

Agnieszka Witek, Magdalena Wieczorek, Marta Brzóstkowska

## SEROTYPY ENTEROWIRUSÓW WYIZOLOWANYCH W LATACH 2008-2009 W ZAKŁADZIE WIRUSOLOGII NIZP - PZH

ENTEROVIRUSES SEROTYPES ISOLATED IN YEARS 2008-2009 IN NIPH - NIH

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny

### STRESZCZENIE

Enterowirusy są istotnym czynnikiem etiologicznym odpowiedzialnym za zachorowania na: zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, choroby układu pokarmowego, zachorowania porażenne (w tym *poliomyelitis*). Celem niniejszej pracy było określenie udziału poszczególnych serotypów tych wirusów wśród zdiagnozowanych zakażeń enterowirusami w Polsce w latach 2008-2009. Przebadano 178 materiałów klinicznych pobranych od osób chorych, uzyskując dodatni wynik izolacji enterowirusów w 24 próbkach (13,5%). Wśród 153 próbek pobranych od pacjentów z ostrym porażeniem wiotkim (OPW) dodatni wynik izolacji uzyskano w 6 badanych próbach (4%). Natomiast w grupie 25 materiałów pobranych od pacjentów z rozpoznaniem klinicznym innym niż OPW z 18 prób wyizolowano enterowirusy (72%). Najczęściej były to wirusy Coxsackie B (25%), ECHO30 (25%) i ECHO6 (21%).

**Słowa kluczowe:** *enterowirusy, ostre porażenie wiotkie, RT-PCR, Polska*

### ABSTRACT

Enteroviruses are important etiologic agents of many human diseases such as diarrhea, self-limiting gastroenteritis, respiratory infections, conjunctivitis, hepatitis, aseptic meningitis, encephalitis, and paralysis. The aim of this study was the evaluation of the frequency of enteroviral infections in Poland in 2008-2009. Out of 178 clinical materials tested for the presence of enteroviruses, 24 samples (13,5%) were positive. In the case of 153 samples from patients suffering from acute flaccid paralysis (AFP), positive results were obtained for 6 samples (4%). Moreover, 25 samples coming from patients with clinical symptoms caused by nonpoliomyelitic enteroviruses were analyzed, giving 18 positive results (72%). The most frequently isolated enterovirus serotypes were Coxsackie B (25%), ECHO30 (25%) i ECHO6 (21%).

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

### WSTĘP

Należące do rodziny *Picornaviridae* wirusy z rodzaju *Enterovirus* charakteryzują się znacznym zróżnicowaniem (obecnie wyróżnia się około 70 serotypów) (1). Do enterowirusów wywołujących zachorowania u ludzi zalicza się 3 serotypy wirusa *poliomyelitis*, serotypy 1-22 i serotyp 24 wirusa Coxsackie grupy A, 6 serotypów wirusa Coxsackie grupy B, ponad 30 serotypów wirusa ECHO oraz wirus WZW typu A (2). Zakażenia enterowirusowe, obok tych wywołanych przez *Rhinovirus*, należą do najczęstszych zakażeń wirusowych na świecie (3).

Zakażenia enterowirusowe zazwyczaj powodują biegunkę oraz zapalenie żołądka i jelit, jednak wirusy te wywołują również szereg innych groźnych w skutkach zakażeń, m.in. infekcje dróg oddechowych, zapalenie mięśnia sercowego, posocznice noworodków, zapalenie spojówek, zapalenie wątroby, aseptyczne zapalenie mó-

zgu oraz ostre porażenia wiotkie (OPW) (4). Głównymi egzogennymi źródłami zakażenia są: woda, żywność oraz gleba skażone odchodami ludzkimi. Ze względu na niską dawkę zakaźną, enterowirusy stanowią istotne zagrożenie epidemiczne rozumiane w aspekcie zdrowia publicznego (5). Szybkie rozprzestrzenianie się enterowirusów związane jest przede wszystkim z przeniesieniem wirusa drogą wodną, co w krótkim czasie może prowadzić nawet do epidemii. Są one niezwykle odporne na niekorzystne warunki środowiska naturalnego oraz na działanie preparatów dezynfekcyjnych, znoszą także duże zasolenie wody oraz wahania temperatury. Z tego względu środowisko wodne stanowi ich naturalny rezerwuuar (6). Enterowirusy są izolowane z wód gruntowych, rzek, oceanów, ścieków i co najważniejsze z epidemiologicznego punktu widzenia – z wody pitnej (7).

Zakażenia o etiologii enterowirusowej należą do bardzo rozpowszechnionych na całym świecie. W ostatnich latach zaobserwowano wzrost zachorowań

wywołanych przez enterowirusy na terenie m.in. USA, Kanady, Francji, Finlandii, Niemiec, Białorusi, Ukrainy (8). W USA występuje rocznie od 30 do 50 milionów nowych zakażeń, z których od 5 do 15 milionów przebiega objawowo (9).

Celem niniejszej pracy było określenie udziału poszczególnych serotypów enterowirusów w zdiagnozowanych zakażeniach tymi wirusami w Polsce w latach 2008-2009.

## MATERIAŁ I METODY

**Badane próbki kliniczne.** Materiał do badań stanowiło 178 próbek klinicznych (kał, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymaz z gardła) zgromadzonych w latach 2008-2009, pobranych od pacjentów z podejrzeniem zakażenia o etiologii enterowirusowej.

**Izolacja i typowanie.** Materiał kliniczny opracowywano z zastosowaniem chloroformu, zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (10). Izolację wirusa z materiału klinicznego prowadzono w hodowli ludzkich komórek mięśniako-mięsaka wrażliwych na zakażenie enterowirusami (linia komórkowa RD) (11). Do identyfikacji serotypów enterowirusów użyto testu mikroneutralizacji. Zobojętnienie zakaźności wirusa przeprowadzono z zastosowaniem puli surowic zawierających przeciwciała skierowane przeciwko enterowirusom (A, B, C, D, E, F, G), wirusowi Coxsackie B (CP) oraz wirusowi polio (PP). Wykrycie i identyfikację pozostałości niezobojętnionego wirusa prowadzono na podstawie obserwacji efektu cytopatycznego w hodowli komórek RD (12).

**Reakcja RT-PCR.** RNA enterowirusów izolowano z zastosowaniem zestawu QIAamp Viral RNA Mini Kit firmy QIAGEN, zgodnie z zaleceniami producenta. Na matrycy wyizolowanego RNA wirusa przeprowadzono reakcję RT-PCR z wykorzystaniem zestawu 'Super Script III One-Step RT-PCR with Platinum Taq' (Invitrogen), umożliwiającym jednoczesną syntezę oraz amplifikację cDNA. Metoda ta umożliwia przepisanie wysoce konserwatywnego fragmentu wirusowego RNA (114 par zasad) znajdującego się w regionie 5'UTR (ang. *UnTranslated Region*) za pomocą odwrotnej transkryptazy na cDNA, który w kolejnym etapie jest amplifikowany w reakcji PCR z parą starterów o sekwencjach:

PanEv1: 5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGT-TCC-3'

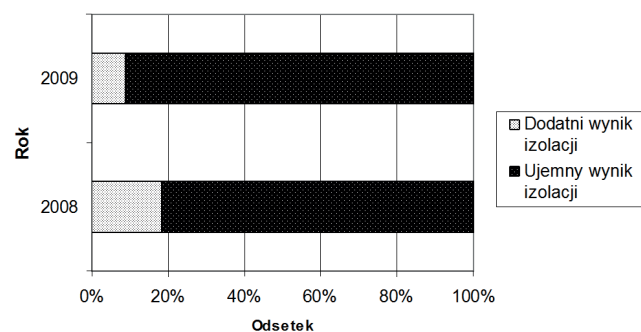
PanEv2: 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-ATCC-3'.

Syntezę cDNA prowadzono w 45°C przez 20 min, a następnie amplifikowano w 35 cyklach składających się z denaturacji - 94°C/30 s, annealingu - 55°C/30 s oraz elongacji - 70°C/30 s. Uzyskany produkt amplifikacji

o wielkości 114 par zasad poddawano analizie elektroforetycznej w 2% żelu agarozowym.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

**1. Enterowirusy izolowane w Polsce w latach 2008-2009.** W latach 2008-2009 zgromadzono 178 próbek materiałów klinicznych pobranych od pacjentów podejrzanych o zakażenie enterowirusami (w 2008 roku - 88 materiałów, w 2009 roku - 90 materiałów). Spośród wszystkich nadesłanych próbek dodatni wynik izolacji enterowirusów w hodowli RD uzyskano dla 24 (13,5%) analizowanych próbek. W 2009 roku zaobserwowano znaczący ( $\chi^2=3,26$ ,  $P_0 \leq 0,05$ ), ponad dwukrotny spadek odsetka izolacji enterowirusów (8,9%) w porównaniu do roku 2008, kiedy dodatnie izolacje stanowiły 18,2% (ryc. 1). Podobnie jak w roku 2007 (13), ujemne wyniki izolacji w roku 2009 stanowiły około 90% wszystkich podjętych próbek izolacji enterowirusów.



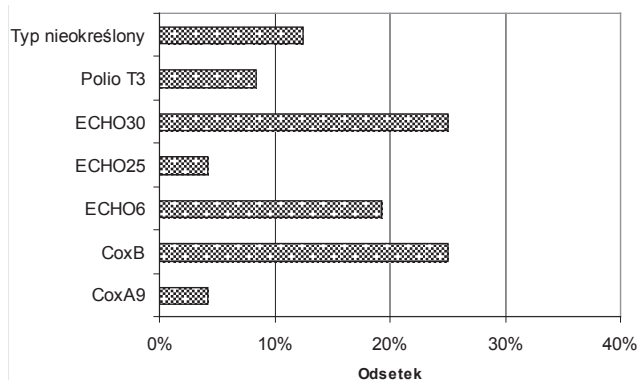
Ryc. 1. Wyniki izolacji enterowirusów w badanej grupie 178 osób w Polsce w latach 2008-2009

Fig. 1. Results of enterovirus isolations in the analyzed group of 178 patients in Poland in 2008-2009

Pośród wyizolowanych enterowirusów najczęściej stwierdzano wirusy Coxsackie B (25%), ECHO30 (25%) i ECHO6 (21%), przy czym 66,7% izolatów wirusów Coxsackie B i ECHO30 przypadało na rok 2008. Najniższy odsetek izolacji (5%) uzyskano dla wirusów ECHO25 i Coxsackie A9 (ryc. 2).

**2. Częstość izolacji enterowirusów z materiałów od pacjentów z rozpoznaniem klinicznym OPW i nie-OPW.** Wśród 153 próbek pobranych od pacjentów z OPW dodatni wynik izolacji uzyskano tylko dla 6 badanych próbek (4%). W grupie 25 materiałów pobranych od pacjentów z rozpoznaniem klinicznym innym niż OPW, wynik dodatni uzyskano dla 18 próbek (72%). Dane te wskazują na prawidłowe wykonanie badań, zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia określonymi w Programie Eradykacji *Poliomyelitis* (14).

Enterowirusy wyizolowane z materiałów otrzymanych od pacjentów z OPW należały tylko do dwóch serotypów: wirus Coxsackie B oraz wirus polio typ 3. Do-



Ryc. 2. Udział poszczególnych serotypów enterowirusów w ogólnej liczbie 24 izolatów uzyskanych ze 178 materiałów klinicznych w Polsce w latach 2008-2009

Fig. 2. Frequency of various enteroviral serotypes in the analyzed group of 24 strains isolated from 178 clinical materials in Poland in 2008-2009

minującym serotypem był wirus Coxsackie B (66,7%). W grupie pacjentów z rozpoznaniem klinicznym innym niż OPW, wyizolowane enterowirusy należały aż do sześciu różnych serotypów, z czego większość stanowił serotyp ECHO30 (33,3%).

**3. Wyniki RT-PCR dla izolowanych szczepów enterowirusów.** Poprawność izolacji enterowirusów w hodowli komórkowej potwierdzano metodą RT-PCR (tab. I). Dla wszystkich badanych prób uzyskano oczekiwany produkt o wielkości 114 pz, potwierdzając jednocześnie przynależność wszystkich izolatów do rodzaju *Enterovirus*. W przedstawionej pracy metodą RT-PCR badano wyłącznie materiały, w których potwierdzono obecność enterowirusów metodami klasycznej wirusologii. Uzyskane wyniki potwierdziły użyteczność badań molekularnych do wykrywania enterowirusów w materiale klinicznym. Dla pełnego porównania metod izolacji w hodowli komórkowej i RT-PCR, w 2010 roku

rozpoczęto badanie wszystkich materiałów klinicznych z jednoczesnym zastosowaniem obu wymienionych technik. Stwierdzono, że dla niektórych materiałów uzyskano ujemny wynik izolacji enterowirusów w hodowli komórkowej przy dodatnim wyniku reakcji RT-PCR. Może to wynikać ze znacznie wyższej czułości reakcji RT-PCR w stosunku do stosowanej metody wirusologii klasycznej lub obecności w materiale unieczynnionych wirusów. Zasadna wydaje się więc identyfikacja enterowirusów w materiale klinicznym, z równoległym zastosowaniem zarówno izolacji w hodowli komórkowej, jak również analizy RT-PCR. Wprowadzenie takiego systemu badań w przyszłości pozwoli na lepsze określenie profilu zakażeń enterowirusowych w Polsce.

## PODSUMOWANIE

W latach 2008-2009 zbadano 178 materiałów klinicznych, izolując enterowirusy z 24 próbek (13,5%). Najwyższy udział spośród izolowanych enterowirusów miały wirusy: Coxsackie B (25%), ECHO30 (25%) i ECHO6 (21%).

Częściej izolowano wirusy z materiałów pobranych od pacjentów z rozpoznaniem klinicznym innym niż porażenia wiotkie. Powszechność zakażeń enterowirusami u osób z rozpoznaniem klinicznym innym niż OPW, potwierdziło uzyskanie 72% dodatnich wyników w materiale badanym.

Wśród pacjentów ze wstępnie rozpoznaniem OPW niski odsetek izolowanych enterowirusów sugeruje obecność innego czynnika odpowiedzialnego za wywołanie objawów chorobowych.

Tabela I. Szczepy enterowirusów izolowane w latach 2008-2009 użyte do analizy techniką RT-PCR. Cieniem zaznaczono materiały pochodzące od pacjentów z podejrzeniem ostrego porażenia wiotkiego

Table I. Enteroviruses isolated in 2008-2009 used for RT-PCR analysis. Materials from patients with potential cases of AFP are shaded

Szczep wirusa/ symbol	Rok izolacji	Materiał	Szczep wirusa/ symbol	Rok izolacji	Materiał
ECHO25/318 I	2008	Kał	CoxB/2048 I	2008	Kał
Typ nieokreślony/ 319	2008	Płyn mózgowo rdzeniowy	CoxB/2048 II	2008	Kał
Typ nieokreślony/ 320 I	2008	Kał	CoxB/2051 I	2008	Kał
ECHO30/321 I	2008	Kał	CoxB/2055 II	2008	Kał
ECHO30/347 I	2008	Kał	ECHO30/360 I	2009	Kał
ECHO30/352 I	2008	Kał	Typ nieokreślony/ 419	2009	Płyn mózgowo- rdzeniowy
ECHO30/353 I	2008	Wymaz z gardła	ECHO30/421 I	2009	Kał
ECHO6/355 I	2008	Kał	CoxB/425	2009	Płyn mózgowo rdzeniowy
ECHO6/356	2008	Wymaz z gardła	CoxA9/426 I	2009	Kał
ECHO6/357 I	2008	Kał	CoxB/428 I	2009	Kał
ECHO6/358 I	2008	Płyn mózgowo- rdzeniowy	Polio T3/2093 I	2009	Kał
ECHO6/359 I	2008	Wymaz z gardła	Polio T3/2093 II	2009	Kał

## 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. Rotbart HA. Review: antiviral therapy for enteroviruses and rhinoviruses. A review of the history, current status and prospects for agents to treat rhinovirus and enterovirus infections. *Antiviral Chem Chemother* 2000; 11:261-271.
4. Fong TT, Lipp EK. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69(2):357-371.
5. Haas CN, Rose JB, Gerba CP, Regli R. Risk assessment of viruses in drinking water. *Risk Anal* 1993; 13:545-552.
6. Bosch A. Human enteric viruses in the water environment. *Int Microbiol* 1998; 1:191-196.
7. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment – a potential threat to Public Health. *Ann Agric Environm Med* 2008; 15:199-203.
8. Amvrosieva TV, Paklonskaya NV, Biazruchka AA, Kazinetz ON, Bohush ZF, Fisenko EG. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Cent Eur J Public Health* 2006; 14(2):67-73.
9. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol* 1999; 73:1941-1948.
10. Jarząbek Z. Zakażenia enterowirusami. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze-epidemiologia i profilaktyka, red. W. Magdzik, D. Naruszewicz-Lesiuk i A. Zieliński. Warszawa: alfa-medica Press, 2007; 364-369.
11. WHO. Accreditation of Global Polio Networks Laboratories. Accreditation of National Poliovirus Laboratories. Geneva, 1997.
12. Menegus M. Manual of clinical microbiology. In: Enteroviruses. 4th edition. Washington D.C. 1985; 743-746.
13. Witek A, Wieczorek M. Badania wirusologiczne i molekularne w zakażeniach enterowirusowych w Polsce w latach 2004-2008. *Przegl Epidemiol* 2009; 63:379-382.
14. Binduga-Gajewska I, Gut W, Jarząbek Z. Badania wirusologiczne udziału enterowirusów niepoliomyelitycznych w zakażeniach ośrodkowego układu nerwowego w Polsce w latach 1995-2000. *Przegl Epidemiol* 2003; 57:631-637.

Otrzymano: 12.07.2010 r.

Zakwalifikowano do druku: 31.08.2010 r.

**Adres do korespondencji:**

Mgr Agnieszka Witek, Mgr Marta Brzostkowska  
Zakład Wirusologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego

– Państwowy Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. 22 54 21 285

mail: awitek@pzh.gov.pl, mbrzostkowska@pzh.gov.pl