

*Agnieszka Witek, Marta Brzóstkowska, Anna Diuwe, Magdalena Wieczorek*

## IDENTYFIKACJA CZYNNIKA ZAKAŻNEGO W MATERIALE DIAGNOSTYCZNYM OD CHORYCH Z PODEJRZENIEM ENTEROWIRUSOWEGO ZAPALENIA OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

### IDENTIFICATION OF INFECTION AGENT IN DIAGNOSTIC MATERIAL FROM PATIENTS WITH SUSPICION OF ENTEROVIRAL MENINGITIS

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego  
– Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

#### STRESZCZENIE

Diagnostyka neuroinfekcji enterowirusowych polega głównie na izolacji wirusa w hodowli komórek wrażliwych i/lub na identyfikacji materiału genetycznego wirusa (RNA) w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr). Celem przedstawionej pracy była ocena przydatności w/w technik do szybkiej diagnostyki zachorowań o etiologii enterowirusowej. Stosując metody biologii molekularnej (RT-PCR) przebadano 69 pmr pobranych od pacjentów w ostrej fazie choroby. Dodatni wynik uzyskano z badania 39 próbek pmr (56,5%). Wybrano 20 dodatnich próbek pmr oraz 20 próbek kału uzyskanych od tych samych pacjentów, w których podjęto próbę izolacji wirusa w hodowli komórkowej. Dodatni wynik uzyskano tylko w jednym pmr, co stanowiło 5,3%. W przypadku próbek kału dodatni wynik izolacji uzyskano w 9 próbkach (45%).

**Słowa kluczowe:** *enterowirusy, RT-PCR, diagnostyka, zakażenia ośrodkowego układu nerwowego*

#### ABSTRACT

Clinical diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system are performed by virus isolation in sensitive cell lines and RT-PCR assay. The aim of the study was evaluation these techniques for fast diagnosis meningitis caused by enteroviruses. 69 samples (cerebrospinal fluid, CSF) were collected and analysed by RT-PCR reaction. 39 samples were positive (56.5%). 20 positive sample were selected and simultaneously 20 stool samples from the same patients were collected for virus isolation in sensitive cell line. Positive isolation was observed only in one CSF (5.3%) and in 9 stool samples (45%).

**Key words:** *enteroviruses, RT-PCR, diagnostics, meningitis*

#### WSTĘP

Zakażenia enterowirusami wśród ludzi są bardzo powszechne. Najczęściej przebiegają bezobjawowo, tylko część zachorowań kończy się rozwinięciem wielonarządowego zakażenia. Enterowirusy wywołują zakażenia począwszy od lekkich, w przebiegu których występują wykwity na błonach śluzowych i skórze, po choroby serca, mięśni, układu pokarmowego, czy choroby ośrodkowego układu nerwowego (oun).

Wirus dostaje się do organizmu drogą pokarmową lub oddechową, następnie namnaża się w tkance chłonnej gardła i jelita cienkiego. Po wystąpieniu wirerii wirus może przedostać się do oun (1). Potwierdzenie jego obecności w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr)

jest równoznaczne z identyfikacją czynnika etiologicznego neuroinfekcji, gdyż rozróżnienie neuroinfekcji enterowirusowych od wywołanych przez inne wirusy na podstawie samego obrazu klinicznego nie jest możliwe.

W diagnostyce neuroinfekcji enterowirusowych stosuje się przede wszystkim izolację wirusa w hodowli komórek wrażliwych oraz wykrywanie materiału genetycznego wirusa (RNA) w pmr. Izolacja i identyfikacja serotypu wirusa z pmr jest procesem długotrwałym (od 2 do 4 tygodni) i charakteryzuje się niską czułością, spowodowaną najczęściej niskim mianem wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym ( $10^1$ - $10^3$  TCID<sub>50</sub>/ml) (2). Ponadto, trudności izolacji wirusa z pmr w hodowli komórkowej często wynikają z popełnianych błędów przedanalizacyjnych tj. nieodpowiednich warunków

transportu, jak i nienależytego postępowania z materiałem do badań. Najpewniejszym źródłem izolacji enterowirusów jest kał osoby zakażonej, w którym miano wirusa jest wysokie, ponadto wirus wydalany jest z kałem przez długi okres czasu od wystąpienia pierwszych objawów choroby (średnio 2 tygodnie) (3). Jednakże izolowanie wirusa z kału w przypadku neuroinfekcji wydaje się być bezcelowe, gdyż identyfikacja wirusa w układzie pokarmowym nie potwierdza, że jest on czynnikiem etiologicznym zapalenia ośrodkowego układu nerwowego. Techniki molekularne uważa się za bardziej użyteczne w przypadku diagnozowania neuroinfekcji; wykrywają nawet kilka kopii RNA wirusowego w próbce badanej, także czas badania skraca się do kilku godzin. Najczęściej stosowana jest reakcja amplifikacji wysoce konserwatywnego regionu 5' NTR, która pozwala na wykrycie jeżeli nie wszystkich, to większości enterowirusów (4). Ten typ badań molekularnych nie dostarcza jednak informacji na temat serotypów krążących w populacji, nie identyfikuje także ognisk epidemicznych (5).

W celu wypracowania systemu badania neuroinfekcji, który polega na identyfikacji poszczególnych enterowirusów w materiale klinicznym, zastosowano równoległe zarówno izolację wirusów w hodowli komórkowej, jak również analizę RT-PCR. Przeprowadzono badania diagnostyczne próbek pmr i kałów uzyskanych od pacjentów z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego.

## MATERIAŁY I METODY

**Materiał diagnostyczny:** Materiał do badań stanowiły próbki 69 płynów mózgowo-rdzeniowych od pacjentów z podejrzeniem wirusowego zakażenia ośrodkowego układu nerwowego. We wszystkich próbkach określano obecność RNA enterowirusów metodą RT-PCR. Do dalszej analizy wybrano próbki 20 pmr dodatnich w reakcji RT-PCR, otrzymanych od pacjentów, od których pobrano również kał w fazie ostrej choroby.

**Reakcja RT-PCR:** Z badanych próbek izolowano materiał genetyczny za pomocą zestawu QIAamp Viral RNA, zgodnie z zaleceniami producenta. Na matrycy wyizolowanego RNA przeprowadzono reakcję RT-PCR z wykorzystaniem zestawu Super Script III one-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen). Zastosowano następujące startery:

PanEv1: 5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGT-TCC-3';

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

Reakcję wykrywającą RNA enterowirusowe przeprowadzono w następujących warunkach: 1 cykl – 20 min. w 45°C, 2 min. w temp. 94°C; 35 cykli – 30 sek. w temp. 94°C, 30 sek. w temp. 55°C, 30 sek. w temp. 70°C; 1 cykl – 5 min. w 72°C. Produkt amplifikacji (wielkość

114bp) wykrywano metodą elektroforezy w żelu agarozowym (2%) z dodatkiem bromku etydyny względem wzorca wielkości (BioRad).

**Izolacja i typowanie:** Izolację i typowanie enterowirusów przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (6). Izolację wirusa z badanych materiałów przeprowadzono w hodowli ludzkich komórek mięśniako-mięsaka wrażliwych na zakażenie enterowirusami (hodowla komórek RD). Pmr bezpośrednio dodawano do hodowli komórek RD, natomiast kał opracowywano z zastosowaniem chloroformu. Do identyfikacji serotypów enterowirusa zastosowano surowice poliklonalne. Identyfikacja polegała na zobojętnieniu zakaźności wirusa przez przeciwciała oraz na wykryciu pozostałości wirusa niezobojętnionego (6).

## WYNIKI I OMÓWIENIE

W reakcji RT-PCR, której wysoką czułość i swoistość opisano poprzednio (7) wykrywano obecność RNA enterowirusów w pmr otrzymanych od pacjentów z zakażeniem ośrodkowego układu nerwowego. Przebadano 69 materiałów, w 39 – 56,5% wykryto materiał genetyczny enterowirusów, natomiast 30 próbek było ujemnych, co stanowi 43,5% wszystkich próbek badanych. Otrzymany odsetek wyników dodatnich nie jest wysoki, bowiem szacuje się, że w krajach gdzie prowadzone są masowe szczepienia populacji przeciw wirusowi nagminnego zapalenia przyusznic (nzp), 85%-95% wszystkich przypadków aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych spowodowane jest właśnie zakażeniem o etiologii enterowirusowej.

Do dalszych badań wybrano próbki 20 pmr dodatnich w reakcji RT-PCR, z których podjęto próbę izolacji czynnika zakaźnego. Jednocześnie od tych samych pacjentów pobrano próbki kału w ostrej fazie choroby i z nich również, po wcześniejszym opracowaniu, izolowano wirusa w hodowli komórek RD. Wyniki przedstawiono w tabeli I. Tylko z jednego pmr dopiero w trzecim pasażu (oznaczenie 00+) udało się wyizolować szczep wirusowy, co stanowi 5,3% wszystkich badanych pmr. Natomiast z 9 próbek kału wyizolowano w hodowli komórkowej szczepy enterowirusów (45%), które następnie typowano metodą neutralizacji z zastosowaniem odpowiednich surowic. W jednym przypadku nie udało się określić typu wyizolowanego wirusa. Pozostałe wyizolowane szczepy wirusowe to ECHO30 (3 szczepy) i CoxA9 (5 szczepów). ECHO30 jest serotypem bardzo często izolowanym w Polsce począwszy od lat 90 (8). Jest to serotyp charakteryzujący się wysokim neurotropizmem i znaczną neurowirulencją. Jest on też często opisywany jako czynnik etiologiczny zachorowań na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych o charakterze epidemicznym, występujący na całym świecie. Podob-

Tabela I. Wyniki izolacji w kierunku enterowirusów próbek pmr i kału od pacjentów z potwierdzonym enterowirusowym zakażeniem oun

Table I. Results of enterovirus isolations in material from patients with enteroviral meningitis

Lp.	Materiał badany			
	pmr		kał	
	RT-PCR	Izolacja (CPE)	Izolacja (CPE)	Wynik typowania z surowicami WHO
1	+	-	00+	ECHO30
2-4	+	-	-	-
5	+	-	0+	Typ nieokreślony
6	+	-	00+	ECHO30
7	+	-	0+	CoxA9
8	+	-	0+	CoxA9
9	+	-	-	-
10	+	-	0+	CoxA9
11	+	-	-	-
12	+	-	00+	ECHO30
13	+	-	-	-
14	+	nb	-	-
15, 16	+	-	-	-
17	+	00+	00+	CoxA9
18	+	-	-	-
19	+	-	00+	CoxA9
20	+	-	-	-

0+ - efekt cytopatyczny w drugim pasażu

00+ - efekt cytopatyczny w trzecim pasażu

nb - nie badano

nie serotyp Coxsackie A9 był wymieniany wśród pięciu najczęściej izolowanych serotypów enterowirusów w USA w latach 2006-2008 (9).

Pojawianie się epidemii enterowirusowych często związane jest ze statusem ekonomicznym populacji. W warunkach niskiego poziomu higieny i wysokiego zagęszczenia ludności do zakażenia dochodzi na ogół w wieku niemowlęcym. W krajach uprzemysłowionych częstość zakażeń w wieku niemowlęcym jest niższa, przez co obserwuje się przesunięcie ekspozycji na zakażenie na wiek późniejszy (10). Wzrost odsetka osób nieposiadających przeciwciał dla poszczególnych typów enterowirusów sprzyja okresowemu występowaniu zachorowań. Najczęściej identyfikowane są epidemie wywołane przez typy wirusów charakteryzujące się wysoką neurowirulencją, które dają poważne objawy kliniczne. Natomiast w przypadku wielu zachorowań wywołanych serotypami o niskiej neurowirulencji, ich obecność w ogóle nie jest diagnozowana i identyfikowana (11).

Metody izolacji enterowirusów w hodowlach komórkowych przyczyniają się do tego, że jako czynnik etiologiczny zakażeń oun wymieniane są serotypy, które posiadają zdolność replikacji w hodowli komórek użytych do izolacji, natomiast serotypy nienamnażające się w hodowlach komórkowych często w ogóle nie są

identyfikowane (12). Zastosowanie metody RT-PCR jest szczególnie przydatne w diagnostyce zakażeń oun wywołanych przez typy wirusów, które nie namnażają się w hodowlach komórkowych (np. Coxsackie wirusy A typ 1 i 6). Obserwowana relacja między cząstkami zakaźnymi a cząstkami niezdolnymi do replikacji wynosi 1:100 powodując, że czułość metod molekularnych w znaczący sposób przewyższa czułość metody izolacji wirusów w hodowli komórkowej. Reakcja RT-PCR, która wykrywa materiał genetyczny wirusa zawarty także w cząstkach defektywnych, jest tym samym nie tylko o wiele szybsza, ale również o wiele czulsza od metody izolacji wirusa w hodowli komórkowej, która wykrywa obecność w próbie badanej tylko cząstki zakaźne wirusa. Jest to bardzo istotne z punktu widzenia diagnostyki indywidualnych przypadków zachorowań, w których ważne jest jedynie szybkie określenie, że czynnikiem etiologicznym choroby jest enterowirus. Określenie serotypu wirusa nie ma bowiem wpływu na postępowanie lecznicze, pozwala natomiast na badanie krążenia enterowirusów w populacji.

Coraz częściej opisywane są metody molekularne określające typ wirusa powodującego zakażenie (13,14,15). I ten typ diagnostyki, identyfikujący zarówno czynnik etiologiczny zakażenia, jak również identyfikujący czynnik epidemiczny, wydaje się być przyszłością diagnostyki chorób oun.

## WNIOSKI

Diagnostyka zakażeń ośrodkowego układu nerwowego, podejrzanych o etiologię enterowirusową powinna opierać się na wykrywaniu materiału genetycznego wirusa w płynie mózgowo-rdzeniowym metodą RT-PCR. Uzupełnienie tych badań o izolację z kału pacjenta szczepu wirusowego w hodowli komórek wrażliwych mogłoby dostarczyć cennych informacji na temat szczepów enterowirusowych krążących w środowisku.

## PIŚMIENNICTWO

1. Rhoades RE, Tabor-Godwin JM, Tsueng G, Feler R. Enterovirus infections of the central nervous system. *Virology* 2011;411:288-305.
2. Romero JR. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:1161-1169.
3. Minor PD. *Poliomyelitis*. Encyclopedia of virology. 3rd edition, 2008.
4. Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G, i in. A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Molecular and Cellular Probes* 2002;16:209-216.

5. Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. Sensitive, semi-nested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44:2698-2704.
6. WHO. Polio laboratory manual. 4<sup>th</sup> edition. WHO November 2004.
7. Witek A, Wieczorek M. Badania wirusologiczne i molekularne w zakażeniach enterowirusowych w Polsce w latach 2004-2008. *Przegl Epidemiol* 2009; 63:379-382.
8. 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.
9. Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2006-2008 [editorial]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010;59:1577-80.
10. Lukashev AN, Ivanova OE, Khudiaakova LV. Social and economic significance infection and its role in etiologic structure of infectious diseases in the world. *Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol* 2010; 5:113-120.
11. Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol* 2005; 5:424-433.
12. Leland DS, Ginocchio CC. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:49-78.
13. Xiao XL, Wu H, Li YJ, i in. Simultaneous detection of enterovirus 70 and coxsackievirus A24 variant by multiplex real-time RT-PCR using an internal control. *J Virol Methods* 2009; 159:23-28.
14. Piqueur M, Verstrepen WV, Bruynseels P i in. Improvement of a real-time RT-PCR assay for the detection of enterovirus RNA. *Virol J* 2009; 6:95.
15. Arita M, Ling H, Yan D, i in. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system for a highly sensitive detection of enterovirus in the stool samples of acute flaccid paralysis case. *BMC Infectious Diseases* 2009; 9:1471-2334.

Otrzymano: 21.07.2011 r.

Zakwalifikowano do druku: 2.08.2011 r.

**Adres do korespondencji:**

Mgr Agnieszka Witek, Dr Magdalena Wieczorek

Zakład Wirusologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy

Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. 22 54 21 285

e-mail: awitek@pzh.gov.pl, mrechnio@pzh.gov.pl