

Włodzimierz Gut¹, Joanna Siennicka¹, Małgorzata Sadkowska-Todys²,
Anna Baumann², Bogumiła Litwińska¹

WYSTĘPOWANIE PRZECIWCIAŁ KLASY IgG SWOISTYCH DLA HANTAWIRUSÓW W POPULACJI PRACOWNIKÓW LEŚNYCH I ZOOLOGÓW*

¹Zakład Wirusologii PZH w Warszawie
Kierownik: Bogumiła Litwińska

²Zakład Epidemiologii PZH w Warszawie
Kierownik: Andrzej Zieliński

Badano występowanie przeciwciał IgG dla hantawirusów w surowicach zdrowych osób, zawodowo narażonych na kontakt z gryzoniami lub ich odchodami. Oznaczenia wykonano metodą ELISA u 86 pracowników leśnych i 47 zoologów badających małe ssaki. Analiza otrzymanych wyników sugeruje, że kryteria interpretacji wyników podane przez producenta testu przeznaczonego do wykrywania przeciwciał dla wirusa Puumala u osób z objawami nephropathia epidemica są zbyt restrykcyjne do badań seroepidemiologicznych.

Słowa kluczowe: zakażenia hantawirusami, odpowiedź serologiczna, pracownicy leśni zoologów

Key words: hantavirus infections, serological response, forest workers, zoologists

WSTĘP

Wirusy z rodzaju *Hantavirus* należące do rodziny *Bunyaviridae*, charakteryzują się ścisłym związkiem i współewolucją ze swoimi gospodarzami, drobnymi ssakami. Każdy z należących do tego rodzaju wirusów jest związany z innym gatunkiem gospodarza. Hantawirusy występują na całym świecie, a liczba opisywanych gatunków stale wzrasta (1, 2). Odpowiedź immunologiczna dla hantawirusów charakteryzuje się wysokim poziomem reakcji krzyżowych pomiędzy poszczególnymi gatunkami (3, 4).

Tylko nieliczne hantawirusy są patogenne dla człowieka. W Europie zachorowania u ludzi wywołują gatunki *Puumala* i *Dobrawa* (*nephropathia epidemica*) oraz *Hantaan* (czynnik zakaźny gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym).

* Przedstawione badania finansowano z funduszy projektu badawczego KBN nr 3PO5D 041 025

Większość zakażeń powodowanych przez te wirusy ma charakter skąpoobjawowy lub bezobjawowy, a zakażenia o pełnoobjawowym charakterze rzadko przekraczają 5% (5). Serologiczna diagnostyka zakażeń określonym gatunkiem wirusa wymaga uwzględnienia występowania krzyżowych reakcji z innymi hantawirusami. (4, 6, 7). U osób z procesem zapalnym nerek należy również uwzględniać możliwość wystąpienia nieswoistych reakcji autoimmunologicznych (8). Prawidłowa interpretacja wyników musi uwzględniać nie tylko spełnienie wymagań producenta testów, ale również krytyczną analizę wyników oraz ustalenie właściwego postępowania w przypadku otrzymania wyników wątpliwych (9).

Celem pracy było wypracowanie właściwych metod interpretacji wyników wątpliwych, uzyskanych w badaniach seroepidemiologicznych, przeprowadzonych testem ELISA przeznaczonym do diagnozowania zakażenia wirusem *Puumala* u osób z objawami *nephropathia epidemica*.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiot badań: Surowice pobrane od osób zdrowych, teoretycznie narażonych na zakażenie hantawirusami: leśników i pracowników leśnych zatrudnionych na Górnym Śląsku przy zabiegach pielęgnacyjnych obszarów leśnych (n=86) oraz zoologów, którzy zajmują się odławianiem drobnych ssaków (gryzonie) będących gospodarzami hantawirusów (n=47).

Metodyka badań: Surowice otrzymane od wyżej wymienionych osób badano metodą immunoenzymatyczną ELISA na obecność swoistych dla wirusa *Puumala* przeciwciał w klasie IgG (*Hantavirus Puumala* IgG/IgM-ELISA, firmy PROGEN Biotechnik GMBH; serie nr 538, 606 i 634). Zestawy zawierały 3 rodzaje surowic kontrolnych: ujemną, dodatnią i *cut-off*. Badania wykonywano zgodnie z instrukcją podaną przez producenta. Próbkę badano w rozcieńczeniu 1:200 w jednokrotnym nastawieniu. Uzyskane wyniki dla badanych surowic oceniano w odniesieniu do kontroli *cut off*. Za ujemne przyjmowano wyniki badania, dla których wartość indeksu OD próbki badanej do OD kontroli *cut off* była ≤ 1 , za dodatnie, gdy wartość indeksu była $> 1,5$. W przypadku wartości zawartych między 1 a 1,5 wyniki uznawano za wątpliwe. Podstawowe dla metody parametry powtarzalności i odtwarzalności określano na podstawie analizy wyników oznaczeń dla surowic kontrolnych dostarczonych przez producenta (ujemnej i odcięcia - *cut off*).

Statystyczną analizę otrzymanych wyników przeprowadzono z użyciem programu Statgraphics™ centurion ver.XV (STATPOINT Inc.)

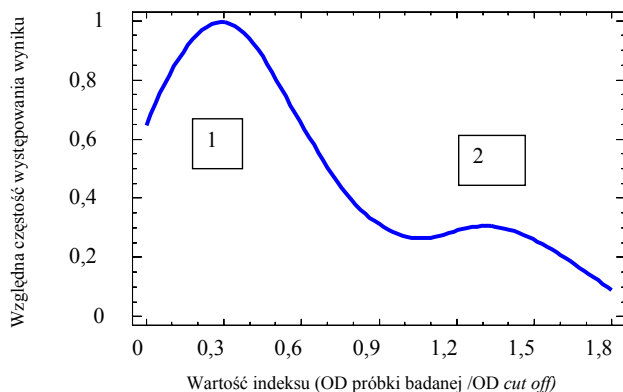
WYNIKI

Charakterystykę podstawowych parametrów uzyskanych wyników oznaczeń IgG przedstawiono w tabeli I. Istotna różnica w wartościach odchylenia standardowego pomiędzy grupą zoologów i leśników wskazuje na odmienną rozkładów wyników w tych grupach. Analiza rozkładu wyników uzyskanych w badaniu surowic zoologów wskazuje na jej niejednorodny charakter z wyraźnym zaznaczeniem podziału na dwie grupy (ryc. 1).

Zgodnie z kryteriami oceny wyników, podanymi przez producenta zestawu, w grupie zoologów występowanie dodatnich wyników oznaczeń IgG dla wirusa *Puumala* stwierdzono

Tabela I. Charakterystyka odpowiedzi IgG dla wirusa *Puumala* w badanych grupach
 Table I. Characterisation of IgG response to *Puumala* virus in investigated groups

Grupy badane	Liczba oznaczeń	Średnia wartość indeksu	Odchylenie standardowe	Względna wariancja
Zoolodzy	47	0,609	0,491	80,6%
Pracownicy leśni	86	0,506	0,145	28,2%
Surowice kontrolne	Liczba oznaczeń	Średnia wartość OD	Odchylenie standardowe	Względna wariancja
Kontrola ujemna	10	0,212	0,093	43,6%
Kontrola <i>cut off</i>	10	1,133	0,109	9,6%



1 - wyniki ujemne; negative results

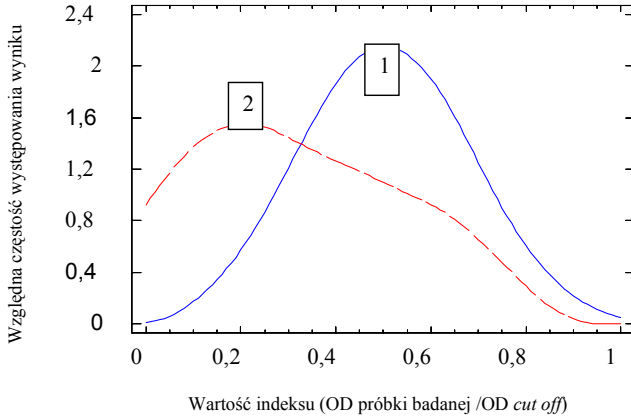
2 - wyniki dodatnie i wątpliwe wg. kryteriów producenta testu; positive and equivocal results according to manufacturer of test

Ryc. 1. Krzywa rozkładu wyników oznaczeń przeciwciał IgG dla wirusa *Puumala* w surowicach zoologów

Fig.1. Density trace of results to *Puumala* virus IgG in zoologist's sera

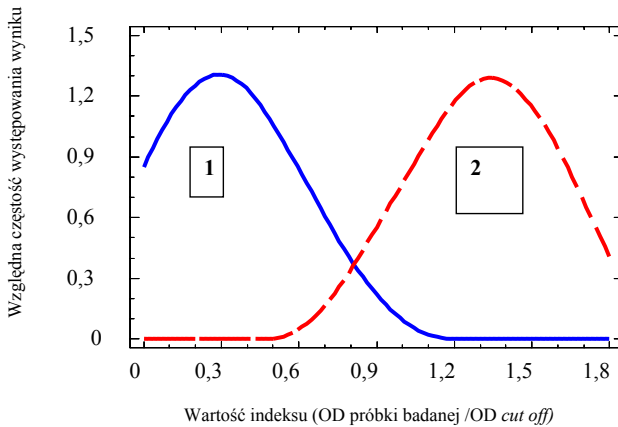
u 7 osób (14,9%), a u 5 osób (10,6%) określono jako wyniki wątpliwe. W grupie leśników i u pozostałych 35 zoologów nie wykryto obecności przeciwciał dla hantawirusów. Analiza rozkładu wyników w grupie leśników wykazała jej jednorodny charakter i normalny rozkład wyników. Podobny rozkład stwierdzono w grupie zoologów serologicznie ujemnych dla hantawirusów (ryc. 2). Krzywa rozkładu wyników dodatnich i wątpliwych w grupie zoologów wykazywała przebieg normalny, podobnie jak krzywa wyników ujemnych pracowników leśnych (ryc. 3).

W większości testów diagnostycznych ELISA, wartość *cut off* ustalana jest na podstawie wartości wyniku dla surowicy ujemnej (bądź puli surowic ujemnych) powiększonego o 3 lub więcej wartości odchylenia standardowego. Na podstawie wyników oznaczeń uzyskanych z kontrolną surowicą ujemną dostarczaną przez producenta wraz z zestawem ELISA ustalono, że średnia odczytu OD dla tej surowicy wyniosła 0,212. Wartość ta powiększona o 3 odchylenia standardowe ($3 \times 0,093$) kształtuje granicę odcięcia wyników dodatnich (*cut off*) na poziomie 0,5, a przy zastosowaniu wartości 6 odchyleń standardowych ($6 \times 0,093$)



Ryc. 2. Porównanie wyników oznaczeń IgG dla wirusa *Puumala* w surowicach pracowników leśnych (1) i serologicznie ujemnych zoologów (2)

Fig.2. Comparison between density tracer of *Puumala* virus IgG in forester worker's sera (1) and seronegative zoologist (2)



Ryc. 3. Krzywe rozkładu gęstości wyników oznaczeń IgG dla wirusa *Puumala* w surowicach pracowników leśnych (1) i zoologów z dodatnim lub wątpliwym wynikiem oznaczeń (2)

Fig.3. Comparison between density tracer of *Puumala* virus IgG in forester worker's sera (1) and seropositive or equivocal results in zoologist's sera (2)

– wartość *cut off* wyniosłaby 0,80. W przypadku przyjęcia za *cut off* średniego wyniku dla grupy serologicznie ujemnych pracowników leśnych, wartość odcięcia wyniosłaby w granicach od 0,94 do 1,38 w zależności od wielokrotności odchylenia standardowego dodawanego do wartości średniej.

DYSKUSJA

Analiza rozkładu uzyskanych wyników wskazuje, że kryterium odcięcia proponowane przez producenta testu (wynik dodatni, gdy wartość indeksu OD próbki badanej / OD kontroli

cut off > 1,5) jest przystosowane do badań diagnostycznych prowadzonych w celu określenia czynnika etiologicznego u osób z objawami zapalenia nerek. Stosowanie tak wysokiego poziomu odcięcia w przypadku badań seroepidemiologicznych może prowadzić do błędnej interpretacji wyników. W celu eliminacji tego problemu przeprowadzono rewalidację kryterium odcięcia, przystosowując ocenę wyników do badań wykonywanych z surowicami osób zdrowych. Określenia wartości *cut off* dokonano na podstawie wyników badań surowic pracowników leśnych (n=86). Przyjęto kryterium odcięcia jako średnią wartość uzyskanych w tej grupie wyników plus 3 odchylenia standardowe (0,94). Stosując określone powyżej kryterium, odsetek serologicznie dodatnich zoologów wyniósł 25%.

Problem ustalenia odpowiedniej wartości *cut off* w metodzie ELISA wynika z charakteru hantawirusów indukujących odpowiedź immunologiczną (10). Do grupy tej należą spokrewnione antygenowo wirusy, różniące się patogennością dla człowieka (2). W diagnostyce osób z objawami chorób nerek istotne jest odróżnienie zakażenia wirusem *Puumala* od zakażeń hantawirusami *Tula* i innymi obecnymi na danym obszarze, które przebiegają bezobjawowo i nie są związane z chorobami nerek (6, 8). Ze względu na krzyżowe reakcje pomiędzy różnymi hantawirusami ustalono kryteria interpretacji wyniku tak, by wyniki wątpliwe mogły świadczyć o odpowiedzi heterologicznej (lub zakażeniu odległym w czasie), a wyniki dodatnie wskazywały na zakażenie wirusem *Puumala* (11, 12). W przypadku badań, których głównym celem jest ustalenie, czy dana grupa osób jest narażona na zakażenie hantawirusami lub czy kiedykolwiek miała z nimi kontakt, stosowanie kryterium odcięcia dostosowanego do określenia czynnika etiologicznego *nephropathia epidemica* może znacząco obniżać czułość metody. Przyjęcie proponowanych w przedstawionej pracy kryteriów jest jednym ze sposobów eliminacji tego problemu. Należy podkreślić, że przyjęte kryterium odcięcia, opracowane na podstawie wyników w grupie serologicznie ujemnych pracowników leśnych jest wyższe od zastosowania bardzo restrykcyjnego *cut off* wyliczonego na podstawie ujemnej kontroli dołączonej przez producenta plus 6 odchyłeń standardowych. Wskazuje to na ograniczoną możliwość otrzymywania wyników fałszywie dodatnich.

Porównanie wyników ocenianych wg obu kryteriów wskazuje, że co najmniej 14,9% badanych zoologów miało w przeszłości kontakt z wirusem *Puumala*, a dodatkowe 10% kontaktowało się z innymi hantawirusami lub przebyło zakażenie wirusem *Puumala* w odległej przeszłości. Na pytanie, czy te zakażenia miały miejsce na terenie Polski i czy łączą się z określonymi obszarami geograficznymi kraju, mogą odpowiedzieć badania epidemiologiczne wśród zoologów pracujących na różnych obszarach.

W Gut, J Siennicka, M Sadkowska Todys, A Baumann, B Litwińska

HANTAVIRUS SPECIFIC IgG ANTIBODIES IN POPULATION OF ZOOLOGISTS AND FOREST WORKERS

SUMMARY

Serological diagnostic tests were introduced for detection of immunoresponse against to etiological agents of current infectious diseases. Interpretation criteria for those tests should eliminate unspecific reactions, cross-reactivity with related viruses as well as traces amounts of immunological response against to the past infections. In the case of past hantaviruses infections for obtaining an adequate seroepidemiological data revalidation of this tests are required. In present studies *Puumala* IgG results obtained in sera from healthy population had been analysed by statistical method and interpretation criteria were recalculated.

Panels of 86 sera from forest workers and 47 zoologists working with small mammals were evaluated for hantavirus specific IgG (*Hantavirus Puumala* ELISA test). *Puumala* specific antibodies were detected in 7 zoologist's sera and in 5 sera gave equivocal results. All sera collected from forest's workers were negative. Statistical analysis based on negative results in forest workers group suggests that the *cut off* of the ELISA test suitable for diagnosis of suspected *nephropathia epidemica* cases is too restrictive for seroepidemiological research of hantavirus in healthy population.

PIŚMIENNICTWO

1. Heyman P, Vervoort T, Colson P, i in. A major outbreak of hantavirus infection in Belgium in 1995 and 1996. *Epidemiol Infect* 1999; 122: 447-53.
2. Zeier M, Handermann M, Bahr U, i in. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention. *Virus Genes* 2005; 30: 157-80.
3. de Carvalho Nicacio C, Gonzalez Della Valle M, Padula P, i in. Cross-protection against challenge with *Puumala* virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol* 2002; 76: 6669-77.
4. Kallio-Kokko H, Leveelahti R, Brummer-Korvenkontio M, i in. Human immune response to *Puumala* virus glycoproteins and nucleocapsid protein expressed in mammalian cells. *J Med Virol* 2001; 65: 605-613.
5. Hujakka H, Koistinen V, Eerikäinen P, i in. New Immunochromatographic Rapid test for diagnosis of acute *Puumala* virus Infection. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2146-50.
6. Hujakka H, Koistinen V, Eerikäinen P, i in. Comparison a new immunochromatographic rapid test with commercial EIA for detection of *Puumala* virus specific IgM antibodies. *J Clin Virol* 2001; 23: 79-85.
7. Lundkvist A, Hukic M, Hörling J, i in. *Puumala* and *Dobrava* viruses cause haemorrhagic fever with renal syndrome in Bosnia-Herzegovina: evidence of highly cross-neutralising antibody responses in early patient sera. *J Med Virol* 1997; 53: 51-9.
8. Koraka P, Avsic-Zupanc T, Osterhaus AD, i in. Evaluation of two commercially available immunoassays for the detection of hantavirus antibodies in serum samples. *J Clin Virol* 2000; 17: 189-96.
9. Biel SS, Donoso Mantke O, Lemmer K, i in. Quality control measures for the serological diagnosis of hantavirus infections. *J Clin Virol* 2003; 28: 248-56.
10. Schubert J, Tollmann F, Weissbrich B. Evaluation of a pan-reactive hantavirus enzyme immunoassay and of a hantavirus immunoblot for the diagnosis of *nephropathia epidemica*. *J Clin Virol* 2001; 21: 63-74.
11. Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Lundkvist A, i in.. Evaluation of *Puumala* virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early *nephropathia epidemica* diagnosis. *Clin Diagn Virol* 1998; 10: 83-90.
12. Meisel H, Wolbert A, Razanskiene A, i in. Development of novel immunoglobulin G (IgG), IgA, and IgM enzyme immunoassays based on recombinant *Puumala* and *Dobrava* hantavirus nucleocapsid proteins. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 36: 1349-57.

Otrzymano: 25.06.2007 r.

Adres Autora:

doc.dr hab. Włodzimierz Gut
Zakład Wirusologii PZH.
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24,
Tel. +48 22 54 21 230