

Joanna Siennicka, Lidia Brydak

ZASTOSOWANIE METODY DOT BLOT DO OZNACZANIA PRZECIWCIAŁ KLASY IgG U LUDZI SZCZEPIONYCH PRZECIWKO GRYPIE

Zakład Wirusologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. M. Kańtoch

Metodą dot blot określono poziom przeciwciał klasy IgG przed i po szczepieniu przeciwko grypie dla 6 szczepów wirusa grypy A (4 reprezentatywnych dla pandemii, oraz 2 wchodzących w skład szczepionki). Badania przeprowadzono w 4 grupach wiekowych (po 20 osób) dobranych na podstawie szczepu, który prawdopodobnie był przyczyną zakażeń pierwotnych w danej grupie. Nie obserwowano różnic zgodnych z teorią „antygenowego grzechu pierworodnego” w odpowiedzi dla poszczególnych szczepów wirusa grypy A. Potwierdzono wysoką czułość metody dot blot.

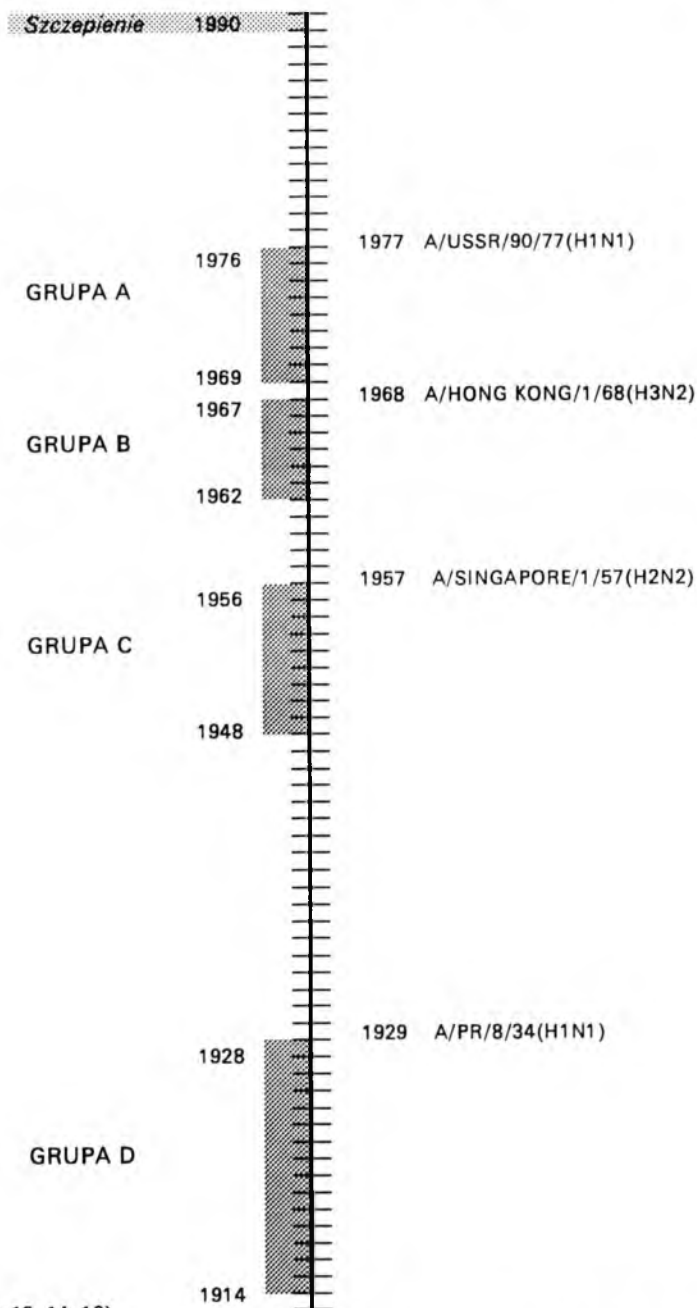
WSTĘP

Co roku notowane są wśród ludzi liczne zachorowania wywoływane kolejnymi wariantami szczepów wirusa grypy, którego jedną z charakterystycznych cech jest duża zmienność (8, 17). Rzadko i w nieprzewidywalnych okresach czasu pojawiały się pandemiczne wirusy grypy A, posiadające odmienny podtyp hemaglutyniny. W XX wieku wystąpiły 4 pandemie w latach: 1918, 1957, 1968 i 1977, w czasie których pojawiały się kolejno szczepy podtypu hemaglutyniny H1, H2, H3 i H1 (1, 7, 19). Teoria *Francisa* opisująca fenomen „pierworodnego grzechu antygenowego” zakłada, że pierwsze zetknięcie z antygenem wirusa grypy pozostawia w pamięci immunologicznej ślad szczepu, który był przyczyną zakażenia pierwotnego (4). Należałoby się więc spodziewać, że osoby przechodzące zakażenie pierwotne szczepami o odmiennym podtypie hemaglutyniny będą reagować odmiennie po powtórnym zetknięciu się z antygenami wirusa grypy (3, 9, 12, 13, 20). W niniejszej pracy próbowano prześledzić wpływ szczepienia na obecność przeciwciał IgG u osób, u których zakażenie pierwotne było związane z różnymi szczepami wirusa grypy.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 80 par surowic pochodzących od ludzi szczepionych przeciwko grypie w sezonie epidemicznym 1990–91 (2), zgrupowanych po 20 osób w 4 grupach wieku dobranych według domniemanego okresu zakażenia pierwotnego.

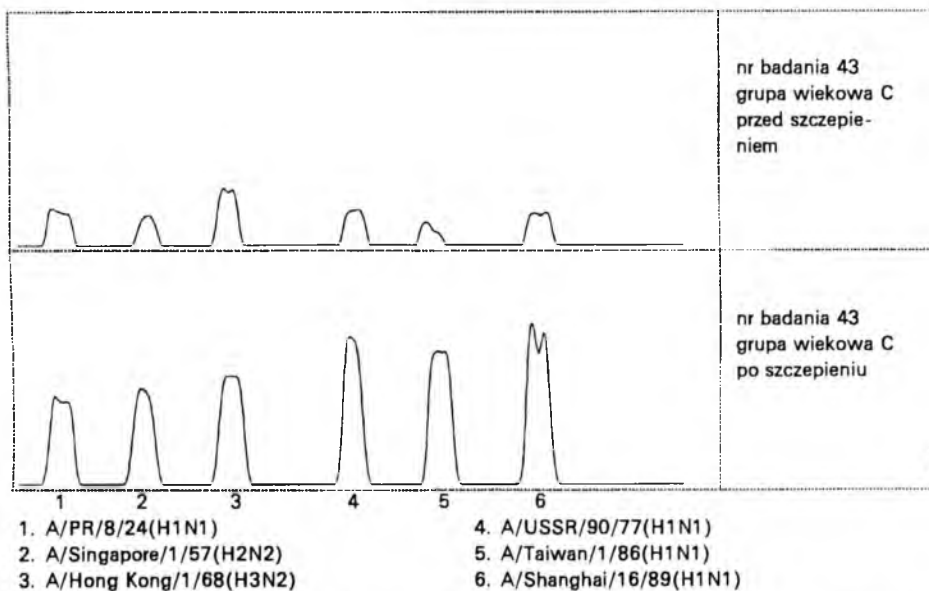
GRUPY WIEKOWE

LATA POJAWIANIA SIĘ
SZCZEPÓW PANDEMICZNYCH

Na podstawie (7, 12, 14, 19)

Ryc. 1. Pandemie grypy i prawdopodobne okresy zakażeń pierwotnych.

Grupę A stanowiły osoby mające w okresie szczepienia 62–76 lat, u których zakażenie pierwotne związane było prawdopodobnie ze szczepem A/PR/8/34(H1N1); grupę B stanowiły osoby w wieku 34–42 lata, u których zakażenie pierwotne związane było prawdopodobnie ze szczepem A/Singapore/1/57(H2N2); grupę C – osoby w wieku 23–29 lat, prawdopodobnie przechodzące zakażenie pierwotne w okresie krążenia szczepu A/Hong Kong/1/68(H3N2); grupę D – osoby w wieku 14–21 lat, u których zakażenie pierwotne mogło być związane ze szczepem A/USSR/90/77(H1N1) (ryc. 1). Osoby badane szczepione były inaktywowaną, podjednostkową szczepionką firmy Weyth: Influenza Virus Vaccine, Trivalent, Types A and B (purified subvirion), której każda dawka (0,5 ml) zawierała po 15 μg hemaglutynin następujących szczepów: A/Taiwan/1/86(H1N1), A/Shanghai/16/89(H3N2) i B/Yamagata/16/88. Do badania użyto 6 szczepów wirusa grypy A: 4 reprezentatywne dla pandemii (A/PR/8/34, A/Singapore/1/57, A/Hong Kong/1/68, A/USSR/90/77) oraz 2 wchodzące w skład szczepionki (A/Taiwan/1/86, A/Shanghai/16/89). Badania przeprowadzono metodą dot blot (16) nakraplając na nitrocelulozę zawiesinę wirusów namnażanych na 11-dniowych zarodkach kurzych i oczyszczanych metodą wirowania w gradiencie sacharozy, zawierającą 1 μg białka w objętości 3 μl . Po inkubacji z surowicą badaną (18 godzin w 4°C) w rozcieńczeniu 1 : 1 000, stosowano biotynylowane, królicze przeciwciała anty-ludzkie IgG (firmy Dako), oraz kompleks streptawidyny z peroksydazą (firmy Amersham). Reakcję wywoływano w roztworze chloronaftolu z dodatkiem H₂O₂. Otrzymane wyniki poddawano analizie densytometrycznej przy użyciu densytometru GS-300 f. Hofer. Powstałe w wyniku odczytu wykresy opracowywano według programu GS-365W wersji 3.01. Odczytywano wysokość szczytu dla każdego ze szczepów badanych (ryc. 2), stosując współczynnik restandaryzacji obliczany dla dodatniej surowicy kontrolnej. Wartości miana surowicy odczytywano z krzywej wzorcowej dla dodatniej surowicy kontrolnej.



Ryc. 2. Zapis densytometryczny badania nr 43 (grupa wiekowa C) przed i po szczepieniu.

Tabela I. Średnie geometryczne mian przeciwciał IgG dla różnych szczepów wirusa grypy A przed i po szczepieniu w grupach wieku

Grupy wieku	Badany szczep											
	A/PR/8/34 (H1N1)		A/Singapore/1/57 (H2N2)		A/Hong Kong/1/68 (H3N2)		A/USSR/90/77 (H1N1)		A/Taiwan/1/86 (H1N1)		A/Shanghai/16/89(H3N2)	
	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana	przed/ po szczep.	indeks przyrostu miana
A 62-76 A/PR/8/34	22646 70469	3,11	11403 38905	3,41	11429 30761	2,69	3846 11376	2,96	1807 688652	381,1	2858 8570	3,0
B 34-42 A/Singapore/ 1/57	11324 13646	1,21	19275 14191	0,74	14962 9037	0,6	3819 5346	1,4	3532 5611	1,59	4775 10666	2,23
C 23-29 A/Hong Kong/1/68	45814 1199499	26,18	46132 194536	4,22	61235 432513	7,06	13459 118577	8,81	21380 100925	4,72	33807 163682	4,84
D 14-21 A/USSR/ 90/77	1702 49204	28,91	2123 59979	28,25	2109 79433	37,66	1746 27164	15,56	1906 6026	3,16	1928 10116	5,25

WYNIKI BADAŃ

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG przed szczepieniem, oraz ich przyrost w wyniku szczepienia dla wszystkich szczepów badanych, we wszystkich grupach wieku (oprócz odpowiedzi dla szczepów A/Singapore/1/57 i A/Hong Kong/1/68 w grupie wieku B) (tab. I). Wartości średniej geometrycznej miana (GMT) przed szczepieniem wahały się od 1 702 w grupie D dla szczepu A/PR/8/34 do 61 235 w grupie C dla szczepu A/Hong Kong/1/68. Po szczepieniu najniższą wartość GMT stwierdzono w grupie B dla szczepu A/Singapore/1/57 (5 346), a najwyższą w grupie C dla szczepu A/Hong Kong/1/68 (1 199 499). Indeks przyrostu miana obliczany jako stosunek średniej geometrycznej miana przed szczepieniem do wartości GMT po szczepieniu w 2 przypadkach miał wartość mniejszą od 1: w grupie B dla szczepu A/Hong Kong/1/68 (0,6) i dla szczepu A/Singapore/1/57 (0,74). Indeks przyrostu miana o najwyższej wartości stwierdzono w grupie A dla szczepu A/Taiwan/1/86 (381,1).

OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki wskazują na wysoką czułość metody dot blot. *Styczyński* (15) określił czułość tej metody na 5×10^{-5} mg białka wirusowego w badanej próbce. Obecnie prezentowane wyniki wskazują na możliwość wykrywania przeciwciał (przy stałej ilości antygeny) w niskich stężeniach.

Nie udało się prześledzić różnic w odpowiedzi dla poszczególnych szczepów wirusa grypy u osób przechodzących zakażenie pierwotne w różnym czasie. Przyczynę stwierdzenia obecności przeciwciał (i ich przyrost w wyniku szczepienia) dla szczepów powodujących zachorowania w przeszłości: A/PR/8/34 i A/Singapore/1/57 u osób z grupy D, u których zakażenie pierwotne było prawdopodobnie związane ze szczepem A/USSR/90/77, można upatrywać w pokrewieństwie antygenowym szczepów (10, 18), doborze metody badania, jak również możliwości ewentualnego zanieczyszczenia szczepów. W odróżnieniu od powszechnie stosowanego odczynu zahamowania hemaglutynacji, w którym wykrywane są przeciwciała łączące się z określonymi miejscami na hemaglutynie wirusa grypy, w metodzie dot blot wykrywane są przeciwciała reagujące również z innymi białkami wirusa grypy, w tym także z białkami wewnętrznymi – nukleoproteiną i białkiem matrycowym, które wykazują mniejsze zróżnicowanie między poszczególnymi szczepami, niż ma to miejsce w przypadku hemaglutyniny (5, 6, 11). Dodatkowo dobór metody o wysokiej czułości mógł mieć wpływ na zwiększenie poziomu wykrywalności reakcji krzyżowych.

WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono:

1. Wysoką czułość metody dot blot, przy zastosowaniu której można wykrywać (przy koncentracji antygeny $3,3 \times 10^{-4}$ mg/ml) przeciwciała klasy IgG w mianie powyżej 1 : 1 000 000.

2. Prawdopodobnie ze względu na krzyżowe pokrewieństwa między białkami wewnętrznymi szczepów reprezentujących odmienne podtypy hemaglutyninowe metodą dot blot, nie udało się określić związku między wiekiem badanych osób a odpowiedzią ze strony przeciwciał IgG dla różnych szczepów wirusa grypy.

J. Siennicka, L. Brydak

APPLICATION OF DOT BLOT METHOD TO ESTIMATE IgG ANTIBODIES IN PERSONS VACCINATED AGAINST INFLUENZA

SUMMARY

The level of IgG antibodies before and post influenza vaccination for 6 strains of influenza A virus (4 representative for pandemics and 2 vaccine strains) was tested by dot blot method. Examinations were performed with 4 age groups (20 persons each), selected on the base of strain which probably caused primary infection in given group. No differences in answer to particular influenza A virus strains consistent with „original antigenic sin” were observed. High sensitivity of dot blot method was confirmed.

PIŚMIENICTWO

1. *Beveridge W.I.*: w: *Influenza: the last great plaque*. Heinemann, London, 1977, 24. – 2. *Brydak L., Rudnicka H., Gut W., Magdzik W., Kańtoch M.*: *Przeg. Epid.*, 1992, 3, 221. – 3. *Feery B.J., Hampson A.W., Forsyth J.R.L., Evered M.G.*: *Med. J. Aust.*, 1977, 2, 324. – *Francis T.*: *Proc. Am. Phil. Soc.*, 1960, 66, 231. – 5. *Gorman O.T., Bean W.J., Kawaoka Y., Donatelli I., Guo Y., Webster R.G.*: *J. Virol.*, 1991, 65, 3704. – 6. *Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.G.*: *J. Virol.*, 1991, 65, 5491. – 7. *Kilbourne E.D.*: w: *Influenza*. New York. Plenum., 1987, 3. – 8. *Magdzik W., Semkow R., Rudnicka H., Zgorzelska K.*: w: *Choroby zakaźne w Polsce i ich zwalczanie w latach 1970–79.*, 1984, Ossolineum, 64. – 9. *McElhaney J.E., Meneilly G.S., Lechelt K.E., Beattie B.L., Beackley R.Ch.*: *Vaccine*, 1993, 11, 1055. – 10. *Neumeier E., Meier-Ewert H., Cox N.J.*: *J. Gen. Virol.*, 1994, 75, 2103.

11. *Neumeier E., Meier-Ewert H.*: *Virus Res.*, 1992, 23, 107. – 12. *Noble G.R., Kaye H.S., Kendal A.P., Dowdle W.R.*: *J. Infect. Dis.*, 1977, 136, 686. – 13. *Powers D.C., Belshe R.B.*: *J. Infect. Dis.*, 1994, 169, 1125. – 14. *Powers D.C.*: *J. Med. Virol.*, 1994, 43, 57. 15. *Styczyński P.*: Rozprawa doktorska. PZH, 1990. – 16. *Tyski S., Adamiak J., Gut W., Hryniewicz W.*: w: *Rapid methods and automation in microbiology and immunology.*, 1989, A. Balows, R.C. Tilton, A. Turano, Brixia Acad. Press. Brescia, 714. – 17. *WER*, 1996, 8, 57. – 18. *Webster R.G., Kawaoka Y.*: *Seminars in Virol.*, 1994, 5, 103. – 19. *Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y.*: *Microbiol. Rev.*, 1992, 56, 152. – 20. *Webster R.G., Kasel J.A., Couch R.B., Laver W.G.*: *J. Infect. Dis.*, 1976, 134, 48.

Adres: Zakład Wirusologii Państwowego Zakładu Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa