

Piotr Czupryna¹, Jowita Niczyporuk², Elżbieta Samorek-Salamonowicz²,
Anna Moniuszko¹, Justyna Dunaj¹, Joanna Zajkowska¹, Sławomir A Pancewicz¹

POSZUKIWANIE RNA WIRUSA ZACHODNIEGO NILU W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM U OSÓB CHORYCH NA ZAPALENIE OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH Z TERENU WOJEWÓDZTWA PODLASKIEGO

1. Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
2. Zakład Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach

STRESZCZENIE

CEL. Celem pracy było sprawdzenie, czy u pacjentów z limfocytarnym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych z terenu województwa polskiego występuje materiał genetyczny WNV w płynie mózgowo-rdzeniowym.

MATERIAŁ I METODY. Płyn mózgowo-rdzeniowy 24 chorych hospitalizowanych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji w Białymstoku w okresie maj-wrzesień z rozpoznaniem limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych przebadano metodą NRT-PCR pod kątem występowania materiału genetycznego WNV.

WYNIKI. W żadnej z próbek płynu mózgowo-rdzeniowego nie stwierdzono obecności RNA WNV.

Słowa kluczowe: *Wirus Zachodniego Nilu, WNV, RNA, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych*

WSTĘP

Wirus Zachodniego Nilu (WNV) jest RNA wirusem z rodzaju *Flaviviridae*. Wyróżnia się przynajmniej 2 linie genetyczne WNV – linię 1 występującą w Europie, Afryce, Ameryce Północnej, Australii, Indiach, linię 2 – głównie w Afryce. Rezerwuarem wirusa są najczęściej wędrowne ptaki mogące przenosić go z terenów tropikalnych na obszary o klimacie umiarkowanym. Wektorem wirusa są komary (*Culicidae*) (1).

Przebieg zakażenia WNV jest najczęściej bezobjawowy. Objawy kliniczne występują u 20-40% zakażonych (2,3). Najczęściej jest to łagodna choroba gorączkowa z dreszczami, bólami głowy, grudkową wysypką. W ok. 1 na 150 przypadków wirus atakuje ośrodkowy układ nerwowy wywołując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, mózgu lub porażenie wiotkie (4,5). Zapaleniu mózgu często towarzyszą objawy pozapiramidowe. Do innych objawów neurologicznych należą drżenia i mioklonie, głównie kończyn górnych. Porażenie wiotkie w przebiegu zakażenia WNV jest asymetryczne i może występować bez towarzyszącego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych lub mózgu (6). W przebiegu zakażenia WNV opisywano również zespół Guillain-Barré i porażenie splotu barkowego (7,8).

Śmiertelność u chorych z objawami neurologicznymi wynosi 5-14% (9). Po przechorowaniu wirus może przetrwać w organizmie.

W badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych obecność materiału genetycznego WNV stwierdzano zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w tkankach obwodowych (nerki, skóra, śledziona, serce, węzły chłonne) nawet w kilka miesięcy po zakażeniu. RNA wirusa stwierdzano w skórze wróbli domowych i myszy po 30 dniach od zakażenia, w nerkach myszy i chomików – po 60-247 dniach, w sercach dzikich ptaków – po 30 dniach, mózgu i rdzeniach kręgowych myszy, chomików i makaków – po 2-6 miesiącach (10,11).

U ludzi, którzy przebyli zapalenie mózgu o etiologii WNV RNA wirusa wykrywano w moczu 1,6-6,7 roku po ustąpieniu objawów (12).

U 3% dawców krwi, którzy przebyli bezobjawowe zakażenie WNV lub łagodną chorobę gorączkową, RNA wirusa stwierdzano po 40-104 dniach od zakażenia (13).

WNV wykazuje podobieństwo antygenowe do występującego w Polsce wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, co może być przyczyną występowania krzyżowych reakcji immunologicznych i omyłkowego rozpoznawania zakażeń WNV jako zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (5,14).

Celem pracy było sprawdzenie, czy zachorowania na limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych chorych z woj. podlaskiego było wywołane przez WNV. Uzyskanie wyników dodatnich tego badania świadczyłoby o występowaniu WNV na Podlasiu.

MATERIAŁ I METODY

Zbadano na obecność materiału genetycznego WNV metodą NRT-PCR płyn mózgowo-rdzeniowy pobrany od 24 chorych na zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych z terenu woj. podlaskiego w wieku od 19 do 76 lat (średnia 44 lata), w tym 10 kobiet i 14 mężczyzn. Chorzy byli hospitalizowani w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji w Białymstoku w okresie maj-wrzesień (okres największej aktywności komarów) 2010 z rozpoznaniem limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych przebadano metodą NRT-PCR pod kątem występowania materiału genetycznego WNV. Do badania włączono wszystkich hospitalizowanych z powodu limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych w tym okresie.

Wszyscy chorzy zostali dodatkowo przebadani pod kątem występowania przeciwciał w kierunku wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy. Badanie wykonano metodą ELISA testem Enzygnost Anti-TBE/FSME Virus [IgG, IgM] Siemens.

Płyn mózgowo-rdzeniowy był pobierany od chorych w dniu przyjęcia do Kliniki, zamrażany w temperaturze -20°C i transportowany do laboratorium Zakładu Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach (laboratorium klasy BSL III+). Do wykrywania RNA WNV użyto metody NRT-PCR opracowanej w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu (15).

IZOLACJA RNA. Materiał genetyczny wirusa został wyekstrahowany z próbki przy pomocy RNA mini-Kit (Quiagen) wg zaleceń producenta. RNA zostało zawieszane w PBS z dodatkiem inhibitora RNA-zy (Promega). Izolaty były przechowywane w temperaturze -70°C .

RT-PCR. Primery zostały zaprojektowane do oznaczania konserwatywnej sekwencji 3'NCR (regionu nie kodującego) (Gene Bank Accession Number: DQ211652) szczepu wirusa WNV NY99. Zostały użyte następujące sekwencje:

Primer sensowny WNV3: 5'-GCC ACC GGA AGT TGA GTA GA-3' i primer antysensowny WNV4: 5'-CTG GTT GTG CAG AGC AGA AG-3'. Długość powstałego produktu wynosiła 450 par zasad (bp).

Primery zostały zaprojektowane przez Instytut Polskiej Akademii Nauk w Warszawie.

Procedura amplifikacji została przeprowadzona przy użyciu Qiagen One Step RT-PCR kit.

NESTED-PCR. Primery użyte w Nested-PCR zostały utworzone na bazie sekwencji ampliconu RT-PCR. Primer sensowny (WNV5) 5' AAA GCC CAA TGT CAG ACC AC 3', primer antysensowny (WNV6) 5' TAG TCC TTT CGC CCT GGT TA 3'. Długość ampliconu wynosiła 150 bp.

ANALIZA PRODUKTÓW PCR. Produkty reakcji zostały poddane elektroforezie na 2% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny i analizowane na transiluminatorze UV. Produkt DNA miał długość 150 bp. Elektroforezę przeprowadzono w pH 8,2, przy napięciu 150V i natężeniu 80mA.

WYNIKI

Wszyscy pacjenci objęci badaniem byli narażeni na pokłucia przez komary i kleszcze.

Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego tych chorych wykazało średnią pleocytozę $105 \pm 121,5$ komórek i stężenie białka $73 \pm 50,1$ mg/dl (przy przyjęciu) oraz $37 \pm 29,6$ komórek i $48 \pm 22,1$ mg/dl (w badaniu kontrolnym wykonanym po 14 dniach).

U 16 chorych na podstawie badań serologicznych (dodatnie miano przeciwciał w klasie IgM i IgG) rozpoznano kzm.

W żadnej z 24 próbek płynu mózgowo-rdzeniowego nie stwierdzono obecności RNA WNV.

DYSKUSJA

Zasięg występowania WNV ciągle się zwiększa i zakażenia tym wirusem są coraz częściej stwierdzane w Europie. W 1996 roku epidemia gorączki Zachodniego Nilu wystąpiła w Rumunii (16), a w 2010 roku w Grecji (17). W latach 2008-2009 zachorowania stwierdzano w północnych Włoszech (18).

Obecność przeciwciał przeciwko WNV stwierdzano u mieszkańców Austrii, Czech i Niemiec (19), zaś na Białorusi wykryto wirusa u ptaków i komarów (20).

W ostatnich latach we Włoszech i w Grecji wykrywano u zwierząt WNV linii 2, dotychczas występujący jedynie w Afryce (21,22,23).

Diagnostyka w kierunku zakażenia WNV nie jest w Polsce rutynowo prowadzona. Na możliwość występowania zachorowań w Polsce wskazują badania potwierdzające obecność przeciwciał przeciwko WNV u ptaków.

W latach 1995-96 wykazano obecność przeciwciał przeciwko WNV u wróbli domowych (u 2,8% badanej populacji) i wróbli mazurków (u 12,1% badanej populacji) w okolicach Puszczy Kampinoskiej (24).

Badania prowadzone przez *Wegner* i wsp. na populacji ptaków dzikich należących do 10 gatunków wykazały, że u 10,6% osobników występowały przeciwciała przeciw WNV (25), zaś badania *Hubalka* i wsp. wykazały obecność przeciwciał u 5,2% badanych ptaków (26).

Badanie przeprowadzone metodą NRT-PCR przez Zakład Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach na 1912 ptakach polskich nie potwierdziło obecności materiału genetycznego WNV (27).

Kubica-Biernat i wsp. poszukiwali RNA WNV u komarów w 4 województwach (kujawsko-pomorskie, podlaskie, warmińsko-mazurskie, mazowieckie). Również te badania dały wynik negatywny (28).

Na możliwość występowania zakażeń WNV u ludzi w Polsce wskazują badania *Kondrusika* i wsp. (2007 r.) przeprowadzone wśród mieszkańców województwa podlaskiego i świętokrzyskiego. Autorzy przebadali 93 osoby, spośród których u 5 potwierdzono (zarówno metodą ELISA, jak i IFA) obecność przeciwciał przeciwko WNV (1). Wcześniej, bo w roku 2006, wykrycie przeciwciał w kierunku WNV u gorączkującej chorej opisywali *Hermanowska-Szpakowicz* i wsp. (14).

Diagnostykę WNV w Polsce utrudnia fakt krzyżowej reakcji przeciwciał z endemicznie występującym m.in. w województwie podlaskim wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. Dlatego też pozytywne wyniki badań serologicznych w kierunku WNV wymagają potwierdzenia testem neutralizacji (Plaque Reduction Neutralisation Test), niedostępnym w Polsce. Wyniki badań serologicznych wykonanych u analizowanych przez nas chorych wskazywały na możliwość zakażenia WNV, nie publikujemy ich jednak ze względu na brak możliwości weryfikacji testem PRNT.

Obecność materiału genetycznego wirusa we krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym można wykazać metodą PCR z odwrotną transkryptazą. Czułość metody PCR w wykrywaniu WNV w płynie mózgowo-rdzeniowym jest szacowana na ok. 55% (3).

PODSUMOWANIE

Fakt, iż nie udało się wykryć materiału genetycznego wirusa u naszych chorych nie wyklucza, że WNV jest czynnikiem sprawczym zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych w województwie podlaskim. Jak wspomniano na wstępie wirus ten stosunkowo rzadko zajmuje ośrodkowy układ nerwowy. Ponadto metoda PCR pozwala wykryć zakażenie jedynie w czasie, kiedy wirus jest obecny w płynie mózgowo-rdzeniowym. Dlatego też planowane są dalsze badania z wykorzystaniem metod serologicznych (z wykorzystaniem testu PRNT), co powinno dać odpowiedź na pytanie o rzeczywistą skalę występowania zakażeń WNV w województwie podlaskim i w Polsce.

Otrzymano: 30.09.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 15.12.2013 r.

Adres do korespondencji:

Piotr Czupryna

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Żurawia 14 Blok E 15-540 Białystok

Tel. 85 7409 514

E-mail: avalon-5@wp.pl

