

Die Labordiagnostik von Polioviren nach der Eradikation der Poliomyelitis in Europa

K. Bienz^a, C. Bourquin^b

a Schweizerisches Referenzlabor für Poliomyelitis am Institut für Med. Mikrobiologie, Basel

b Bundesamt für Gesundheit, Bern

- 1 Manor Y, Handsher R, Halmut T, Neuman M, Bobrov A, Rudich H, et al. Detection of poliovirus circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian Authority. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):1670-5.
- 2 Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Eremeeva TP, Chumakov KM, et al. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol* 2002;76(13):6791-9.
- 3 Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:151-78.
- 4 Abramson JS, Baker CJ, Fisher MC, Gerber MA, Meissner HC, Murray DL, et al. Prevention of poliomyelitis: Recommendations for use of only inactivated poliovirus vaccine for routine immunization. *Pediatrics* 1999;104(6):1404-6.
- 5 Acute Flaccid Paralysis Associated with Circulating Vaccine-Derived Poliovirus. Philippines, 2001. *MMWR* 2001;50:874.
- 6 Outbreak of Poliomyelitis. Dominican Republic and Haiti, 2000–2001. *MMWR* 2001;50:147.
- 7 Richtlinien zur Bekämpfung übertragbarer Krankheiten, Suppl III. BAG 2001.

Korrespondenz:
Prof. Dr. Kurt Bienz
Universität Basel
Institut für Medizinische
Mikrobiologie
Petersplatz 10
CH-4003 Basel
Tel. 061 267 32 90
Fax 061 267 32 83

E-Mail: Kurt.Bienz@unibas.ch

Zusammenfassung

Europa, die beiden Amerika und der Westpazifik sind von der WHO als poliomyelitischfrei erklärt worden. In anderen Teilen der Welt ist das Wildtyp-Poliiovirus und damit die Poliomyelitis noch endemisch. Vielerorts wird, wie bis vor kurzem auch noch bei uns, der orale Polioimpfstoff nach Sabin verwendet. Dieser kann aber zu neurovirulenten Formen zurückmutieren und dann in nicht-geimpften Personen ebenfalls eine Poliomyelitis auslösen. Deshalb wird weltweit, in Zusammenarbeit mit der WHO, das Auftreten von Poliomyelitis überwacht. In der Schweiz geschieht dies durch eine virologische Abklärung aller AFP-Fälle bis zum Alter von 15 Jahren (AFP: acute flaccid paralysis, akute schlaffe Lähmung), grundsätzlich auch solcher mit geringer (klinischer) Poliomyelitis-Wahrscheinlichkeit. Diese kostenlose Abklärung soll über das Schweizerische Referenzlabor für Poliomyelitis durch zwei Stuhlproben im Abstand von max. 48 Stunden erfolgen. Die Labordiagnostik geschieht durch Virusisolierung in Zellkulturen. Die Wertigkeit anderer Methoden und Untersuchungsmaterialien für den Nachweis von Polio- und anderen Enteroviren wird besprochen.

Seit 1994 ist Nord- und Südamerika, seit 2000 die Westpazifische Region und seit Juli 2002 Europa gemäss WHO-Definition frei von Poliomyelitis. Das heisst, dass in diesen Gebieten seit wenigstens 3 Jahren keine autochtonen Poliofälle mehr aufgetreten sind und dass keine Wildtyp-Polioviren mehr zirkulieren. Da aber in den meisten Staaten dieser Regionen bis vor kurzem noch die oralen Polioimpfstoffe (OPV) mit lebenden, abgeschwächten Erregern (Sabin-Stämme) verwendet wurde, zirkulieren an ihrer Stelle die Impfviren in der Bevölkerung [1]. Wir legen im folgenden dar, dass diese Viren eine potentielle Gefahr bilden können [2], und zeigen, wozu wir heute eine entsprechende Labordiagnostik für Polio- und/oder andere Enteroviren brauchen und wie eine solche Diagnostik effizient, rasch und kostengünstig durchgeführt wird.

Die Entero-, Parecho-, Hepatitis-A- und Rhinoviren sowie die veterinärmedizinisch wichtigen

Maul- und Klauenseucheviren gehören zu den Picornaviren, einer Familie innerhalb der Plus-Strang-RNA-Viren. Die Gattung Enterovirus umfasst die Arten Polio-, Coxsackie- und Echoviren mit total über 70 Typen. Die Vermehrungsweise der Enteroviren ist sehr ähnlich, benötigt nur wenige Stunden, tötet die infizierte Zelle durch ausgedehnten Membranumbau und führt zur Freisetzung einer grossen Zahl neuer Viren. Weil die Enteroviren eine RNA als Genom besitzen, ist die Replikation ihres Erbmaterials mit häufigen Fehlern behaftet, was eine grosse Mutabilität («Quasispezies») der Viren zur Folge hat [3].

Die Polioimpfung

Diese Mutabilität ist der Grund, weshalb in jüngster Zeit in vielen Ländern vom Lebendimpfstoff (Sabin) zum Totimpfstoff (nach Salk, IPV = inaktivierte Polioimpfstoffe) übergegangen wurde [4]: immer wieder (statistisch in einem Fall pro 400 000–750 000 Erstgeimpfter) treten als Komplikation der Sabin-Impfung paralytische Poliofälle auf (VAPP = vaccine associated paralytic polio), weil das Impfvirus bei der Vermehrung im Darm des Geimpften zur Neurovirulenz zurückmutieren kann. Vor allem bei einem beeinträchtigten Immunsystem, besonders dem humoralen, kann es dadurch zu einer Poliomyelitis kommen.

Die durch die Sabin-Impfung in eine Region eingeführten Impfviren, die sich im Darm jedes Geimpften replizieren und in grosser Menge ausgeschieden werden, zirkulieren über Jahre in der Bevölkerung [1]. Bei Individuen mit ungenügendem Impfschutz besteht die Gefahr, dass die neurovirulenten Revertanten unter diesen zirkulierenden Impfviren, gleich wie Wildtyp-Viren, eine paralytische Polio auslösen. Dies ist 2001 u. a. in der Dominikanischen Republik, in Haiti und den Philippinen geschehen, wo Ausbrüche von «Impfpolio» auftraten [5, 6]. Einzelfälle wurden aber auch an anderen Orten (z. B. in Russland) beobachtet [2]. Die Aufrechterhaltung einer guten (mehr als 95%) Durchimpfung der Bevölkerung gegen Polio ist daher wesentlich; in der Schweiz wird dies durch eine Salk-Impfung im Alter je von 2, 4, 6, 15–24 Monaten und 4–7 Jahren sichergestellt [7].

AFP-Überwachung

Die Poliomyelitis ist noch nicht weltweit ausgerottet, und deswegen wird von der WHO von jedem Land verlangt, Massnahmen zu ergreifen, die erlauben, ein allfälliges Auftreten von Polio sofort zu erfassen und eine Verbreitung, vor allem unter Nicht-Geimpften und Immunkompromittierten, zu unterbinden. Unter den verschiedenen zur Verfügung stehenden Überwachungssystemen hat sich die Schweiz für die sogenannte AFP-Überwachung entschieden, da dieses Vorgehen das beste Kosten-Nutzen-Verhältnis bei hoher Sensitivität bietet. Dabei werden von jedem AFP-Fall bis zum Alter von 15 Jahren innerhalb 48 Stunden zwei Stuhlproben entnommen und auf Polioviren untersucht.

AFP-Fälle treten mit einiger statistischer Regelmässigkeit auf (1 Fall pro $\geq 100\,000$ Personen dieser Altersgruppe pro Jahr), wobei es sich meist um das Guillain-Barré-Syndrom handelt. Die routinemässige virologische Abklärung aller AFP-Fälle (auch der klinisch als Nicht-Polio diagnostizierten) soll sicherstellen, dass das Überwachungssystem funktioniert, dass ein (auch wenig typischer) Poliofall als solcher erkannt würde und dass sich eine Routine für das diagnostische Vorgehen einspielt. Zudem bietet das System den Vorteil, dass statistisch das Funktionieren dieser Routine überprüft werden kann: pro Jahr sollten in der Schweiz total etwa 12 solcher Fälle zur Untersuchung kommen.

Das Vorgehen für diese virologische Untersuchung ist absichtlich einfach gewählt worden. Der behandelnde Arzt sendet die Stuhlproben mit dem Namen des Patienten und dem Absender per Post an das Schweizerische Referenzlabor für Poliomyelitis (Adresse siehe unten). Ein spezielles Begleitformular kann im Referenzlabor per Telefon, Fax oder E-Mail angefordert oder im Internet (siehe unten) als pdf-Dokument bezogen und per Fax oder Post ein- oder nachgereicht werden. Auch alle anderen Arten von schriftlicher oder telefonischer Mitteilung werden akzeptiert. Wichtig ist immer die Polioimpfanamnese und die Information, ob klinisch ein AFP-Fall vorliegt. Die virologische Abklärung der AFP-Fälle ist für den Einsender und Patienten gratis; die Kosten werden vom BAG getragen.

Der Labornachweis von Polioviren

Die Viren werden mit Vorteil aus Stuhl- oder evtl. aus Rachenmaterial durch *Isolierung* in Zellkulturen nachgewiesen. Die Identifizierung und Typisierung (intertypische Differenzierung, Serotyp 1–3) geschieht mit Immunfluoreszenz. Die Unterscheidung nach Wildtyp- oder Sabin-Stämmen (intratypische Differenzierung) erfolgt

durch Sequenzierung einer entsprechenden Genomregion des Virus.

Ein Nachweis von Polioviren durch *PCR* ist zwar möglich, aber zeitlich und punkto Sensitivität der Kultur unterlegen. Dazu kommt, dass eine Isolierung in Zellkulturen in jedem Fall nötig ist, da die inter- und intratypische Differenzierung zurzeit nur mit Isolaten praktikabel ist.

Die *Serologie* spielt eindeutig eine untergeordnete Rolle und wird im Prinzip nicht (mehr) empfohlen. Antikörper gegen Polio sind weit verbreitet (Impfung, subklinische Infektion). Standardisierte, zuverlässige IgM-Nachweise sind nicht erhältlich, so dass für den akuten Fall mit einem Titeranstieg gearbeitet werden müsste. Ein IgG-Nachweis und -Anstieg ist aber nur als Neutralisationstest zuverlässig. Dieses Verfahren ist so aufwendig, dass die Isolierung zeitlich, finanziell und in bezug auf Sensitivität bei weitem vorzuziehen ist.

Der Nachweis von Immunität gegen Polioviren durch Bestimmung des *Antikörpertiters* ist bei korrekter Grundimmunisierung (siehe oben) nicht nötig, da von einer lebenslangen Immunität ausgegangen werden kann. Bei unvollständiger Grundimmunisierung kann im Prinzip ohne Bestimmung des Antikörpertiters nachimmunisiert werden. Der Salk-Impfstoff kann, im Gegensatz zum Sabin-Lebendimpfstoff, auch bei HIV-Positivität verwendet werden.

Der Labornachweis der übrigen sogenannten Nicht-Polio-Enteroviren (NPEV)

Die verbreiteten Enteroviren (Coxsackie A und B, Echoviren) zeigen weitgefächerte klinische Bilder, darunter Meningitiden, Myokarditis, Herpangina und kutane Affektionen (HFMD: hand, foot and mouth disease). Die zumindest in Mitteleuropa meist harmlose Klinik führt dazu, dass bei Einzelfällen eher selten eine Labordiagnostik durchgeführt wird.

Das *diagnostische Vorgehen* ist analog zum oben beschriebenen bei Polioviren. Die *PCR*, am ehesten aus Material betroffener Organe, hat wegen der schlechteren Züchtbarkeit einiger NPEV-Stämme hier eine höhere Bedeutung. Ob allenfalls auch Stuhlproben für PCR vom Untersuchungslabor akzeptiert werden, ist vorgängig abzuklären. Eine Typisierung ist (bei über 70 Serotypen!) ebenfalls mit dem Labor abzusprechen.

Die oben für Polio angebrachten Vorbehalte gegenüber der *Serologie* gelten auch für die NPEV. Dazu kommt, dass für viele NPEV ein Neutralisationstest nicht routinemässig zur Verfügung steht.

Das Referenzlabor für Poliomyelitis hat keine Referenzfunktion für die NPEV.

Adressen

Schweizerisches Referenzlabor für Poliomyelitis, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Petersplatz 10, 4003 Basel, Tel. 061 267 32 79 (Labor), 061 267 32 90 (Prof. K. Bienz), Fax 061 267 32 98, Internet: www.unibas.ch/imm, E-Mail: Vi-Mikrobio@unibas.ch. (Zur Beachtung: der Datenschutz ist bei E-Mail-Übermittlungen nicht unbedingt gewährleistet).