

Detekcija aktivacijskih antigena na T-limfocitima u diferencijalnoj dijagnostici infekcija uzrokovanim hantavirusima ili leptospirama

Alemka MARKOTIĆ¹⁾, prof. dr. sc., dr. med., specijalist infektolog

Ljiljana ŽMAK²⁾, dr. sc., dr. med., specijalist mikrobiolog

Nenad TURK³⁾, prof. dr. sc., dr. vet. med.

¹⁾ Odjel za znanstvena istraživanja, Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb

²⁾ Odjel za dijagnostiku tuberkuloze, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

³⁾ Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet, Zagreb

Ključne riječi

*hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom leptospiroza
imunofenotipizacija
protočna citometrija
aktivacijski biljezi
CD4⁺
CD8⁺*

Key words

*hemorrhagic fever with renal syndrome leptospirosis
immunophenotyping
flow cytometry
activation markers
CD4⁺
CD8⁺*

Primljeno: 2011–12–08

Received: 2011–12–08

Prihvaćeno: 2011–12–20

Accepted: 2011–12–20

Znanstveni rad

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) i leptospiroza su zoonoze i važne javno-zdravstvene zarazne bolesti. Još uvijek postoje brojni dijagnostički problemi u diferencijaciji HVBS-a i leptospiroze, kako na kliničkoj, tako i laboratorijskoj razini, osobito na samom početku bolesti kada su kliničke slike gotovo identične, a u rutinskim dijagnostičkim testovima za specifično dokazivanje ovih patogena također povremeno dolazi do pojave nespecifičnih reakcija. Unutar T-limfocitne populacije, našli smo statistički značajan porast ($p = 0,001$) postotka ukupno aktiviranih T-limfocita ($TCR^+HLA-DR^+$) u bolesnika s HVBS-om u usporedbi s bolesnicima s leptospirozom ili kontrolnom skupinom. Daljnjom analizom ranih aktivacijskih biljega na T-limfocitnoj subpopulaciji nalazimo značajan porast postotka ($p = 0,003$) aktiviranih citotoksičnih ($CD8^+CD71^+$), kao i postotka ($p = 0,005$) pomoćničkih ($CD4^+CD25^+$) limfocita u bolesnika s HVBS-om u odnosu na bolesnike s leptospirozom ili kontrolnu skupinu. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi može imati važnu ulogu kao pomoćna dijagnostička metoda u diferenciranju HVBS-a od leptospiroze.

Detection of T-lymphocyte activation markers in differential diagnosis of infections caused by hantaviruses or leptospira

Scientific paper

Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) and leptospirosis are zoonoses and important public health infectious diseases. There are still many problems in the diagnostic differentiation between HFRS and leptospirosis, at the clinical, and laboratory level, especially at the beginning of the disease when the clinical picture is almost identical, and routine diagnostic tests for specific detection of these pathogens also occasionally show nonspecific reactions. Within the T-lymphocytes population, we found a statistically significant increase ($p = 0.001$) in the percentage of total activated T-lymphocytes ($TCR^+HLA-DR^+$) in patients with HFRS infection compared to patients with leptospirosis and control group. Further analysis of the early activation markers on T-lymphocytic subpopulation found a significant increase in the percentage ($p = 0.003$) of activated cytotoxic ($CD8^+CD71^+$) and percentage ($p = 0.005$) of activated helper ($CD4^+CD25^+$) lymphocytes in patients with HFRS, in comparison to patients with leptospirosis and control group. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes may play an important role as an additional diagnostic tool in differentiating HFRS from leptospirosis.

Uvod

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) i leptospiroza su zoonoze i važne javno-zdravstvene zarazne bolesti [1].

Uzročnici HVBS-a su virusi iz roda hantavirusa, a danas u svijetu postoji preko 23 različite vrste hantavirusa [2]. U Europi su zabilježena u različitim područjima četiri

različita hantavirusa: Puumala, Dobrava, Saarema i Tula [3]. Virus Puumala u pravilu uzrokuje blaže kliničke oblike bolesti, dok virus Dobrava može uzrokovati teže oblike [4]. Za viruse Saarema i Tula još nema dovoljno dokaza da uzrokuju manifestne oblike bolesti u ljudi iako su opisani rijetki pojedinačni slučajevi [3]. U Hrvatskoj na malom prostoru cirkuliraju sva četiri virusa [4, 5, 6]. Cijela Hrvatska osim obale i otoka je endemsko područje

za hemoragijsku vrućicu s bubežnim sindromom [4, 5]. Rezervoari hantavirusa su sitni šumski glodavci [1, 2, 6].

U ljudi klinička slika u početku bolesti može biti nespecifična. Kasnije tijekom bolesti možemo pratiti pet različitih faza, no na našim prostorima, gdje su ipak češći blaži klinički oblici, svih pet faza se u većine bolesnika ne vidi tako često [4]. Rana dijagnostika HVBS-a može biti teška, a u praksi se danas koriste brzi imunokromatografski testovi, enzimski imunotestovi (ELISA), testovi indirektno imunofluorescencije (IFA), test reverzne transkripcije lančane reakcije polimeraze (RT-PCR), različite osjetljivosti i specifičnosti [1, 2, 4, 6]. Diferencijalno dijagnostički, osobito u Hrvatskoj gdje se obje bolesti endemski nalaze na gotovo istom području, treba obavezno misliti na leptospirozu, a zabilježene su i dvojne infekcije [7, 8]. Od ostalih bolesti diferencijalno-dijagnostički treba isključiti sljedeće bolesti: akutno zatajenje bubrega drugog uzroka, akutne febrilne infekcije urinarnog trakta, tubulointersticijski nefritis druge etiologije, akutni i kronični glomerulonefritis, akutni abdomen, akutni apendicitis, hemoragijska skarlatina, hemolitičko-uremički sindrom, trombocitopenična purpura, akutne respiratorne infekcije, virusni hepatitis, sepsa, denga i druge hemoragijske vrućice [2, 3].

Leptospiroza je zoonoza prirodno-žarišnog tipa, javlja se širom svijeta i značajna je za humano i veterinarsko javno zdravstvo. Uzročnici bolesti su patogene bakterije unutar roda *Leptospira* [7, 9].

Leptospiroza se u ljudi i životinja očituje u rasponu od blagih inaparentnih oblika pa do veoma teških, praćenih zatajivanjem različitih organa. U većine bolesnika, bolest počinje febrilitetom i općim infektivnim sindromom koji traje tri do pet dana. Kasnije tijekom bolesti se može razvijati u smislu gastroenterokolitičkog ili nefritičkog oblika bolesti, može se javiti druga faza bolesti karakterizirana seroznim meningitisom, a može se razviti i ikterični oblik leptospiroze (*Weilova bolest*) sa značajnim pogoršanjem hepatalne i renalne funkcije, hemoragijama, poremećajem svijesti i smrtonošću oko 10 % [7–9, 11].

Mišoliki glodavci predstavljaju rezervoare infekcije, jer izlučuju urinom leptospire u okoliš (površinske vode). Domaće i divlje životinje te čovjek mogu se inficirati izravnim ili neizravnim kontaktom s rezervoarom, oboljelom životinjom ili pak kontaminiranim okolišem. Unatoč propisanim mjerama sprječavanja i iskorjenjivanja, leptospiroza se u Hrvatskoj pojavljuje kao reemergentna bolest u ljudi i u životinja, poglavito u dolinama Save i Drave te drugim geoepizootičkim područjima pogodnim za održanje uzročnika. U praksi se u dijagnostici leptospiroze najčešće koristi test mikroaglutinacije, a intenzivno se radi na povećanju osjetljivosti i specifičnosti drugih dijagnostičkih testova kao što su ELISA i PCR [8–11].

Još uvijek međutim, postoje brojni dijagnostički problemi u diferencijaciji HVBS-a i leptospiroze, kako na kli-

ničkoj, tako i laboratorijskoj razini, osobito na samom početku bolesti kad su kliničke slike gotovo identične [4, 7–9], a u rutinskim dijagnostičkim testovima za specifično dokazivanje ovih patogena također povremeno dolazi do pojave nespecifičnih reakcija (neobjavljeni podaci, A. Markotić).

U ovoj pilot studiji smo pokazali da detekcija aktivacijskih antigena na T-limfocitima može poslužiti kao pomoćni dijagnostički test u diferenciranju HVBS-a od leptospiroze.

Bolesnici i metode ispitivanja

Identifikaciju površinskih biljega na perifernim mononuklearima izvršili smo na punoj krvi u 22 bolesnika inficiranih virusom Puumala, pet bolesnika inficiranih leptospirama i 22 zdrava ispitanika. Specifična antitijela na virus Puumala su dokazana ELISA IgM i IgG testom [4], a infekcija leptospirama je dokazana testom mikroaglutinacije [9]. Od bolesnika i kontrola su iz antekubitalne vene sterilnom plastičnom štrcaljkom uzeti uzorci od 5 mL krvi za odvajanje seruma i daljnje serološke i imunološke pretrage te 10 mL krvi uz dodatak antikoagulansa (300 i.j. heparina) za fenotipizaciju.

Izolacija mononuklearnih stanica

Heparinizirana krv je unutar dva sata od uzimanja držana na sobnoj temperaturi, a potom obrađena. Da bi se istaložili eritrociti, krv je u sterilnoj epruveti pohranjena u inkubatoru na 37 °C, tijekom 15 minuta. Kao supernatant odvojena plazma, nadslojena je nad otopinu Ficoll-Paque (1,13 g/mL, Pharmacia, Upsala, Švedska), u volumnom omjeru 1:1, a potom centrifugirana na 800 g, 15 minuta. Preostali eritrociti, granulociti i mrtve stanice izdvojeni su na gradijentu gustoće na dnu epruvete, dok se na dodirnom sloju fikola i plazme izdvojio prsten sastavljen od limfocita i monocitno-makrofagnih stanica. Pasteurovom pipetom pažljivo je pokupljen prsten, a dobivena suspenzija potom je dva puta isprana u mediju, te istaložena centrifugiranjem na 400 g. Nakon dekantiranja, koncentracija stanica podešena je na 10⁷/mL medija.

Obilježavanje pune krvi monoklonskim antitijelima i identifikacija protočnim citometrom

Za određivanje površinskih biljega na izoliranim stanicama koristili smo metodu direktnog dvostrukog obilježavanja monoklonskim antitijelima direktno konjugiranim s fluorescentnim bojama (FITC i PE). U svakom pokusu su za određivanje nespecifičnog vezanja korištene izotipske kontrole konjugirane s FITC-om i PE-om.

Simultano bojenje s različitim monoklonskim antitijelima je priređeno na punoj krvi kako je opisano ranije. Ukratko, 50 μ L heparinizirane krvi je 30 minuta inkubirano u mraku na 4 °C s 10 μ L fluorokromima-konjugiranih antitijela. Eritrocite smo lizirali dodavanjem 2 mL 10 % lizirajuće otopine za FACS (Becton Dickinson, San Jose, SAD) i inkubiranjem kroz 10 minuta na sobnoj temperaturi u mraku. Nakon pomnog ispiranja, stanice smo resuspendirali u 0,5 mL fiksativa (1 % formaldehid). Kontrole su pripravljene na isti način. Stanična fluorescencija u bolesnika od HVBS-a i kontrola je analizirana na FACScan protočnom citometru (Becton Dickinson, Mountain View, SAD). Za analizu dvostruko obilježenih stanica prikupljeno je 5000 stanica unutar limfocitne ograde (*gate*). Rezultate smo izrazili kao postotak stanica koje nose određeni biljeg, koristeći program *CELL Quest* software (Becton Dickinson, Mountain View, SAD).

Ispitali smo sljedeće površinske biljege na stanicama: T-limfocitnu populaciju (CD3, TCR, CD4 i CD8) i aktivacijske biljege na T-limfocitima (CD25, CD71, HLA-DR). Sva monoklonska antitijela su od tvrtke Becton Dickinson (Heidelberg, Njemačka).

Statistička analiza

U analizi promjena na perifernim mononuklearnim stanicama bolesnika od HVBS-a ili leptospiroze koristili smo deskriptivnu statistiku, te neparametrijski Mann-Whitney U test. Usporedba tri testirane skupine je izvršena korištenjem Kruskal-Wallis testa. U radu smo koristili statistički program *Statistica for Windows 6.0* (StatSoft Inc., Tulsa, SAD).

Rezultati

Razlike u ekspresiji aktivacijskih antigena na T-limfocitima u bolesnika s HVBS-om i leptospirozom

Unutar T-limfocita, našli smo statistički značajan porast ($p = 0,001$) postotka ukupno aktiviranih T-limfocita ($\text{TCR}^+\text{HLA-DR}^+$) u bolesnika s HVBS-om u usporedbi s bolesnicima s leptospirozom ili kontrolnom skupinom (sl. 1.a). Daljnjom analizom ranih aktivacijskih biljega na T-limfocitnoj subpopulaciji nalazimo značajan porast postotka ($p = 0,003$) aktiviranih citotoksičnih ($\text{CD8}^+\text{CD71}^+$), kao i postotka ($p = 0,005$) pomoćničkih ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$) limfocita u bolesnika s HVBS-om u odnosu na bolesnike s leptospirozom ili kontrolnu skupinu (sl. 1.b,c).

Diskusija

Diferencijalna dijagnostika HVBS-a i leptospiroze u ranoj akutnoj fazi bolesti može biti teška jer su simptomi kod većine bolesnika gotovo identični, a specifični dijag-

nostički testovi, osobito oni koji se koriste u detekciji leptospira, također u ranoj fazi nisu dovoljno osjetljivi ni specifični.

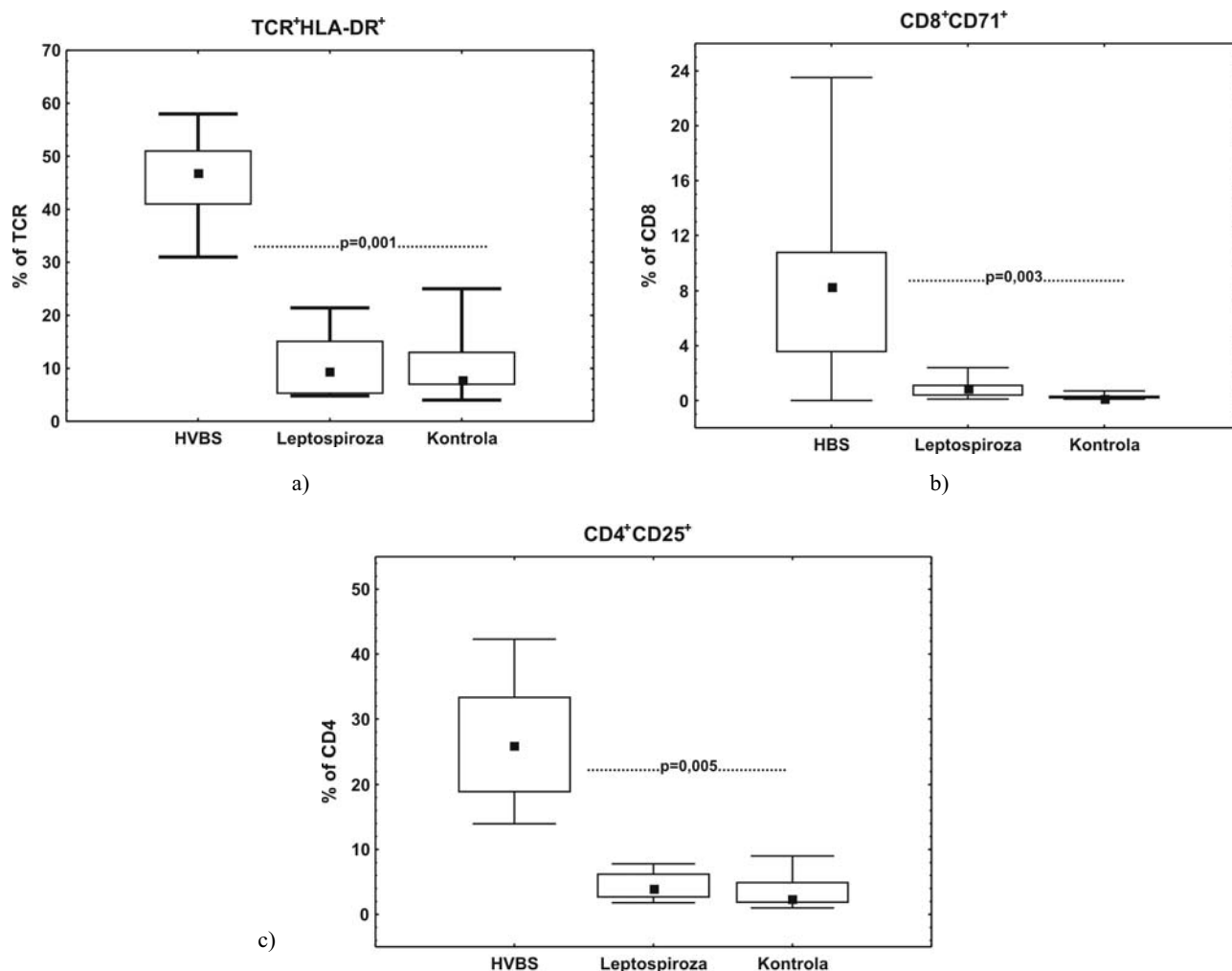
Imunofenotipizacija leukocita periferne krvi predstavlja danas rutinsku dijagnostičku metodu koja se koristi kao pomoćno dijagnostičko sredstvo u brojnim infektivnim i imunološkim bolestima, koje nam omogućava ne samo prepoznavanje određenih kliničkih entiteta, nego i praćenje razvoja bolesti, a može imati i prognostičku vrijednost. Osobito se ova metoda u infektologiji koristi u praćenju bolesnika s virusom humane imunodeficijencije (HIV), ali i drugim infektivnim bolestima uključujući i zoonoze [12–16]. Ipak, još uvijek za veliki broj uzročnika infektivnih bolesti nemamo podatke o njihovom učinku na stanične imunoreakcije, uključujući i ekspresiju različitih antigena na površini monocita i limfocita, uključujući pomoćničke CD4^+ i citotoksične CD8^+ limfocite.

U našim istraživanjima smo prethodno pokazali da u bolesnika s HVBS-om, inficiranih virusima Puumala ili Dobrava, tijekom akutne faze bolesti dolazi do povišenog postotka CD4^+ i CD8^+ T-limfocita, te do značajne ekspresije ukupno aktiviranih T-limfocita, kao i ranih aktivacijskih molekula na pomoćničkim i citotoksičnim T-limfocitima [14–15]. Štoviše, pokazali smo da u fazi inkubacije ovi parametri nisu povišeni, ali da već na početku akutne faze HVBS-a dolazi do njihovog značajnog povišenja u odnosu na zdrave ispitanike [15]. U do sada dostupnoj literaturi nismo našli sličnu studiju u bolesnika s leptospirozom. Nedavna naša istraživanja potencijalnih razlika u serumskoj razini kemokina u bolesnika s HVBS-om ili leptospirozom nisu pokazala značajnu razliku između dvije skupine koja bi imala dijagnostički potencijal [16].

U ovom radu je međutim naša pretpostavka da će u bolesnika s HVBS-om u kojih bolest uzrokuju virusi postojati razlika u aktivacijskim biljezima na površini pomoćničkih i citotoksičnih limfocita u odnosu na bolesnike s leptospirozom u kojih je infekcija uzrokovana bakterijama u potpunosti potvrđena. Sukladno našoj hipotezi, bolesnici s HVBS-om su imali značajno povišen postotak ukupno aktiviranih T-limfocita ($\text{TCR}^+\text{HLA-DR}^+$), kao i značajno povišenu ekspresiju ranih aktivacijskih biljega na pomoćničkim ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+$) i citotoksičnim ($\text{CD8}^+\text{CD71}^+$) T-limfocitima u odnosu na bolesnike s leptospirozom u kojih se vrijednosti nisu statistički značajno razlikovale od vrijednosti u zdravih ispitanika. Ovo je ujedno i prva komparativna studija u kojoj je imunofenotipizacija limfocita periferne krvi korištena kao pomoćno dijagnostičko sredstvo u diferenciranju HVBS-a od leptospiroze.

Zaključak

Na osnovi ove pilot studije možemo zaključiti da pri ranoj akutnoj infekciji bolesnika s hantavirusima dolazi do



Slika 1. Postotak TCR⁺HLA-DR⁺ (a), CD8⁺CD71⁺ (b) i CD4⁺CD25⁺ (c) T-limfocita u bolesnika s hemorragijskom vrućicom s bubrežnim sindromom (HVBS) ili leptospirozom u odnosu na zdrave kontrole. Kvadrati predstavljaju 25. i 75. percentile, centralna točka medijan, a produžeci označavaju minimalne i maksimalne vrijednosti, (Kruskal-Wallis i Mann-Whitney U test; razlika je značajna kod $p < 0,05$).

Figure 1. Percentage of TCR⁺HLA-DR⁺ (a), CD8⁺CD71⁺ (b) and CD4⁺CD25⁺ (c) T lymphocytes in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) or leptospirosis in comparison to healthy controls. Box indicates 25th and 75th percentile, central point median, and whiskers indicate min-max data values, (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U test; the difference is significant at $p < 0,05$).

značajnog povišenja postotka ukupno aktiviranih T-limfocita (TCR⁺HLA-DR⁺), kao i značajno povišene ekspresije ranih aktivacijskih biljega na pomoćničkim (CD4⁺CD25⁺) i citotoksičnim (CD8⁺CD71⁺) T-limfocitima u odnosu na bolesnike s leptospirozom kod kojih su ove vrijednosti nepromijenjene. Imunofenotipizacija limfocita periferne krvi može imati važnu ulogu kao pomoćna dijagnostička metoda u diferenciranju HVBS-a od leptospiroze. Ove rezultate potrebno je dodatno potvrditi na većoj skupini ispitanika.

Autori izjavljuju da nisu u sukobu interesa.
Authors declare no conflict of interest.

Literatura

- [1] Markotić A, Krajinović LC, Margaletić J, i sur. Zoonoses and vector-borne diseases in Croatia – a multidisciplinary approach. *Vet Ital* 2009; 45: 55–66.
- [2] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses. A global disease problem. *Emerg Infect Dis* 1997; 3: 95–104.
- [3] Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, Henttonen H, Plyusnin A, Vaheri A. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 653–61.
- [4] Markotić A, Nichol ST, Kuzman I, i sur. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol* 2002; 66: 542–51.
- [5] Scharninghausen JJ, Pfeffer M, Meyer H, Davis DS, Honeycutt RL, Faulde M. Genetic evidence for tula virus in *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* populations in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2002; 2: 19–27.

- [6] Plyusnina A, Krajinović LC, Margaletić J, i sur. Genetic evidence for the presence of two distinct hantaviruses associated with Apodemus mice in Croatia and analysis of local strains. *J Med Virol* 2011; 83: 108–14.
- [7] Clement J, Neild G, Hinrichsen SL, Crescente JA, van Ranst M. Urban leptospirosis versus urban hantavirus infection in Brazil. *Lancet* 1999; 354: 2003–4.
- [8] Markotić A, Kuzman I, Babić K, i sur. Double trouble. Hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 221–4.
- [9] Topic Balen M, Habuš J, Milas Z, Tošev EC, Stritof Z, Turk N. Human leptospirosis in Croatia: current status of epidemiology and clinical characteristics. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010; 104: 202–6.
- [10] Turk N, Milas Z, Mojčec V, i sur. Molecular analysis of *Leptospira* spp. isolated from humans by restriction fragment length polymorphism, real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 300: 174–9.
- [11] Škerk V, Markotić A, Puljiz I, i sur. Electrocardiographic changes in hospitalized patients with leptospirosis over a 10-year period. *Med Sci Monit* 2011; 17:3 69–75.
- [12] Janols H, Bredberg A, Thuvesson I, Janciauskiene S, Grip O, Wullt M. Lymphocyte and monocyte flow cytometry immunophenotyping as a diagnostic tool in uncharacteristic inflammatory disorders. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 205–2012.
- [13] Markotić A, Skerk V, Cvetko Krajinović L, Beus A. Is the clinical picture of Schnitzler syndrome always Schnitzler syndrome? *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 507–9.
- [14] Markotić A, Gagro A, Dasić G, i sur. Immune parameters in hemorrhagic fever with renal syndrome during the incubation and acute disease: case report. *Croat Med J* 2002; 43: 587–90.
- [15] Markotić A, Dašić G, Gagro A, i sur. Role of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) phenotype changes in the pathogenesis of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 329–34.
- [16] Zidovec Lepej S, Vince A, Rakusic S, Dakovic Rode O, Sonicki Z, Jeren T. Center for Disease Control (CDC) flow cytometry panel for human immunodeficiency virus infection allows recognition of infectious mononucleosis caused by Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. *Croat Med J* 2003; 44: 702–6.
- [17] Žmak LJ, Markotić A, Mišić Majerus LJ. Interleukin-8, monocitni kemotaktični protein-1 i interleukin-10 u infekcijama s leptospirama i hantavirusima. *Infektol Glas* 2011; 31: 5–14.