycobacterium tuberculosis* dal *Mycobacterium bovis* BCG (Andersen *et al*, 1986, Coates *et al*, 1981).

L'identificazione e la caratterizzazione di specifici antigeni del *Mycobacterium tuberculosis* ed epitopi, riconosciuti dai B e T linfociti ha attirato l'attenzione del mondo scientifico ed aperto la strada al miglioramento della specificità del test. Nel 1986 fu identificato il primo antigene Mt specifico denominato MPT64 o noto anche come MPB64 (Harboe *et al*, 1986). Fu dimostrato che dal punto di vista genetico il gene

codificante il MPT64 era assente solo in alcuni ceppi BCG (Li *et al*, 1993), confermando così la specificità di questo antigene. Nel 1995 (Andersen *et al*, 1995) fu scoperta l'esistenza di un antigene bersaglio della risposta immune cellulare alla tubercolosi nel ratto, noto come "early secreted antigenic target 6" (ESAT 6). Successivamente, nel 1998, venne descritto un altro antigene altamente immunogenico denominato "culture filtrate protein 10" (CFP10) (Berthet *et al*, 1998). L'MPT64 è stato molto studiato (Mustafa *et al*, 1998; Roche *et al*, 1996; Elhay *et al*; 1998), ma per il fatto che è presente anche in alcuni ceppi di BCG e che è un bersaglio meno potente della risposta immunitaria, presenta un'utilità limitata nella diagnosi di infezione tubercolare latente (Berthet *et al*, 1998; Mustafa *et al*, 1998).

Gli antigeni ESAT 6 (Berthet *et al*, 1998; Mustafa *et al*, 1998; Ulrichs *et al*, 1998; Harboe *et al*, 1996; Sorensen *et al*, 1995) e CFP10 (Sorensen *et al*, 1995; Dillon *et al*, 2000) si sono dimostrati sin dall'inizio dei potenziali candidati per la diagnosi dell'infezione tubercolare latente.

Un grosso impulso a questa linea di ricerca è stato dato dal sequenziamento completo del genoma del Mt nel 1998 (Cole *et al*, 1998). Studi di genomica comparata hanno permesso di capire che alcune regioni del genoma presenti nel Mt erano invece assenti nel *Mycobacterium bovis* BCG e in alcuni micobatteri non tubercolari, incluso il *Mycobacterium avium*. (Mahairas *et al*, 1996; Philipp *et al*, 1996; Brosch *et al*, 1998; Gordon *et al*, 1999; Behr *et al*, 1999). Questi segmenti genici sono stati denominati regioni di differenza "region of difference" (RD) e le proteine codificate da queste regioni sono state denominate proteine RD. In tempi recenti un certo numero di antigeni RD sono stati studiati per poter allestire dei test diagnostici basati sulla capacità di evocare una risposta cellulare T-mediata e/o umorale. Mahairas *et al* confrontarono il genoma del *M. tuberculosis* e quello del *M. bovis* virulento con quello del BCG. Fu scoperto che nel genoma del BCG risultavano delete tre regioni RD (denominate RD1, RD2, RD3). I geni per ESAT6, CFP10 e MPT64 sono stati ritrovati in queste regioni, in particolare sia ESAT 6 che CFP10 risultavano codificati da RD10 (Mahairas *et al*, 1996).

Sia ESAT 6 che CFP10 sono stati identificati essenzialmente nei micobatteri patogeni: *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* (Mahairas *et al*, 1996; Philipp *et al*, 1996; Brosch *et al*, 1998; Gordon *et al*, 1999; Behr *et al*, 1999) e in quattro micobatteri non tubercolari (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens* e *M. marinum*) (Harboe *et al* 1996; Pollock *et al*, 1997). Di questi micobatteri non tubercolari solo l'infezione da *M. kansasii* ha una presentazione clinica simile al *M. tuberculosis*. Dato che in entrambi i micobatteri vi è la presenza degli antigeni ESAT 6 e CFP10, l'esposizione a *M. kansasii* potrebbe potenzialmente indurre una risposta immune cellulo-mediata indistinguibile dall'infezione latente da *M. tuberculosis*, situazione peraltro rara in quanto rara è l'infezione da *M. kansasii*. Pertanto gli antigeni ESAT 6 e CFP10 codificati da RD1 possono essere praticamente considerati altamente specifici per il *Mycobacterium tuberculosis*.

Nel settembre 2003 la sostituzione nel test QuantiFERON-TB del PPD con gli antigeni RD1, ESAT6 e CFP10, ha dato origine ad un nuovo test più specifico effettuato con metodica ELISA denominato QuantiFERON-TB Gold e dopo certificazione FDA e CE , è diventato un test a supporto della diagnosi di infezione da *Mycobacterium tuberculosis* ed è stato incluso nelle Linee Guida aggiornate dei CDC del dicembre 2005 (Mazurek *et al*, 2005). Da settembre 2004 esiste una nuova versione del QuantiFERON-TB Gold, il QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) che oltre a permettere la raccolta del campione in apposite provette di reazione preriempite con gli antigeni, semplificando le procedure di laboratorio e rendendo il test utilizzabile sul campo in modo più estensivo, presenta un altro antigene il TB7.7 (Rv2654) che si è dimostrato anch'esso specifico per il *Mycobacterium tuberculosis* (Aagaard *et al*, 2004; Brock *et al*, 2004). Il gene per il TB7.7 è stato mappato nella regione RD11 del genoma del *M. tuberculosis*. Così come è stato dimostrato per ESAT-6 e il CFP-10, i peptidi del TB7.7 sono in grado di stimolare i T linfociti dei pazienti affetti da tubercolosi con produzione di IFN- γ (Aagaard *et al*, 2004; Brock *et al*, 2004).

Analogamente al QuantiFERON-TB Gold un altro test su sangue, il T SPOT-TB, utilizza gli antigeni RD1, da cui si differenzia per la diversa metodica, l'ELISPOT, per l'identificazione di cellule CD4+ che producono l'IFN- γ in seguito al contatto con ESAT 6 e CFP10. Questo test è stato sviluppato ad Oxford alla fine degli anni Novanta da Lalvani *et al* (2001a, 2001b) e nasce dall'adattamento della metodica ELISPOT (Enzyme Linked Immunospot). Sia il QuantiFERON-TB Gold che il T SPOT-TB sono test *ex vivo* e sono effettuati su campioni di sangue venoso periferico. Hanno l'importante caratteristica di possedere un controllo interno positivo che li accomuna e che li differenzia dal TST. Un campione ematico viene saggiato con una sostanza in grado di stimolare in modo aspecifico la produzione di l'IFN- γ da parte dei T linfociti (controllo positivo). Questo permette di fornire un'importante informazione per poter interpretare correttamente l'esito dei test immunologici: la negatività al controllo interno permette di identificare quelle situazioni in cui i test non possono essere correttamente interpretati, in quanto viene identificata una situazione di riduzione della funzione dei T linfociti, compromettendo la validità del test. Una possibilità analoga non esiste per il TST.

Entrambe le metodiche rilevano, anche se con tecniche differenti, la produzione di IFN- γ da parte dei T linfociti precedentemente sensibilizzati in risposta ad antigeni tubercolari.

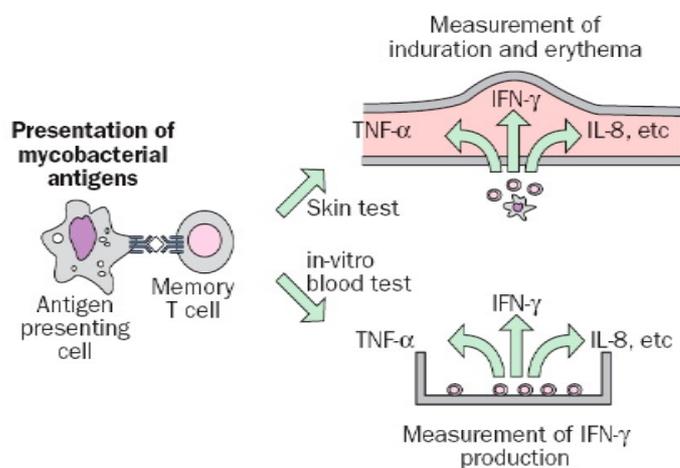
Nel QuantiFERON-TB Gold è utilizzato un campione di sangue intero con una quantità sconosciuta di T linfociti, nel T SPOT-TB sono utilizzate le cellule polimononucleari periferiche. L'esito dei due test è differente: il QuantiFERON-TB Gold misura il livello di IFN- γ nel supernatante di un campione di sangue intero dopo stimolo antigenico, il T SPOT-TB conta i T linfociti che producono IFN- γ dopo incubazione con antigeni tubercolari. Il rilascio di IFN- γ da parte di ciascun linfocita viene identificato da uno spot colorato, per cui ogni spot rappresenta "l'impronta" di un singolo linfocita specifico per quel determinato antigene (Lalvani *et al*, 2001a; Lalvani *et al* 2001b).

Le maggiori differenze tra test QuantiFERON TB Gold e QuantiFERON TB Gold IT, T SPOT-TB e TST sono evidenziate in Tabella 2. I fondamenti biologici del TST e degli IGRAs sono rappresentati in Figura 3.

Tabella 2. Caratteristiche del TST e degli IGRAs (Richeldi, 2006 mod.)

	<i>QuantiFERON TB Gold/ QuantiFERON TB Gold IT</i>	<i>T SPOT-TB</i>	<i>TST</i>
Setting del test	<i>In vitro</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Antigeni	ESAT 6 e CFP 10 ESAT 6, CFP 10 e TB7.7	ESAT 6 e CFP 10	PPD
Cross-reattività con BCG	No	No	Si
Cross-reattività Micobatteri non TB	No	No	Si
Controllo interno positivo	Si	Si	No
Effetto boosting in test ripetuti	No	No	Si
Necessità di visita di ritorno	No	No	Si
Tempi richiesti per il risultato	16-24 h	16-20 h	48-72 h
Interpretazione del test	Oggettivo (instrument-based)	Oggettivo (instrument-based)	Soggettivo (operator-based)
Tipo di risultato del test	Concentrazione sierica di IFN γ prodotto dai T Linfociti, espressa in UI/ml	n. di T linfociti antigene specifici	Millimetri di indurimento
Metodica utilizzata	ELISA	ELISpot	-
Substrato	Sangue intero	Cellule polimorfonucleate	-
Sistema di lettura	Misura dei valori di densità ottica utilizzando un lettore automatizzato	Conteggio del numero di spot utilizzando un lettore automatizzato	Misura diametro indurimento palpabile

Figura 3. Basi biologiche del TST e degli IGRAs. (Andersen *et al*, 2000)



3.6. Sensibilita' e specificita' dei test diagnostici di infezione tubercolare latente

Non è facile dimostrare la superiorità dell'accuratezza diagnostica di un test diagnostico rispetto ad un altro quando, come nel caso dell'infezione tubercolare latente, non esiste un gold standard per la diagnosi.

Questa lacuna è stata parzialmente colmata da alcune approssimazioni metodologiche basate sulla conoscenza della storia naturale della tubercolosi e sulla sua epidemiologia. La conoscenza che la trasmissione per via aerea del *Mycobacterium tuberculosis* è favorita da contatti stretti e prolungati con un caso indice contagioso e dal tempo trascorso nello stesso ambiente confinato è stata utilizzata per generare l'ipotesi che se un nuovo test è un marker migliore di LTBI rispetto al TST, dovrebbe correlare maggiormente con il livello di esposizione ad un caso di TB bacillifera rispetto al test cutaneo.

Inoltre, sebbene sia il TST e sia i nuovi test immunologici non siano nati per diagnosticare la malattia tubercolare attiva, un approccio alternativo per saggiare la sensibilità dei nuovi test è l'analisi della proporzione dei test positivi tra i soggetti con TB attiva confermata microbiologicamente: in questo caso i pazienti affetti da malattia tubercolare non hanno l'infezione tubercolare latente, ma sono infettati per definizione dal *Mycobacterium tuberculosis* e i risultati ottenuti possono essere estrapolati per l'LTBI. L'esito in base a questo approccio potrebbe però essere compromesso dalla presenza di citochine soppressive associate alla condizione di TB attiva (Hirsch *et al*, 1999).

In una recente metanalisi (Pai *et al*, 2008) finalizzata alla stima della sensibilità dei test diagnostici per LTBI sono stati considerati gli studi relativi a pazienti con tubercolosi attiva confermata microbiologicamente e in una metanalisi precedente (Menzies *et al*, 2007) sono stati considerati studi relativi a contatti con un caso bacillifero in cui siano stati chiaramente definiti e distinti i gradienti di esposizione (alta e bassa esposizione ad un caso).

La stima della sensibilità utilizzando la malattia tubercolare come surrogato di LTBI è risultata del 78% (95% CI: 73%-82%) per il QuantiFERON-TB Gold, del 70% (95% CI:63%-78%) per il QuantiFERON-TB Gold In-Tube e del 90% (95% CI:86%-93%) per il T SPOT-TB (Pai M et al, 2008). La sensibilità del TST risultava del 77% (95% CI:71%-82%).

In una metanalisi (Menzies *et al*, 2007) dove è stata stimata la sensibilità dei test utilizzando il gradiente di esposizione come indicatore di probabilità di LTBI, è emersa la criticità riscontrata nell'analisi dei vari studi in quanto ciascun studio risultava aver caratterizzato in modo diverso il tipo di esposizione. Tuttavia l'analisi, pur con questi limiti, ha sostanzialmente evidenziato che la prevalenza di risultati positivi nei soggetti a maggiore esposizione è elevata sia per IGRAs che per TST, ma la prevalenza di risultati positivi nei soggetti a bassa esposizione è maggiore per il TST rispetto agli IGRAs nei soggetti con pregressa vaccinazione con BCG (esiti falsamente positivi).

La specificità può essere stimata dall'analisi della proporzione di test negativi tra i soggetti sani che abbiano una ridotta probabilità di infezione da *Mycobacterium tuberculosis*, poiché considerati a basso rischio. Un limite a questo approccio è però legato al fatto che alcune persone che non hanno fattori di rischio noti potrebbero potenzialmente essere infettate con *Mycobacterium tuberculosis*. In una recente review sistematica (Pai *et al*, 2008) sono stati considerati per la stima della specificità i soggetti in buona salute, residenti per tutto il corso della loro vita in paesi a bassa incidenza di TB, con età inferiore ai 40 anni, con un'anamnesi lavorativa e personale negativa per esposizione a TB. La specificità è risultata essere in questa categoria di soggetti del 98% complessivamente negli studi relativi al QuantiFERON-TB Gold (95% CI: 96%-99%): in particolare del 99% (95% CI: 98%-100%) nei soggetti non vaccinati con BCG e del 96% (95% CI: 94%-98%) nei soggetti vaccinati con BCG. La specificità del T SPOT-TB/ELISpot, senza distinzione tra BCG vaccinati o non, risultava complessivamente del 93% (95% CI: 86%-100%). La specificità del TST risultava elevata, pari del 97% (95% CI: 95%-99%) nei soggetti non

vaccinati con BCG, mentre nella popolazione BCG vaccinata la specificità risultava molto bassa, con i risultati estremamente eterogenei e variabili nei vari studi considerati (Pai *et al*, 2008).

Una elevata specificità dei test IGRAs permette di eliminare i test falsamente positivi nei soggetti BCG vaccinati, permettendo di risparmiare i costi relativi ad una chemiopprofilassi non necessaria e la sua associata tossicità. Inoltre l'elevata sensibilità permette di identificare un più alto numero di soggetti falsamente negativi al TST. Più risultati veri positivi nei soggetti con LTBI permette di incrementare il numero di vere diagnosi e di trattamenti proprio nei soggetti più vulnerabili prima della progressione verso la TB attiva.

3.7. Gli operatori sanitari e la ripetizione seriale degli IGRAs

La trasmissione del *Mycobacterium tuberculosis* costituisce un importante rischio lavorativo specifico per gli operatori sanitari. Il rischio di trasmissione dal malato con TB attiva agli altri pazienti e agli operatori sanitari è noto da molti anni (Fennelly and Iseman, 1999; Sepkowitz, 1994). L'entità del rischio varia dall'ambito lavorativo, dalla prevalenza di TB nella comunità, dalla tipologia di pazienti assistiti e dall'efficacia delle misure di prevenzione e di controllo dell'esposizione attuate. In ambiente sanitario la trasmissione del Mt contenuto in aerosol è stato correlato positivamente con il contatto stretto con pazienti affetti da TB durante alcune procedure quali broncoscopia e intubazione endotracheale, irrigazione di ascessi tubercolari, autopsie, induzioni espettorato e le manovre atte ad indurre tosse, come quelle di ventilazione meccanica e fisiochinesiterapia respiratoria (Jensen *et al*, 2005).

Lo screening periodico degli operatori sanitari per l'infezione tubercolare latente costituisce un'importante componente dei programmi di controllo dell'infezione (Jensen *et al*, 2005).

I noti limiti del TST, in particolare relativi al fenomeno boosting, alle conversioni e alle reversioni che si possono evidenziare, lo rendono un test problematico nell'utilizzo nelle ripetizioni seriali (Menzies, 1999). Altra situazione problematica è la falsa positività del TST dovuta alla pregressa vaccinazione con BCG, obbligatoria in Italia fino all'anno 2001 per tutti gli operatori sanitari cutinegativi, in base alla Legge n. 1008 del 14 dicembre 1970. Il successivo DPR n. 465 del 7 novembre 2001, ancora in vigore, ha di fatto limitato l'obbligo vaccinale solo a quelle rare situazioni in cui gli operatori, con test tubercolinico negativo, lavorino in ambienti sanitari ad alto rischio di esposizione a ceppi multifarmacoresistenti (MDR) e alle situazioni, altrettanto rare, in cui il rischio di trasmissione occupazionale sia alto e l'operatore sanitario non possa ricorrere alla chemioprophilassi per controindicazioni cliniche all'uso di farmaci specifici.

I test su sangue basati sul rilascio di IFN γ hanno numerose caratteristiche che li rendono dei test ideali nelle ripetizioni seriali: sono più specifici del TST, non cross-reagiscono con il BCG, possono essere ripetuti senza sensibilizzare il soggetto e senza evocare il fenomeno boosting, riducono la necessità di visite ripetute per la lettura del risultato in vivo,

Sebbene il test QuantiFERON-TB Gold sia raccomandato nei test seriali (Mazurek *et al*, 2005; Jensen *et al*, 2005), attualmente vi sono pochi studi a supporto di questa pratica. Vi sono dati limitati relativi alla modificazione del test imputabile all'errore intrinseco del test o alla variazione dello stato biologico dell'individuo (riproducibilità del test).

Finora la riproducibilità dei risultati degli IGRAs è stata approfondita, seppure con pochi studi, solo relativamente al test QF-GIT, grazie alla maggiore versatilità di questo test rispetto al T-SPOT TB che ne permette l'utilizzo in numerosi e diversi contesti di indagine. Tra i limitati studi disponibili solo 2 hanno avuto come oggetto gli operatori sanitari (Veerapathran *et al*, 2008, Pai M *et al*, 2006). L'approccio delle prime indagini relative all'analisi del livello di riproducibilità del risultato IGRAs è stato basato sul confronto degli esiti di questi test con quelli ottenuti nello

stesso contesto con il TST, cercando di valutare il livello di agreement tra i due test.

Attualmente un importante filone di interesse scientifico è orientato all'analisi della variabilità del dato quantitativo del QF-GIT espresso in UI/ml e dei possibili fattori che possono influenzare l'esito del test: sia le problematiche di tipo tecnico-procedurali sia la variabilità biologica della risposta individuale (Veerapathhran *et al*, 2008; Perry *et al*, 2008).

A fronte di alcuni risultati discordanti del QF-GIT, che ha peraltro riguardato solo in una piccola quota di soggetti indagati negli studi disponibili, un ulteriore filone di interesse e di indagine, spesso parallelo al precedente, riguarda l'analisi dei soggetti con conversioni, reversioni e alterazioni specifiche del test al fine sia di comprenderne meglio l'origine, l'andamento e la prognosi (Andersen *et al*, 2007) sia di trovare un consenso in merito alla definizione di queste situazioni, che attualmente non esiste (Pai *et al*, 2009; Veerapathhran *et al*, 2008; Perry *et al*, 2008).

4. SCOPO DELLO STUDIO

Lo studio ha coinvolto una popolazione di operatori sanitari di una struttura ospedaliera pubblica di Padova ed è stato sviluppato secondo due filoni di indagine distinti.

Il primo (denominato Studio 1) ha avuto come obiettivi il confronto di performance e di riproducibilità del risultato qualitativo tra il QuantiFERON-TB Gold in Tube (QF-GIT) e il test tubercolinico cutaneo (TST) nella diagnosi di infezione tubercolare latente (ITBL) negli operatori sanitari e la valutazione del grado di compliance di questi soggetti ai programmi di screening in base al tipo di test diagnostico utilizzato.

Il secondo (denominato Studio 2) ha avuto come obiettivi l'analisi della riproducibilità del risultato quantitativo del QF-GIT nelle ripetizioni seriali e l'analisi delle variazioni osservate (in particolare conversioni, reversioni e variazioni aspecifiche del test). Allo scopo sono state formulate 2 ipotesi di lavoro che abbiamo cercato di verificare nella popolazione oggetto di studio:

1. il test QF-GIT è accurato e affidabile: dosa in modo preciso e riproducibile la quantità di IFN- γ prodotto dai T-linfociti del sangue periferico del soggetto;
2. la produzione di IFN- γ a seguito di ITBL non è di tipo OFF-ON, ma la sua entità è proporzionale allo stato del sistema immunitario nei confronti dell'ITBL.

Abbiamo voluto inoltre verificare se nella nostra popolazione di operatori sanitari era possibile correlare i risultati stabilmente positivi o stabilmente negativi del QF-GIT ad alcune variabili individuali (sesso, età, qualifica professionale).

5. STUDIO 1

5.1. Soggetti e metodi

5.1.1. Disegno dello studio e popolazione

Lo studio è stato condotto nel periodo 1 settembre 2006- 30 settembre 2007. Ha coinvolto 1715 operatori sanitari di una grande struttura ospedaliera di Padova che sono stati invitati ad effettuare sia TST che un prelievo ematico per l'effettuazione del QF-GIT.

5.1.2.Procedura del TST

Il TST è stato effettuato da personale addestrato secondo il protocollo standard internazionale: 5 UI di Derivato Proteico Purificato (PPD) sono state iniettate per via intradermica con lettura del risultato dopo 48-72 ore dall'inoculazione e misura in millimetri del diametro dell'indurimento.

Il TST è stato definito negativo se l'indurimento rilevato è risultato assente o inferiore ai 5 millimetri dopo 48-72 ore dall'inoculazione, viceversa è stato definito positivo se l'indurimento rilevato è risultato maggiore o uguale ai 5 millimetri.

Nei test seriali ciascun TST è stato confrontato con l'esito dello stesso test effettuato in controlli precedenti. La conversione del TST è stata definita come un aumento di 6 millimetri di diametro dell'indurimento rispetto al valore del TST precedente. La reversione del TST è stata definita come una riduzione di 6 millimetri del diametro di indurimento rispetto al valore del TST precedente.

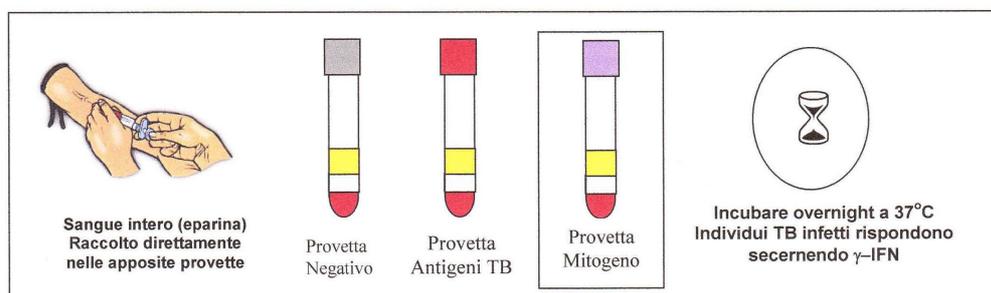
I soggetti con esito alternante del TST, ora positivo, ora negativo, sono stati definiti alternanti.

5.1.3. Procedura del test QF-GIT

Il QF-GIT è stato effettuato tramite un prelievo di 1 ml di sangue periferico direttamente in ciascuna di tre provette dedicate eparinizzate e pre-riempite, contenenti rispettivamente: Mitogeno (fitoemoagglutinina A: controllo positivo), Antigeni TB specifici [Early Secreted Antigen Target 6 (ESAT 6), Culture Filtrate Protein 10 (CFP10) e TB 7.7 (Rv2654)], e un controllo Negativo (senza mitogeno, né antigene). Le provette, dopo il prelievo, sono state agitate accuratamente per garantire il mescolamento del campione ematico con il loro contenuto.

Il campione sono stati conservati a temperatura ambiente, processati entro le 16 ore e successivamente sono stati messi ad incubare “overnight” (per 16-24 ore) a 37°C. (Figura 4).

Figura 4. Raccolta e processazione campione ematico



Le tre aliquote di plasma risultanti (sopranatante) in alcuni casi sono state utilizzate immediatamente il giorno seguente per la seconda fase del test (Rapid IFN γ Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), in altri casi sono state refrigerate a 2-8°C, per un massimo di 8 settimane, e sottoposte alla seconda fase del test successivamente (in accordo con le indicazioni operative della casa produttrice). Il test ELISA ha permesso la misura della concentrazione di IFN γ in UI/ml eventualmente sviluppatesi in ciascuna aliquota di plasma. E' stato utilizzato un software dedicato che, combinando tra loro i valori di IFN γ delle tre aliquote di plasma testate

per ciascun soggetto ha permesso un calcolo dei risultati sia qualitativi che quantitativi. (Figura 5)

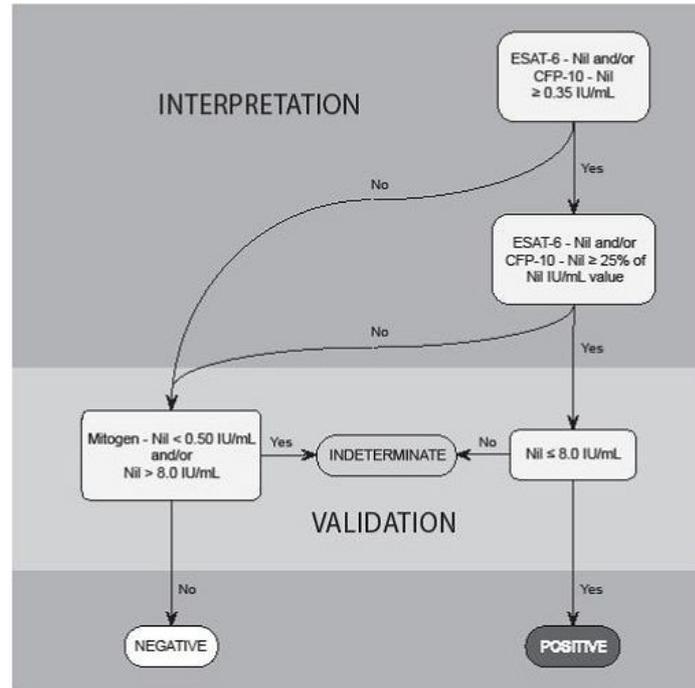
Figura 5. Test ELISA ed estrapolazione dei risultati



I risultati sono stati interpretati in accordo con le indicazioni della casa produttrice: una concentrazione di IFN $\gamma \geq 0,35$ UI/ml (valore di cut-off), dopo aver sottratto il valore riscontrato nel controllo negativo, è considerato un esito “positivo”, una concentrazione di IFN $\gamma < 0,35$ UI/ml è considerato un esito “negativo”.

Nei test seriali l'esito del QF-GIT è stato confrontato con l'esito dello stesso test effettuato in controlli precedenti. La conversione del QF-GIT è stata definita come aumento della quantità di IFN γ da un valore inferiore al cut-off ($< 0,35$ UI/ml) ad un valore successivo sopra il cut-off ($\geq 0,35$ UI/ml), viceversa la reversione del QF-GIT è stata definita come una diminuzione della quantità di IFN γ da un valore sopra il cut-off ($\geq 0,35$ UI/ml) ad un valore sotto il cut-off ($< 0,35$ UI/ml) successivo, in accordo con le indicazioni della ditta produttrice. Nella circostanza di concentrazioni di IFN γ nel controllo negativo ≥ 8 UI/ml e/o differenza tra mitogeno e controllo negativo $< 0,5$ UI/ml, il risultato è stato considerato “Indeterminato” (Figura 6.).

Figura 6. Flow-chart per l'Interpretazione dei risultati del QF-GIT



5.1.4. Analisi statistica

La concordanza e la riproducibilità del risultato dei singoli risultati qualitativi nei soggetti sottoposti al TST è stata valutata come percentuale dei soggetti con esiti o sempre positivi (più semplicemente soggetti Positivi) o sempre negativi (soggetti Negativi) rispetto ai soggetti con test non riproducibili nel tempo, ovvero soggetti Convertiti, Revertiti, Alternanti.

La concordanza e la riproducibilità del risultato dei singoli risultati qualitativi nei soggetti sottoposti al QF-GIT è stata valutata come percentuale dei soggetti con esiti o sempre positivi (più semplicemente soggetti Positivi) o sempre negativi (soggetti Negativi) rispetto ai soggetti con test non riproducibili nel tempo, ovvero soggetti Convertiti, Revertiti, Indeterminati.

E' stata inoltre confrontata la concordanza (agreement) tra l'esito dei due diversi test (TST e QF-GIT) calcolando la k di Cohen

5.2. Risultati

I 1715 operatori sanitari coinvolti nello studio sono stati invitati ad effettuare sia il QF-GIT che il TST nel periodo 1 settembre 2006- 30 settembre 2007.

Dal punto di vista del rischio TB sono stati classificati secondo le Linee Guida dei Centres for Disease Control and Prevention (Jensen *et al*, 2005): 897 sono stati classificati a rischio basso e sono stati invitati ad effettuare un test basale (sia TST che QF-GIT); 420 sono stati classificati a rischio medio sono stati invitati ad effettuare un test basale e un test di screening ogni 12 mesi (sia TST che QF-GIT); 375 sono stati classificati a rischio di trasmissione in atto (*potential ongoing transmission*) e sono stati inviati ad effettuare i test di screening (sia TST che QF-GIT) il prima possibile dopo l'esposizione non protetta e poi dopo 8-10 settimane.

Dei 1715 lavoratori, 367 soggetti (21%) hanno rifiutato di sottoporsi a TST mentre solo 23 (1%) non hanno effettuato il prelievo per il QF-GIT.

Dei 1348 operatori sanitari che hanno effettuato il TST, 405 (30%) hanno effettuato un solo TST nel periodo di studio, 943 soggetti (70%) si sono sottoposti a TST multipli (uno o più nel periodo di studio, ed eventualmente altri nel periodo antecedente lo studio).

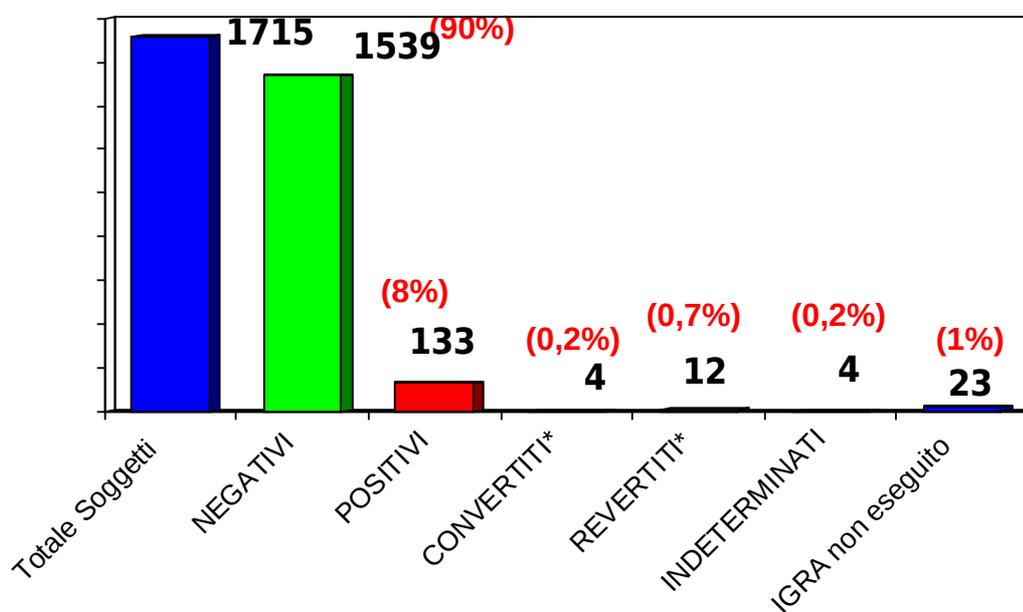
Dei 1692 operatori sanitari che si sono sottoposti a QF-GIT, 1422 (83%) hanno effettuato un test singolo, mentre 270 (16%) hanno effettuato prelievi multipli.

Tabella 3. Numero di TST e di QF-GIT effettuati

N. Soggetti (%)	N. TST (working life)	N. Soggetti (%)	N. QFT-GIT (Set 06-Set 07)
367 (21)	0	23 (1)	0
405 (24)	1	1422 (83)	1
943 (55)	Multipli	270 (16)	Multipli
1715 (100)	Totale	1715 (100)	Totale

Dei 1715 operatori sanitari coinvolti nello studio per lo screening dell'infezione tubercolare latente, l'esito del QF-GIT in 1539 soggetti (90%) è risultato negativo (sono stati inclusi in questa categoria 13 soggetti con un primo test indeterminato e i successivi con esito sempre negativo), in 133 (8%) il QF-GIT ha dato esito positivo, in 4 (0,2%) è stata evidenziata una conversione con una modificazione del test da negativo a positivo, in 12 soggetti (0,7%) è stata evidenziata una reversione del test per la modificazione dell'esito da positivo a negativo. Quattro (0,2%) soggetti hanno presentato un test dall'esito indeterminato.

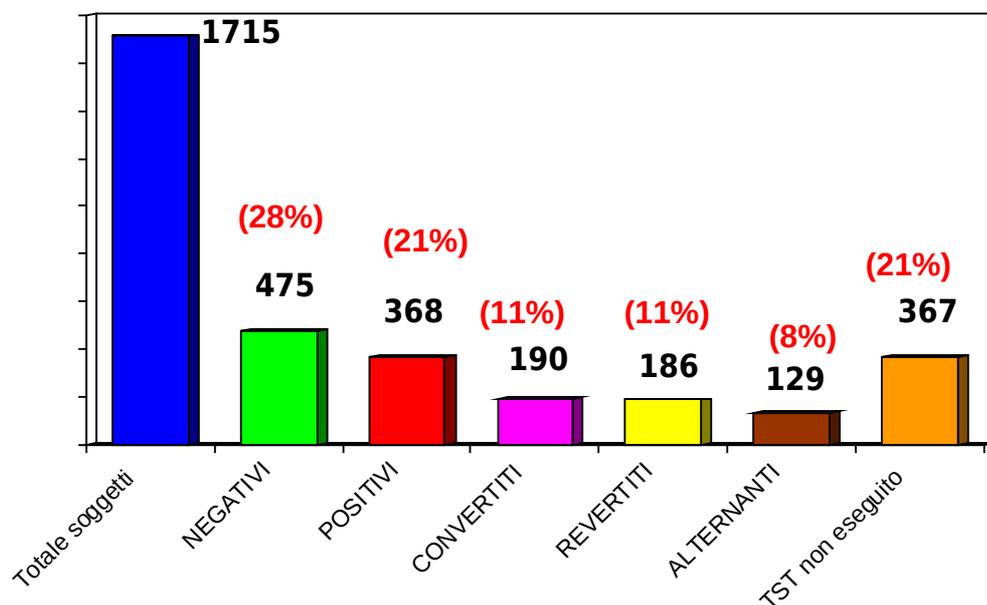
Grafico 1. Esito screening per LTBI con QF-GIT



* In accordo con la definizione di cut-off dato dal produttore

Dei 1715 operatori sanitari coinvolti nello studio per lo screening dell'infezione tubercolare latente in base all'esito del TST, 475 soggetti (28%) hanno avuto un esito negativo. In 368 soggetti (21%) l'esito del TST è stato positivo, in 190 soggetti (11%) è stata evidenziata una conversione del TST, in 186 (11%) è stata documentata una reversione al TST, 129 (8%) hanno presentato un esito alternante del TST.

Grafico 2. Esito screening per LTBI con TST



Nei test seriali il test QF-GIT ha dato sempre un esito concorde in 241 soggetti (89%) sui 270 che hanno ripetuto il test (Grafico 3), mentre il TST ha dato un risultato concorde solo in 438 soggetti (46%) sui 943 che hanno ripetuto il test (Grafico 4).

Grafico 3. Riproducibilità risultati QF-GIT

Grafico 4. Riproducibilità risultati TST

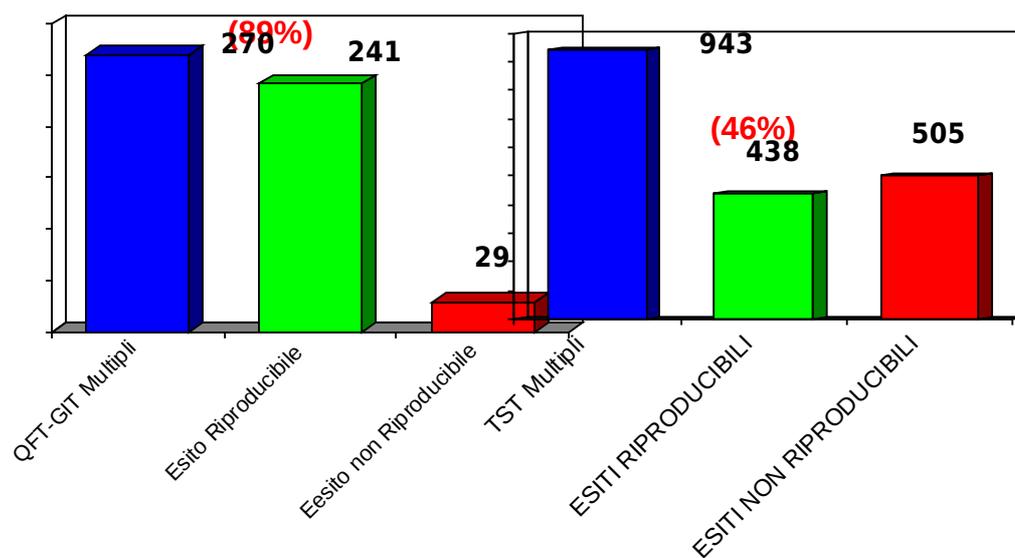
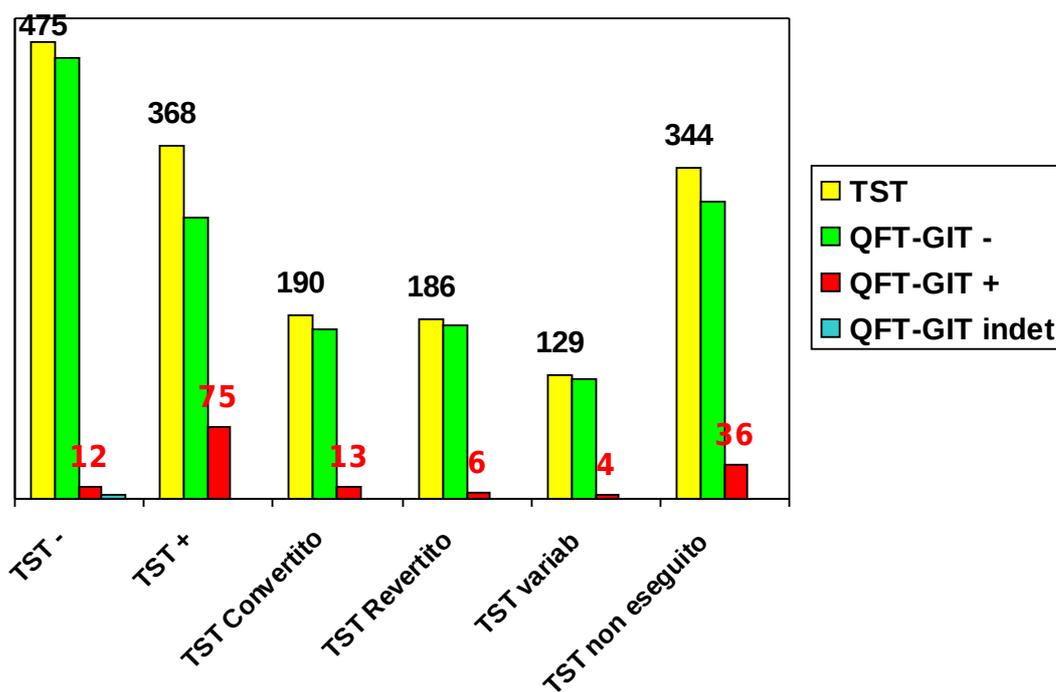


Grafico 5. confronto risultati qualitativi del TST e del QF-GIT



Confrontando i risultati qualitativi del QF-GIT e del TST (Grafico 5), risulta che in 73 operatori sanitari è stato possibile porre diagnosi di infezione tubercolare latente basata solo sull'esito positivo del QF-GIT, mentre il TST è risultato negativo, ha presentato una reversione del risultato (TST Convertito), o non ha permesso di porre una diagnosi perché esito risultava variabile oppure perché non era stato semplicemente eseguito (TST non eseguito). Il QF-GIT è risultato positivo in 12 soggetti con TST negativo (TST-), in 6 soggetti che presentavano una reversione del risultato TST (TST Revertito), in 4 soggetti che presentavano un esito alternante e non interpretabile del TST (TST variabile). Inoltre in 36 soggetti che non avevano mai eseguito il TST il QF-GIT ha dato un esito positivo (TST non eseguito)

Invece per 470 soggetti con esito positivo del TST, di cui 293 con esiti positivi al TST (TST+) e 177 conversioni del risultato TST (TST convertito), non è stato possibile confermare la diagnosi di LTBI, in quanto l'esito del QF-GIT è risultato negativo (Grafico 5).

E' stata calcolata la concordanza (agreement) tra gli esiti del TST e del QF-GIT ed è risultata scarsa ($k=0,2$)

5.3. Discussione e conclusioni

Nel nostro studio 58 operatori sanitari (4%) sono stati diagnosticati affetti da LTBI solo in base all'esito del QF-GIT. In 470 (27%) operatori sanitari con precedente diagnosi LTBI effettuata in base al solo esito del TST, il rilievo non è stato confermato dall'esito del QF-GIT. La scarsa sensibilità del TST nei soggetti con pregressa vaccinazione con BCG, quali sono gli operatori sanitari, è documentato in letteratura ed emerge in vari studi in una recente metanalisi (Menzies *et al*, 2007).

La compliance degli operatori sanitari al programma di screening è stata maggiore per il test QF-GIT, rispetto a quanto avvenuto sia in questa occasione, sia in precedenti iniziative di screening con l'utilizzo del TST: il 99% dei soggetti hanno effettuato il prelievo per il QF-GIT in confronto al 79% dei soggetti che si sono sottoposti a TST. Ciò è da attribuire ad alcuni vantaggi che differenziano in modo sostanziale il QF-GIT dal TST legati al fatto che il primo è un test in vitro, quindi l'analisi non è operatore-dipendente, ed inoltre è privo di cross-reattività con BCG. La completa adesione ai programmi di controllo dell'LTBI finora è stata ostacolata dai limiti del TST quali l'iniezione di sostanze esogene in vivo, che spesso non è gradita agli operatori sanitari che si devono sottoporre ripetutamente all'iniezione intradermica nel corso della loro storia lavorativa, la variabilità individuale nella somministrazione e nella lettura, la richiesta della visita di ritorno per la lettura e l'effetto boosting nell'interpretazione dei risultati.

Gli esiti qualitativi del QF-GIT nei test seriali sono risultati più stabili e riproducibili rispetto a quelli del TST: nell'89% dei casi l'esito del QF-GIT ripetuto è concorde con quello del precedente test, mentre questo avviene solo nel 46% se viene utilizzato il TST. Tra gli operatori sanitari oggetto di indagine in questo studio, e negli operatori sanitari in generale, la prevalenza di anamnesi positiva per una pregressa vaccinazione con BCG è elevata e questo giustifica in gran parte la scarsa concordanza rilevata tra l'esito esito del QF-GIT e l'esito del TST ($k = 0,2$).

Questo dato è confermato anche da altri studi riguardanti gli operatori sanitari da cui risulta che la vaccinazione con BCG è il maggiore fattore di confondimento dei risultati del TST, mentre i risultati del QF-GIT non vengono influenzati dal BCG (Vinton *et al*, 2009; Ringhausen *et al*, 2009; Nienhaus *et al*, 2008; Diel *et al*, 2006).

Infine da questo studio emerge che le differenze rilevate tra i due test sia in termini organizzativi - gestionali, sia in termini di ricadute cliniche (i positivi al QF-GIT nella nostra esperienza risultano una quota ridotta con necessità di approfondimenti strumentali ed eventuale chemiopprofilassi in un minor numero di soggetti rispetto ai positivi al solo TST) rendono l'utilizzo del QF-GIT una strategia di screening più efficiente ed efficace rispetto al TST per la diagnosi di LTBI negli operatori sanitari.

6. STUDIO

6.1. Soggetti e Metodi

6.1.1. Disegno dello studio e popolazione

Lo studio è stato condotto nel periodo 1 settembre 2006 - 30 settembre 2009 ed ha coinvolto 530 operatori sanitari di una grande struttura ospedaliera di Padova che, in base ad un programma di screening periodico per TB secondo le Linee Guida dei Centres for Disease Control and Prevention (Jensen *et al*, 2005), sono stati ripetutamente testati con il QF-GIT.

Sono stati inclusi nello studio solo gli operatori sanitari che hanno ripetuto il test almeno 3 volte nell'arco temporale di osservazione di 3 anni : 376 soggetti hanno ripetuto il test 3 volte, 83 soggetti 4 volte, 50 soggetti 5 volte, 20 soggetti 6 volte e 1 soggetto 8 volte.

Sono stati quindi raccolti i risultati quantitativi di 1838 test effettuati da 530 operatori sanitari.

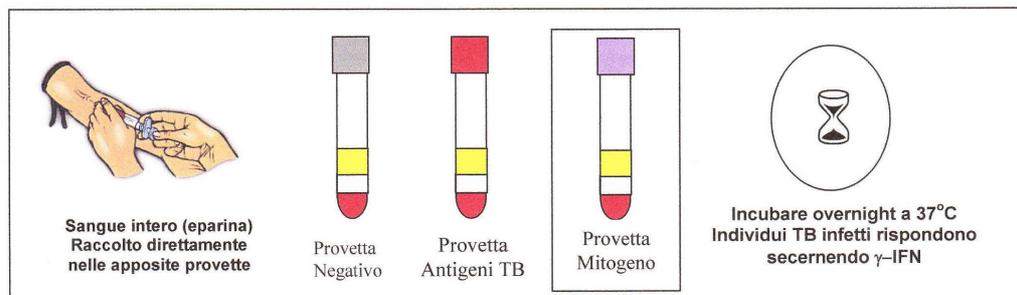
In questo studio è stato effettuato un controllo ripetuto del solo QF-GIT.

6.1.2. Procedura del test QF-GIT

Il QF-GIT è stato effettuato tramite un prelievo di 1 ml di sangue periferico direttamente in ciascuna di tre provette dedicate eparinizzate e pre-riempite, contenenti rispettivamente: mitogeno (fitoemoagglutinina A: controllo positivo), Antigeni TB specifici [Early Secreted Antigen Target 6 (ESAT 6), Culture Filtrate Protein 10 (CFP 10) e TB 7.7 (Rv2654)], e un controllo negativo (senza mitogeno, né antigene). Le provette, dopo il prelievo, sono state agitate accuratamente per garantire il mescolamento del campione ematico con il loro contenuto.

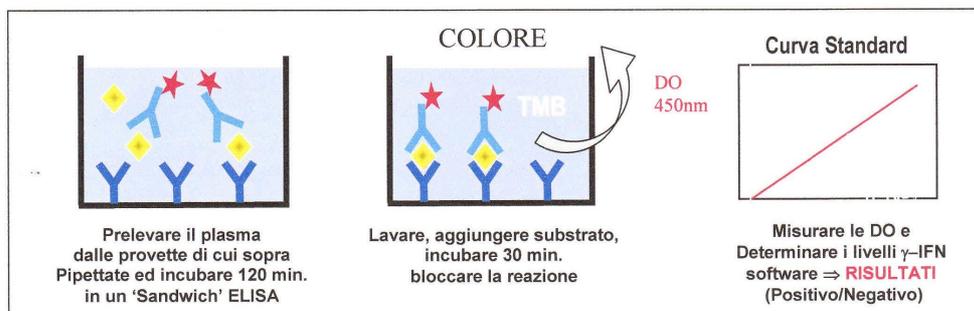
Il campione è stato conservato a temperatura ambiente, processato entro le 16 ore e successivamente sono stati messi ad incubare “overnight” (per 16-24 ore) a 37°C. (Figura 7.).

Figura 7. Raccolta e processazione campione ematico



Le tre aliquote di plasma risultanti (sopranatante) in alcuni casi sono state utilizzate immediatamente il giorno dopo per la seconda fase del test (Rapid IFN γ Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), in altri casi sono state refrigerate a 2 - 8°C , per un massimo di 8 settimane, e sottoposte alla seconda fase del test successivamente (in accordo con le indicazioni operative della casa produttrice). Il test ELISA ha permesso la misura della concentrazione di IFN γ in UI/ml eventualmente sviluppatesi in ciascuna aliquota di plasma. E' stato utilizzato un software dedicato che, combinando tra loro i valori di IFN γ delle tre aliquote di plasma testate per ciascun soggetto ha permesso un rapido calcolo dei risultati sia qualitativi che quantitativi. (Figura 8)

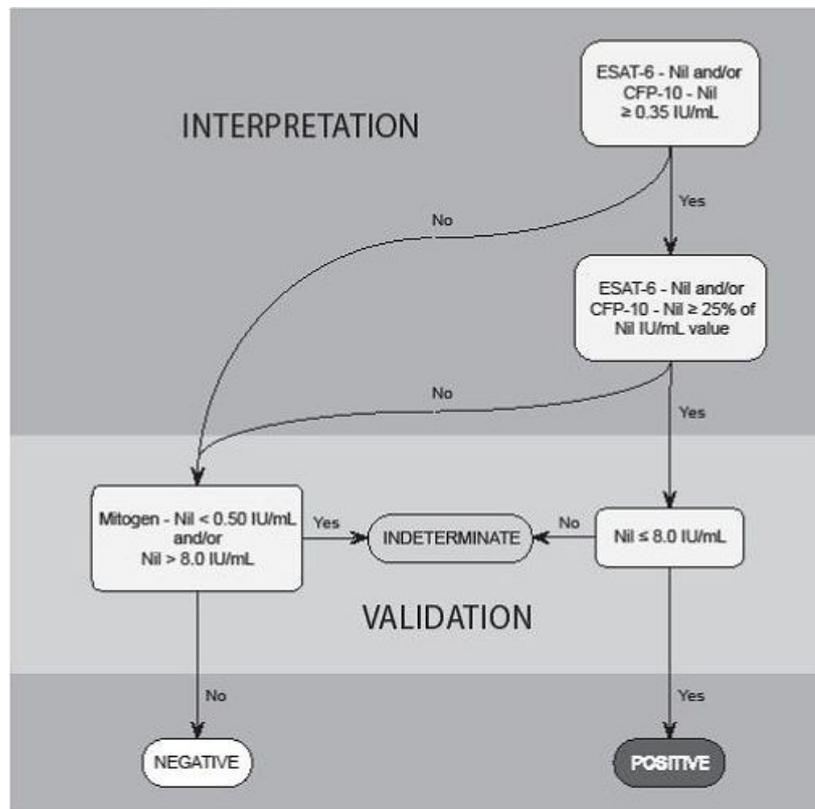
Figura 8. Test ELISA ed estrapolazione dei risultati



I risultati sono stati interpretati in accordo con le indicazioni della casa produttrice: una concentrazione di IFN $\gamma \geq 0,35$ UI/ml (valore di cut-off), dopo aver sottratto il valore riscontrato nel controllo negativo, è considerato un esito “positivo”, una concentrazione di IFN $\gamma < 0,35$ UI/ml è considerato un esito “negativo”.

Nei test seriali l’esito del QF-GIT è stato confrontato con l’esito dello stesso test effettuato in controlli precedenti. La conversione del QF-GIT è stata definita come aumento della quantità di IFN γ da un valore inferiore al cut-off ($< 0,35$ UI/ml) ad un valore successivo sopra il cut-off ($\geq 0,35$ UI/ml), viceversa la reversione del QF-GIT è stata definita come una diminuzione della quantità di IFN γ da un valore sopra il cut-off ($\geq 0,35$ UI/ml) ad un valore sotto il cut-off ($< 0,35$ UI/ml) successivo, in accordo con le indicazioni della ditta produttrice. Nella circostanza di concentrazioni di IFN γ nel controllo negativo ≥ 8 UI/ml e/o differenza tra mitogeno e controllo negativo $< 0,5$ UI/ml, il risultato è stato considerato “Indeterminato” (Figura 9.)

Figura 9. Flow-chart per l’Interpretazione dei risultati del QF-GIT



In questo studio è stato considerato sia l'esito qualitativo del test sia l'esito quantitativo della produzione di IFN γ espresso in UI/ml. Poiché il test ELISA non è in grado di misurare con precisione valori di IFN γ > 10UI/ml, a questi valori è stato assegnato il valore di 10UI/ml che corrisponde al limite superiore della curva di calibrazione.

6.1.3. Analisi statistica

L'analisi statistica delle medie, della deviazione standard e degli intervalli di confidenza delle medie, così come per i centili della distribuzione degli esiti è stata effettuata utilizzando il programma Stata, Versione 11 (Stata Corp.). Analogamente per lo studio con modello logit (log odds) delle probabilità di risultare Positivo confermato o Negativo confermato controllando per alcune caratteristiche individuali (genere, età e qualifica professionale).

6.2. Risultati

Sono stati studiati gli esiti dei test QF-GIT, sia qualitativi che quantitativi, effettuati da 530 operatori sanitari in almeno 3 diverse occasioni nell'arco temporale di osservazione di 3 anni (1 settembre 2006 - 30 settembre 2009). Le caratteristiche generali della popolazione oggetto di indagine sono evidenziate in Tabella 4.

Tabella 4. Caratteristiche della popolazione studiata (N = 530)

Sesso		Soggetti n (%)
	Maschi	139 (26)
	Femmine	391 (74)
Età media anni(range)		43 (23-63)
Profilo Professionale		
	Infermieri	296 (56)
	Addetti assistenza pazienti	152 (29)
	Tecnici sanitari	33 (6)
	Medici	49 (9)
Classificazione rischio lavorativo per TB (Jensen <i>et al</i> , 2005)		
	Basso (<3 pazienti TB /anno)	33 (6)
	Medio (≥ 3 pazienti TB /anno)	214 (40)
	Potenziale trasmissione (esposizione non protette)	283 (54)

La diversa sequenza temporale dei possibili esiti qualitativi del QF-GIT (positivo, negativo ed indeterminato) ha permesso di identificare in questo studio 9 diverse categorie di soggetti:

1. con tutti test negativi (Negativi confermati),
2. con tutti i test positivi (Positivi confermati),
3. con reversioni del test, ossia coloro con uno o più test positivi seguiti da due o più test negativi (Reversioni confermate),
4. con conversioni del test ossia coloro con uno o più test negativi seguiti da due o più test positivi (Conversioni confermate),
5. con test negativi seguiti da uno o al massimo due test positivi che poi ritornano negativi in controlli successivi (Conversioni transitorie),

6. con test indeterminato confermato in tutti i prelievi (Indeterminati confermati),
7. con un unico test transitoriamente indeterminato nell'ambito di tutti test negativi, sia precedenti che seguenti (Indeterminati transitori),
8. con esito transitoriamente negativo tra test precedenti e seguenti tutti positivi (Negativi transitori),
9. con esiti alternanti del test, da esito negativo a positivo e viceversa (Esiti alternanti).

La Tabella 5 evidenzia il numero dei soggetti che hanno effettuato 3, 4, 5, 6 oppure 8 QF-GIT nel periodo di studio, classificati a seconda dei risultati qualitativi dei test seriali.

Tabella 5. Soggetti che hanno effettuato test seriali e classificazione

N. test	<i>Neg conf*</i>	<i>Pos conf*</i>	<i>Rev conf*</i>	<i>Conv conf*</i>	<i>Conv trans*</i>	<i>Indet conf*</i>	<i>Indet trans*</i>	<i>Neg trans*</i>	<i>Esiti altern*</i>	TOT sogg	TOT test
3 test	313	28	15	6	7	1	5	1	0	376	1128
4 test	52	4	1	7	9	0	3	3	4	83	332
5 test	42	0	2	0	4	0	0	2	0	50	250
6 test	17	0	0	0	1	0	2	0	0	20	120
8 test	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8
<i>Tot sogg</i>	424	32	18	13	22	1	10	6	4	530	1838
<i>% sogg</i>	80,0	6,0	3,4	2,5	4,1	0,2	1,9	1,1	0,8	100,0	

*Nota: *Neg conf*:: Negativi confermati; *Pos conf*: Positivi confermati; *Rev conf*: Reversioni confermate; *Conv conf*: Conversioni confermate; *Conv trans*: Conversioni transitorie; *Indet conf*:: indeterminati confermati; *Indet trans*: Indeterminati transitori; *Neg trans*: Negativi transitori; *Esito altern*: Esiti alternanti del test

L'esito qualitativo del QF-GIT è risultato concorde e riproducibile in 456 soggetti su 530 cioè nell'86 % dei casi (in 424, pari all'80% dei casi, l'esito ha dato esito sempre negativo, in 32, pari al 6% dei casi, un esito sempre positivo). Un soggetto ha presentato tutti i test con risultato sempre indeterminato (0,2% dei 530 del totale). La quota dei soggetti con esito del QF-GIT variabile corrisponde al 14% della popolazione (Grafico 6).

Dall'analisi dei soggetti con esiti del test non concordi, inclusi nel Grafico 6, nel macrogruppo "Variabili", è possibile individuare 22 soggetti con Conversioni transitorie pari al 4,1%, 18 con Reversioni confermate pari al 3,4%, 13 con Conversioni confermate pari al 2,5%, 10 con variazioni

aspecifiche o di incerto significato (rientrano in questo gruppo i soggetti sia con un unico test dall'esito negativo tra tutti positivi - Negativi transitori -, sia i soggetti con esiti alternanti del test da positivo a negativo e viceversa – Esiti alternanti) e 10 soggetti Indeterminati transitori con 1 unico test indeterminato nell'ambito di tutti test con esito concorde negativo. (Grafico 7).

Grafico 6. Esiti qualitativi QF-GIT

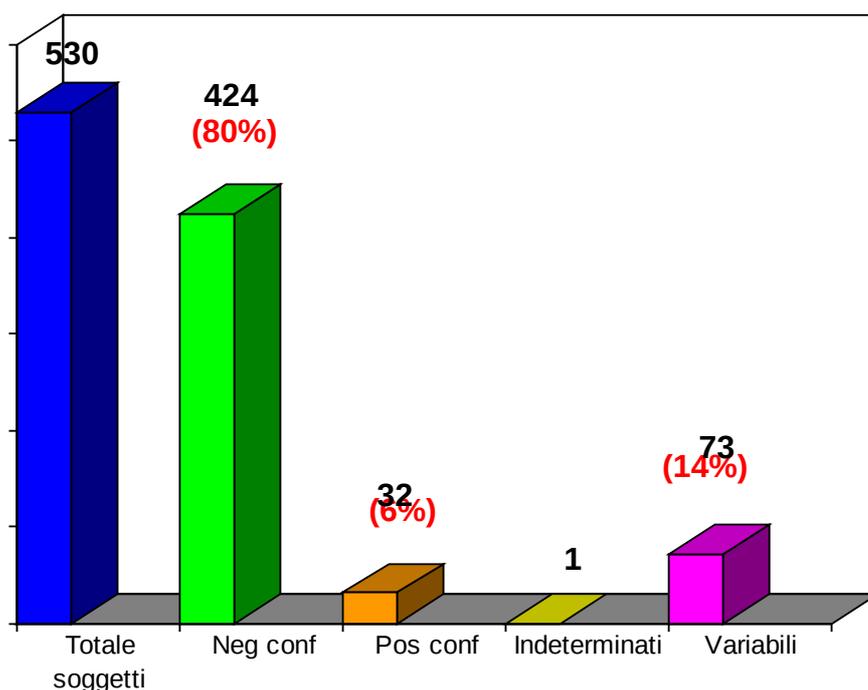
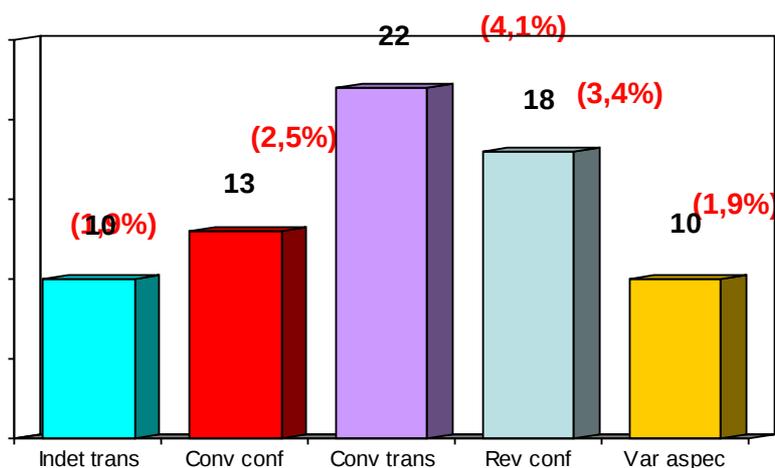


Grafico 7. Esiti qualitativi QF-GIT: composizione macrogruppo Variabili



E' stato successivamente analizzato il risultato quantitativo del QF-GIT in termini di concentrazione di IFN γ espressa in UI/ml.

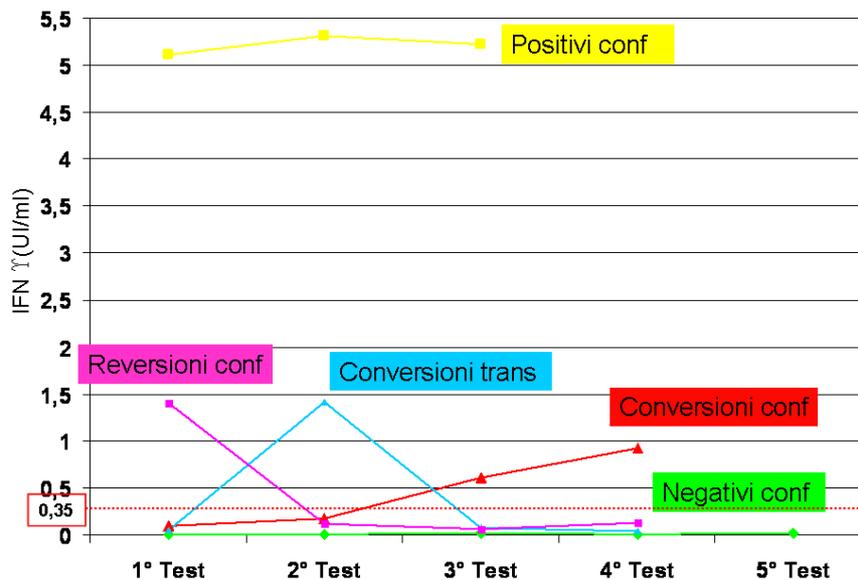
E' stata analizzata la variabilità nella produzione di IFN γ nei raggruppamenti più rappresentativi (Negativi confermati, Positivi confermati, soggetti con Reversioni confermate, con Conversioni confermate e con Conversioni transitorie), in funzione della sequenza temporale dei vari test, nel 1° Test, 2° Test, 3° Test, 4° Test (Tabella 6.) ed è stata rappresentata in Grafico 3.

Tabella 6. Variabilità IFN γ in funzione della sequenza temporale del test

	1° test		2° Test		3°Test		4° Test	
	X*	SD	X*	SD	X*	SD	X*	SD
Negativi confermati	0,016	0,038	0,016	0,039	0,019	0,041	0,014	0,024
Conversioni transitorie	0,059	0,057	1,412	1,866	0,078	0,085	0,042	0,052
Conversioni confermate	0,100	0,078	0,179	0,117	0,613	0,281	0,926	0,384
Reversioni confermate	1,408	2,234	0,126	0,104	0,070	0,096	0,133	0,112
Positivi confermati	5,104	4,160	5,306	4,058	5,225	3,764	1,695	2,144

Nota: X* = media. SD = deviazione standard.

Grafico 8. Produzione media IFN γ in funzione della sequenza temporale del test



E' stata calcolata la variabilità della produzione di IFN γ nelle varie categorie di soggetti (media, IC 95% della media e SD della media)

differenziando la valutazione per le concentrazioni < 0,35 UI/ml (Test negativi) e per le concentrazioni ≥ 0,35 UI/ml (Test positivi).

I singoli risultati sono evidenziati in Tabella 7.

Tabella 7. Variabilità produzione di IFN γ nei test negativi e positivi

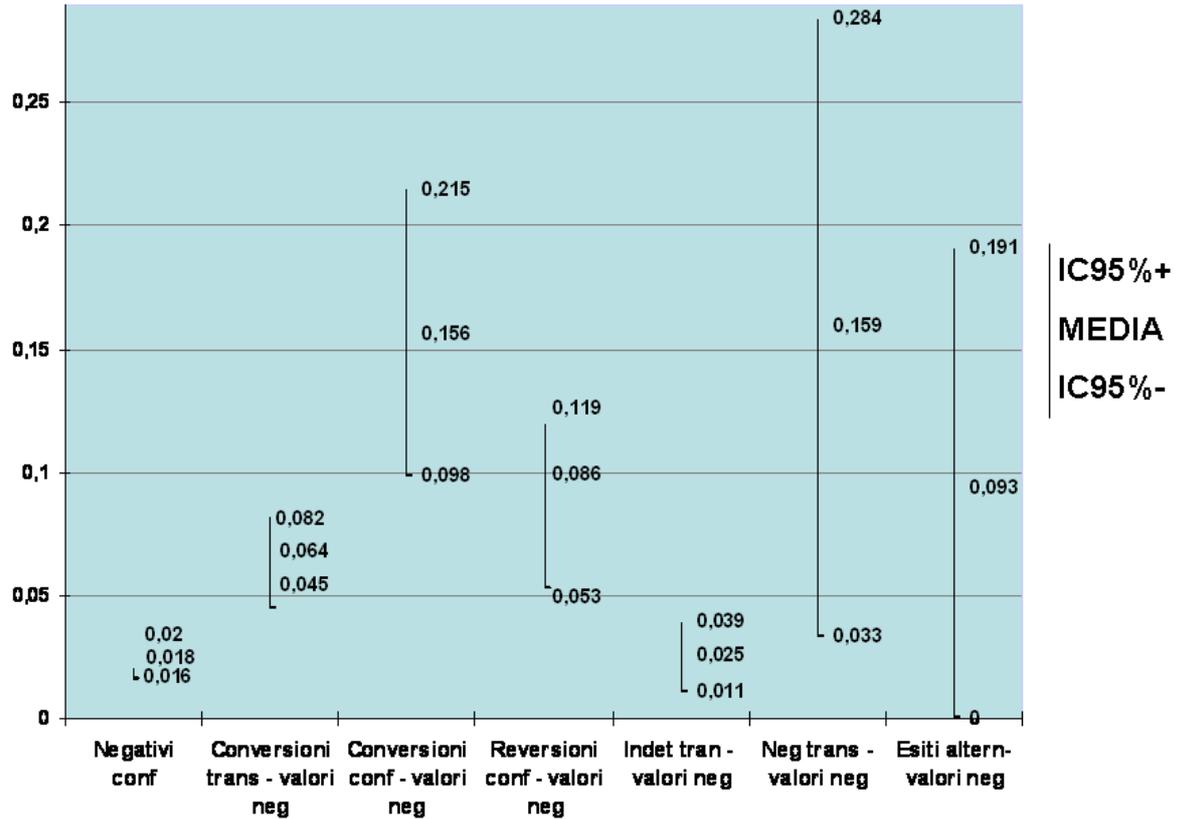
CLASSIFICAZIONE	N. Test validi	TEST NEGATIVI		N Test validi	TEST POSITIVI	
		X* (IC 95%)	SD		X* (IC 95%)	SD
Negativi conf	1459	0,018 (0,016 - 0,020)	0,001	-	-	-
Conversioni trans	68	0,064 (0,045 - 0,082)	0,009	23	1,341 (0,564 - 2,117)	0,374
Conversioni conf	16	0,156 (0,098 - 0,215)	0,028	30	0,957 (0,675 - 1,239)	0,138
Reversioni conf	41	0,086 (0,053 - 0,119)	0,017	18	1,408 (0,297 - 2,520)	0,527
Indeterminati trans	29	0,025 (0,011 - 0,039)	0,007	-	-	-
Negativi trans	7	0,159 (0,033 - 0,284)	0,051	18	1,036 (0,570 - 1,501)	0,221
Esiti alternanti	8	0,093 (0 - 0,191)	0,042	8	1,239 (0,114 - 2,364)	0,476
Positivi conf	-	-	-	100	5,118 (4,342 - 5,893)	0,527

Nota: X* = media. SD =deviazione standard. IC95%= intervallo confidenza 95%

Per quanto riguarda gli esiti negativi del QF-GIT (Test negativi) evidenziati in Tabella 7, i soggetti Negativi Confermati hanno la produzione media di IFN γ che è la più bassa di tutte le categorie di soggetti (pari a 0,018 UI/ml , IC95%: 0,016-0,020; SD: 0,001), seguita da quella degli Indeterminati transitori (pari a 0,025 UI/ml, IC95%: 0,011-0,039; SD: 0,007), poi da quella dei soggetti con Conversioni transitorie (pari a 0,064 UI/ml, IC95%: 0,045-0,082; SD: 0,009), a seguire quella dei soggetti con Reversioni confermate (pari a 0,086 UI/ml, IC95%: 0,053-0,119; SD: 0,017), poi quella dei soggetti con Esiti alternanti del test (pari a 0,093 UI/ml, IC95% 0-0,191; SD: 0,042), quella dei soggetti con Conversioni Confermate (pari a 0,156 UI/ml, IC95%: 0,098-0,215; SD: 0,028), ed infine la produzione media di IFN γ dei soggetti con tutti i test positivi ed occasionalmente un test positivo, definiti Negativi

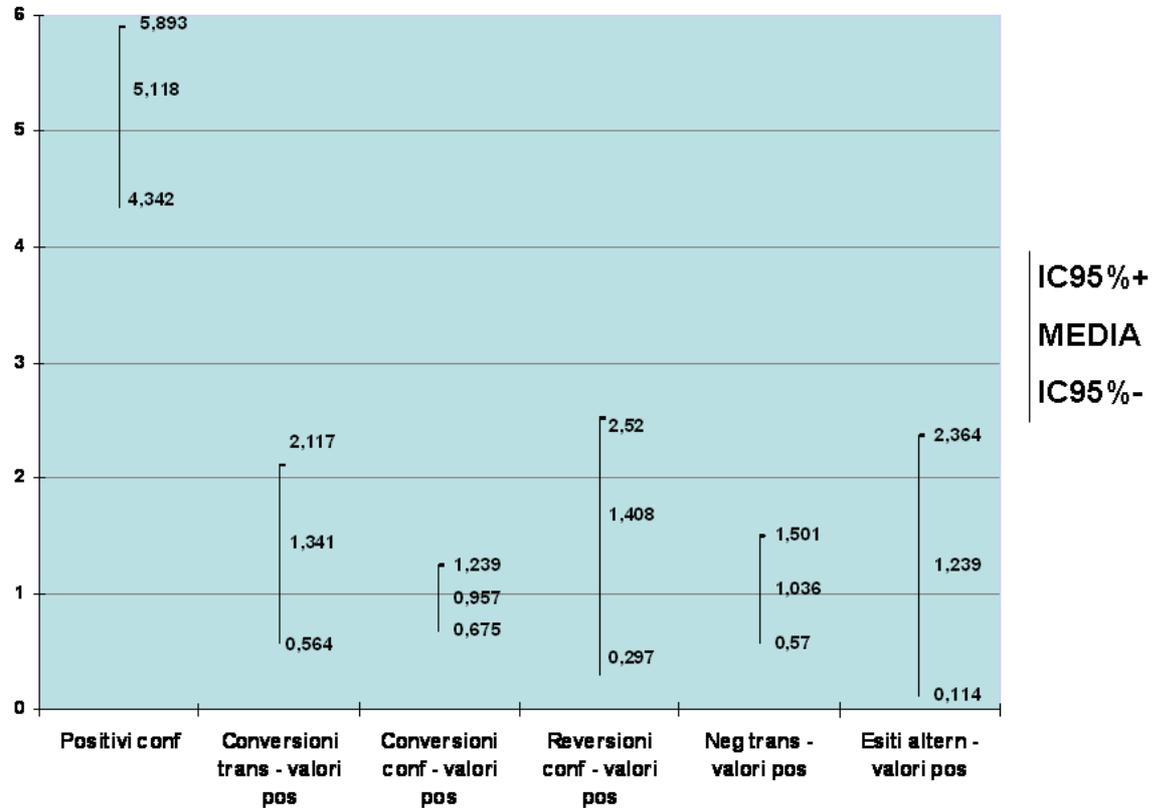
transitori (pari a 0,159 UI/ml, IC95%: 0,033-0,284; SD: 0,051). Il grado di dispersione della distribuzione delle medie di questi esiti negativi sono rappresentati in Grafico 9.

Grafico 9. Grado di dispersione distribuzione delle medie nei test negativi



Gli esiti positivi del QF-GIT (Test positivi) sono evidenziati in Tabella 7. I soggetti Positivi confermati hanno la produzione maggiore di IFN γ (pari a 5,118 UI/ml, IC95%: 0,045-0,082; SD: 0,009), seguita da quella dei soggetti con Reversioni confermate (che risulta di 1,408 UI/ml, IC95%: 0,297-2,520; SD: 0,527), poi da quella dei soggetti con Conversioni transitorie (pari a 1,341 UI/ml, IC95%: 0,564-2,117; SD: 0,374), con Esiti alternanti del test (pari a 1,239 UI/ml, IC95%: 0,114-2,364; SD: 0,527), a seguire quella dei soggetti Negativi transitori (pari a 1,036 UI/ml, IC95%: 0,570-1,501; SD: 0,221) ed infine quella soggetti con Conversioni confermate (che risulta di 0,957 UI/ml, IC95%: 0,675-1,239; SD: 0,138). Il grado di dispersione della distribuzione delle medie degli esiti positivi sono rappresentati in Grafico 10.

Grafico 10. Grado di dispersione distribuzione delle medie nei test positivi



Nell'analisi dei centili dei test negativi e positivi risulta una distribuzione fortemente asimmetrica, in particolar nel caso dei Positivi confermati, dove per tutte le categorie la mediana è minore della media evidenziando una coda lunga a destra della distribuzione.

Nel caso dei Positivi confermati, il valore riscontrato per il 95° percentile è pari al limite superiore dei esiti possibili (10 UI/mL) con nessuna variabilità, mentre il 5° percentile presenta un intervallo di confidenza attorno al valore puntuale di 1,077 UI/ml e comunque nettamente superiore al cut-off di riferimento (0,35 UI/ml) (Tabella 8).

Nota: intervalli di confidenza calcolati senza assunzioni sulla distribuzione dei centili, utilizzando interpolazione lineare e programma Stata, Versione 11.

Tabella 8. Intervalli di confidenza per 5, 50 e 95 percentile relativi alla produzione di IFN γ nei test positivi

Categorie	N test	X*	5° centile	IC 95%	50° centile	IC 95%	95° centile	IC 95%
Negativi conf	0	-	-	-	-	-	-	-
Conversioni trans	21	1,413	0,381	0,380 - 0,419	0,560	0,455 - 1,056	6,797	2,090 - 6,950
Conversioni conf	13	0,920	0,465	0,465 - 0,565	0,740	0,577 - 1,098	2,077	1,136 - 2,077
Reversioni conf	18	1,408	0,360	0,360 - 0,420	0,625	0,462 - 1,247	10,000	1,946 - 10,0
Indeterminati trans	0	-	-	-	-	-	-	-
Negativi trans	6	0,985	0,390	0,390 - 0,470	0,535	0,398 - 2,393	2,493	1,263 - 2,493
Esiti alternanti	5	1,108	0,525	0,525 - 0,574	0,585	0,525 - 3,200	3,200	0,685 - 3,200
Positivi conf	32	5,230	1,205	1,077 - 1,428	3,898	2,172 - 7,943	10,000	10,00 - 10,00

Nota: X* = media; IC = intervallo di confidenza. Gli intervalli di confidenza calcolati senza assunzioni sulla distribuzione dei centili, utilizzando interpolazione lineare e programma Stata, Versione 11.

Per i negativi confermati, il 95° percentile risulta avere un intervallo di confidenza significativamente al di sotto del cut-off di riferimento (0,35 UI/ml). Per quanto riguarda le altre categorie, gli intervalli di confidenza risentono della scarsa numerosità campionaria (Tabella 9).

Tabella 9. Intervalli di confidenza per 5, 50 e 95 percentile relativi alla produzione di IFN γ nei test negativi

Categorie	N test	X*	5° centile	IC 95%	50° centile	IC 95%	95° centile	IC 95%
Negativi conf	145	9	0,018	0,000 - 0,000	0,000	0,000 - 0,000	0,090	0,070 - 0,100
Conversioni trans	68	0,064	0,000	0,000 - 0,000	0,030	0,024 - 0,050	0,248	0,162 - 0,310
Conversioni conf	16	0,156	0,000	0,000 - 0,300	0,145	0,061 - 0,265	0,340	0,280 - 0,340
Reversioni conf	41	0,100	0,000	0,000 - 0,000	0,050	0,030 - 0,123	0,327	0,233 - 0,340
Indeterminati trans	16	0,025	0,000	0,000 - 0,000	0,010	0,000 - 0,023	0,135	0,048 - 0,140
Negativi trans	7	0,159	0,000	0,00 - 0,330	0,021	0,000 - 0,240	0,260	0,217 - 0,260
Esiti alternanti	8	0,093	0,000	0,000 - 0,000	0,190	0,000 - 0,318	0,340	0,256 - 0,340
Positivi conf	0	-	-	-	-	-	-	-

Nota: X* = media; IC = intervalli di confidenza. Gli intervalli di confidenza calcolati senza assunzioni sulla distribuzione dei centili, utilizzando interpolazione lineare e programma Stata, Versione 11.

L'analisi della frequenza di esiti negativi del QF-GIT è stata eseguita considerando 3 intervalli di concentrazione crescente di IFN γ : 0-0,10 UI/ml,

0,11-0,20 UI/ml e 0,21-0,34 UI/ml (Tabella 10). Il 96,2% dei soggetti Negativi confermati ha una concentrazione di IFN γ entro il valore di 0,10 UI/ml. Entro la fascia di concentrazione di IFN γ di 0-0,10 UI/ml vi sono anche i valori negativi dei soggetti Indeterminati transitori con una frequenza pari al 93,1%.

Tabella 10. Frequenza di esiti negativi del QF-GIT per categoria

	Negativi conf	Indet trans Valori Neg	Conv trans Valori Neg	Conv conf Valori Neg	Rev conf Valori Neg	Neg trans Valori Neg	Esiti altern Valori Neg
IFN γ (UI/ml)	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST
0 - 0,10	1403/1459 (96,2%)	27/29 (93,1%)	53/68 (77,9%)	5/16 (31,2%)	23/41 (56,1%)	3/7 (42,8%)	5/8 (62,5%)
0,11 - 0,20	41/1459 (2,8%)	2/29 (6,9%)	10/68 (14,8%)	6/16 (37,5%)	11/41 (26,8%)	1/7 (14,3%)	0
0,21 - 0,34	15/1459 (1%)	0	5/68 (7,3%)	5/16 (31,2%)	7/41 (17%)	3/7 (42,8%)	3/8 (37,5%)

L'analisi della frequenza di esiti positivi del QF-GIT è stata eseguita considerando 3 intervalli di concentrazione crescente di IFN γ : 0,35-0,50 UI/ml, 0,51-1 UI/ml e 1,01-10 UI/ml (Tabella 11). L'81% dei soggetti Positivi confermati ha una concentrazione di IFN γ > 1 UI/ml. Gli altri soggetti, quelli con Conversioni transitorie, con Conversioni confermate, con Reversioni confermate, i soggetti Negativi transitori, i soggetti con Esiti alternanti del test hanno i valori positivi che si distribuiscono in tutte le tre fasce considerate.

Tabella 11. Frequenza di esiti positivi del QF-GIT per categoria

	Positivi conf	Conv trans Valori Pos	Conv conf Valori Pos	Rev conf Valori Pos	Neg trans Valori Pos	Esiti altern Valori Pos
IFN γ (UI/ml)	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST	N. TEST/ TOT TEST
0,35 - 0,50	5/100 (5%)	10/23 (43,5%)	7/30 (23,3%)	6/18 (33,3%)	8/18 (44,4%)	3/8 (37,5%)
0,51 - 1	14/100 (14%)	7/23 (30,4%)	14/30 (46,7%)	6/18 (33,3%)	4/18 (22,2%)	3/8 (37,5%)
> 1	81/100 (81%)	6/23 (26,1%)	9/30 (30%)	6/18 (33,3%)	6/18 (33,3%)	2/8 (25%)

Infine abbiamo studiato la correlazione tra la probabilità di un soggetto di risultare Positivo confermato o Negativo confermato ed alcune sue caratteristiche individuali: genere, qualifica professionale ed età. Tra le variabili di controllo non abbiamo considerato la classificazione del rischio lavorativo per TB, in quanto la popolazione dei soggetti occupati in ambiti lavorativi a rischio medio TB e a rischio di trasmissione nosocomiale in atto sono risultate sovra rappresentate rispetto ai soggetti a basso rischio TB.

Abbiamo selezionato solo gli individui appartenenti alle categorie dei Positivi confermati e dei Negativi confermati. Non è stato possibile effettuare una simile analisi per le altre categorie di soggetti a causa della scarsa numerosità campionaria.

Abbiamo definito una variabile dicotomica che prende valore pari a 0 se il soggetto è classificato Negativo confermato, e pari a 1 se è classificato Positivo confermato. I coefficienti del modello logit riportati nella prima colonna della Tabella 12 evidenziano che esiste una correlazione positiva e statisticamente significativa tra la probabilità di essere Positivo confermato per le donne e che la probabilità di essere Positivo confermato aumenta con l'età.

In Tabella 12, seconda colonna, riportiamo anche gli effetti marginali del logit per una migliore interpretazione dei risultati. Essi indicano che:

- le donne hanno 8% di probabilità in più rispetto ai maschi (categoria residuale rispetto al genere) di risultare Positive confermate, con livello di significatività del 10%;
- rispetto all'età media di questo campione (43 anni), l'aumento di un anno d'età comporta una maggiore probabilità di essere nella categoria dei Positivi confermati pari a 0,6%. Tale coefficiente è significativo all'1%;
- i medici hanno 3,2% di probabilità in meno di essere Positivi confermati rispetto alla categoria professionale omessa (addego all'attività infermieristica) statisticamente significativa al 10%;

- non risulta invece alcuna differenza statisticamente significativa tra gli addetti ad attività infermieristica, addetti all'assistenza e i tecnici di laboratorio.

Tabella 12. Analisi logit della probabilità di essere Positivo confermato (variabile dipendente uguale a 1)

Variabili	Coefficienti	Effetti marginali
Donna	1.026**	0.080*
Addetto assistenza	-0.302	-0.014
Medico	-0.873	-0.032*
Tecnico Labor	0.294	0.026
Età	0.106***	0.006***
Costante	-7.726***	
Obs.	456,000	456,000
Log likelihood	-99,568	-99,568
Chi-squared	32,597	32,597

Note: p-values in parentesi. * p<.10, ** p<.05, *** p<.01

6.3. Discussione

L'identificazione e il trattamento degli individui affetti da infezione tubercolare latente (LTBI) sono componenti essenziali di un'efficace strategia di controllo ed eliminazione della tubercolosi nei paesi a bassa incidenza. In questo contesto i lavoratori della sanità rappresentano un'importante popolazione target dei programmi di screening mirati per la diagnosi di LTBI per la quale è richiesto un utilizzo seriale di test diagnostici. I test basati sul rilascio di IFN- γ costituiscono una valida alternativa al TST e ne è raccomandato l'utilizzo nei test ripetuti anche da alcune linee guida internazionali. Tuttavia, i dati di letteratura relativi all'interpretazione dei risultati IGRAs seriali sono scarsi.

In questo studio abbiamo analizzato il grado di riproducibilità del risultato del QF-GIT in un contesto di attività istituzionale di screening dell'infezione tubercolare latente in un'ampia popolazione sanitaria.

Nella nostra casistica l'86% dei soggetti ripetutamente testati presenta un risultato stabile del QF-GIT nelle ripetizioni seriali.

Questo risultato è in linea con i risultati dello studio Veerapathran *et al*, (2008) che ha indagato il grado di riproducibilità del QF-GIT nel breve periodo (test ripetuti in 4 diverse occasioni distanziate ciascuna di 3 giorni). Infatti in questo studio il QF-GIT è risultato riproducibile nell'86,7%: la maggior parte dei soggetti presentava valori di IFN γ nettamente al di sotto e al di sopra dei valori di cut-off di 0,35 UI/ml. Nella nostra popolazione la varianza riscontrata nei soggetti Negativi confermati e nei Positivi confermati è minima rispetto alla rispettiva media. I soggetti Negativi confermati presentano valori medi molto bassi di produzione di IFN γ e diversi in modo statisticamente significativo da quelli dei soggetti appartenenti alle altre categorie: nessuno infatti delle altre categorie rientra nell'IC95% della media dei Negativi confermati, tranne i soggetti Indeterminati transitori. Valori molto bassi di IFN γ e prossimi allo zero nei soggetti negativi sono stati evidenziati anche nello studio di Veerapathran *et al*, (2008). I soggetti Positivi confermati hanno invece valori medi molto

elevati di produzione di IFN γ che risultano diversi in modo statisticamente significativo dai valori positivi medi dei soggetti appartenenti alle altre categorie.

L'analisi quantitativa dei test negativi degli Indeterminati transitori (ovvero, con un unico test indeterminato all'interno di tutti i test con esito negativo) ha dimostrato dei valori sovrapponibili a quelli dei soggetti Negativi confermati. La produzione media di IFN γ dei soggetti Negativi confermati è infatti di 0,020 UI/ml (IC95%: 0,016-0,020), mentre la produzione media dei soggetti Indeterminati transitori è di 0,025 UI/ml (IC95%: 0,011-0,039). La verosimili cause del risultato indeterminato di questi test sono pertanto secondo noi da attribuire più che ad uno stato di immunodepressione, anche se transitoria, ad errori tecnici (in fase di prelievo, conservazione campione, trasporto ed analisi). Si tratta comunque di situazioni rare (nel nostro studio si è verificato nello 0,6% dei casi).

In questo studio il QF-GIT non è stato informativo solo per un soggetto, in quanto tutti i test effettuati sono sempre risultati indeterminati (0,25% dei soggetti testati). Peraltro questo soggetto non presenta alcuna problematica clinica in grado di giustificare questa tipologia di esito.

I soggetti con esito variabile e non riproducibile del QF-GIT sono risultati il 14% della popolazione oggetto di indagine.

Le variazioni più frequenti sono risultate essere le Conversioni (in totale 35 di cui 22 in modo transitorio e 13 stabili, confermate in controlli successivi) e le Reversioni (in tutti i 18 casi confermate in controlli successivi).

Sebbene i test immunologici per la diagnosi di LTBI siano raccomandati nei test seriali (Mazurek *et al*, 2005), i dati di letteratura disponibili finalizzati all'interpretazione dei risultati nei test ripetuti non sono numerosi. Gli studi esistenti, sebbene limitati, evidenziano comunque che nelle ripetizioni seriali possono essere rilevate delle conversioni, delle reversioni e alcune modificazioni aspecifiche dei test così come accade quando si utilizza il TST (Ewer *et al*, 2006; Pai *et al*, 2006, Hill *et al*, 2007; Lee *et al*, 2007).

Gli studi relativi all'utilizzo nei test seriali dimostrano poi che gli IGRAs sono dei test dinamici e che la risposta dei T linfociti, specialmente nelle

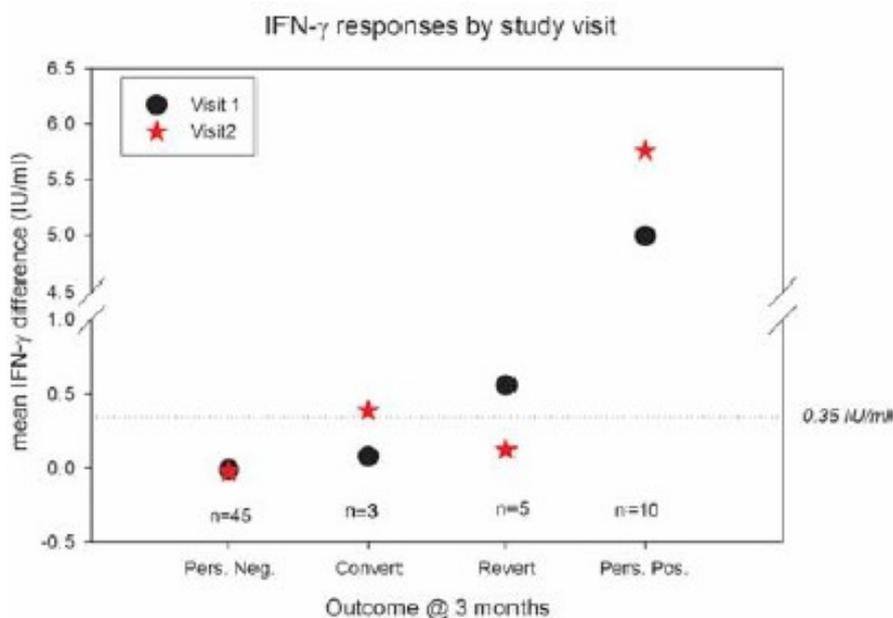
risposte debolmente positive, tendono a fluttuare, anche in assenza di uno specifico trattamento (Pai et al, 2006; Hill *et al*, 2007; Ewer *et al*, 2006) . In altri studi è stata rilevata una maggiore frequenza di esiti discordi dei test IGRAs per concentrazioni di IFN γ attorno al punto di cut-off di 0,35 UI/ml con riscontro sia di conversioni che di reversioni del test (Perry *et al*, 2008; Veerapathran *et al*, 2008). Comunque finora non si è giunti ad alcun consenso circa le modalità con cui definire ed interpretare sia le conversioni che le reversioni (Pai *et al*, 2007). Mentre per quanto riguarda le conversioni, il meccanismo alla base del fenomeno è noto ed è riconducibile ad un contatto con un soggetto affetto da TB contagiosa nota o ignota, non sono altrettanto chiari i meccanismi che sottendono alla reversione del risultato del QF-GIT da positivo a negativo. Alcune reversioni possono essere l'esito di una guarigione dall'infezione TB (spontanea o dopo trattamento). Hill *et al* (2007) ipotizzano che la reversione possa semplicemente riflettere l'andamento del ciclo vitale del *Mycobacterium tuberculosis*: l'ipotesi è che durante lo stato di quiescenza sia in grado di produrre o degli antigeni diversi da quelli individuati dai test IGRAs attualmente disponibili, oppure gli antigeni ESAT 6 e CFP10 anche se in modo intermittente. Nella nostra indagine ogni riscontro di conversione del test ha comportato l'approfondimento sia dell'anamnesi lavorativa che personale del soggetto. E' stato possibile dimostrare in tutti i casi l'occorrenza di un contatto potenzialmente contagiante con paziente affetto da TB contagiosa in ambiente lavorativo fra l'ultimo QF-GIT negativo ed il successivo QF-GIT positivo, ad eccezione di 2 situazioni per le quali l'anamnesi lavorativa e personale è risultata negativa. Infatti, se consideriamo l'entità di esposizione a rischio professionale per TB (Jensen *et al*, 2005) risulta che tra i lavoratori occupati in ambiti lavorativi classificati a rischio medio TB (ovvero dove vengono ricoverati abitualmente più di 3 pazienti affetti da TB all'anno) in 15 operatori sanitari su 214 (7%) è stata rilevata una conversione dell'esito del QF-GIT, 7 in modo transitorio e 8 in modo stabile (46 % vs. 54%). Tra gli operatori sanitari occupati in ambiti lavorativi a rischio in atto di potenziale trasmissione nosocomiale dell'infezione TB (risk of ongoing

trasmissione) per un'occasionale esposizione non protetta a paziente affetto da TB, 18 soggetti su 283 (6,3%), hanno presentato una conversione dell'esito del QF-GIT, di cui 14 in modo transitorio (77.7%) e 4 in modo stabile (22.2%).

In alcuni studi si è cercato di caratterizzare l'andamento del dato quantitativo nei soggetti con esiti del test discordanti, in particolare nei soggetti con conversioni e con reversioni del test.

Nello studio di Perry *et al* (2008) la concentrazione media dei valori positivi rilevata nei soggetti con risultati discordanti al QF-GIT testati in due occasioni non superava il valore di IFN γ di 0,68 UI/ml. Inoltre la media dei valori positivi, sia dei soggetti con conversioni che con reversioni, è risultata diversa in modo statisticamente significativo da quella dei soggetti con valori di IFN γ persistentemente positivi. (Figura 8)

Figura 10. Valori medi di produzione di IFN γ in due successivi controlli (0, 3 mesi) (da Perry S, Sanchez L, Yang S, Agarwal Z, Hurst P, Parsonnet J. Reproducibility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay. Clin Vaccine Immunol 2008, 15:425–32)



Nel nostro studio abbiamo rilevato 13 conversioni (pari al 2,5% dei soggetti testati) e 18 reversioni entrambe confermate in successivi controlli (pari al 3,4% dei soggetti testati) del QF-GIT.

I soggetti con Conversioni confermate hanno una media dei valori negativi più alta rispetto a quella dei soggetti con Reversioni confermate (0,156 vs 0,86), ma non diversa in modo statisticamente significativo (IC95% 0,053-0,119 vs IC95% 0,098-0,215). Viceversa i soggetti con Reversioni confermate hanno una media dei valori positivi più alta rispetto a quella dei soggetti con Conversioni confermate (0,957 vs 1,408), anche in questo caso la diversità non è statisticamente significativa (IC95% 0,675-1,239 vs 0,297-2,520) (tabella 7.). Sia gli operatori sanitari con Conversioni confermate che quelli con Reversioni confermate hanno una media dei valori positivi e una media dei valori negativi statisticamente diversa sia dai Positivi confermati che dai Negativi confermati. Questo dato risulta concorde con i dati di letteratura.

Alcuni studi hanno dimostrato che qualora la definizione di conversione sia basata semplicemente sul dato quantitativo, ovvero definita come il cambiamento di un test da un esito negativo ad uno positivo in controlli successivi, le conversioni risultano essere sovrastimate utilizzando gli IGRAs rispetto all'utilizzo del TST (Pai *et al*, 2006; Corbett *et al*, 2006). In letteratura esistono varie definizioni proposte di conversione che Pai *et al* (2009) hanno utilizzato in una coorte di 250 contatti verificando una certa variabilità del numero di conversioni a seconda della definizione adottata, anche se le differenze non sono risultate statisticamente significative a causa della scarsa numerosità di queste situazioni.

Harada *et al* (2004) hanno suggerito la presenza di una “grey zone” per il risultati del QF compresa tra 0,10 e 0,35 UI/ml e hanno raccomandato di escludere dal calcolo delle conversioni i risultati compresi in questo range. Pai *et al* (2009) hanno proposto ed applicato un approccio alternativo di lettura dei risultati del QF-GIT basato sulla ipotizzata presenza di “uncertainty zone” non più solo nel versante dei valori negativi, ma sia al di sopra che al di sotto del cut-off esistente di 0,35 UI/ml. Arbitrariamente hanno fissato il range di valori per definire la “uncertainty zone” ossia da 0,20 UI/ml a 0,50 UI/ml. Pertanto ogni valore < 0,20 UI/ml è stato considerato un risultato vero negativo, viceversa ogni valore > 0,50 UI/ml è

stato considerato vero positivo. La vera conversione è stata definita come un incremento del valore di IFN γ da $< 0,20$ UI/ml a $>0,50$ UI/ml in test ripetuti, la vera reversione è invece definita come un decremento del valore di IFN γ da $>0,50$ UI/ml a $< 0,20$ UI/ml in test ripetuti. I soggetti con risultati fluttuanti all'interno della zona di incertezza in test ripetuti sono stati definiti con reversione o conversione dubbia.

Se applichiamo l'interpretazione dei risultati del QF-GIT secondo il criterio della “*uncertainty zone*” alla nostra casistica risulta che il 68,7% dei soggetti con Conversioni confermate presenta valori negativi di IFN γ $< 0,20$ UI/ml, mentre il 76,7% dei soggetti ha valori positivi IFN γ $> 0,50$ UI/ml. I soggetti con Reversioni confermate presentano valori positivi di IFN γ $> 0,50$ UI/ml nel 66,3% dei casi e valori negativi $< 0,20$ UI/ml nel 82,9% dei casi. I Convertiti confermati con contemporaneamente valori di IFN γ $< 0,20$ UI/ml e $>0,50$ UI/ml in test ripetuti sono 8. I soggetti con reversioni confermate con contemporaneamente valori di IFN γ $< 0,20$ UI/ml e $>0,50$ UI/ml in test ripetuti sono 13. Se adottassimo nella nostra casistica il criterio interpretativo dei risultati proposto da Pai *et al* (2009), escludendo quelli compresi nella cosiddetta “*uncertainty zone*”, la quota di convertiti passerebbe da 13 a 8 e quella dei revertiti da 18 a 13.

Allo stato attuale non è possibile verificare quale sia la definizione più rispondente alla realtà biologica e soprattutto quale sia la definizione che permetta di individuare chi effettivamente è affetto da ITBL e necessita di trattamento preventivo. Solo studi di follow-up potranno chiarire la questione.

Nel nostro studio abbiamo documentato in 22 casi (4,1%) la presenza di una conversione transitoria del QF-GIT.

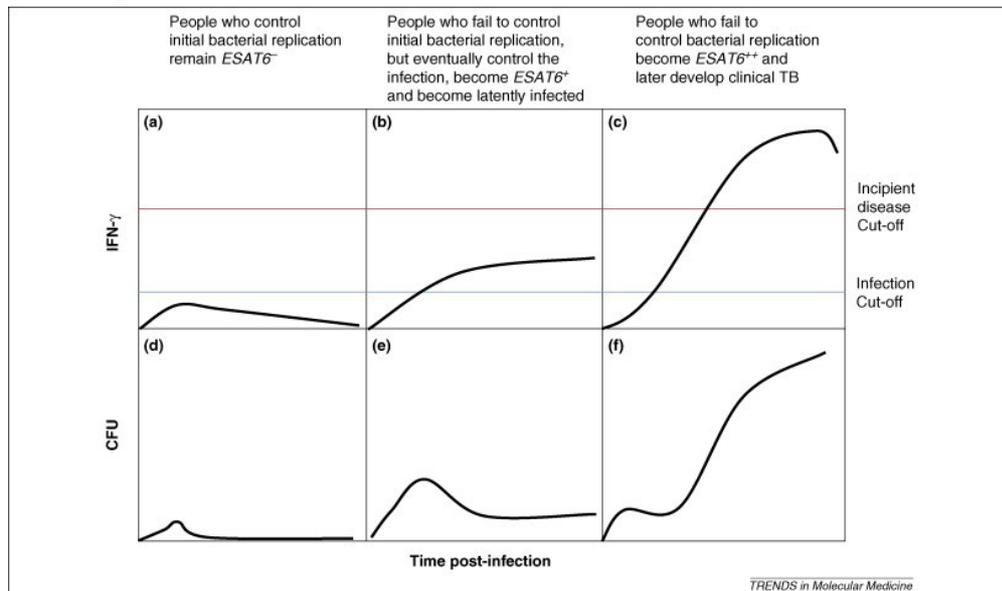
Le conversioni transitorie sono circostanze già rilevate in letteratura (Ewer *et al*, 2006, Nardell and Wallis, 2006). Nello studio di Ewer *et al*. finalizzato al controllo post-esposizione TB in una comunità scolastica è emersa una significativa riduzione della risposta del test IGRA (ELIspot) con negativizzazione del risultato in un gruppo di contatti TST negativi durante il follow-up che non erano stati sottoposti a chemioprophilassi (pari al 50% dei

contatti con TST negativo ed IGRA positivo). Lo studio pone come possibile ipotesi interpretativa l'instaurarsi in questi soggetti di un'infezione tubercolare transitoria rilevata in base alla specifica risposta dei T linfociti effettori e giustifica l'assenza di una successiva risposta dei T linfociti memoria con l'intervento di un processo di autocura con eliminazione del *Mycobacterium tuberculosis*.

Il controllo dell'iniziale replicazione batterica e l'intervento di un possibile fenomeno di autocura ad opera del sistema immunitario è stato considerato anche nello studio di Andersen *et al* (2007) (Figura 9).

Figura 11. Possibili relazioni esistenti tra carica batterica (CFUs), risposta ad Ag Mt e quadro clinico.

(Da Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? Trends in Molecular Medicine 2007; 13:175-82.)



Infine nella nostra casistica 10 soggetti (1,9 %) hanno presentato variazioni aspecifiche o di incerto significato del test (rientrano in questo gruppo sia 6 soggetti con un unico test dall'esito negativo tra tutti positivi definiti Negativi transitori, sia 4 soggetti con esiti alternanti del test da positivo a negativo e viceversa definiti dagli Esiti alternanti). I risultati negativi di questi soggetti evidenziano una maggiore dispersione rispetto alle altre categorie, mentre questo aspetto non si evidenzia per i valori positivi.

Questa categoria di soggetti necessita di un attento follow-up.

L'analisi logit della probabilità di risultare Positivi o Negativi confermati evidenzia che, controllando per genere, età e qualifica professionale, le donne e i soggetti con età più avanzata (e quindi con maggiore probabilità di esposizione) risultano con maggiore probabilità affetti da infezione tubercolare latente. Il risultato statisticamente significativo relativamente alle donne è probabile dipenda dalla sovra rappresentazione del genere femminile nella popolazione esaminata. Al contrario, i medici risultano avere una minore probabilità di risultare Positivo confermati. Questo può essere spiegato da una minore esposizione connessa con la tipologia di attività lavorativa che prevede contatti brevi e meno frequenti con i pazienti affetti da TB. Un'ulteriore plausibile spiegazione può essere attribuibile con la diversa estrazione socio-economica dei medici rispetto alle altre categorie professionale anche se nella nostra analisi non possiamo controllare per questa variabile.

6.4. Conclusioni

Il presente studio aveva come obiettivo l'analisi dell'affidabilità del QF-GIT nelle ripetizioni seriali e la quantificazione delle variazioni osservate (in particolare conversioni, reversioni e variazioni aspecifiche del test) e la valutazione della possibile correlazione dell'esito del QF-GIT con alcune variabili individuali (sesso, età, qualifica professionale).

Avevamo ipotizzato che il test QF-GIT fosse accurato, affidabile e in grado di dosare in modo preciso e riproducibile la quantità di IFN- γ prodotto dai T linfociti del sangue periferico dei soggetti testati.

Dalla nostra analisi emerge che:

- a) nell'86% dei soggetti il risultato è confermato nei test multipli;
- b) nel 10% dei casi (in soggetti con conversioni e reversioni) sono state documentate variazioni con plausibilità biologica che possono giustificare la modificazione;
- c) nel 1,9% dei casi vi sono state variazioni aspecifiche che richiedono un'ulteriore analisi;
- d) in un ridotto numero di casi (10, pari al 1,9%) vi possono essere occasionali risultati indeterminati attribuibili ad errori tecnici;
- e) in 1 caso (0,18%) il test è risultato indeterminato in tutte le occasioni.

Inoltre avevamo ipotizzato che la produzione di IFN- γ a seguito dell'instaurarsi dell'infezione tubercolare latente non fosse di tipo OFF-ON, ma la sua entità fosse proporzionale allo stato del sistema immunitario nei confronti dell'ITBL.

Dalla nostra analisi emerge che:

- a) nei soggetti Negativi confermati il valore numerico del QF-GIT è molto basso (i valori sono nel 96,2% dei casi $\leq 0,1$ UI/ml; nel 99 % dei casi i valori sono $\leq 0,2$ UI/ml) e il valore è molto stabile: media 0,018 (CI 95% 0,016-0,020);

- b) nei soggetti Positivi confermati il valore numerico del test è molto alto (nel 81% dei casi ha un valore ≥ 1 UI/ml) e la variabilità di questi valori è più ampia rispetto ai soggetti Negativi confermati, peraltro in un range di molto superiore al cut-off di riferimento;
- c) i soggetti con conversioni e reversioni hanno:
 - (i) valori negativi tendenzialmente maggiori rispetto a quelli dei soggetti Negativi confermati;
 - (ii) valori positivi inferiori rispetto a quelli dei soggetti Positivi confermati.

Dallo studio emerge inoltre che la probabilità di risultare affetto da infezione tubercolare latente è positivamente correlata con il genere, l'età e la qualifica professionale.

Possiamo quindi concludere che in base ai risultati di questa indagine il QF-GIT è un test affidabile e dai risultati riproducibili nel tempo che lo rendono uno strumento valido nell'utilizzo in popolazioni selezionate, quali gli operatori sanitari, nell'ambito di programmi di sorveglianza e controllo dell'infezione tubercolare latente.

7. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Bruno Saia e il Prof. Riccardo Manganelli per la loro attenta supervisione durante tutto il periodo del dottorato di ricerca.

Ringrazio inoltre le Dott.sse Marta Peracchi e Loredana Fallico per la preziosa collaborazione e per il contributo materiale al lavoro.

La mia più grande stima e riconoscenza va alla Dott.ssa Caterina Zanetti per l'aiuto e la disponibilità dimostrata lungo tutto il percorso e per l'amore per il sapere che è sempre riuscita a trasmettermi.

Non posso qui non menzionare gli Infermieri Raffaella Baggio, Francesca Scarpazza e Fulvio Gardin che ringrazio di cuore per l'aiuto fornito nella faticosa gestione dei dati, attività indispensabile per la realizzazione di questo progetto.

8. BIBLIOGRAFIA

Aagaard C, Brock I, Olsen A, Ottenhoff THM, Weldingh K, Andersen P. *Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: Two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the Mycobacterium tuberculosis complex*. Journal Of Infectious Diseases 2004;189(5):812-819

American Thoracic Society. *Diagnostic standards and classification of Tuberculosis in adults and children*. Am J Respir Crit Care Med 2000a;161:1376-1395

American Thoracic Society. *Targeted tuberculin testing and treatment of latent tuberculosis infection* 2000b;161:S221-S247

American Thoracic Society, CDC and Infectious Disease Society of America. *Controlling tuberculosis in the United States*. MMWR 2005;54:1-81

Andersen AB, Yuan ZL, Haslow K, Vergmann B, Bennedsen J. *Interspecies reactivity of five monoclonal antibodies to Mycobacterium tuberculosis as examined by immunoblotting and enzyme-linked immunosorbant assay*. J Clin Microbiol 1986;232:446-51

Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. *Recall of long-lived immunity to Mycobacterium tuberculosis infection in mice*. J Immunol 1995;154:3359-72

Andersen P, Munk ME, Pollok JM, Doherty TM. *Specific immune-based diagnosis of tuberculosis*. Lancet 2000;356:1099-104

Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. *The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted?* Trends in Molecular Medicine 2007;13:175-82

Bass JB, Serio RA. *The use of repeat skin test to eliminate the booster phenomenon in serial tuberculin testing.* Am Rev Respir Dis 1981;123:394-396

Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. *Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray.* Science 1999;284:1520-3

Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. *A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT6 and a novel low molecular-mass culture filtrate protein [CFP10].* Microbiol 1998;144:3195-203

Black GF, Weir RE, Floyd S, Bliss L, Warndorff DK, Crampin AC, Ngwira B, Sichali L, Nazareth B, Blackwell JM, Branson K, Steven D, Chaguluka SD, Donovan L, Jarman E, King E, Fine PEM, Dockrell HM. *BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and UK: two randomised controlled studies.* Lancet 2002;359(9315):1393-401

Bloom BR, Murray CJL (1992). *Tuberculosis: commentary on a reemergent killer.* Science 1992;257:1055-64

Brock I, Weldingh K, Lillebaek T, Follmann F, Andersen P. *Comparison of tuberculin skin test and new specific blood test in tuberculosis contacts.* Am J Respir Crit Care Med. 2004;170:65-69

Brosch R, Gordon SV, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Soravito C, Barrell BG, Cole ST. *Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics.* Infect Immunol 1998;66:2221-9

Chaparas SD, Vandiviere HM, Melvin I, Koch G, Becker C. *Tuberculin test. Variability with the Mantoux procedure.* Am Rev Resp Dis 1985;132(1):175-7

Coates AR, Hewitt J, Allen BW, Ivanji J, Mitchinson DA. *Antigenic density of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis detected by means of monoclonal antibodies.* Lancet 1981;2:167-69

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry III CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence.* Nature 1998;393:537-44

Corbett EL, Kathryn C, Millington KA, *et al.* *Tuberculosis infection in African nursing students:tuberculin skin test compared to ELISPOT conversion rates.* Int J Tuber Lung Dis 2006;10(Suppl1):S231

Diel R, Ernst M, Doscher G, Visuri-Karbe L, Greinert U, Niemann S, Nienhaus A, Lange C. *Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting Mycobacterium tuberculosis infection with a blood test.* Eur Respir J 2006;28:16-23

Dillon DC, Anderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YAWS,¹ Thomas Vedvick T, Badaro R, Reed SG, Houghton R. *Molecular and immunological characterization of Mycobacterium tuberculosis CFP10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bovis BCG*. J Clin Microbiol 2000;38:3285-90

Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P. *Delayed-type hypersensitivity responses to ESAT6 and MPT64 from Mycobacterium tuberculosis in the guinea pig*. Infect Immun 1998;66 3454-6

European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. *Tuberculosis surveillance in Europe 2007*. Stockholm, European Centre for Disease Prevention and Control, 2009

Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalavani A. *Dynamic antigen-specific t-cell responses after point-source exposure to Mycobacterium tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:831-9

Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. *False positive tuberculin skin test: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria?*. Int J Lung Dis 2006;10(11):1192-1204

Fennelly KP, Iseman MD. *Health care workers and tuberculosis: the battle of a century*. Int J Lung Dis 1999;3(5):363-364

Flynn JAL, Chan J. *Tuberculosis: latency and reactivation*. Infect Immun 2001;69:4195-201

Flynn JAL, Chan J. *Immune evasion by Mycobacterium tuberculosis: living with the enemy*. Curr Opin Immunol 2003;15:450-5

Gardam MA, Keystone EC, Menzies R, Manners S, Skamene E, Long R, Vinh DC. *Anti-tumour necrosis agents and tuberculosis risk: mechanism of action and clinical management*. Lancet Infect Dis 2003;3(5):270-1

Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Einglmeier K, Cole ST. *Identification of variable regions in the genome tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays*. Mol Microbiol 1999;32:643-55

Harada N, Higuchi K, Sekijya, Rothel J, Kitoh T, Mori T. *Basic characteristics of a novel diagnostic method (QuantiFERON TB-2G) for latent tuberculosis infection with the use of Mycobacterium specific antigens, ESAT-6 and CFP-10*. Kekkaku 2004 (abstract) ;79:725-735 [Japanese]

Harboe M, Nagai S, Patarroyo ME, Torres ML, Ramirez C, Cruz N. *Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG*. Infect Immun 1986;52:293-302

Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. *Evidence for occurrence of the ESAT 6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG*. Infect Immun 1996;64:16-22

Havlir DV, Barnes PF. *Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection*. N Engl J Med. 1999;340:367–73

Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD, Donkor SA, Adetifa IM, de Jong BC, Aiken AM, Adegbola RA, McAdam KP. *Longitudinal assessment of an ELISPOT test for Mycobacterium tuberculosis infection*. PloS Med 2007;4:e192

Hirsch CS, Toossi Z, Othieno C, Johnson JL, Schwander SK, Robertson S, Wallis RS, Edmonds K, Okwera A, Mugerwa R, Peters P and Ellner JJ. *Depressed T-cell interferon- γ responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanism and modulation with therapy.* J Infect Dis 1999;180:2069-73

Houben ENG, Nguyen L, Pieters J. *Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system.* Curr Opin Microbiol 2005;9:1-10

Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. *The tuberculin skin test.* Clinical Infectious Diseases 1993;17:368-75

Jasmer RM, Nahid P, Hopewell PC. *Clinical practice. Latent tuberculosis infection.* N Engl J Med 2002;347(23):1860-6

Jensen PA, Lambert LA, Iademarco MF, Ridzon R. *Guidelines for preventing the transmission of Mycobacterium tuberculosis in Healthcare Setting, 2005.* MMWR 2005;54:1-141

Kaufmann SHE. *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?.* Nature Reviews Immunol 2001;1:20-30

Kaufmann SHE. *Killing vs suicide in antibacterial defence.* Trends Microbiol 1999; 7:59-61

Kusner DJ. *Mechanism of mycobacterial persistence in tuberculosis.* Clin Immunol 2005;114:239-47

Lalvani A, Pathan AA, Durkan H, Wilkinson RJ, Whelan A, Deeks JJ, Reece WH, Latif M, Pasvol G, Hill AV. *Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T cells.* Lancet 2001a;357:2017-2021

Lalvani A, Pathan AA, McShane H, Wilkinson RJ, Latif M, Conlon CP, Pasvol G, Hill AVS. *Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T cells.* Am J Respir Crit Care Med 2001b;163:824-8

Lee SS, Liu YC, Huang TS, Chen YS, Tsai HC, Wann SR, Lin HH. *Comparison of the interferon- gamma release assay and the tuberculin skin test for contact investigation of tuberculosis in BCG-vaccinated health care workers.* Scand J Infect Dis 2007:373-80

Li H, Ulstrup JC, Jonassen TO, Melby K, Nagai S, Harboe M. *Evidence of absence of the MPB64 gene in some substrains of Mycobacterium bovis BCG.* Infect Immun 1993; 61:1730-34

Lysashchenko K, Colangeli R, Houde M, Al Jahdali H, Menzies D, Gennaro ML. *Heterogeneous antibody responses in tuberculosis.* Infect Immun 1998;66:3936-40

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. *Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent Mycobacterium bovis.* J Bacteriol 1996;178:1274-82

Mazurek GH, LoBue P, Daley CL, Bernardo J, Lardizabal AA, Bishai WR, Iademarco MF, Rothel JS. *Comparison of a whole-blood interferon gamma assay with tuberculin skin for detecting latent Mycobacterium tuberculosis infection.* JAMA 2001;286(14):1740-7

Mazurek GH, Villarino ME. *Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosis Mycobacterium tuberculosis infection*. Centre for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep 2003;52:15-8

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

Menzies D. *Interpretation of repeated tuberculin tests. Boosting, conversion, and reversion*. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:15-21

Menzies D, Pai M, Comstock G. *Meta-analysis: new test for the diagnosis of latent tuberculosis infection: areas of uncertainty and recommendation for research*. Ann Intern Med 2007;146:340-54

Ministero del Lavoro Salute e Politiche Sociali. *Epidemiologia della tubercolosi in Italia (anni 1995-2007)*
(www.ministerosalute.it/malattieInfettive/malattieInfettive.jsp)

Murray PR. *et al*. Medical Microbiology. 5th edition 2005 University of Maryland, Baltimore, Brandon-Hill.

Mustafa AS, Amoudy HA, Wiker HG, Abal AT, Ravn P, Oftung F and Andersen P. *Comparison of antigen-specific T-cell responses of tuberculosis patients using complex or single antigens of Mycobacterium tuberculosis*. Scand J Immunol 1998;48:535-43

Nardell EA, Wallis RS. *Here today-gone tomorrow: the case for transient acute tuberculosis infection*. Am J Respir Crit Care Med 2006;174:734-35

Nienhaus A, Schablon A, Diel R. *Interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent TB diagnosis – analysis of discordant results, when compared to the tuberculin skin test.* PLoS ONE 2008;3:e2665

Pai M, Joshi R, Dogra S, Mendiratta DK, Narang P, Kalantri S, Reingold AL, Colford JM Jr, Riley LW and Menzies D. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon- γ assay. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 349-55

Pai M, Dheda K, Cunningham J, Scano F, O'Brien R. *T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward.* Lancet Infect Dis 2007; 7:428-38

Pai M, Zwerling A, Menzies D. *Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update.* Ann Intern Med 2008;149:177-84

Pai M, Joshi R, Dogra S, Zwerling AA, Gajalakshmi D, Goswami K, Reddy MVR, Kalantri S, Hill PC, Menzies D, Hopewell PC. *T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India.* Int J Tuberc Lung Dis 2009;13:84–92

Parkash O, Singh BP, Pai M. *Regions of differences encoded antigen as targets for immunodiagnosis of tuberculosis in humans.* Scandinavian Journal of Immunology 2009; 70:345-57

Perry S, Sanchez L, Yang S, Agarwal Z, Hurst P, and Parsonnet J. Reproducibility of QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15(3): 425-32

Philipp WJ, Nair S, Guglielmi G, Lagranderie M, Gicquel B, Cole ST. *Physical mapping of Mycobacterium bovis BCG Pasteur reveals differences from the genome map of Mycobacterium tuberculosis H37Rv and from Mycobacterium bovis.* Microbiol 1996;142:3135-45

Pollock JM, Andersen P. *The potential of the ESAT6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis.* J Infect Dis 1997;175:1251-4

Pouchot J, Grasland A, Collet C, Coste J, Esdaile JM, Vincenaux P. *Reliability of tuberculin skin test measurement.* Ann Intern Med 1997;126(3):210-4

Direzione per la Prevenzione della Regione Veneto. *TB nella Regione Veneto. Dati al 31 dicembre 2009*
www.regione.veneto.it/Servizi+alla+Persona/Sanita/Prevenzione/Malattie+Infettive/Tubercolosi

Richeldi L. *An Update on the diagnosis of tuberculosis infection.* Am J Respir Crit Care Med 2006;174:736-42

Rieder HL. *Epidemiologic basis of tuberculosis control.* Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 1999.

Ringshausen FC, Schlosser S, Nienhaus A, Schablon A, Schultze-Werninghaus G, Rohde G. *In-hospital contact investigation among health care workers after exposure to smear-negative tuberculosis.* J Occup Med Toxicol 2009;4:1-11

Roche PW, Feng CG, Britton WJ. *Human T cell epitopes on the Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64.* Scand J Immunol 1996;43:662-70

Rothel JS, Jones SL, Corner LA, Cox JC, Wood PR. *A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle* (abstract). *Aust Vet J* 1990;67(4):134-7

Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SHE. *Confrontation between intracellular bacteria and the immune system*. *Adv Immunol* 1999;71:267-377

Sepkowitz KA. *Tuberculosis and the health care worker: a historical perspective*. *Ann Intern Med* 1994;120:71-79

Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. *Purification and characterization of a low molecular mass T cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710-7

Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T, Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. *An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin*. *Science* 1998;282:121-5

Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. *Latent tuberculosis: mechanism of host and bacillus that contribute to persistent infection*. *Lancet Infect Dis* 2003;3:578-90

Ulrichs T, Munk M E, Mollenkopf H, Behr-Perst S, Colangeli R, Gennaro M L, Kaufmann SHE. *Differential T cell responses to Mycobacterium tuberculosis ESAT 6 in tuberculosis patients and healthy donors*. *Eur J Immunol* 1998;28:3949-58

Vinton P, Mhrshahi S, Johnson P, Jenkin GA, Jolley D, Biggs BA. *Comparison of QuantiFERON-TB Gold in Tube Test and tuberculin skin test for identification of latent Mycobacterium tuberculosis infection in healthcare staff and association between positive test results and known risk factors for infection.* Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30:215-21
WHO. *Global tuberculosis control - epidemiology, strategy, financing.* WHO Report 2009

Wood PR, Corner LA, Plackett P. *Development of a simple, rapid in vitro cellular assay for bovine tuberculosis based on the production of gamma interferon (abstract).* Res Vet Sci 1990;49(1):46-9