

Človeški T-celični limfotropni virus tipa I (HTLV-I) Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)

Jurij Bednařik*, Katarina Rednak**, Mario Poljak***, Katja Seme****

Ključne besede
HTLV-I-mikrobiologija
HTLV-I infekcije-mikrobiologija
levkemija T-celična
parapareza tropska spastična

Key words
HTLV-I-microbiology
HTLV-I infections-microbiology
leukemia, T-cell
paraparesis tropical spastic

Izvleček. Človeški T-celični limfotropni virus tipa I (HTLV-I) uvrščamo v družino *Retroviridae*, poddružino *Oncovirinae*. Virion virusa HTLV-I sestavlja virusna sredica, ki jo obdaja virusna ovojnica. Virusna sredica je sestavljena iz vijahnega ribonukleotida in stožcu podobne beljakovine. Ovojnica je zgrajena iz lipidnega dvosloja in dveh glikoproteinov – gp21 in gp46. Genom virusa HTLV-I je pozitivno usmerjena enovijačna molekula RNA. Zgrajen je iz strukturnih (*gag*, *pol* in *env*) in regulatornih (*tax*, *rex*) genov. Provirusna DNA ima na obeh koncih posebna odseka, imenovana LTR. Virus se prenaša s spolnimi odnosi, z okuženo krvjo ter z matere na otroka preko posteljice oziroma z dojenjem. V nekaterih državah na svetu testirajo kri krvodajalcev na prisotnost protiteles proti virusu HTLV-I. Na svetu je okuženih med 10 in 20 milijonov ljudi. Endemska področja so Japonska in še nekateri predeli Azije (Kitajska, Koreja, Tajvan), Karibski otoki ter osrednja Afrika. V Evropi in ZDA je prekuženost visoka predvsem v skupinah z večjim tveganjem okužbe (homoseksualci, intravenski uživalci drog, prostitutke). Velika večina okuženih so prenašalci virusa brez znakov bolezni. Majhen delež okuženih lahko zboli za posebno obliko T-celične levkemije ali mielopatije.

Abstract. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) belongs to the family *Retroviridae* and subfamily *Oncovirinae*. HTLV-I has an outer envelope consisting of a lipid bilayer and two types of glycoproteins – gp21 and gp46. HTLV-I viral genome is a positive single stranded molecule of RNA. It contains structural (*gag*, *pol* and *env*) and regulatory (*tax*, *rex*) genes. Special segments, called LTR (long terminal repeat), are located at both ends of proviral DNA. The most important routes of transmission of HTLV-I are sexual intercourse, transfusion of infected blood and mother-to-child transmission via placenta and breastfeeding. There are between 10 and 20 million HTLV-I infected people in the world. HTLV-I is endemic in Japan and some Asian countries (China, Korea, Taiwan), Caribbean islands and central Africa. High risk groups (homosexuals, intravenous drug users, prostitutes) are the main source of infection in Europe and the USA. HTLV-I infected individuals are mostly asymptomatic virus carriers, and only a small proportion of them can develop a special form of T-cell leukemia or myelopathy.

Uvrstitev

Človeški T-celični limfotropni virus tipa I oz. HTLV-I (iz angl. *human T-cell lymphotropic virus type I*) uvrščamo v družino *Retroviridae*, poddružino *Oncovirinae* (tabela 1).

Virus HTLV-I povzroča posebno vrsto T-celične levkemije pri odraslih ter s HTLV-I povezano mielopatijo (1). Virus HTLV-II povzroča neagresivno obliko dlakastocelične lev-

*Jurij Bednařik, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

**Katarina Rednak, štud. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

***Doc. dr. Mario Poljak, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

****Asist. dr. Katja Seme, dr. med., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Zaloška 4, 1000 Ljubljana.

kemije (2). Virus HTLV-V je bil osamljen pri bolniku s kožno obliko T-celičnega limfoma oziroma levkemije (3). HIV-1 (iz angl. *human immunodeficiency virus*) in HIV-2 povzročata sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti oz. aids (iz angl. *acquired immunodeficiency syndrome*) (4). Spuma virusi povzročajo penasto degeneracijo okuženih celic celične kulture, vendar jih zaenkrat ne povezujemo z nobeno znano boleznijo pri človeku (5).

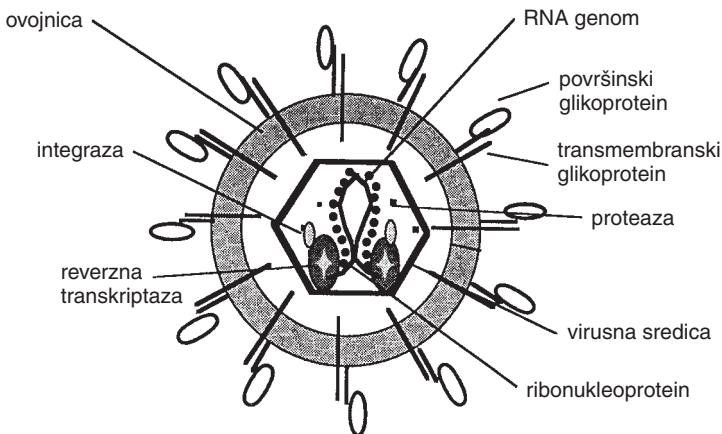
Tabela 1. Razdelitev družine *Retroviridae*. HTLV – človeški T-celični limfotropni virus tipa I, HIV – virus človeške imunske pomanjkljivosti.

Poddružina	Virus
Oncovirinae	HTLV-I HTLV-II HTLV-V
Lentivirinae	HIV-1 HIV-2
Spumavirinae	virus, ki povzroča penasto degeneracijo celic

Zgradba virusa

Virion

Virion oziroma zreli virusni delec virusa HTLV-I je okroglaste oblike, v premeru meri približno 90 nm. Virusno sredico, ki je sestavljena iz vijačnega ribonukleoproteina in stožcu podobne beljakovine, obdaja ovojnica (6, 7). Zgradba viriona virusa HTLV-I je prikazana na sliki 1.



Slika 1. Virion človeškega T-celičnega limfotropnega virusa tipa I.

Ovojnica

Virusna ovojnica je zgrajena iz lipidnega dvosloja in dveh glikoproteinov – gp21 in gp46. Glikoproteina sta zapisana v genu *env* in nastaneta s proteolitično cepitvijo glikoproteina gp61–68.

Gp21 je površinski glikoprotein, ki je povezan z glikoproteinom gp46. Z glikoproteinom gp21 se virus pripenja na celične receptorje.

Gp46 je transmembranski glikoprotein, ki prebada ovojnico virusa. Zgrajen je iz treh delov: zunanjega, membranskega in notranjega. Zunanji del je povezan s površinskim glikoproteinom gp21, na aminokoncu ima hidrofobno verigo, odgovorno za zlitje s celično membrano. Membranski del je zgrajen iz 20–30 hidrofobnih aminokislin. Notranji del je kratek in leži v citoplazmi (8).

Virusna sredica

Virusno sredico sestavljajo trije polipeptidi: p15, p19 in p24. Nastanejo s proteolitično cepitvijo polipeptidnega prekursorja p55. Polipeptid p15 je tesno povezan z RNA in sodeluje pri gubanju in povezovanju virusnega genoma (9). Polipeptid p19 je membranska beljakovina. Leži tik pod virusno ovojnico in jo utrjuje (10). Polipeptid p24 je fosforiliran, iz njega je zgrajena virusna sredica. Sestavljen je iz hidrofobnih aminokislin (8).

Encimi

Najpomembnejše encimske beljakovine v virusni sredici so reverzna transkriptaza, integraza in proteaza (11). Reverzna transkriptaza prepisuje virusno RNA v DNA. Integraza z dejavnostjo endonukleaze in ligaze omogoča vgradnjo prepisane DNA v celični genom. Proteaza cepi prekursorske poliproteine v virusne strukturne in encimske beljakovine.

Zgradba genoma

Genom virusa HTLV-I je približno 8000 nukleotidov dolga, pozitivno usmerjena enovijačna molekula RNA. Zgrajen je podobno kot pri ostalih retrovirusih, le da sta na 3'-koncu še dva gena, ki ju pri drugih retrovirusih ni (12) (slika 2).

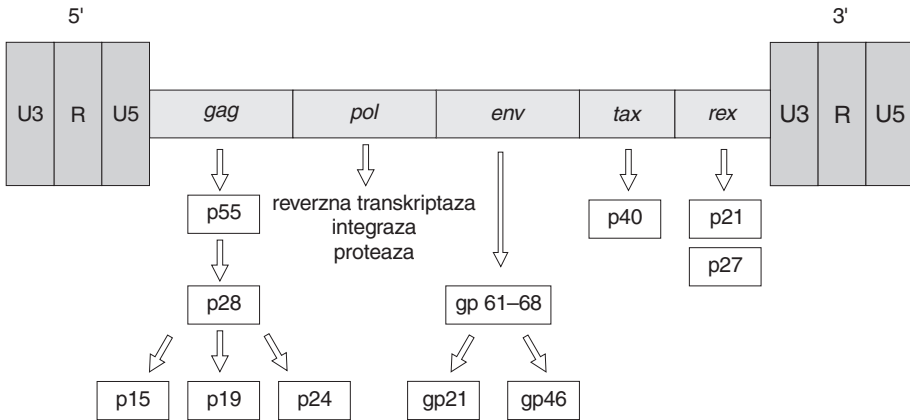
Genom virusa HTLV-I je sestavljen iz strukturnih in regulatornih genov.

Strukturni geni so (7):

- *gag* (iz angl. *group specific antigens*) z zapisom za beljakovine virusne sredice (p15, p19, p24);
- *pol* (iz angl. *polymerase*) z zapisom za encime reverzno transkriptazo, integrazo in proteazo;
- *env* (iz angl. *envelope*) z zapisom za glikoproteine virusne ovojnice (gp21 in gp46).

Regulatorna gena sta:

- *tax* (iz angl. *trans-activator derived from the X region*) zapisuje beljakovino molekulske mase 40 kDa, ki je močan aktivator prepisovanja virusnih genov in



Slika 2. Genom človeškega T-celičnega limfotropnega virusa tipa I in njegovi produkti. U3, R, U5 – gradniki področja LTR; p28, p55 – prekursorjska polipeptida; p15, p19, p24 – gradniki virusne sredice; gp61-68 – prekursorjski glikoprotein; gp21 – transmembranski glikoprotein; gp46 – ovojnični glikoprotein; p21, p27, p40 – regulatorne beljakovine.

– *rex* (iz angl. *regulator from the X region*) zapisuje beljakovini p21 in p27. Beljakovini se nahajata v jedru in jedrcu okuženih celic in sta fosforilirani. Vloga p21 danes še ni zadovoljivo pojasnjena. Beljakovina p27 uravnava prehod virusnih mRNA iz jedra v citoplazmo. S tem uravnava izražanje virusnih genov (13).

Provirusna DNA ima na obeh koncih posebna odseka, imenovana LTR (iz angl. *long terminal repeats*). Odseka sta dolga 755 nukleotidov in sestavljena iz treh področij: U3 (iz angl. *unique*), U5 in R (iz angl. *redundant*) (12).

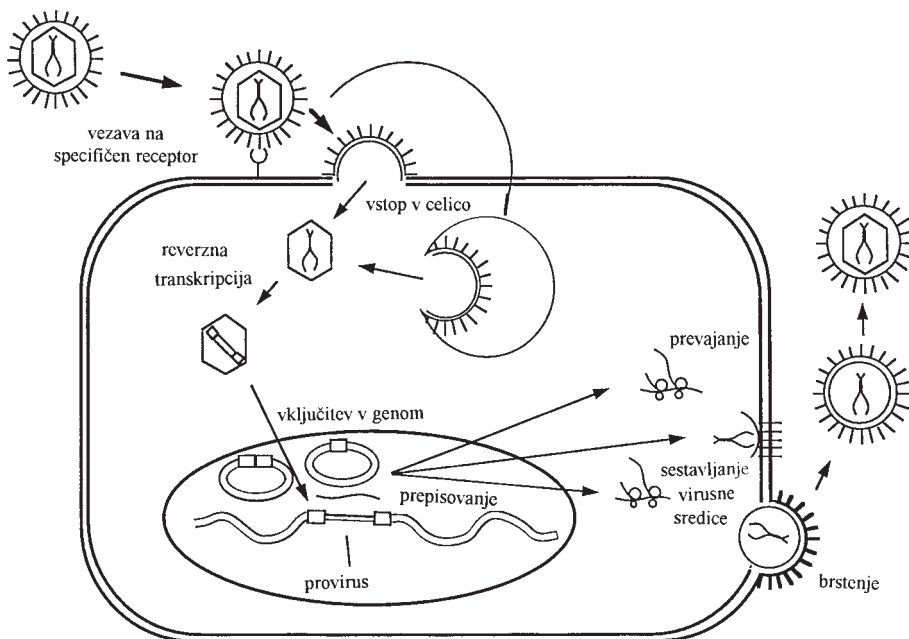
Regiji U3 in U5 sta pomembni za vgradnjo provirusa v celični genom. Poleg tega so v regiji U3 promotorji, ki uravnava prepisovanje virusnih genov. R in U5 vplivata tudi na poprepisovalno kontrolo izražanja virusnih genov.

Virusa HTLV-I in HTLV-II imata enakih približno 65 % nukleotidnih zaporedij. Homogenost je najmanjša v LTR in neprepisujočih regijah ter največja v *tax* in *rex* genih (7).

Razmnoževanje virusa

Razmnoževalni krog virusa HTLV-I se začne s pritrjevanjem viriona na površino občutljivih celic, limfocitov T (7, 14, 15). Pri tem se virusni ligandi gp46 vežejo s specifičnimi glikoproteinskimi receptorji na celični citoplazemski membrani. Pritrjevanju sledi vstopanje virusa v celico. Vstopanje je zapleten proces. Sledi zlitje virusne ovojnice in celične membrane. Virusna sredica vstopi v notranjost celice. Potem ko je virusna nukleokapsida prodrla v citoplazmo, reverzna transkriptaza prepíše virusno RNA v dvojnovijačno DNA. Dvojnovijačna DNA potuje v jedro, kjer se s pomočjo integraze vgradi v celični genom na naključno izbranih mestih. Občutljiva celica je tako trajno okužena. Vgrajeni provirus lahko nekaj časa ostane v celici v latentni obliki, potem pa se v dolo-

čenem trenutku aktivira in začne prepisovati. Pri tem imajo pomembno vlogo različni celični prepisovalni dejavniki, kot npr. NF- κ B (iz angl. *nuclear factor kappa B*), ki se aktivira v imunsko spodbujenih limfocitih T. NF- κ B se veže na regijo U3 provirusnega odseka LTR in sproži izražanje virusnih genov. Prepisovanje provirusnih genov poteka pod vplivom celične polimeraze RNA. Prepisane nerazcepljene mRNA predstavljajo nove molekule virusne nukleinske kisline. Prepisane bolj ali manj nerazcepljene mRNA potujejo iz jedra v citoplazmo, kjer se prevedejo v virusne strukturne in regulatorne beljakovine. Med prvimi se sintetizirata obe regulatorni beljakovini Tax in Rex, ki se vrtneta v celično jedro. Beljakovine virusne ovojnice (prekurzorski gp61–68) se sintetizirajo na ribosomih na površini zrnatega endoplazemskega retikuluma in se glikozilirajo v njegovi notranjosti in v Golgijevem aparatu. Virusne strukturne beljakovine in nukleinske kisline se povežejo in oblikujejo v nukleokapside. Sestavljanju in zorenju virusa sledi izstopanje iz celice. Virus HTLV-I zapusti celico z brstenjem s celične površine. Virusno spremenjena celična membrana se izboči in povleče za seboj virusno sredico. Naredi se brstič, ki postopoma obda virusno sredico. Končno se brstič odščipne in kot popolni virus sprosti v okolje celice. Zorenje virusnih delcev se nadaljuje še po izstopu iz celice. Virusna proteaza razcepi poliproteine v kapsidne, membranske in encimske beljakovine, sredica dobi značilno stožčasto obliko. Zreli virusni delci postanejo kužni (7, 14, 15). Razmnoževanje virusa je prikazano na sliki 3.



Slika 3. Razmnoževanje človeškega T-celičnega limfotropnega virusa tipa I.

Patogeneza

Po vstopu v telo se virioni HTLV-I vežejo na receptorje na površini limfocitov T in vdirajo v celice. Zapis za receptor na celični površini je zapisan na kromosomu 17 (16).

Okužba celic celične kulture z virusom HTLV-I je v primerjavi z drugimi retrovirusi počasnejša in manj učinkovita (7). Virus HTLV-I lahko okuži tudi druge celice (limfocite B, nezrele celice kostnega mozga, živčne celice), ne more pa jih transformirati (17).

Virus HTLV-I spremeni limfocite T tako, da se ti začnejo nepretrgoma deliti brez prisotnosti zunanjih ravnih dejavnikov. Ta pojav imenujemo transformacija in ga moramo ločiti od onkogeneze (18). Tako spremenjeni limfociti T začnejo izdelovati več različnih limfokinov: IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9 ter še mnoge druge (19). Na površini okuženih limfocitov T se spremeni sestava površinskih označevalcev: poveča se število receptorjev za IL-2, pojavi se receptor za transferin, spremeni se sestava človeških limfocitnih antigenov (HLA, iz angl. *human lymphocyte antigens*) antigenov, na površini se poveča število adhezijskih molekul. Tako spremenjeni limfociti T pa še vedno ohranijo svoje prvotne lastnosti.

Molekularni mehanizmi, s katerimi virus HTLV-I transformira limfocite T, danes še niso popolnoma znani. Ve se, da sta pri tem pomembna regulatorna gena *tax* in *rex* (20). Beljakovina Tax se veže na neaktivni del podenote beljakovine NF- κ B, ki igra osrednjo vlogo pri nadzoru celičnega prepisovanja in imunske aktivacije limfocitov. Nastali kompleksi tax–NF- κ B se vežejo na določene promotorje človeškega genoma in sprožijo prepisovanje genov, kjer so zapisi za že omenjene limfokine (21).

Iz tako transformiranih celic se lahko razvije maligni klon. Zakaj in kdaj se to zgodi, se danes še ne ve. Vemo le to, da se v jedrih okuženih limfocitov T sčasoma pojavijo kromosomske nepravilnosti. Takrat ima okuženi že T-celično levkemijo (22).

Imunski odgovor na okužbo

Večina okuženih z virusom HTLV-I se odzove z nastankom protiteles, usmerjenih proti različnim antigenom, najpogosteje proti produktom genov *gag*, *env* in *tax* (7). Kot pri vseh retrovirusih so tudi pri virusu HTLV-I beljakovine Gag najbolj imunogene in so odgovorne za nastanek prvih protiteles. V kratkem obdobju po okužbi se v serumu okuženih pojavijo protitelesa proti strukturnim delom virusne sredice: najprej proti p24, nato pa še proti p15 in p19. Kasneje se pojavijo protitelesa proti glikoproteinom ovojnice, najprej proti gp21, nato še proti gp46 in gp61–68. Šele nekaj mesecev po okužbi se pojavijo protitelesa proti beljakovini Tax. Domnevajo, da se pri razpadu okuženega limfocita T beljakovina Tax sprosti iz jedra in tako pride v stik z imunskim sistemom. Potek nastajanja protiteles so raziskovali na bolnikih, ki so se okužili s transfuzijo krvi (23).

Serološki profil se med posamezniki močno razlikuje. Največkrat se telo odzove z nastankom več vrst protiteles, pri nekaterih pa lahko nastane samo ena vrsta protiteles. Opisani so tudi posamezni primeri T-celične levkemije, povzročene z virusom HTLV-I, kjer v serumu bolnikov niso našli protiteles proti virusu HTLV-I (24).

Epidemiologija

Prva okužba z virusom HTLV-I je bila opisana leta 1980 (25), kasneje so prihajala poročila o okužbah s celega sveta (7). Tako je danes na svetu okuženih med 10 in 20 milijonov ljudi (26).

Pomembno endemsko področje je Japonska. Ocenjujejo, da je na Japonskem okuženih več kot milijon ljudi. Prekuženost se v posameznih delih države razlikuje, največja je v jugozahodnem delu, vendar so tudi v tem delu Japonske prisotne velike razlike v pogostnosti okužbe, najbrž zaradi omejenega prenosa virusa HTLV-I med socialno izoliranimi populacijami (27, 28).

Med endemska področja spadajo še nekateri predeli Azije (Kitajska, Koreja, Tajvan), Karibski otoki ter osrednja Afrika (29). V literaturi je objavljenih veliko raziskav, pri katerih so ugotavljali razširjenost okužbe z virusom HTLV-I v ZDA in Evropi. Raziskave so bile narejene na zelo različnih skupinah ljudi: splošni populaciji, krvodajalcih, nosečnicah in intravenskih uživalcih drog. V raziskavah izpred nekaj let so uporabljali starejše presejalne teste, ki niso bili popolnoma specifični za virus HTLV-I. Danes se uporablja teste, ki so že zelo specifični (30).

V večini raziskav razširjenosti okužbe z virusom HTLV v ZDA in Evropi ugotavljajo, da je prekuženost visoka predvsem v skupinah z večjim tveganjem okužbe (homoseksualci, intravenski uživalci drog, prostitutke) in da je vsako leto višja. Pripadniki omenjenih skupin so okuženi predvsem z virusom HTLV-II. Za omenjene raziskave je značilno tudi, da so okuženi predvsem priseljenci iz endemskih področij (7).

Tabela 2. Prekuženost krvodajalcev s človeškim T-celičnim limfotropnim virusom tipa I.

Država	Prekuženost krvodajalcev (%)
Japonska	8–10
Karibski otoki	4,2–2,4
Tajvan	1
Kanada	0,001
ZDA	0,002
Francija	0,011
Portugalska	0,022
Rusija	0,042
Italija	0,0065
Velika Britanija	0,00036
Švedska	0,002
Nizozemska	0,002
Španija	0,004

V letu 1997 smo na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani opravili raziskavo razširjenosti okužbe z virusom HTLV-I v Sloveniji (31). Iz-

brali smo tri skupine preiskovancev: eno z majhno možnostjo okužbe (10.369 nosečnic) ter dve z večjo možnostjo okužbe (219 intravenskih uživalcev drog in 869 oseb, ki so obiskale ambulante za spolno prenosljive bolezni).

Od skupno 11.457 serumskih vzorcev, vključenih v raziskavo, je bil le eden (0,87 na 10.000) pozitiven na protitelesa proti virusu HTLV-I. Po podatkih iz literature je to prvi dokazani primer okužbe z virusom HTLV-I v Sloveniji. Na podlagi dobljenega rezultata domnevamo, da v Sloveniji z virusom HTLV-I ni okuženih več kot 2,3 na 10.000 ljudi (95 % zgornji interval zaupanja $IZ \leq 0,00023$). Delež okuženih smo ocenili glede na normalno porazdelitev.

Zaradi možnosti prenosa virusa HTLV-I s transfuzijo krvi so se nekatere države že odločile za presejalno testiranje krvi krvodajalcev. Tako testirajo kri krvodajalcev v ZDA, Kanadi, Franciji, na Japonskem, Nizozemskem in Danskem.

Uvedba presejalnega testiranja krvi krvodajalcev na prisotnost določenih mikroorganizmov je pomembna in predvsem politična odločitev, povezana z ogromnimi stroški. Glede na nizko razširjenost okužbe z virusom HTLV-I v Sloveniji, ugotovljeno v naši raziskavi (31), ter majhno verjetnost, da okuženi zbolijo za T-celično levkemijo ali mielopatijo, se v naši državi za presejalno testiranje krvi krvodajalcev na prisotnost protiteles proti virusu HTLV-I v bližnji prihodnosti najverjetneje ne bomo odločili.

Način okužbe

Virus HTLV-I se prenaša na tri načine:

- prenos s krvjo in krvnimi pripravki, ki vsebujejo okužene limfocite T (37). Možnost okužbe s transfuzijo krvi je približno 12 % (38). V to skupino prištevamo tudi prenos okužbe z okuženimi iglami pri intravenskih uživalcih drog;
- prenos z matere na plod oziroma na novorojenca (32) – pri prvem načinu gre za prenos okuženih limfocitov T preko posteljice, pri drugem pa za prenos okuženih limfocitov T z mlekom. V številnih raziskavah so primerjali oba načina prenosa in ugotovili, da je pomembnejši prenos z mlekom (33, 34);
- prenos z nezaščitenim spolnim odnosom preko okuženih limfocitov T, ki se nahajajo v semenski tekočini (35). Na ta način je možen prenos predvsem z moškega na žensko ter med moškimi, manj pa z ženske na moškega (36).

Laboratorijska diagnostika okužbe

Sodobna diagnostika okužbe z virusom HTLV-I največkrat temelji na ugotavljanju specifičnih protiteles proti virusu HTLV-I v serumskih vzorcih.

Presejalni testi

Vzorci serumov se najprej testira s presejalnimi testi. Na voljo so encimsko-immunski testi, imunofluorescenčni testi in aglutinacijski testi (39). Dobra lastnost teh testov, kot tudi drugih presejalnih testov, je nizka cena in visoka občutljivost, slabost pa je, sorazmer-

no majhna specifičnost (39). Z drugimi besedami – lažnonegativnih rezultatov je malo, medtem ko je lažnopolitivnih rezultatov več.

Encimsko-immunski test

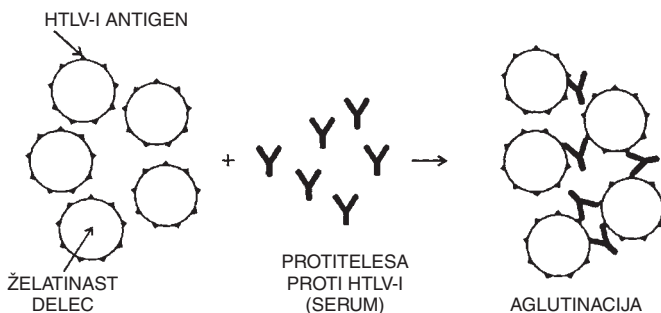
Pri tem testu bolnikov serum najprej naneseemo v vdolbinico mikrotitracijske ploščice, ki ima na stenah vezane virusne beljakovine (antigene). Po kratkotrajni inkubaciji in spiranju ostanejo na steni vdolbinice (v primeru prisotnosti protiteles proti virusu HTLV-I v preiskovanem serumu) kompleksi antigena in protiteles, na katere v naslednji stopnji reakcije vežemo z encimom (največkrat uporabljamo hrenovo peroksidazo ali alkalno fosfatazo) označena sekundarna protičloveška protitelesa. Po spiranju in dodatku za encim specifičnega substrata poteče encimska reakcija, ki se kaže s spremembo barve substrata. Intenziteta barve je sorazmerna količini specifičnih protiteles v serumskem vzorcu.

Imunofluorescenčni test

Pri tej metodi bolnikov serum naneseemo na predmetno stekelce, na katero so pritrjeni virusni antigeni (limfociti T, ki so okuženi z virusom HTLV-I). Če so v bolnikovem serumu prisotna protitelesa proti virusu HTLV-I, se bodo vezala z antigeni in v jedru limfocita T bodo nastali kompleksi antigena in protiteles. Sledi spiranje, s katerim odstranimo morebitna nevezana protitelesa. Nato naneseemo na predmetno stekelce sekundarna protičloveška protitelesa, označena s flourokromi, ki se vežejo na imunske komplekse v jedru. Rezultat reakcije opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom. V primeru pozitivnega rezultata so jedra limfocitov T obarvana rumenozeleno.

Aglutinacijski test

Pri aglutinacijskih testih uporabljamo obarvane lateksne ali želatinaste delce, ki imajo na površini vezan antigen (rekombinantni ali sintetični). Te delce v mikrotitracijski ploščici z vdolbinicami v obliki črke U pomešamo z majhno količino krvi ali seruma. Če v serumu ali v krvi ni protiteles proti virusu HTLV-I, se delci usedejo na dno vdolbinice in nastane jasno omejena pika. Protitelesa proti virusu HTLV-I pa delce povežejo in nastane večji ter svetlejši krog z neostrim robom (aglutinacija). Rezultate ocenimo s prostim očesom.



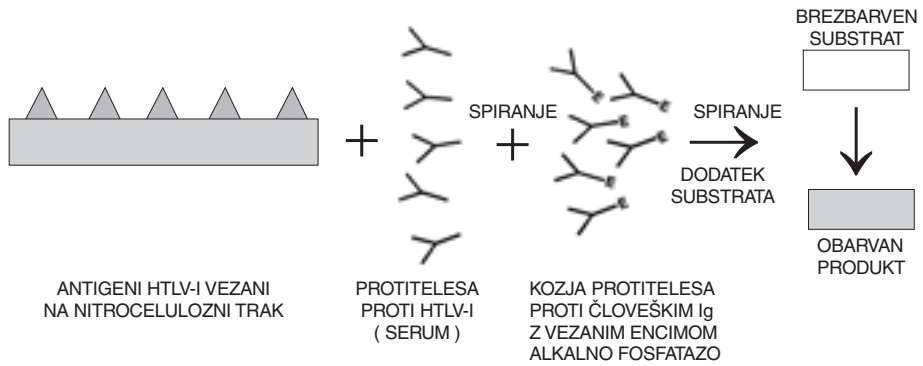
Slika 4. Princip delovanja aglutinacijskega testa.

Omenjeno metodo uporabljamo za določanje protiteles proti virusu HTLV-I tudi v Sloveniji. Princip delovanja te metode je prikazan na sliki 4.

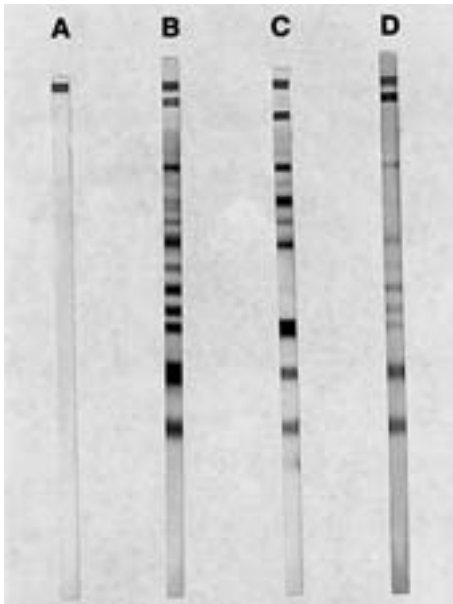
Zaradi velike možnosti lažnopolitivnih rezultatov presejalnih testov je treba vsak reaktivni vzorec opredeliti še s potrditvenim testom (38).

Potrditveni testi

Metodo Western blot uporabljamo za opredelitev pozitivnih rezultatov presejalnih testov. Beljakovine, ki služijo kot antigeni za vezavo morebitnih protiteles proti virusu HTLV-I



Slika 5. Princip delovanja metode Western blot.



Slika 6. Rezultati testa Western blot. A – negativna kontrola; B – pozitivna kontrola I; C – pozitivna kontrola II; D – človeški T-celični limfotropni virus tipa I seropozitiven vzorec.

v serumu, dobimo iz liziranega virusa ali iz lizirane okužene celične linije. Prednost uporabe okužene celične linije je v tem, da tako dobimo več virusnih beljakovin, ki jih je v virionu malo. Virusne beljakovine ločimo z elektroforezo in jih prenesemo na nitrocelulozni trak. Trak nekaj časa inkubiramo s preiskovanim serumom in ga nato speremo, da odstranimo nevezan material. Če so v serumu prisotna protitelesa, se vežejo na beljakovine (antigene) na nitroceluloznem traku. Nato dodamo sekundarna protitelesa proti človeškim IgG, na katerih je vezana alkalna fosfataza. Nitrocelulozni trak ponovno speremo, da odstranimo nevezana protitelesa. Ko dodamo substrat za encim, pride do spremembe barve. Na traku se pojavijo obarvani pasovi. Dva ali trije pasovi pomenijo pozitiven rezultat – odvisno od kriterija. Trak brez pasov pomeni negativen rezultat. Če pasovi ne ustrezajo kriteriju za pozitiven rezultat, slednjega opredelimo kot nejasnega. Princip delovanja metode je prikazan na sliki 5, slika 6 pa prikazuje primer rezultatov testa Western blot.

Bolezni, povezane z okužbo

T-celična levkemija

Oblika T-celične levkemije pri odraslih oz. ATL (iz angl. *adult T cell leukemia*) je nedvomno povezana z okužbo z virusom HTLV-I. Več različnih stanj je opisanih kot obdobja ATL, ki so v nekaterih primerih tudi medsebojno povezana: prenašalec brez znakov bolezni, prelevkemično stanje (pre-ATL), kronična ATL, limfomska oblika ter akutna ATL (7).

Velika večina okuženih z virusom HTLV-I je prenašalcev virusa brez znakov bolezni. Možnost, da okužena oseba v življenju zbolijo za ATL, je približno 1 % (40), medtem ko ima 5–10 % možnosti, da zbolijo za katerokoli drugo boleznijo, povezano z okužbo z virusom HTLV-I (26).

ATL se pojavlja pri starejših ljudeh, dvajset do trideset let po okužbi (41). Nekateri bolniki pred tem prebolevali okužbo, imenovano pre-ATL. To je stanje brez znakov bolezni, ki se kaže s povečanim številom morfološko spremenjenih limfocitov T. V serumu bolnikov so prisotna protitelesa proti virusu HTLV-I. Iz nizkega deleža pre-ATL se razvije akutna oblika ATL.

Pri približno 30 % bolnikov s kliničnimi znaki okužbe se razvije manj agresivna kronična oblika ATL, ki lahko preide v akutno obliko ATL (41).

Pri akutni obliki ATL je v krvi prisotno povečano število morfološko spremenjenih limfocitov T. Velikokrat je prisotno tudi povečano število eozinofilcev in nevtrofilcev. Jetra, vranica in bezgavke so povečane. Zaradi infiltracije kože z levkemičnimi celicami so prisotne kožne spremembe. Spremenjeni so biokemični kazalci v krvi: povišana je koncentracija encima laktat dehidrogenaze, bilirubina in kalcija (41). Povišana koncentracija kalcija je povezana s prisotnostjo litičnih sprememb v kosteh glave in dolgih kosteh (42). Bolniki z ATL so tudi imunsko oslabei, prisotne so oportunistične okužbe: sistemske glivične okužbe; pljučnica, povzročena s *Pneumocystis carinii* ali citomegalovirusom ter druge okužbe (41, 43). Prisotnost ascitesa pri akutni ATL napoveduje kraj-

še preživetje. Kljub agresivnemu kemoterapevtskemu zdravljenju je povprečno preživetje približno šest mesecev (7, 41).

Pri nekaterih bolnikih je bolezen bolj podobna limfomu kot levkemiji (44).

S človeškim T-celičnim limfotropnim virusom tipa I povezana mielopatija

Ugotovili so, da ima skupina indijskih bolnikov z nevrološko boleznijo, imenovano tropška spastična parapareza, povišan titer protiteles proti virusu HTLV-I (45). Povišan titer protiteles so obenem ugotovili tudi pri skupini japonskih bolnikov s počasi napredujočo mielopatijo in motnjami piramidnega sistema (46). Ugotovili so, da gre pravzaprav za isto bolezen, ki so jo imenovali z virusom HTLV-I povezana mielopatija (HPM). Bolezen se pojavlja v vseh predelih sveta, kjer je okužba z virusom HTLV-I endemska (45). Verjetnost, da okuženi zbolijo, je manj kot 1 % (47).

Znaki HPM so šibkost in spastičnost okončin, hiperrefleksija, pozitiven znak Babinskega, motnje v delovanju mišic zapiralk (sfinktrov), blage periferne motnje senzibilitete. V likvorju bolnikov so prisotna protitelesa proti virusu HTLV-I, koncentracija beljakovin je povišana (48). Z magnetnoresonančnim slikanjem so ugotovili okvare v belini ter v paraventrikularnih področjih možganov bolnikov s HPM (49). Avtopsijske raziskave kažejo tudi na prizadetost prsnega dela hrbtenjače v smislu demielinizacije in razraščanja kapilar (50).

O nastanku HPM se danes ve še zelo malo. V nasprotju z ATL, ki se razvije šele mnogo let po okužbi, se HPM lahko razvije že po nekaj letih, najpogosteje po transfuziji okužene krvi (51). Prisotnost protiteles proti virusu HTLV-I v likvorju kaže, da je virus prisoten tudi v osrednjem živčevju (48). Pri bolnikih s HPM so v krvi prisotni imunski kompleksi, zato nekateri menijo, da je HPM avtoimunskega izvora. Ti bolniki imajo tudi višji titer protiteles proti virusu HTLV-I kot bolniki z ATL (48). Znana je povezava med razvojem HPM in določenimi HLA-haplotipi, kar pa ni značilno za ATL (7).

Ostale bolezni, povezane s človeškim T-celičnim limfotropnim virusom tipa I

Okužba z virusom HTLV-I lahko poleg ATL povzroči tudi druge bolezni krvi. Opisani so primeri T-celičnega Nehodgkinovega limfoma, T-prolimfocitne levkemije, sindroma Sezari, fungoidne mikoze, drobnoceličnega karcinoma ter velikocelične levkemije, pri katerih so bolniki imeli povišan titer protiteles proti virusu HTLV-I (7).

Poročali so tudi o povezavi med okužbo z virusom HTLV-I in multiplo sklerozo, toda podmena je bila kasneje ovržena (52).

Virus HTLV-I povzroča oslabitev delovanja imunskega sistema tako pri bolnikih z ATL kot tudi pri nekaterih zdravih nosilcih virusa. Pogosta je tudi sočasna okužba z virusom HIV, vendar so dokazali, da tudi okužba samo z virusom HTLV-I lahko povzroči sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (53).

Pri majhnem deležu okuženih z virusom HTLV-I se lahko razvije tudi kronično vnetje sklepov (54).

Raziskave v endemskih področjih so pokazale povezavo med okužbo in uveitisom (55).

Zdravljenje okužbe

Zdravljenje okužbe z virusom HTLV-I je posebno zaradi več razlogov: inkubacijska doba je dolga (celo več kot dvajset let), v času bolezni je virus vgrajen v perifernih levkocitih in se ne prepisuje, le majhen delež okuženih zboli (26, 40).

Ukrepi pri posameznikih, ki so okuženi in nimajo znakov bolezni, so omejeni na občasne nevrološke preglede in spremljanje krvne slike. Treba je ugotoviti morebitno prekuženost družinskih članov in se izogibati dojenju, spolnim stikom in krvodajalstvu (7).

Akutna T-celična levkemija je zelo maligna bolezen, preživetje se meri v mesecih. Standardne kombinacije kemoterapevtikov, ki se uporabljajo za zdravljenje agresivnih oblik Nehodgkinovega limfoma in akutnih oblik limfoblastične levkemije, niso bile uspešne pri zdravljenju akutne T-celične levkemije (56). Do danes še ne poznamo ustreznega kemoterapevtika za zdravljenje ATL. Poskušali so uporabiti tudi interferon β in interferon γ , vendar neuspešno (57).

Z virusom HTLV-I povzročeno mielopatijo so poskušali zdraviti z oralnimi oblikami kortikosteroidov, vendar z manjšim uspehom (58). Visoki odmerki globulina γ so bolezen nekoliko ublažili, vendar le začasno (59). Poskušali so uporabiti interferon α , vendar je bil učinek opazen le pri nekaterih bolnikih.

Cepivo še ni razvito, vendar določene lastnosti virusa (sorazmerno nizka genska spremenljivost virusa, pojav naravne imunosti pri ljudeh) ter dosedanje raziskave kažejo na to, da bo v bližnji prihodnosti na voljo tudi cepivo (26). Nekateri skupine znanstvenikov so že začele z razvojem cepiva. Z beljakovinami ovojnice virusa, pripravljenimi s pomočjo bakterij, so imunizirali opice. Nekaj opic je razvilo dovolj visok titer protiteles za obrambo pred okužbo z virusom HTLV-I (60). Do danes se klinične raziskave na ljudeh še niso začele.

Literatura

1. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7415–9.
2. Rosenblatt JD, Giorgi N, Golde DW, et al. Integrated HTLV-II genome in CD8-T-cells from a patient with atypical hairy-cell leukemia: evidence for distinct T- and B-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 1988; 71: 363–6.
3. Calderon EJ, Soriano V, Medrano FJ, Leal M. Epidemiology of HTLV-I/II infection in Spain. *Alpe Adria Microbiology Journal* 1995; 2: 85–95.
4. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1983; 220: 868–71.
5. Flugel RM. Spumaviruses-A group of complex retroviruses – Review. *J Acq Immun Def Synd* 1991; 4: 739–50.
6. Anon. Tumor viruses and oncogenes. In: Adelberg EA, Brooks GF, Buntel JS, Jawetz E, Melnick JL, Ornston LN, eds. *Medical microbiology*. New York: Prentice-Hall, 1995: 492–513.
7. Cann AJ, Irvin C. Human T-cell leukemia virus types I and II. In: Fields N, Knipe M, Howley PM, eds. *Virology*. Philadelphia: Lippincott, 1996: 1849–88.

8. Oroszlan S, Copeland TD, Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Schultz AM, Gallo RC. Chemical analyses of human T-cell leukemia virus structural proteins. In: Gallo RC, Essex ME, Gross L, eds. *Human T-cell leukemia lymphoma viruses*. New York: Cold Spring Harbor, 1984: 101–10.
9. Copeland TD, Oroszlan S, Kalvanaraman VS, Samgadharan MG, Gallo RC. Complete amino acid sequence of human T-cell leukemia virus structural protein p15. *FEBS Lett* 1983; 162: 390–5.
10. Pepinsky RB, Vogt VM. Fine-structure analyses of lipid-protein and protein-protein interactions of gag protein p19 of the avian sarcoma and leukemia viruses by cyanogen bromide mapping. *J Virol* 1984; 52: 145–53.
11. Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Ann Rev Biochem* 1994; 63: 133–73.
12. Chen ISY, McLaughlin J, Gasson JC, Clark SC, Golde DW. Molecular characterization of genome of a novel human T-cell leukaemia virus. *Nature* 1983; 305: 502–5.
13. Chen ISY, Slamon DJ, Rosenblatt JD, Shah NP, Quan SG, Wachsman W. The x gene is essential for HTLV replication. *Science* 1985; 229: 54–8.
14. Luciw PA, Leung NJ. Mechanisms of retrovirus replication. In: Levy JA, ed. *The Retroviridae*. New York: Plenum Pr, 1992: 220–87.
15. Swanstrom R, Vogt PK. *Retroviruses: strategies of replication*. Berlin: Springer, 1990: 105–27.
16. Sommerfelt MA, Williams BP, Clapham PR, Solomon E, Goodfellow PN, Weiss RA. Human T cell leukemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science* 1988; 242: 1557–9.
17. Clapham P, Nagy K, Cheingsong-Popov R, Weiss RA. Productive infection and cell-free transmission of human T-cell leukemia virus in a nonlymphoid cell line. *Science* 1983; 222: 1125–7.
18. Chen ISY, Quan SG, Golde DW. HTLV-I transforms normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 7006–9.
19. Nyborg JK, Dynan WS, Chen ISY, Wachsman W. Multiple host-cell protein binding sites on the HTLV-I LTR: implications for transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 1457–61.
20. Cann AJ, Rosenblatt JD, Wachsman W, Shah NP, Chen ISY. Identification of the gene responsible for human T-cell leukemia virus transcriptional regulation. *Nature* 1985; 318: 571–4.
21. McGuire KL, Curtiss VE, Larsoii EL, Haseltine WA. Influence of HTLV-I tax and rex on interleukin-2 gene expression. *J Virol* 1993; 67: 1590–9.
22. Maruyama K, Fukushima T, Kawamura K, Mochisuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res* 1990; 50: 5697–702.
23. Manns A, Murphy EL, Willcs R, et al. Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. *Blood* 1991; 77: 96–105.
24. Shimoyama M. HTLV-I negative adult T-cell leukemia-lymphoma. *Hematol Rev Commun* 1989; 3: 211–2.
25. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. Detection and isolation of type-c retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 7415–9.
26. DeThe G, Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 381–6.
27. Tajima K, Tominaga S, Kuroishi T, Shimizu H, Suchi T. Geographical features and epidemiological approach to endemic T-cell leukemia lymphoma in Japan. *Jpn J Clin Oncol* 1979; 9: 495–504.
28. Tajima K. The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. *Int J Cancer* 1990; 45: 237–43.
29. Blattner WA. Epidemiology of HTLV-I and associated diseases. In: Blattner WA, ed. *Human retrovirology: HTLV*. New York: Raven, 1990: 251–65.
30. Chen YA, Lee T, Wiktor SZ, et al. Type-specific antigens for serological discrimination of HTLV-I and HTLV-II infection. *Lancet* 1990; 336: 1153–5.
31. Poljak M, Bednarik J, Rednak K, Seme K, Kristančič L, Čelan-Lucu B. Seroprevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) in pregnant women, patients attending venereological out-patients services and intravenous drug users from Slovenia. *Folia Biol (Praha)* 1998; 44: 23–25.
32. Okochi K, Sato H. Transmission of ATL (HTLV-I) through blood transfusion. In: Miwa M, ed. *Retroviruses in human lymphoma leukemia*. Utrecht: Japanese Science Society Press; 1985: 129–35.

33. Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. HTLV-I associated myelopathy: a new clinical entity. *Lancet* 1986; 1: 1031–2.
34. Komuro A, Hayami M, Fujii H, Miyahara S, Hirayama M. Vertical transmission of adult T-cell leukaemia virus. *Lancet* 1983; 1: 240.
35. Saito S, Furuki K, Ando Y, et al. Identification of HTLV-I sequence in cord blood mononuclear cells of neonates born to HTLV-I antigen/antibody-positive mothers by polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1990; 81: 890–5.
36. Hirata M, Hayashi J, Noguchi A, et al. The effects of breast feeding and presence of antibody to p40 (tax) protein of human T cell lymphotropic virus type-I on mother to child transmission. *Int J Epidemiol* 1992; 21: 989–94.
37. Nakano S, Ando Y, Ichijo M, et al. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Jpn J Cancer Res* 1984; 75: 1044–5.
38. Brodine SK, Oldfield EC III, Corwin AL, et al. HTLV-I among U. S. marines stationed in a hyperendemic area: evidence for female-to-male sexual transmission. *J Acq Immun Def Synd* 1992; 5: 158–62.
39. Khabbaz RF, Heneine W, Kaplan JE. Testing for other human retroviruses: HTLV-I and HTLV-II. In: Schochetman G, George RJ, eds. *Aids testing*. Berlin: Springer, 1994: 206–20.
40. Kondo T, Kono H, Nonaka H, et al. Risk of adult T-cell leukaemia lymphoma in HTLV-I carriers. *Lancet* 1987; 2: 159.
41. Kawano F, Yamaguchi K, Nishimura H, Tsuda H, Takatsuki K. Variation in the clinical courses of adult T-cell leukemia. *Cancer* 1985; 55: 851–6.
42. Blayney DW, Jaffe ES, Fisher RI, et al. The human T-cell leukemia lymphoma virus, lymphoma, lytic bone lesions and hypercalcemia. *Ann Intern Med* 1983; 98: 144–51.
43. Ueda N, Iwata K, Tokuoka H, Akagi T, Ito J, Mizushima M. Adult T-cell leukemia with generalized cytomegalic inclusion disease and Pneumocystis carinii pneumonia. *Acta Pathol Jpn* 1979; 29: 221–32.
44. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the lymphoma study group (1984–1987). *Br J Haematol* 1991; 79: 437.
45. Gessain A, Vernant JC, Maurs L, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2: 407–10.
46. Nakagawa M, Izumo S, Ikurou M, Osame M. The clinical features of HTLV-I infection. HTLV-I associated myelopathy. *Uirusu* 1992; 42: 21–8.
47. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, et al. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acq Immun Def Synd* 1990; 3: 1096–101.
48. Osame M, Igata A, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Kosaka K. HTLV-I associated myelopathy: a report of 85 cases. *Ann Neurol* 1987; 2: 116.
49. Miller DH, Newton MI, Rudge P, Cnietshank K. Magnetic resonance imaging in HTLV-I antibody positive patients. *Lancet* 1987; 2: 514.
50. Akizuki S, Nakazato O, Higuchi Y, et al. Necropsy findings in HTLV-I associated myelopathy. *Lancet* 1987; 1: 156–7.
51. Delamacter RB, Carr J, Saxton EH. HTLV-I viral-associated myelopathy after blood transfusion in a multiple trauma patient. *Clin Orthop* 1990; 260: 191–4.
52. Fugger L, Morling N, Ryder LP, Sandberg Wollheim M, Svejgaard A. Failure to demonstrate human T cell lymphotropic virus type I in multiple sclerosis patients. *J Gen Virol* 1990; 71: 1103–7.
53. Levy J, Mascart-Lemone F, Song M, Dobec M. Immunosuppression by HTLV-I infection (II). *Lancet* 1991; 337: 309.
54. Kitajima I, Yamamoto K, Sato K, et al. Detection of human T cell lymphotropic virus type I proviral DNA and its gene expression in synovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *J Clin Invest* 1991; 88: 1315–22.
55. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res* 1992; 83: 236–9.
56. Bunn PA Jr, Schechter GP, Jaffe E, et al. Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. *N Engl J Med* 1983; 309: 257–64.

57. Tamura K, Makino S, Araki Y, Imamura T, Seita M. Recombinant interferon beta and gamma in the treatment of adult T cell leukemia. *Cancer* 1987; 59: 1059–62.
58. Harrington WJ Jr, Sheremata WA, Snodgrass SR, Emerson S, Phillips S, Berger JR. Tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM): treatment with an anabolic steroid danazol. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 1031–4.
59. Kuroda Y, Takashima H, Ikeda A, et al. Treatment of HTLV-1-associated myelopathy with high-dose intravenous gammaglobulin. *J Neurol* 1991; 238: 309–14.
60. Nakamura H, Hayami M, Ohta Y, et al. Protection of cynomolgus monkeys against infection by human T-cell leukemia virus type I by immunization with viral env gene products produced in *Escherichia coli*. *Int J Cancer* 1987; 40: 40–7.

Prispelo 18. 11. 1997