

Izražaj perforina u citotoksičkim T-limfocitima dojenčadi s bronhiolitisom uzrokovanim respiracijskim sincicijskim virusom

Alma-Martina CEPIKA¹⁾, dr. med.
Alenka GAGRO¹⁾, dr. sc., dr. med.
Ana BAČE²⁾, primarijus, mr. sc., dr. med.,
specijalist infektolog
Dorian TJEŠIĆ-DRINKOVIĆ³⁾, primarijus,
dr. sc., dr. med., specijalist pedijatar
Mladen MATIĆ²⁾, dr. med.,
specijalist infektolog
Jadranka KELEČIĆ³⁾, dr. med.,
specijalist pedijatar
Tamara BARIČIĆ VOSKRESENSKY³⁾,
mr. sc., dr. med., specijalist pedijatar
Vladimir DRAŽENOVIĆ⁴⁾, dr. med.,
specijalist mikrobiolog
Gordana MLINARIĆ-GALINOVIĆ⁴⁾,
prof. dr. sc., dr. med., specijalist mikrobiolog
Duška TJEŠIĆ-DRINKOVIĆ³⁾, dr. sc.,
dr. med., specijalist pedijatar
Zvonimir VRTAR⁵⁾, dr. med.,
specijalist kirurg
Sabina RABATIĆ¹⁾, prof. dr. sc., dipl. ing.

1) Imunološki zavod, Zagreb

2) Klinika za infektivne bolesti »Dr. Fran Mihaljević«, Zagreb

3) Klinički bolnički centar Zagreb, Klinika za pedijatriju Šalata

4) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Odjel za virologiju, Zagreb

5) Klinika za dječje bolesti, Zagreb

Ključne riječi

perforin
dojenčad
respiracijski sincicijski virus
T-limfociti

Key words

perforin
infants
respiratory syncytial virus
T cells

Primljeno: 2005–09–05

Received: 2005–09–05

Prihvaćeno: 2005–09–30

Accepted: 2005–09–30

Znanstveni članak

Perforin je protein smješten u sekretornim granulama citotoksičkih T-limfocita. Zajedno s ostalim komponentama granula nužan je za lizu stanica organizma inficiranih unutarstaničnim patogenima. Ispitali smo izražaj perforina u citotoksičkim T-limfocitima dojenčadi s bronhiolitisom uzrokovanim respiracijskim sincicijskim virusom (RSV). Uzorci periferne krvi prikupljeni su za vrijeme primarne infekcije i rekonvalescencije u inficirane dojenčadi (n=12) i od kontrolne skupine zdrave djece koja su odgovarala po dobi i spolu. Analiza prikupljenih podataka pokazala je približno jednak postotak citotoksičkih T-limfocita koji izražavaju perforin u sve tri skupine ispitanika. Međutim, pronađene su razlike u razini izražaja perforina po pojedinom limfocitu između rekonvalescentne djece i zdravih kontrola, što upućuje na trajniji poremećaj stanične imunosti nakon prestanka infekcije RSV-om.

Perforin expression in cytotoxic T cells of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis

Scientific paper

Perforin is a protein located in secretory granules of cytotoxic T cells. Together with other granules' proteins perforin is necessary for lysis of host's cells infected with intracellular pathogens. We investigated perforin expression in cytotoxic T cells of infants with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus (RSV). The peripheral blood samples were obtained from hospitalized infants during primary infection and after the resolution of the disease (n=12), and from the control group of age- and gender-matched healthy children. Analysis of the data revealed that the percentage of perforin-expressing cytotoxic T cells was similar in all three groups of tested subjects. However, there were differences in perforin expression levels in cytotoxic T cells between once-infected infants and their healthy controls. This indicates an ongoing disturbed cellular immune response even after the resolution of RSV infection.

Uvod

Citotoksički T-limfociti su podskupina limfocita koja ima važnu ulogu u obrani od unutarstaničnih patogena – virusa, unutarstaničnih bakterija i nekih parazita. U tim infekcijama poželjno je da se zaražena stanica uništi bez razaranja njene membrane i posljedičnog ispuštanja patogena u izvanstanični prostor. To se može postići poticanjem programirane stanične smrti ili apoptoze zaraženih stanica. Glavni mehanizam kojim citotoksički T-limfociti potiču apoptozu u ciljnim stanicama je perforinom posredovana stanična liza. Perforin je protein smješten u unutarstaničnim granulama citotoksičkih T-limfocita, koje se luče nakon kontakta T-limfocita s antigenom za koji nosi specifičan receptor. Perforin se umeće u lipidni dvosloj i polimerizira u membrani ciljne stanice, stvarajući pore u membrani. Kroz te pore ulaze ostali citotoksički proteini iz granula: granzimi (serinske proteaze iz iste porodice kao i tripsin) i granulizin, koji uništavaju unutarnji integritet stanice, započinju fragmentaciju DNA, i induciraju apoptotski proces [1].

Sposobnost lize ciljnih stanica, ili citotoksičnost, mjerljiva je u *in vitro* uvjetima detekcijom otpuštanja određenog radioaktivnog izotopa, najčešće kroma (^{51}Cr), iz prethodno obilježenih stanica nakon dodavanja citotoksičkih limfocita. No, kako je nedavno pokazano da razina perforina u stanici korelira s njenom citotoksičnošću [2], indirektan uvid u efektorsku funkciju citotoksičkih T-limfocita bez korištenja radioaktivnih metoda može se dobiti i mjerenjem razine unutarstaničnog perforina protočnom citometrijom.

Cilj našeg istraživanja bio je izmjeriti razinu perforina u citotoksičkim T-limfocitima za vrijeme i nakon infekcije organizma određenim unutarstaničnim patogenom. Kao primjer smo odabrali infekciju respiracijskim sincicijskim virusom (RSV-om). RSV je paramiksovirus koji primarno inficira epitelne stanice dišnih puteva, koje i uništava tijekom propagacije uz otpuštanje proupalnih medijatora, povećano lučenje sekreta, i edem intersticija [3, 4]. U ljudi se smatra ubikvitarnim patogenom jer većina djece preboli infekciju RSV-om barem jednom do svoje druge godine života [5]. Bolest uglavnom ima oblik infekcije gornjih dišnih puteva, a ako se virus i proširi u donje dišne puteve simptomi su većinom blagi [6]. No, kod novorođenčadi i dojenčadi koja su po prvi puta inficirane RSV-om, zbog nezrelosti pluća infekcija se može manifestirati kao bronhiolitis ili bronhopneumonija. Simptomi traju tjedan do 10 dana, kada se povlače s razvojem specifične imunološke reakcije na RSV. Stanice imunološkog sustava koje se smatraju najvažnijim za odstranjivanje virusa su upravo citotoksički T-limfociti [7, 8, 9]. No usprkos naočigled uspješnoj obrani organizma (smrtni slučajevi su izuzetno rijetki, i onda kod od ranije imunološki kompromitirane djece), RSV infekcija ne potiče nastajanje trajne imunosti na virus i reinfekcije

su moguće u kratkom roku nakon primarne zaraze, iako u blažem obliku [10]. Također, čini se da djeca koja su preboljela RSV-bronhiolitis imaju znatno povećan rizik za razvoj kroničnog piskanja kasnije u djetinjstvu u usporedbi s ostalom djecom [11]. Sve to upućuje na poremećaj normalne imunološke reakcije tijekom RSV-infekcije koja nije još u potpunosti definirana. Kako do sada još nije bila utvrđivana razina perforina u RSV-om inficirane djece, smatrali smo da bi naše istraživanje moglo pružiti dodatan uvid u imunopatogenezu RSV-infekcije.

Materijal i metode

Bolesnici i kontrole

Uzorci heparinizirane periferne krvi dobiveni su iz novorođenčadi i dojenčadi ($n = 12$; 6 djevojčica i 6 dječaka medijan dobi 4,7 mjeseci) hospitalizirane zbog RSV-om uzrokovanog bronhiolitisa u akutnoj fazi bolesti i rekonvalescenciji tijekom zimske epidemije 2003./04., te njihovih zdravih kontrola ($n = 15$; 7 djevojčica i 8 dječaka medijan dobi 5,5 mjeseci). Prije potvrde RSV-a kao uzročnika infekcije i vađenja krvi za imunološke testove, djeca su bila samo na simptomatskoj terapiji. Dijagnoza bronhiolitisa bila je definirana kao piskanje, O_2 saturacija u perifernoj krvi $< 95\%$, te hiperinflacija pluća bez infiltrata na roentgenogramu pluća. Djeca u kontrolnoj skupini bila su klinički zdrava u vrijeme uzimanja uzorka i ni pod kakvom terapijom. Cjelokupno istraživanje je bilo odobreno od strane Etičkih povjerenstava svih ustanova koje su sudjelovale u studiji. Roditelji su bili informirani o istraživanju i dali pismeni pristanak za vađenje uzoraka krvi.

Potvrda RSV-infekcije

Virus je potvrđen u nazofaringealnom sekretu unutar prvih 7 dana od početka simptoma putem brze detekcije antitijelima (DFA; od engl. direct fluorescent antibody, Institute Virion Ltd, Switzerland) i/ili izolacijom virusa na staničnim kulturama (HeLa, GMK ili Hep-2 stanične linije).

Klinički simptomi i laboratorijski parametri

Određivanje kompletne krvne slike, brzine sedimentacije eritrocita, C-reaktivnog proteina i bakteriološke analize izvršene su za vrijeme rutinske obrade tijekom hospitalizacije. Na taj način su isključeni bolesnici s eventualnom pratećom ili superponiranom infekcijom. Simptomi (piskanje, minimalna O_2 saturacija, maksimalna respiratorna frekvencija i vrućica) su određeni prema standardima za te parametre.

Monoklonska antitijela

Populaciju citotoksičkih T-limfocita odredili smo pomoću slijedećih mišjih antitijela na humane površinske biljege: anti-CD3 konjugiran s alofikocijaninom (APC-

-om), i anti-CD8 konjugiran s fikoeritrin-Cy5 (PE-Cy5). Intracelularno smješten perforin obilježavao se antitijelom konjugiranim s fluorescein izotiocijanatom (FITC). U svakom pokusu su upotrebljavane izotipske kontrole za određivanje nespecifičnog vezanja. Sva antitijela su proizvedena u BD Biosciences, Heidelberg, Njemačka.

Obilježavanje heparinirane krvi monoklonskim antitijelima

Obilježavanje je vršeno unutar nekoliko sati od prispjeća uzorka. Iz Vacutainer® epruveta (BD Diagnostics, Heidelberg, Njemačka) uzeto je 50 µL krvi i premješteno u plastične Falcon-epruvete (BD Biosciences). Krv je inkubirana s 5 µL anti-CD3 i anti-CD8 monoklonskih antitijela 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Eritrociti su zatim lizirani dodatkom FACS Lysing-otopine (BD Biosciences) u kojoj je krv stajala 10 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Nakon toga su epruvete isprane sa »Staining«-puferom (1 %-tni FCS i 0,1 %-tni NaN₃ u Dulbeccovoj pročišćenoj fiziološkoj otopini), te stanice fiksirane 4 %-tnim formaldehidom na 4 °C 20 minuta. Potom je stanična membrana permeabilizirana puferom s 0,1 % saponina, te su stanice inkubirane s 10 µL anti-perforin monoklonskog antitijela 20 minuta na 4 °C. Stanice su na kraju još jednom isprane s permeabilizacijskim puferom da se odstrani nevezano antitijelo, resuspendirane u »Staining«-puferu i analizirane na FACSCalibur protočnom citometru sa CellQuest programom (BD Biosciences, Mountain View, SAD).

Statistička obrada podataka

Rezultati analize podataka dobivenih propuštanjem stanica kroz protočni citometar bili su izraženi kao postotak (%) stanica u ogradi i njihov srednji intenzitet fluorescencije (MFI; od engl. *mean fluorescence intensity*). Usporedba između rezultata iz akutne faze i rekonvalescencije vršena je neparametarskim Wilcoxonovim testom, a između RSV-om inficirane djece i zdravih kontrola neparametarskim Mann-Whitney *U*-testom. *P*-vrijednost manja od 0,05 se smatrala statistički značajnom.

Rezultati

Izražaj perforina u citotoksičkim T-limfocitima mjeren protočnom citometrijom

Propuštanjem suspenzije stanica kroz protočni citometar prikupljeno je najmanje 5000 stanica u limfocitnoj ogradi postavljenoj na osnovu veličine (FSC, od engl. *forward scatter*) i zrnatosti (SSC, od engl. *side scatter*) stanica. Da bi se izdvojili T-limfociti od ostalih stanica krvi postavljena je druga ograda na CD3⁺ staničnoj populaciji, kroz koju se zatim analizirao udio efektorskih citotoksičkih T-limfocita (tj. CD8⁺perforin⁺ dvostruko pozitivnih stanica) i srednji intenzitet fluorescencije perforina na tim stanicama (Slika 1). Statistička analiza tako dobivenih po-

dataka pokazala je da nema značajne razlike u postotku perforin⁺ citotoksičkih T-limfocita između uzoraka skupljenih u akutnoj fazi bolesti i u rekonvalescenciji, niti u usporedbi sa zdravim kontrolama. Iako nije bilo značajne statističke razlike u srednjem intenzitetu fluorescencije (MFI) perforina u RSV-om zaražene djece u akutnoj fazi infekcije i rekonvalescenciji, MFI perforina u rekonvalescentnoj fazi RSV-infekcije bio je značajno niži u usporedbi s onim u zdravih kontrola. Postotak citotoksičkih T-limfocita u perifernoj krvi niti u jednoj fazi infekcije nije se razlikovao od postotka tih stanica u zdravih kontrola (Tablica 1).

Rasprava

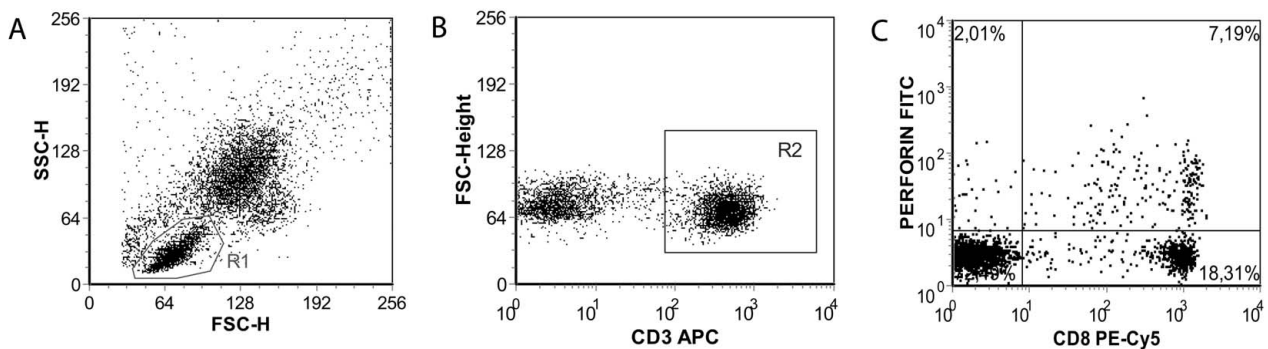
Jedno od ranijih objašnjenja uzroka teške kliničke slike primarne RSV-infekcije kod novorođenčadi i dojenčadi bila je nezrelost imunološkog sustava u toj dobi. To je i djelomično potvrđeno u nekim istraživanjima, npr. *Berthoua i sur.* [12], koja su pokazala da je udio perforin⁺CD8⁺ T-limfocita iz pupkovine manji nego u odraslih, sa slabijom citotoksičkom aktivnošću. No, podaci dobiveni u našem istraživanju ukazuju da čak i mala djeca zaražena RSV-om imaju sličan udio citotoksičkih T-limfocita u akutnoj fazi bolesti kao i zdrave kontrole, te urednu citotoksičku aktivnost mjerenu razinom unutarstaničnog perforina. Ti rezultati su u skladu s prijašnjim studijama. *Mbawuike i sur.* [13] pokazali su da je citotoksičnost CD8⁺ T-limfocita kod RSV-om inficirane novorođenčadi i djece prisutna, i primarno ovisi o samoj infekciji, a ne o dobi djeteta. Na modelu kongenitalne infekcije humanim citomegalovirusom (HCMV) pokazano je da zaražena novorođenčad imaju visoku razinu perforina u HCMV-specifičnim CD8⁺ T-limfocitima i citotoksičkim T-limfocitima općenito, sa znatnom sposobnosti citolize ciljnih stanica [14]. Iz toga bi se moglo zaključiti da, iako citotoksički T-limfociti novorođenčadi možda nemaju bazalnu ekspresiju perforina u istoj mjeri kao i odrasli, i dalje mogu uspješno reagirati u obrani od virusne infekcije.

Određivanje postotka stanica koje sadrže perforin nije vrlo specifičan način mjerenja efektorskih funkcija CD8⁺ T-limfocita. Naime, površinski biljezi T-limfocita koje smo mi koristili ne pružaju informaciju da li je dotični limfocit i specifičan za antigene RSV-a. Moguće je da aktivirani antigen-specifični T-limfociti imaju visoku razinu perforina po stanici – dakle izraženu efektorsku sposobnost – ali se ne razlučuju od ostalih stanica koje jesu dođuše perforin⁺, ali s malom razinom unutarstaničnog proteina. Stoga smo pri analizi naših rezultata mjerili i srednji intenzitet fluorescencije (MFI), koji odgovara broju vezanih mjesta po stanici za odgovarajući antigen (u ovom slučaju perforin) i ne ovisi o broju stanica pozitivnih za taj antigen [15]. Analiza je pokazala da je tako izražena razina perforina u citotoksičnim T-limfocitima značajno ma-

nja u rekonvalescentnoj fazi RSV-infekcije u usporedbi sa zdravim kontrolama. Kako smo mi izvodili naše istraživanje na stanicama periferne krvi, prvo objašnjenje koje se nameće jest da su T-limfociti s visokom razinom perforina migrirali u donje dišne puteve, dakle na mjesto infekcije, te da nam stoga nisu bili dostupni. No, za to bi bio potreban određen stimulus na periferiji u obliku upalnih medijatora ili samog virusa, a poznato je da se kod djece koja nisu imunološki kompromitirana RSV može detektirati do najviše 3 tjedna od početka bolesti [16], što čini naš rezultat neočekivanim. Prijašnja mjerenja razine CD25, aktivacijskog biljega T-limfocita, pokazala su povećani udio CD25⁺ limfocita u rekonvalescenciji [17] i povećanu razinu solubilnog CD25 u akutnom i rekonvalescentnom stadiju [18] RSV-infekcije kod djece. Ti rezultati zajedno s našima ukazuju na kontinuitet imunološke reakcije nakon infekcije RSV-om kod inače klinički posve zdrave djece, čiji uzrok je za sada nepoznat.

Jedno objašnjenje je da RSV perzistira u plućima nakon akutne faze bolesti, što je do sada pokazano samo na

animalnim modelima [19, 20, 21] i staničnim linijama [22]. Za drugi je virus iz iste porodice *Paramyxoviridae*, virus ospica, poznato da može nakon primarne infekcije u dječjoj dobi perzistirati u latentnom obliku da bi se nakon 7 do 10 godina bolest reaktivirala kao subakutni skleroizirajući panencefalitis (SSPE) [23]. Perzistirajuća infekcija RSV-om nije još dokazana u ljudi, ponajviše zbog toga što je biopat plućnog tkiva ili bronhoalveolarni ispirak rekonvalescentnog, ali klinički zdravog djeteta nedostupan. Međutim, ako je perzistirajuća RSV-infekcija moguća, mogla bi poslužiti kao okidač za nastanak astme kasnije u djetinjstvu u određenog broja djece koja su prebolila RSV-bronhiolitis. Astma je inače bolest koja se povezuje s prevalencijom Th2-tipa stanične imunološke reakcije nad Th1-reakcijom [24]. Slično stanje se nalazi i kod akutnog stadija RSV-infekcije [25, 26], iako je Th1-tip T-limfocitne reakcije optimalan za odstranjivanje virusa iz organizma [27]. Drugo objašnjenje niske razine perforina u citotoksičnim T-limfocitima se može naći u mogućoj kontinuiranoj, ali neprimjerenj upalnoj reakciji Th2-tipa ko-



Slika 1. Reprezentativne slike dobivene analizom na protočnom citometru: (A) veličine (FSC) i zrnatosti (SSC) stanica periferne krvi na kojima je postavljena limfocitna ograda, (B) izdvajanja T-limfocita na temelju izražaja CD3 biljega iz ukupne limfocitne populacije, i (C) CD8/perforin dvostruko pozitivnih stanica u zajedničkoj limfocitnoj i CD3 ogradi

Figure 1. Representative dot-plots of flow cytometric analyses of: (A) size (forward-scatter – FSC) and granularity (side-scatter – SSC) of peripheral blood cells, within lymphocyte gate, (B) T cell isolation from total lymphocytes based on CD3 antigen expression, and (C) CD8/perforin double-positive cells in both lymphocyte and CD3 gate

Tablica 1. Deskriptivna statistika mjerenih parametara. Statistički značajna razlika dobivena je usporedbom srednjeg intenziteta fluorescencije perforina (MFI) na citotoksičnim T-limfocitima djece u rekonvalescentnom stadiju nakon infekcije respiracijskim sincicijskim virusom s perforinom u zdravim kontrola neparametarskim Mann-Whitney *U*-testom pri *p*-vrijednosti < 0,05 (označeno zvjezdicom). MFI = mean fluorescence intensity (srednji intenzitet fluorescencije); CTL = citotoksički T-limfociti

Table 1. Descriptive statistics of measured parameters. Comparison of perforin mean fluorescence intensity (MFI) between cytotoxic T cells (CTLs) of convalescent infants after respiratory syncytial virus infection and their healthy controls by non-parametric Mann-Whitney *U*-test yielded statistical significance. *P*-value < 0.05 was considered significant (marked with asterix)

	Akutna faza		Rekonvalescencija			Zdrave kontrole		
	medijan	raspon min. maks.	medijan	raspon min. maks.	medijan	raspon min. maks.	medijan	raspon min. maks.
% perforin ⁺ CTL-a	1,4	0,03 9,6	1,8	0,8 10,4	3,1	1,1 5,6		
perforin MFI	19,8	5,2 57,4	11,7*	7,2 18,8	20,5*	10,7 56,3		
% CTL-a u T-limfocitima	17,2	10,9 27,2	18,2	12,3 28,5	17,2	10,3 21,7		

ja je prisutna i nakon što RSV-a više nema u organizmu, koja privlači većinu efektorskih T-limfocita s visokom razinom perforina u pluća čineći ih nedostupnima detekciji. Kako su istraživanja ekspresije perforina u zdrave djece oskudna [28, 29], a naše je jedino koje se bavi ekspresijom perforina za vrijeme RSV-infekcije, za razjašnjavanje gore navedenih teorija i naših rezultata će svakako biti potrebna daljnja istraživanja.

Literatura

- [1] Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. T cell-mediated cytotoxicity. U: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6. izd. New York: Garland Publishing, 2005: 351–357.
- [2] Zhang D, Shankar P, Xu Z i sur. Most antiviral T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood* 2003; 101:226–35.
- [3] Collins PL, Chanock RM, Murphy BR. Respiratory syncytial virus disease. U: Knipe D, Howley P et al., eds. *Fields Virology*. 4. izd. Vol.1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:1443–86.
- [4] Black CP. Systematic review of the biology and medical management of respiratory syncytial virus infection. *Respir Care* 2003; 48:209–231.
- [5] Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child* 1986; 140:543–6.
- [6] Meissner HC. Economic impact of viral respiratory disease in children. *J Pediatr* 1994; 124:s17–s21.
- [7] Cannon MJ, Openshaw PJ and Askonas BA. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med* 1988; 168:1163–8.
- [8] Alwan WH, Kozłowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 1994; 179:81–9.
- [9] B S Graham, L A Bunton, P F Wright, and D T Karzon. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J Clin Invest* 1991; 88:1026–33.
- [10] Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med*. 1979; 300:530–4.
- [11] Peebles RS Jr. Viral infections, atopy, and asthma: is there a causal relationship? *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113:S15–8.
- [12] Berthou C, Legros-Maida S, Soulie A i sur. Cord blood T lymphocytes lack constitutive perforin expression in contrast to adult peripheral blood T lymphocytes. *Blood* 1995; 85:1540–46.
- [13] Mbawuiké IN, Wells J, Byrd R, Cron SG, Glezen WP, Piedra PA. HLA-restricted CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte, interferon- γ , and interleukin-4 responses to respiratory syncytial virus infection in infants and children. *J Inf Dis* 2001; 183:687–96.
- [14] Marchant A, Appay V, van der Sande M i sur. Mature CD8⁺ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 2003; 111:1747–55.
- [15] Shapiro HM. Flow cytometry: problems, parameters, probes and principles. U: *Practical flow cytometry*. 4. izd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2003:18–48.
- [16] Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM. Respiratory syncytial virus infections in infants: quantitation and duration of shedding. *J Pediatr* 1976; 89:11–5.
- [17] Renzi PM, Turgeon JP, Yang JP, Drblik SP, Marcotte JE, Pedneault L, Spier S. Cellular immunity is activated and a T_H-2 type response is associated with early wheezing in infants after bronchiolitis. *J Pediatr* 1997; 130:584–93.
- [18] Smyth RL, Fletcher JN, Thomas HM, Hart CA. Immunological responses to respiratory syncytial virus infection in infancy. *Arch Dis Child* 1997; 76:210–4.
- [19] Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJM. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 169:801–5.
- [20] Hegele RG, Hayashi S, Bramley AM, Hogg JC. Persistence of respiratory syncytial virus genome and protein after acute bronchiolitis in guinea pigs. *Chest* 1994; 105:1848–54.
- [21] Valarcher JF, Bourhy H, Lavenu A, Bourges-Abella N, Roth M, Andreoletti O, Ave P, Schelcher F. Persistent infection of B lymphocytes by bovine respiratory syncytial virus. *Virology* 2001; 291:55–67.
- [22] Guerrero-Plata A, Ortega E, Ortiz-Navarette V, Gomez B. Antigen presentation by a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. *Virus Res* 2004; 99:95–100.
- [23] Griffin DE, Bellini WJ. Measles virus. U: Knipe D, Howley P et al., ur. *Fields Virology*. 4. izd. Vol.1. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1267–1312.
- [24] Tudorić N, Pavičić F. Astma. U: *Vrhovac i sur., Interna medicina*. 3. izd. Zagreb: Naklada Ljevak, 2003:714–721.
- [25] Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL i sur. RSV infection in infants is associated with predominant T_H2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:190–5.
- [26] Bendelja K, Gagro A, Baće A i sur. Predominant type-2 response in infants with RSV infection demonstrated by cytokine flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:332–8.
- [27] Janeway CA, Travers P, Walport M, Schlomchik M. T_H1 cells coordinate the host response to intracellular pathogens. U: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6. izd. New York: Garland Publishing, 2005:359–361.
- [28] Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G i sur. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood* 1998; 92:2410–20.
- [29] Feldmann J, Le Deist F, Ouachee-Charadin M i sur. Functional consequences of perforin gene mutations in 22 patients with familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol*. 2002; 117:965–72.