

*Iwona Binduga-Gajewska, Włodzimierz Gut, Zdzisław Jarząbek*

## BADANIA WIRUSOLOGICZNE UDZIAŁU ENTEROWIRUSÓW NIEPOLIOMYELITYCZNYCH W ZAKAŻENIACH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO W POLSCE W LATACH 1995–2000

Zakład Wirusologii Państwowego Zakładu Higieny  
Kierownik Zakładu: Bogumiła Litwińska

*Izolacja wirusa jest podstawą klasycznej diagnostyki zakażeń enterowirusami. Jest ona nadal niezbędna w pracy, w laboratoriach zajmujących się problematyką enterowirusów, gdyż dostarcza szeregu istotnych informacji, m. in. na temat krążenia szczepów należących do poszczególnych typów.*

*Celem przedstawionej pracy jest wstępna ocena diagnostyki opartej o metodę izolacji wirusa wykonywanej w kilku Pracowniach Wirusologicznych WSSE w Polsce.*

*Słowa kluczowe: niepoliomyelityczne enterowirusy, izolacje*

*Key words: nonpoliomyelitic enteroviruses, isolations*

### WSTĘP

Rodzaj *Enterovirus* obejmuje znaczną liczbę wirusów (blisko 70 odmiennych serotypów) należących do rodziny *Picornaviridae* (1). W klimacie umiarkowanym zakażenia wywołane przez enterowirusy mają charakter sezonowy i występują głównie w miesiącach letnich i jesiennych, najczęściej u dzieci (2, 3, 4, 5).

Pomimo, że metoda izolacji wirusa jest zastępowana przez nowoczesne metody diagnostyczne oparte o reakcję RT-PCR (5–12), izolacja pozostaje metodą niezbędną do pracy w laboratoriach zajmujących się problematyką enterowirusów, gdyż dostarcza szeregu istotnych informacji m. in. o krążeniu szczepów należących do poszczególnych typów, jak i dominacji określonych typów enterowirusów w sezonach epidemicznych. Od wiarygodności tej metody zależy właściwe rozeznanie sytuacji zakażeń enterowirusami.

W związku z tym, celem przedstawionej pracy jest wstępna ocena poprawności diagnostyki wirusologicznej (izolacji wirusa) wykonywanej w Pracowniach Wirusologicznych kilku Wojewódzkich Stacji Sanitarnej-Epidemiologicznych (WSSE) w Polsce.

### MATERIAŁ I METODY

Analizę wyników badań wirusologicznych przeprowadzonych u chorych z wirusowymi neuroinfekcjami w latach 1995–2000 na terenie Polski, wykonano na podstawie sprawoz-

dań rocznych przesyłanych przez Pracownie Wirusologiczne WSSE do Zakładu Wirusologii PZH. Należy podkreślić, że przysyłanie danych przez WSSE miało charakter nieobowiązkowy. Zawarte w nich informacje obejmowały: wiek, płeć, datę pobrania pierwszej próbki materiału diagnostycznego, rodzaj materiału diagnostycznego, wynik badania wirusologicznego i serologicznego oraz rozpoznanie. Zgromadzone dane pochodziły tylko z sześciu na 16 zajmujących się tą problematyką Pracowni Wirusologicznych WSSE.

Zgromadzono informacje dotyczące 2 719 przypadków zachorowań z potwierdzonym (izolacją albo badaniem serologicznym) lub wysoce prawdopodobnym (rozpoznanie kliniczne oraz dane epidemiologiczne przy braku potwierdzenia zakażenia innym czynnikiem) zakażeniem enterowirusami. Udział enterowirusa w zachorowaniu potwierdzano metodą izolacji lub oznaczeniami miana swoistych przeciwciał przeciw enterowirusom, przeprowadzonymi odczynem wiązania dopełniacza (OWD) lub odczynem neutralizacji (ON). Nie uzyskano natomiast informacji dotyczących ogólnej liczby badań przeprowadzonych w poszczególnych WSSE. Spośród tych zachorowań analizie poddano 1496 przypadków, w których rozpoznanie dotyczyło schorzenia ośrodkowego układu nerwowego. Rozpoznanie obejmowały zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (zomr; 831 przypadków = 55,55% wszystkich obserwacji), zapalenie mózgu (zm; 7,02% ogółu), inne nieokreślone zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (21,12%) oraz inne określone schorzenia oun tj. zespół Guillain-Barre, porażenia nerwu twarzowego, porażenia kończyn dolnych, zapalenie nerwu czaszkowego, zapalenie wielonerwowe, porażenia wiotkie (16,31%).

Analizę związków pomiędzy zjawiskami jakościowymi przeprowadzono metodą Fisher i  $\chi^2$  a relację związków ilościowych metodą analizy regresji. Do analiz użyto programu Statgrafic for Windows 1.4.

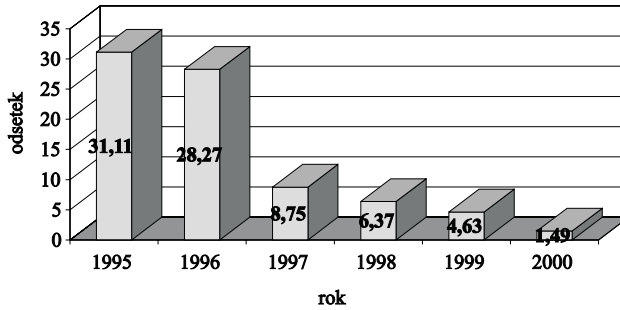
## WYNIKI

### Izolacje enterowirusów z przypadków aseptycznych neuroinfekcji

Z uzyskanych z Pracowni Wirusologicznych 6 WSSE sprawozdań, wynika, że w okresie 1995–2000 przeprowadzono w nich 1429 prób izolacji enterowirusów z próbek kału osób z aseptycznymi zakażeniami oun. Najwięcej dodatnich prób izolacji przypada na rok 1995 i 1996, kiedy dodatni wynik izolacji uzyskano odpowiednio dla 31,11% i 28,27% podjętych prób wyizolowania enterowirusa z omawianych przypadków. Od 1997 roku obserwuje się znaczny spadek częstości udanych izolacji enterowirusów. Ujemne wyniki izolacji stanowią ponad 90% omawianych przypadków. W 2000 roku na 268 przeprowadzonych próbach izolacji ujemny wynik uzyskano dla 264 próbek, co stanowiło 98,51% wszystkich podjętych prób izolowania enterowirusa w przypadkach aseptycznych zakażeń oun. Dodatni wynik uzyskano w tym roku tylko dla 1,5% podjętych prób izolacji enterowirusa od osób chorych z aseptycznymi neuroinfekcjami (ryc. 1).

### Częstość izolacji Echo typ 30 w stosunku do izolacji innych enterowirusów

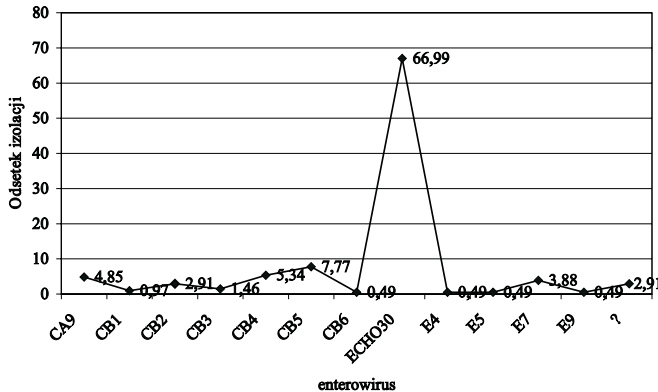
W wymienionych laboratoriach od 138 chorych (z 203, od których wyizolowano enterowirusy) izolowano echowirus typu 30, co stanowiło ponad 60% wszystkich udanych prób izolacji enterowirusów w badanym okresie. Ponad 70% wszystkich udanych izolacji przypadało na rok 1996 i w przeważającej mierze dotyczyło izolacji wirusa Echo typ 30. Rok



Ryc. 1. Odsetek dodatknych izolacji enterowirusów w latach 1995-2000 od chorych z neuroinfekcjami wirusowymi (w stosunku do liczby podjętych prób).

Fig. 1. Frequency of enterovirus isolation in period 1995-2000y. (ratio number of isolation to number of tested materials).

1998 był kolejnym rokiem dominacji tego wirusa, którego izolacje stanowiły ponad 87% wszystkich izolacji enterowirusów. Po 1998 roku nie odnotowano żadnego przypadku izolacji tego serotypu. W kolejnych latach izolacje pozostałych enterowirusów sprowadzały się do pojedynczych przypadków. Jednocześnie w latach, w których izolacje echowirusa typu 30 były dominujące w stosunku do izolacji pozostałych serotypów enterowirusów, odnotowano 2–3-krotny wzrost zachorowań na zomr (13). Częstość izolacji poszczególnych typów enterowirusów w latach 1995–2000 pokazuje ryc. 2.



Ryc 2. Częstość izolacji poszczególnych enterowirusów z przypadków neuroinfekcji w latach 1995–2000.

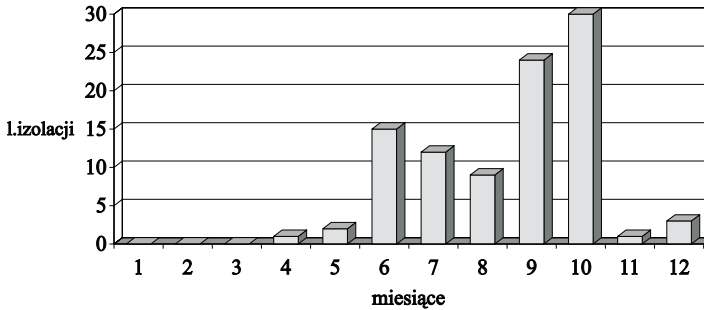
**Użyte skróty:** CA9: Coxsackie A typ 9; CB1: Coxsackie B typ 1; CB2: Coxsackie B typ 2; CB3: Coxsackie B typ 3; CB4: Coxsackie B typ 4; CB5: Coxsackie B typ 5; CB6: Coxsackie B typ 6; ECHO30: echowirus typ 30; E4: echowirus typ 4; E5: echowirus typ 5; E7: echowirus typ 7; E9: echowirus typ 9; ?: nieokreślone enterowirusy.

Fig 2. Frequency of enteroviruses types isolated in period 1995–2000y.

**Abbreviations:** CA9: Coxsackie A type 9; CB1: Coxsackie B type 1; CB2: Coxsackie B type 2; CB3: Coxsackie B type 3; CB4: Coxsackie B type 4; CB5: Coxsackie B type 5; CB6: Coxsackie B type 6; ECHO30: echovirus type 30; E4: echovirus type 4; E5: echovirus type 5; E7: echovirus type 7; E9: echovirus type 9; ?: undetermined.

### Sezonowość izolacji enterowirusów

Izolacje enterowirusów odnotowano od kwietnia do grudnia, przy czym w miesiącach wiosennych (kwiecień–maj) i jesienno-zimowych (listopad–grudzień) izolacje ograniczone były do pojedynczych przypadków. Najwięcej przypadków udanych izolacji przypadało na okres od czerwca do października. Najczęściej izolowanym enterowirusem w okresie lat 1995–2000 był Echo typ 30 (ryc. 2). Częstość dodatnich wyników izolacji na przestrzeni roku kalendarzowego obrazuje rycina 3.



Ryc. 3 Liczba izolacji enterowirusów w poszczególnych miesiącach.

Fig 3. Number of enteroviruses isolated in different months

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wśród stosowanych metod diagnostyki zakażeń enterowirusami metoda izolacji wirusa w hodowli komórkowej ciągle pozostaje tzw. złotym standardem (z ang. *gold standard*) w odniesieniu do pozostałych metod. Dostarcza ona szeregu użytecznych informacji epidemiologicznych m. in. o krążących szczepach i dominacji typów enterowirusów w sezonach epidemicznych i dlatego jest nadal stosowana, pomimo braku przydatności do celów szybkiej diagnostyki zakażeń enterowirusami (2, 4, 12). Składa się na to wiele czynników, począwszy od długiego czasu oczekiwania na wynik izolacji, po konieczność wykonania badania przez personel posiadający kompetencje do pracy z hodowlami komórkowymi i materiałami zakaźnymi. Dochodzą do tego trudności wynikające z biologii i wymagań wirusa, np. niektóre serotypy enterowirusów, zwłaszcza Coxsackie A, nie namnażają się w hodowlach komórkowych (14, 15, 16). Trudności te są potęgowane przez niewłaściwe przechowywanie i opracowywanie próbek materiału zawierającego wirusy.

Szacuje się, że ujemne wyniki izolacji wirusa z materiałów klinicznych, pobranych od pacjentów z charakterystycznymi objawami zakażenia enterowirusem, sięgają 35% przypadków (14, 15). Analiza danych epidemiologicznych dotyczących neuroinfekcji wywołanych przez enterowirusy w latach 1995–2000 na terenie Polski, przeprowadzona na podstawie danych przesyłanych przez WSSE do Zakładu Wirusologii PZH wykazała, że najwięcej dodatnich prób izolacji przypada na rok 1995 i 1996. W tych latach pozytywny wynik izolacji uzyskano dla odpowiednio 31% i 28% podjętych prób wyizolowania enterowirusa z próbek kału od osób z objawami aseptycznych zakażeń oun. Jednocześnie najwięcej dodatnich prób izolacji enterowirusów przypadało na miesiące letnie i jesienne co potwierdza typowy dla tej grupy patogenów w strefie klimatu umiarkowanego sezonowy cha-

rakter zachorowań (9). Od roku 1997 obserwuje się drastyczny spadek częstości udanych izolacji w stosunku do przeprowadzonych prób izolacji wirusa. Ujemne próby izolacji stanowią ponad 90% wszystkich przypadków. W roku 2000 dodatni wynik uzyskano dla 1,5% podjętych prób wyizolowania enterowirusa. Podkreślić należy, że analizowane dane dotyczyły przypadków zachorowań z potwierdzonym/wysokie prawdopodobnym enterowirusowym charakterem zakażenia, a izolacje enterowirusów prowadzono głównie z kału. Powszechność zakażeń enterowirusami, które w przeważającym odsetku mają charakter bezobjawowy i związana z tym ich częsta obecność w kale u osób zdrowych, wpłynęła na decyzję Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), wg której wskaźnikiem poprawności pracy laboratoriów prowadzących izolacje enterowirusów jest 5–10% poziom udanych izolacji enterowirusów z kału osób zdrowych (17). Biorąc pod uwagę wspomniane szacunki WHO, odsetek udanych izolacji w omawianych przypadkach powinien być wyższy.

W prawidłowo prowadzonej diagnostyce enterowirusów, izolacja wirusa powinna być uzupełniona określeniem przyrostu miana przeciwciał neutralizujących izolowanego wirusa w dwóch próbkach surowicy, pobranych w ostrej i rekonwalescencyjnej fazie choroby. Przy braku izolacji wirusa w surowicach określa się przyrost przeciwciał dla dominującego w danym sezonie typu enterowirusa oraz innych wirusów krążących w populacji, ustalonych na podstawie częstości wywoływanych przez nie zachorowań. Przeprowadzenie dokładniejszej analizy wymaga użycia blisko 70 szczepów wirusowych i z tego względu nie jest stosowane w rutynowej pracy laboratoriów diagnostycznych. W sytuacji, w której udane izolacje stanowią tak niski odsetek przeprowadzonych prób izolacji istnieje poważne niebezpieczeństwo, że zmiany profilu serotypów zakażających populację mogą nie zostać zauważone i badania serologiczne będą prowadzona dla innych enterowirusów niż rzeczywiście krążące i wywołujące zakażenia w populacji.

Przedstawiona wstępna ocena wyników badań wirusologicznych wykonanych w 6 Pracowniach Wirusologicznych WSSE wskazuje na znacznie zaniżony odsetek izolacji enterowirusów z próbek kału. Przyczyny mogą się wiązać z pobieraniem, przesyłaniem i przechowywaniem materiału diagnostycznego, stosowaniem niewłaściwych procedur laboratoryjnych, linii komórkowych i drobnego sprzętu laboratoryjnego. Utrzymanie ale i usprawnienie diagnostycznych badań wirusologicznych w kierunku enterowirusów jest ważne, ponieważ badania te są wykonywane w Polsce tylko w Pracowniach Wirusologicznych WSSE i w Zakładzie Wirusologii PZH.

Powyższa analiza podkreśla rolę izolacji w monitorowaniu krążenia szczepów enterowirusów i konieczność optymalizacji tej procedury diagnostycznej. Jednocześnie autorzy prezentowanej pracy mają świadomość, że pełna ocena sytuacji w diagnostyce zakażeń enterowirusowych w Polsce wymaga przeanalizowania wyników uzyskiwanych we wszystkich laboratoriach prowadzących tego typu działalność.

*I Binduga-Gajewska, W Gut, Z Jarząbek*

#### PARTICIPATION OF NONPOLIOMYELITIC ENTEROVIRUSES IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM INFECTIONS IN POLAND IN 1995–2000 VIRAL ISOLATION DATA

#### SUMMARY

The aim of this study was evaluation of enterovirus diagnosis based on isolation of the virus in cell culture from subjects with aseptic neuroinfection conducted in six Provincial Sanitary-Epidemiolog-

ical Stations in 1995-2000 years. Available data from six Sanitary-Epidemiological Stations indicated that 1429 isolation of enteroviruses from fecal samples of those patients were performed. The most frequently isolated enterovirus serotype was echovirus type 30: 138/203 isolated enteroviruses, but also others enterovirus serotypes were isolated in a study period. In the years 1995 and 1996 the percentage of positive results of isolation was highest with the numbers of 31% and 28,27% respectively. The decrease in positive isolation results has been observed from 1997 year. Negative results of isolation come up to 90% of investigated cases. Only 1,5% of enterovirus isolation attempts finished successfully in 2002 year. The situation when percentage of positive results of isolation is on so low level, the natural alterations in a profile of enterovirus serotype infected population cannot be observed, and serological investigations can be conducted for enterovirus serotypes others than really circulating and causing infections in population.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report on the international committee on taxonomy of viruses, eds. MHV von Regenmortel, CM Fauguet, DHL Bishop, Academic Press, 2000.
2. Binduga-Gajewska I, Gut W: Diagnostyka zakażeń enterowirusami nie-poliomyelitycznymi-aktualne kierunki i problemy. *Post. Mikrobiol.* 2002;41,367-81.
3. Jarząbek Z: Zakażenia enterowirusami poza poliomyelitis; w: Zakażenia i zarażenia człowieka. *Epidemiologia, zapobieganie i zwalczanie*, red. W. Magdzik i D. Naruszewicz-Lesiuk, PZWL. Warszawa, 2001;477-83.
4. Muir P, Kämmerer U, Korn K, Mulders MN, Pöyry T, Weissbrich B, Kandolf R, Cleator GM, van Loon AM: Molecular typing of Enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11,202-27.
5. Rotbart HA: Viral meningitis. *Semin. Neurol.* 2000;20,277-92.
6. Binduga-Gajewska I, Gut W, Wielkopolaska A, Jarząbek Z: Zastosowanie metody RT-PCR i nested-PCR do wykrywania zakażeń enterowirusami. *Med. Doś. Mikrobiol.* 1999;51,375-81.
7. Chesky M., Scalco R., Failace L., Read S., Jobim LF.: Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2000,58,836-42.
8. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A: Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J. Clin. Virol.* 2003;26,1-28.
9. Jeffery KJM, Read SJ, Peto TEA: Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. *The Lancet* 1997;349,313-17.
10. Read SJ, Mitchell JL, Fink CG: LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infection of the central nervous system. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39,3056-59.
11. Stellrecht KA, Harding I, Woron AM, Lepow ML, Venezia RA: The impact of an enteroviral RT-PCR assay on the diagnosis of aseptic meningitis and patient management. *J. Clin. Virol.* 2002;25,S19-S26.
12. Vleit KE, Muir P, Echevarria JM, Klapper PE, Cleator GM, van Loon AM: Multicenter proficiency testing of nukleic acid amplification methods for the detection of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2001,9,3390-3392
13. Żabicka J.: Meningitis and encephalitis in Poland 1997. *Przeg. Epid.* 1999;53,57-66.
14. Lipson SM, Walderman R, Costello P, Szabo K: Sensitivity of rhabdomyo-sarcoma and guinea pig embryo cell cultures to field isolates of difficult-to-cultivate group A coxsackieviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26,1298-303.
15. Chonmaitree T, Ford MC, Sanders C, Lucia HL: Comparison of cell cultures for rapid isolation enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26,2576-80.
16. Sawyer MH.: Enterovirus infections: diagnosis and treatment. *Curr. Opin. Pediatr.* 2001,1,65-9.
17. World Health Organisation. Accreditation of Global Polio Network Laboratories. Accreditation of National Poliovirus Laboratories. WHO/EPI, Geneva, 1997.

**Adres autorów:**

Włodzimierz Gut  
Zakład Wirusologii  
Państwowy Zakład Higieny  
Ul Chocimska 24 00-791 Warszawa  
tel. +022-54 21 283; e-mail wgut@pzh.gov.pl

**Podziękowanie:** Autorzy dziękują kierownictwu Pracowni Wirusologicznych WSSE w Białymstoku, Lublinie, Łodzi, Olsztynie, Piotrkowie Trybunalskim, Poznaniu za udostępnienie informacji o wykonywanych w ich laboratoriach badaniach diagnostycznych w kierunku enterowirusów.