

FULL PAPERS

CXCL10/IP10 is a novel potential in vitro marker of TB infection

Ilaria Sauzullo¹, Valeria Belvisi², Fernanda Chiarini³, Miriam Lichtner², Claudio Maria Mastroianni², Fabio Mengoni¹, Raffaella Rossi¹, Vincenzo Vullo¹

¹Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, "Sapienza" Università di Roma, Italy

²Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali, "Sapienza" Università di Roma, Polo Pontino, Italy

³Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica, "Sapienza" Università di Roma, Italy

Key Words: *Myc. tuberculosis*, IFN- γ , CXCL10/IP10

CXCL10/IP10: biomarker alternativo nella diagnosi dell'infezione tubercolare

SUMMARY

Introduction

IFN- γ is a pivotal cytokine in the immune response to *Myc. tuberculosis*, in fact this is the key cytokine produced in response to antigens specific following tuberculosis exposure causing either active or latent tuberculosis (TB) and this observation forms the basis of interferon gamma release assay (IGRA), but there are alternative or additional cytokines and chemokines that could be used to improve detection of *Myc. tuberculosis* infection. The aim of this study was to evaluate the diagnostic utility of chemokine CXCL10/IP-10 as biomarker of active TB and to compare the results with classical QuantiFERON-Gold assay.

Methods

CXCL10/IP-10 and IFN- γ responses to stimulation with ESAT-6 and CFP-10 were evaluated in 21 patients with active tuberculosis and in 6 healthy unexposed subjects with no history of TB or TB contact were used as controls healthy controls. QuantiFERON-TB Gold (QFT-G, Cellestis) was used for the measurement of IFN- γ levels; CXCL10/IP-10 was detected by ELISA (R&D Systems).

Results

Of the 21 TB patients included, 11 had a QFT-G positive and 10 had negative QFT-G results. All QFT-G positive patients had increased levels of CXCL10/IP-10 (median, pg/ml) in both ESAT-6 and CFP-10 stimulated samples patients compared to healthy controls (1807 and 1111 vs 251 and 188 of controls, respectively) ($p < 0.001$ for both). The patients with active TB and QFT-G negative exhibited higher concentrations of CXCL10/IP-10 following antigen stimulation (837 pg/ml for ESAT-6; 1674 pg/ml for CFP-10) ($p < 0.001$).

Conclusion

Our study showed that in all patients with active TB, the CXCL10/IP-10 is expressed in higher amounts than IFN- γ following *Myc. tuberculosis* antigen-specific stimulation, and CXCL10/IP-10 appeared to be even more sensitive than QuantiFERON TB-Gold in TB patients with negative IFN- γ response. The measurement of chemokine CXCL10/IP-10, although not specific for tuberculosis, may have potential as an alternative or additional marker to IFN- γ in vitro diagnosis infection with *Myc. tuberculosis*.

Received March 18, 2009

Accepted May 6, 2009

INTRODUZIONE

La diagnosi tempestiva di tubercolosi (TB) attiva rimane un gold standard per contenere la diffusione della tubercolosi.

L'identificazione di due proteine secretorie specifiche di *Myc. tuberculosis*, ESAT-6 (early secretory antigen target-6) e CFP-10 (culture filtrate protein-10) ha portato allo sviluppo di due nuovi test per la diagnosi immunologica dell'infezione

tubercolare: il QuantiFERON-TB Gold, (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia) e il T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Gran Bretagna). Questi test, denominati con l'acronimo di IGRA (interferon gamma releasing assays), si basano sul principio che i linfociti T effettori di individui sensibilizzati con antigeni specifici, producono l'IFN- γ quando vengono nuovamente in contatto con gli stessi antigeni. Si presume, perciò, che

Corresponding author: Ilaria Sauzullo

Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali,

"Sapienza" Università di Roma, Policlinico Umberto I, 00161 Roma, Italy - Tel: 06/49970881 - Fax: 06/49972625

E-mail: ilariasauzullo@libero.it

un'elevata produzione di IFN- γ possa essere indicativa d'infezione tubercolare (13, 14).

Queste proteine, codificate dalla regione genomica RD1 (region of differentiation-1), sono presenti in modo peculiare in *Myc. tuberculosis* e assenti in tutti i ceppi di *Myc. bovis* (BCG) e nella maggior parte dei micobatteri non tubercolari (NTM) (2, 5), pertanto l'utilizzo di questi test immunologici ha consentito di migliorare sia la sensibilità che la specificità della diagnosi d'infezione latente (3, 9).

Nelle forme di malattia attiva, particolarmente gravi, i test immunologici possono essere falsamente negativi, tale condizione è riconducibile ad uno stato di " *Myc. tuberculosis* non responsivo-specifico", caratterizzato da uno scarso rilascio antigene-specifico di IFN- γ delle cellule immunocompetenti, che può presentarsi nella fase di massima replicazione del patogeno (12, 15).

Recenti studi su markers alternativi per la diagnosi di TB hanno evidenziato la capacità da parte delle cellule T di rilasciare elevati livelli *in vitro* di una chemochina, CXCL10/IP-10, dopo stimolazione con antigeni specifici di *Myc. tuberculosis*. CXCL10, anche chiamata proteina 10 kDa indotta dall'interferone, è un membro della famiglia delle CXC-chemochine. È prevalentemente prodotta da diverse cellule, inclusi linfociti, monociti/macrofagi e fibroblasti (7). Svolge un ruolo importante nel traffico dei monociti e induce il reclutamento dei linfociti T nei tessuti infiammati attraverso l'interazione con i recettori CXCR3. Elevati livelli di CXCL10/IP-10 sono stati trovati nella reazione di ipersensibilità di tipo ritardato alla PPD (tubercolina derivato proteico purificato) (7), nei linfonodi e granulomi tubercolari polmonari (4), nel plasma e nei versamenti pleurici di pazienti con infezione tubercolare (1, 12), e in soggetti HIV-coinfetti con sindrome da immunoricostruzione (3, 6). Nonostante questi dati, numerosi aspetti rimangono ancora da definire. L'obiettivo dello studio era quello di valutare l'applicazione nella pratica clinica di questo nuovo biomarker, in particolare di valutare la produzione antigene-specifica di CXCL10/IP10 in soggetti con gravi forme di malattia tubercolare e basso rilascio di IFN- γ al fine di aumentare la sensibilità del test immunologico QuantiFERON-TB Gold.

MATERIALI E METODI

Popolazione in studio

Nello studio sono stati arruolati 21 pazienti adulti con tubercolosi attiva (70% TB polmonare e 30% TB extrapolmonare) e 6 soggetti sani, inclusi come gruppo di controllo, seguiti presso il

Dipartimento di Malattie Infettive del Policlinico Umberto I° "Sapienza" di Roma. Dei 27 pazienti il 52% erano uomini e il 48% donne, il 46% dei soggetti non era di nazionalità italiana e nessuno presentava una condizione d'immunodeficienza. La diagnosi di tubercolosi è stata formulata mediante isolamento colturale di *Myc. tuberculosis* in 14 soggetti, mentre in 7 soggetti sono stati utilizzati criteri clinico-diagnostico strumentali (Rx, TAC) associati ad una valida risposta alla terapia antitubercolare.

Su tutti i pazienti è stato effettuato il test QuantiFERON-TB Gold (QFT-G) e successivamente è stato analizzato il rilascio della chemochina CXCL10/IP-10.

I 21 soggetti con TB attiva, in base all'esito del test QFT-G, sono stati suddivisi in due gruppi:

- a) 11 soggetti con test QFT-G positivo, inclusi come gruppo di controllo positivo
- b) 10 soggetti con test QFT-G negativo.

Test QuantiFERON® TB-Gold

Il QuantiFERON-TB Gold è un test diagnostico (Cellestis Ltd, Carnegie, Victoria, Australia) eseguito *ex vivo* su un campione di sangue periferico che permette la valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata ad antigeni specifici per *Myc. tuberculosis*: ESAT-6 (early secretory antigen target-6) e CFP-10 (culture filtrate protein-10).

Quattro aliquote da 1 ml di sangue intero eparinato sono incubate per 18 h a 37°C con gli antigeni specifici ESAT-6 e CFP-10, il mitogeno (phytoemmagglutinin, PHA) come controllo positivo e il Nil come controllo negativo. Dopo l'incubazione si preleva il plasma e si quantifica IFN- γ prodotto mediante saggio ELISA. Una curva con IFN- γ ricombinata, è effettuata ad ogni determinazione. Per facilitare il confronto tra IFN- γ e CXCL10/IP-10 i risultati sono espressi in pg/ml; 1UI/ml di IFN- γ corrisponde a 50 pg/ml. Il soggetto è ritenuto positivo per l'infezione da *Myc. tuberculosis* se la produzione di IFN- γ in risposta agli antigeni ESAT-6 e/o CFP-10 supera il cut-off stabilito di 0,35 UI/ml (17,5 pg/ml). L'analisi di dati è stata eseguita utilizzando il QuantiFERON-TB Analisi Software.

Produzione di CXCL10/IP-10

Il sangue intero eparinato, suddiviso in quattro aliquote, è incubato per 18 h con un controllo negativo (nil), un controllo positivo (PHA) e con gli antigeni MTB-specifici (ESAT-6 e CFP-10). La concentrazione di CXCL10/IP-10 sul sovratanante di coltura è stata quantificata mediante il test ELISA Quantikine Human CXCL10/IP-10 (R&D Systems; www.rndsystems.com) seguendo le indicazioni per l'uso fornite dal produttore.

Tutti i risultati sono espressi come pg/ml.

Analisi statistica

La produzione di IFN- γ e CXCL10/IP-10 in risposta a stimolazione antigenica è stata espressa in pg/mL. Per i diversi parametri analizzati, è stata calcolata la Mediana (range). I valori mediani dei diversi makers sono stati comparati utilizzando test non parametrico (test di Wilcoxon-Mann Withney). Una $p < 0.05$ è stata valutata come significativa.

RISULTATI

Nello studio sono stati arruolati 21 soggetti con malattia tubercolare attiva confermata a livello clinico-microbiologico e 6 soggetti sani. Tra i soggetti con TB il test QFT-G è risultato positivo in 11 e negativo in 10; i 6 pazienti sani sono risultati negativi al test QFT-G.

Rilascio di CXCL10/IP10 e IFN- γ

Per confrontare le potenzialità diagnostiche di CXCL10/IP-10 e IFN- γ abbiamo valutato i livelli di questi due markers in 6 soggetti sani e nel primo gruppo di 11 soggetti con TB e test QFT-G positivo.

In tutti i pazienti con TB attiva si evidenzia un elevato rilascio di CXCL10/IP10 in risposta agli stimoli antigenici ESAT-6 e CFP-10, che risulta più basso nei controlli sani. Tale differenza tra i due gruppi risulta essere statisticamente significativa ($p < 0.001$ per ESAT-6; $p = 0.003$ per CFP-10).

In parallelo, anche i livelli di IFN- γ valutati nei soggetti con TB e nei controlli sani, hanno rivelato differenze significative ($p = 0.008$ per ESAT-6 e $p = 0.005$ per CFP-10), Tabella 1. Si evidenzia, quindi, che il rilascio di CXCL10/IP10, dopo 18h di stimolazione specifica, nei soggetti con TB attiva è maggiore del rilascio di IFN- γ ($p < 0.001$ per entrambi gli antigeni).

CXCL10/IP10 nei soggetti con QFT negativo

Al fine di valutare se CXCL10/IP10 può miglio-

rare la sensibilità del test immunologico QFT-G, abbiamo testato il rilascio di questa chemochina nel secondo gruppo comprendente 10 soggetti con gravi forme di malattia tubercolare attiva e QFT-G negativo.

In questi pazienti è stata riscontrata un'elevata produzione di CXCL10/IP10 sia in risposta ad ESAT-6 che a CFP-10 (mediana 837pg/ml, range 244-1814; mediana 1674 pg/ml, range 377-1926, rispettivamente), mentre i valori mediani corrispondenti dell'IFN- γ , sono di 1pg/ml, (range 0-16) per ESAT-6; 4,25 pg/ml (range 0-15) per CFP-10. La concentrazione plasmatica di CXCL10/IP-10 era significativamente più alta rispetto alla concentrazione di IFN- γ ($p = 0.001$ per ESAT-6 e $p < 0.001$ per CFP-10), Figura I, e risulta paragonabile ai livelli osservati nel gruppo di soggetti con TB attiva e test QFT-G positivo ($p = 0.09$ per ESAT-6 e $p = 0.2$ per CFP-10).

DISCUSSIONE

L'introduzione nella pratica clinica dei test IGRA ha migliorato la diagnosi d'infezione tubercolare, ma in ogni caso, va sottolineato che questi test hanno delle limitazioni importanti, come ad esempio la riduzione notevole della sensibilità sia in pazienti con infezioni particolarmente severe a cui è associato uno scarso rilascio di IFN- γ dalle cellule immuno-competenti, sia in soggetti immuno-depressi, in particolare HIV positivi, in cui si assiste ad una progressiva perdita della capacità di montare risposte di ipersensibilità ritardata. In entrambi i casi si assiste ad una risposta falsamente negativa al test immunologico QuantiFERON-TB Gold.

Per valutare il possibile utilizzo di CXCL10/IP-10 come marker utile per la diagnosi dell'infezione tubercolare, ed in particolare per migliorare la performance del test QFT-G è stato inizialmente analizzato, come controllo, un gruppo di pazienti con TB attiva e test QFT-G positivo per verificare l'effettivo rilascio della chemochina CXCL10/IP-

Tabella 1. Confronto tra CXCL10/IP-10 ed IFN- γ nel primo gruppo di 11 soggetti con TB attiva e QFT-G positivo e nei controlli sani

PAZIENTI	Produzione di CXCL10/IP-10 ed IFN-g		P value
	CXCL10/IP-10 (pg/ml)*	IFN- γ (pg/ml)*	
TB attiva ^o (n=11)			
ESAT-6	1807 (46-1953)	44 (0-474,5)	$p < 0.001$
CFP-10	1111 (300-1974)	33,5 (0-139,5)	$p < 0.001$
Controlli sani (n=6)			
ESAT-6	251 (140-434)	0	$p = 0.002$
CFP-10	188 (68-579)	0	$p = 0.002$
P value	$p < 0.001$ Esat-6 $p = 0.003$ Cfp-10	$p < 0.008$ Esat-6 $p = 0.005$ Cfp-10	

*I valori sono espressi come mediana (range): 1 IU/ml IFN- γ = 50pg/ml, Source: NIBSC, UK

^o La diagnosi di TB è stata formulata mediante positività all'esame colturale

10 e successivamente un secondo gruppo di soggetti con gravi forme di malattia tubercolare, caratterizzati da basso rilascio di IFN- γ con test QFT-G negativo.

I risultati nel gruppo di controllo, TB attiva/QFT-G positivo, hanno evidenziato che la concentrazione plasmatica di CXCL10/IP10 in campioni stimolati con antigeni specifici di *Myc. tuberculosis* (ESAT-6/CFP-10) risulta più elevata nei pazienti rispetto ai controlli sani. In tal modo questa chemochina mostra un potere di discriminazioni tra gli individui infetti e sani simile a quello mostrato dal dosaggio dell' IFN- γ . I nostri risultati sono in accordo con i precedenti studi che suggeriscono che il rilascio di CXCL10/IP-10 sia indicativo di infezione tubercolare.

La produzione antigeno-specifica di La produzione antigeno-specifica di CXCL10/IP10 nei soggetti con TB attiva/QFT-G negativo risulta nettamente superiore all' IFN- γ evidenziando, quindi, un'ottima sensibilità del marker CXCL10/IP-10.

Il fatto che CXCL10/IP10 sia espresso in grandi quantità in tutti i soggetti con TB attiva, inclusi i soggetti con test QFT-G negativo, potrebbe indicare che questa chemochina sia coinvolta in un pathway immunologico complementare all' IFN- γ . Sulla base dei risultati ottenuti, CXCL10/IP-10 potrebbe essere considerato un marker immunologico aggiuntivo ai test commerciali nell'identificazione dell'infezione tubercolare consentendo, così di superare i limiti causati dalla depressione temporanea della risposta immunitaria sul rilascio di IFN- γ e risultando particolarmente utile nei soggetti immunodepressi che presentano quadri clinici "atipici" della tubercolosi HIV-associata la cui diagnosi si presenta particolarmente indagine.

BIBLIOGRAFIA

1. Azzurri A, Sow OY, Amedei A, et al. IFN-gamma inducible protein 10 and pentraxin 3 plasma levels are tools for monitoring inflammation and disease activity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2005; 7:1-8
2. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. *M. tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein CFP-10. *Microbiology* 1998; 144: 3195-3203
3. Bourgarit A, Carcelain G, Martinez V, et al. Explosion of tuberculin-specific Th1-responses induces immune restoration syndrome in tuberculosis and HIV co-infected patients. *AIDS* 2006;20:F1-F7
4. Ferrari G, Losi M, Meacci M, et al. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-g

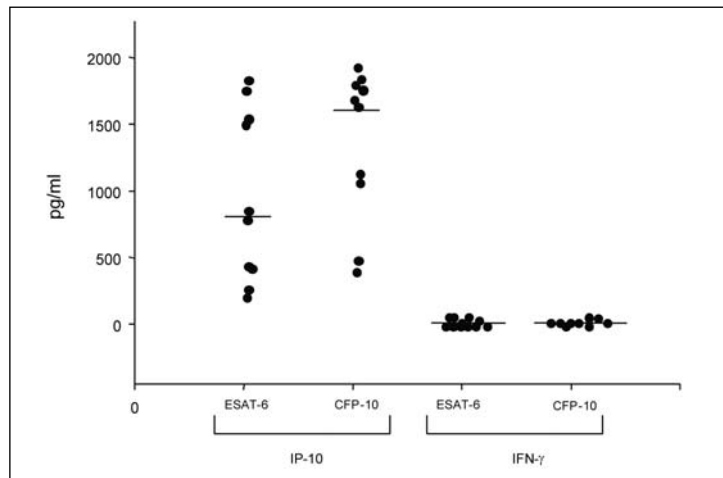


Figura I. Confronto dei biomarker nel secondo gruppo di 10 soggetti con TB attiva e QFT-G negativo. La produzione di CXCL10/IP-10 e IFN- γ , in risposta agli antigeni tubercolari ESAT-6 e CFP-10, è stata valutata in 10 soggetti con TB e test QFT-G negativo. Si osserva che la produzione di CXCL10/IP-10 è notevolmente superiore rispetto all' IFN- γ . Tale differenza è statisticamente significativa ($p < 0.001$)

5. Ferrero E, Biswas P, Vettoretto K, et al. Macrophages exposed to *Mycobacterium tuberculosis* release chemokines able to recruit selected leucocyte subpopulations: focus on gammadelta cells. *Immunology* 2003;108:365-74
6. Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *M. tuberculosis* and virulent *M. bovis* and for its absence in *M. bovis* BCG. *Infect Immun* 1996; 64: 116-122
7. Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, et al. Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1999;67:4295-7
8. Kaplan G, Luster AD, Hancock G, et al. The expression of a gamma interferon-induced protein (IP-10) in delayed immune responses in human skin. *J Exp Med* 1987;166:1098-1108
9. Lin Y, Zhang M, Hofman FM, et al. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64:1351-6
10. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, et al. Specific detection of tuberculosis infection: an interferon-gamma-based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 59-64
11. Nicol MP, Pienaar D, Wood K, et al. Enzyme-linked immunospot assay responses to early secretory antigenic target 6, culture filtrate protein 10, and purified protein derivative among children with tuberculosis: implications for diagnosis and monitoring of therapy. *Clin Infect Dis* 2005; 40:1301-8
12. Nicol MP, Sola C, February B, et al. Distribution of strain families of *Mycobacterium tuberculosis* causing pulmonary and extrapulmonary disease in hospitalized children in Cape Town, South Africa. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11):5779-81
13. Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, et al. Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines, and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med*

- 2005;145: 88-93
14. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part 1. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diag* 2006; 6(3):423-32
 15. Pai M, Lee WR, Colford JM. Interferon-assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 761-76
 16. Pathan AA, Wilkinson K, Klenerman P, *et al.* Direct *ex vivo* analysis of antigen-specific IFN γ -secreting CD4 T cells in *M.tuberculosis*-infected individuals: Associations with clinical disease state and effect of treatment. *J Immunol* 2001; 167: 5217-25
 17. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, *et al.* Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *M. tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63: 1710-7
 18. Zhang M, Lin Y, Iyer DV, *et al.* T cell cytokine responses in human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63:3231-4