

Agata Makówka, Bogumiła Litwińska

BADANIA WIRUSOLOGICZNE I MOLEKULARNE W NADZORZE
EPIDEMIOLOGICZNYM NAD ZACHOROWANIAMI NA ODRE W POLSCE
W 2006 ROKU

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład
Higieny
Kierownik Zakładu: Bogumiła Litwińska

Ocena stopnia eliminacji i nadzór epidemiologiczny nad zachorowaniami na odrę możliwe są dzięki badaniom wirusologicznym, a zwłaszcza molekularnym. W pracy przedstawiono metody oraz wyniki izolacji wirusa odry w hodowli komórkowej próbek klinicznych pochodzących od pacjentów z podejrzeniem odry, wyniki wykrywania genomu wirusa metodą RT-PCR oraz genotypowania.

Słowa kluczowe: odra, izolacja, wykrywanie genomu, genotypowanie, nadzór epidemiologiczny, Polska

Key words: measles, isolation, detection of genome, genotyping, epidemiological surveillance, Poland

WSTĘP

Wprowadzenie w Polsce w roku 1975 szczepień przeciwko odrze dzieci w wieku 13-15 miesiąca życia spowodowało ograniczenie transmisji wirusa odry (1). Po 1998 r. zanotowano poniżej 150 zachorowań rocznie. W latach 2004 i 2005 zarejestrowano zaledwie odpowiednio 11 i 13 przypadków odry. Istnieje możliwość eliminacji rodzimych zachorowań na odrę w Regionie Europejskim WHO w terminie określonym przez Regionalny Komitet Europejski, czyli do roku 2010 (3). Jednym z warunków stopniowej eliminacji jest utrzymanie wysokiego odsetka zaszczepienia ludności. Co kilka lat odnotowuje się tzw. epidemie wyrównawcze, spowodowane nagromadzeniem na danym terenie liczby osób wrażliwych na odrę, wystarczającej do utrzymania transmisji wirusa. Możliwe jest również występowanie zachorowań na odrę zawleczonych z krajów endemicznych. W 2006 r. w Polsce odnotowano wzrost do 120 przypadków podejrzanych o zachorowanie na odrę (4,5). Obecnie zachorowania na odrę często mają nietypowy przebieg i są mylone z różyczką, co powoduje że są rzadko zgłaszane przez lekarzy pierwszego kontaktu. Dlatego niezbędne jest usprawnienie nadzoru epidemiologicznego nad zachorowaniami na odrę, zwiększenie liczby wykonywanych

oznaczeń serologicznych, rozszerzenie badań laboratoryjnych o metody wirusologiczne i molekularne w celu potwierdzenia przypadków podejrzeń, jak również określenia genotypu krążących wirusów.

Metoda izolacji wirusa w hodowli komórkowej, stosowanie techniki RT-PCR oraz sekwencjonowanie kwasu nukleinowego są użytecznymi technikami, ponieważ umożliwiają przeprowadzenie genetycznej charakterystyki dzikich szczepów wirusa odry. Ma to istotne znaczenie w nadzorze epidemiologicznym, gdyż znajomość sekwencji nukleotydów genomu pozwala na zidentyfikowanie źródeł zakażenia i rozróżnienie pomiędzy rodzimymi i importowanymi zachorowaniami. W rutynowej diagnostyce laboratoryjnej nie jest obligatoryjne stosowanie badań wirusologicznych, lecz stanowią one jej uzupełnienie (6).

W pracy przedstawiono wyniki badań prowadzonych w ramach nadzoru nad zachorowaniami na odrę w 2006 roku. Badania serologiczne oraz izolację wirusa odry w hodowli komórkowej Vero/SLAM wykonano w Zakładzie Wirusologii NIZP-PZH, które jest Narodowym Laboratorium d.s. Diagnostyki Odry i Różyczki, akredytowanym przez WHO. Badania molekularne (RT-PCR oraz genotypowanie) zostały przeprowadzone w Instytucie Roberta Kocha w Berlinie, które pełni funkcję Regionalnego Laboratorium Referencyjnego WHO.

Celem pracy jest przedstawienie oraz wstępna ocena metody izolacji wirusa odry w hodowli komórkowej, wyników RT-PCR oraz molekularnego genotypowania wirusów odry pochodzących z przypadków zachorowań na odrę w Polsce w 2006 roku.

MATERIAŁ I METODY

Badane próbki kliniczne

Odpowiednim materiałem do izolacji wirusa są: komórki z wymazu z gardła chorego, leukocyty izolowane z krwi oraz mocz pobrane w pierwszych 3-4 dniach od momentu wystąpienia wysypki (7,8). Zgromadzono 70 próbek klinicznych od 39 pacjentów podejrzanych o zachorowanie na odrę: 21 prób krwi, 20 moczu i 29 wymazów z gardła. Od 10 pacjentów otrzymano 3 rodzaje próbek, od 11 pacjentów 2 rodzaje próbek oraz pojedyncze próbki od 18 pacjentów. Z otrzymanych 70 próbek klinicznych, w 60 przeprowadzono próby izolacji wirusa odry. Pozostałe 10 próbek klinicznych nie nadawało się do opracowania, ponieważ zostały nieprawidłowo pobrane. Najwięcej próbek klinicznych otrzymano w czerwcu (35) i w lipcu (19). W sierpniu nadesłano 7 próbek, we wrześniu 5 i w październiku 3.

Prawidłowo pobrany wymaz z gardła umieszczano w płynnym podłożu transportowym (płyn Hanks'a, jałowy PBS lub jałowy roztwór soli fizjologicznej) z dodatkiem antybiotyków (penicylina, streptomycyna), mocz w ilości do 50 ml zbierano do jałowych pojemników, natomiast do próbek krwi dodawano antykoagulant (np. EDTA, heparyna) i umieszczano w jałowych probówkach. Próbki kliniczne w warunkach chłodniczych przesyłano do laboratorium w ciągu 24-48 godzin od momentu pobrania.

Izolacja wirusa odry w hodowli komórkowej Vero/SLAM

Do izolacji wirusa odry z prób klinicznych używano hodowli komórkowej Vero/SLAM, zalecanej do stosowania przez Światową Organizację Zdrowia. Jest to hodowla komórek nerki mały zielonej mających na swojej powierzchni cząsteczki sygnałowe aktywacji limfocytów SLAM (CD150), będące jednocześnie receptorem zarówno dla dzikich jak i dla laboratoryjnych szczepów wirusa odry (9,10). Hodowla komórek Vero/SLAM wyma-

ga obecności w podłożu genetyczny, która jest czynnikiem różnicującym i odpowiada za ekspresję receptora SLAM na powierzchni komórek Vero (9).

W przypadku pozytywnej izolacji wirusa odry w zakażonej hodowli komórkowej obserwuje się charakterystyczny efekt cytotatyczny, charakteryzujący się obecnością form wielojądrowych oraz pojedynczych komórek o wrzecionowatym kształcie.

Nested RT-PCR

W metodzie RT-PCR wysoce konserwatywny odcinek wirusowego RNA w pozycji 465-864, zlokalizowany w obrębie genu N, jest przepisywany za pomocą odwrotnej transkryptazy na cDNA, które z kolei jest dwukrotnie amplifikowane w reakcji PCR (nested) przy udziale polimerazy DNA. Do reakcji użyto 2 pary starterów o sekwencjach: MN1: 5'GGTYCG GAT GGT TCG AGAACA3' (Y=C/T), MN2: 5'GRT TCA TCAAGG ACT CAA GTG3' (R=A/G), MN3: 5'TGA AGT GCAAGA CCC TGA GGG3' oraz MN4: 5'TTC ATG CAG TTC AAG AGC AGG 3'. Produkt o wielkości 400 par zasad analizowano w 1,5% żelu agarozowym. Reakcję nested RT-PCR przeprowadzono zgodnie z opisaną procedurą (11,12,13).

Genotypowanie

Genotypowanie oparto na ustaleniu sekwencji zmiennej części genu nukleoproteiny (456 nukleotydów) kodującego 15 C-terminalnych aminokwasów. Jest to minimum danych niezbędnych do określenia genotypu wirusa odry. Procedura ta obejmuje etapy: RT-PCR, ustalenie sekwencji nukleotydów, analizę sekwencji oraz przypisanie do określonego genotypu wirusa (11,14).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W 2006 roku na podstawie obrazu klinicznego zarejestrowano 120 zgłoszonych podejrzeń o zachorowanie na odrę, co stanowi 59,4% w stosunku do liczby 202 pacjentów, od których w Zakładzie Wirusologii PZH otrzymano materiały do badań. Rozpoznanie kliniczne obejmowały wystąpienie plamek Koplika, wysypki, oraz niespecyficznych objawów takich jak wysoka temperatura, katar i kaszel. Zebrane dane zawierały: imię i nazwisko, rodzaj materiału klinicznego, datę pobrania próbki, datę wystąpienia objawów, datę dostarczenia próbek do laboratorium. Badaniom wirusologicznym podlegały próbki kliniczne pobrane od chorych z podejrzanych o zachorowanie na odrę w okresie od czerwca do końca 2006 roku. Zostały one przysłane przez pracownie wirusologiczne czterech Wojewódzkich Stacji Sanitarно-Epidemiologicznych (WSSE), siedmiu Powiatowych Stacji Sanitarно-Epidemiologicznych (PSSE) oraz dwa szpitale i dwie poradnie rodzinne. Zakład Wirusologii NIZP-PZH we współpracy z Głównym Inspektoratem Sanitarnym, poprzez Wojewódzkie Stacje Sanitarно-Epidemiologiczne, zwrócił się do placówek służby zdrowia z prośbą o gromadzenie materiałów pozwalających na określenie genotypu wirusów odry krążących w Polsce.

Izolacje wirusa odry z próbek klinicznych

Zgodnie z wytycznymi WHO metoda izolacji wirusa odry w hodowli Vero/SLAM jest badaniem uzupełniającym w Programie Eliminacji Odry i Różyczki i wprowadzono ją w Polsce w roku 2006 w Zakładzie Wirusologii NIZP-PZH. Izolacja wirusa odry pełni

istotną rolę w uzyskaniu szczepów krążących na terenie kraju, które są dalej wykorzystywane do dalszych badań epidemiologicznych i dlatego powinna być stosowana, pomimo braku przydatności do celów diagnostycznych. Trudnościami związanymi z izolacją wirusa w hodowli komórkowej są: przestrzeganie, aby materiał kliniczny został pobrany w odpowiednim czasie po wystąpieniu objawów choroby, zapewnienie należytych warunków transportu, długi czas oczekiwania na wynik, który spowodowany jest koniecznością wykonania co najmniej dwóch pasażu badanego materiału.

Zaletą hodowli Vero/SLAM jest fakt, że w odróżnieniu od poprzednio stosowanej linii B95a, która była transformowana za pomocą wirusa Epsteina-Barr, nie jest ona materiałem zakaźnym.

Z 70 nadesłanych próbek klinicznych podjęcie próby izolacji wirusa odry możliwe było w przypadku 60 materiałów. Dodatni wynik izolacji wirusa odry otrzymano w 6 (10 %) materiałach klinicznych pobranych od 4 pacjentów: 3 z moczu, 2 z wymazów z gardła i 1 z limfocytów krwi. (tabela I). Z 37 materiałów nie izolowano wirusa, co stanowi 61,6 % omawianych próbek. W przypadku pozostałych 17 (28,3%) materiałów izolacja nie była możliwa z powodu niezachowanej jałowości przy pobieraniu próbki: w pierwszym pasażu hodowle przerosły z powodu zakażenia bakteryjnego lub grzybiczego. Ogółem spośród 70 przysłanych materiałów 27 nie nadawało się do przeprowadzenia badań wirusologicznych, co stanowiło 38,6% całości.

Tabela I. Wyniki izolacji wirusa odry z materiałów klinicznych w 2006 w Polsce

Table I. The results of measles virus isolation from clinical samples in 2006 in Poland

Wynik izolacji wirusa	Materiał diagnostyczny			Razem
	krew	mocz	Wymaz z gardła	
Dodatni	1	3	2	6
Ujemny	15	8	14	37
Nie badano	5	9	13	27

Stwierdzono, że na powodzenie izolacji miały wpływ zarówno czas jak i warunki transportu do laboratorium. Należy zwrócić uwagę, że dodatnie izolacje uzyskano z próbek transportowanych w krótkim czasie od momentu pobrania. O efektywności izolacji cząstek zakaźnych decydowały również takie czynniki jak pobranie materiałów w pierwszych dniach po wystąpieniu wysypki oraz sposób pobierania próbek, a mianowicie głęboki wymaz z gardła, zawierający komórki nabłonkowe.

Niepokojący jest fakt, że tak duży odsetek materiałów klinicznych nie nadawał się do wykonywania prób izolacji wirusa odry w hodowli komórkowej.

Wykrywanie materiału genetycznego wirusa odry metodą nested RT-PCR

W Regionalnym Laboratorium Referencyjnym WHO mieszczącym się w Instytucie Roberta Kocha (RKI) w Berlinie zostało przebadanych metodą RT-PCR 57 materiałów klinicznych pochodzących od 37 pacjentów z podejrzeniem o zachorowanie na odrę. Do przeprowadzenia badań molekularnych użyto 14 materiałów, które nie nadawały się do izolacji wirusa odry w hodowli komórkowej.

Wynik dodatni badań RT-PCR uzyskano w 22 próbkach (6 wymazów z gardła, 10 próbek moczu i 6 próbek krwi), co stanowi 38,6% wszystkich przebadanych materiałów. Były to próbki pochodzące od 13 pacjentów z podejrzeniem o zachorowanie na odrę. Spośród 22 materiałów, w których wykryto RNA wirusa odry, w 5 udało się wyizolować zakaźne cząstki wirusa za pomocą hodowli komórkowej Vero/SLAM. W przypadku pozostałych 35 (61,4%) próbek nie wykryto RNA wirusa odry. W 17 próbkach, w których nie stwierdzono obecności zakaźnych cząstek wirusa, wykryto jego materiał genetyczny. Metoda RT-PCR wykrywa nie tylko obecność kwasu nukleinowego w aktywnych cząstkach wirusa, ale również w cząstkach niekompletnych oraz zabitych wirusach.

Tabela II. Porównanie wyników izolacji wirusa odry w hodowli komórkowej i badania obecności genomu (RT-PCR)

Table II. The combined results of measles virus isolated on cell culture and genom detection (RT-PCR)

Wynik izolacji wirusa odry w linii komórkowej Vero/SLAM	Wynik RT-PCR		Razem
	Dodatni	Ujemny	
Dodatni	5	1	6
Ujemny lub nie izolowano	17	34	51
Razem	22	35	57

Wyniki genotypowania

W 2006 roku na Ukrainie miała miejsce epidemia odry, wywołana przez wirus należący do genotypu D6 (15). Zaobserwowano również przypadki zachorowań na odrę w przygranicznych województwach Polski. Istniało podejrzenie, że są to zawleczenia zachorowań na odrę z Ukrainy. Z próbek pobranych od tych przypadków nie otrzymano jednak izolatów szczepów wirusa. Tym samym nie można potwierdzić jak i wykluczyć importowanego charakteru odry na tych terenach. Wyniki genotypowania wirusów odry krążących w centralnej Polsce wykazały, że należą do genotypu D4, a więc różnią się od szczepów krążących na Ukrainie – co wskazuje na ich rodzimy charakter.

Sekwencjonowanie RNA szczepów wirusa odry wykonano w Regionalnym Laboratorium Referencyjnym d.s. Odry i Różyczki WHO znajdującym się w RKI. Określono genotypy 22 wirusów wykrytych metodą RT-PCR i ich relację w stosunku do szczepów krążących w innych regionach WHO.

Molekularne genotypowanie szczepów wirusa odry wskazało, że w 20 próbkach obecny jest wirus odry genotypu D4, natomiast w 2 przypadkach D5. Wszystkie badane genomy wirusa odry należące do genotypu D4 różniły się od innych, krążących w krajach regionu europejskiego.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przedstawiona ocena wyników badań wirusologicznych wykonanych w 2006 roku w Krajowym Laboratorium d.s. Odry i Różyczki wskazuje na niski odsetek izolacji wirusa odry z próbek klinicznych. Może to być spowodowane procedurą pobierania, przesyłania

i przechowywania materiału klinicznego. Ważne jest usprawnienie diagnostyki wirusologicznej, udoskonalenie molekularnych technik detekcji kwasu nukleinowego wirusa odry oraz wprowadzenie metod genotypowania. Przede wszystkim ważne jest rozpowszechnienie informacji o roli Krajowego Laboratorium d.s. Odry i Różyczki i o możliwości wykonywania bezpłatnych badań serologicznych. Wskazane jest nawiązanie ścisłej współpracy z WSSE i lekarzami pierwszego kontaktu w sprawie pobierania i wysyłania materiałów klinicznych pochodzących od pacjentów podejrzanych o zachorowanie na odrę. Liczba osób, od których otrzymano materiały do badań w kierunku odry, znacznie przekracza liczbę zarejestrowanych podejrzeń o zachorowanie. Wskazuje to na konieczność wzmocnienia nadzoru nad zachorowaniami i poprawę systemu zgłaszania podejrzeń o zachorowanie na odrę i ich rejestracji.

A Makówka, B Litwińska

EPIDEMIOLOGICAL SURVEILLANCE OF MEASLES OCCURRENCE IN POLAND IN 2006 BY MEANS OF VIROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

SUMMARY

The availability of sensitive cell line for isolation of measles virus from clinical samples and establishment RT-PCR and molecular sequencing methods have allowed for rapid genetic characterization of wild-type strains of measles virus. This sequence information makes it possible to identify the source of wild-type viruses and differentiate between native and reported cases.

The aim of this study was evaluation of virus isolation in cell culture in National Laboratory in Poland (Department of Virology in NIH), presentation of RT-PCR and molecular genotyping results performed in Regional Reference Laboratory in Berlin (Robert Koch Institut).

PIŚMIENNICTWO:

1. Naruszewicz-Lesiuk D. Odra. W: Kostrzewski J, Magdzik W, Naruszewicz-Lesiuk D, red. Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku. Wyd 1. Warszawa: PZWL;2001:281-287
2. WHO. European Region strategic plan 2005-2010. Eliminating Measles and Rubella and Preventing Congenital Rubella Infection.
3. Strategic plan for measles and congenital rubella infection in the European Region of WHO. Copenhagen: WHO Regional Office For Europe; 2003
4. Makówka A, Gut W, B Litwińska. Podstawy eliminacji odry na świecie i w Polsce, Przegl Epidemiol, 2007, 61:135-142.
5. Makówka A, Gut W. Wyniki genotypowania wirusa odry krążącego w Polsce w 2006 roku. Meldunek o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach. 2006;9/B/06:6
6. Papania MJ, Orenstein WA. Defining and assessing measles elimination goals. J Infect Dis, 2004; 189 Suppl 1:S23-6.
7. Riddell MA, Chibo D, Kelly HA, Catton MG, Birch CJ. Investigation of Optimal Specimen Type and Sampling Time for Detection of Measles Virus RNA during a Measles Epidemic. J Clin Microbiol 2001;1:375-376.
8. WHO. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. Second edition. WHO 14 July 2006

9. Ono N, H Tatsuo, Y Bidaka, T Aoki, H Minagawa, Y Yanagi, Measles virus on throat swab from measles patients use signalic lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a molecular receptor. *J Virol* 2001;75:4399-4401.
10. Y Yanagi, M Takeda, S Ohno, F Seki. Measles Virus Receptors and Tropism. *Jpn J Infect Dis*, 2006; 59: 1-5.
11. Tischer A, Santibanez S, Siedler A, Heider A, Hengel H. Laboratory investigations are indispensable to monitor the progress of measles elimination-results of the German Measles Sentinel 1999-2003. *J Clin Virol* 2004;31:165-178.
12. Matsuzono Y, Narita M, Ishiguro N, Togashi T, Detection of measles virus from clinical samples using the polymerase chain reaction. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994: 148:289-293.
13. Nakayama T, Mori T, Yamaguchi S, Sonoda S, Asamura S, Yamashita R, Takeuchi Y, Urano T. Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. *Virus Res*, 1995; 35: 1-16.
14. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. *Weekly epidemiological record*, No.40,7 October 2005
15. Spika JS, Aidyraliewa C, Mukharskaya L, Kostyuchenko NN, Mulders M, Lipskaya G, et al. Measles outbreak in the Ukraine, 2005-2006;11(3):E060309.1. Available from: <http://www.eurosurveillance.org/ew/2006/060309.asp#1>

Otrzymano: 26.03.2008 r.

Adres autorów:

Agata Makówka, Bogumiła Litwińska

Zakład Wirusologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. 22 54 21 283

mail: amakowka@pzh.gov.pl, blitwinska@pzh.gov.pl