

Perzistence protilátek vůči virovým a vakcinálním antigenům (Duration of Humoral Immunity to Common Viral and Vaccine Antigens)

Amanna Ian J., Carlson Nichole E., Slifka Mark K.

The New England Journal of Medicine, Vol. 357, November 8, 2007, č. 19, s. 1903-15

Volně přeložil a zkrátil MUDr. Plesník

Souhrn:

Dlouhodobé přetrvávání protilátek, vzniklých po styku s antigenem, je podstatou ochrany před mnoha patogeny. Bohužel znalost trvání humorální imunity a podíl účasti paměťových B buněk na ní není spolehlivě znám.

Sledovali jsme u 45 osob změny titrů protilátek vůči antigenům virů vakcinie, spalniček, příušnic, planých neštovic a pásového oparu, Epstein-Barrové a proti antigenům původců tetanu a záškrtu po dobu až 26 let. Navíc jsme diluční analýzou stanovovali antigen-specifické paměťové B buňky a porovnávali počet těchto buněk se zjištěnými hladinami sérových protilátek.

Hladiny protilátek vůči virovým antigenům byly pozoruhodně stabilní. Poločas rozpadu sahal od odhadovaných 50 let u protilátek proti VZV, až po více než 200 let pro jiné viry, např. viry spalniček a příušnic. Protilátky proti antigenům tetanu a záškrtu mizely rychleji, odhad poločasu rozpadu činil 11 a 19 let. Paměťové B buňky přežívaly dlouho, nebyla však statisticky významná souvislost mezi počtem paměťových B buněk v krevním řečišti a hladinou protilátek vůči pěti z osmi testovaných antigenů.

Závěrem lze říci, že práce obsahuje kvantitativní sledování humorální imunity proti několika antigenům u osob sledovaných déle než 10 roků. V podmínkách, kdy je běžná častá expozice, nebo opakovaná vakcinace proti danému agens, počet paměťových B buněk nekoreluje s titry protilátek. To naznačuje, že periferní paměťové B buňky a plasmatické buňky produkující protilátky mohou představovat na sobě nezávisle řízené populace buněk a že mohou mít odlišné role při přetrvávání ochranné imunity.

Prožití akutní virové či bakteriální infekce často vede ke vzniku dlouhodobé, až doživotní imunity. Ač je dobře znám význam přetrvávání protilátek pro ochranu zdraví, mechanismy, které toto přetrvávání ovlivňují, nejsou jasné. Abychom zjistili persistenci protilátek po prožití nemoci, či po očkování, sledovali jsme změny titrů protilátek proti různým antigenům v uchovávaných sérech, získaných jak v plánovaných (ročních) intervalech, tak po náhodné expozici (nemoc, kontakt, revakcinace). Navíc jsme stanovili trvání humorální imunity během dlouhé doby, v níž nedošlo ke specifickému navýšení – bústrování titru protilátek.

METODIKA

Osoby

K účasti na studii jsme e-mailem vyzvali zaměstnance Národního výzkumného střediska primátů v Oregonu. Požádali jsme je o souhlas s odběrem vzorků séra při zařazení do studie a o souhlas s odběry dalších vzorků séra v plánovaných termínech. Odpovědělo 51 osob, které podepsaly souhlas s účastí ve studii po písemně předaném poučení a po vyplnění dotazníku s podrobnou osobní anamnézou. Jedinou podmínkou zařazení do studie byl požadavek, aby byly k dispozici nejméně tři uložené vzorky séra zájemce o účast ve studii, odebrané tři a více let před začátkem studie. Tato podmínka vedla k vyřazení šesti zájemců, od zbylých 45 osob bylo pro k analýzám užito celkem 630 vzorků séra.

Vzorky byly u pracovníků s primáty odebírány podle plánu jednou ročně. Pokud došlo k úzkému styku se zvířaty (tj. poškrábání, kousnutí), byl odebrán další, mimořádný vzorek séra. U skupiny osmi osob byly také vzorky odebírány v týdenních intervalech po očkování virem vakcinie se záměrem sledovat akutní fázi imunitní odpovědi. Ke stanovení titrů protilátek byly užity ELISA testy.

Ze závěrečného hodnocení byly vyřazeny neočkované, nebo séronegativní osoby, včetně pracovníků s nálezem nejednoznačných titrů protilátek (méně než 200 ELISA jednotek) Celkem bylo vyřazeno devět osob. Ke statistickému zpracování výsledků vyšetření hladin protilátek byly využity několikrát počítačové programy.

VÝSLEDKY

Vzorky sér a charakteristika vyšetřené populace

Celkem bylo získáno 630 vzorků sér od 45 osob. Mezi nimi bylo 21 mužů s 24 žen průměrného věku 37 ± 8 let (rozpětí 23-59 let), bělochů bylo 38. Většina sér byla odebrána v plánovaných termínech, ale 50 sér (7,9 %) bylo odebráno mimořádně po těsném kontaktu se zvířetem. Od každého pracovníka bylo během průměrné doby 15,2 let sledování získáno průměrně 14 vzorků séra (medián 11). Většina osob byla očkována proti variole v dětství a prožila nákazu virem spalniček, příušnic, zarděnek, EB-virem a VZ-virem. Nikdo neměl nějaký specifický imunodeficit.

Antigen	Ochranný titr IU/ml	Persistence specifických protilátek v séru	
		Počet imunních ¹⁾ n (%)	Poločas rozpadu protilátek ²⁾ let (95 % interval spolehlivosti)
Tetanus ³⁾	0,01	42 (93)	11 (10 – 14)
Záškrt ³⁾	0,01	40 (89)	19 (14 – 33)
VZV	.	.	50 (30 – 153)
Vakcinie	3,8	28 (62)	92 (46 - ∞)
Zarděnky	10,0	39 (87)	114 (48 - ∞)
EBV	.	.	11,5 (63 - ∞)
Příušnice	.	.	542 (90 - ∞)
Spalničky	0,2	41 (91)	3014 (104 - ∞)

- 1) = Tyto hodnoty vychází z titru nalezeném v posledním vzorku séra odebraném před očkováním vakcínou MMR, nebo před bústrem protilátek při epidemii v roce 1999.
- 2) = U některých antigenů nedocházelo k poklesu protilátek, proto nebylo možné stanovit poločas jejich rozpadu. Rozdíly mezi persistencí protilátek u mužů nebo žen nebyly statisticky významné.
- 3) = Počet imunních vůči tetanu a záškrtu je dán střízlivým odhadem, neboť předpokládaná ochranná hladina protilátek proti oběma antigenům je pod hranicí detekce imunoenzymatickými testy.

Protilátky proti viru vakcinie

Jednou z možností pro uchování dlouhotrvající imunity vůči patogenu, který v těle nepřežívá, je opakující se reexpoze tomuto patogenu. K objasnění této možnosti jsme sledovali protilátkovou odpověď po očkování proti variole. Ze 43 osob narozených před rokem 1972 mělo protilátky proti viru vakcinie 39 (91 %) osob. Rutinní očkování proti variole bylo v USA zrušeno roku 1972, necirkulují zde ani jiné orthopoxviry patogenní pro lidi. Před rokem 2003, v němž bylo osm osob zařazených do studie přeočkováno proti variole, jsme našli jen u dvou osob vzestup hladiny protilátek. Předpokládanou ochrannou hladinu specifických protilátek mělo 28 (62 %) ze 45 osob. **Titry klesaly velmi pomalu, odhad**

poločasu jejich vymizení činí 92 let (při 95 % intervalu spolehlivosti 46 let až nekonečno).

Protilátky proti viru spalniček

Výskyt spalniček v USA je dnes raritou, stále však hrozí možnost jejich importu ze zahraničí. Během studie našli u pěti osob zvýšení titru spalničkových protilátek. Ukázalo se, že jedna osoba byla přeočkována MMR vakcínou, u čtyř stoupl titer po jejich styku s nemocnými primáty při epidemii roku 1999, vyvolané necharakterizovaným paramyxovirem. Podle titerů protilátek v posledním odebraném vzorku séra před epidemií z roku 1999, nebo po bústře při epidemii, mělo ochrannou hladinu spalničkových protilátek 43 (96 %) ze 45 sledovaných osob. Předpokládaná ochranná hladina činila nejméně 0,2 IU/ml. **Pokles hladiny spalničkových protilátek byl nevýznamný, tyto protilátky nejspíše přetrvávají po celý život. Odhadovaný poločas rozpadu byl 3014 let (při 95 % IS 104 let až nekonečno).**

Protilátky proti viru příušnic

V této skupině mělo parotitické protilátky 41 (91 %) ze 45 vyšetřovaných osob. Dvě byly přeočkovány MMR vakcínou, u jiných dvou došlo ke krátkodobému zvýšení hladiny protilátek. Mohl to být následek expozice přirozené komunitní infekci virem parotitidy. Tato incidence 0,3 případů/1000 člověkoroků je v souladu se stálým poklesem prevalence parotitidy po zahájení rutinního očkování v roce 1977. **Protilátková odpověď na virus parotitidy byla, podobně jako u spalniček, dlouhodobá (odhad poločasu rozpadu je 542 let, při 95 % IS 90 let až nekonečno) a hladiny nijak významně neklesaly (P=0,69).**

Protilátky proti viru zarděnek

Před zahájením očkování proti zarděnkám v USA (sedmdesátá léta 20. století) byla tato infekce nejčastější příčinou vrozených vývojových vad dětí. V naší skupině mělo zarděnkové protilátky 40 (89 %) ze 45 osob. Předpokládanou ochrannou hladinu protilátek (nejméně 10 IU/ml) mělo 39 (87 %) ze 45 osob. **Hladiny se téměř neměnily, odhadovaný poločas rozpadu byl 114 let (při 95 % IS od 48 let do nekonečna).**

Ačkoli opakovaná expozice sledovaným, nebo jim sérologicky blízce příbuzným virům, může bústrovat hladiny protilátek, výše uvedené výsledky ukazují, že **pro dlouhodobé přetrvávání protilátek proti virům vakcínie, spalniček, příušnic a zarděnek není nutný opakovaný styk s těmito viry v populaci, nebo opakované prožití nákazy.**

Protilátky proti virům Epstein-Barrové a varicella-zoster

Na rozdíl od akutních virových infekcí mohou při chronické a latentní nákaze viry v těle buď persistovat, nebo u latentní infekce dojde k jejich aktivaci, což má za následek bústř imunity u infikované osoby. Ze 45 sledovaných osob mělo protilátky proti EBV 37 (82 %) osob. U jedné osoby došlo ve sledované době k sérokonverzi, u čtyř dočasné zvýšení titerů signalizovalo reaktivaci, nebo opakovanou expozici viru. **Protilátková imunita proti EBV se však významně nesnižovala a zdá se, že je doživotní.**

Naopak titry protilátek proti VZV často kolísaly. Protilátky mělo všech 45 sledovaných osob, u 10 (22 %) z nich hladina protilátek dočasně stoupla. Dvě osoby uvedly ataku oparu, jedna mohla být ve styku s čerstvě očkováným dítětem, u šesti osob nezjistili možnou expozici VZV, o jedné osobě chyběly informace. **Hladina protilátek pomalu klesala, odhad poločasu rozpadu činí 50 let. Ač infekce VZV je latentní a často u ní dochází k reaktivaci či reexpozici, vyvolává nejkratší persistenci protilátek ze všech vyšetřovaných virových infekcí.**

Protilátky proti tetanu a záškrtu

Očkování proti tetanu a záškrtu bylo doporučováno již ve 40. letech 20. století, u dospělých především kombinovanými toxoidy tetanu se záškrtkem. Po očkování došlo k prudkému poklesu incidence obou nemocí a k přetrvávání protilátek. **Za ochranný titer tetanických protilátek je považována hodnota 0,01 IU/ml. Titry při ELISA vyšší než 0,16 IU/ml dobře korelují s neutralizační aktivitou séra. Tento titer je současně nejnižší spolehlivě prokazatelná hodnota protilátek v ELISA testu. Ochranu však mohou zajistit i nižší titry, takže skutečný počet imunních osob může být větší.** Bústry tetanických protilátek našli u 27 ze 31 vyšetřovaných osob. **Jejich hladina klesala poměrně rychle, odhad poločas rozpadu byl 11 let (95 % IS 10-14; P<0,001).** Podobný výsledek byl získán u modelu před více než 40 roky.

Aby si ověřili, že rychlý pokles protilátek proti tetanu platí i pro jiné proteinové antigeny, sledovali také imunitu vůči záškrtu. Za ochrannou hladinu záškrťových protilátek se považuje hodnota vyšší než 0,01 IU/ml. Ze 45ti námi sledovaných osob mělo 40 (89 %) osob hladinu vyšší než námi stanovenou limitní hodnotu 200 ELISA jednotek (0,04 IU/ml). Je možné, že i zbylých pět osob bylo imunních, ale to jsme nemohli ověřit. Zvýšení hladiny záškrťových protilátek typicky provázelo současné zvýšení hladiny tetanických protilátek, navozené podáním kombinované Td vakcíny pro dospělé osoby. Analýza ukázala, **že poločas rozpadu záškrťových protilátek je asi 19 let (95% IS je 14-33 let; P<0,001).** Je zřejmé, že **délka přetrvávání protilátek je značně ovlivněna složením antigenu. Bílkovinné antigeny navozovaly kvantitativně kratší persistenci protilátek, než jaká je pozorovaná u virových infekcí.**

Persistence protilátek u jednotlivců

Jedna hypotéza o dlouhodobém přetrvávání protilátek předpokládá, že k němu přispívá stimulace paměťových B buněk nespecifickými antigeny. Abychom ověřili případný vliv heterologní infekce a očkování, sledovali jsme u čtyř osob protilátkovou odpověď na osm antigenů po více než 25 let a po očkování proti variole i v týdenních intervalech. Během sledování došlo k obvyklým změnám hladiny protilátek po přeočkování proti tetanu a záškrtu, k sérokonverzi u infekce EBV, po opakované expozici nebo reaktivaci VZV. Tyto změny však měly jen malý vliv na hladiny protilátek vůči dalším sledovaným antigenům. Přesto, že po revakcinaci virem vakcinie došlo až k cca 4000% vzestupu specifických protilátek, změnila se hladina protilátek vůči sedmi dalším sledovaným antigenům jen málo, nebo vůbec ne. Tento náleznaznačuje, že **příležitostná nespecifická aktivace imunitního systému je jen stěžímechanismem, který udržuje dlouhodobé přežívání specifické imunity.**

Individuální odchylky persistence protilátek svědčí o tom, že i když významný podíl na persistenci má sám antigen který je vyvolal, není jediným faktorem o persistenci rozhodujícím. **Uplatňuje se asi také jeden, či několik dalších faktorů, které zatím neznáme.**

Paměťové B-buňky a jejich souvislost s hladinami protilátek

Plasmatické buňky buď udržují hladiny protilátek samy o sobě, nebo je k tomu potřebné jejich zmnožení proliferací a diferenciací paměťových B-buněk. Všechny teorie vycházející ze závislosti přetrvávání protilátek na paměťových B-buňkách předpokládají, že musí být souvislost mezi počtem těchto buněk a hladinami protilátek. Pomocí dilučních analýz jsme zjistili, že paměťové B-buňky jsou v krevním oběhu přítomny pozoruhodně dlouho.

Významná korelace počtu paměťových B-buněk s hladinami protilátek byla zjištěna po prožití spalniček, příušnic a zarděnek, ne však po infekci virem vakcinie. Významná korelace však chyběla po infekci VZV nebo EBV (vznik latentní infekce), nebo po očkování proti

tetanu a záškrtu. Těsnost korelace se u různých antigenů velmi odlišovala což naznačuje, že **počet paměťových B-buněk není dobrým prognostickým znakem pro výši hladin protilátek v séru**. Zdá se, že pomnožení krátce žijících plasmatických buněk, vyvolané paměťovými B-buňkami, není hlavní příčinou přetrvávání protilátek.

DISKUSE

Sledovali jsme přetrvávání protilátkové reakce na osm antigenů po dobu až 26 let. **Po infekci živými viry byl poločas rozpadu protilátek 50 a více let, v řadě případů nebyl pokles protilátek prokazatelný. Naopak protilátková odpověď na proteinové, nereplikující se antigeny (tetanus, záškrť) se poměrně rychle snižovala (odhad poločasu rozpadu byl 11 -19 let). To naznačuje, že u některých osob hrají na persistenci protilátkové imunity významnou roli další specifické mechanismy.**

Průměrný věk osob byl na konci studie 52 let, většina z nich prožila v dětství přirozenou infekci viry spalniček, příušnic, nebo zarděnek. Neví se, zda imunita navozená očkováním trvá stejně dlouho jako po prožití nemoci. I když se titry protilátek po očkování zdají nižší, než titry po přirozené infekci, dlouhodobé sledování imunity vůči spalničkám, příušnicím a zarděnkám **naznačuje, že postvakační protilátková paměť může být stejná jako po onemocnění. Tento úsudek je však založen jen na velmi malém vzorku osob (2-5)** a dříve než bude možné učinit statisticky věrohodný závěr, musí být uskutečněny další porovnávací studie. Získání informací o persistenci protilátkové paměti je v současnosti zvláště důležité, neboť její bústrování při asymptomatické infekci je stále řidší následkem klesající cirkulace divokých virů v populaci.

Předpokládají se dva hlavní mechanismy pro udržování dlouhodobé humorální imunity: tvorba protilátek krátce žijícími plasmatickými buňkami, řízená paměťovými B-buňkami, nebo tvorba protilátek dlouho žijícími plasmatickými buňkami, nezávislá na paměťových B-buňkách. Pokud je podstatou persistence protilátek aktivace polyklonálních B-buněk, pak by měla být doba přítomnosti protilátek stejná bez ohledu na specifitnost antigenu.

Hypotézy o závislosti na paměťových B-buňkách navíc vyžadují, aby po každé infekci byla zachována souvislost mezi hladinou protilátek a počtem paměťových B-buněk, přinejmenším na periférii krevního oběhu. Taková korelace byla nalezena jen v některých případech. Platilo to u infekce virem spalniček, příušnic a zarděnek, ne však u infekce virem vakcinie, varicella-zoster, Epstein-Barrové, či u tetanu, nebo záškrtu.

Pokud jsou paměťové B-buňky a protilátky regulovány nezávisle na sobě, mohla by mnohočetná opakovaná expozice antigenům vést k jejich odlišným hladinám. Ve prospěch druhé hypotézy svědčí nález, že antigeny, jimž je organismus exponován opakovaně při revakcinaci, nebo při aktivaci latentní virové infekce, vykazují nejslabší korelaci mezi počtem paměťových B-buněk a titry protilátek. **Podobně se v jedné studii ukázalo, že mnohočetné očkování proti tetanu vedlo k stálému zvyšování paměťových B-buněk bez současného stoupání titrů dlouhodobě přežívajících protilátek.** Také to signalizuje, že regulace paměťových B-buněk a tvorby protilátek spolu nesouvisí.

Trvání humorální imunity mohou nepříznivě ovlivňovat různé okolnosti, včetně imunodeficitů, nebo chemoterapie. Tyto mohou vést k rychlejšímu ústupu hladin protilátek než jaké jsme zaznamenali. Stejně tak naše výsledky se opírají o protilátkovou odpověď podmíněnou T-buňkami. Ta se může lišit od obvykle krátkodobé humorální imunity proti antigenům nezávislým na T-buňkách. Lepší poznání faktorů, které rozhodují o přetrvávání specifických protilátkových reakcí bude důležité jak pro vývoj nových vakcín, tak pro stanovení intervalů revakcinace, potřebných k udržení ochranných hladin protilátek.

Poznámka překladatele

Nejprve se zájmem, pak s údivem jsem četl výše uvedený článek. Se zájmem proto, že potřeba přeočkování a intervaly mezi základním očkováním a přeočkováním (-mi) jsou stále často probíraným tématem. Nejen při „tvorbě“ očkovacích schémat a kalendářů, ale i při zvažování možností jak a kde zajistit co nejvyšší účast očkovaných a zejména, zda případná revakcinace je ekonomicky opodstatněná a u nás v současnosti finančně únosná.

S údivem jsem zíral na uváděné doby persistence specifických protilátek proti živým virovým nákazám. Rád se dovídám, že očkování vakcínami MMR vede ke stejně dlouhotrvající humorální imunitě (prakticky doživotní), jako prožití přirozené infekce těmito viry. Když však tento nález konfrontuji s nedávnými epidemiemi parotitidy i u opakovaně očkovaných osob, a to nejen u nás, ale v řadě států, vtírají se pochyby o :

- (1) správné dg onemocnění a jeho hlášení,
- (2) kvalitě použité vakcíny,
- (3) jejím správném uchovávání a aplikaci vakcíny,
- (4) antigenní shodě vakcinálního viru s epidemickým virem ,
- (5) zobecňování výsledků získaných na malém (až minimálním) počtu účastníků studie.

Dovoluji si připomenout práci Cohenové a spol. o odhadu účinnosti očkování v epidemii parotitidy v Anglii během let 2004-2005 (**SMS 31**). Metodou detekce specifických protilátek ve slinách očkovaných zjistila, že podíl dětí s ochrannou hladinou protilátek po dvou dávkách vakcíny klesl z 99 % vyšetřených dětí ve věku 5-6 let (IS 97-99,5 %), na 86 % (IS 74-93 %) u dětí vyšetřených ve věku 11-12 let. Mezi velikostí ochrany po jedné či dvou dávkách vakcíny MMR byl statisticky významný rozdíl ($p < 0.001$). Usoudila, že příčinou vzniku epidemií P u starších očkovaných může být klesající imunita.

Podle zkušeností z ČR většina onemocněvších očkovaných dostala poslední dávku vakcíny před 6 – 13 roky. Na přenosu viru parotitidy se podílí nejen nemocní, ale i osoby s asymptomatickým průběhem infekce, které ve slinách po 2-3 týdny vylučují virus. Jejich podíl mezi infikovanými osobami může být 30 až 40 %. V populaci s vysokou proočkovaností zřetelně chybí bústrování imunity cirkulací divokého viru, proto pokles postvakcinační imunity se jeví pravděpodobným. Zjištění dlouhodobého přetrvávání ochranných títů protilátek proti viru parotitidy ve výše uvedené studii však oponuje empirickému závěru ze současných epidemií parotitidy o zhruba desetileté persistenci ochranného titru postvakcinačních protilátek u většiny očkovaných.

Naopak se zejména u nás ukázalo, že imunita u osob řádně očkovaných proti tetanu (dětí i dospělých, imunizovaných při celonárodní akci) je podstatně delší, než by podle výsledků persistence protilátek ve zde uvedené studii vyplývalo. Podílí se na tom vyšší počet paměťových T-buněk ?

Nastíněné rozpory lze snad vysvětlit jednak malým počtem (45) osob zařazených do studie, jednak tím, že jde o pracovníky jednoho ústavu, což jistě není reprezentativní vzorek celé populace. Obávám se však, že podobné dlouhodobé monitorování protilátek u velké a reprezentativní kohorty osob, které by mohlo poskytnout věrohodné informace, je v nedohlednu.