

Włodzimierz Gut<sup>1</sup>, Joanna Siennicka<sup>1</sup>, Małgorzata Sadkowska-Todys<sup>2</sup>, Jolanta Gozdowska<sup>3</sup>, Bogumiła Litwińska<sup>1</sup>

PROBLEM WYSTĘPOWANIA REAKCJI KRZYŻOWYCH  
I NIESWOISTYCH W BADANIACH ODPOWIEDZI HUMORALNEJ DLA  
HANTAWIRUSA PUUMALA\*

<sup>1</sup> Zakład Wirusologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: Bogumiła Litwińska

<sup>2</sup> Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: Andrzej Zieliński

<sup>3</sup> Instytut Transplantologii Akademii Medycznej w Warszawie  
Kierownik: Magdalena Durlik

*W surowicach osób z klinicznymi objawami nephropathia epidemica (n=9), pacjentów hospitalizowanych z powodu ostrej dysfunkcji nerek (n=21) oraz zoologów pracujących z małymi ssakami (n=78) oznaczano obecność swoistych dla hantawirusów Puumala i Hantaan przeciwciał klasy IgG i IgM. Potwierdzono opisaną wcześniej obserwację, że stosowane przez producenta kryteria oceny wyników są zbyt restrykcyjne w przypadku grupy osób zdrowych, a prawidłowe w przypadku osób z dysfunkcją nerek. Pozytywne wyniki oznaczeń stwierdzono jedynie dla IgG swoistych dla Puumala w grupie zoologów. Wyniki pozostałych oznaczeń (IgG i IgM Hantaan oraz IgM Puumala) w innych grupach były ujemne bądź wątpliwe. Analiza przeciwciał krzyżowo reagujących między wirusami Hantaan i Puumala wskazuje, że najbardziej prawdopodobnym induktorem przeciwciał u zoologów były hantawirusy z grupy Puumala/Tula.*

*Słowa kluczowe: diagnostyka serologiczna, hantawirusy, reakcje krzyżowe*  
Key words: serological diagnosis, hantaviruses, cross reactivity

## WSTĘP

Serologiczna diagnostyka zakażeń hantawirusem *Puumala* wymaga uwzględnienia występowania krzyżowych reakcji występujących pomiędzy wirusami z rodzaju *Hantavirus* (1,2). Dodatkowym problemem są nieswoiste reakcje występujące w procesie patologicznym,

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

związany z uszkodzeniem nerek (*nephropatia epidemica*), będącym podstawą klinicznego podejrzenia zakażenia tym wirusem.

Prawidłowa interpretacja uzyskanych w laboratorium wyników wymaga nie tylko spełnienia wymagań producenta zestawów do oznaczeń swoistych przeciwciał dla wirusa *Puumala*, ale i krytycznej analizy wyników i ustalenia właściwego postępowania w przypadku uzyskania wyników wątpliwych. Porównanie wyników oznaczeń swoistych IgG u osób zdrowych wykazało, że stosowane kryteria różnicowania wyników podane przez producenta testu są zbyt restrykcyjne (3).

Celem przedstawionej pracy była zarówno ocena użyteczności diagnostycznej oznaczeń odpowiedzi immunologicznej metodą ELISA jak i wypracowanie właściwych metod postępowania w przypadkach uzyskania wyników wątpliwych.

## MATERIAŁ I METODY

Oznaczenia przeciwciał dla hantawirusów przeprowadzono w trzech grupach osób:

- 1) osób z podejrzeniem zakażenia hantawirusem *Puumala*, u których wystąpiły kliniczne objawy *nephropatia epidemica* (n=9). U wszystkich chorych stwierdzono: białkomocz, krwinkomocz, brak wysypki krwotocznej, u 6/9 gorączkę > 37°C. Badanie w kierunku leptospirozy wykonane u 3 chorych dało wynik ujemny.
- 2) osób z ostrą dysfunkcją nerek (n=21) wyselekcjonowanych w na podstawie następujących cech: ostry początek choroby sugerujący infekcję nerek, wykluczenie zakażenia bakteryjnego (u dwóch osób obserwowano nadkażenie bakteryjne w okresie pomiędzy wystąpieniem choroby nerek a skierowaniem do badania). W trakcie choroby białkomocz stwierdzano u 16 osób, krwimocz u 15 osób, u 6 obserwowano w tym okresie gorączkę powyżej 37°C.
- 3) zoologów (n=78) pracujących z małymi ssakami.

Surowice otrzymane od wyżej wymienionych osób badano metodą immunoenzymatyczną ELISA na obecność swoistych dla wirusa *Puumala* przeciwciał w klasie IgG i IgM (Hantavirus *Puumala* IgG/IgM-ELISA, firmy PROGEN Biotechnik GMBH). 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  $\leq 1$ , za dodatnie w przypadku IgG, gdy wartość indeksu była > 1,5 a w przypadku IgM > 2. W przypadku wartości zawartych między 1 a 1,5 dla IgG oraz 1 a 2 dla IgM wyniki uznawano za wątpliwe. W przypadku stwierdzenia wyników wątpliwych przeprowadzano oznaczenia obecności IgG i IgM swoistych dla hantawirusa *Hantaan* (Hantavirus *Hantaan* IgG/IgM-ELISA, firmy PROGEN Biotechnik GMBH) w celu rozróżnienia pomiędzy reakcjami krzyżowymi a nieswoistymi (4,5).

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

## WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W celu oceny kryteriów producenta testu do oznaczeń poziomu przeciwciał IgG i IgM dla wirusa *Puumala* przeprowadzono porównanie wyników uzyskanych w badaniu przeprowadzonym w trzech grupach osób: chorych z podejrzeniem zakażenia hantawirusem, pacjentów z ostrą dysfunkcją nerek oraz zoologów.

Wyniki oznaczeń przeciwciał IgG i IgM swoistych dla hantawirusów przedstawiono w tabeli I. Spośród analizowanych grup tylko u zoologów stwierdzono dodatnie wyniki oznaczeń przeciwciał IgG swoistych dla wirusa *Puumala*.

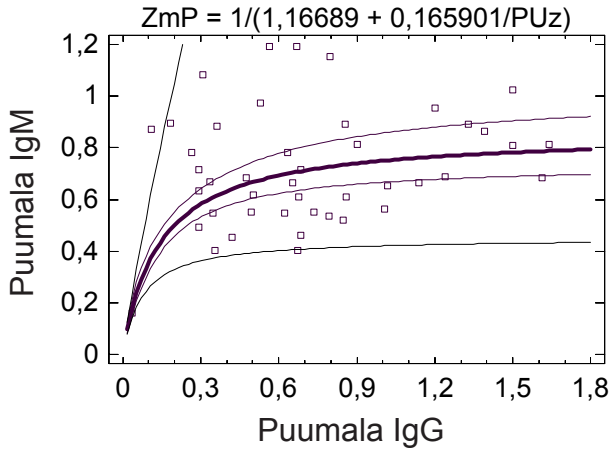
Tabela I. Wyniki oznaczeń przeciwciał klasy IgG i IgM dla hantawirusów *Puumala* i *Hantaan* w badanych grupach

Table I. Results of IgG and IgM for hantaviruses *Puumala* and *Hantaan* in investigated groups

Badana grupa i jej liczebność (n)	Średnie wartości indeksu OD próbki badanej/OD kontroli cut off +/- odchylenie standardowe (liczba wyników: ujemnych/wątpliwych/dodatnich)			
	IgG <i>Puumala</i>	IgM <i>Puumala</i>	IgG <i>Hantaan</i>	IgM <i>Hantaan</i>
Chorzy z podejrzeniem zakażenia hantawirusem (n=9)	0,901+/-0,416 (4/5/0)	0,998+/-0,348 (6/3/0)	0,336+/-0,233 (7/0/0)	0,335+/-0,100 (3/0/0)
Chorzy z ostrą dysfunkcją nerek (n=21)	0,861+/-0,344 (21/0/0)	0,655+/-0,323 (20/1/0)	0,232+/-0,140 (21/0/0)	0,357+/-0,401 (19/2/0)
Zdrowi zoology (n=78)	0,629+/-0,424 (63/4/11)	0,720+/-0,224 (39/5/0)	0,942+/-0,401 (2/5/0)	1,064+/-0,304 (3/2/0)

Na podstawie porównania rozkładu wyników oraz wcześniej przeprowadzonych analiz (3) ustalono, że 15 spośród 78 zoologów miało kontakt z hantawirusami, przy czym w przypadku 11 z nich był to kontakt z wirusem *Puumala*. W grupie zoologów prawie połowa surowic reagujących z antygenem wirusa *Puumala* dawała wątpliwy wynik oznaczeń IgG swoistych dla wirusa *Hantaan*. Analiza współzależności pomiędzy wynikami oznaczeń IgG dla wirusów *Hantaan* i *Puumala* wskazuje na występowanie korelacji pomiędzy tymi wynikami, przy czym korelacja ta ma inny wzór dla surowic ujemnych dla wirusa *Puumala*, a inny dla surowic dodatnich i wątpliwych. Obliczony współczynnik determinacji wynosił 0,62 (dla surowic dodatnich i wątpliwych), co wskazuje, że aż 62% wyniku uzyskanego z antygenem wirusa *Hantaan* ma swoje źródło w odpowiedzi dla wirusa *Puumala*.

Obserwowana zależność potwierdza występowanie przeciwciał IgG dla hantawirusów wśród zoologów, a wartości pomiarów wyższe dla wirusa *Puumala* niż dla wirusa *Hantaan* wskazują, że induktorem tych przeciwciał był najprawdopodobniej wirus *Puumala* lub *Tula*, które są ze sobą blisko spokrewnione antygenowo (1,2,5). Wirus *Hantaan* jest bardziej odległy antygenowo od wirusa *Puumala* niż wirusów *Dobrawa* i *Saaremaa*. We wczesnym okresie badań wirus *Dobrawa* był określany jako szczep wirusa *Hantaan* (6). Wirus *Saaremaa* jest to wirus nazywany dawniej *Dobrawa*, związany z gryzoniem *Apodemus agrarius* (6,7,8).



Ryc.1. Zależność pomiędzy wynikami oznaczeń poziomu przeciwciał IgM (ZmP) i IgG (PUz) dla wirusa *Puumala* w surowicach zoologów

Fig. 1. Relationship between results of IgM (ZmP) and IgG (PUz) for *Puumala* virus in sera of zoologists

Analizie poddano również wyniki oznaczeń IgG u wszystkich zoologów, u których uzyskano ujemne wyniki oznaczeń IgG swoistych dla wirusa *Puumala*. Poziom tej reakcji odpowiada wcześniej opisanemu (3) średniemu poziomowi odpowiedzi w grupie seronegatywnych leśników.

U żadnej z badanych osób nie stwierdzono dodatnich wyników oznaczeń przeciwciał IgM swoistych dla wirusów *Puumala* i *Hantaan*. Problemy z wykrywaniem tej klasy przeciwciał obserwowano już wcześniej (9). Dzagurova i in. (9) sugerują, że brak wykrycia IgM metodą immunofluorescencji w surowicach chorych może być powodowany blokowaniem epitopów antygeny przez swoiste IgG. W przedstawionej pracy badania wykonywano pośrednią metodą ELISA. Podstawy merytoryczne obu metod są takie same (10). W przypadku badań przeciwciał dla hantawirusów metoda immunofluorescencji jest uznawana jako „złoty standard”. W związku z powyższym, problem blokowania epitopów przez swoiste przeciwciała różnych klas pozostał nierozwiązany. W testach komercyjnych ELISA zaleca się usuwanie z badanych próbek czynnika reumatoidalnego, który jest powodem otrzymywania wyników fałszywie dodatnich, a pozostawia się IgG, które mogą być przyczyną wyników zaniżonych lub fałszywie ujemnych (10).

Z powyższych powodów wykonano analizę relacji pomiędzy wynikami oznaczeń poziomu IgG i IgM dla wirusa *Puumala* u wszystkich zoologów (rycina 1). Obserwowany asymptotyczny charakter krzywej wskazuje na istotny wpływ wyższych koncentracji swoistych IgG na wyniki oznaczeń IgM.

Jednocześnie, według kryteriów producenta, średni wynik oznaczeń swoistych IgM dla wirusa *Puumala* ( $0,700 \pm 0,243$ ) w surowicach zoologów (IgM i IgG ujemnych) wskazuje na stosunkowo wysoki poziom nieswoistych reakcji IgM u osób tej grupy. Ustalona na tej podstawie wartość cut off (średnia wartość indeksu OD w grupie wyżej zdefiniowanych zoologów + 3 odchylenia standardowe) wynosi 1,430. Tym samym, niezależnie od przyjętego

kryterium, nie potwierdzono obecności swoistych dla wirusa *Puumala* IgM w surowicach otrzymanych od zoologów. Stwierdzenie to potwierdzają wyniki oznaczeń IgM dla wirusa *Hantaan*.

Przedstawiona powyżej analiza dotyczyła osób zdrowych. W przypadku klinicznych podejrzeń zakażeń hantawirusem odnośnienie wyników do populacji osób zdrowych może prowadzić do błędów interpretacyjnych. W celu uniknięcia tego typu błędów, jako grupę odniesienia przyjęto pacjentów z ostrą dysfunkcją nerek, u których ostry początek choroby nie miał podłoża bakteryjnego. Prawdopodobieństwo spowodowania dysfunkcji nerek wywołanej zakażeniem hantawirusowym w tej grupie osób, zgodnie z danymi opublikowanymi przez innych autorów jest wystarczająco niskie (11). Z tego powodu mogła ona stanowić grupę odniesienia dla osób z podejrzeniem zakażenia hantawirusem.

Pomiędzy grupą pacjentów z ostrą dysfunkcją nerek, a grupą z podejrzeniem zakażenia hantawirusem nie stwierdzono istotnej różnicy w średnich wartościach wyników oznaczeń IgG i IgM ( $P_0 > 0,1$ ). Analiza tych wyników wskazuje, że w przypadku osób chorych z zespołami nerkowymi kryteria producenta są poprawne i nie można ich zmienić. Jednocześnie, wysoka nieswoista reaktywność surowic od chorych z zespołami nerkowymi, narzuca konieczność niezwykle ostrożnej interpretacji wyników oznaczeń IgM i wykonywania, w przypadku uzyskania wyniku wątpliwego, badań kolejnych pobranych surowicy lub zastosowania technik umożliwiających wykrywanie wirusa. Przeprowadzenie takich badań jest szczególnie istotne w przypadkach, w których w surowicy wykrywane są tylko przeciwciała IgM swoiste dla jednego z hantawirusów, przy ujemnym wyniku oznaczeń swoistych IgG (5).

Przedstawiona praca dotyczy jedynie metodycznych aspektów badań nad wykrywaniem przeciwciał dla hantawirusów, w surowicach osób zdrowych i chorych z uszkodzeniem nerek. Niezbędne jest jednak odniesienie się do całokształtu problemu diagnostyki zakażeń hantawirusami w Polsce. Dotychczas jedynym izolowanym w naszym kraju hantawirusem był wirus *Tula* (12). Znikoma liczba podejrzeń zakażenia hantawirusami nie ma uzasadnienia w odmienności obrazu tego zespołu klinicznego od innych ostrych chorób nerek. Analiza informacji klinicznych, dotyczących 9 chorych podejrzanych o zakażenie hantawirusem oraz analiza zebranej w krótkim okresie grupy odniesienia (21 pacjentów z ostrą dysfunkcją nerek), nie pozwoliła na wyróżnienie żadnego wskaźnika, który mógłby być przyczyną podziału na te dwie grupy. Jediną różnicą między grupami był kontakt z gryzoniami, zgłoszony w 9/9 przypadków podejrzeń o zakażenie hantawirusem, a w grupie odniesienia w 19/21 przypadków. Jest to jednak różnica nieistotna. Równocześnie, tylko u niewielkiej liczby chorych wykonywano badania różnicujące w kierunku leptospirozy (odpowiednio 3/9 i 0/21), które powinny być w takich przypadkach wykonywane. Tak niewielka liczba otrzymanych surowic od osób chorych, podejrzanych o zakażenie hantawirusami, mimo szeroko rozesłanych informacji do szpitali, a przede wszystkim oddziałów nefrologicznych na terenie całej Polski, o prowadzeniu w Zakładzie Wirusologii PZH nieodpłatnej diagnostyki w ramach badań naukowych, jednoznacznie wskazuje na brak „motywacji” wśród lekarzy diagnozowania zakażeń hantawirusowych. Powody mogą być różne, ale najprawdopodobniej najistotniejszym jest, że uzyskany wynik ma niewielki wpływ na postępowanie z chorym. W tej sytuacji, na podstawie zgłoszeń o zachorowaniach podejrzanych o zakażenie hantawirusami, nie można wnioskować o obecności czy braku tych wirusów w Polsce i ich znaczeniu dla zdrowia publicznego.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Na występowanie zakażeń hantawirusami w Polsce wskazuje stosunkowo wysoki odsetek osób posiadających przeciwciała reagujące z antygenem wirusa *Puumala* wśród zoologów. Jest to niewątpliwie istotna grupa ryzyka. Analiza epidemiologiczna powinna wyjaśnić związki obecnością przeciwciał dla hantawirusów a danymi epidemiologicznymi. Dane te obejmują regiony, w których ci zoolodzy prowadzili badania, gatunki gryzoni będące obiektami ich badań oraz ewentualne związki posiadania przez nich przeciwciał dla hantawirusów z prowadzeniem badań poza granicami Polski. Takie informacje są niezbędne do prowadzenia prac nad identyfikacją hantawirusów u gryzoni i tym samym ustalenia, jakie hantawirusy występują w Polsce i na jakich obszarach.

Ze względu na krzyżowe reakcje serologiczne, jednoznaczna identyfikacja określonego hantawirusa w oparciu o badania serologiczne, może być obarczona błędami i to niezależnie od liczby antygenów/wirusów użytych do badań.

Szczegółowa identyfikacja hantawirusów jest praktycznie możliwa tylko przy zastosowaniu metod molekularnych w odniesieniu do izolowanych szczepów lub genomów tych wirusów (7).

*W Gut, J Siennicka, M Sadkowska-Todys, J Gozdowska, B Litwińska*

THE CROSS AND UNSPECIFIC REACTIONS IN SEROLOGICAL EXAMINATION FOR  
ANTIBODIES AGAINST OF HANTAVIRUS *PUUMALA*

SUMMARY

A serological survey of 78 zoologist capturing small wild rodents in their environment, 9 patients with suspected hantavirus infections and 21 patients with acute renal dysfunction for antibodies to hantaviruses was conducted in Poland. Survey was done by the indirect ELISA with *Puumala* and *Hantaan* virus antigens. Out of the 78 mammalogists 15 were seropositive for hantavirus *Puumala* IgG without history of clinical illness. Analysis of relation between reactive zoologist's sera IgG with antigens of *Puumala* and *Hantaan* viruses suggests that these persons had contact with *Puumala/Tula* viruses rather than with *Dobrava/Saaremaa* complex. Analysis of results of IgG and IgM presence by ELISA test have confirmed correct interpretation criteria proposed by manufacturer for serological diagnosis of suspected hantavirus infection. Both cross and unspecific reactions in the some sera have been observed. Low number of patients with suspected hantavirus infection suggests the existence of underestimation in registration of data collected in Poland and existence of non-diagnosed infections with hantaviring.

PIŚMIENNICTWO

1. de Carvalho Nicacio C, Gonzalez Della Valle M, Padula P, i in. A. Cross-protection against challenge with *Puumala* virus after immunization with nucleocapsid proteins from different hantaviruses. *J Virol* 2002;76:6669-77.
2. Lundkvist A, Hukic M, Horling 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.

3. Gut W, Siennicka J, Sadowska-Todys M, i in. Występowanie przeciwciał klasy IgG swoistych dla hantawirusów w populacji pracowników leśnych i zoologów. *Przeegl Epid* 2007;3 (w druku).
4. Ahlm C, Juto P, Stegmayr B i in. Prevalence of serum antibodies to hantaviruses in northern Sweden as measured by recombinant nucleocapsid proteins. *Scand J Infect Dis* 1997;29:349-54.
5. 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.
6. Sibold C, Ulrich R, Labuda M i in. Dobrava hantavirus causes hemorrhagic fever with renal syndrome in central Europe and is carried by two different Apodemus mice species. *J Med Virol* 2001;63:158-67.
7. Avsic-Zupanc T, Nemirov K, Petrovec M i in. Genetic analysis of wild-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J Gen Virol* 2000;81:1747-55.
8. Sironen T, Vaheri A, Plyusnin A. Phylogenetic evidence for the distinction of Saaremaa and Dobrava hantaviruses. *Virol J* 2005;2:90-.
9. Dzagurova TK, Tkachenko EA, Petrov VA. Effectiveness of using cultured antigens for the serodiagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome by the immunofluorescence method. *Vopr Virusol* 1988; 33:71-5.
10. Gut W, Kańtoch M. Diagnostyczne badania wirusologiczne: aktualne możliwości i problemy. *Post. Nauk Med* 1996;9:174-179.
11. Panasiak W, Wleklík M, Oraczewska A, i in. Serological studies of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Poland. Preliminary report. *Acta Microbiol Pol* 1989;38:63-7.
12. Song JW, Baek LJ, Song KJ i in. Characterization of Tula virus from common voles (*Microtus arvalis*) in Poland: evidence for geographic-specific phylogenetic clustering. *Virus Genes* 2004;29:239-47.

Otrzymano: 11.07.2007 r.

**Adres autora:**

Doc. dr hab. med. Włodzimierz Gut  
Zakład Wirusologii  
Państwowego Zakładu Higieny  
Ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa  
Tel. +48 22 54 21 230