

Joanna Siennicka, Agnieszka Częścik, Agnieszka Trzcńska

## ZNACZENIE EPIDEMIOLOGICZNE BADANIA POZIOMU PRZECIWCIAŁ ODROWYCH OZNACZANYCH METODĄ IMMUNOENZYMATYCZNĄ (EIA) I TESTEM NEUTRALIZACJI (PRNT)

Zakład Wirusologii  
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

### STRESZCZENIE

W pracy omówiono rolę przeciwciał odrowych w kształtowaniu odporności oraz znaczenie epidemiologiczne oznaczania ich różnymi metodami serologicznymi. Dokonano porównania poziomu przeciwciał przeciwko wirusowi odry oznaczanych metodą immunoenzymatyczną (EIA) i testem neutralizacji (PRNT). Stwierdzono, że poziom przeciwciał wynoszący 200 mIU/ml oznaczanych testem neutralizacji PRNT uznawany za poziom chroniący przed kliniczną postacią odry odpowiada 636 mIU/ml przeciwciał wykrywanych metodą EIA, testem Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgG.

**Słowa kluczowe:** Program Eliminacji Odry, jednostki międzynarodowe, *anty-MeV Abs*

### WSTĘP

Strategiczny plan Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dla Regionu Europejskiego zakłada eliminację odry i różyczki wrodzonej do roku 2020 (1). Powodzenie tego planu zależy od osiągnięcia i utrzymania wysokiego poziomu odporności w populacji. Badania serologiczne są ważnym narzędziem do jej oceny, przy czym, wobec złożoności odpowiedzi immunologicznej na zakażenie wirusem odry, istotne znaczenie ma poprawna interpretacja wyników oznaczeń serologicznych.

Chociaż poziom przeciwciał przeciwko wirusowi odry (*anty-MeV Abs*) zapewniający ochronę przed zakażeniem lub chorobą jest nadal przedmiotem dyskusji, to w oparciu o obserwacje dokonane podczas epidemii odry wykazano, że obecność przeciwciał oznaczanych testem neutralizacji PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*) o mianie niższym od 120 (co odpowiada 200 mIU/ml) nie chroniła przed zachorowaniem, obecność przeciwciał o mianie wyższym niż 120 ale niższym od 1 052 stanowiła ochronę przed wystąpieniem pełnoobjawowej postaci odry, ale nie chroniła przed chorobą o łagodnym przebiegu klinicznym, natomiast poziom przeciwciał o mianie wyższym niż 1 052 (co odpowiada 1 841 mIU/ml) wskazywał na pełną ochronę (2,3,4). Jakkolwiek klasyczny test neutralizacji PRNT jest po-

wszechnie uznawany za „złoty standard” w badaniach serologicznych dotyczących zakażenia wirusem odry, to z uwagi na to, że jest to metoda pracochłonna, czasochłonna i wymagająca specjalistycznego zaplecza laboratoryjnego, jej zastosowanie jest ograniczone. Podejmowane są wysiłki mające na celu ulepszenie testu PRNT. Jedną z takich modyfikacji (*Plaque Reduction Microneutralization assay* – PRMN) polega na wykorzystaniu do reakcji neutralizacji rekombinowanego wirusa odry z ekspresją białka EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) i pomiarze fluorescencji pod mikroskopem lub w wersji automatycznej - w czytniku (5). Inną modyfikacją to immunoenzymatyczny test neutralizacji (Nt-EIA) w którym do pomiaru zahamowania replikacji wirusa odry w komórkach Vero w obecności przeciwciał mających zdolności do neutralizacji (Nt) zakaźnych właściwości wirusa, wykorzystywany jest standardowy test immunoenzymatyczny (EIA) (6). Pomimo tego, że dzięki modyfikacjom oznaczanie przeciwciał neutralizujących nie jest tak czasochłonne, jak w przypadku klasycznego testu PRNT, nie zmienia to faktu, że najczęściej stosowaną techniką w badaniach serologicznych, zarówno rutynowych, diagnostycznych jak i tych do celów epidemiologicznych, pozostaje metoda immunoenzymatyczna (EIA). Przy stosowaniu EIA do oceny odporności należy jednak mieć na uwadze różnice między metodą immunoenzymatyczną a testem

neutralizacji dotyczące rodzaju wykrywanych przeciwciał (zależność między różnymi typami anti-MeV Abs przedstawiono graficznie na rycinie 1): a) podczas gdy PRNT wykrywa przeciwciała neutralizujące zakaźne właściwości wirusa (Nt-Abs), które są produkowane dla białek powierzchniowych wirusa czyli dla hemagglutyniny (H) i białka fuzyjnego (F), to test EIA wykrywa przeciwciała dla wszystkich białek wirusowych; b) EIA wykrywa przeciwciała określonej klasy (IgG lub IgM lub IgA), podczas gdy PRNT wykrywa przeciwciała neutralizujące (Nt-Abs) reprezentujące różne klasy przeciwciał; c) najliczniej produkowanymi przeciwciałami w odpowiedzi na zakażenie wirusem odry lub szczepienie są przeciwciała dla nukleokapsydu wirusa (N), które nie mają właściwości neutralizujących, a w konsekwencji ochronnych. Białko N jest również najobficiej syntetyzowane w czasie replikacji i stąd też jest głównym antygenem wiążącym przeciwciała w EIA, ponieważ dołki płytek opłaszczane są lizatem zakażonych komórek.

Celem pracy było porównanie wyników oznaczania w standaryzowanych próbkach obecności przeciwciał odrowych metodą immunoenzymatyczną (EIA) i testem neutralizacji (PRNT) oraz wyznaczenie poziomu ochronnego anti-MeV Abs dla oznaczeń prowadzonych metodą EIA przy użyciu komercyjnego zestawu używanego w Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH.

#### MATERIAŁ I METODY

W badaniach wykorzystano test Enzygnost®Anti-Measles Virus/IgG (Simens, dawniej DadeBehring, Niemcy), rutynowo stosowany w Laboratorium Zakładu Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowym Zakładzie Higieny (NIZP-PZH). Badania przeprowadzono na zestawach pochodzących z dwóch cykli produkcji o numerach serii: 41961 i 42196.

Oznaczenia wykonywano zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Procedura ta umożliwia określenie poziomu przeciwciał (badanie ilościowe) poprzez zmierzenie gęstości optycznej (OD) pojedynczego rozcieńczenia surowicy w dołku testowym (opłaszczonym lizatem komórek zakażonych wirusem odry) i dołku referencyjnym (opłaszczonym lizatem niezakażonych komórek). Różnica pomiędzy zmierzonymi wartościami OD ( $\Delta OD$ ) pomnożona przez współczynnik korekcji (iloraz średniej wartości  $\Delta OD$  dla kontroli pozytywnej i wartości nominalnej określanej przez producenta) stanowi podstawę do jakościowej oceny wyniku według następujących wartości odcięcia: dla  $\Delta OD < 0,100$  wynik negatywny, dla  $\Delta OD$  w zakresie  $0,100 - 0,200$  wynik wątpliwy, dla  $\Delta OD > 0,200$  wynik pozytywny. Poziom przeciwciał anti-MeV IgG (badanie ilościowe) obliczano ze wzoru:  $\log_{10} \text{mIU/ml} = \alpha * \Delta OD^\beta$ , gdzie  $\alpha$  i  $\beta$  są stałymi zależnymi od serii zestawu określanymi

przez producenta. Wyniki oznaczeń ilościowych wyrażono w mIU/ml.

Badania kalibracyjne wykonano przy użyciu trzeciego międzynarodowego standardu (3rd WHO International Standard for Anti-Measles, NIBSC 97/648) (7) zawierającego 3 000 mIU/ml przeciwciał przeciwko wirusowi mierzonych testem neutralizacji (PRNT). Ze standardem postępowano zgodnie z dołączoną instrukcją. Liofilizat rozpuszczono w 1 ml destylowanej wody, rozporcejowano i przechowywano w temperaturze  $-70^\circ\text{C}$ . Sporządzano szereg pięciu dwukrotnych rozcieńczeń standardu i oznaczano poziom anti-MeV IgG testem EIA Enzygnost®Anti-Measles Virus/IgG. W oparciu o wyniki uzyskane w czterech niezależnych eksperymentach, w których serie rozcieńczeń standardu były badane w trzech powtórzeniach otrzymano krzywą kalibracyjną (mIU-EIA *versus* mIU-PRNT).

#### WYNIKI

W wyniku sporządzenia serii dwukrotnych rozcieńczeń standardu otrzymano pięć próbek o następującym stężeniu przeciwciał anti-MeV mierzonym testem neutralizacji PRNT: 3 000, 1 500, 750, 375 i 187,5 mIU/ml. Cztery próbki o najwyższym stężeniu były dodatnie w teście EIA. Wartość  $\Delta OD$  dla tych próbek (średnia i odchylenie standardowe dla 12 oznaczeń) wyniosła  $0,955 \pm 0,28$ ;  $0,728 \pm 0,35$ ;  $0,568 \pm 0,21$ ;  $0,406 \pm 0,20$ , odpowiednio. Dla próbki o najniższym stężeniu przeciwciał anti-MeV (187,5 mIU/ml) w teście EIA uzyskano wynik wątpliwy o wartości  $\Delta OD 0,198 \pm 0,11$ . Zależność pomiędzy poziomem (mIU/ml) przeciwciał anti-MeV oznaczonych metodą EIA i testem neutralizacji PRNT przedstawiono na rycinie 2. Stworzoną w modelu regresji liniowej krzywą kalibracyjną przedstawiono na rycinie 3. Zależność między badanymi wartościami opisuje wzór funkcji liniowej:  $\text{mIU/ml-EIA} = 332,7 + 1,5 * \text{mIU/ml-PRNT}$  ( $r^2 = 60,9\%$ ,  $R = 0,78$ ,  $p = 0,000$ ).

#### DYSKUSJA

Ze względu na takie zalety jak niska praco- i czasochłonność, niskie koszty oraz brak wysokich wymagań technicznych, metoda immunoenzymatyczna (EIA) jest najczęściej stosowaną techniką laboratoryjną w badaniach serologicznych. W prezentowanej pracy dokonano porównania poziomu przeciwciał dla wirusa odry oznaczanych testem Enzygnost z poziomem uzyskanym w teście neutralizacji. Otrzymane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów (5,8), że poziom ten w EIA jest wyższy w porównaniu z PRNT. W przeprowadzonym przez nas doświadczeniu 200

mIU/ml anty-MeV Abs oznaczanych testem neutralizacji PRNT odpowiadał 636 mIU/ml przeciwciał w EIA, czego przyczyną są różnice między metodami dotyczące rodzaju wykrywanych przeciwciał.

Chociaż pytanie o ochronny poziom przeciwciał przeciwko wirusowi odry nadal pozostaje otwarte, to przyjmuje się, że 200 mIU/ml przeciwciał neutralizujących chroni przed wystąpieniem pełnoobjawowej postaci choroby (3). Poziom ten oznaczany metodą EIA będzie wyższy i jak wykazano w badaniu ESEN (*European Sero-Epidemiology Network*), różny w zależności od użytego testu (10). W związku z tym, że dostępnych jest wiele różnych komercyjnych zestawów EIA, przeprowadzenie badań kalibracyjnych jest w wysokiej mierze uzasadnione. Spośród dostępnych na rynku zestawów, Enzygnost (produkcji Simens, dawniej DadeBehring) charakteryzuje się najlepszymi parametrami (9) i z tego też powodu jest używany w Krajowych Laboratoriach Referencyjnych WHO wielu państw (10). Wyniki prezentowanej pracy potwierdzają obserwacje opisane przez Janaszek i współ (11), którzy za poziom ochronny przyjęli wartość 500 mIU/ml oznaczanych testem ELISA-Behringwerke<sup>TM</sup>, dawniej DadeBehring, a obecnie Simens, który to poziom jest nieznacznie niższy niż ten, określony w tej pracy na 636 mIU/ml.

Ograniczeniem tej pracy może być zastosowanie do badań kalibracyjnych trzeciego międzynarodowego standardu, który nie jest rekomendowany przez WHO w odniesieniu do testów ELISA (12). Należy jednak zauważyć, że wspomniana rekomendacja dotyczy stosowania wartości tworzącej jednostkę w tym systemie pomiaru (ang. *unitage*), która to wartość jest prawdziwa w odniesieniu do testu neutralizacji, ale nie testu ELISA.

Tak więc nie o użycie standardu jako takiego, a o użycie jego jednostek chodzi, i w tym rozumieniu przeprowadzone i opisane w przedłożonej pracy doświadczenie w niczym nie narusza rekomendacji WHO, a co więcej, potwierdza jej zasadność, wskazując na rozbieżności w wynikach uzyskanych różnymi metodami.

Chociaż przeciwciała stanowią ważny element ochrony przed odrą, a ich pomiar pozwala wnioskować na temat odporności, to należy podkreślić, że mechanizmy odpowiedzialne za wytworzenie tej odporności są dużo bardziej złożone i nie podlegają prostej zasadzie „wszystko albo nic”, (*all-or-none phenomenon*) (2). Potwierdzają to wyniki najnowszych badań, które wskazują na niezależność pomiędzy wirusowo-swoistą odpowiedzią humoralną i komórkową na zakażenie wirusem odry (13,14).

## WNIOSKI

Poziom przeciwciał wynoszący 200 mIU/ml oznaczanych testem neutralizacji PRNT uznawany za poziom chroniący przed kliniczną postacią odry (3) odpowiada 636 mIU/ml przeciwciał wykrywanych metodą EIA, testem Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgG.

Otrzymano: 17.02.2014 r.

Zaakceptowano do publikacji: 23.07.2014 r.

### Adres do korespondencji:

Dr hab. Joanna Siennicka, prof. nadzw. NIZP-PZH  
Zakład Wirusologii NIZP-PZH  
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa  
e-mail: [jsiennicka@pzh.gov.pl](mailto:jsiennicka@pzh.gov.pl)

