

Joanna Klimiuk, Rafał Krenke

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: prof. dr hab. n. med. R. Chazan

Rola biomarkerów w diagnostyce gruźliczego wysiękowego zapalenia opłucnej

Role of biomarkers in making the diagnosis of tuberculous pleurisy

Abstract

Although tuberculosis is one of the most common causes of pleural effusion, diagnosis of tuberculous pleuritis still remains a challenge. This is due to paucity of *M. tuberculosis* organisms in pleural effusion which results in a relatively low sensitivity of the routinely used diagnostic methods. Thus, different biomarkers in pleural effusion have been extensively studied in order to improve the diagnostic accuracy. Pleural fluid deaminase adenosine activity (ADA) and interferon gamma (IFN- γ) concentration have been shown to be the most reliable and cost-effective markers of tuberculous pleurisy. Hence, these markers have been included in different diagnostic algorithms for patients suspected of tuberculous pleurisy. A high variability of the diagnostic performance and/or more advanced technical demands significantly limit the use of other relatively new diagnostic methods, such as nucleic acid amplification tests (NAATs) and IFN- γ releasing assays (IGRAs). The article presents a current data on the potential use of different biomarkers in the diagnosis of tuberculous pleurisy.

Key words: tuberculous pleurisy, tuberculous pleural effusion, biomarkers, adenosine deaminase (ADA), interferon gamma (IFN- γ), interferon gamma releasing assays (IGRAs), interleukin 12 (IL-12), interferon-inducible protein 10 (IP-10)

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 4: 288–297

Streszczenie

Chociaż gruźlicze wysiękowe zapalenie opłucnej stanowi jedną z najczęstszych przyczyn pojawienia się płynu w opłucnej, to jednak potwierdzenie gruźliczej etiologii wysięku nie należy do łatwych. Wynika to ze stosunkowo niewielkiej liczby drobnoustrojów *M. tuberculosis* w płynie, co stanowi główną przyczynę niskiej czułości rutynowo stosowanych metod diagnostycznych. Dlatego też przeprowadzono liczne badania nad różnymi, potencjalnymi biomarkerami gruźliczego zapalenia opłucnej, których oznaczanie w płynie z opłucnej mogłoby przyczynić się do poprawy skuteczności diagnostycznej. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że największą czułością i swoistością, a także najkorzystniejszym współczynnikiem „koszt/efektywność” cechuje się oznaczanie aktywności deaminazy adenozy (ADA) i stężenia interferonu gamma (IFN- γ). Dlatego też badanie ADA i IFN- γ stanowi jeden z ważnych elementów algorytmów diagnostycznych ukierunkowanych na rozpoznanie gruźliczego zapalenia opłucnej. Chociaż wyniki uzyskane dla innych testów diagnostycznych są obiecujące (np. metody identyfikacji swoistych sekwencji kwasów nukleinowych lub też pomiar wydzielania IFN- γ pod wpływem stymulacji antygenami *M. tuberculosis*), to jednak ich praktyczne zastosowanie ogranicza znaczne zróżnicowanie wyników, a także większe koszty i stopień ich technicznego skomplikowania. W niniejszym artykule omówiono wyniki dotychczasowych badań nad zastosowaniem wielu różnorodnych biomarkerów w diagnostyce gruźliczego wysięku w opłucnej.

Słowa kluczowe: gruźlicze zapalenie opłucnej, biomarkery, deaminaza adenozy (ADA), interferon gamma (IFN- γ), testy uwalniania interferonu gamma, interleukina 12 (IL-12), białko indukowane interferonem 10 (IP-10)

Pneumonol. Alergol. Pol. 2011; 79, 4: 288–297

Adres do korespondencji: dr n. med. Rafał Krenke, Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1A, 02–097 Warszawa, e-mail: rafalkrenke@interia.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 02.08.2010 r.
Copyright © 2011 Via Medica
ISSN 0867–7077

Wstęp

Gruźlicze wysiękowe zapalenie płucnej (GWZO) jest jedną z najczęstszych postaci gruźlicy pozapłucnej. Według danych epidemiologicznych ze Stanów Zjednoczonych GWZO stanowi drugą co do częstości (po gruźlicy węzłowej) postać gruźlicy pozapłucnej [1, 2]. W Polsce, odnotowuje się rocznie 300–400 przypadków GWZO (ok. 3,5% wszystkich postaci gruźlicy), co stawia ją na pierwszym miejscu pod względem częstości wśród wszystkich pozapłucnych postaci gruźlicy [3]. W innych krajach, na przykład Stanach Zjednoczonych czy Brazylii, odsetek GWZO jest bardzo zbliżony (3,3–4,1%). Część badaczy uważa jednak, że liczba przypadków GWZO może być niedoszacowana [4]. Ważną i coraz liczniejszą grupę chorych, u których względna częstość gruźlicy pozapłucnej (także GWZO) jest większa niż w pozostałej populacji stanowią osoby z zaburzeniami odporności (np. zakażeni HIV lub leczeni preparatami immunosupresyjnymi).

W wielu krajach gruźlicze wysiękowe zapalenie płucnej stanowi najczęstszą przyczynę wysięku płucnowego [5, 6]. Dane dotyczące procentowego udziału wysięków gruźliczych wśród wszystkich przypadków występowania płynu w płucnej są zróżnicowane. Wyniki badań przeprowadzonych w jednym z regionów Hiszpanii, w którym współczynnik zapadalności na gruźlicę jest stosunkowo wysoki (55–68 nowych zachorowań/100 000/rok), wykazały, że GWZO stanowi najczęstszą przyczynę występowania płynu w płucnej [7]. Z kolei w Czechach nie stwierdzono ani jednego przypadku GWZO u 142 chorych, u których wykazano obecność płynu w płucnej [8]. Dla porównania w badaniach prowadzonych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie częstość występowania GWZO wynosiła 11,5–15% wszystkich płynów płucnowych [9].

Jedną z przyczyn przedstawionych różnic epidemiologicznych mogą być trudności w potwierdzeniu gruźliczej etiologii wysięku i wynikające z nich niedoszacowanie rzeczywistej liczby przypadków. Trudności diagnostyczne są związane ze stosunkowo małą czułością mikrobiologicznych metod identyfikacji prątków gruźlicy w płynie z płucnej, a także z naturalnym przebiegiem choroby. Nierozpoznane i nieleczone GWZO ma zwykle przebieg samoograniczający się. Zwykle w okresie 4–16 tygodni od chwili pojawienia się pierwszych objawów następuje znaczne ich złagodzenie lub ustąpienie. Jeśli w tym czasie rozpoznanie nie zostanie ustalone, choroba pozostaje nierozpozna-

na. Niezwykle ważne znaczenie kliniczne i epidemiologiczne ma jednak fakt, że u tych chorych ryzyko rozwoju gruźlicy płuc lub nawrotu gruźliczego zapalenia płucnej w kolejnych latach sięga 43–65% [10, 11]. W związku z przytoczonymi danymi nie dziwi zainteresowanie licznymi biomarkerami, które mogą mieć potencjalne znaczenie w diagnostyce GWZO [12]. W niniejszym artykule przedstawiono wybrane informacje o rutynowo stosowanych metodach diagnostycznych, a następnie omówiono wyniki badań nad zastosowaniem różnych biomarkerów.

Rutynowe metody stosowane w diagnostyce gruźliczego wysiękowego zapalenia płucnej

Badanie składu chemicznego i komórkowego płynu z płucnej

Rutynowe badanie płynu płucnowego obejmujące jego właściwości fizykochemiczne oraz skład komórkowy pozwala jedynie na sklasyfikowanie płynu jako wysiękowego lub przesiekowego oraz wstępne wnioskowanie o najbardziej prawdopodobnych chorobach stanowiących jego przyczynę. We wszystkich przypadkach gruźliczego zapalenia płucnej płyn wykazuje cechy wysięku, zaś całkowita liczba komórek w płynie waha się zwykle w granicach 1000–4500/mm³ z wyraźną przewagą limfocytów (> 75%) [4, 12, 13]. Limfocytoza płynu nie jest jednak cechą swoistą — do innych przyczyn limfocytnego wysięku w płucnej należy między innymi wysięk nowotworowy. U pacjentów w niektórych okresach choroby w wysięku mogą przeważać granulocyty obojętnochłonne lub kwasochłonne [14, 15]. Tak więc rutynowe badanie składu chemicznego i składu komórkowego płynu nie może stanowić wiarygodnej podstawy rozpoznania gruźliczej etiologii wysięku.

Badania mikrobiologiczne płynu płucnowego

Mikrobiologiczna diagnostyka GWZO nie należy do łatwych. Wiadomo, że gruźliczy wysięk w płucnej jest materiałem skąpoprątkowym. Dlatego metody polegające na wykrywaniu w nim prątków cechują się ograniczoną czułością. Połączona czułość mikroskopii bezpośredniej i badań hodowlanych wynosi poniżej 50% [4, 13, 16]. Wiele nadziei na poprawę skuteczności diagnostycznej GWZO wiązano z wprowadzeniem metod wykrywania materiału genetycznego *M. tuberculosis* w płynie z płucnej. W metaanalizie 40 badań Pai i wsp. stwierdzili, że dzięki swej wysokiej swoistości (93–98%) testy oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych (NAATs, *nucleic acid amplification*

tests) mogą odgrywać ważną rolę w potwierdzaniu rozpoznania GWZO. Z drugiej jednak strony charakteryzują się one stosunkowo niską czułością (średnia dla komercyjnie dostępnych testów wynosi około 62%), co przy negatywnym wyniku testu nie pozwala na wykluczenie choroby [11, 17]. Co prawda, wyniki późniejszych badań wykazały, że czułość NAATs może być wyższa i sięgać 82–87%, jednakże swoistość okazała się niższa niż to przedstawiono we wcześniej cytowanej metaanalizie (85–92% u dorosłych i 75% u dzieci) [18–20]. Przyczyna ograniczonej czułości NAATs w badaniu gruźliczego wysięku z opłucnej nie jest jasna. Próbuje się ją tłumaczyć możliwą obecnością inhibitorów reakcji występujących w płynie opłucnowym. Jednak wobec otrzymywanych dodatnich wyników wewnętrznej kontroli testu w obecności inhibitorów tłumaczenie takie wydaje się niesatisfakcjonujące. Istotną rolę może odgrywać niewielka ilość materiału genetycznego *M. tuberculosis* w płynie opłucnowym. Wydaje się także, że różnice w czułości diagnostycznej mogą mieć związek z jakością stosowanych testów oraz technicznymi aspektami wykonania badań [17].

Badanie histologiczne i mikrobiologiczne biopłatów opłucnej

Skuteczność diagnostyczna metod biopsyjnych i badań biopłatów opłucnej przewyższa skuteczność wszystkich innych metod stosowanych w diagnostyce GWZO. Jest to związane nie tylko z możliwością znalezienia typowej ziarniny w badaniu histologicznym, ale także wyższej czułości badań mikrobiologicznych biopłatów niż badań płynu. W przypadku stosowania przezskórnej igłowej biopsji opłucnej czułość połączonych badań histologicznych i mikrobiologicznych osiąga 79,0–91,5%. Badanie licznych biopłatów pobranych podczas torakoskopii umożliwia uzyskanie niemal 100% czułości diagnostycznej [21, 22]. Zastosowanie dodatkowych technik obrazowania pozwala dodatkowo zwiększyć czułość przezklatkowej biopsji opłucnej. Dlatego metody biopsyjne są uważane wciąż za „złoty standard” rozpoznania gruźlicy opłucnej [12, 13, 23]. Są one jednak stosunkowo inwazyjne, kosztowne i wymagają dużych umiejętności oraz doświadczenia osób wykonujących badanie.

Nieswoiste biomarkery zapalenia i odpowiedzi immunologicznej

Poznanie immunopatogenezy gruźlicy opłucnej umożliwiło podjęcie badań nad wykorzystaniem markerów biologicznych do diagnostyki róż-

nicowej GWZO. Większość przedstawionych w dalszej części artykułu biomarkerów jest wydzielana w przebiegu reakcji immunologicznych wywołanych zakażeniem *M. tuberculosis* [12, 24].

Deaminaza adenozyń

Deaminaza adenozyń (ADA, *adenosine deaminase*), enzym uczestniczący w przemianach adenozyń i deoksyadenozyń, występuje w postaci dwóch izoenzymów różniących się powinowactwem do wyżej wymienionych substratów. Izoenzym ADA1 jest obecny w różnych komórkach, w tym między innymi limfocytach, makrofagach i neutrofilach, podczas gdy ADA2 to izoenzym występujący wyłącznie w monocytach i makrofagach. Wysoka całkowita aktywność ADA w gruźliczym wysięku w opłucnej zależy głównie od zwiększonej aktywności ADA2 wydzielanej przez pobudzone monocyty i makrofagi [25].

Diagnostyczna wartość ADA u chorych na GWZO jest wyjątkowo dobrze udokumentowana. W ciągu ostatnich 30 lat opublikowano wyniki ponad 100 badań poświęconych roli ADA w różnicowaniu gruźliczych i niegruźliczych wysięków w jamie opłucnej. Przeprowadzono także 4 metaanalizy, w których uwzględniono łącznie wyniki 77 badań — we wszystkich połączona wartość czułości i swoistości (punkt Q na krzywej ROC) pomiaru ADA w płynie z opłucnej dla rozpoznania GWZO wahała się w wąskim zakresie 91–93% [26–29]. Obliczone średnie wartości czułości i swoistości były zbliżone do odpowiednio 92 i 89% [26–29].

Najczęściej stosowaną do pomiaru stężenia ADA w płynie z opłucnej jest metoda kolorymetryczna według Giusti. Chociaż graniczna wartość ADA przyjmowana przez różnych autorów waha się w dość szerokich granicach, w większości badań zawiera się jednak między 40,0–60,0 j.m./l (wartości powyżej przyjętego progu są typowe dla GWZO). W polskiej populacji wartość graniczna obliczona na podstawie analizy ROC była równa 40,3 j.m./l, a więc była niemal taka sama jak stosowana przez większość badaczy wartość odcięcia równa 40,0 j.m./l [12]. W praktyce wartość odcięcia może być ustalona także na innym poziomie, co pozwala na zwiększenie czułości (obniżenie wartości odcięcia) lub też swoistości (podwyższenie wartości odcięcia) metody. Może to mieć zastosowanie w populacjach o istotnie różnym prawdopodobieństwie wystąpienia GWZO. W populacji o wysokiej częstości gruźliczego zapalenia opłucnej dodatni wynik testu może być traktowany jako potwierdzenie gruźliczej etiologii wysięku. W populacji o małej częstości GWZO pozytywna wartość predykcyjna testu jest znacznie niższa

i nie może stanowić podstawy rozpoznania. W takiej populacji można natomiast wykorzystać wysoką negatywną wartość predykcyjną testu — jego ujemny wynik pozwala na wiarygodne wykluczenie etiologii gruźliczej [24, 25].

W kilku badaniach porównawczych wykazano przewagę czułości diagnostycznej pomiaru aktywności ADA w płynie z opłucnej nad NAATs, jak również nad badaniami histologicznymi [30, 31]. Należy jednak zaznaczyć, że w jednym z badań nie udało się wykazać takiej prawidłowości.

Najpoważniejsze ograniczenie związane z wykorzystaniem ADA w diagnostyce GWZO stanowi fakt, że podwyższoną aktywność enzymu stwierdza się także w ponad połowie przypadków ropniaków opłucnej wywołanych zakażeniem bakteriami nieswoistymi. Co prawda u wielu chorych dane epidemiologiczne, objawy kliniczne i przebieg choroby pozwalają na stosunkowo łatwe rozróżnienie tych dwóch stanów, jednak w niektórych przypadkach różnicowanie może być trudniejsze. Dla poprawy swoistości diagnostycznej ADA zaproponowano dwa rozwiązania. Pierwsze z nich to oznaczanie izoenzymów w płynie. W przypadku GWZO zwiększona aktywność ADA zależy głównie od ADA2, podczas gdy w ropniakach opłucnej dominującą formą jest ADA1 [24, 32]. Drugie to ograniczenie diagnostycznego zastosowania ADA do płynów limfocytarnych. Wprowadzenie ograniczenia i pomiar aktywności ADA w niegruźliczych wysiękach, w których limfocyty stanowiły ponad 50% wszystkich komórek, wykazały, że spośród 630 chorych liczba wyników fałszywie dodatnich wynosiła jedynie 18 (2,8%) [13].

Do niedawna wątpliwości budziła możliwość diagnostycznego wykorzystania pomiaru aktywności ADA w GWZO u chorych z zaburzeniami odporności. Wykazano jednak, że skuteczność diagnostyczna ADA w populacji zakażonych HIV nie zależy od liczby komórek CD4 i jest wysoka nawet u chorych z liczbą tych komórek poniżej 50/ μ l [33]. Dobrą skuteczność diagnostyczną ADA potwierdzono także u chorych po przeszczepieniu nerki [34].

Neopteryna

Neopteryna jest niskocząsteczkowym produktem katabolizmu guanozynotrifosforanu (GTP, *guanosinetriphosphate*), zachodzącego w monocytach i makrofagach. W innych komórkach szlak katabolizmu GTP prowadzi głównie do wytwarzania tetrahydrobiopteryny. Pobudzenie monocytów i makrofagów, wtórne do immunologicznej aktywacji limfocytów Th1, prowadzi do zwiększonego uwalniania neopteryny. Najważniejszym czynnikiem powodującym bezpośrednie pobudzenie

wytwarzania neopteryny jest interferon gamma (IFN- γ , *interferon gamma*). Znając diagnostyczne zastosowanie pomiaru stężenia IFN- γ u chorych na GWZO łatwo zrozumieć dlaczego neopteryna została uznana za potencjalny i możliwy do praktycznego wykorzystania biomarker GWZO. Liczba publikacji dotyczących pomiaru stężenia neopteryny u chorych z różnymi postaciami wysięku opłucnowego jest jednak bardzo ograniczona. Stwierdzono, że stężenie neopteryny jest znamienne wyższe w wysiękach gruźliczych niż w nowotworowych [35]. Jednak czułość tego testu w różnicowaniu GWZO od innych postaci wysięku w opłucnej wahała się w bardzo szerokich granicach (44–85%). Swoistość była znacznie wyższa i wynosiła 85–93% [35, 36]. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń oznaczanie neopteryny w wysięku opłucnowym nie może być uznane za wiarygodny wskaźnik gruźliczej etiologii wysięku. Wykazano także wyższość oznaczania ADA nad oznaczaniem neopteryny [35].

Leptyna

Leptyna to hormon peptydowy wytwarzany przez adipocyty i uczestniczący w regulacji gospodarki energetycznej ustroju, między innymi przez wpływ na apetyt oraz metabolizm. Leptyna wykazuje związki z procesami zapalenia, a jej stężenie we krwi u chorych na gruźlicę może być znacząco obniżone. Jak dotąd opublikowano wyniki tylko jednego badania, w którym mierzono stężenie leptyny w różnych postaciach wysięku w opłucnej. Wykazano, że w GWZO stężenie leptyny jest znamienne niższe niż w innych postaciach wysięku [37]. Jednak obliczone na podstawie analizy ROC czułość i swoistość diagnostyczna leptyny (odpowiednio 82,4% i 82,1%) były znamienne niższe niż czułość i swoistość oznaczania ADA w płynie. Tym samym można stwierdzić, że badanie stężenia tego hormonu w płynie jest mniej wartościowym testem niż badanie aktywności ADA [37].

Lizozym

Lizozym jest kationowym białkiem posiadającym właściwości hydrolizy peptydoglikanów ścian komórek bakteryjnych. Ponieważ obecność lizozymu wykazano w komórkach nabłonkowych ziarniników, makrofagach i aktywowanych granulocytach, podjęto badania nad wykorzystaniem oznaczania stężenia tego białka jako markera GWZO. Moriwaki i wsp. wykazali, że pomiar stężenia lizozymu w płynie z opłucnej pozwala na różnicowanie wysięków gruźliczych i nowotworowych (czułość 100%, swoistość 83%). Podobną wartość diagnostyczną można uzyskać, posługując się sto-

sunkiem stężenia lizozymu w płynie z opłucnej do jego stężenia w surowicy krwi [38]. Niższą czułość i swoistość stwierdzili Valdés i wsp., badając możliwości wykorzystania oznaczania lizozymu w płynie z opłucnej dla różnicowania wysięków gruczolanych i niegruczolanych (odpowiednio 85,7% i 61,6%). Zastosowanie stosunku stężenia lizozymu w płynie i surowicy skutkowało zmniejszeniem czułości i podwyższeniem swoistości testu [39]. Pomiar stosunku stężenia lizozymu w płynie i osoczu próbowano wykorzystać w celach diagnostycznych także w kilku innych badaniach. We wszystkich znanych autorom niniejszej pracy publikacjach wartość diagnostyczna oznaczania lizozymu okazała się jednak niższa niż wartość diagnostyczna ADA. Dlatego do chwili obecnej lizozym nie znalazł szerszego zastosowania praktycznego jako biomarker GWZO.

Cytokiny i chemokiny

Spośród wielu różnych cytokin najważniejszą rolę w różnicowaniu wysięków gruczolanych od niegruczolanych odgrywa pomiar stężenia IFN- γ . Bogatym źródłem IFN- γ uwalnianego do płynu opłucnowego w przebiegu GWZO są komórki CD4 (+) i komórki NK [24]. Liczba publikacji dotyczących wartości diagnostycznej stężenia IFN- γ w płynie z opłucnej jest nieco mniejsza niż dotyczących ADA, ale IFN- γ jest obok ADA najważniejszym biomarkerem GWZO. Dwie metaanalizy opisujące jego rolę w różnicowaniu gruczolanych i niegruczolanych wysięków w opłucnej wykazały dużą zgodność wyników. W pierwszej z nich średnia czułość i swoistość testu zostały ocenione odpowiednio na 87% i 97%, zaś w drugiej — na 89% i 97% [26, 40]. Połączona wartość czułości i swoistości (punkt Q na krzywej ROC) wynosiła w pierwszym przypadku 96,4%, zaś w drugim 95% [26, 40]. W populacji chorych z zaburzeniami odporności pomiar stężenia IFN- γ wykazuje podobnie wysoką wartość diagnostyczną [41]. Autorzy przeprowadzonej ostatnio analizy publikacji z lat 2005–2009, w których porównano wartość diagnostyczną ADA i IFN- γ stwierdzili, że średnia czułość diagnostyczna obu biomarkerów jest bardzo podobna (88,5% i 89,5%) podczas gdy swoistość IFN- γ — nieco wyższa niż swoistość ADA (96,6% v. 90,1%) [24]. Podobnie jak w przypadku ADA, praktyczne zastosowanie IFN- γ jako markera GWZO wymaga dokładnej znajomości metod pomiaru jego stężenia, wyznaczenia odpowiednich dla metody wartości odcięcia oraz znajomości względnej częstości GWZO w badanej populacji. Ze względu na wcześniejsze wprowadzenie pomiaru ADA do diagnostyki GWZO, a także fakt, że koszt pomiaru aktywności ADA jest niż-

szy niż koszt pomiaru stężenia IFN- γ , jest on dziś częściej wykorzystywanym biomarkerem GWZO. Tym niemniej, wartość diagnostyczna obu biomarkerów jest równie wysoka.

Możliwość praktycznego zastosowania pomiaru stężenia IFN- γ w płynie z opłucnej jako wskaźnika różnicującego etiologię wysięku stanowiła zachętę do podjęcia badań nad wykorzystaniem w tym celu także innych biologicznie czynnych substancji związanych z wydzielaniem IFN- γ . Należą do nich zarówno czynniki stymulujące wydzielanie IFN- γ , jak również czynniki wydzielane pod wpływem IFN- γ . W pracach, w których porównano wartość diagnostyczną interleukiny 12 (IL-12, *interleukin 12*) (czynnik stymulujący wydzielanie IFN- γ), IFN- γ i białko indukowanego IFN- γ (IP-10, CXCL-10) nie udało się wykazać, aby IL-12 lub IP-10 przewyższały pod względem wartości diagnostycznej IFN- γ [24]. Tylko w jednym z badań uzyskano porównywalne wartości dla trzech wymienionych cytokin, natomiast we wszystkich pozostałych IFN- γ wykazywał przewagę nad IL-12 i IP-10 zarówno pod względem czułości, jak i swoistości [24].

Przeprowadzono również wiele badań, w których testowano możliwość diagnostycznego wykorzystania innych cytokin. Hiraki i wsp. stwierdzili, że spośród 6 badanych substancji największą skutecznością diagnostyczną cechuje się oznaczanie IFN- γ . Kolejne miejsce skuteczności diagnostycznej mierzonej wielkością pola pod krzywą (AUC, *area under the curve*) zajęły: rozpuszczalny receptor IL-2 (sIL-2R, *soluble IL-2 receptor*), ADA, IL-18, kwaśne białko immunosupresyjne (IAP, *immunosuppressive acidic protein*) i IL-12 [42]. Hua i wsp. wykazali, że stężenie czynnika martwicy guza (TNF- α , *tumor necrosis alfa*) w wysiękach gruczolanych jest znamienne wyższe niż w wysiękach nowotworowych. Nie udało się natomiast wykazać istotnych różnic w stężeniu IL-1b w tych postaciach wysięku. Autorzy nie przeprowadzili analizy ROC, nie można więc stwierdzić na ile skuteczne byłoby zastosowanie stężenia TNF- α jako czynnika różnicującego wysięki gruczolane i nowotworowe [43].

Biorąc pod uwagę patogenezę GWZO można przypuszczać, że diagnostyczne zastosowanie mogłyby znaleźć także niektóre chemokiny, w szczególności te, które są wydzielane przez komórki międzybłonka i wykazują aktywność chemotaktyczną w stosunku do monocytów-makrofagów. Do takich chemokin należą: białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein 1*) oraz białko zapalne makrofagów (MIP-1- α , *macrophage inflammatory protein 1 alfa*). Wy-

niki badań przeprowadzonych przez Trzaskę-Sobczak i wsp. wykazały, że stężenie MCP-1 w wysięku gruźliczym, nowotworowym i parapneumonicznym są zbliżone i tym samym czułość i swoistość tego markera w diagnostyce GWZO jest bardzo ograniczona [44]. Nieco lepsze wyniki uzyskali ci sami autorzy z zastosowaniem MCP-1 (przy wartości odcięcia >120 pg/ml czułość wynosiła 66%, a swoistość 99%). Grupa chorych z GWZO, która uczestniczyła w tych badaniach była jednak bardzo mała (6 chorych), a wyniki gorsze od uzyskanych w innych badaniach dla uznanych biomarkerów GWZO, takich jak ADA czy też IFN- γ [44].

Produkty aktywacji dopełniacza

W pojedynczych badaniach podjęto próby wykorzystania w celach diagnostycznych oznaczania produktów aktywacji dopełniacza. Hara i wsp. wykazali, że stężenie wielkocząsteczkowego kompleksu SC5b-9 (*soluble terminal complement complex*) odzwierciedlającego późną fazę aktywacji dopełniacza ze 100-procentową czułością i swoistością różnicuje wysięki gruźlicze i nieleczone wysięki nowotworowe [45]. Jednak różnicowanie GWZO i innych postaci wysięków (np. parapneumonicznych, reumatoidalnych) cechowało się znacznie mniejszą skutecznością. Chociaż w całej badanej grupie czułość testu oceniono na 100%, to swoistość była znacznie mniejsza i wynosiła 74% [45]. Wyniki badań Salomaa i wsp. potwierdziły, że stężenie SC5b-9 jest znacznie wyższe w wysiękach gruźliczych niż nowotworowych, jednak mediana stężenia SC5b-9 w wysiękach reumatoidalnych była jeszcze wyższa niż w gruźliczych [46]. Późniejsza publikacja Porcel i wsp. także dowodzi, że stężenie substancji odzwierciedlających wczesną i późną fazę aktywacji dopełniacza (odpowiednio — stabilnej, nieaktywnej formy C3a, tj. C3a-desArg i wielkocząsteczkowego kompleksu SC5b-9) jest znamienne wyższe w wysiękach gruźliczych niż w przesiekach i wysiękach nowotworowych [47]. Czułość diagnostyczna SC5b-9 dla rozróżnienia GWZO i wysięku nowotworowego wynosiła 83,3%, podczas gdy dla C3a-desArg tylko 69,6%. Chociaż swoistość tego ostatniego testu była większa niż SC5b-9, to jednak ogólna skuteczność diagnostyczna SC5b-9 przewyższała nieco skuteczność C3a-desArg (80,8% v. 78,8%) [47].

Inne markery nieswoiste

Oprócz najistotniejszych z punktu widzenia diagnostyki GWZO cytokin i chemokin, które zostały omówione w odpowiednim rozdziale przeprowadzono także badania nad możliwością potencjalnego wykorzystania jako biomarkerów GWZO

wielu innych związków należących do cytokin, chemokin oraz innych grup. Należą do nich IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Mimo że dla niektórych z tych związków stwierdzono istotne różnice między stężeniem w wysiękach gruźliczych i niegruźliczych, to jednak pomiar ich stężenia w płynie opłucnowym i/lub krwi nie przedstawia istotnej wartości diagnostycznej.

Wykazano, że wysięki gruźlicze i niegruźlicze różnią się istotnie stężeniem rozpuszczalnej postaci ligandu Fas (sFasL, *soluble Fas ligand*) [48]. Wstępne doświadczenia wskazują na to, że oznaczanie sFasL może być czułym markerem GWZO (dane niepublikowane). Niestety, swoistość testu jest dość ograniczona.

Swoiste markery odpowiedzi immunologicznej

Wydzielanie IFN- γ przez komórki płynu opłucnowego pod wpływem stymulacji swoistymi antygenami

Wprowadzenie testów, których istotą jest pomiar ilości IFN- γ wytwarzanego przez komórki jednokomórkowe krwi (IGRAs, *interferon- γ release assays*) pod wpływem stymulacji swoistymi antygenami *M. tuberculosis* przyniosło znaczący postęp w diagnostyce utajonej (latentnej) postaci gruźlicy. Dziś IGRAs są szeroko wykorzystywane w miejsce wcześniej stosowanego skórniego odczynu tuberkulinowego. Antygeny stosowane w IGRAs zostały tak dobrane, aby zwiększyć swoistość badania i wyeliminować fałszywie dodatnie wyniki związane z wcześniejszym szczepieniem BCG i zakażeniami prątkami niegruźliczymi. Chociaż sama idea IGRAs, jak również metodyka zastosowana w dwóch różnych, komercyjnie dostępnych testach są przekonujące, to jednak zastosowanie tych testów do diagnostyki aktywnej gruźlicy jest bardzo problematyczne. Wynika to z faktu, że IGRAs nie potrafią różnicować między zakażeniem utajonym a aktywnym. Dodatkowo ograniczona czułość tych testów oznacza, że negatywny wynik testu nie wyklucza aktywnej gruźlicy [49]. Dlatego testy IGRA służą do wykrywania zakażenia latentnego, a nie aktywnej postaci choroby. Próby wykorzystywania tych testów do rozpoznawania GWZO są w fazie badań.

Pomysł zastosowania ilościowej oceny IFN- γ wydzielanego przez komórki wysięku opłucnowego pod wpływem zestawu swoistych antygenów *M. tuberculosis* stanowi bardzo atrakcyjną alternatywę dla oznaczania jego całkowitego stężenia w płynie opłucnowym. Teoretycznie wydaje się, że po-

miar ilości IFN- γ wydzielanego pod wpływem stymulacji antygenami *M. Tuberculosis* powinien być bardziej swoistym testem diagnostycznym dla GWZO niż całkowite stężenie IFN- γ w płynie z opłucnej. W praktyce okazało się jednak, że zarówno czułość, jak i swoistość IGRAs nie jest odpowiednio wysoka, aby można było tę metodę uznać za wiarygodny test diagnostyczny u chorych z podejrzeniem GWZO. W 2009 roku Hooper i wsp. podsumowali dotychczasowe wyniki badań nad zastosowaniem IGRAs w różnicowaniu gruźliczych i niegruźliczych wysięków w opłucnej. Analiza tych autorów obejmuje 6 badań przeprowadzonych w latach 2005–2008. Łączna liczba chorych z GWZO uczestniczących w tych badaniach była stosunkowo niewielka i wynosiła 136 osób [50]. Autorzy podzielili wyniki w zależności od współczynnika zapadalności na gruźlicę w populacjach, w których przeprowadzono badania. Okazało się, że w populacjach o niskim współczynniku zapadalności na gruźlicę IGRAs cechują się stosunkowo wysoką średnią czułością (95–100%) i nieco mniejszą swoistością (76–97,8%). W największym badaniu europejskim (przeprowadzonym we Włoszech, Niemczech i Holandii) wartość diagnostyczna IGRA dla płynu opłucnowego była wyższa niż dla krwi, jednak swoistość okazała się stosunkowo niska (76%) [51]. W populacjach o wysokim ryzyku zachorowania na gruźlicę wyniki były znacznie gorsze. Średnia czułość diagnostyczna testu wynosiła 40–57%, zaś swoistość 60–87% [50]. Należy zwrócić uwagę, że badane grupy były stosunkowo nieliczne, a populacja chorych z niegruźliczym wysiękiem w opłucnej obejmowała w niektórych pracach wyłącznie chorych z wysiękiem nowotworowym. Również w późniejszych badaniach nie udało się wykazać większej czułości i swoistości testów IGRA [52, 53]. Warto przytoczyć wyniki badania Dheda i wsp. w którym nie tylko analizowano różne rodzaje IGRA, ale także porównano wyniki z całkowitym (niestymulowanym) stężeniem IFN- γ w płynie z opłucnej. Okazało się, że najlepsze wyniki uzyskane przy użyciu IGRA (standaryzowany test RD-1 ELISPOT) były znacznie gorsze niż wyniki pomiaru całkowitego stężenia IFN- γ w płynie z opłucnej (czułość odpowiednio 86 v. 97%, swoistość 60 v. 100%) [54]. Biorąc pod uwagę wyniki przedstawionych badań i analiz można wnioskować, że w wybranych populacjach o niskim ryzyku GWZO wysoka negatywna wartość predykcyjna IGRAs może być pomocna w różnicowaniu gruźliczych i niegruźliczych wysięków w opłucnej. W populacjach o większym współczynniku zapadalności na gruźlicę czy też większym odsetku chorych z utajonym zakażeniem

M. tuberculosis wartość diagnostyczna testu jest na tyle niska, że nie znajduje on praktycznego zastosowania. Wobec porównywalnej (lub większej) czułości oraz większej swoistości badania wykorzystującego całkowite stężenie IFN- γ (lub aktywność ADA) w płynie opłucnej, niższych kosztów testu oraz znacznie większej liczby chorych, u których badano wartość diagnostyczną testu brakuje dziś podstaw, aby zalecać wprowadzenie IGRAs zamiast oznaczenia całkowitego stężenia IFN- γ (lub aktywności ADA) [50].

Przeciwciała przeciwko antygenom *M. tuberculosis* w płynie z opłucnej

Wiadomo, że zarówno w przypadkach gruźlicy płuc, jak i gruźlicy pozapłucnej diagnostyka serologiczna odgrywa minimalną rolę. Dokonany przez Steingart i wsp. systematyczny przegląd piśmiennictwa, w którym uwzględniono doświadczenia z komercyjnie dostępnymi testami służącymi do wykrywania przeciwciał różnych klas i skierowanych przeciwko różnym antygenom wykazał, że ze względu na stosunkowo niską i bardzo zróżnicowaną czułość i swoistość testów ich praktyczne zastosowanie jest bardzo ograniczone [55, 56]. Nie można jednak wykluczyć, że badanie miejscowego stężenia przeciwciał w płynie opłucnowym pozwoliłoby osiągnąć lepsze wyniki niż badania przeprowadzone w surowicy krwi. W ostatnim dziesięcioleciu opublikowano wyniki kilku badań, które wskazują, że możliwości diagnostyki GWZO na podstawie pomiaru stężenia przeciwciał w płynie opłucnowym są także bardzo ograniczone. Demkow i wsp. nie udało się wykazać różnic w stężeniu żadnego z badanych przeciwciał między grupą chorych z GWZO i chorych z wysiękiem niegruźliczym (odpowiednio 7 i 13 chorych) [57]. Badanie Chierakul i wsp. przeprowadzono w znacznie większej grupie chorych i obejmowało wykrywanie przeciwciał skierowanych przeciwko 5 różnym antygenom. Czułość diagnostyczna testu przeprowadzonego w płynie opłucnowym była jednak bardzo niska (25,4%). Jednoczesne wykrywanie antygenów w płynie i w surowicy pozwoliły na zwiększenie czułości testu, ale tylko do 50,7% [58]. W dwóch różnych badaniach uzyskano prawie takie same wyniki dotyczące czułości rozpoznawczej GWZO (50% i 52,6%) na podstawie oznaczania przeciwciał skierowanych przeciwko lipoarabinomannanowi [59, 60]. Podobnie jak w innych badaniach, swoistość testu okazała się znacznie wyższa i sięgała odpowiednio 93,8% i 97,8%. Najlepsze wyniki uzyskano dla przeciwciał klasy A skierowanych przeciwko dwóm rekombinowanym antygenom białkowym: MPT-64 and MT-10.3.

Ta sama grupa autorów opublikowała wyniki dwóch prac badawczych, w których wykazano, że czułość rozpoznawcza połączonego testu (oznaczanie przeciwciał skierowanych przeciwko obu antygenom) wynosiła 76%, zaś swoistość 96% [19, 61]. W badaniu opublikowanym w 2007 roku autorzy porównali wartość diagnostyczną wymienionego testu z oznaczaniem aktywności ADA w płynie oraz NAAT. Okazało się, że mimo iż czułość diagnostyczna pomiaru przeciwciał jest znacznie wyższa niż wyniki uzyskane w innych badaniach to i tak jest ona znacznie niższa niż czułość testu ADA [19].

Podsumowując wyniki badań dotyczących diagnostyki GWZO na podstawie oceny przeciwciał w płynie z opłucnej, można stwierdzić, że najlepszym testem wydaje się pomiar przeciwciał klasy A skierowanych przeciwko antygenom MPT-64 i MT-10.3, jednak czułość tego testu (jak również każdego innego) jest zbyt niska, aby mógł on znaleźć praktyczne zastosowanie diagnostyczne.

Modele predykcyjne i algorytmy diagnostyczne wykorzystujące biomarkery

Dla zwiększenia skuteczności pojedynczych testów diagnostycznych zaproponowano kilka różnych modeli predykcyjnych i algorytmów diagnostycznych wykorzystujących większą liczbę biomarkerów bądź też jeden biomarker łącznie z innymi danymi klinicznymi lub laboratoryjnymi.

Jak wspomniano, połączenie oceny składu komórkowego płynu z opłucnej (stosunek limfocytów i neutrofilów) z pomiarem ADA zwiększa swoistość tego ostatniego wskaźnika, bez utraty wysokiej czułości testu [62]. Neves i wsp. stwierdzili, że ADA jest najbardziej wiarygodnym pojedynczym wskaźnikiem różnicującym między wysiękami gruźliczymi i niegruźliczymi. W konsekwencji ADA została wykorzystana jako ważny składnik obu równań regresji obliczających prawdopodobieństwo gruźliczej etiologii wysięku, które zostały opracowane przez tych autorów [63]. Villegas i wsp. stwierdzili, że jednoczesne zastosowanie pomiaru aktywności ADA i NAAT, jak również pomiaru stężenia IFN- γ i NAAT w płynie z opłucnej pozwala zwiększyć czułość diagnostyczną GWZO w porównaniu z czułością uzyskaną na podstawie oceny pojedynczego biomarkera (ADA lub IFN- γ) [64]. Trzeba jednak zauważyć, że w innych badaniach, w których czułość pojedynczych testów wykorzystujących ADA i/lub IFN- γ była wyższa niż w cytowanym wyżej badaniu, dodatkowe zastosowanie wyników innych badań nie poprawiało istotnie diagnostycznej wartości tych testów.

W 2003 roku Porcel i Vives zaproponowali dwa różne modele predykcyjne opracowane dla poprawy skuteczności różnicowania między wysiękiem gruźliczym a nowotworowym. Ważną składową jednego z tych modeli stanowił pomiar aktywności ADA w wysięku opłucnowym. Stwierdzenie aktywności ADA ≥ 40 j.m./l było równoznaczne z przyznaniem 5 punktów, pozostałe wskaźniki wraz z odpowiednią liczbą przyznawanych punktów to: wiek < 35 lat (2 punkty), temperatura ciała $\geq 37,8^{\circ}\text{C}$ (2 punkty) oraz liczba erytrocytów w płynie opłucnowym $< 5 \times 10^9$ l (1 punkt). Uzyskanie sumarycznej liczby punktów ≥ 5 pozwalało z 95-procentową czułością i 94-procentową swoistością rozpoznać gruźliczą etiologię wysięku [65]. Niestety, system ten nie został zwalidowany w innej grupie chorych. Kilka lat później Porcel i wsp. przedstawili algorytm diagnostyczny opierający się na następujących danych: wiek, pomiar aktywności ADA w płynie, gorączka i pomiar aktywności LDH (*lactate dehydrogenase*) w płynie. Odpowiednie uszeregowanie wyżej wymienionych danych i przyjęcie dla nich odpowiednich wartości odcięcia, to jest wiek < 35 lat, aktywność ADA > 38 j./l, obecność gorączki i aktywność LDH < 32 j/l pozwoliły na przeprowadzenie różnicowania GWZO z wysiękiem nowotworowym z 92,2-procentową czułością i 98,3-procentową swoistością [66].

Niedawno Sales i wsp. opublikowali wyniki badań nad dwoma innymi modelami predykcyjnymi o bardzo dużej skuteczności [67]. Oba zawierają pomiar aktywności ADA w płynie oraz pomiar stężenia globulin. Trzecim ocenianym parametrem może być obecność komórek nowotworowych albo makroskopowy wygląd wysięku. W przypadku gdy ADA $> 46,5$ j./l i stężenie globulin $> 2,05$ g/dl oraz nie stwierdza się obecności komórek nowotworowych w płynie, czułość różnicowania między wysiękiem gruźliczym i nowotworowym wynosiła 99,4%, a swoistość 96%. Zastosowanie makroskopowego wyglądu płynu zamiast jego oceny cytologicznej (płyn niezawierający domieszki krwi, niekrwisty) skutkowało jedynie niewielkim zmniejszeniem czułości rozpoznawczej do 95,8%, przy zachowanej bardzo wysokiej swoistości 97,4% [67].

Prawidłowe praktyczne zastosowanie modeli wykorzystujących biomarkery może, dzięki zmniejszeniu liczby niepotrzebnie wykonywanych badań, istotnie zmniejszyć koszty diagnostyki GWZO. Dobór odpowiedniego modelu zależy od możliwości oznaczenia poszczególnych biomarkerów oraz od lokalnej sytuacji epidemiologicznej (prawdopodobieństwa gruźliczej etiologii wysięku).

Podsumowanie

Wobec ograniczonej czułości konwencjonalnych metod diagnostyki mikrobiologicznej prawidłowe rozpoznanie GWZO wciąż stanowi problem kliniczny. Alternatywą do bardziej inwazyjnych badań mających na celu pozyskanie materiałów tkankowych z opłucnej jest oznaczanie biomarkerów w płynie opłucnowym. Spośród wielu badanych biomarkerów najwyższą skutecznością diagnostyczną cechują się aktywność deaminazy adenozyiny i stężenie interferonu gamma. Oznaczanie jednego z powyższych biomarkerów jest godne polecenia i może w istotny sposób poprawić skuteczność rozpoznania GWZO. Nie należy przy tym zapominać, że zarówno ADA, jak i IFN- γ są tylko biomarkerami procesu zapalnego w jamie opłucnowej i nie wskazują jednoznacznie na czynnik etiologiczny zapalenia.

Chociaż w ostatnich latach nastąpiła istotna poprawa w zakresie skuteczności diagnostycznej NAATs i IGRAs, to jednak wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu tych metod cechują się znaczną zmiennością i wobec tego nie mają przewagi nad oznaczaniem aktywności ADA i/lub całkowitego stężenia IFN- γ w płynie z jamy opłucnej.

Piśmiennictwo

- Peto H.M., Pratt R.H., Harrington T.A., LoBue P.A., Armstrong L.R. Epidemiology of extrapulmonary tuberculosis in the United States, 1993–2006. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49: 1350–1357.
- Baumann M.H., Nolan R., Petrini M., Lee Y.C.G., Light R.W., Schneider E. Pleural tuberculosis in United States: incidence and drug resistance. *Chest* 2007; 131: 1125–1132.
- Szczuka I. (red.). Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc — Zakład Epidemiologii i Organizacji Walki z Gruźlicą: gruźlica i choroby układu oddechowego w Polsce w roku 2008. Warszawa 2009.
- Light R.W. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010; 15: 451–458.
- Valdes L., Alvarez D., Valle J.M., Pose A., San Jose E. The etiology of pleural effusions in an area with high incidence of tuberculosis. *Chest* 1996; 109: 158–162.
- Liam C.K., Lim K.H., Wong C.M. Causes of pleural exudates in a region with a high incidence of tuberculosis. *Respirology* 2000; 5: 33–38.
- Salgueiro Rodríguez M., González Barcala J., Zamarrón Sanz C. i wsp. Tuberculosis in Santiago de Compostela from 1999 to 2002. An epidemiological study. *An. Med. Int.* 2004; 21: 215–222.
- Marel M., Zrustova M., Stasny B., Light R.W. The incidence of pleural effusion in a well-defined region: epidemiologic study in Central Bohemia. *Chest* 1993; 104: 1486–1489.
- Krenke R., Safianowska A., Paplińska M. i wsp. Pleural fluid adenosine deaminase and interferon gamma as diagnostic tools in tuberculous pleurisy. *J. Physiol. Pharmacol.* 2008; 59 (supl. 6): 349–360.
- Patiala J. Initial tuberculous pleuritis in the Finnish Armed Forces in 1939–1945 with special reference to eventual post pleuritic tuberculosis. *Acta Tuberc. Scand.* 1954; 36 (supl.): 1–57.
- Roper W.H., Waring J.J. Primary serofibrinous pleural effusion in military personnel. *Am. Rev. Tuberc.* 1955; 71: 616–634.
- Trajman A., Pai M., Dheda K. i wsp. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural effusion: what works and what does not. *Eur. Respir. J.* 2008; 31: 1098–1106.
- Porcel J.M. Tuberculous pleural effusion. *Lung* 2009; 187: 263–270.
- Lin M.T., Wang J.Y., Yu C.J., Lee L.N., Yang P.C.; TAMI Group. Mycobacterium tuberculosis and polymorphonuclear pleural effusion: incidence and clinical pointers. *Respir. Med.* 2009; 103: 820–826.
- Krenke R., Nasiłowski J., Korczyński P. i wsp. Incidence and etiology of eosinophilic pleural effusion. *Eur. Respir. J.* 2009; 34: 1111–1117.
- Luzze H., Elliott A.M., Joloba M.L. i wsp. Evaluation of suspected tuberculous pleurisy: clinical and diagnostic findings in HIV-1-positive and HIV-negative adults in Uganda. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5: 746–753.
- Pai M., Flores L.L., Hubbard A., Riley L.W., Colford J.M. Jr. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2004; 4: 6.
- Anie Y., Sumi S., Varghese P., Madhavi L.G., Sathish M., Radhakrishnan V.V. Diagnostic approaches in patients with tuberculous pleural effusion. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 59: 389–394.
- Trajman A., Kaisermann C., Luiz R.R. i wsp. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2007; 67: 877–884.
- Mishra O.P., Kumar R., Ali Z., Prasad R., Nath G. Evaluation of polymerase chain reaction and adenosine deaminase assay for the diagnosis of tuberculous effusions in children. *Arch. Dis. Child.* 2006; 91: 985–989.
- Valdés L., Alvarez D., San José E. i wsp. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch. Intern. Med.* 1998; 158: 2017–2021.
- Diacon A.H., Van de Wal B.W., Wyser C. i wsp. Diagnostic tools in tuberculous pleurisy: a direct comparative study. *Eur. Respir. J.* 2003; 22: 589–591.
- Gopi A., Madhavan S.M., Sharma S.K., Sahn S.A. Diagnosis and treatment of tuberculous pleural effusion in 2006. *Chest* 2007; 131: 880–889.
- Krenke R., Korczyński P. Use of pleural fluid levels of adenosine deaminase and interferon gamma in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2010; 16: 367–375.
- Pérez-Rodríguez E., Jiménez Castro D. The use of adenosine deaminase and adenosine deaminase isoenzymes in the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2000; 6: 259–266.
- Greco S., Girardi E., Masciangelo R., Capocotta G.B., Saltini C. Adenosine deaminase and interferon- γ measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a metaanalysis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2003; 7: 777–786.
- Goto M., Noguchi Y., Koyama H., Hira K., Shimbo T., Fukui T. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a meta-analysis. *Ann. Clin. Biochem.* 2003; 40: 374–381.
- Liang Q.L., Shi H.Z., Wang K., Qin S.M., Qin X.J. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir. Med.* 2008; 102: 744–754.
- Morisson P., Neves D.D. Evaluation of adenosine deaminase in the diagnosis of pleural tuberculosis: a Brazilian meta-analysis. *J. Bras. Pneumol.* 2008; 34: 217–224.
- Trajman A., Kaisermann C., Luiz R.R. i wsp. Pleural fluid ADA, IgA-ELISA and PCR sensitivities for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2007; 67: 877–884.
- Dheda K., Van-Zyl Smit R.N., Sechi L.A. i wsp. Clinical diagnostic utility of IP-10 and LAM antigen levels for the diagnosis of tuberculous pleural effusions in a high burden setting. *PLoS ONE* 2009; 4: e4689.
- Zemlin A.E., Burgess L.J., Carstens M.E. The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2009; 13: 214–220.
- Baba K., Hoosen A.A., Langeland N., Dyrhol-Riise A.M. Adenosine deaminase activity is a sensitive marker for the diagnosis of tuberculous pleuritis in patients with very low CD4 counts. *PLoS ONE* 2008; 3: e2788.
- Chung J.H., Kim Y.S., Kim S.I. i wsp. The diagnostic value of the adenosine deaminase activity in the pleural fluid of renal transplant patients with tuberculous pleural effusion. *Yonsei Med. J.* 2004; 45: 661–664.
- Cok G., Parildar Z., Basol G. i wsp. Pleural fluid neopterin levels in tuberculous pleurisy. *Clin. Biochem.* 2007; 40: 876–880.
- Tozkoopan E., Deniz O., Cakir E. i wsp. The diagnostic values of serum, pleural fluid and urine neopterin measurements in

- tuberculous pleurisy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9: 1040–1045.
- 37 Celik G., Kaya A., Poyraz B. i wsp. Diagnostic value of leptin in tuberculous pleural effusions. *Int. J. Clin. Pract.* 2006; 60: 1437–1442.
- 38 Moriawaki Y., Kohjiro N., Itoh M. i wsp. Discrimination of tuberculous from carcinomatous pleural effusion by biochemical markers: adenosine deaminase, lysozyme, fibronectin and carcinoembryonic antigen. *Jpn. J. Med.* 1989; 28: 478–484.
- 39 Valdés L., San José E., Alvarez D. i wsp. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon- γ . *Chest* 1993; 103: 458–465.
- 40 Jiang J., Shi H.Z., Liang Q.L., Qin S.M., Qin X.J. Diagnostic value of interferon- γ in tuberculous pleurisy: a metaanalysis. *Chest* 2007; 131: 1133–1141.
- 41 Villena V., López-Encuentra A., Echave-Sustaeta J., Martín-Escribano P., Ortuño-de-Solo B., Estenoz-Alfaro J. Interferon-gamma in 388 immunocompromised and immunocompetent patients for diagnosing pleural tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 1996; 9: 2635–2639.
- 42 Hiraki A., Aoe K., Eda R. i wsp. Comparison of six biological markers for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 2004; 125: 987–989.
- 43 Hua C.C., Chang L.C., Chen Y.C., Chang S.C. Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions. *Chest* 1999; 116: 1292–1296.
- 44 Trzaska-Sobczak M., Pierzchała W., Brożek G., Farnik M. Znaczenie C-C chemokin w ustalaniu etiologii płynu w płucnej. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2008; 76: 415–420.
- 45 Hara N., Abe M., Inuzuka S., Kawarada Y., Shigematsu N. Pleural SC5b-9 in differential diagnosis of tuberculous, malignant, and other effusions. *Chest* 1992; 102: 1060–1064.
- 46 Salomaa E.R., Viander M., Saaresranta T., Terho E.O. Complement components and their activation products in pleural fluid. *Chest* 1998; 114: 723–730.
- 47 Porcel J.M., Vives M., Gázquez I., Vicente de Vera M.C., Pérez B., Rubio M. Usefulness of pleural complement activation products in differentiating tuberculosis and malignant effusions. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2000; 4: 76–82.
- 48 Budak F., Uzaslan E.K., Cangür S., Göral G., Oral H.B. Increased pleural soluble fas ligand (sFasL) levels in tuberculosis pleurisy and its relation with T-helper type 1 cytokines. *Lung* 2008; 186: 337–343.
- 49 Lange C., Pai M., Drobniewski F., Migliori G.B. Interferon-c release assays for the diagnosis of active tuberculosis: sensible or silly? *Eur. Respir. J.* 2009; 33: 1250–1253.
- 50 Hooper C.E., Lee Y.C., Maskell N.A. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of TB pleural effusions: hype or real hope? *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2009; 15: 358–365.
- 51 Losi M., Bossink A., Codecasa L. i wsp. Use of a T-cell interferon-c release assay for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Eur. Respir. J.* 2007; 30: 1173–1179.
- 52 Lee L.N., Chou C.H., Wang J.Y. i wsp. Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15: 173–179.
- 53 Liao C.H., Chou C.H., Lai C.C. i wsp. Diagnostic performance of an enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in extrapulmonary tuberculosis varies between different sites of disease. *J. Infect.* 2009; 59: 402–408.
- 54 Dheda K., van Zyl-Smit R.N., Sechi L.A. i wsp. Utility of quantitative T-cell responses versus unstimulated interferon-g for the diagnosis of pleural tuberculosis. *Eur. Respir. J.* 2009; 34: 1118–1126.
- 55 Steingart K.R., Henry M., Laal S. i wsp. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 2007; 62: 911–918.
- 56 Steingart K.R., Henry M., Laal S. i wsp. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 2007; 4: e202.
- 57 Demkow U., Filewska M., Białas B. i wsp. Ocena poziomu przeciwciał przeciwprątkowych w płynie płucnowym, osierdziowym i mózgowo-rdzeniowym u chorych na gruźlicę. *Pneumonol. Alergol. Pol.* 2004; 72: 105–110.
- 58 Chierakul N., Damrongchokpipat P., Chaiprasert A., Arjatanakul W. Antibody detection for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2001; 5: 968–972.
- 59 Yokoyama T., Rikimaru T., Kinoshita T., Kamimura T., Oshita Y., Aizawa H. Clinical utility of lipoarabinomannan antibody in pleural fluid for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *J. Infect. Chemother.* 2005; 11: 81–83.
- 60 Morimoto T., Takanashi S., Hasegawa Y. i wsp. Level of antibodies against mycobacterial glycolipid in the effusion for diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Respir. Med.* 2006; 100: 1775–1780.
- 61 Kaisermann M.C., Sardella I.G., Trajman A. i wsp. IgA antibody responses to Mycobacterium tuberculosis recombinant MPT-64 and MT-10.3 (Rv3019c) antigens in pleural fluid of patients with tuberculous pleurisy. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2005; 9: 461–466.
- 62 Burgess L.J., Maritz F.J., Le Roux I., Taljaard J.J. Combined use of pleural adenosine deaminase with lymphocyte/neutrophil ratio. Increased specificity for the diagnosis of tuberculous pleuritis. *Chest* 1996; 109: 414–419.
- 63 Neves D.D., Dias R.M., Cunha A.J. Predictive model for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Braz. J. Infect. Dis.* 2007; 11: 83–88.
- 64 Villegas M.V., Labrada L.A., Saravia N.G. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase and interferon- γ in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2000; 118: 1355–1364.
- 65 Porcel J.M., Vives M. Differentiating tuberculous from malignant pleural effusions: a scoring model. *Med. Sci. Monit.* 2003; 9: CR175–CR180.
- 66 Porcel J.M., Alemán C., Bielsa S., Sarrapio J., Fernández de Sevilla T., Esquerda A. A decision tree for differentiating tuberculous from malignant pleural effusions. *Respir. Med.* 2008; 102: 1159–1164.
- 67 Sales R.K., Vargas F.S., Capelozzi V.L. i wsp. Predictive models for diagnosis of pleural effusions secondary to tuberculosis or cancer. *Respirology* 2009; 14: 1128–1133.