

İMMÜNOLOJİK İZLEM

Meral GÜLTEKİN

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANTALYA
mgulteekin@akdeniz.edu.tr

ÖZET

İnfeksiyondan infeksiyon hastalığına giden süreci, konak ile mikroorganizma arasındaki etkileşim belirlemektedir. Konağın etkene karşı gösterdiği/gösteremediği immün yanıtın saptanması ve izlenmesi 'kişiye özel tedavi' yaklaşımını yönlendirecektir. Organ nakil hastalarında, nakledilen 'yabancı'nın red edilmemesi için 'iyatrojenik' olarak dengesi bozulan immün sistemin, mikroorganizmalar ile başa çıkabilmesinde hedeflenen 'yeni denge' nasıl izlenebilir? İmmün supresif ilaçların kan düzeyleri bu sorunun yanıtının bir kısmıdır, ancak yeterli değildir. Mikrobiyoloji laboratuvarında etkenin tüm özelliklerinin belirlenmesi önemlidir, gereklidir ancak bu da yeterli değildir. Bu bölümde, etken olarak CMV ele alınacak ve transplant hastalarında virolojik izlem ile birlikte immunolojik izlemin önemi vurgulanarak kullanılan yöntemler ve veriler tartışılacaktır.

Anahtar sözcükler: akış sitometri, ELISPOT yöntemi, hücre içi ATP ölçümü, immünolojik izlem, quantiferon

SUMMARY

Immunologic Monitoring

Interaction between the host and the microorganism determines the process which leads to the infectious disease from infection. Detection and monitoring of the immune response which the host can or can not exhibit against the agent will shape the future approach of the private treatment modality. How can the "new balance" which is aimed in overcoming microorganisms be followed-up, for the transplanted 'foreign body' not to be rejected in transplant patients whose immune system which was imbalanced 'iatrogenically'? Blood levels of the immunosuppressive drugs are only a part of the answer to this question but not sufficient themselves. All characteristics of the agent to be determined in the microbiology laboratory is of great significance but again not adequate itself. In this chapter; CMV will be dealt as an agent, importance of immunologic monitoring as well as virologic monitoring will be highlighted, procedures and the data will be discussed.

Keywords: ELISPOT assay, flow cytometry, immunologic monitoring, intracellular ATP measuring, quantiferon

Transplant hastalarında, özellikle latent viral infeksiyonların kontrolünde esas mekanizma kazanılmış-ölgül hücrel bağışık yanıtıdır. CMV infeksiyonunun da klinik yelpazesini belirleyen en önemli faktör konağın etkene karşı gösterdiği edinsel ölgül hücrel immün yanıtıdır. CMV infeksiyonunun kontrolünde rolü olan hücreler CD4+, CD8+ ve gammadelta T lenfositleridir. CMV infeksiyonuna özel hücrel yanıtın ölçümü için T-hücre bazlı çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. İdeal olarak bu yöntemler ile ex vivo T hücrelerinin tanımlanması ve/veya fonksiyonlarının ve ölgüllüğünün belirlenmesi amaçlanmıştır⁽⁴⁾.

Akış sitometri

Hücrel yanıtın araştırılmasında en yay-

gın kullanılanlardan birisi, peptid-MHC sınıf 1 tetramerleri ile CMV spesifik CD8+ T lenfositlerinin akış sitometride saptandığı tetramer bazlı yöntemdir. Bu tekniğin esası, antijene ölgül T lenfositlerinin, MHC-peptid kompleksi - tetramerik molekül ile doğrudan belirlenmesidir. Kemik iliği transplantasyonu (KİT) yapılan hastalarda CMV hastalığı gelişmesinin belirlenmesinde CMV hücrel immünitenin izlemi yol göstericidir⁽⁶⁾. Çok merkezli prospektif bir araştırmada, Gratama ve ark.⁽⁵⁾, 83 KİT alıcısında transplantasyon sonrası CMV spesifik CD8+ T lenfosit yanıtını bir yıl izlemişler ve post transplant ilk 65 gün içerisinde CMV spesifik CD8+ T lenfosit sayısının 7 hücre/μl'den az olması durumunda, bu değer CMV ile ilişkili komplikasyon gelişmesi bakımından risk ifade ettiğini

belirtmişlerdir. Ancak, bu yöntem epitop ve HLA spesifiktir ve kullanılan MHC tetramer-peptid paneli yanıtı belirlemede yeterli olmaya-bilir. Akış sitometride, mononükleer hücreler sentetik CMV peptid epitopları ile uyarılarak, sitokin sentezleyen CMV spesifik T lenfositleri hücre içi sitokin boyaması ile (sitokin-akış sitometri: CFC) gösterilebilir. Bu teknik ile sitotoksik T lenfositleri, fonksiyonlarının son aşamasında-sitokin sentez aşaması-gösterilmektedir⁽³⁾.

Akış sitometride, yakın zamanda Lozza ve ark.⁽⁹⁾ tarafından geliştirilen yeni tekniğin temeli, endoteliotropik ve dendrotropik CMV VR1814 suşu ile oluşturulan immatür dendritik hücre enfeksiyonu ardından infekte hücrelerle lenfosit kültürünün yapılması ve bunun sonucunda sitokin sentezleyen CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin saptanmasına dayanmaktadır. Bu şekilde T lenfositlerinin ex vivo olarak uyarılması, in vivo koşullara daha yakın olarak gerçekleştirilmektedir. Viral özgül hücresel yanıt modelini oluştururken şüphesiz etkenin uyarılmasında kullanılan antijenlerin çeşidi, özgüllüğü de önemlidir. Bunde ve ark.⁽²⁾, standart aminoasitlere ek olarak CMV immediate early (IE)-1 ve pp65 proteinlerini içeren peptid karışımına CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtını araştırdıklarında, hastalarda CMV hastalığından korunmada IE-1 spesifik CD8+ T hücre yanıtının izlenmesinin değeri olduğunu vurgulamışlardır. Viral hücresel yanıtın prospektif olarak izleminin amacı, alıcılarda CMV hastalığı gelişmeden hemen önce, bu konuda alarm verecek "cut off" değerini belirlemektir⁽⁴⁾.

ELISPOT

ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) yönteminde, IFN-γ sentez eden özgül T hücreleri araştırılmaktadır. Bunun için, mononükleer hücreler sentetik peptid veya antijen lizatlar ile uyarılır, antihuman IFN-γ ile kaplanır ve ELISA esasları çerçevesinde çalışılarak özgül spot oluşturan IFN-γ sentezleyen T hücrelerinin sayısı yapılır. Sonuç, 200,000 mononükleer hücrede 'spot forming colonies' (SFC) olarak ifade edilir⁽¹⁰⁾. Abate ve ark.⁽¹⁾, farklı serolojik profilde (seropozitif ve seronegatif) profaksi ya da preemptif tedavi uygulanan solid organ alıcısını transplant öncesi ve 30., 60., 90., 180., 360. gün-

lerde CMV viral yük ile birlikte gama interferon ELISA (ELISPOT) testi ile izlemişlerdir. Transplantasyonun birinci yılında CMV spesifik T hücre yanıtını ort. 171 SFC bulurken bu sayının transplant öncesi 326 SFC/ 200,000 lenfosit olduğunu dolayısı ile antiviral T hücre yanıtının transplantasyon öncesi düzeye gelmesi için bir yıldan fazla zamana gereksinim olduğunu vurgulamışlardır. Seronegatif alıcılarda profaksi sürecinde T hücre yanıtı saptanamamıştır. ELISPOT sonucu > 100 SFC olan hastalarda viremi epizodu saptanamamasına karşın, ilginç olarak profilaksi tamamlanan ve T hücre yanıtı gelişmeyen on üç hastanın beşinde viremi saptanmış, sekizinde ise viremi gelişmemiştir.

Quantiferon

Quantiferon testinde, tam kan, CMV stimüle eden peptid epitopları ile muamele edilerek T lenfositleri uyarılır ve sentez edilen IFN-γ ELISA metodolojisi ile kantite edilir. CD8+ sitotoksik T lenfositlerinin fonksiyonel ürünü olan IFN-γ CMV hastalığının gelişme riskini belirlemede değerlendirilir. IFN-γ üretimi söz konusu lenfositlerin fonksiyonel bir belirteçidir. Testte kullanılan CMV peptidleri, popülasyonun tamamına yakını (> % 98) kapsayacak şekilde HLA sınıf I haplotipleri içeren CD8+ T hücreleri hedef alınarak hazırlanmıştır. Dolayısı ile CMV hastalığı gelişenlerin CD8+ T lenfositleri söz konusu sınıf 1 MHC-viral peptid komplekslerini tanırlar ve IFN-γ sitokinini üretirler. Kumar ve ark.⁽⁸⁾, solid organ transplant hastalarını post-transplant 0, 1, 2, 3. aylarda CMV hücresel immünite açısından Quantiferon-CMV testi ile izlemişler ve saptanabilir interferon-gama (cut-off: 0.1 IU/mL) yanıtı olan hastaların % 5.3'ünde CMV hastalığı geliştiğini, bu oranın interferon-gama saptanamayan grupta % 22.9 olduğunu belirtmişlerdir.

Hücre içi ATP ölçümü

2002 yılında FDA onayı alan ImmuKnow immün hücre fonksiyon yönteminin esası, lenfosit stimülasyonu ardından manyetik seperasyon ile ayrılan CD4+ hücrelerinin parçalanması ardından açığa çıkan hücre içi ATP (iATP)'nin luminometrede ölçümüdür. Transplant hastalarında enfeksiyon veya akut rejeksiyon için tanısal test olmayıp, enfeksiyon/rejeksiyon riskini belir-

lemede kullanılması önerilmektedir⁽¹¹⁾. On organ nakli merkezinden 504 solid organ alıcısının izlendiği araştırmada, iATP immün yanıtı 25 ng/mL olan solid organ alıcılarında, daha kuvvetli immün yanıt olanlara göre enfeksiyon gelişme riskinin on iki kez daha fazla olduğu, buna karşın 700 ng/mL değeri saptanan alıcılarda, daha düşük iATP saptananlara göre rejeksiyon gelişme riskinin otuz kez daha fazla olduğu belirtilmiştir. iATP ölçüm yöntemi ile solid organ alıcılarında hedeflenen immünolojik yanıt zonunun belirlenerek, enfeksiyon/rejeksiyon risklerine karşı denge sağlanabileceği vurgulanmıştır⁽⁷⁾.

Sonuç

Viral hücresel yanıtın saptanmasında T hücrelerinin uyarılması, T hücrelerinin ve/veya fonksiyonlarının gösterilmesi, değerlendirilmesi aşamalarında farklı metodolojik yaklaşımlar mevcuttur. İmmün süpresif tedavi uygulanan organ nakil hastalarında hücresel bağışık yanıtın yeniden yapılanması viral hastalığın gelişimini önlediğinden, virolojik yanı sıra immüno- lojik izlem laboratuvar rutininde yer almalıdır.

KAYNAKLAR

1. Abate D, Saldan A, Fison M et al. Evaluation of Cytomegalovirus (CMV)-specific T cell immune reconstitution revealed that baseline antiviral immunity, prophylaxis, or preemptive therapy but not antithymocyte globulin treatment contribute to CMV-specific T cell reconstitution in kidney transplant recipients, *J Infect Dis* 2010;202(4): 585-94. <http://dx.doi.org/10.1086/654931> PMID:20594105
2. Bunde T, Kirshner A, Hoffmeister B et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8+ T cells, *J Exp Med* 2005;201(7):1031-6. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20042384> PMID:15795239 PMCid:2213133
3. Crough T, Khanna R. Immunobiology of human Cytomegalovirus: from bench to bedside, *Clin Microbiol* 2009;22(1):76-98. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00034-08> PMID:19136435 PMCid:2620639
4. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection, *New Microbiologica* 2011;34(3): 229-54. PMID:21811744
5. Gratama JW, Boeckh MB, Nakamura R et al. Immune monitoring with iTA_g MHC Tetramers for prediction of recurrent or persistent cytomegalovirus infection or disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a prospective multicenter study, *Blood* 2010;116(10):1655-62. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-03-273508> PMID:20508161
6. Gratama JW, van Eser JW, Lamers CH et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in T cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection, *Blood* 2001;98(5):1358-64. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.5.1358> PMID:11520783
7. Kowalski RJ, Psot DR, Manon RB et al. Assessing relative risks of infection and rejection: a meta-analysis using an immune function assay, *Transplantation* 2006;82(5):663-8. <http://dx.doi.org/10.1097/01.tp.0000234837.02126.70> PMID:16969290
8. Kumar D, Chernenko S, Moussa G et al. Cell-mediated immunity to cytomegalovirus disease in high-risk solid organ transplant recipients, *Am J Transplant* 2009;9(5):1214-22. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2009.02618.x> PMID:19422346
9. Lozza L, Lilleri D, Percivalle E et al. Simultaneous quantification of HCMV-specific CD4+ and CD8+ T cells by a novel method using monocyte-derived HCMV-infected immature dendritic cells, *Eur J Immunol* 2005;35(6):1795-804. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200526023> PMID:15902686
10. Mattes FM, Vargas A, Kopycinski J et al. Functional impairment of Cytomegalovirus specific CD8+ T cells predicts high level replication after renal transplantation, *Am J Transplant* 2008;8(5):990-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2008.02191.x> PMID:18325078
11. Rodrigo E, Lopez-Hoyos M, Corral M. ImmuKnow as a diagnostic tool for predicting infection and acute rejection in adult liver transplant recipients: a systematic review and meta-analysis, *Liver Transpl* 2012;18(10):1245-53. <http://dx.doi.org/10.1002/lt.23497> PMID:22740321

Eş Zamanlı Oturum: Panel 14 sunularından

AİLE HEKİMLİĞİ PRATİĞİNDE ANTİBİYOTİK KULLANIMI

Yöneten: **Hakan LEBLEBİCİOĞLU**

- İnfeksiyon hastalıklarının, bakteriyel ve viral etiyoloji ayrımını da içeren genel karakteristik özellikleri
Sibel G. GÜNDEŞ
- Antibiyotik kullanımında yanlışlar ve doğrular
Oğuz KARABAY