ENTEROVİRUSLARIN İZOLASYONUNDA DEĞİŞİK HÜCRE KÜLTÜRLERİNİN DUYARLILIKLARI

SENSITIVITIES OF DIFFERENT CELL CULTURES FOR THE ISOLATION OF ENTEROVIRUSES

Etem ÖZKAYA, Gülay KORUKLUOĞLU*, Tülay YALÇINKAYA* Ayten TÜRKERİ*, Tunca ATAK*, Ayhan KUBAR**

ÖZET: Bu çalışmada, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji, Doku Kültürü ve Enterovirus Laboratuvarı'na 1999-2000 yılları arasında akut flask paralizli ve aseptik menenjitli hastalardan gönderilen gaita ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerinden enterovirusların izolasyon ve tanımlanmasında, HEp-2 (insan epiteliyoma), RD (rabdomiyosarkom) ve L20B (fare kökenli, insan poliovirus reseptörü taşıyan hücreler) hücre kültürlerinin duyarlılıkları değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Çalışılan toplam 1663 örneğin 131'inden virus izolasyonu yapılmış ve bunların 120'si enterovirus, 11'i adenovirus olarak tanımlanmıştır. Sabin benzeri poliovirus olarak tiplendirilen 48 suşun HEp-2, RD ve L20B hücre kültürlerinden izolasyon oranları sırasıyla %83.3, %87.5 ve %91.6 olup, her üç hücre kültürü de benzer duyarlılıkta bulunmuştur. Echovirus olarak tiplendirilen 47 suşun hepsi RD hücrelerinden, Coxsackie B olarak tiplendirilen 13 suşun hepsi HEp-2 hücrelerinden ve poliovirus dışı enterovirus (non-polio enterovirus) olarak tanımlanan 12 suşun hepsi RD hücrelerinden izole edilmiştir. Tümünü HEp-2 hücrelerinde ürettiğimiz 11 adenovirus izolatının ise, gastrointestinal kanala ulaşarak tesadüfi olarak gaita ile salgılanan suşlar olduğu ve hastalarımız açısından klinik önemi olmadığı düşünülmüştür. Sonuç olarak, HEp-2, RD ve özellikle L20B hücrelerinin polioviruslara, RD hücresinin özellikle Echoviruslara, HEp-2 hücresinin ise özellikle Coxsackie tip B viruslara daha fazla duyarlı oldukları görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Enterovirus, izolasyon, hücre kültürü.

SUMMARY: In the present study, the sensitivities of HEp-2 (human epithelioma), RD (rhabdomyosarcoma) and L20B (mouse cells, that have receptors for human polioviruses) cell cultures have been evaluated and compared, for the isolation and identification of enteroviruses from the stool and cerebrospinal fluid samples of patients with acute flask paralysis and aseptic meningitis, which were examined between the years 1999-2000, in Refik Saydam Institute of Hygiene Center, Virology, Tissue Culture and Enterovirus Laboratory. Of a total of 1663

* Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji Laboratuvarı, Ankara.

Geliş Tarihi: 15.2.2002 Kabul Ediliş Tarihi: 20.2.2003

samples, 131 viral strains were isolated, and 120 of them were identified as enteroviruses, and 11 as adenoviruses. The isolation rates of 48 Sabin-like polioviruses from HEp-2, RD and L20B cell lines were found similar, as 83.3%, 87.5%and 91.6%, respectively. All of 47 Echovirus strains were isolated from RD cells, all of 13 Coxsackie type B strains were isolated from HEp-2 cells, and all of 12 non-polio enteroviruses were isolated from RD cells. All of 11 adenovirus strains that have been grown in Hep-2 cells, were thought to be occasionally isolated due to the passage of viruses to gastrointestinal tract, and excreted via stool, thus having no clinical significance for these patients. As a result, it was concluded that, all of these three cell lines and especially L20B were sensitive for polioviruses, RD cell line being more sensitive for Echovirus, and HEp-2 cell line being more sensitive for Coxsackie type B virus strains.

Key words: Enterovirus, isolation, cell culture.

GİRİŞ

Picornaviridae ailesi içinde yer alan insan enterovirusları, yeni sınıflandırma ile Poliovirus (3 serotip), Coxsackie virus A (23 serotip) ve Coxsackie virus B (6 serotip), Echovirus (28 serotip) ve Enterovirus tip 68-71'den (4 serotip) oluşmaktadır[1,2]. Enteroviral enfeksiyonlar arasında en önemlileri poliomyelit/polioensefalit, aseptik menenjit, ensefalit, miyokardit/perikardit, pleurodinia, solunum yolu hastalıkları, eksantem ve enantemler ve gastroenteritler olmakla birlikte, enterovirusların neden olduğu klinik olarak tanımlanmış yirmiden fazla sendrom mevcuttur[1]. Enteroviruslar, tüm dünyada soğuk algınlığı viruslarından sonra ikinci sıklıkta görülen enfeksiyon etkenleri olup halk sağlığı yönünden büyük önem taşımaktadırlar[3]. Enfeksiyon etkeni olarak izole edilen enterovirusların tiplendirilmesi de epidemiyolojik açıdan gereklidir.

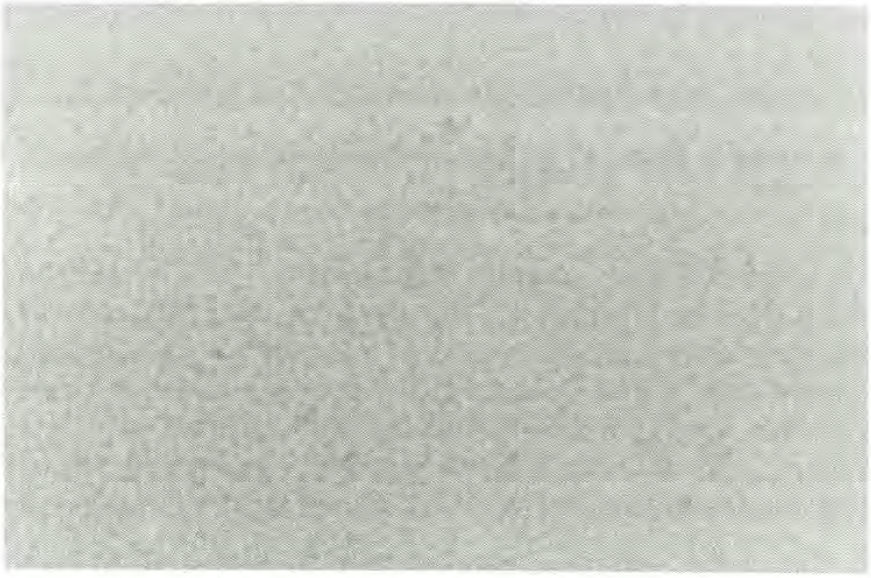
Viral enfeksiyonların tanısında çok sayıda yeni ve hızlı yöntemin geliştirilmiş olmasına rağmen, konvansiyonel bir yöntem olan hücre kültürlerinden virus izolasyonu halen altın standart olma özelliğini korumaktadır. Özellikle enteroviral enfeksiyonların tanımlanmasında hücre kültür sistemleri değer taşır, ancak bu işlem zor ve zaman alıcıdır. Bütün enterovirusların üretilmesi için kullanılan tek bir hücre kültürü olmamasına rağmen, birçok enterovirus serotipi rabdomiyosarkom (RD) hücrelerinde üreyebilmektedir[2]. Özellikle klinik örneklerden izolasyon şansını artırmak için hücre kültür kombinasyonlarının kullanılması önerilmektedir, oysa günümüzde bu kombinasyonlarla ilgili bir fikir birliği oluşmamıştır[4]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), klinik örnekte düşük titrede bulunabilecek poliovirusların atlanmaması için RD ve HEp-2 hücrelerinin yanısıra, sadece polioviruslara duyarlı olduğu bilinen L20B hücrelerine ekim yapılmasının da gerektiğini vurgulamaktadır[3,5].

Laboratuvarımızda, enteroviral enfeksiyondan şüphelenilen hastalardan gönderilen gaita, beyin omurilik sıvısı ve boğaz sürüntüsü gibi örneklerden enterovirus izolasyonu, üç farklı hücre tipi kullanılarak yapılmakta ve serotiplendirme için enteroviruslara özgül poliklonal hiperimmün antiserumlar ve polio tiplendirme (tip 1, 2, 3) serumları kullanılmaktadır. Bunun yanısıra izole edilen tüm virusların tanımlanma zorunluluğu nedeniyle, enterovirus dışı diğer viruslar yönünden de inceleme yapılmaktadır.

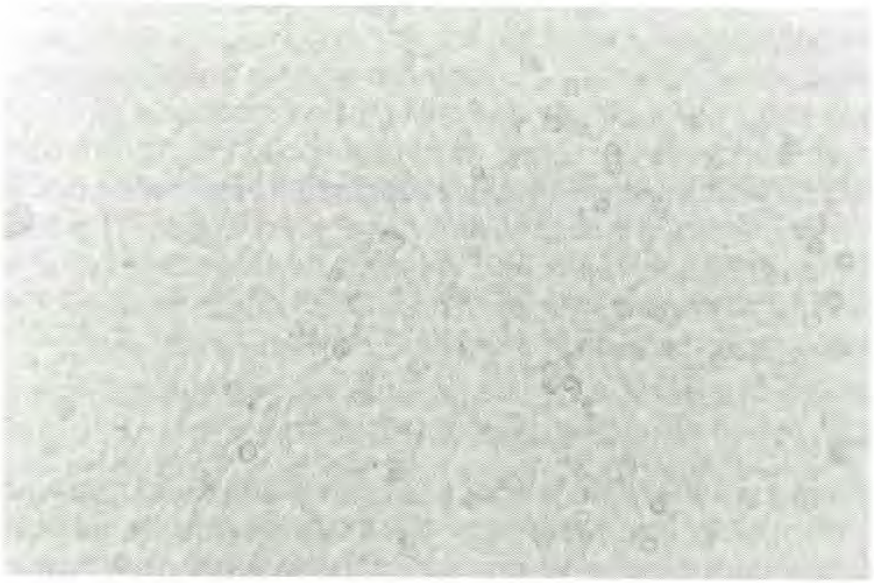
Bu retrospektif çalışmada, laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerden enterovirus izolasyonunda, HEp-2, RD ve L20B hücre kültürlerinin duyarlılıklarının değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

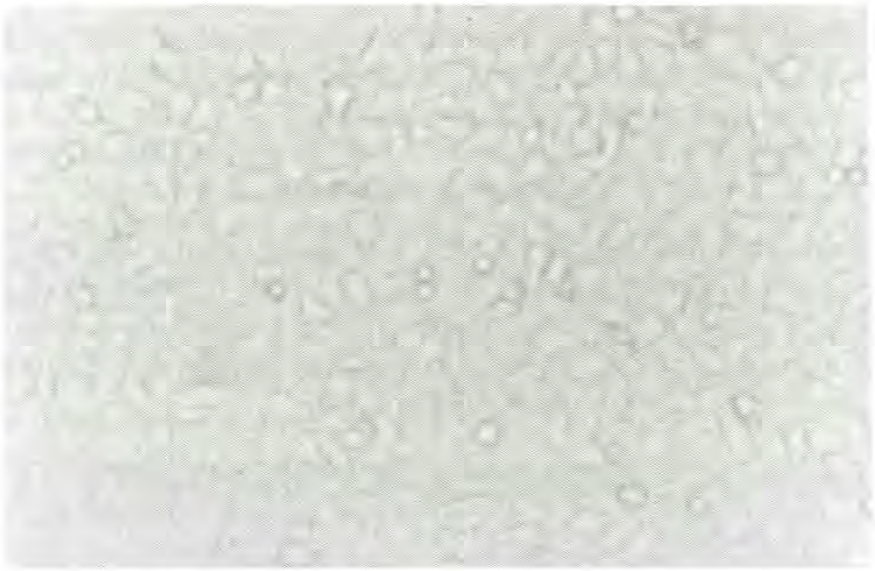
Hücre Kültürleri: Kullanılacak HEp-2 (insan epitelyoma), L20B (fare kökenli ve insan poliovirus reseptörü taşıyan L hücre dizisi) ve RD (rabdomiyosarkom) hücre kültürleri, %5-10 fetal dana serumu eklenmiş Eagle's vasatı (Autoclavable Eagle's Minimum Essential Medium, EMEM) kullanılarak steril polistren hücre kültür tüplerinde tek tabaka halinde üretildi (Resim 1-3).



Resim 1: Sağlıklı ve tek tabaka halindeki RD hücre kültürü.



Resim 2: Sağlıklı ve tek tabaka halindeki L20B hücre kültürü.



Resim 3: Sağlıklı ve tek tabaka halindeki Hep-2 hücre kültürü.

Örnekler: 1999-2000 yılları arasında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Viroloji, Doku Kültürü ve Enterovirus Laboratuvarı'na, akut flask paralizi ve aseptik menenjiti olan hastalardan gönderilen toplam 1663 gaita ve beyin omurilik sıvısı (BOS) örneği çalışmaya dahil edildi. Gaita örnekleri, öncelikle hücre kültürüne toksik etki yapabilecek bakteri, mantar ve toksik maddelerin uzaklaştırılması amacıyla kloroformla muamele edilerek santrifüj edildi. Üstteki sıvı kısım ayrı bir tüpe alınarak ekim için kullanıldı. BOS örnekleri steril olarak alındıkları için herhangi bir ön işleme tabi tutulmadı.

Hücre Kültürlerine Ekim ve Değerlendirme: Örnekler her üç hücre kültürüne de 0.2 ml olmak üzere ekildi ve inkübasyona bırakıldı[2,3]. Kültürler, herhangi bir virus üremesinden kaynaklanabilecek sitopatik etki (CPE) oluşumu yönünden 7 gün boyunca günlük olarak izlendi. CPE negatif veya pozitif tüm örnekler tekrar aynı tip hücrelere pasajlanarak 7 gün inkübe edildi ve günlük CPE takibi yapıldı. Toplam 14 gün süreyle izleme sonunda CPE saptanan örnekler pozitif, saptanmayanlar ise negatif olarak kabul edildi (Resim 4). Pozitif örnekler, poliovirus (tip 1,2,3) ve diğer enteroviruslara (echovirus, coxsackie virus) özgül poliklonal hiperimmün antiserum (RIVM, Hollanda) setleri kullanılarak mikronötralizasyon yöntemiyle serotiplendirildi[1,6]. Serotiplendirme ile poliovirus olmayan ve tip tayini yapılamayanlar polio dışı enterovirus (non-polio enterovirus, NPEV) olarak değerlendirildi. Ayrıca, enterovirus olarak tiplendirilemeyip adenovirusa benzer CPE görülen hücrelerin kültür sıvısı, polivalan lateks aglütinasyon kiti (Adenolex, Finland) ile test edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda 1663 klinik örneğin 131'inden (%7.8) virus izolasyonu yapılmış, bunların 120'si (%7.2) enterovirus, 11'i (%0.6) adenovirus olarak tanımlanmıştır. Serotiplendirilen enteroviruslar ile bunların hücre kültürlerinden izolasyon oranları Tablo I'de görülmektedir.



Resim 4: RD hücre kültüründe Echovirus tip 30'a bağlı sitopatik etki.

Tablo I: Tiplendirilen Enteroviruslar ve Hücre Kültürlerinden İzolasyon Oranları

Virus Tipi (Sayı)	HEp-2 Sayı (%)	RD Sayı (%)	L20B Sayı (%)
Poliovirus* (n: 48)	40 (83.3)	42 (87.5)	44 (91.6)
Echovirus (n: 47)	20 (42.5)	47 (100)	0
Coxsackie tip B (n: 13)	13 (100)	0	0
NPEV** (n: 12)	5 (41.6)	12 (100)	0

* Sabin aşı benzeri (Sabin-like) polioviruslardır.

** Poliovirus olmayan, Echo, Coxsackie tip A veya B viruslardan oluşan fakat tip tayini yapılamamış enteroviruslardır (non-polio enterovirus).

Görüldüğü gibi, her üç hücre tipinin de polioviruslara benzer oranlarda duyarlılık göstermesine karşın, poliovirusların %91.6'sı, DSÖ tarafından geliştirilen ve sadece polioviruslara duyarlı olduğu bildirilen L20B hücre kültürlerinden izole edilmiştir. Echoviruslar ve polio dışı enterovirusların (NPEV) hepsi RD hücrelerinde, Coxsackie tip B viruslarının hepsi ise Hep-2 hücrelerinde üremiştir.

Çalışmada izole edilen echovirusların serotipleri ve üredikleri hücrelere göre dağılımı Tablo II'de verilmiştir. Burada da tüm tiplerin RD hücrelerinde daha iyi üredikleri ve en sık izole edilen serotipin tip 30 olduğu görülmektedir.

Çalışmada izole edilen adenovirusların hepsinin Hep-2 hücre kültüründe üredikleri saptanmış, ancak bunların tesadüfi olarak gaita ile salgılanan ve klinik bir öneme sahip olmayan suşlar olduğu düşünülmüştür.

Tablo II: Echovirus Serotipleri ve Üredikleri Hücrelere Göre Dağılımları

Echovirus Tipi (Sayı)	RD	Hep-2
Tip 30 (22)	22	3
Tip 25 (7)	7	3
Tip 11 (6)	6	5
Tip 7 (4)	4	4
Tip 14 (2)	2	1
Tip 24 (2)	2	2
Tip 6 (1)	1	–
Tip 13 (1)	1	1
Tip 17 (1)	1	1
Tip 20 (1)	1	–
Toplam	47	20

TARTIŞMA

Enteroviral etkenlerle oluşan ve genellikle hafif seyreden başlıca enfeksiyon olan aseptik menenjitlerde ve diğer enfeksiyonlarda, virusun izolasyon ve tanımlanması için hücre kültür sistemleri kullanılmaktadır, ancak bu işlem oldukça zor ve zaman alıcıdır[1,2]. Bilinen tüm enterovirus serotiplerinin üremesi için kullanılan tek bir hücre kültürü yoktur ve enteroviral izolasyon olasılığını yükseltmek amacıyla genellikle hücre kültürlerinin kombinasyonları kullanılmaktadır[3,4]. Çoğu enterovirus serotipleri RD hücrelerinde ürediği halde klinik örneklerden izolasyon oldukça güçtür. Muhtemel bir enteroviral etkenin laboratuvar tanısı hücre kültürleri kullanılarak 14 günden daha fazla bir süre gerektirebilmektedir. Aynı örnekte birden fazla enterovirus bulunduğu durumlarda işe daha uzun sürelere gereksinim vardır[2].

Günümüzde enterovirusların izolasyon ve serotiplendirmesi, araştırma ve referans laboratuvarları tarafından yapılmaktadır. Şüpheli paralitik poliomyelit vakalarında, poliovirusların polio dışı enteroviruslardan ayırımı ve dolayısıyla poliovirusların izolasyon ve serotiplendirmesinde kullanılacak olan hücre kültürünün seçimi büyük önem taşımaktadır[6,7]. Bu çalışmada, laboratuvarımızda enterovirus izolasyonu için kullanılan HEp-2, RD ve L20B hücrelerinin duyarlılıkları karşılaştırılmış ve her üç hücre kültürünün de polioviruslara birbirine yakın duyarlılıkta olduğu, echoviruslara en duyarlı hücrenin RD, coxsackievirus tip B'ye ise HEp-2 olduğu görülmüştür.

Tüm dünyadan poliovirus eradikasyonu hedefiyle DSÖ tarafından başlatılan program kapsamında Ulusal Polio Referans Laboratuvarı olarak görev yapmakta olan laboratuvarımıza ait veriler, kapsamı içinde olduğumuz kalite kontrol programı gereğince Avrupa Bölgesi Referans Laboratuvarı olan RIVM Enstitüsü'ne (Bilthoven, Hollanda) gönderilerek denetlenmektedir. Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları da RIVM Enstitüsü tarafından kontrol edilmiş ve kendi verileri ile uyumlu bulunmuştur.

Polio dışı enterovirusların aynı örnekte polioviruslarla karışık olarak bulundukları durumlarda poliovirusların üremelerini interfere etme olasılıkları vardır. Böyle bir durumda ya da poliovirusların örnekte düşük titrelerde bulunması halinde, son yıllarda polio eradikasyon programı çerçevesinde sadece polioviruslara duyarlı olan

L20B hücresinin kullanılması gerektiği vurgulanmaktadır[5,8]. Özellikle gaita örneklerinde birden fazla enteroviral etkenin bulunması sıklıkla karşılaşılan bir durum olduğu için ve serotiplendirme panelinin Coxsackie A viruslarının tiplendirilmesinde yetersiz kalması nedeniyle, etkenlerin tip düzeyinde tayinleri son derece zahmetli olmaktadır[9]. Dünyada yaygın olarak dolaşan enterovirus tiplerinin büyük ölçüde saptanmış olması, ülkemizdeki tiplerin de tespitini epidemiyolojik olarak önemli kılmaktadır. Çalışmamızda akut flask paralizli ve aseptik menenjitli hastalara ait 1663 örneğin 48'inden Sabin benzeri poliovirus, 47'sinden echovirus, 13'ünden Coxsackie tip B ve 12'sinden poliovirus dışı enterovirus izolasyonu yapılmış, echoviruslar arasında en sık rastlanılan tiplerin tip 30 ve tip 25 olduğu belirlenmiştir.

Akut solunum hastalığı, epidemik keratokonjunktivit, hemorajik sistit ve gastroenterit gibi enfeksiyonlara yol açan adenoviruslar ise 47 serotipe sahiptir ve bunların yaklaşık yarısı insanlarda enfeksiyonlara sebep olmaktadır[10]. Sıklıkla üst solunum yolunda yerleşen adenoviruslar buradan kaybolduktan sonra gastrointestinal kanalda uzun süreler bulunabilmekte ve birkaç ay boyunca semptom oluşturmaksızın gaita ile salgılanmaktadırlar[10]. Birçok adenovirus tipinin, insan epitel orijinli hücre kültürlerinde kolaylıkla üretilebilmesine karşın, enterik adenoviruslar olarak bilinen serotip 40 ve 41 hücre kültürlerinde son derece zor ürerler[10]. Gerek bu nedenlerle gerekse hastalarımızın kliniği yönünden, çalışmamızda gaita örneklerinden izole edilen adenovirusların enterik adenovirus olmadığını ve tesadüfi olarak gastrointestinal kanala ulaşan diğer serotipler olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, DSÖ önerileri doğrultusunda başta polioviruslar olmak üzere enterovirusların izolasyonu için laboratuvarımızda kullanmakta olduğumuz hücre kültürlerinin duyarlılıklarını değerlendirmek ve karşılaştırmak amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışmanın, ülkemizde enterovirusların epidemiyolojik profilinin araştırmasıyla ilgili olarak yapılacak daha geniş izolasyon ve tiplendirme çalışmalarına ışık tutacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Rotbart HA: Meningitis and encephalitis, pp: 271-291. In: Rotbart HA (Ed), Human Enterovirus Infections. 1995, American Society for Microbiology, Washington DC.
2. Grandien M, Forsgren M, Ehrnst A: Enteroviruses, pp: 279-297. In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET (Eds), Diagnostic Procedures for Viral, Ricketsial, and Chlamydial Infections. 1995, 7th ed, American Public Health Association, Washington DC.
3. World Health Organization: Manual for the virological investigation of Polio, pp: 20-32. Global Programme For Vaccines And Immunization, Expanded Programme On Immunization. 1997, WHO, Geneva.
4. Olivo PD: Transgenic cell lines for detection of animal viruses. Clin Microbiol Rev 1996, 9: 321-334.
5. World Health Organization: Polio Lab Network, Quarterly Update. Global Programme For Vaccines And Immunization, Expanded Programme On Immunization. Vol 4, No 2. 1998, WHO, Geneva.
6. Leonardi GP, Greenberg BJ, Costello PC, Szabo C: Echovirus type 30 infection associated with aseptic meningitis in Nassau County, New York, USA. Intervirology 1993, 36: 53-56.
7. Yoshii K, Yoneyama T, Shimizu H, Yoshida, H, Hagiwara A: Sensitivity of cells to poliovirus. Jpn J Infect Dis 1999, 52: 169.

8. Hagiwara A, Yoneyama T, Yoshii K, Yoshida H, Shimizu H, Miyamura T: Difference of poliovirus isolation from stool specimens in different cell lines. Jpn J Infect Dis 1999, 52: 164-165.

9. Spencer HSL, James EB, Margaret AM, Kvin RF: A novel approach to enterovirus typing. J Med Virol 1991, 35: 128-132.

10. Hierholzer JC: Adenoviruses, pp: 896-903. In: Balows A (Ed-in-Chief), Manual of Clinical Microbiology. 1991, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington DC.