

Agnieszka Witek, Magdalena Wieczorek

BADANIA WIRUSOLOGICZNE I MOLEKULARNE W ZAKAŻENIACH ENTEROWIRUSOWYCH W POLSCE W LATACH 2004-2008

VIROLOGICAL AND MOLECULAR METHODS IN ENTEROVIRUSES INFECTIONS IN 2004-2008, POLAND

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

STRESZCZENIE

Ocena częstości zakażeń enterowirusowych jest możliwa dzięki badaniom wirusologicznym, z włączeniem metod biologii molekularnej. Celem przedstawionej pracy była wstępna ocena przydatności techniki RT-PCR w szybkiej diagnostyce zakażeń enterowirusowych. W latach 2004-2008 z nadesłanych 678 próbek klinicznych od pacjentów podejrzanych o zakażenie enterowirusami, dodatni wynik izolacji enterowirusów uzyskano w 17,1%. Pośród 116 wyizolowanych enterowirusów największą grupę stanowiły wirusy Coxsackie grupy B (30,17%). Pozostałe serotypy enterowirusów izolowanych w trakcie badanego okresu to wirus Coxsackie A (8,62%), ECHO3 (1,72%), ECHO6 (7,76%), ECHO7 (4,31%), ECHO25 (0,86%), ECHO30 (18,97%), poliovirus (0,86%).

Słowa kluczowe: *niepoliomyelityczne enterowirusy, izolacja, RT-PCR, Polska*

WSTĘP

Rodzaj *Enterovirus* należy do rodziny *Picornaviridae* i obejmuje dużą liczbę wirusów (ok. 70 serotypów) (1). Do enterowirusów człowieka należą 3 serotypy wirusa *poliomyelitis*, serotypy 1-22 i 24 wirusów Coxsackie grupy A, 6 serotypów wirusów Coxsackie grupy B, ponad 30 serotypów wirusów ECHO oraz wirus wirusowego zapalenia wątroby typu A (2). W klimacie umiarkowanym zakażenia enterowirusowe mają charakter sezonowy - najwyższa częstość ich występowania przypada na miesiące letnie i jesienne, i dotyczy głównie dzieci (3). Zakażenia u ludzi niejednokrotnie przebiegają bezobjawowo, a tylko w od 1 do 10% przypadków wywołują zakażenia wielonarządowe. Czynniki takie jak poziom higieny, gęstość zaludnienia, stopień uprzemysłowienia mają wpływ na częstość zakażeń enterowirusami. W latach 1995-1996 zaobserwowano wzrost zachorowań wywołanych enterowirusami na terenie Polski (4). Celem niniejszej pracy było prześledzenie częstości występowania w latach 2004-2008

ABSTRACT

The availability of sensitive cell lines and molecular methods have allowed for epidemiological surveillance of nonpoliomyelitic enteroviruses in Poland in 2004-2008. The aim of the study was evaluation of enterovirus diagnosis based on RT-PCR reaction. Available data collected in 2004-2008 indicated that 116 isolation of enteroviruses were performed. The most frequently isolated enterovirus serotype was Coxsackievirus B (30,17%). Other enteroviruses serotypes isolated during study period were Coxsackievirus A (8,62%), ECHO3 (1,72%), ECHO6 (7,76%), ECHO7 (4,31%), ECHO25 (0,86%), ECHO30 (18,97%), poliovirus (0,86%).

Key words: *nonpoliomyelitic enteroviruses, isolation, RT-PCR, Poland*

oraz ocena nowoczesnej metody diagnostyki zakażeń enterowirusowych opartych o reakcję RT-PCR.

MATERIAŁ I METODY

Badane próbki kliniczne. Jako materiał do badań posłużyły próbki zgromadzone w latach 2004-2008 pobrane od 408 pacjentów z podejrzeniem zakażenia o etiologii enterowirusowej. Przebadano 678 próbek (kał, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymaz z gardła).

Izolacja i typowanie. Próbkę kału, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz wymaz z gardła opracowywano przy pomocy chloroformu zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (5). Izolację wirusa z materiału klinicznego prowadzono w hodowli komórek RD. Jest to hodowla ludzkich komórek mięśniako-mięsaka wrażliwych na zakażenie enterowirusami (6). W przypadku pozytywnej izolacji szczep wirusowy był następnie identyfikowany przy użyciu surowic poliklonalnych. W pierwszym etapie przeprowadzono neutralizację

zakaźności wirusa z zastosowaniem puli surowic zawierających przeciwciała skierowane przeciwko enterowirusom (A, B, C, D, E, F, G), wirusowi Coxsackie B (CP), wirusowi polio (PP). Następnie wykrycie i identyfikację pozostałości wirusa niezobojętnionego prowadzono na podstawie obserwacji efektu cytopatycznego w hodowli komórek RD (7).

Reakcja RT-PCR. RNA enterowirusów izolowano zestawem QIAamp Viral RNA Mini Kit firmy QIAGEN, zgodnie z zaleceniami producenta. Wyizolowane RNA wirusa poddawano reakcji RT-PCR z zastosowaniem zestawu Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq firmy Invitrogen umożliwiającym jednoczesną syntezę cDNA oraz amplifikację. W metodzie RT-PCR wysoce konserwatywny fragment wirusowego RNA z regionu 5'UTR (ang. *UnTranslated Region*) o wielkości 114 par zasad, jest przepisywany za pomocą odwrotnej transkryptazy na cDNA, które w kolejnym etapie ulega amplifikacji w reakcji PCR. Do reakcji użyto 2 pary starterów o sekwencjach:

PanEv1: 5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCG-GTTCC-3'

PanEv2: 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'.

Synteza cDNA prowadzono w 45°C/20 min, a następnie amplifikowano przez 35 cykli składających się z denaturacji - 94°C/30s, anelingu - 55°C/30s oraz elongacji - 70°C/30s. Produkt o wielkości 114 par zasad poddawano analizie elektroforetycznej w 2% żelu agarozowym.

Określenie czułości systemu amplifikacji RT-PCR.

W celu określenia czułości wykrywania zakażeń enterowirusowych metodą RT-PCR przygotowano 10-krotne rozcieńczenia (10^{-1} - 10^{-7}) zawiesiny wirusa polio szczepu szczepionkowego typu 1 w płynie Eagle'a (MEM) o znanym mianie infekcyjnym w kilkukrotnych powtórzeniach. Z kolejnych rozcieńczeń wirusa izolowano RNA, a następnie tak otrzymany materiał poddawano reakcji RT-PCR w warunkach podanych powyżej.

Sprawdzenie swoistości starterów dla różnych szczepów enterowirusów. W badaniach zastosowano zawiesiny enterowirusów namnożonych w linii komórek RD. Reakcję RT-PCR wykonano z materiałem genetycznym wyizolowanym z 32 szczepów enterowirusów izolowanych w latach 2004-2008 (1 szczepu ECHO3, 5 szczepów ECHO6, 1 szczepu ECHO7, 1 szczepu ECHO25, 3 szczepów ECHO30, 16 szczepów Coxsackie B, 3 szczepów Coxsackie A9, 2 szczepów typu nieokreślonego) posłużyły do badań molekularnych (tab. I).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Częstość izolacji enterowirusów w latach 2004-2008.

W latach 2004-2008 zarejestrowano 408 pacjentów

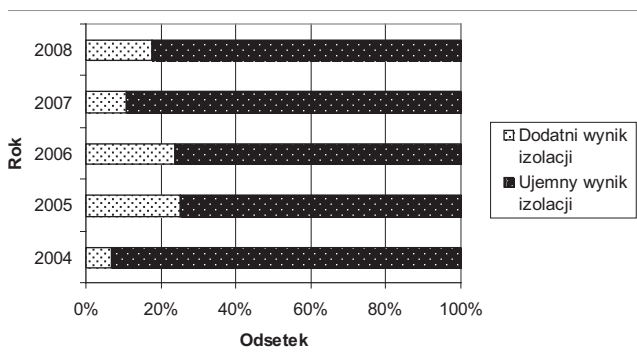
Tabela I. Szczepy enterowirusów izolowanych w latach 2005-2008 na terenie Polski użyte do analizy techniką RT-PCR

Table I. The results of nonpoliomyelitic enteroviruses isolated in 2005-2008 in Poland used for RT-PCR analysis

Szczep wirusa/symbol	Rok izolacji	Materiał	Szczep wirusa/symbol	Rok izolacji	Materiał
ECHO6/357 I	2008	Kał	ECHO6/234 I	2006	Kał
ECHO6/356	2008	Wymaz z gardła	CoxB/235 I	2006	Kał
ECHO30/353	2008	Wymaz z gardła	CoxB/238 I	2006	Kał
CoxB/2055 II	2008	Kał	CoxB/239 I	2006	Kał
ECHO30/347 I	2008	Kał	CoxB/230	2006	Płyn mózgowo-rdzeniowy
CoxB/2048 II	2008	Kał	CoxB/231 I	2006	Kał
CoxB/2052 I	2008	Kał	ECHO6/225	2006	Płyn mózgowo-rdzeniowy
ECHO30/321 I	2008	Kał	CoxB/228	2006	Kał
Typ nieokreślony/ 320 I	2008	Kał	CoxB/220 I	2006	Kał
ECHO25/318 I	2008	Kał	CoxB/221 I	2006	Kał
Typ nieokreślony/ 298 I	2007	Kał	CoxA/205 I	2006	Kał
CoxB/263	2007	Płyn mózgowo-rdzeniowy	CoxA9/196 I	2006	Kał
CoxB/266 I	2007	Kał	CoxB/180 I	2006	Kał
CoxB/247 I	2007	Kał	ECHO3/1868 I	2005	Kał
CoxB/251 I	2007	Kał	ECHO7/136	2005	Płyn mózgowo-rdzeniowy
ECHO6/233 I	2006	Kał	CoxA9/155	2005	Wymaz z gardła

podejrzanych o zakażenie enterowirusami. Z nadesłanych 678 próbek klinicznych dodatni wynik izolacji enterowirusów w hodowli RD uzyskano w przypadku 116 próbek (17,1%). Uzyskany odsetek dodatnich prób wskazuje na prawidłowy przebieg izolacji enterowirusów, zgodnie z wytycznymi Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), według których wskaźnikiem prawidłowej pracy laboratoriów prowadzących izolacje enterowirusów jest 5-10% poziom udanych izolacji enterowirusów z kału osób zdrowych (5).

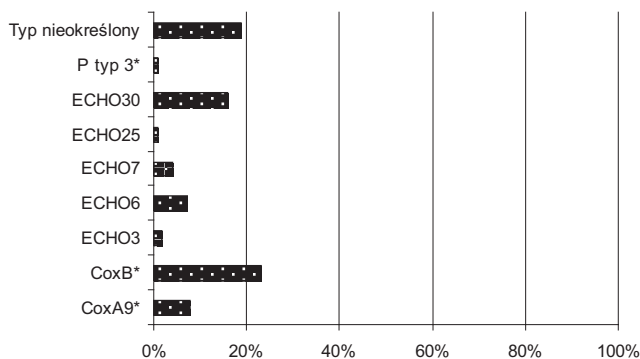
Najwięcej enterowirusów wyizolowano w latach 2005 i 2006, gdzie dodatni wynik uzyskano odpowiednio w 25% i 23,66% przypadków. Najwyższy odsetek dodatnich izolacji przypadła na miesiące letnie i jesienne, co jednocześnie potwierdza sezonowy charakter zakażeń enterowirusowych. W latach 2007 i 2008 odnotowano spadek częstości izolacji enterowirusów. W 2007 r. ujemne wyniki izolacji stanowiły aż 90% wszystkich podjętych prób izolacji enterowirusów (ryc. 1).



Ryc. 1. Wyniki izolacji enterowirusów w Polsce w latach 2004-2008

Fig. 1. The results of enteroviruses isolation in 2004-2008, Poland

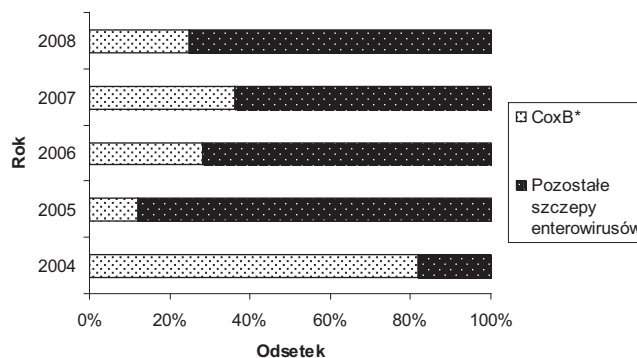
Częstość izolacji wirusów Coxsackie grupy B w latach 2004-2008 w stosunku do innych enterowirusów. Pośród 116 wyizolowanych enterowirusów w latach 2004-2008 największą grupę (30,17%) stanowiły wirusy Coxsackie grupy B (ryc. 2). W 2004 r. stwierdzono najniższą częstość izolacji enterowirusów w stosunku do całego badanego okresu, jednak liczba izolacji wirusa Coxsackie grupy B była najwyższa i wynosiła 81,82% pozytywnych prób (ryc. 3). W 2006 r. dodatnie wyniki izolacji enterowirusów uzyskano w 45,69% badanych prób, z czego większość wyizo-



Ryc. 2. Częstość izolacji poszczególnych serotypów enterowirusów w Polsce w latach 2004-2008

Fig. 2. The results of various enteroviruses serotypes isolation in 2004-2008, Poland

* CoxA9-CoxsackiewirusA9, CoxB-CoxsackiewirusB, P typ 3-poliowirus typ 3

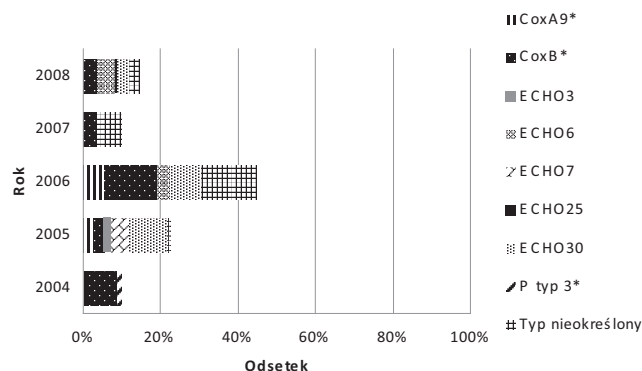


Ryc. 3. Częstość izolacji wirusa Coxsackie B w Polsce w latach 2004-2008

Fig. 3. Frequency of Coxsackievirus B isolation in 2004-2008, Poland

* CoxB-CoxsackiewirusB

lowanych szczepów należała do serotypu Coxsackie B (28,3%). W 2005 r. odnotowano najniższą częstość izolacji wirusa Coxsackie grupy B, która stanowiła 12% wszystkich dodatnich prób izolacji (ryc. 3). Częstość izolacji poszczególnych typów enterowirusów w latach 2004-2008 przedstawiono na ryc. 4.



Ryc. 4. Enterowirusy izolowane w latach 2004-2008

Fig. 4. Enteroviruses isolation in 2004-2008

* CoxA9-CoxsackiewirusA9, CoxB-CoxsackiewirusB, P typ 3-poliowirus typ 3

Wyniki reakcji amplifikacji RT-PCR dla szczepów enterowirusów izolowanych na terenie Polski w latach 2004-2008. Przeprowadzono reakcję RT-PCR na matrycy RNA, izolowanego uprzednio z 10-krotnych rozcieńczeń wirusa polio szczepu szczepionkowego typu 1, z zastosowaniem wcześniej opisanych starterów, uzyskując swoisty dla enterowirusów fragment DNA o wielkości 114 pz. Przy określaniu czułości systemu amplifikacji stwierdzono, że po rozdiale elektroforetycznym produktów amplifikacji wynik dodatni otrzymano we wszystkich próbkach rozcieńczeń 10⁻¹-10⁻⁵ (100%), 25% wyników dodatnich uzyskano przy rozcieńczeniu 10⁻⁶, natomiast we wszystkich próbkach rozcieńczeń 10⁻⁷ wynik był ujemny. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że opracowany system amplifikacji cechuje się wysoką czułością i pozwala na wykrycie

nawet niewielkiej ilości RNA wirusowego w próbce poddanej amplifikacji (tab. II).

Tabela II Wyniki amplifikacji RNA izolowanego z 10-krotnych rozcieńczeń szczepionkowego wirusa polio o znanym mianie infekcyjnym.

Table II The results of vaccine poliovirus (with known infectious titer) isolated on decimal dilutions

Stężenie wirusa w 1 ml badanej próby	Teoretyczna liczba cząstek zakaźnych w objętości użytej do amplifikacji	Wynik amplifikacji dodatnie/badane	% wyników dodatnich
10^{-1} TCID ₅₀	500	4/4	100%
10^{-2} TCID ₅₀	50	4/4	100%
10^{-3} TCID ₅₀	5	4/4	100%
10^{-4} TCID ₅₀	0,5	4/4	100%
10^{-5} TCID ₅₀	0,05	4/4	100%
10^{-6} TCID ₅₀	0,005	1/4	25%
10^{-7} TCID ₅₀	0,0005	0/4	0%

Opracowany system amplifikacji wykorzystano do przeprowadzenia reakcji RT-PCR dla wszystkich dziewięciu szczepów enterowirusów izolowanych na terenie Polski w latach 2004-2008. Udało się uzyskać produkt amplifikacji o wielkości 114 par zasad, co potwierdza swoistość metody do wykrywania różnych szczepów enterowirusów.

PODSUMOWANIE

W latach 2004-2008 z 678 próbek pobranych od 408 pacjentów podejrzanych o zakażenie enterowirusami dokonano izolacji z 116 próbek (17,1%). Wśród wyizolowanych enterowirusów największą grupę stanowiły wirusy Cocksackie grupy B - 30,17%.

Pośród stosowanych metod diagnostyki zakażeń enterowirusowych coraz częściej wprowadza się metody biologii molekularnej, w tym m.in. reakcję RT-PCR. Analiza RT-PCR wykazuje przydatność do celów szybkiej diagnostyki zakażeń enterowirusowych w odróżnieniu od długotrwałej i pracochłonnej metody izolacji wirusa w hodowli komórkowej (8,9). W dalszym etapie walidacji techniki planuje się wykonanie badań mających na celu określenie wpływu matrycy na przebieg reakcji RT-PCR, poprzez bezpośrednie zastosowanie do analizy materiału pobranego od pacjenta.

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. Hyypiä T, Hovi T, Knowles NJ, Stanway G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J Gen Vir* 1997; 78:1-11.
3. Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberst S, Pallansch MA. Centers for Disease Control and Prevention: Enterovirus surveillance – United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ* 2006; 55:1-20.
4. Rajtar B, Majek M, Polanski L, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment - a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med* 2008; 15:199-203.
5. Jarząbek Z. Zakażenia enterowirusami w: Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka, red. W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk i A. Zieliński. Warszawa 2007; 364-69.
6. WHO. Accreditation of Global Polio Networks Laboratories. Accreditation of National Poliovirus Laboratories. Geneva, 1997.
7. Menegus M. Manual of clinical microbiology In: Enteroviruses. 4th edition. Washington D.C. 1985; 743-46.