

MAGDALENA HUBALEWSKA-MAZGAJ, GRAŻYNA BOCHENEK,
GRAŻYNA PULKA, MAREK SANAK

WYKRYWANIE OBECNOŚCI GENOMU RYNOWIRUSA W POPLUCZYNACH NOSOWYCH U CHORYCH NA ASTMĘ

ABSTRACT

Human rhinoviruses (HRV) are one of the nine genera belonging to a large family of Picornaviridae. They are responsible for the most cases of common cold, as well as one third to one half of upper respiratory tract (URT) infections. However, HRV are also associated with more severe illnesses, like acute otitis media, sinusitis and some lower respiratory tract diseases such as pneumonia, wheezing in children and exacerbations of asthma. Viral infections are associated with the majority of asthma exacerbations both in children (80-85%) and adults (75-80%), and about 60% of these are caused by HRV. However, the exact mechanism of HRV-induced exacerbations of the disease is not well understood, which makes it difficult to establish the effective treatment.

There have already been many attempts to develop a sensitive and specific method of HRV detection in clinical samples. Some of them were based on virus cultures followed by acid lability test, whereas others implemented the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and amplification of conserved sequences of the rhinoviral genome. As numerous of these sequences are common to both rhinoviruses and enteroviruses (EVs), further analyses were necessary, which made those methods laborious, time-consuming and too difficult to use in routine diagnostics.

Steininger et al. established an RT-PCR-based sensitive and specific method of rhinovirus detection in clinical samples, which was tested to amplify 87 different tissue-culture-grown serotypes of HRV. The aim of this study was to evaluate a modified RT-PCR based method of HRV detection in clinical samples obtained from patients with asthma exacerbations.

tions. We collected 41 nasal lavages from patients with asthma exacerbations who received hospital treatment either following an admission or in an out-patient clinic. HRV was found in 22 cases (54%), which corresponded well with the published data.

WSTĘP

Ludzkie rynowirusy (ang. *human rhinovirus*, HRV) są rodzajem wirusów należących do rodziny pikornawirusów (*Picornaviridae*). Są to małe, pozbawione otoczki cząstki o średnicy kapsydu ok. 35-30 nm, a ich materiałem genetycznym jest pojedynczy łańcuch RNA o dodatniej polarności. Większość rynowirusów wymaga względnie niskiej temperatury do replikacji – 33°C. Świadczy to o ich przystosowaniu do obecności w jamie nosowo-gardłowej i jest związane z zakażeniami górnych dróg oddechowych.

Rynowirusy są najczęstszym czynnikiem etiologicznym zakażeń górnych dróg oddechowych u ludzi. Odpowiadają za około połowę przeziębień każdego roku oraz są przyczyną większości chorób układu oddechowego w okresie wiosennym i jesiennym. Ponadto wykazany został związek zakażeń rynowirusowych z ostrym zapaleniem ucha środkowego¹, zapaleniami płuc u dzieci² oraz zaostrzeniami astmy zarówno u dzieci, jak i u dorosłych³.

Szacuje się, że 40-85% zaostrzeń astmy ma związek z wirusowymi zakażeniami górnych dróg oddechowych⁴, z czego 60% wywołują rynowirusy. Liczne badania sugerują istnienie swoistej zależności między podatnością na zakażenie wirusem a zmianami w biologii dróg oddechowych wywołanymi takimi chorobami jak właśnie astma. Przyczyną objawów astmy jest skurcz oskrzeli, który wynika z toczącego się stanu zapalnego dróg oddechowych oraz z ich nadreaktywności. Nadal nie zostało wyjaśnione, jakie mechanizmy związane z zakażeniem wirusowym dróg oddechowych prowadzą do zaostrzeń objawów astmy.

¹ M. Arola, T. Ziegler, O. Ruuskanen, J. Mertsola, K. Nanto-Salonen, P. Halonen, *Rhinovirus in acute otitis media*, "Journal of Pediatrics" 1988, Vol. 113, s. 693-695.

² M.J. Abzug, A.C. Beam, E.A. Gyorkos, M.J. Levin MJ., *Viral pneumonia in the first month of life*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1990, Vol. 9, s. 881-885.

³ S.L. Johnston, P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell et al., *Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children*, "BMJ" 1995, Vol. 310, s. 1225-1229; K.G. Nicholson, J. Kent, D.C. Ireland, *Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults*, "BMJ" 1993, Vol. 307, s. 982-986; W.W. Busse, J.E. Gern, *Viruses in asthma*, „Journal of Allergy and Clinical Immunology" 1997, Vol. 100, s. 147-150; P.K. Pattemore, S.L. Johnston, P.G. Bardin, *Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology*, "Clinical and Experimental Allergy" 1992, Vol. 22, s. 325- 336.

⁴ S.L. Johnston, P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell et al., op. cit., s. 1225-1229; K.G. Nicholson, J. Kent, D.C. Ireland, op. cit., s. 982-986.

Obecnie zostało dobrze udokumentowane, że w porównaniu z osobami zdrowymi chorzy na astmę są bardziej podatni na zakażenia rynowirusami (HRV) oraz mają cięższe i dłużej utrzymujące się objawy ze strony dolnych dróg oddechowych w przebiegu infekcji HRV⁵. Co więcej, potwierdzenie obecności HRV w dolnych drogach oddechowych pacjentów chorych na astmę ma swoje odzwierciedlenie w cięższym przebiegu klinicznym choroby⁶.

Znanych jest ponad 100 różnych serotypów HRV, sklasyfikowanych na podstawie wielu parametrów, takich jak między innymi powinowactwo komórkowych receptorów dla HRV czy homologia sekwencji genomu HRV. Na podstawie homologii sekwencji nukleotydowych, w szczególności analizy regionu genomu wirusa kodującego białko jego kaspynu VP4/VP2, wyodrębniono dwie główne grupy rynowirusów – HRV-A oraz HRV-B. W 2004 r. zidentyfikowano nowy genotyp rynowirusa⁷, który dał początek kolejnej grupie rynowirusów – HRV-C, odróżnianej od pozostałych na podstawie sekwencji genu VP4⁸. Ze względu na ogromne znaczenie rynowirusów jako patogenów ludzkich podejmowano liczne próby znalezienia czulej i swoistej metody wykrywania HRV w materiale klinicznym. Starsze metody oparte były na namnażaniu wirusa w hodowlach komórkowych, a następnie ich izolacji oraz inkubacji w środowisku o różnym pH w celu sprawdzenia podatności na inaktywację (ang. *acid-lability test*)⁹. W ten sposób odróżniano rynowirusy od enterowirusów. Metody te jednak miały niewystarczającą użyteczność, głównie ze względu na czasochłonność (ok. 2 tygodnie), co stanowiło o ich niskiej przydatności do rutynowej diagnostyki. Namnażanie wirusa w hodowlach komórkowych, a następnie mianowanie z użyciem swoistych dla HRV przeciwciał również nie przynosi zadowalających efektów – dzieje się tak ze względu na niską czułość metody¹⁰. Dlatego też działania te zostały wyparte przez znacznie szybsze i bardziej

⁵ J.M. Corne, C. Marshall, S. Smith, J. Schreiber, G. Sanderson, S.T. Holgate, S.L. Johnston, *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*, "Lancet" 2002, Vol. 359 (9309), s. 831-834.

⁶ M. Wos, M. Sanak, J. Soja, H. Olechnowicz, W.W. Busse, A. Szczeklik, *The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" Vol. 2088/177, s. 1082-1089.

⁷ D. Lamson, N. Renwick, V. Kapoor, Z. Liu, G. Palacios, J. Ju, A. Dean, K. George, T. Briese, W.I. Lipkin, *MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005*, "Journal of Infectious Diseases" 2006, Vol. 194, s. 1398-1402.

⁸ S.K. Lau, C.C. Yip, H.W. Tsoi, R.A. Lee, L.Y. So, Y.L. Lau, K.H. Chan, P.C. Woo, K.Y. Yuen, *Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children*, "Journal of Clinical Microbiology" 2007, Vol. 45 (11), s. 3655-3664.

⁹ B.Y. Yun, M.R. Kim, J.Y. Park, E.H. Choi, H.J. Lee, C.K. Yun, *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1995, Vol. 14 (12), s. 1054-1059.

¹⁰ P.K. Pattermore, S.L. Johnston, P.G. Bardin, op. cit., s. 325-336.

czułe techniki molekularne oparte na odwrotnej transkrypcji i PCR¹¹. Wśród licznych doniesień, w których stosowano metody oparte o PCR do wykrywania HRV w materiale biologicznym, zdecydowana większość polegała na amplifikacji wysoce konserwatywnego regionu niekodującego końca 5' (5'NCR)¹² lub fragmentów genów kapsydu HRV (VP2, VP4)¹³. Ze względu na fakt, że niektóre z tych sekwencji są wspólne dla rynowirusów i enterowirusów, również zakażających drogi oddechowe, niezbędne są dalsze analizy prowadzące do identyfikacji materiału genetycznego pochodzącego od rynowirusów. Polegają one na hybridyzacji otrzymanych fragmentów ze specyficznymi dla HRV sondami¹⁴, trawieniu enzymami restrykcyjnymi¹⁵, sekwencjonowaniu otrzymanych fragmentów lub analizie różnic w wielkości produktów reakcji PCR¹⁶, co znacznie wydłuża czas oczekiwania na wyniki i przez to obniża użyteczność tego typu metod do celów rutynowej diagnostyki.

¹¹ E. Arruda, A. Pitkäranta, T.J.J. Witek, C.A. Doyle, F.G. Hayden, *Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (11), s. 2864-2868.

¹² E. Arruda, F.G. Hayden, *Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR*, "Molecular and Cellular Probes" 1993, Vol. 7 (5), s. 373-379; R.E. Gama, P.R. Horsnell, P.J. Hughes, C. North, C.B. Bruce, W. al-Nakib, G. Stanway, *Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction*, "Journal of Medical Virology" 1989, Vol. 28 (2), s. 73-77; P. Halonen, E. Rocha, J. Hierholzer, B. Holloway, T. Hyypiä, P. Hurskainen, M. Pallansch, *Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization*, "Journal of Clinical Microbiology" 1995, Vol. 33 (3), s. 648-653; D.C. Ireland, J. Kent, K.G. Nicholson, *Improved detection of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR*, "Journal of Medical Virology" 1993, Vol. 40 (2), s. 96-101; S.L. Johnston, G. Sanderson, P.K. Pattemore, S. Smith, P.G. Bardin, C.B. Bruce, P.R. Lambden, D.A. Tyrrell, S.T. Holgate, *Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (1), s. 111-117; U. Kämmerer, B. Kunkel, K. Korn, *Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses*, "Journal of Clinical Microbiology" 1994, Vol. 32 (2), s. 285-291; J. Santti, T. Hyypiä, P. Halonen, *Comparison of PCR primer pairs in the detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates*, "Journal of Virological Methods" 1997, Vol. 66 (1), s. 139-147.

¹³ F. Freymuth, A. Vabret, F. Galateau-Salle, J. Ferey, G. Eugene, J. Petitjean, E. Gennetay, J. Brouard, M. Jolik, J.F. Duhamel, B. Guillois, *Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization*, "Clinical and Diagnostic Virology" 1997, Vol. 8 (1), s. 31-40; J. Mori, J.P. Clewley, *Polymerase chain reaction and sequencing for typing rhinovirus RNA*, "Journal of Medical Virology" 1994, Vol. 44 (4), s. 323-329; D.M. Olive, S. al-Mufti, W. al-Mulla, M.A. Khan, A. Pasca, G. Stanway, W. al-Nakib, *Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification*, "Journal of General Virology" 1990, Vol. 71, s. 2141-2147.

¹⁴ D.C. Ireland, J. Kent, K.G. Nicholson, op. cit., s. 96-101; S.L. Johnston, G. Sanderson, P.K. Pattemore, S. Smith, P.G. Bardin, C.B. Bruce, P.R. Lambden, D.A. Tyrrell, S.T. Holgate, op. cit., s. 111-117; A.C. Andeweg, T.M. Bestebroer, M. Huybreghs, T.G. Kimman, J.C. de Jong, *Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (3), s. 524-530; S. Blomqvist, A. Skyttä, M. Roivainen, T. Hovi, *Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (9), s. 2813-2816; A. Pitkäranta, E. Arruda, H. Malmberg, F.G. Hayden, *Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (7), s. 1791-1793.

¹⁵ U. Kämmerer, B. Kunkel, K. Korn, op. cit., s. 285-291.

¹⁶ J. Mori, J.P. Clewley, op. cit., s. 323-329; D.M. Olive, S. al-Mufti, W. al-Mulla, M.A. Khan, A. Pasca, G. Stanway, W. al-Nakib, op. cit., s. 2141-2147; R.L. Atmar, P.R. Georghiou, *Classification of respiratory tract picornavirus isolates as enteroviruses or rhinoviruses by using reverse transcription-polymerase chain reaction*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (9), s. 2544-2546.

Steininger i wsp.¹⁷ opracowali czułą i swoistą metodę szybkiej i selektywnej detekcji HRV w materiale klinicznym. Skuteczność metody została potwierdzona na podstawie amplifikacji genomu 87 różnych serotypów HRV z hodowli komórkowych. Swoistość metody sprawdzono, poddając próbie amplifikacji wybrane enterowirusy (coxackie wirusy B1-B6, echowirusy 18, 24 oraz 30, poliovirusy 1-3) oraz inne wirusy dróg oddechowych, takie jak adenowirusy, wirusy grypy, paragrypy, koronawirus OC43 oraz wirus RSV (ang. *Respiratory Syncytial Virus*). Sekwencje genomowe żadnego z enterowirusów, jak również innych wymienionych patogenów dróg oddechowych, nie poddawały się amplifikacji za pomocą użytej metody, co potwierdza jej wysoką swoistość wobec wirusów HRV.

Zważywszy, że większość zaostrzeń astmy jest związana z zakażeniami rynowirusowymi, celem pracy było określenie – przy zastosowaniu omawianej metody – częstości występowania HRV w popłuczynach nosowych pobranych od chorych z zaostrzeniem astmy.

OPIS METODY

DETEKCJA SEKWENCJI RYNOWIRUSOWEGO RNA W MATERIALE POCHODZĄCYM OD CHORYCH NA ASTMĘ

STARTERY I AMPLIFIKOWANA SEKWENCJA

Zgodnie z metodologią opisaną przez Steininger i wsp., sekwencje starterów do reakcji RT-PCR zostały wybrane na podstawie serotypu 14 rynowirusa. Zastosowano następujące startery do odwrotnej transkrypcji oraz pierwszego etapu reakcji PCR (PCR z zewnętrzną parą starterów): cDNA, 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'; starter antysensowny: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'; produkt amplifikacji miał wielkość 106 par zasad. Sekwencje starterów dla drugiego etapu reakcji (wewnętrzna para starterów) były następujące: cDNA, 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'; starter antysensowny: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C(AG)T CC-3'; amplifikowany fragment miał wielkość 93 par zasad.

PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Natychmiast po pobraniu od pacjenta aspiratu nosowego (popłuczyny z nosa uzyskane po przepłukaniu przewodów nosowych 10 ml soli fizjologicznej) do próbki dodawano 1 µl inhibitora rybonukleaz (RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, Carlsbad,

¹⁷ Ch. Steininger, S.W. Aberle, T. Popow-Kraupp, *Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 2001, Vol. 39 (1), s. 129-133.

CA). Następnie próbkę przenoszono do jałowej probówki typu Falcon, mieszano z 1/3 objętości roztworu glikolu polietylenowego (0,1M HEPES pH 7.0, 30% PEG 6000, Sigma-Aldrich, z dodatkiem 1,8M NaCl) i inkubowano w 4°C przez kilka dni w celu precypitacji cząstek wirusa. Następnie próbkę wirowano (15 minut, 15000 rpm, 4°C) i izolowano z niej RNA (osobno z pelety i z supernatantu) przy pomocy zestawu do izolacji RNA (Total RNA Kit, A&A Biotechnology, Gdynia, Polska).

ODWROTNA TRANSKRYPCJA I AMPLIFIKACJA

Do amplifikacji sekwencji genomu HRV wprowadzono modyfikacje metody opisanej przez Steininger i wsp., głównie w zakresie programów termocyklera użytych do reakcji PCR. Do odwrotnej transkrypcji użyto 10µl roztworu wyizolowanego RNA (całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej – 50µl). Reakcję przeprowadzono osobno dla RNA wyizolowanego z pelety i z supernatantu. Posłużono się zestawem do odwrotnej transkrypcji i amplifikacji z użyciem tego samego enzymu – polimerazy Tth (GeneAmp EZ rTth RNA PCR Kit, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey), zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 60°C przez 30 minut (etap odwrotnej transkrypcji), a następnie przeprowadzono dwuetapową reakcję PCR (zagnieżdżony PCR), co stanowiło łącznie 95 cykli amplifikacji.

Parametry programu do pierwszej reakcji PCR (50 cykli) były następujące: denaturacja przez 20 sekund, przyłączanie starterów w temp. 60°C przez 30 sekund, elongacja w temp. 72°C przez 40 sekund, końcowa inkubacja w 72°C przez 5 minut. Drugi etap amplifikacji, w którym matrycę stanowiło 2µl uzyskanej uprzednio mieszaniny poreakcyjnej, rozpoczynała 10-minutowa denaturacja, po której następowało 45 cykli programu: denaturacja – 20 sekund, przyłączanie starterów w 60°C – 30 sekund, elongacja – 40 sekund oraz końcowa inkubacja – 5 minut w 72°C. Do każdej serii analizowanych próbek dodawano dwie kontrole: pozytywną (materiał od chorego, z wcześniej potwierdzoną obecnością HRV) oraz negatywną. Ponadto, każdorazowo do pierwszego etapu PCR dodawano enzym uracylo-N-glikozylazę (AmpErase UNG, 1U/µl, Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey) w celu uniknięcia ewentualnej kontaminacji materiałem amplifikowanym między kolejnymi seriami próbek.

ANALIZA PRODUKTÓW REAKCJI PCR

Po przeprowadzonej amplifikacji produkty (10µl) uwidaczniano za pomocą elektroforezy w 2-procentowym żelu agarozowym (Nu Micropor Agarose, Prona) z dodatkiem bromku etydyny.

OSOBY BADANE

Popłuczyny nosowe pobrano od 41 chorych, zgłaszających się z powodu zaostrzenia astmy, hospitalizowanych lub pozostających w leczeniu ambulatoryjnym II Katedry Chorób Wewnętrznych. Chorzy byli rekrutowani w okresie od stycznia 2009 do marca 2010 roku. Ich wiek mieścił się w przedziale między 18. a 84. rokiem życia (mediana: 50 lat). Wśród zbadanych osób było 30 kobiet oraz 11 mężczyzn.

Do badania włączono wszystkich chorych, którzy spełniali kryteria zaostrzenia astmy oskrzelowej zgodnie z najnowszymi wytycznymi opublikowanymi w „American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine” w 2009 roku. Ów zaostrzony stan stwierdza się u osoby chorej, jeśli zaistniała potrzeba zastosowania systemowej steroidoterapii lub zwiększenia dotychczasowej dawki glikokortykosteroidów przez co najmniej 3 kolejne dni bądź zaszła konieczność hospitalizacji lub pobytu na oddziale intensywnej opieki medycznej z powodu astmy, wymagająca włączenia systemowej steroidoterapii¹⁸.

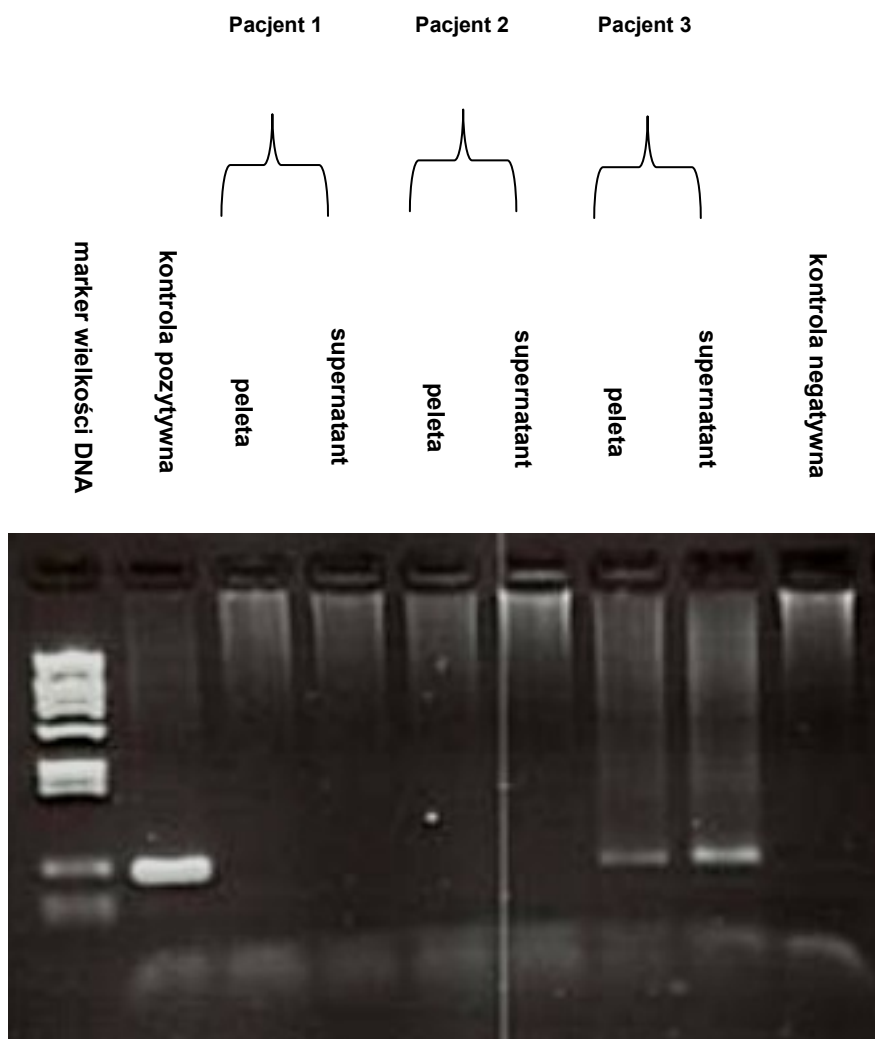
WYNIKI

Spośród 41 chorych włączonych do badania, u 22 osób wykryto obecność genomu rynowirusów, co stanowi 54% analizowanych próbek (17/30 kobiet czyli 57%, 5/11 mężczyzn, czyli 45%). Dodatni wynik reakcji PCR potwierdzono, przeprowadzając sekwencjonowanie otrzymanego produktu amplifikacji. Porównanie wyników badania pelety uzyskanej przez precypitację cząstek wirusa glikolem polietylenowym z wynikami badania supernatantu wskazuje na celowość wprowadzenia tego kroku do procedury postępowania z analizowanymi próbkami. W próbkach, w których wykryto obecność rynowirusa, najczęściej sygnał otrzymywano zarówno w pelecie, jak i w supernatancie. Były jednak przypadki, w których

¹⁸ H.K. Reddel, D.R. Taylor, E.D. Bateman, L.P. Boulet, H.A. Boushey, W.W. Busse, T.B. Casale, P. Chanez, P.L. Enright, P.G. Gibson, J.C. de Jongste, H.A. Kerstjens, S.C. Lazarus, M.L. Levy, P.M. O'Byrne, M.R. Partridge, I.D. Pavord, M.R. Sears, P.J. Sterk, S.W. Stoloff, S.D. Sullivan, S.J. Szefler, M.D. Thomas, S.E. Wenzel, *American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice*, “American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine” 2009, Vol. 180 (1), s. 59-99.

obecność rynowirusa wykrywano jedynie w pelecie, co prawdopodobnie wynika z niskiej liczby kopii wirusa w próbce. W takim przypadku precypitacja glikolem polietylenowym wydaje się mieć istotne znaczenie.

Rys. 1. Zdjęcie żelu po podziale elektroforetycznym produktów amplifikacji



Źródło: Materiały własne

DYSKUSJA

Z opublikowanych badań wynika, że około 80% przypadków zaostrzeń astmy oskrzelowej ma związek z zakażeniami wirusowymi dróg oddechowych, z czego około 60% to infekcje rynowirusowe (co daje około 50% zaostrzeń astmy wywołanych zakażeniami HRV). Odsetek chorych, u których wykryto genom HRV, w przeprowadzonym badaniu jest zbliżony i wynosi 54%. Zastosowana metoda jest niewątpliwie bardzo czuła (łącznie 95 cykli amplifi-

kacji), co znajduje potwierdzenie w przeprowadzonych eksperymentach metodologicznych, w których zawsze uzyskiwano produkt amplifikacji w przypadku obecności co najmniej 10 kopii wirusa. Jest to szczególnie istotne podczas poszukiwania materiału rynowirusowego w błonkach nosowych, ponieważ nawet w razie uzyskania małej ilości materiału do badania wciąż istnieje duże prawdopodobieństwo otrzymania dodatniego wyniku u osób z zakażeniem HRV (dzięki tak czulej reakcji PCR). Zastosowana metoda została również sprawdzona pod względem swoistości wobec HRV. Należy jednak pamiętać, że jej skuteczność jest potwierdzona dla 87 różnych serotypów rynowirusów, podczas gdy obecnie znanych jest ponad 100 różnych serotypów zakażających ludzkie drogi oddechowe. Nie ma więc pewności, czy próba detekcji HRV w materiale od osób zakażonych pozostałymi serotypami nie daje fałszywie negatywnego wyniku przy zastosowaniu takiej metody. Wskazane byłoby zatem oznaczenie genotypów wirusów wykrytych w próbkach klinicznych oraz dodatkowe sprawdzenie metody pod kątem detekcji pozostałych serotypów HRV. Konieczne jest także przeprowadzenie podobnych analiz na znacznie większej próbie badanych osób.

BIBLIOGRAFIA

1. Abzug M.J., Beam A.C., Gyorkos E.A., Levin M.J., *Viral pneumonia in the first month of life*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1990, Vol. 9.
2. Andeweg A.C., Bestebroer T.M., Huybreghs M., Kimman T.G., de Jong J.C., *Improved detection of rhinoviruses in clinical samples by using a newly developed nested reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (3).
3. Arola M., Ziegler T., Ruuskanen O., Mertsola J., Nanto-Salonen K., Halonen P., *Rhinovirus in acute otitis media*, "Journal of Pediatrics" 1988, Vol. 113.
4. Arruda E., Hayden F.G., *Detection of human rhinovirus RNA in nasal washings by PCR*, "Molecular and Cellular Probes" 1993, Vol. 7 (5).
5. Arruda E., Pitkäranta A., Witek T.J.J., Doyle C.A., Hayden F.G., *Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (11).
6. Atmar R.L., Georghiou P.R., *Classification of respiratory tract picornavirus isolates as enteroviruses or rhinoviruses by using reverse transcription-polymerase chain reaction*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (9).
7. Blomqvist S., Skyttä A., Roivainen M., Hovi T., *Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridization assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 1999, Vol. 37 (9).
8. Busse W.W., Gern J.E., *Viruses in asthma*, "Journal of Allergy and Clinical Immunology" 1997, Vol. 100.
9. Corne J.M., Marshall C., Smith S., Schreiber J., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L., *Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study*, "Lancet" 2002, Vol. 359 (9309).

10. Freymuth F., Vabret A., Galateau-Salle F., Ferey J., Eugene G., Petitjean J., Gennetay E., Brouard J., Jokik M., Duhamel J.F., Guillois B., *Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization*, "Clinical and Diagnostic Virology" 1997, Vol. 8 (1).
11. Gama R.E., Horsnell P.R., Hughes P.J., North C., Bruce C.B., al-Nakib W., Stanway G., *Amplification of rhinovirus specific nucleic acids from clinical samples using the polymerase chain reaction*, "Journal of Medical Virology" 1989, Vol. 28 (2).
12. Halonen P., Rocha E., Hierholzer J., Holloway B., Hyypiä T., Hurskainen P., Pallansch M., *Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization*, "Journal of Clinical Microbiology" 1995, Vol. 33 (3).
13. Ireland D.C., Kent J., Nicholson K.G., *Improved detection of rhinoviruses in nasal and throat swabs by seminested RT-PCR*, "Journal of Medical Virology" 1993, Vol. 40 (2).
14. Johnston S.L., Pattemore P.K., Sanderson G., Smith S., Lampe F., Josephs L., Symington P., O'Toole S., Myint S.H., Tyrrell D.A. et al., *Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children*, "BMJ" 1995, Vol. 310.
15. Johnston S.L., Sanderson G., Pattemore P.K., Smith S., Bardin P.G., Bruce C.B., Lambden P.R., Tyrrell D.A., Holgate S.T., *Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms*, "Journal of Clinical Microbiology" 1993, Vol. 31 (1).
16. Kämmerer U., Kunkel B., Korn K., *Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses*, "Journal of Clinical Microbiology" 1994, Vol. 32 (2).
17. Lamson D., Renwick N., Kapoor V., Liu Z., Palacios G., Ju J., Dean A., George K., Briese T., Lipkin W.I., *MassTag polymerase-chain-reaction detection of respiratory pathogens, including a new rhinovirus genotype, that caused influenza-like illness in New York State during 2004-2005*, "Journal of Infectious Diseases" 2006, Vol. 194.
18. Lau S.K., Yip C.C., Tsoi H.W., Lee R.A., So L.Y., Lau Y.L., Chan K.H., Woo P.C., Yuen K.Y., *Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children*, "Journal of Clinical Microbiology" 2007, Vol. 45 (11).
19. Mori J., Clewley J.P., *Polymerase chain reaction and sequencing for typing rhinovirus RNA*, "Journal of Medical Virology" 1994, Vol. 44 (4).
20. Nicholson K.G., Kent J., Ireland D.C., *Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults*, "BMJ" 1993, Vol. 307.
21. Olive D.M., al-Mufti S., al-Mulla W., Khan M.A., Pasca A., Stanway G., al-Nakib W., *Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification*, "Journal of General Virology" 1990, Vol. 71.
22. Pattemore P.K., Johnston S.L., Bardin P.G., *Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. Epidemiology*, "Clinical and Experimental Allergy" 1992, Vol. 22.
23. Pitkäranta A., Arruda E., Malmberg H., Hayden F.G., *Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR*, "Journal of Clinical Microbiology" 1997, Vol. 35 (7).

24. Reddel H.K., Taylor D.R., Bateman E.D., Boulet L.P., Boushey H.A., Busse W.W., Casale T.B., Chanez P., Enright P.L., Gibson P.G., de Jongste J.C., Kerstjens H.A., Lazarus S.C., Levy M.L., O'Byrne P.M., Partridge M.R., Pavord I.D., Sears M.R., Sterk P.J., Stoloff S.W., Sullivan S.D., Szeffler S.J., Thomas M.D., Wenzel S.E., *American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on Asthma Control and Exacerbations. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: asthma control and exacerbations: standardizing endpoints for clinical asthma trials and clinical practice*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" 2009, Vol. 180 (1).
25. Santti J., Hyypiä T., Halonen P., *Comparison of PCR primer pairs in the detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates*, "Journal of Virological Methods" 1997, Vol. 66 (1).
26. Steininger Ch., Aberle S.W., Popow-Kraupp T., *Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay*, "Journal of Clinical Microbiology" 2001, Vol. 39 (1).
27. Wos M., Sanak M., Soja J., Olechnowicz H., Busse W.W., Szczeklik A., *The presence of rhinovirus in lower airways of patients with bronchial asthma*, "American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine" 2008, Vol. 177.
28. Yun B.Y., Kim M.R., Park J.Y., Choi E.H., Lee H.J., Yun C.K., *Viral etiology and epidemiology of acute lower respiratory tract infections in Korean children*, "Pediatric Infectious Disease Journal" 1995, Vol. 14 (12).