

Využití molekulárně biologických metod v diagnostice virových gastroenteritid *Using molecular biological methods in the diagnosis of viral gastroenteritis*

Tomáš Zajíc, Martin Kracík

Souhrn

V České republice nepatří molekulárně biologický průkaz původců virových gastroenteritid ke standardním vyšetřením. V zahraničí je však tato metoda považována za zlatý standard. V naší studii jsme porovnávali běžně využívanou imunochromatografii (průkaz antigenu) s multiplexní PCR. Bylo vyšetřeno celkem 69 vzorků stolice, u kterých se podařilo zvýšit celkový záchyt původců o 35 % a v určitých skupinách pacientů až o 57 %. Výsledky studie by měly posloužit k zamyšlení o využití molekulárně biologických metod v průkazu původců virových gastroenteritid a také ke zvýšení povědomí o této skupině onemocnění, u které je celá řada otázek stále nezodpovězena.

In the Czech Republic, molecular biological detection of viruses causing gastroenteritis is not routinely used. Nevertheless, in other countries, this method is considered as a gold standard. In the present study, immunochromatography (antigen detection), a commonly used method, was compared with multiplex polymerase chain reaction (PCR). Sixty-nine stool samples were analyzed and a 35% to 57% higher overall detection rate of the causative agents was achieved. The study results should support the potential for use of molecular biological methods in the detection of viruses causing gastroenteritis and should enhance the awareness of these infections where a number of questions remain unanswered.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(4): 145–147.

Klíčová slova: Virové gastroenteritidy, laboratorní diagnostika, imunochromatografie, PCR
Keywords: *Viral gastroenteritis, laboratory diagnosis, immunochromatography, PCR*

ÚVOD

Dle oficiálních statistik (EPIDAT) je v ČR počet enteritid virové etiologie mnohem nižší než enteritid bakteriálních. Skutečnost však může být zcela opačná. Řada případů se totiž do statistik nedostane. Příčinou je nekomplikovaný průběh onemocnění a malý zájem jak laické, tak odborné veřejnosti. Důvodů proč trvat na správné diagnostice je však celá řada. Těžké průběhy sice nejsou v rozvinutých zemích časté, přesto se vyskytují a ani úmrtí na tato onemocnění nejsou raritou. Data získaná lepší diagnostikou lze využít pro sledování spektra původců, jejich chování, určování cest přenosu a možností prevence a léčby. Pomineme-li biomedicínskou stránku onemocnění, lze správnou diagnostikou napomoci k řešení socioekonomických problémů, které nemoc způsobuje.

V současnosti mohou být původci virových gastroenteritid identifikováni pomocí elektronové mikroskopie, ELISA metody, imunochromatografickým testem a PCR. Elektronová mikroskopie je rychlá, neselektivní metoda, umožňující průkaz virů pomocí morfologické identifikace. Pro rutinní diagnostiku je ale náročná na vybavení a finanční prostředky. Metoda ELISA je pro zavedenou labo-

ratoř prakticky bez nákladů na vybavení, cena testů a náročnost na provedení je střední. Průkaz antigenu imunochromatografickým testem je nejjednodušší metoda na provedení s nejnižšími požadavky na vybavení. Citlivostí se pohybuje na úrovni metody ELISA a je levnější [1, 6, 7, 8, 9]. PCR je v zahraničí považována za zlatý standard [2]. Disponuje nejlepší citlivostí a specificitou ze zmíněných metod, ale má vyšší nároky na vybavení laboratoří. Základní cena testu je jen mírně vyšší. Citlivost ELISA vs. PCR v diagnostice norovirů je 37–81 % [1, 2, 3, 4, 5, 10, 11]. Evropská multicentrická studie udává při vyšetření 2672 vzorků citlivost 44 % oproti PCR při použití ELISA soupravy RIDASCREEN (R-Biopharm), resp. 59 % při použití ELISA soupravy IDEIA (Oxoid, Thermo Fisher Scientific) [2]. Pro imunochromatografii platí obdobná čísla, námi nalezený rozptyl citlivosti oproti PCR je 48–85 % [1, 6, 7, 8, 9]

V naší studii jsme porovnávali v českých laboratořích rozšířenou imunochromatografii pro průkaz adenovirů, rotavirů a norovirů s multiplexní end-point PCR. PCR souprava umožňovala průkaz pěti původců virových gastroenteritid: noroviry genoskupin I a II, rotaviry, adenoviry a astroviry. Výsledky studie by měly posloužit k zamyšlení nad využitím molekulárně biologických metod k průkazu původců virových gastroenteritid a k posouzení, zda není zavedení této metody ve vztahu k investicím jak finančním, tak personálním přílišným luxusem.

MATERIÁL A METODY

Sběr vzorků

Vzorky stolice byly vybírány z materiálů doručených do laboratoře k rutinní diagnostice virových gastroenteritid. U nemocničních pacientů byly vzorky odebrány do několika hodin od začátku klinických příznaků. Vzorky z epidemických výskytů pak v režimu dnů až týdnů od prvních příznaků. Studie byla provedena na 69 vzorcích získaných od různých odesílatelů. 30 vzorků bylo odesláno z infekčního oddělení Krajské nemocnice Liberec, a.s., 21 vzorků z protiepidemického odboru Krajské hygienické stanice Liberec a 18 vzorků z ostatních oddělení liberecké nemocnice. Jednalo se o vzorky, které vyšly negativní v imunochromatografických testech na průkaz tří základních původců (noroviry, rotaviry, adenoviry) a nebyla zjištěna jiná příčina potíží - bakteriální původce, nespecifický střevní zánět, apod. - nebo nám nebyl znám klinický stav pacienta. Pro potřeby studie byly vzorky skladovány při teplotě -70 °C.

Imunochromatografie

Pro diagnostiku imunochromatografickým testem byly využity soupravy Immunoquick: Adenovirus, Rotavirus combo (Biosynex) a Immunoquick: Norovirus (Biosynex). Vyšetření bylo provedeno ihned po přijetí vzorku do laboratoře dle příbalových instrukcí.

Příprava vzorku a izolace RNA

Z 50-100 µg stolice byla připravena suspenze přidáním 500 µl virologického transportního média (UTM-RT COPAN). Suspenze byla centrifugována v 1,5 ml mikrozkuvkách po dobu 10 min při 15 000 g. Izolace RNA byla provedena z 150 µl supernatantu soupravou GeneProof Pathogen Free RNA Isolation Kit (Geneproof) dle návodu.

Reverzní transkripce a multiplex end-point PCR

Ihned po izolaci byla spuštěna reakce reverzní transkripce. Použita byla souprava RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas). Reakční směs: reakční pufr 4 µl, dNTP 2 µl, náhodný hexamer 1 µl, RevertAid 1 µl, Ribolock 1 µl, izolovaná RNA 11 µl. Program: 1 cyklus 25 °C 5 min, 1 cyklus 42 °C 60 min. Multiplex PCR bylo provedeno soupravou Seegene Diarrhea-V PCR kit (Seegene). Reakční směs: Multiplex master mix 10 µl, primery 4 µl, 8-MOP 3 µl, cDNA 3 µl. Program: 1 cyklus 94 °C 15min, 40 cyklů 94 °C 0,5 min, 60 °C 1,5 min, 72 °C 1,5 min, finální extenze 72 °C 10 min. Produkty PCR byly detekovány

metodou kapilární elektroforézy v přístroji MultiNA (Shimadzu).

VÝSLEDKY

Podářilo se nám určit původce virových gastroenteritid u 25 z 69 imunochromatograficky negativních vzorků. Z toho 24 vzorků obsahovalo 6 krát noroviry genoskupiny I, 20krát noroviry genoskupiny II. Ve dvou případech šlo o dualní infekci obou genoskupin. V jednom vzorku se podařilo zachytit astrovirus, který nebyl imunochromatograficky testován. Multiplex PCR je tedy o 35 % citlivější než imunochromatografické testy a nabízí možnost detekovat větší množství původců. Distribuci pozitivních nálezů dle místa původu vzorku popisuje tabulka 1.

DISKUZE

Výsledky naší studie potvrdily vyšší citlivost metody PCR, která odpovídá hodnotám uvedeným v zahraniční literatuře. Výrazný rozptyl navýšení citlivosti u jednotlivých skupin vzorků dle původu je dán pravděpodobně typem pacienta, který je pro tyto skupiny typický. U pacientů, jejichž vzorky byly odeslány z infekčního oddělení, je nejvyšší podezření na virovou etiologii. Tito pacienti jsou většinou bez komorbidit a vykazují typické příznaky virové gastroenteritidy. Jedná se tedy o skupinu ideální pro porovnávání citlivosti jednotlivých metod. Zvýšení citlivosti o 37 % u této skupiny je nejrelevantnějším údajem naší studie. Pacienti z jiných nemocničních oddělení byli většinou přijati do nemocnice z jiných důvodů než akutní gastroenteritida a její příznaky se u nich objevily během hospitalizace. Byli často polymorbidní a ve většině případů léčeni antibiotiky. Navíc na žádném oddělení nemocnice nebyl zaznamenán epidemický výskyt gastroenteritid. Průjem u pacientů byl tedy připisován dysmikrobii po léčbě antibiotiky. Odpovídá tomu i malé množství (2) pozitivních vzorků. Poslední skupina pacientů byla spojena se dvěma epidemickými výskytů gastroenteritid. Vysoké procento (57 %) imunochromatograficky falešně negativních vzorků je v tomto případě nejspíše způsobeno pozdním odběrem vzorků, kdy koncentrace virových partikulí klesla pod detekční mez imunochromatografických testů.

Zajímavé je spektrum patogenů zachycených v naší práci. Absence rotavirů je zřejmě způsobena věkovým rozložením pacientů, kdy prakticky chybí děti. Pouze u vzorků z lokálních epidemických výskytů se jednalo o školní kolektivy. Nižší věkové kategorie pacientů jsme bohužel nemohli zařadit do této studie vzhledem k téměř nulovým požadavkům o vyšetření stolice na přítomnost norovirů.

Tabulka 1: DISTRIBUCE POZITIVNÍCH NÁLEZŮ

Původ	noro. GI	noro. GII	astro.	pozitivních	celkem	%
infekční odd.	0	10	1	11	30	37
epidemiologie	6 *)	8 *)	0	12	21	57
jiná nemocniční odd.	0	2	0	2	18	11
Celkem záchytů	6	20	1			

*) 2x pacient s duální infekcí

Přítom dle evropských společností ESPHGAN/ESPID jsou noroviry etiologicky druhé nejčastější agens průjemových onemocnění u dětí včetně těch nejmenších (na prvním místě jsou právě rotaviry) [12]. Zastoupení norovirů pak může svědčit o značném poddiagnostikování v ČR, což by i odpovídalo údajům ze zahraničí, kdy se v souvislosti s noroviry, zejména GII.4, hovoří až o pandemii [13]. V akutní fázi gastroenteritidy by mělo být ve stolici přítomno řádově alespoň 10^6 virových partikulí na ml stolice. To je množství, které by nemělo být problémem ani pro metody s nižší citlivostí. Výrazný rozdíl v zachytu patogenu metodou PCR oproti imunochromatografii a metodě ELISA by mohl být způsoben například proměnlivou virovou náloží v jednotlivých stolicích pacienta, nebo jejím rychlým poklesem v době odeznívání akutní fáze.

U norovirů je známo, že pro některé genotypy je až 20 % bělošské populace rezistentní [14]. Jedná se o tzv. non-sekretory, tedy osoby, které mají nefunkční gen pro fukosyl transferázu a nemají na slizničních površích a v sekretech obsaženy komponenty ABH systému. ABH systém pravděpodobně souvisí s receptorem pro noroviry. Tito lidé tedy mohou vylučovat malé množství norovirů, ale sami ne onemocní. V tomto případě správně pozitivní výsledek PCR neodpovídá etiologií klinických obtíží. Zároveň to ale neznamená, že by rezistentní osoby nemohly být zdrojem infekce pro své okolí, ač s pravděpodobností mnohem nižší.

Dříve nebyly metody molekulární biologie využívány, především z důvodu finanční náročnosti. Dnes jsou však metody ELISA a PCR finančně srovnatelné jak ve vykazování pojišťovnam, tak v nákladech pro laboratoř, imunochromatografie pak vychází asi třikrát levněji v obou parametrech.

ZÁVĚR

V podmínkách rutinní laboratorní diagnostiky virových gastroenteritid je zařazení metod molekulární biologie vhodné. Z našich výsledků vyplývá zřetelné zlepšení zachytu patogenů při použití PCR. Nejužitečnější se jeví použití těchto metod při epidemických výskytech, kdy je k dispozici pouze materiál z pozdějšího odběru, či výtěr z rekta místo stolice.

Tato práce byla financována z fondu vědecké rady KNL a.s.

LITERATURA

- [1] Khamrin P, Nguyen TA, Phan TG, et al. Evaluation of immunochromatography and commercial enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of norovirus antigen in stool samples. *J Virol Methods*. 2008; 147(2): 360–363.
- [2] Gray JJ, Kohli E, Ruggeri FM, et al. European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detect-

- ing norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14(10): 1349–1355.
- [3] Wilhelmi de Cal I, et al. Evaluation of two commercial enzyme immunoassays for the detection of norovirus in faecal samples from hospitalised children with sporadic acute gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13(3): 341–343.
- [4] de Bruin E, et al. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006; 137(2): 259–264.
- [5] Okitsu-Negishi S, Okame M, Shimizu Y, et al. Detection of norovirus antigens from recombinant virus-like particles and stool samples by a commercial norovirus enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol*. 2006; 44(10): 3784–3786.
- [6] Bruins MJ, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of norovirus in stool samples. *European Journal of Clinical Microbiology* 2010; 29(6):741–743.
- [7] Bruggink LD, et al. Evaluation of the RIDA(®)QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *J Virol Methods*. 2011; 173(1): 121–126.
- [8] Ambert-Balay K, Pothier P. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. *J Clin Virol*. 2013; 56(3): 194–198.
- [9] Thongprachum A, et al. Evaluation and comparison of the efficiency of immunochromatography methods for norovirus detection. *Clin Lab*. 2012; 58(5-6): 489–493.
- [10] Geginat G, Kaiser D, Schrempf S. Evaluation of third-generation ELISA and a rapid immunochromatographic assay for the detection of norovirus infection in fecal samples from inpatients of a German tertiary care hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(5): 733–737.
- [11] Kirby A, et al. An evaluation of the RIDASCREEN and IDEIA enzyme immunoassays and the RIDAQUICK immunochromatographic test for the detection of norovirus in faecal specimens. *J Clin Virol*. 2010; 49(4): 254–257.
- [12] Guarino A, et al., European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008; 6(5): 619–621.
- [13] Debbink K, et al., Emergence of new pandemic GII.4 Sydney norovirus strain correlates with escape from herd immunity. *J Infect Dis*. 2013; 208(11): 1877–1887.
- [14] Debbink K, et al. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS Pathog* 2012; 8(10): e1002921.

Tomáš Zajíc

Martin Kracík

Oddělení klinické mikrobiologie a imunologie
Centrum laboratorní medicíny

Krajská nemocnice Liberec a.s.

tomas.zajic@nemlib.cz

martin.kracik@nemlib.cz