

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

FACULTATEA DE MEDICINĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

“REZUMAT”

**CARACTERIZAREA MUTAȚIILOR DE SCĂPARE IL-17 ȘI IL-22
POLIMORFICE ȘI TESTE DE PROLIFERARE LA LUCRĂTORII DIN
SĂNĂTATE CU TITRURI JOASE SAU NON-RESPONDERI POST
VACCINARE HBV.**

Conducător științific:

Prof.Dr. Adrian Streinu-Cercel

Doctoranda: Zohreh Borzooy

București

2016

Introducere

Infecția cu virus B (HBV) este o problemă majoră în rândul populației și este cauza cea mai frecventă a bolii de ficat acute și cronice. În întreaga lume, două miliarde de oameni au fost infectați cu HBV, 370 de milioane suferă de infecție cronică și aproximativ un million mor în fiecare an din cauza unor afecțiuni ale ficatului legate de HBV, inclusiv cancerul hepatic. Vaccinul există de peste două decenii, iar utilizarea de rutină a acestuia este recomandată de Organizația Mondială a Sănătății încă din 1997. În ciuda faptului că vaccinurile HBV actualmente în uz s-au dovedit a fi eficiente și sigure, cu utilizarea globală a graficului de imunizare standard cu trei doze, există încă o variație interindividuală considerabilă în ceea ce privește răspunsul imune în urma vaccinării HBV. De exemplu, 5-20% indivizi prezintă hiporeactivitate sau reactivitate zero la vaccinul HBV.

Din cauza incidenței cu pacienții sau cu personalul medical (de exemplu, medici, asistente, tehnicieni de laborator etc.) este expus riscului de transmitere potențială a bolilor ce pot fi prevenite cu ajutorul vaccinurilor, cum ar fi infecția HBV. Riscul transmiterii HBV în urma unui contact tăietor/înțepător este de aproximativ 30%, în timp ce riscul de transmitere a HCV este de aproximativ 1.8%, iar a HIV de 0.3%. Astfel, menținerea imunității reprezintă un aspect esențial al programelor de prevenție și luptă împotriva infectării personalului medical.

Studiile desfășurate în această teză de doctorat au urmărit trei direcții majore de cercetare în ceea ce privește pacienții cu un răspuns inexistent sau scăzut la vaccinarea împotriva HBV (Diagrama 1): 1. Depistarea de tulpini virale non-neutralizabile în urma vaccinării, în urma analizei frecvenței hepatite oculte HBV în rândul personalului medical. 2. Detectarea

polimorfismelor interleukinelor IL-17 și IL-22 la personalul medical. 3. Măsurarea răspunsului proliferativ indus de prezența HBsAg în celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC).

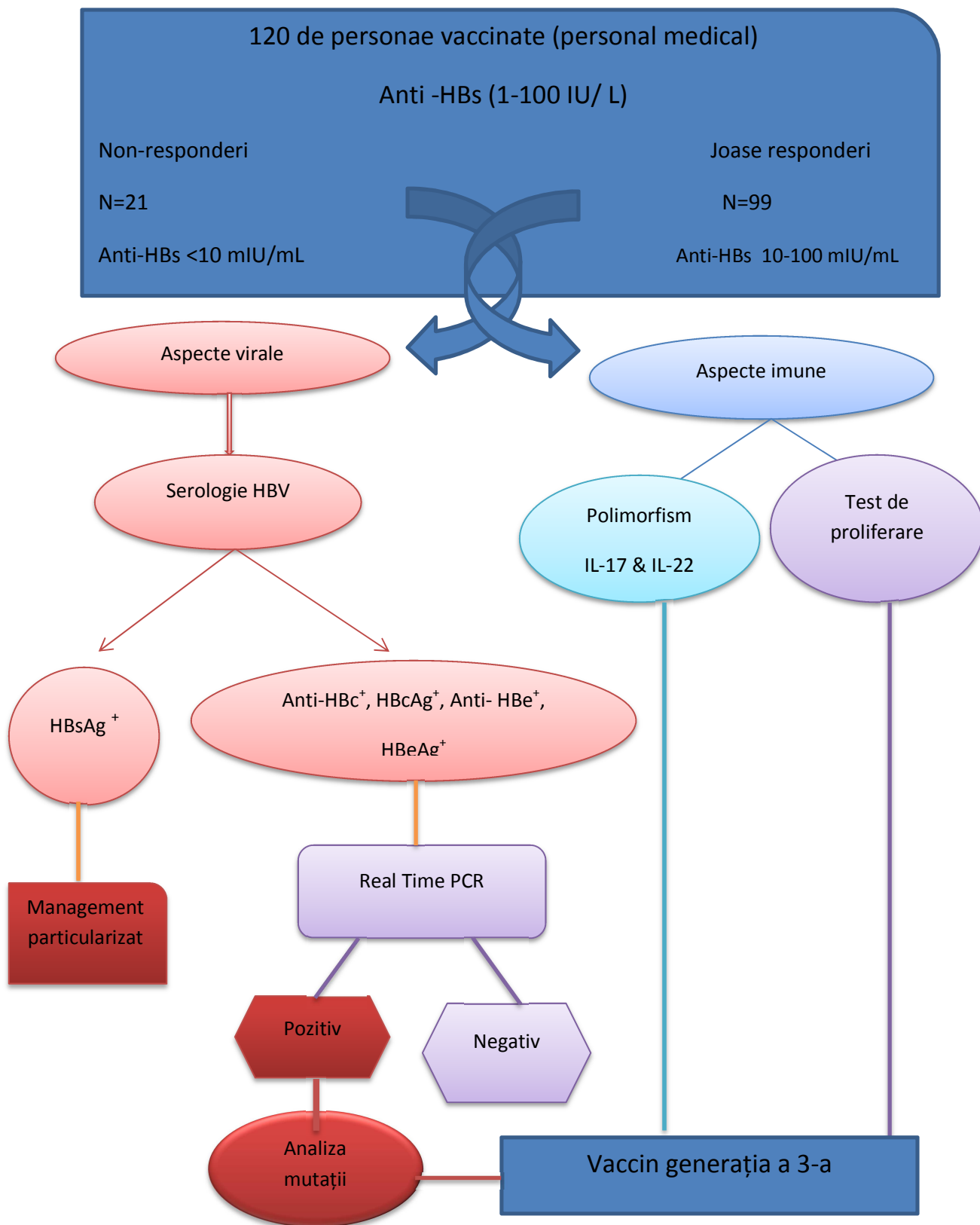


Diagrama 1. Designul studiului

A) Detectarea mutațiilor de “scăpare” post-imunizare activă

Metode

Serurile recoltate de la personal medical HBsAg-negativ (n=120), cu niveluri joase și moderate de anti-HBs, respectiv < 10 UI/mL (grupa I) și 10- 100 UI/mL (grupa II), au fost examinate pentru OBI prin real time PCR indiferent de rezultatele serologice. La persoanele cu hepatită ocultă (OBI) am efectuat secvențiere directă a genelor proteinelor de suprafață.

Rezultate

Patru (3.3 %) din 120 de cazuri au fost pozitive pentru ADN HBV și au fost clasificate ca infecție cu HBV ocultă. Toate au fost negative pentru anti-HBc. În două dintre cazuri nivelul de anti-HBs s-a situat în intervalul 10- 100 UI/mL. Nu am identificat diferențe semnificative în ceea ce privește factorii de risc sau datele serologice între indivizii neresponsivi (<10 UI/L) și slab responsivi la vaccinarea anti-HBV. Nicio mutație nu a fost identificată pe suprafața proteinelor în cazurile de OBI.

B)

B) Detectarea polimorfismelor IL-17 și IL-22

Metode

Am selectat următoarele polimorfisme IL-17 și IL-22: rs4711998 (A/G) din secvențele de gene IL-17 și rs2227501 (A/T), rs2227503 (A/G), rs1026786 (A/G) din IL-22. Acestea au fost determinate prin restriction fragment length polymorphism (RFLP-PCR).

Rezultate

Polimorfismul rs4711998 din IL-17 a avut o frecvență semnificativ mai scăzută în rândul indivizilor non-responsivi comparativ cu cei slab-responsivi. Nu am identificat însă o relație între genotipurile IL-22 rs1026780, rs2227501 și rs2227503 și răspunsul anti-HBs după vaccinare anti-HBV.

C) Teste de proliferare celulară XTT

Metode

Pentru a studia răspunsurile imune la HBsAg la nivel celular, am izolat celule mononucleare din sângele periferic sau PBMC iar apoi am derulat o evaluare a proliferării limfocitare, măsurând numărul de limfocite sau proporția sau diviziunea limfocitelor, după ce le-am tratat în mod optim cu HBsAg. Răspunsurile limfoproliferative au fost detectate în sisteme de cultură celulară. Rezultate optime au fost obținute când limfocitele au fost stimulate la o densitate de însămânțare de 2×10^6 celule/mL, cu 10 mg/mL proteine recombinante AgHBs pentru 5 zile. Culturile au fost suplimentate cu soluția activată XTT și absorbanta fiecărui godeu a fost măsurată la lungimi de undă de 450-630, pentru determinarea creșterii celulare și a expansiunii.

Rezultate:

Lipsa de răspuns proliferativ la AgHBs a fost demonstrată în PBMC la indivizii fără răspuns dintre subiecții noștri. S-a observat un răspuns slab proliferativ la AgHBs la subiecții imunizați fără răspuns comparativ cu indivizii imunizați cu răspuns slab. Stimularea cu PHA (ca

un mitogen) a indus un index proliferativ adecvat în PBMCs al subiecților noștri fără răspuns, care înregistrează o diferență semnificativă față de cei cu răspuns slab.

Concluzii

1) Diferențierea între lipsa de anticorpi anti-HBs și nivelurile scăzute (cel puțin pentru personalul medical (PM) este problematică.

2) Am identificat 4 cazuri (3.3%) de infecție ocultă HBV în rândul PM testat (n=120) în cadrul acestui studiu; toți au avut anti-HBc negativ; două dintre cazurile pozitive aveau niveluri moderate de anticorpi anti-HBs (între 10 și 100 UI/mL).

3) Nu am găsit nicio diferență semnificativă în ceea ce privește factorii de risc sau datele serologice între indivizii neresponsivi (<10 UI/L) și slab responsivi la vaccinarea anti-HBV ($10 < \text{anti-HBs} < 100$ UI/L).

4) Nicio mutație nu a fost identificată la nivelul proteinelor de suprafață în cazurile de infecție ocultă cu HBV.

5) Nivelul de 10 mUI/ml anti-HBs nu indică faptul că deasupra acestei limite nu pot apărea infecții cu HBV.

6) Personalul medical cu anticorpi anti-HBs inadecvați (<100 UI/mL) în urma vaccinării, indiferent de profilul lor serologic pentru HBV, trebuie testați pentru prezenta ADN HBV prin teste moleculare sensibile.

7) Anti-HBc nu este un marker de încredere pentru suspiciunile de infecție ocultă cu HBV, în special pentru grupurile de indivizi cu risc crescut.

8) În rândul personalului medical, genotipul IL-17 rs4711998 GG a prezentat o frecvență semnificativ mai redusă în cazul indivizilor neresponsivi, în comparație cu cei slab responsivi la vaccinul împotriva HBV.

9) Cele trei polimorfisme investigate (rs1026786, rs2227501, rs2227503) în gena IL-22 nu au fost corelate cu nivelurile de anticorpi anti-HBs pentru populația studiată.

10) Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) al indivizilor neresponsivi nu au prezentat răspunsuri la prezența HBsAg de tip stimulare sau expansiune, în comparație cu cei slab responsivi.

11) PBMC ale indivizilor slab-responsivi și non-responsivi au avut prezentat răspuns proliferativ împotriva PHA ca mitogen, fără diferențe semnificative între cele două grupuri.