MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2011, 63: 267 - 272

Joanna Siennicka, Agnieszka Częścik, Milena Dunal, Agnieszka Trzcińska

Wpływ stymulacji wirusem odry ekspresji wczesnych markerów aktywacji limfocytów T CD4+

Zakład Wirusologii NIZP-PZH w Warszawie
Kierownik: dr hab. B. Litwińska, prof. nadzw. w NIZP-PZH

Przedstawiono charakterystykę wczesnej odpowiedzi limfocytów pomocniczych (T CD4+) osób z różną historią zakażenia wirusem odry na wirusowo-swoistą stymulację. Oznaczano obecność receptora CD69 oraz zdolność komórek do produkcji interferonu (INF) zależnej od rodzaju szczepu i dawki wirusa.

Eliminacja odry stanowi jeden z priorytetów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Plan strategiczny opracowany dla państw Regionu Europejskiego zakładał eliminację zachorowań na odrę w tym regionie do roku 2010 (11). Pomimo dużych sukcesów w poprawie nadzoru nad odrą, przypadki epidemii w Europie ciągle są obserwowane (4). Chociaż zachorowania w większości dotyczą osób nieszczepionych, to odnotowuje się również przypadki odry wśród osób z udokumentowaną historią szczepień przeciwko odrze (1). Wyniki przeprowadzonych badań wstępnych wykazały, że w grupie osób młodych (20-30 lat), blisko połowa wykazuje śladową obecność przeciwciał przeciwko wirusowi odry (anty-MeV IgG) lub ich brak. Zachodzi więc pytanie o skuteczność szczepienia: czy pomimo braku przeciwciał wytworzona została pamięć immunologiczna i czy jest ona równie silna w stosunku do szczepów obecnie izolowanych w Polsce jak i tych, wchodzących w skład szczepionki. Jednym ze sposobów identyfikacji antygenowo-swoistych limfocytów jest określenie ekspresji cząsteczek CD69 i cytokin (9, 10). Obecność receptora CD69 na powierzchni komórki jest jednym z najwcześniejszych, pojawiającym się po 1 do 4 godzinach po stymulacji markerów aktywacji (7). Dodatkowym markerem aktywacji jest produkcja cytokin takich jak IFN, TNF czy IL-2 przez stymulowane komórki. Jednoczesne oznaczanie komórek wykazujących ekspresję CD69 i produkujących cytokiny znacznie zwiększyło możliwości badania odpowiedzi immunologicznej związanej z antygenowo-swoistą stymulacją komórek odpornościowych (8).

Praca była badaniem pilotażowym mającym na celu określenie wpływu stymulacji różnymi szczepami wirusa odry na ekspresję wczesnych markerów aktywacji limfocytów pomocniczych (T CD4+) osób z różną historią zakażenia wirusem odry oraz określenie zależności poziomu aktywacji od dawki wirusa użytego do stymulacji.

Badanie finansowane w ramach projektu MNiSW NN 404 107938

MATERIAŁ I METODY

B a d a n e o s o b y. Badania przeprowadzono na materiale pobranym od dwóch dobrowolnych dawców (MR i JS), u których w badaniach wstępnych określono poziom przeciwciał IgG dla wirusa odry (anty-MeV IgG). Oznaczenia serologiczne przeprowadzono metodą ELISA przy użyciu testu Enzygnost Anti-Measles Virus/IgG (Simens, Niemcy). Za wynik dodatni przyjmowano wartość $\Delta OD \geq 0,2$, za ujemny $\Delta OD \leq 0,1$, za wątpliwy, gdy wartość ΔOD zawierała się między 0,1 a 0,2. Poziom anty-MeV IgG (mIU/ml) obliczano wg procedury podanej przez producenta testu.

C h a r a k t e r y s t y k a b a d a n y c h o s ó b. MR - kobieta w wieku 28 lat, szczepiona przeciwko odrze w wieku 10 miesięcy, w surowicy której stwierdzono 213 mIU/ml anty-MeV IgG (ΔOD= 0,138, wynik wątpliwy). JS - kobieta w wieku 52 lat, nieszczepiona, seropozytywna, anty-MeV IgG 4 832 mIU/ml (ΔOD=1,019, wynik dodatni). U obu osób wykonano badania kontrolne obejmujące określenie liczby leukocytów i profilu limfocytów (Simulset IMK-*Lymphocyte*, Becton Dickinson), które u żadnej z nich nie wykazały odchyleń od normy.

S z c z e p y w i r u s a o d r y. Do badania użyto szczepionkowego szczepu wirusa odry – Edmonston (ATCC, VR-24) i szczepu wyizolowanego w 2006 r. w Polsce w Krajowym Ośrodku Referencyjnym WHO d/s. eliminacji odry/różyczki NIZP-PZH (izolat 2281/06). Wirusy namnożono, mianowano określając $TCID_{50}$ i po rozporcjowaniu przechowywano w -70°C.

W a r u n k i s t y m u l a c j i. Pełną krew pobraną na heparynę sodową rozporcjowywano po 0,5ml i dodawano zawiesinę wirusa zawierającą około 100 cząstek zakaźnych szczepu Edmonston (E100) oraz jej rozcieńczenie 10-krotne (E10) i 100-krotne (E1). Analogicznie przygotowano i dodawano izolat 2281/06 (D100, D10, D1). Kontrole pozytywne stymulacji stanowiły próbki, do których dodawano 1µg/ml enterotoksyny B *Staphylococcus aureus* (SEB) (S4881, Sigma). Kontrole negatywne stymulacji stanowiły próbki podlegające tym samym procesom inkubacji co pozostałe, do których nie dodawano wyżej wymienionych stymulatorów. Do wszystkich próbek zgodnie z procedurą testu BD FastImmune (Becton Dickinson, 337185) dodawano kostymulujące przeciwciała CD28 i CD49d i inkubowano 2h w 37ºC. W celu zahamowania wydzielania cząstek CD69 i interferonu (IFN) do próbek dodawano roztwór brefeldyny A (BFA) i inkubowano 4h w 37ºC. Po inkubacji dodawano EDTA i roztwór lizujący w celu usunięcia komórek przylegających do ścian probówki, lizy erytrocytów i utrwalenia leukocytów. Utrwalone komórki przechowywano w temp. -80ºC do czasu barwienia.

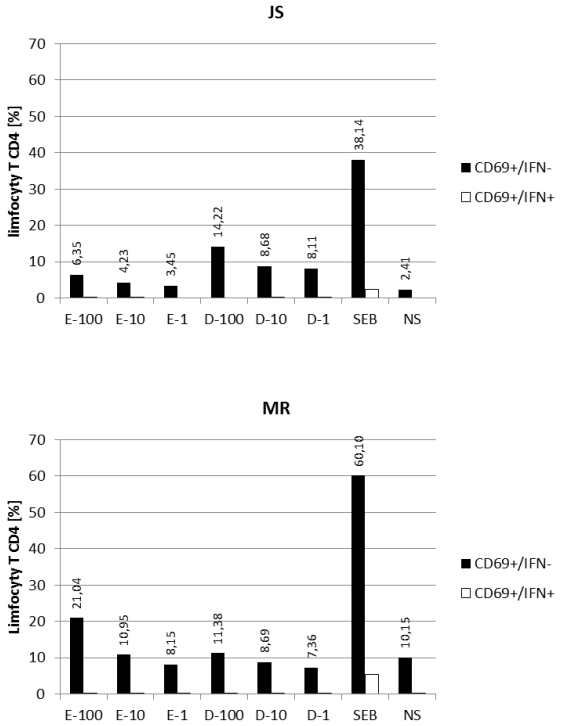
C y t o m e t r i a p r z e p ł y w o w a. Znakowanie utrwalonych komórek przeprowadzano zgodnie z procedurą testu BD FastImmune (Becton Dickinson, 337185). Po permeabilizacji, każdą próbkę znakowano koktajlem przeciwciał INFγ/FITC, CD69/PE, CD4/PerCP-Cy5.5, CD3/APC. W celu określenia swoistości użytych przeciwciał oraz ustalenia granic odcięcia między pozytywnymi i negatywnymi populacjami komórek, dla każdej próbki wykonywano kontrolę izotypową (γ2a/FITC, γ1/PE, CD4/PerCP-Cy5.5, CD3/APC). Po wybarwieniu komórki utrwalano i do czasu analizy przechowywano w lodówce. Próbki poddawano analizie czterokolorowej przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur i programu CellQuest. Do analizy zbierano 20 000 limfocytów T CD4+.

WYNIKI

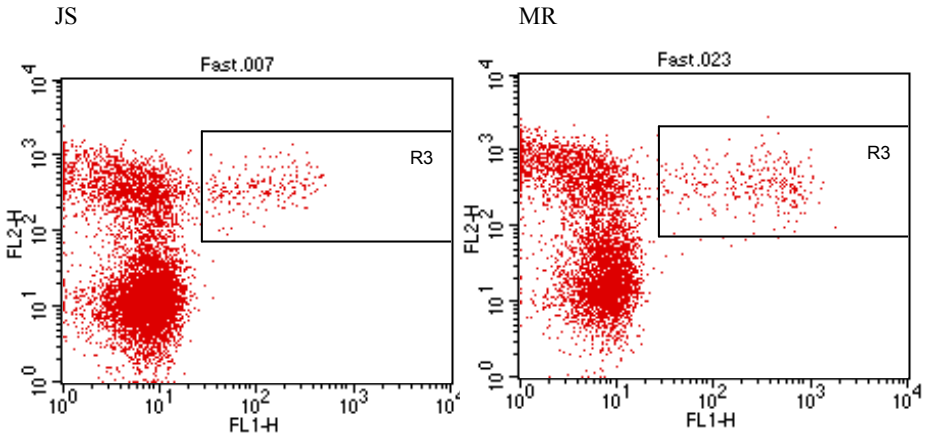
Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od dwóch osób. Osoba seropozytywna (anty-MeV IgG +), urodziła się przed wprowadzeniem szczepień w Polsce (JS), z czego można wnosić, że uzyskała odporność w wyniku naturalnego zakażenia. Oznaczenia serologiczne u drugiej osoby (MR), szczepionej przeciwko odrze 27 lat temu, dały wynik wątpliwy (anty-MeV IgG +/-).

Wyniki badania reaktywności limfocytów T CD4+ pod wpływem antygenowo-swoistej stymulacji wykazały różnicę w zakresie ekspresji wczesnego markera aktywacji (CD69) zależną od użytego szczepu (Ryc. 1). Podczas gdy limfocyty T CD4+ osoby seropozytywnej wykazywały wyższą ekspresję CD69 pod wpływem stymulacji dzikim szczepem wirusa odry (14,22% *versus* 6,35% przy stymulacji na poziomie około 100 cząstek zakaźnych wirusa), to u osoby szczepionej wyższy poziom reaktywności obserwowano pod wpływem stymulacji szczepionkowym szczepem MeV (21,04% *versus* 11,98% przy stymulacji na poziomie j.w.).

Limfocyty MR w stosunku do JS charakteryzowały się większą reaktywnością pod wpływem nieswoistej stymulacji (SEB), wyrażającą się zarówno większym odsetkiem



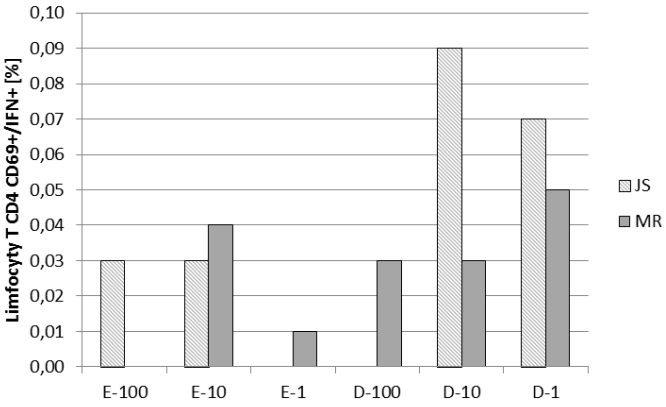
Ryc. 1. Odsetek limfocytów T CD4 wykazujących ekspresję cząsteczki CD69 i produkujących interferon (CD69+/IFN+) po stymulacji swoistej (E- szczepionkowy szczep, D-dziki izolat) wirusa odry oraz nieswoistej (SEB) u osoby seropozytywnej w wyniku naturalnego zakażenia wirusem odry (JS) i szczepionej, wykazującej śladową obecność przeciwciał anty-MeV IgG (MR). NS-kontrola negatywna.



Ryc. 2. Limfocyty T CD4 aktywowane SEB.
FL2-H – CD69/PE, FL1-H – IFN/FITC.
R3 – region obejmujący komórki T CD4 CD69+/IFN+

komórek z ekspresją CD69 (60,10% *versus* 38,14%), jak i komórek CD69+ produkujących interferon (5,37% *versus* 2,38%) (Ryc. 2). Jednocześnie komórki niestymulowane (NS) osoby szczepionej również wykazywały wyższy poziom ekspresji CD69 (10,15% *versus* 2,41%), jak i CD69+/INF+ (0,02% *versus* 0%). Poziom ekspresji CD69 zarówno u JS jak i u MR był zależny od dawki wirusa MeV (r^2=0,98+/-0,017).

Limfocyty pomocnicze CD4 CD69+ osoby seropozytywnej w wyniku naturalnego zakażenia (JS) jak i szczepionej, wykazującej śladową obecność przeciwciał anty-MeV



Ryc. 3. Odsetek limfocytów T CD4 CD69+/IFN+ po stymulacji swoistej szczepionkowym szczepem wirusa odry (Edmonston) i dzikim izolatem (2281/06) u osoby seropozytywnej w wyniku naturalnego zakażenia wirusem odry (JS) i szczepionej, wykazującej śladową obecność przeciwciał anty-MeV IgG (MR). Odpowiedź na stymulację przedstawiono jako różnicę między odsetkiem pozytywnych komórek CD69+/IFN+ w próbkach stymulowanych i nie stymulowanych.

IgG, odpowiedziały produkcją IFN na stymulację zarówno dzikim, jak i szczepionkowym szczepem odry. Wyższy poziom tej odpowiedzi u osoby seropozytywnej obserwowano po stymulacji dzikim szczepem (Ryc. 3). W zakresie odpowiedzi CD69+/IFN+ nie obserwowano zależności od dawki wirusa.

DYSKUSJA I PODSUMOWANIE

Odpowiedź immunologiczna po podaniu atenuowanej szczepionki przeciwko odrze jakościowo jest podobna do indukowanej w wyniku naturalnego zakażenia. Różnice dotyczą między innymi poziomu produkowanych przeciwciał, które są niższe w przypadku immunizacji (2, 3). Wiadomo przy tym, że istotnym elementem odporności na odrę jest wytworzenie długotrwałej pamięci immunologicznej. *Ovsyannikova* i wsp. (6) oceniali zdolność osób w wieku 15-25 lat, seronegatywnych i seropozytywnych w wyniku szczepienia przeciwko odrze, do odpowiedzi na MeV poprzez określenie proliferacji wirusowo-swoistych limfocytów T. Chociaż stwierdzono, że odsetek komórek CD4 jak i CD8 był znacząco niższy u osób seronegatywnych to potwierdzono obecność wirusowo-swoistej odpowiedzi komórkowej będącej wynikiem szczepienia (6). W prezentowanej pracy potwierdzono, że u osoby szczepionej 27 lat temu, wykazującej śladową obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko odrze, wytworzone zostały mechanizmy pamięci immunologicznej, pozwalające na reakcję w wyniku stymulacji zarówno szczepem szczepionkowym jak i dzikim izolatem wirusa odry, co jest zgodne z powyższymi obserwacjami. Naniche i wspł. (5) donosili z kolei, że osoby po naturalnym zakażeniu wykazują wyższy odsetek MeV-swoistych CD4 w porównaniu z osobami szczepionymi. Wyniki prezentowanych badań potwierdzają tę obserwację. Pomimo wyraźnie wyższej reaktywności limfocytów osoby szczepionej (zarówno w wyniku stymulacji SEB jak i MeV), co mogło być spowodowane różnicą wieku badanych osób, u osoby z odpornością nabytą w wyniku naturalnego zakażenia stwierdzono wyższy odsetek MeV-swoistych CD4 (CD69+/IFN+).

W podsumowaniu można stwierdzić, że ekspresja wczesnych markerów aktywacji (CD69 i IFN) limfocytów pomocniczych zależna jest od użytego do stymulacji szczepu wirusa odry, rodzaju uzyskanej odporności (poszczepienna, naturalne zakażenie), a w zakresie ekspresji CD69 również od dawki wirusa użytego do aktywacji.

J. Siennicka, A. Częścik, M. Dunal, A. Trzcińska

Effect of stimulation with the measles virus on expression of early activation markers on CD4+ T lymphocytes

SUMMARY

Elimination of measles is one of the priority plans of WHO. The success of this plan depends on the development of long lasting, postvaccinal immune response. The aim of this study was to present the effect of stimulation with different strains of measles virus on the expression of T-helper cell (CD4+ T) early activation markers in people with different history

of measles infection and to determine the correlation between the activation and dose of virus used for stimulation. The study was conducted using material derived from two patients: one seropositive due to natural infection and one vaccinated, with traces of anti-MeV IgG antibodies. In the CD4 T helper cells, the expression of CD69 receptor and the ability of the cells to produce INF after stimulation with the vaccine-derived or wild-type strain of measles virus was determined. For antigen-specific stimulation the virus suspension containing about 100 infectious particle, its tenfold and hundredfold dilutions was used. We found that the expression of T-helper cells early activation markers depended on the strain of the measles virus used for the stimulation, type of the immune response (postvaccinal, natural infection), and in the case of CD69 expression also on the dose of the virus used for the stimulation.

PIŚMIENNICTWO

1. *Czarkowski P, Cielebąk E, Dacka P* i inni. Odra. W: Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2006 roku. Wydawnictwo NIZP-PZH, Warszawa 2008, 58 - 60.
2. *Janaszek W, Ślusarczyk J*. Immunity against measles in populations of women and infants in Poland. Vaccine 2003; 21: 2948 – 53.
3. *Krugman S*. Present status of measles and rubella immunization in the United States: a medical progress report. J Pediatr 1977; 90: 1-12.
4. *Muscat M, Bang H, Wohlfahrt J* i inni. Measles in Europe: an epidemiological assessment. Lancet 2009; 373: 383 - 89.
5. *Naniche D, Garenne M, Rae C* i inni. Decrease in measles virus-specific CD4 T cell memory in vaccinated subjects. J Infect Dis 2004; 190: 1387 – 95.
6. *Ovsyannikova IG, Dhiman N, Jacobson RM* i inni. Frequency of measles virus-specific CD4+ and CD8+ T cells in subjects seronegative or highly seropositive for measles vaccine. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 411 – 16.
7. *Shapiro HM*. Practical Flow Cytometry. Wydawnictwo Wiley-Liss. Wydanie czwarte. New Jersey 2003.
8. *Suni MA, Picker LJ, Maino VC*. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. J Immunol Methods 1998; 212: 89 -98.
9. *Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM* i inni. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. J Clin Invest 1997; 99: 1739 - 50.
10. *Waldrop SL, Davis KA, Maino VC* i inni. Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. J Immunol 1998; 161: 5284 - 95.
11. World Health Organization. Global Programme for Vaccines and Immunization. Expanded Programme on Immunization. The Immunological Basis for Immunization Series. Module 7: Measles. WHO Genewa 1993.

Otrzymano: 8 VII 2011 r.
Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Wirusologii NIZP-PZH.