บทความฟื้นวิชา

Immunological Assays to Measure Host Immune Responses to HIV

ทิพย์วรรณ ชื่นจิตร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร กรมแพทย์ทหารบก

คำนำ

การวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีมีความสำคัญ เนื่องจากทำให้เข้าใจบทบาทของไวรัสที่มีต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย การศึกษาถึงลักษณะของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและความสัมพันธ์กับการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวี สามารถช่วยการพัฒนาประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกัน สำหรับการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีนั้นสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี โดยแบ่งเป็น การตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral immunity) ซึ่งวิธีที่นิยมใช้คือการตรวจวัด neutralizing antibodies และ antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) และการตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell-mediated immunity) ซึ่งสามารถทดสอบได้หลายวิธี เช่น cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay โดยการวัดความสามารถของ CD8+ T cell ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวี (cytolytic activity); enzyme-linked immunospot (ELISPOT) และ intracellular cytokine staining (ICS) assays ซึ่งเป็นการตรวจหา T cell ที่สามารถหลั่ง cytokines ชนิดต่างๆ HLA tetramer binding assays ใช้ตรวจหา T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจน; และ lymphoproliferation assay (LPA) ใช้ตรวจหา CD4+ T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนต่างๆ รวมถึงแอนติเจนของเชื้อเอชไอวีด้วย

Humoral immune responses) neutralizing antibody assays[13]

ภูมิคุ้มกันที่ร่างกายต้องการเพื่อป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (sterilizing immunity) คือ neutralizing antibodies แอนติบอดีเหล่านี้จะป้องกันการติดเชื้อโดยจับกับส่วน envelope ของเชื้อเอชไอวีซึ่งส่วน envelope นี้เป็นส่วนสำคัญที่ไวรัสใช้จับกับเซลล์ของร่างกายเพื่อจะเข้าสู่เซลล์และทำลายเซลล์ดังกล่าวในที่สุด ดังนั้นจึงทำให้เชื้อเอชไอวีไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้

สำหรับการทดสอบหา neutralizing antibodies ต่อ T cell line adapted (TCLA) HIV strains นั้น เราใช้วิธี MT-2 cell killing assay MT-2 เป็น CD4+ human lymphoblastoid cell line ซึ่งเมื่อมีการติดเชื้อเอชไอวีชนิด X4 (ใช้ CXCR4 เป็น coreceptor) จะเกิด cytopathic effect การทดสอบนี้จะนำ supernatant ซึ่งประกอบด้วยเชื้อเอชไอวีซึ่งอยู่นอกเซลล์ มาอบ (incubate) กับน้ำเหลืองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีที่ต้องการตรวจ ที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมงก่อนเติม MT-2 cell neutralizing antibodies ที่มีอยู่ในน้ำเหลืองจะจับกับไวรัสและทำให้ไวรัสไม่สามารถที่จะเข้าสู่ MT-2 cell ได้ การ neutralization วัดโดยการย้อม viable cells ด้วยสี neutral red เมื่อ cytopathic effect ในหลุมควบคุม [(control wells), มีเซลล์ และไวรัส แต่ไม่มีน้ำเหลือง] มากกว่า 70% แต่น้อยกว่า 100% ส่วน neutralizing antibody titers คือส่วนกลับของ dilution ของน้ำเหลืองที่สามารถป้องกันเซลล์ไม่ให้ติดเชื้อและถูกฆ่าโดยไวรัสได้ 50% สำหรับ 50% cutoff นี้จะเท่ากับการลดการสร้างแอนติเจนของไวรัสได้ 90% นอกจากนี้จะต้องทำการทดสอบ positive control โดยการใช้น้ำเหลืองที่เราทราบค่าของ neutralizing antibody titers แล้ว ควบคู่ไปด้วย น้ำเหลืองที่นำมาทดสอบหา neutralizing antibody titers ต้องทำลาย (heat-inactivate) complement ก่อนด้วยความร้อน เนื่องจาก complement ที่ถูก activated แล้วสามารถมาจับและสะสมบนผิวของไวรัส ทำให้

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 18 สิงหาคม 2547 ได้ให้ตีพิมพ์เมื่อ 27 สิงหาคม 2547

ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พ.อ.หญิง ทิพย์วรรณ ชื่นจิตร
สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทหาร 315/6 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี กทม. 10400

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

สามารถจับกับ complement receptors บน MT-2 cell ได้ ดังนั้นจึงเพิ่มการติดเชื้อหรือการที่ไวรัสเข้าสู่เซลล์ และรบกวนการตรวจหา neutralizing antibodies อย่างไรก็ตามวิธีการการตรวจหา neutralizing antibodies โดยใช้เม็ดเลือดขาว peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ไม่จำเป็นต้องทำลาย complement ก่อน เนื่องจาก CD4+ T cell ไม่มี complement receptors

แม้ว่า MT-2 killing assays จะมีประโยชน์สำหรับการตรวจหา neutralization ต่อ TCLA HIV strains (CXCR4-tropic) แต่ไม่สามารถใช้หา neutralization ของ primary isolates ของเชื้อเอชไอวีซึ่งเป็น CCR5-tropic ได้ ดังนั้น neutralization ของ primary isolates ของเชื้อเอชไอวี เราจึงใช้ PBMC assays คือนำ PBMC ของคนปกติและกระตุ้นด้วย PHA แทนการใช้ MT-2 cell และวัดการลดลงของการสร้าง p24 Gag core antigen

สำหรับวิธี PBMC assays นั้นคล้ายกับ MT-2 assays คือนำไวรัสที่ทราบจำนวนหรือความเข้มข้นมาอบกับน้ำเหลืองที่ dilution ต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง ที่ 37°C ก่อนการเติม PBMC ของคนปกติซึ่งกระตุ้นด้วย PHA หลังจากอบค้างคืนแล้วจึงล้างเซลล์และเติม growth medium ที่มี interleukin-2 (IL-2) เราจะเก็บ culture supernatants ทุกวันเพื่อตรวจหา p24 โดยการใช้ชุดตรวจ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สำเร็จรูป นอกจากนี้ในแต่ละครั้งที่เก็บ supernatant จะต้องคำนวณหาค่า p24 ใน virus control wells (มีไวรัส และเซลล์ แต่ไม่มีน้ำเหลือง) เพื่อใช้สร้าง viral replication curve ส่วน Neutralization titers คือ ส่วนกลับของน้ำเหลืองที่ dilution ซึ่งการสร้าง p24 ลดลง 80% เมื่อเทียบกับ negative control serum

สำหรับการศึกษา neutralizing antibodies ในคนไทยผู้ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 CRF01-AE (สับทัยป์อี) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดำเนินโรคเร็วและกลุ่มดำเนินโรคช้านั้น ทิพย์วรรณฯ และคณะ[4] พบว่าความสามารถของ neutralizing antibodies ต่อ TCLA strain NPO3 และ primary isolates TH023 เพิ่มขึ้นในกลุ่มดำเนินโรคช้า ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มดำเนินโรคเร็ว

Anti-HIV-1 antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) assays[2,5]

เป็นการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันของสารน้ำ โดยการทดสอบหาแอนติบอดีในน้ำเหลืองที่สามารถทำให้เซลล์เป้าหมาย [(target cells), เซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวีหรือ express HIV-1] แตกโดยอาศัย PBMC ของคนปกติ การแตกทำลายนี้วัดเป็นเปอร์เซนต์ (percent specific lysis) โดยเปรียบเทียบกับการหลั่ง 51_{Cr} จากเซลล์เป้าหมายที่ติดฉลากด้วยสารรังสี กับค่าสารรังสีที่หลั่งออกมาจากเซลล์ปกติ (spontaneous) และสารรังสีที่หลั่งออกมามากสุด (maximum) เมื่อทำให้เซลล์แตก

โดยปกติวิธีมาตรฐานจะใช้ เซลล์เป้าหมายที่ติดฉลากด้วยสารรังสีเท่ากับ $5x10^3$ เซลล์, PBMC ของคนปกติ เท่ากับ 1.65 x 10^5 เซลล์ และน้ำเหลืองที่เจือจางเป็น 10 เท่า ซึ่งต้องการทดสอบโดยเริ่มจาก 1:20 ถึง 1:20,000 (dilution สุดท้าย) น้ำเหลืองของแต่ละ dilution จะทำการทดสอบใน 3 หลุม และอบ ไว้ 6 ชั่วโมง

การคำนวณ % Specific lysis นั้น ใช้สูตรดังนี้

% Specific lysis = (Experimental release - Spontaneous release/Maximum release - Spontaneous release) X 100

ตามปกติจะใช้ CEM-NK^R cell line ซึ่งผ่านขบวนการคัดเลือกทางด้านภูมิคุ้มกันวิทยา (immunoselected) เพื่อให้ต่อต้าน (resistance) ในการที่ NK cells ใน donor PBMC จะสามารถฆ่า target cells ได้เองโดยไม่ต้องอาศัยแอนติบอดี (ตามปกติ NK cells สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อด้วยขบวนการ nonspecific lysis ได้เช่นกัน) แต่ละการทดสอบจะรวมถึงการหาค่า background lysis คือการที่ CEM-NKR cells ที่ express HIV-1 และอบกับ donor PBMC โดยไม่ได้ใส่น้ำเหลือง นอกจากนี้จะต้องมี positive control และ negative control โดยการใช้น้ำเหลืองของผู้ติดเชื้อเอชไอวี (HIV-seropositive subject) และ น้ำเหลืองของผู้ไม่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV-seronegative donor) ตามลำดับ สำหรับค่า HIV-1 specific ADCC จะต้องหักค่า background lysis ออกจาก percent specific lysis ด้วย โดยค่า ADCC ที่พิจารณาเป็นค่าบวก หรือ reactive จะต้องมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 15%

การศึกษาในคนไทยผู้ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 CRF01-AE (สับทัยป์อี) โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มดำเนินโรคเร็วและกลุ่มดำเนินโรคช้านั้น พบว่าความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 สับทัยป์บี และ CRF01_AE (สับทัยป์อี) โดยวิธี ADCC ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มดำเนินโรคเร็วและกลุ่มดำเนินโรคช้า อย่างไรก็ตามความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ

เอชไอวีทัยป์ 1 ข้ามสับทัยป์ หรือ เคลดโดยวิธี ADCC (cross-clade ADCC) เกิดขึ้นได้ จากการศึกษานี้คือ แอนติบอดีในน้ำเหลืองของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 CRF01-AE (สับทัยป์อี) สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 สับทัยป์บีได้ แสดงให้เห็นว่า แอนติบอดีต่อส่วนเปลือกนอก (envelope) ซึ่งใช้ในการศึกษานี้ในส่วนที่ conserved เช่น C5 domain ของ gp120 อาจเป็นแอนติบอดีที่มีความสามารถในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวีด้วยวิธี ADCC ได้กว้างกว่า variable region[4,6]

Cellular immune responses

ปัจจุบันความสัมพันธ์ของภูมิคุ้มกันและการป้องกันการติดเชื้อเอชไอวียังไม่กระจ่างนัก เป็นที่ทราบกันดีว่า neutralizing antibodies เป็นภูมิคุ้มกันซึ่งร่างกายต้องการและใช้ป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (sterilizing immunity) อย่างไรก็ตาม neutralizing antibodies ต่างๆเหล่านี้ไม่สามารถสร้างได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยวัคซีน[7] น่าจะเป็นไปได้ว่าภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ โดยเฉพาะ CD8+ cytotoxic T lymphocyte จะมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสในกรณีที่ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อเชื้อเอชไอวีได้ตั้งแต่แรก[8] มีรายงานจากการศึกษาใน non-human primate models ว่า เมื่อนำ CD8+ cytotoxic T lymphocytes ออกจะเป็นผลให้ plasma viral load เพิ่มขึ้น[9,10] นอกจากนี้พบว่า การกระตุ้น CD4+ T cell ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีอาจจะสำคัญสำหรับการควบคุมการเพิ่มจำนวนของไวรัส[11,12,13] ด้วยเหตุผลดังกล่าวการทดสอบวัคซีนเอชไอวีในปัจจุบันจึงออกแบบเพื่อที่จะกระตุ้นทั้งภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และ neutralizing antibodies

CD8+ T cell มีบทบาทในการทำลายไวรัสโดยการทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อแตก และโดยการหลั่ง cyokines [เช่น γ-IFN หรือ chemokines (เช่น MIP-1α, RANTES)] ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีต่างๆเพื่อการตรวจวัดหน้าที่ของเซลล์ต่างๆเหล่านี้ได้อย่างมากมาย

Cytotoxic T lymphocyte (CTL) assay[1,2,14]

CTL มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ CTL ที่จำเพาะต่อไวรัส ส่วนใหญ่เป็น CD8+ T cell ซึ่งจดจำ (recognized) แอนติเจนโดย MHC class I แต่ในทางตรงข้าม CD4+ T cell จะจดจำแอนติเจนโดย MHC class II ความแตกต่างในการจดจำแอนติเจนดังกล่าวมีความสำคัญ เนื่องจากแอนติเจนที่ถูกสร้างภายในเซลล์จะถูกนำเสนอโดย MHC class I ส่วนแอนติเจนที่ถูกนำเสนอโดย MHC class II สามารถถูกจับกิน (take up) โดย antigen presenting cells (APC) และผ่านขบวนการ (process) และนำเสนอไปยัง CD4+ T cell

สำหรับวิธีที่นิยมใช้วัด CTL activity คือ chromium release assay

Chromium release assay เป็นวิธีใช้วัดความสามารถของ CD8+ T cell โดยการทำให้เซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งมีแอนติเจนที่จำเพาะของเชื้อเอชไอวีปรากฏอยู่ (expressing specific HIV antigens) แตก โดยมีขั้นตอนคร่าวๆ ดังนี้ คือ กระตุ้น PBMC ที่แยกได้ใหม่ๆ (freshly isolated PBMC) จากผู้ติดเชื้อเอชไอวีหรือผู้ได้รับวัคซีน ด้วยแอนติเจนของเชื้อเอชไอวี นาน 2 สัปดาห์ เพื่อให้ HIV-specific T cell เพิ่มจำนวน (expansion)เนื่องจากโดยปกติจำนวนของ HIV-specific CD8+ T cell มีน้อยเกินไปเมื่อใช้วิธีนี้ ถ้าใช้เซลล์โดยตรงเมื่อทดสอบนอกร่างกาย (ex vivo) จากนั้นนำ HIV-specific T cell ที่เพิ่มจำนวนแล้วมาอบกับ autologous target cell (ปกติใช้ B lym-phoblastoid cell lines ที่ได้จากการ transformation ของ autologous B cell โดยใช้ Epstein-Barr virus กระตุ้น) ซึ่งติดฉลาก (label) ด้วย radioisotope ^{51}Cr และติดเชื้อ vaccinia ซึ่ง express แอนติเจนของเชื้อเอชไอวีที่จะศึกษา HIV-specific T cell จะสามารถจำ (recognize) target cells และทำให้ target cell ดังกล่าวแตก มีผลให้สารรังสีที่ใช้ติดฉลาก คือ chromium ปรากฏอยู่ใน culture supernatant

นอกจากนี้เราวัด spontaneous lysis ใน replicate wells ที่มี radiolabeled targets แต่ขาด effector cells ส่วน maximum lysis วัดใน replicate wells ที่ใส่ detergent radioactivity ของ supernatants วัดโดยใช้ scintillation countingผลการทดสอบเป็นบวกต่อเมื่อ % HIV-specific lysis เกิน 15% สำหรับการคำนวณ % HIV-specific lysis สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

% HIV-specific lysis = (Experimental lysis - Spontaneous lysis)/(Maximum lysis - Spontaneous lysis) X 100

การทดสอบนี้ค่อนข้างยาก ต้องใช้ผู้มีความเชี่ยวชาญทางเทคนิคและใช้เวลานาน เนื่องจากต้องมีการกระตุ้นและเตรียม autologous target cells นอกจากนี้ต้องใช้ PBMC ซึ่งเตรียมได้ใหม่ๆ ไม่

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

สามารถใช้ cryopreserved PBMC ได้ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการทดสอบและตรวจหา CD8+ T cell โดยวิธีอื่นเพิ่มขึ้น

Interferon-gamma (IFN-γ) Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assays[1,2,14]

เป็นวิธีวัดความสามารถของ T cell ที่หลั่ง IFN-γ ในการตอบสนองต่อแอนติเจนที่จำเพาะ โดยใช้หลักการวิธี ELISA PBMCจากผู้ที่ต้องการทดสอบถูกเติมหลังจากเติม specific HIV peptides ลงในเพลท 96 หลุมซึ่งเป็น nitrocellulose-lined microtiter well plates และ coated ด้วยแอนติบอดีต่อ IFN-γ หลุมควบคุม [(control wells) คือหลุมที่มี PBMC และ media อย่างเดียวโดยไม่มี HIV peptides] จะทดสอบคู่กันไป ระหว่างอบค้างคืนที่ 37°C HIV-specific T cell ที่มีอยู่ใน PBMC จะถูกกระตุ้นโดย HIV peptides เพื่อหลั่ง IFN-γ ซึ่งจะเกิดรอบๆ producing cells เราสามารถสังเกตเห็นได้จากการเติม แอนติบอดีต่อ IFN-γ ตัวที่สองซึ่งถูก labeled ด้วย biotinแอนติบอดีต่อ IFN-γ ตัวที่สองจะจดจำ epitope ที่แตกต่างจาก แอนติบอดีต่อ IFN-γ ตัวแรกที่ถูก coated บนเพลท จึงเกิดเป็น sandwich ของแอนติบอดีต่อ IFN-γ ทั้งสอง แล้วจึงเติม streptavidin-enzyme conjugate Streptavidin จะจับกับ biotin ซึ่งถูก labeled กับ แอนติบอดีต่อ IFN-γ ตัวที่สองอย่างแน่น (high avidity) จึงเกิดเป็น biotin/streptavidin complex ที่จับกับ enzyme [โดยปกติ คือ horseradish peroxidase (HRP)] เมื่อเติม substrate จึงเกิดสีหรือ spot ตรงตำแหน่งหรือบริเวณที่มีการสร้าง biotin/streptavidin complexจำนวน spots จะเป็นตัวแทนของจำนวน T cell ใน PBMC ที่จำเพาะต่อแอนติเจน เราสามารถแยกการตอบสนองต่อเอชไอวีของ CD8+ T cell และ CD4+ T cell จากการทดสอบนี้โดยการแยก CD8+ T cell ก่อนทดสอบโดยการใช้ magnetic beads ที่ labeled ด้วย anti-CD8 antibodies อย่างไรก็ตามเราต้องทดสอบโดยการใช้ PBMC ที่นำเอา CD8+ T cell ออกควบคู่กับ PBMC ที่ไม่ได้นำเอา CD8+ T cell ออกด้วย ถ้าเราพบการตอบสนองใน PBMC ที่ไม่ได้นำเอา CD8+ T cell ออก แต่ไม่พบใน PBMC ที่นำเอา CD8+ T cell ออก แสดงว่าการตอบสนองนั้นเนื่องจาก CD8+ T cell ที่จำเพาะต่อเอชไอวี ถ้าพบการตอบสนองใน PBMC ที่นำเอา CD8+ T cell ออก แสดงว่าการตอบสนองนั้นเนื่องจาก CD4+ T cell นอกจากนี้ ELISPOT assay ยังสามารถใช้ทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่หลั่ง cytokines ชนิดอื่นได้เช่น IL-2 หรือ tumor necrosis factor alpha (TNF-α) ได้เช่นกัน

Intracellular cytokine staining (ICS) assays[1,2,14]

เป็นการทดสอบโดยการใช้วิธี flow cytometry เพื่อการหา T cell ซึ่งหลั่ง cytokines ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยแอนติเจน โดยนำ PBMC จากผู้ที่ต้องการทดสอบมากระตุ้นด้วย HIV peptides ซึ่งต้องมีแอนติบอดีต่อ CD28 และ CD49d มาเป็น costimulator antibodies สำหรับ negative control จะไม่เติม HIV peptide และ positive control จะถูกกระตุ้นด้วย superantigens เช่น staphylococcal enterotoxin B (SEB) ทั้ง negative control และ positive control ต้องทดสอบคู่กันไปกับตัวอย่างส่งตรวจ สำหรับการกระตุ้น PBMC มักนิยมใช้ brefeldin A หรือ monesin (ซึ่งจะยับยั้งการขนส่งโปรตีนผ่าน golgi bodies) อบนาน 6 ชั่วโมงที่ 37°C ดังนั้น cytokines ชนิดต่างๆ ที่ถูกสร้างขึ้นโดยการกระตุ้น T cell ที่จำเพาะต่อเอชไอวีด้วย HIV peptides จะสะสมอยู่ภายในเซลล์และไม่หลั่งออกมานอกเซลล์ เราสามารถตรวจสอบเซลล์เหล่านั้นได้โดยการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ cytokines ชนิดที่เราต้องการทดสอบและนำมา labeled ด้วยสารเรืองแสง fluorescein จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีต่อเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เช่น CD3 และ CD8 antibodies ที่ labeled ด้วยสารเรืองแสง เมื่อต้องการทดสอบหา CD8+ T cell เซลล์จะถูกวิเคราะห์และนับโดยใช้เครื่อง flow cytometer

สำหรับการทดสอบทั้งสองวิธี คือ ICS และ ELISPOT เป็นการทดสอบหน้าที่ของ effector cell โดยทั่วไป ELISPOT ต้องการใช้เซลล์น้อยกว่า และความเชี่ยวชาญทางเทคนิคที่น้อยกว่าวิธี ICS อย่างไรก็ตามข้อดีของทั้งสองวิธีซึ่งแตกต่างจาก CTL chromium release assay คือ สามารถใช้ cryopreserved cell ได้

MHC Tetramer Binding Assays[1,2,14]

ขณะที่การตรวจวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ที่กล่าวมาแล้ว เป็นการทดสอบหน้าที่ของ effector cell แต่ tetramers เป็นการวัดจำนวน (absolute number) ของเซลล์ที่จดจำ epitope ที่จำเพาะ โดยไม่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ของเซลล์เหล่านี้เลย เซลล์ที่ติดเชื้อเอชไอวีจะย่อย HIV protein ให้เป็น peptideสายสั้นๆ (peptidic fragments, epitopes) ซึ่งจะจับกับ MHC class I molecules และ ปรากฏอยู่ที่ผิวของเซลล์ T cell สามารถ

จดจำ target cells เหล่านี้โดยผ่าน การจับกันของ T cell receptors (TCR) กับ MHC/HIV epitope complexes MHC tetramers ประกอบด้วย MHC class I molecules 4 อัน จับกับ HIV peptide ที่ต้องการศึกษา ซึ่งต่อกันโดย streptavidin ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง fluorescein reagents ต่างๆ เหล่านี้จะจับกับ TCR ของ T cell ทั้งหมดซึ่งจดจำ MHC/peptide complex อย่างจำเพาะ การทดสอบโดยวิธีนี้เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบ T cell ที่จำเพาะกับเชื้อเอชไอวีที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ

ข้อจำกัดของวิธีนี้มีหลายประการ เช่น จะต้องทราบ HIV peptide ที่แน่นอนและ restricting MHC class I molecule เพื่อใช้สร้าง tetramers เนื่องจาก HIV epitopes ที่มี restricting MHC molecules ซึ่งแตกต่างกันยังไม่ทราบ ดังนั้นจึงเป็นปัญหาที่สำคัญ ยิ่งไปกว่านั้น MHC class I tetramers ยังมีจำกัดเนื่องจากปัจจุบันเรายังไม่ได้ศึกษา epitopes ที่ restricted ต่อ MHC class I อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้วิธีนี้เป็นวิธีวัดการจับกัน (binding) ของ T cell receptors (TCR) กับ MHC/HIV epitope complexes แต่ไม่ใช่วิธีทดสอบหน้าที่ของ CD8+ T cell โดยตรง

Lymphoproliferative Assays (LPA)[1,2,14]

เป็นวิธีการทดสอบเพื่อศึกษาความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ โดยใช้หลักการที่ว่า lymphocytes เมื่อถูกกระตุ้นด้วยไมโตเจน (mitogens) หรือ แอนติเจนที่ร่างกายเคยสัมผัสมาก่อน (sensitizing antigens) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน (proliferate) เป็น lymphoblasts ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจาก lymphocytes เป็น lymphoblasts นั้น ต้องมีการสร้าง DNA เพิ่มขึ้น สามารถตรวจดูได้จากการที่ใส่สาร thymidine ซึ่งเป็นต้นกำเนิด (precursor) ของ DNA thymidine ที่ติดฉลากไว้ด้วยสารกัมมันตรังสี [ส่วนใหญ่ใช้ tritiated thymidine (^{3}H thymidine)] จะถูกนำไปใช้ในการสร้าง DNA ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนของโครโมโซม ทำให้ทราบปริมาณเซลล์ที่แบ่งตัวใหม่จากปริมาณสารรังสี ^{3}H thymidine ที่มีอยู่ภายในเซลล์เหล่านั้น โดยการวัดปริมาณรังสีเบต้า (β radiation) โดยทั่วไป LPA ไม่แสดง proliferation ของ CD8+T cell เพราะว่าแอนติเจนที่เป็นโปรตีนเมื่อผ่านขบวนการ endocytosis โดย macrophages จะถูก processed ผ่าน ขบวนการ class II-antigen processing pathway ซึ่ง peptides เหล่านั้นจะถูกนำเสนอบน MHC class II molecules ไปยัง CD4+ T cell

การจับ (binding) ของ T cell กับแอนติเจน โดยใช้ T cell receptor (TCR) จะกระตุ้นการ activation และ proliferation การตอบสนองนี้จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific) และต้องการ antigen presenting cell (APC) ที่เหมาะสม เช่น macrophages ตัวอย่างของการทดสอบนี้ เช่น PBMC จากคนที่ได้รับ vaccine tetanus ถูก culture ร่วมกับ tetanus Ag จำนวน cell ที่ specific กับ tetanus จะเริ่มแบ่งตัวและหลั่ง cytokines เพราะว่าจำนวนเซลล์ซึ่ง proliferate น้อยเกินไปที่จะวัดโดยการวัดจำนวนเซลล์ การ proliferation ตามปกติจะถูกวัดโดยวัดการ incorporation ของ ^{3}H-thymidine (thymidine ถูก incorporate เข้าไปใน DNA ของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัว) จำนวนของ ^{3}H-thymidine ในการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแอนติเจนนำมาเปรียบเทียบกับ จำนวนของ ^{3}H-thymidine ในหลุมควบคุม (หลุมไม่ได้เติมแอนติเจน) เพื่อหา stimulation index (SI) โดยทั่วไป SI > 3 ถือว่ามีการตอบสนองต่อแอนติเจนนอกจากนี้ การตอบสนองต่อแอนติเจนสามารถวัดได้จากการผลิต specific cytokines เช่น IL-2, IL-4 และ IFN-γ ด้วยเช่นกัน

HIV-specific proliferative responses สามารถพบได้ในคนไข้ acute HIV infection แต่การตอบสนองจะหายไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลจากการที่ไวรัสแบ่งตัวและการที่ CD4+ T cell ที่จำเพาะต่อเชื้อเอชไอวีลดลง อย่างไรก็ตามการตอบสนองต่อแอนติเจน จาก จุลชีพฉวยโอกาส เช่น candida, *pneumocystic carinii* pneumonia (PCP), mycobacterium avium complex (MAC), cytomegalovirus (CMV) สามารถพบได้ แต่การตอบสนองต่อแอนติเจนเหล่านี้จะหายไปตามการลุกลามของโรค และการตอบสนองนี้จะสะสมในคนไข้ทีละเล็กทีละน้อยหลังจากได้รับยาต้านไวรัส อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองต่อเชื้อโรคภายนอกร่างกาย (in vitro) และ ความเสี่ยงของโรคภายในร่างกาย (in vivo) แต่สำหรับการตอบสนองต่อไมโตเจน เช่น phytohaemagglutination (PHA) สามารถพบได้ในผู้ติดเชื้อเอชไอวี ตั้งแต่ระยะไม่มีอาการจนถึงระยะเอดส์

สำหรับการศึกษาเบื้องต้นในคนไทยนั้น ทิพย์วรรณฯ และคณะ[15] ได้ศึกษาความสามารถของผู้ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 ว่ามี lymphoproliferative responses ต่อเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 ทั้งสับทัยป์บีและ CRF01_AE (สับทัยป์อี) รวมทั้ง recall antigens เป็นเช่นไร การศึกษาดังกล่าวพบว่า คนไทยที่ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1

D:\Zoom\Zoom\Journal\57(1)\Blood.p65

จะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อ recall antigens คือ PPD และ Tetanus ไม่ต่างกับคนปกติ ยกเว้น candida ซึ่งปฏิกิริยาตอบสนองค่อนข้างต่ำ และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อ Candida นั้นจะลดลงตามจำนวน CD4+ T cell ที่ลดลงด้วย ส่วนปฏิกิริยาตอบสนองต่อเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 มีน้อยมาก lymphoproliferative responses ในคนที่ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 ที่มีรายงานในประเทศสหรัฐอเมริกาก็เช่นเดียวกับผู้ที่ติดเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 ในประเทศไทย แม้ว่าเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยเป็น CRF01-AE (สับทัยป์อี) ซึ่งต่างจากสหรัฐอเมริกาซึ่งเป็น สับทัยป์บี ก็ตาม

นอกจากนี้การศึกษาในคนไทยที่ไม่ติดเชื้อเอชไอวี และได้รับวัคซีนเอชไอวีทัยป์ 1 สายพันธุ์บี ในส่วนของเปลือกนอก (envelope gp120 SF2) ซึ่งเป็นการทดสอบวัคซีนในระยะ I/II นั้น พบว่ามี cross-clade lymphoproliferative responses ต่อ CRF01-AE (สับทัยป์อี) เกิดขึ้นได้ แสดงว่าคือ ผู้ได้รับวัคซีนเอชไอวีทัยป์ 1 สายพันธุ์บี จะสามารถสร้างปฏิกิริยาตอบสนอง ต่อเชื้อเอชไอวีทัยป์ 1 CRF01_AE (สับทัยป์อี) ได้[16]

สรุป

วิธีการวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อเชื้อเอชไอวีนั้นสามารถตรวจวัดได้หลายวิธี ทั้งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ และ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ อย่างไรก็ตามความสำคัญของวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยและการนำไปใช้เป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากการทดสอบบางชนิดไม่ใช่เป็นการทดสอบหน้าที่ของเซลล์โดยตรง และมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกใช้อย่างถูกต้องและเหมาะสม อย่างไรก็ตามวิธีการทดสอบดังกล่าวข้างต้นมีประโยชน์อย่างยิ่งในการให้ข้อมูลทางการศึกษาวิจัยและการรักษา เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพวัคซีนและยาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. http://hivinsite.ucsf.edu/InSite?page=kb-02-02-04
2. http://scharp.org/public/redbook/assays.htm
3. Mckeating J. Quantitative assays for virus neutralization. In : Jonathan Karn eds. HIV volume 1 a practical approach Virology and Immunology. New York: Oxford University Press Inc., 1995:117-27.
4. Chuenchitra T, Wasi C, Louisirirojchanakul S, Nitayaphan S, Sutthent R, Cox JH, et al. A longitudinal study of humoral immune responses in HIV-1 subtype CRF01-AE (E) infected Thai patients with different rates of disease progression. AIDS Res Hum Retroviruses 2003;19:293-305.
5. Goath F, Broliden K. HIV-1 specific cytotoxic T lymphocyte and ADCC responses. In : Jonathan Karn eds. HIV volume 1 a practical approach Virology and Immunology. New York:Oxford University Press Inc., 1995:253-71.
6. Thippawan Chuenchitra, Chantapong Wasi, Victoria R. Polonis ,Suda Louisirirojchanakul, Sorachai Nitayaphan, Mark S. de Souza[1], Ruengpung Sutthent, Arthur E. Brown, Deborah L. Birx and Josephine S. Cox. HIV-1 Cross-Clade Serum Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) Activity in HIV-1 Subtype CRF01_AE (E)-Infected Thai Individuals with Different Rates of Disease Progression. 13th Asia Pacific Military Medicine Conference. Bangkok, Thailand, 11-16 May 2003.
7. Burton DR, Moore JP. Why do we not have an HIV vaccine and how can we make one?. Nat Med. 1998;4(5 Suppl):495-8.
8. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. J Virol. 1994;68(7):4650-5.
9. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. J Exp Med. 1999;189(6):991-8.
10. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. Science. 1999;283(5403): 857-60.
11. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. J Virol. 1994;68(12):8056-63.
12. Ostrowski MA, Justement SJ, Ehler L, Mizell SB, Lui S, Mican J, et al. The role of CD4+ T cell help and CD40 ligand in the in vitro expansion of HIV-1-specific memory cytotoxic CD8+ T cell responses. J Immunol. 2000;165(11):6133-41.
13. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. Science. 2003;300(5617) :339-42.
14. http://hivandhepatitis.com/hiv_and_aids/test/labIprint.html
15. Thippawan Supapongse, C. Chuenchitra, J Gaywee, S Sangkasuwan, Mason C, S Nitayaphan, Birx D. Lymphoproliferative Responses to Microbial and HIV-1 Specific Antigens in HIV Positive Thai Individuals. X International Conference on AIDS, Yokohama, 7-12 August, 1994. [Abstract PA 0266].
16. Chuenchitra T, Ratto-Kim S, Desouza M, Rungruengthanakit K, Nitayaphan S, Khamboonruang C, Chuenchitra C, Michael R, Sinagil F, Duliege A. HIV-1 cross-clade lymphoproliferative responses following immunization with recombinant GP120 SF2. XII World AIDS Conference, Geneva, Switzerland. 27 June- 3 July 1998 [Abstract 497/21201].