

*Zdzisław Dziubek¹, Hanna Żarnowska¹, Wojciech Basiak¹, Andrzej Górski²,
Piotr Kąffasz¹*

NIEKTÓRE ASPEKTY ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ W TOKSOPLAZMOZIE

¹ Klinika Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych
Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM w Warszawie
Kierownik: Z. Dziubek

² Zakład Immunologii AM w Warszawie
Kierownik: A. Górski

Zbadano zachowanie niektórych parametrów odpowiedzi komórkowej i humoralnej u dorosłych osób z węzłową lub oczną postacią toksoplazmozy w powiązaniu z przebiegiem klinicznym choroby.

WSTĘP

Badania doświadczalne na myszach wykazują, że obrona organizmu w przebiegu inwazji *Toxoplasma gondii* jest związana w głównej mierze z odpornością komórkową. Znalazło to potwierdzenie u ludzi z AIDS, nowotworami i leczonych immunosupresyjnie, u których dochodziło do obniżenia odporności komórkowej przy często prawidłowej odpowiedzi humoralnej. Zapalenie mózgu wywołane przez *T. gondii* jest częste w przebiegu AIDS, a występuje na ogół u osób z obecnością swoistych przeciwciał surowiczych. Stwierdzono także, że u chorych z AIDS 4-krotny wzrost miana przeciwciał IgG przeciw *T. gondii* lub jednorazowe ich miano powyżej 1:2048 oznacza w 90% prawdopodobieństwo uczynnienia postaci utajonej lub zachorowania na toksoplazmozę (1). Świadczy to o braku korelacji pomiędzy odpornością humoralną a jej działaniem obronnym.

Pomimo znaczenia zarażeń *T. gondii* w patologii człowieka także u osób immunokompetentnych, dane dotyczące odporności komórkowej u tych chorych są skąpe. Dlatego istnieje potrzeba dalszych badań nad rolą tej odpowiedzi w zwalczaniu omawianej inwazji. Podkreśla się że immunostymulacja obniżonej odpowiedzi komórkowej może odegrać rolę w terapii toksoplazmozy (2). Celem prezentowanej pracy jest ocena swoistej odpowiedzi komórkowej u osób z różnymi postaciami toksoplazmozy, na tle ogólnej reakcji limfocytów T oraz odpowiedzi humoralnej i w powiązaniu z przebiegiem klinicznym choroby.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto dwie grupy pacjentów hospitalizowanych w Klinice lub przyjętych w Poradni Chorób Odzwierzęcych - grupa I: 38 osób obu płci w wieku 16-55 lat (w

tym 18 osób w wieku 16-26 lat i 20 osób w wieku 28-55 lat) z węzłową postacią toksoplazmozy, w okresie choroby od kilku dni do 24 miesięcy; grupa II: 14 osób obu płci w wieku 17-47 lat (w tym 6 osób 17-27 lat i 8 osób 32-47 lat) z oczną postacią toksoplazmozy, w okresie choroby od 6 miesięcy do 18 lat.

Okres choroby ustalono na podstawie wywiadu z pacjentem oraz określenia awidności swoistych przeciwciał IgG (Labsystems).

Aby ocenić odpowiedź komórkową u pacjentów wykonano test proliferacyjny limfocytów T w odpowiedzi na bodziec mitogenny OKT3 (mysie monoklonalne przeciwciało przeciw CD3+) oraz na swoisty antygen toksoplazmowy (otrzymany metodą sonifikacji) w różnych stężeniach. Limfocyty T pochodzące z krwi obwodowej hodowano w pełnym środowisku hodowlanym na bazie płynu Parkera i rozlewano na płytki z polistyrenu (Nunc) po 100 000 limfocytów T na dołek. Płytki uprzednio opłaszczono OKT3 w stężeniu 1 µg/ml lub antygenem toksoplazmowym w stężeniu 1 µg/ml lub 5,10, 50 µg/ml. Hodowlę prowadzono przez 3 dni. Wyniki wyrażono jako poziom wbudowanej ³H-tymidyny i odczytywano za pomocą licznika scyntylacyjnego (1450 Micro Beta Liquid Scintillation Counter, Wallac LKB). ³H-tymidynę dodano trzeciego dnia w ilości 1 µg/ml. U tych osób określano także odsetek populacji limfocytów CD3+, a wśród nich CD4+ i CD8+ metodą cytometrii przepływowej w aparacie FAC Sort. Grupę kontrolną dla badania swoistej odpowiedzi tworzyło 10 osób zdrowych, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciw 71 *gondii*. Grupę kontrolną dla badania ogólnej odpowiedzi limfocytów T stanowiło 100 zdrowych dawców krwi, których wyniki określono jako normę.

Odpowiedź humoralną oceniano na podstawie stwierdzanego w surowicy krwi badanych osób poziomu swoistych przeciwciał anty - *T. gondii* oraz poziomu całkowitych immunoglobulin. Dla określenia swoistych IgG zastosowano metodę immunofluorescencji pośredniej. Swoiste przeciwciała IgM oznaczano dwiema metodami: ELISA (Sanofi-Pasteur) i ISAGA (bioMerieux). Swoiste przeciwciała IgA wykrywano testem ELISA (Sanofi-Pasteur). W obu testach ELISA użyto jako antygen białko p30 (powierzchniowe białko tachyzoitów *T. gondii*). Poziom całkowitych immunoglobulin IgG, IgM i IgA mierzono w aparacie Turbitimer firmy Behring.

WYNIKI

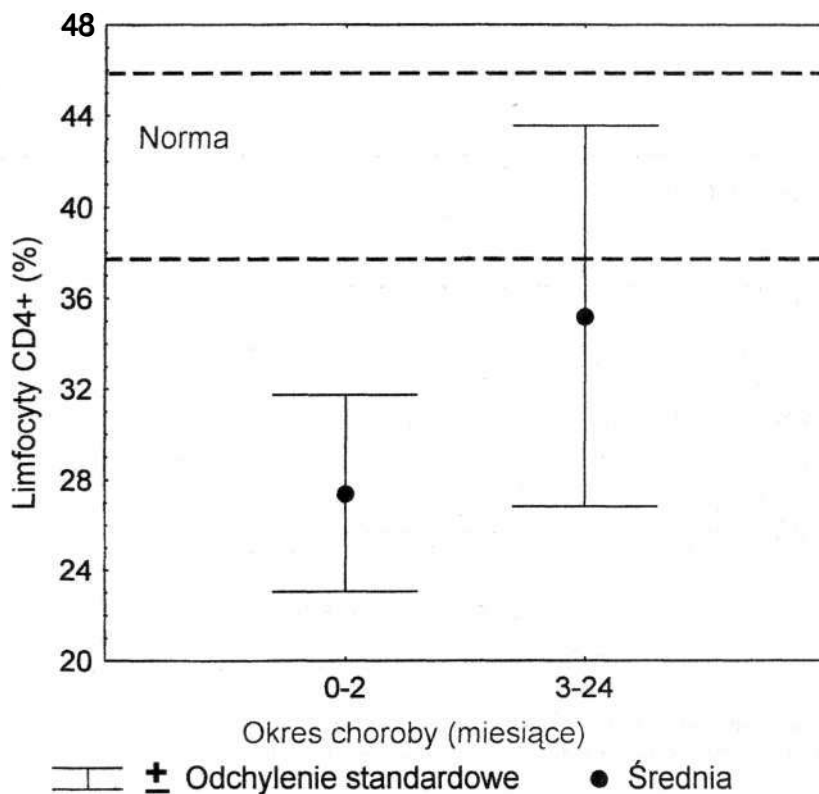
U badanych osób nie zaobserwowano znaczących zaburzeń nieswoistej odpowiedzi komórkowej na bodziec mitogenny OKT3. U większości chorych stwierdzono aktywność proliferacyjną ich limfocytów na antygen toksoplazmowy, jednakże tylko u pacjentów z postacią węzłową pomiędzy 2 a 4 miesiącem choroby była ona istotnie statystycznie wyższa (test t Studenta) w porównaniu z grupą kontrolną.

Grupa I (pacjenci z postacią węzłową)

Objawy kliniczne. Powiększenie węzłów chłonnych zaobserwowano u wszystkich chorych - w tym węzłów szyjnych lub karkowych u wszystkich badanych do 12 miesiąca od wystąpienia objawów. Po tym okresie u większości pacjentów były powiększone węzły pachowe. Wielkość węzłów chłonnych: od 0,5 cm do 3 cm. Ośmioro pacjentów zgłaszało złe samopoczucie.

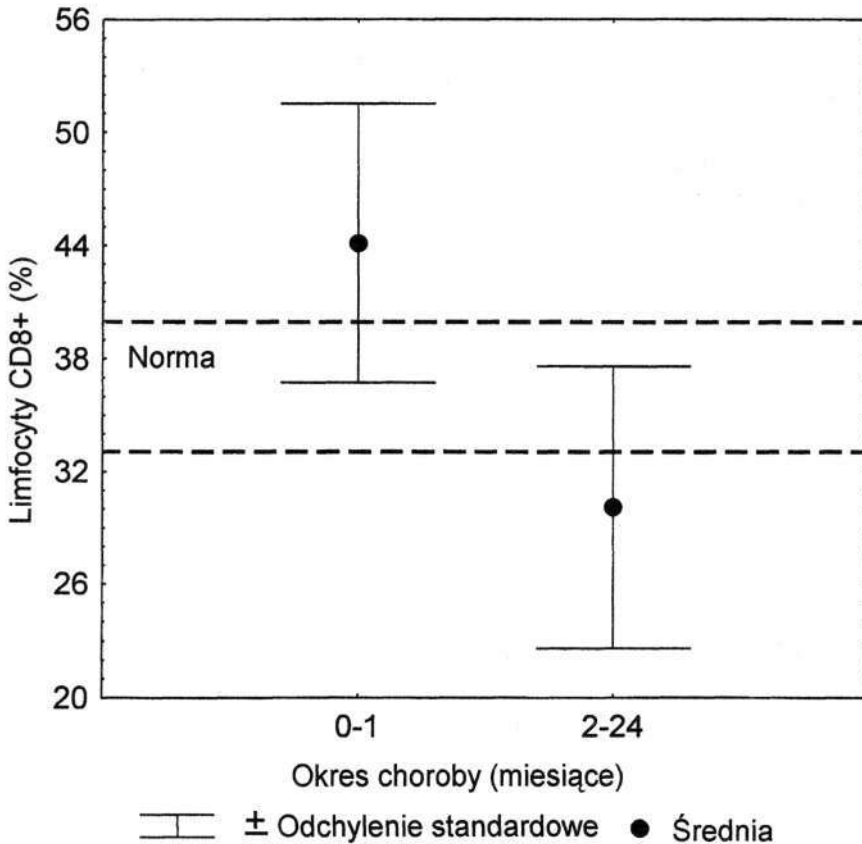
Odpowiedź komórkowa. Odsetek subpopulacji limfocytów CD4+ był niższy w stosunku do normy u wszystkich pacjentów zbadanych w okresie do 2 miesięcy choroby

i u 71% pozostałych (ryc. 1). Odsetek CD8+ w pierwszym miesiącu choroby był wyższy w stosunku do normy u 5 na 7 badanych osób - średnia 46,2%; SD 3,44 (ryc. 2). Wśród osób badanych w późniejszym okresie tylko u 1 osoby (w 12 miesiącu choroby) odsetek CD8+ był wyższy od normy i wyniósł 44%; równocześnie stwierdzono bardzo wysoki poziom swoistych IgG (18 900 IU) oraz obecność swoistych IgM i IgA.



Ryc. 1. Limfocyty CD4+ u pacjentów z węzłową toksoplazmozą
 Fig. 1. CD4+ lymphocytes in patients with nodular toxoplasmosis

Odpowiedź humoralna. Poziom swoistych przeciwciał IgG był wysoki albo bardzo wysoki (1200-9600 IU) głównie u pacjentów badanych do 12 miesiąca choroby. Swoiste przeciwciała IgM obserwowano długo także u osób badanych w okresie od 12 do 24 miesiąca choroby (ryc 3). Nie zaobserwowano różnic wyników testów ELISA i ISAGA. Swoiste przeciwciała IgA obserwowano głównie do 7 miesiąca choroby (ryc. 4). W 2 przypadkach przeciwciała te wykryto w 12 i 21 miesiącu choroby u pacjentów z wysokim poziomem swoistych IgG (odpowiednio 2400 IU oraz 18 900 IU).



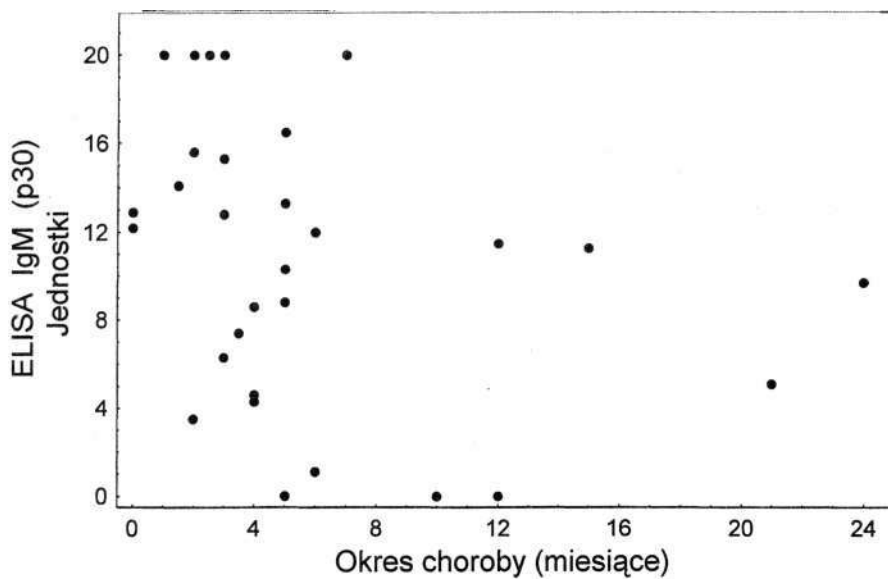
Ryc. 2. Limfocyty CD8+ u pacjentów z węzłą toksoplazmozą
 Fig. 2. CD8+ lymphocytes in patients with nodular toxoplasmosis

Grupa II (pacjenci z postacią oczną)

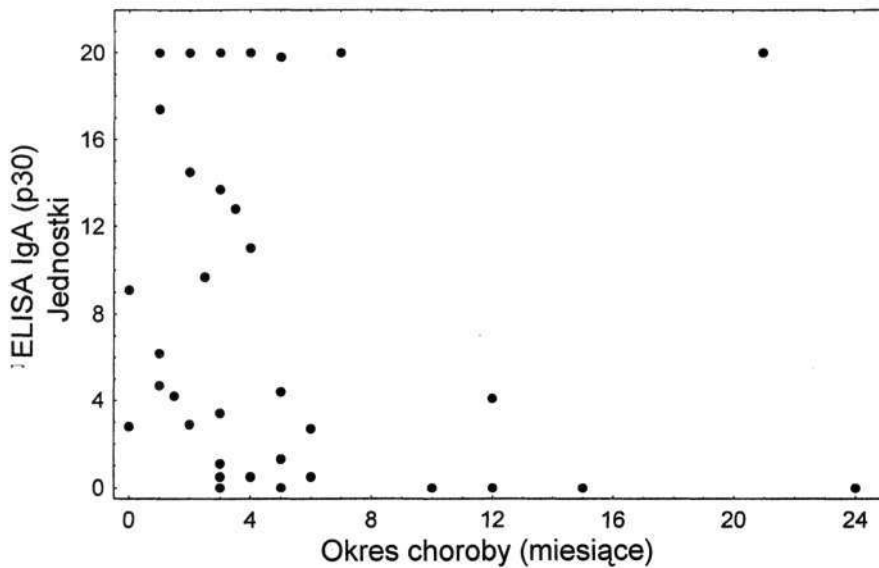
Objawy kliniczne. U 11 osób zaobserwowano stare zmiany na dnie oka, w tym u 4 pacjentów również świeże ogniska zapalne w siatkówce, 3 osoby miały tylko świeże zmiany.

Odpowiedź komórkowa. Odsetek limfocytów CD4+ i CD8+ był obniżony u 6 pacjentów. U 5 osób był obniżony odsetek CD4+ lub CD8+. Nie zaobserwowano aby korelowało to z aktywnością procesu chorobowego na dnie oka.

Odpowiedź humoralna. Poziom swoistych IgG: od 9-150 IU (11 osób) oraz 600 IU (2 osoby) i 1200 IU (1 osoba). Swoiste IgM wykryto tylko (na niskim poziomie) testem ISAGA u 3 pacjentów ze świeżymi zmianami ocznymi, u których poziom swoistych IgG wynosił 150-300 IU. U żadnego pacjenta nie wykryto swoistych przeciwciał IgA.



Ryc. 3. Poziom swoistych przeciwiac IgM w przebiegu wuzlowej toksoplazmozy
Fig. 3. Level of specific IgM antibodies in course of nodular toxoplasmosis



Ryc. 4. Poziom swoistych przeciwiac IgA w przebiegu wuzlowej toksoplazmozy
Fig. 4. Level of specific IgA antibodies in course of nodular toxoplasmosis

DYSKUSJA

Badania doświadczalne wykazały, że zarówno limfocyty CD4+ jak i CD8+ odgrywają ważną rolę w zapobieganiu aktywnej toksoplazmozie (3, 4). Jednak odporność przeciw zarażeniu *T. gondii* wydaje się zależeć głównie od komórek CD8+ (5). Wyróżnia się dwa mechanizmy dzięki którym limfocyty CD8+ ograniczają inwazję pasożyta. Pierwszy - to produkcja interferonu gamma (IFN-gamma) po stymulacji antygenem (6-8), drugi - to efekt cytotoxiczny zarażonych komórek żywiciela oraz tachyzoitów pierwotniaka (9-11). Natomiast znaczenie CD4+ polega na wydzielaniu interleukiny 2 (IL 2) stymulującej limfocyty CD8+, chociaż komórki CD4+ także produkują IFN-gamma (8, 12).

Wyniki prezentowanych badań dotyczą osób immunokompetentnych, co wykazano oceniając ich odpowiedź komórkową na bodziec mitogeny OKT3, a także odpowiedź humoralną mierzoną poziomem całkowitych immunoglobulin poszczególnych klas. W grupie osób z limfadenopatią wyraźną reakcję limfocytów CD8+ zanotowano tylko w pierwszym miesiącu choroby, chociaż u wszystkich pacjentów niezależnie od okresu inwazji zaobserwowano powiększenie węzłów chłonnych.

U osób tej grupy wykryto swoiste IgM skierowane przeciw antygenowi p30, który jest białkiem powierzchniowym tachyzoitów (13, 14). Swoiste przeciwciała IgA przeciw temu antygenowi wykrywano do 7 miesiąca choroby, a tylko u 2 osób także do 12 i 21 miesiąca. Powiększenie węzłów karkowych i szyjnych obserwowano do 12 miesiąca. Można więc sądzić, że aktywna inwazja utrzymywała się u tych pacjentów dłużej niż reakcja limfocytów CD8+. Na uwagę zasługuje odsetek CD4+ poniżej normy u wszystkich osób tej grupy w pierwszych dwóch miesiącach choroby i u większości także w późniejszym okresie. Mogło to być przyczyną słabej stymulacji komórek CD8+, a wyrazem tego - długie utrzymywanie się procesu chorobowego. Derouin i wsp. (15) zaobserwowali u pacjentów z węzłową toksoplazmozą wyższą liczbę limfocytów CD8+ przez cały czas ostrej fazy, przy normalnym poziomie komórek CD4+. Wyniki prezentowanej pracy są zgodne z opinią niektórych autorów, że obecność swoistych IgA jest charakterystyczna dla ostrej toksoplazmozy (16, 17) oraz wykazują, że u pacjentów z długo utrzymującą się limfadenopatią przeciwciała te mogą być długo wykrywane.

W grupie pacjentów z ocną postacią toksoplazmozy większość z nich miała zmiany stare lub stare i świeże ogniska zapalne. U 3 osób zaobserwowano tylko świeże ogniska zapalne w siatkówce i u tych osób wykryto także swoiste IgM, ale tylko testem ISAGA. Pacjenci ci mieli obniżony poziom CD4+ przy braku reakcji ze strony limfocytów CD8+. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenie dotyczące pacjentów z postacią węzłową.

WNIOSKI

Zmniejszona populacja limfocytów CD4+ może słabo stymulować komórki CD8+ i w ten sposób przyczynić się do wydłużenia okresu choroby. Obniżenie poziomu komórek CD4+ może być wynikiem supresyjnego działania pasożyta.

Z Dziubek, H Żarnowska, W Basiak, A Górski, P Kajfasz

SOME ASPECTS OF IMMUNE RESPONSE IN TOXOPLASMOSIS

SUMMARY

Objective: The study was performed to determine cell-mediated and humoral responses related to the clinical course of disease in adults with different forms of toxoplasmosis.

Methods: The cellular response was estimated by blastogenic transformation of T-lymphocytes induced by OKT3 mitogenic stimulus, as well as by a specific soluble toxoplasmic antigen. The phenotype analysis of T-lymphocytes was performed using monoclonal antibody on FACS flow cytometer. The humoral response was examined by determining the levels of toxoplasma-specific IgA, IgM and IgG antibodies and total serum immunoglobulins.

Results: Significant disruption of the cell-mediated response was not observed (T-lymphocyte proliferation test). In the group of patients with lymphadenopathy, an increased proportion of CD8+ lymphocytes was only noted in the first month of the disease, although enlargement of the cervical lymph nodes was observed for up to a year. The individuals in question were found to have IgA antibodies against the p30 antigen of *T. gondii*, mainly in the period of disease up to 7 months. The proportion of CD4+ lymphocytes was sub-normal in all patients of this group who were studied in the first two months of the disease, and in most of those studied later. Three out of 14 patients with the ocular form of toxoplasmosis only had recent foci of inflammation in the retina, and were also found to have specific IgM. These patients had depressed CD4+ levels, and showed no reaction from CD8+ lymphocytes.

Conclusions: Sub-normal CD4+ population could have been the cause of the weak stimulation of CD8+ cells and an expression of this is the long course of disease. Sub-normal CD4+ cells may be also result the suppressing effect of the parasite.

PIŚMIENNICTWO

1. La Rocco A, Sanders JW, Myers JW. Central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *New Engl J Med* 1993;328:1353-6.
2. Subauste CS, Dawson L, Remington JS. Human lymphokine - activated killer cells are cytotoxic against cells infected with *T. gondii*. *J Exp Med* 1992;176:1511-5.
3. Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* 1990;145:3438-41.
4. Araujo FG. Depletion of L3 T4+ (CD4+) T lymphocytes prevent development of resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Infect Immun* 1991;59:1614-9.
5. Parker SJ, Roberts CW, Alexander J. CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:207-12.
6. Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol* 1989;143:2045-50.
7. Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Treatment of toxoplasmic encephalitis in mice with recombinant gamma interferon. *Infect Immun* 1990;58:3050-5.
8. Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, i in. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN - gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 1991;146:286-92.
9. Yano A, Aosai F, Ohta M, i in. Antigen presentation by *Toxoplasma gondii* infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. *J Parasitol* 1989;75: 411-6.
10. Hakim FT, Gazzinelli RT, Denkers E, i in. CD8+ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite - infected or antigen pulsed host cells. *J Immunol* 1991;147:2310-6.

11. Kasper LH, Khan I A, Ely KH, i in. Antigen - specific (P30) mouse CD8+ T cells are cytotoxic against *Toxoplasma gondii* infected peritoneal macrophages. J Immunol 1992;148:1493-7.
12. Gazzinelli RT, Xu Y, Hieny S, i in. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1992;149:175-89.
13. Kasper LH, Crabb JH, Pfefferkom ER. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoadsorption with a monoclonal antibody. J Immunol 1983;130:2407-10.
14. Kasper LH, Khan IA. Role of P30 in host immunity and pathogenesis of *T. gondii* infection. Res Immunol 1993;144:45-8.
15. Derouin F, Rabian-Herzog C, Sulahian A. Longitudinal study of the specific humoral and cellular response to *Toxoplasma gondii* in a patient with acquired toxoplasmosis. J Clin Lab Immunol 1989;30:97-102.
16. Decoster A, Caron A, Darcy F, i in. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute toxoplasmosis. Lancet 1988;12:1104-7.
17. Francis JM, Joynson DHM. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1993;12:556-9.

Adres autorów:

Zdzisław Dziubek

Klinika Chorób Odzwierzęcych i Tropikalnych

Instytutu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych AM

ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa

tel/fax 0-prefiks-22 632-06-84