

COXSACKIE B – WIRUSY PANTROPOWE

Beata Gad, Magdalena Wiczorek*

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Wirusologii, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w grudniu 2021 r., zaakceptowano w maju 2022 r.

Streszczenie: Wirusy Cocksackie (CV), podobnie jak inne enterowirusy, to małe, bezosłonkowe wirusy o kształcie ikosaedrycznym kapsydu. Należą do rodziny *Picornaviridae*. Ich nazwa wywodzi się od miasta Cocksackie w stanie Nowy Jork (USA), gdzie w latach 40. XX wieku rozpoznano pierwsze przypadki zachorowań wywołane tymi wirusami. Wirusy Cocksackie B (CVB) wyróżnia od innych enterowirusów zdolność do zakażenia różnego rodzaju tkanek i organów. Tak szeroki tropizm powoduje, że są one czynnikiem etiologicznym wielu różnych jednostek chorobowych. CVB są w stanie zakażać serce, opłucną, trzustkę, płuca i wątrobę powodując zapalenie mięśnia sercowego, pleurodynię, zapalenie trzustki, płuc i wątroby. Przenikają do centralnego układu nerwowego indukując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu lub ostre porażenie wiotkie. Powodują także uogólnione zakażenia noworodków oraz choroby chroniczne takie jak cukrzyca typu 1 czy przewlekłe zapalenie mięśnia sercowego. Pantropowy charakter CVB może wynikać ze swoistej interakcji wirusa z receptorem komórkowym, która warunkuje zakażenie i zajęcie kolejnych komórek. CVB łączy się z przynajmniej dwoma białkami receptorowymi, receptorem dla wirusów Cocksackie i adenowirusów (CAR) oraz czynnikiem przyspieszającym rozkład (DAF), ale również inne determinanty mogą warunkować permissywność tkanek i nasilenie choroby. Celem niniejszego artykułu było podsumowanie najważniejszych aspektów dotyczących zakażenia wirusami Cocksackie B takich jak: replikacja, interakcja z białkami gospodarza, zmienność genetyczna, patogenezą, epidemiologią i diagnostyką.

1. Rys historyczny. 2. Klasyfikacja i budowa. 3. Receptory komórkowe i replikacja. 4. Zmienność genetyczna. 5. Przebieg zakażenia. 6. Patogeneza. 7. Epidemiologia. 8. Diagnostyka i możliwości terapeutyczne. 9. Podsumowanie

COXSACKIE B – PANTROPIC VIRUSES

Abstract: Cocksackieviruses (CV), as all enteroviruses, are small, non-enveloped, icosahedral-shaped capsid viruses. They belong to the family *Picornaviridae*. This group was named after the town of Cocksackie in New York State (USA) where was recognized the first human case of coxsackievirus infection in the 40s of the XX century. Cocksackie B (CVB) are distinguished from other enteroviruses by ability to infect many types of tissues and organs. This wide tropism reason that these viruses are etiologic agents of large number of different diseases. CVB cause infection of the heart, pleura, pancreas, lungs and liver, causing myocarditis, pleurodynia, pericarditis, pneumonia and hepatitis. They can invade the central nervous system and induce meningitis, encephalitis, or acute flaccid paralysis. They also cause systemic neonatal disease and chronic infections such as type 1 diabetes and chronic myocarditis. This pantropic character of CVB can be determinate by specific virus – receptor interaction, which initiate the infection and viral spread. CVB attach at least two receptor proteins: the coxsackievirus – adenovirus receptor (CAR) and the decay – accelerating factor (DAF). Moreover, other anonymous determinant may play a role in tissue permissiveness and disease severity. This article summarizes the main aspects of Cocksackieviruses B infection: replication, virus-receptor interaction, genetic variability, pathogenesis, epidemiology and diagnostics.

1. Introduction. 2. Classification and structure. 3. Cellular receptors and replication. 3. Genetic variability. 4. Course of infection. 5. Pathogenesis. 6. Epidemiology. 7. Diagnosis and therapeutic possibility. 8. Summary

Słowa kluczowe: enterowirusy, pantropizm, wirusy Cocksackie B

Keywords: enteroviruses, pantropism, Cocksackieviruses B

1. Rys historyczny

Historia wirusów Cocksackie (CV) rozpoczyna się w latach 40. XX wieku, w Stanach Zjednoczonych Ameryki objętych epidemią *poliomyelitis*. Latem 1947 roku w stanie Nowy Jork miało miejsce kilka ognisk zachorowań, które badał Gilbert Dalldorf, dyrektor labora-

torium w Albany. Był on zafascynowany ideą zastosowania osesków mysich do izolacji wirusa polio jako alternatywnego modelu zwierzęcego, zamiast małp, które dla każdego laboratorium stanowiły bardzo kosztowny wydatek. Dalldorf i współpracująca z nim Sickles użyli kału od dwójki dzieci podejrzanych o zakażenie wirusem polio. Zawiesinę kałową podali

* Autor korespondencyjny: Magdalena Wiczorek, Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel.: (0-22) 542 12 30; e-mail: mrechnio@pzh.gov.pl

© 2023 Beata Gad & Magdalena Wiczorek

This is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

dorośli i nowonarodzonym myszom, tylko u osesków rozwinął się paraliż związany z rozległymi zmianami w mięśniach szkieletowych. Ich dalsze badania z użyciem surowic wykazały jednak, że przyczyną paraliżu nie były wirusy polio. W 1949 roku Dalldorf zaproponował, aby nowe wirusy nazwać Coxsackie, od małej wioski nad rzeką Hudson, z której pochodziły pierwsze rozpoznane przypadki zachorowań, wywołane przez te nowoodkryte patogeny [21, 22].

Dalsze badania na oseskach mysich skłoniły Dalldofra do podziału wirusów Coxsackie na dwie grupy A i B. Izolaty należące do grupy A (CVA) wywoływały zmiany w mięśniach szkieletowych nowonarodzonych myszy prowadzące do śmiertelnego paraliżu w ciągu 2 dni od zakażenia. Natomiast te należące do grupy B (CVB) powodowały zajęcie wielu organów i tkanek, a ostatecznie powolną śmierć w następstwie porażenia spastycznego (5–7 dni). Dodatkowo badacze obserwowali ogniskowe zapalenie mięśni i zmiany w komórkach trzustki, serca, hepatocytach, w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) oraz w nadnerczach zakażonych myszy. W latach 50. XX wieku zastosowano surowice do identyfikacji serotypów wirusów Coxsackie. Wkrótce rozpoznano, że CVB są czynnikiem etiologicznym np. pleurodynii, zwanej także diabelskim uściskiem lub chorobą bornholmską. Wirusy z grupy A powiązano z herpanginą, ciężkim zapaleniem gardła i chorobą dłoni, stóp i jamy ustnej (HFMD) [21].

Częste zakażenia laboratoryjne, charakteryzujące się ciężkim przebiegiem powodowały, że wielu naukowców rezygnowało z badań nad tą grupą wirusów. Dopiero rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na bardziej dogłębne poznanie natury CV oraz stworzenie nowej klasyfikacji, opartej na pokrewieństwie filogenetycznym [21].

2. Klasyfikacja i budowa

Wirusy Coxsackie B należą do rodziny *Picornaviridae*. To jedna z największych rodzin w systematyce wirusów. W jej skład wchodzi 63 rodzaje, a osiem z nich jest zdolnych do zakażenia człowieka: *Enterovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Kobuvirus*, *Salivirus*, *Cardiovirus*, *Rosavirus* oraz *Cosavirus*. Wirusy Coxsackie B podobnie jak rinowirusy, wirusy polio oraz wirusy ECHO, wchodzi w skład rodzaju *Enterovirus* (EV), który zgodnie z kryteriami Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów (ICTV) został podzielony na poszczególne gatunki i typy. CVB zostały sklasyfikowane jako gatunek B ludzkich enterowirusów (HEV-B). Do tej pory wyodrębnionych zostało sześć typów wirusów Coxsackie B tj. od CVB1 do CVB6 [85].

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inni przedstawiciele rodziny *Picornaviridae*, są to małe (około 30 nm),

bezosłonkowe wirusy o ikosaedralnym kształcie kapsydu. Materiałem genetycznym jest liniowa cząsteczka kwasu rybonukleinowego o dodatniej polarności ((+)ssRNA). Genom CVB zbudowany jest z około 7400 nukleotydów i posiada pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ORF). ORF podzielona jest na trzy regiony P1, P2, P3. Region P1 koduje białka strukturalne kapsydu: VP1, VP2, VP3, VP4, natomiast P2 i P3 białka niestrukturalne: 2A^{pro}, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol} [8, 47, 50]. Na końcach genomowego RNA znajdują się regiony, które nie ulegają translacji (NTR). Do końca 5' jest kowalencyjnie przyłączone białko VPg, natomiast na końcu 3' znajduje się fragment poliadenylowy – poli(A). Ponadto, w regionie 5'NTR zlokalizowane są dwie jednostki funkcjonalne: struktura liścia koni czyny CL oraz wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu typu I (IRES) [26, 47, 50, 82].

Kapsyd CVB tworzy 60 protomerów, zbudowanych z trzech białek powierzchniowych VP1, VP2 i VP3 oraz białka wewnętrznego VP4. W powierzchni każdej trójkątnej ściany utworzonej przez stykające się ze sobą monomery występuje zagłębienie (około 2 nm) nazywane kanionem, które bierze udział w wiązaniu wirusa do receptorów komórkowych gospodarza. Specyficzna budowa kanionu sprawia, że jest on mało dostępny dla przeciwciał, a jednocześnie jego struktura wpływa na stabilność cząsteczki wirusowej. Białka powierzchniowe kapsydu są także antygenami stymulującymi odpowiedź swoistych przeciwciał neutralizujących, jednym z najbardziej immunogennych jest VP1 [9].

Kapsyd wirusów Coxsackie B pozbawiony jest osłonki, co decyduje o jego większej stabilności w organizmie gospodarza oraz w środowisku. W temperaturze otoczenia CVB są niewrażliwe na rozpuszczalniki lipidowe (np. eter, chloroform, aceton) oraz stabilne w niejonowych detergentach. Ponadto wykazują oporność na powszechnie stosowane środki dezynfekujące, w tym 70% etanol i izopropanol. Charakteryzuje je stabilność w szerokim zakresie pH (3–9), po ekspozycji na pH ≤ 3.0 nadal zachowują zakaźność. Dodatkowo są w stanie przetrwać, nawet do kilku tygodni w wodzie i ściekach. Wirion CVB zostaje inaktywowany w temperaturze powyżej 56°C oraz poprzez ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe (UV), podchloryn sodu, formaldehyd, aldehyd glutarowy [72].

3. Receptory komórkowe i replikacja

Cykl replikacyjny CVB można podzielić na kilka etapów: wiązanie wirusa z komórką docelową, wnikanie materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy, translacja i replikacja materiału genetycznego, składanie i uwalnianie potomnych cząsteczek wirusa. Translacja, replikacja oraz składanie zachodzą na terenie cyto-

plazmy komórki gospodarza, a złożone formy wirionu uwalniane są w wyniku lizy komórki. Proces namnażania wirusów Cocksackie B nie został jeszcze w pełni poznany, większość dostępnych informacji dotyczy ogólnego modelu replikacji enterowirusów, głównie opartego na badaniach nad wirusem polio [8, 26, 30, 48].

Pierwszym etapem procesu namnażania jest połączenie się wirusa z powierzchnią wrażliwej komórki, a następnie wnikięcie do jej wnętrza. Wiązanie cząsteczki wirusowej do komórki następuje w wyniku oddziaływania pomiędzy białkami powierzchniowymi wirionu, a receptorami na komórce docelowej. Możliwość wiązania ze specyficznymi receptorami wyznacza zakres gospodarza i tropizm tkankowy danego wirusa [3, 47].

Wszystkie typy CVB wiążą się ze specyficznym receptorem dla wirusów Cocksackie i adenowirusów (CAR). CAR to transbłonowa glikoproteina o masie 46 kDa, która należy do nadrodziny immunoglobulin [62] i rodziny łącznikowych cząsteczek adhezyjnych (JAM) [46]. Zbudowana jest z dwóch zewnątrzkomórkowych domen immunoglobulinowych D1 i D2, regionu transbłonowego TMD i wewnętrznego fragmentu cytoplazmatycznego ICD [62, 81]. W procesie wiązania i wnikania materiału genetycznego wirusa bierze udział koniec aminowy domeny D1 [47, 62]. CAR ekspresowany jest głównie na komórkach epitelialnych, w kluczowych organach: mózgu, sercu, płucach, wątrobie, jądrach, trzustce oraz nerkach [81]. Szczególnie silnej ekspresji ulega w rozwijającym się centralnym układzie nerwowym [14, 53]. Jako molekula adhezyjna odgrywa istotną rolę w regulacji takich procesów jak wzrost, różnicowanie się i migracja komórek, należy zaznaczyć jej szczególną rolę w rozwoju mózgu i serca [67].

CVB1, CVB3 i CVB5 dodatkowo wiążą się z czynnikiem przyspieszającym rozkład (DAF, CD55) białkiem o masie 70 kDa, które występuje na powierzchni większości komórek. DAF jest jednym z ważniejszych czynników regulujących aktywność dopełniacza [58]. Jego zewnątrzkomórkowy region zbudowanym jest z czterech 60 aminokwasowych fragmentów SCR, również nazywanych domenami kontrolującymi dopełniacz (CCP) [58]. Nie wszystkie szczepy w ramach serotypu oddziałują z DAF, kolejne pasażę wirusa w hodowlach komórkowych mogą pomóc wyselekcjonować warianty, które posiadają taką zdolność [11]. Jednak uważa się, że samo wiązanie się wirusa do DAF nie jest wystarczające do wnikięcia i litycznego zakażenia komórki [19, 62]. Dodatkowo wymagana jest interakcja z CAR lub innym receptorem, dlatego DAF uznawany jest za koreceptor jedynie ułatwiający proces zakażenia komórek [62].

Opisywane są także alternatywne receptory komórkowe wykorzystywane przez niektóre warianty CVB. Mutant szczepu referencyjnego Nancy CVB3, charakteryzujący się zwiększoną wirulencją, jako recep-

tor wykorzystuje glikozaminoglikan na powierzchni komórki, a dokładniej powtarzające się jednostki siarczanu heparyny [84].

Receptorem specyficznym dla wielu różnych wirusów są integryny, białka transbłonowe biorące udział w regulacji funkcji komórki związanych z adhezją, agregacją i migracją. CVB1 łączy się z integryną $\alpha v\beta 6$. Zaobserwowano, że ekspresja tej integryny wpływa na bardziej wydajną replikację wirusa w linii ludzkich komórek epitelialnych wyprowadzonych z nowotworu jelita grubego [3].

Kolejnym białkiem, które może pełnić rolę receptora dla CVB jest nukleolina, wielofunkcyjna fosfoproteina głównie zlokalizowana w jąderku, ale także występująca na powierzchni komórki. Wszystkie typy CVB są zdolne do wiązania nukleoliny w przeciwieństwie do wirusa polio, który takiej właściwości nie posiada.

Miejsmem wiązania się receptora komórkowego z wirusem są reszty aminokwasowe umieszczone na dnie kanionu [47, 64]. W wyniku oddziaływania receptora z głębszymi warstwami kanionu, dochodzi do usunięcia reszty lipidowej z kieszonki białka VP1. Powoduje to destabilizację i rozluźnienie struktury cząsteczki wirusa, otwarcie kanału, przemieszczenie się na zewnątrz części aminowej VP1 i uwolnienie VP4. W błonie komórkowej zostają utworzone pory, przez które (+)ssRNA transportowany jest do cytoplazmy [69]. Mechanizm wprowadzenia genomu CVB do wnętrza komórki nie jest do końca poznany. Jedną z teorii zakłada, iż proces zachodzi na drodze endocytozy zależnej od kaweolin [32], a druga, że przez makropinocytozę [20, 52]. Endocytoza zależna od kaweolin polega na utworzeniu wpuklenia, które od strony cytoplazmy stabilizuje niskocząsteczkowe białko – kaweolina, a następnie tworzy się pęcherzyk, który jest transportowany w okolicy siateczki śródplazmatycznej (ER) lub aparatu Golgiego [32]. Na drodze makropinocytozy, wiązanie CVB z receptorem prowadzi do polimeryzacji aktyny oraz silnego sfałdowania błony komórkowej i utworzenia dużych pęcherzyków – makropinosomów [52]. Istnieją także doniesienia o internalizacji CVB3 na drodze endocytozy zależnej od klatryn [19]. W tym typie endocytozy w powstawaniu pęcherzyków bierze udział białko klatryna, która ulega nagromadzeniu w cytoplazmie w odpowiedzi na połączenie receptor-ligand [19]. Następnie utworzony endosom jest transportowany wzdłuż mikrotubul do aparatu Golgiego [32]. Ostatecznie kwas nukleinowy wirusa zostaje uwolniony do cytoplazmy komórki gospodarza [8, 69].

Kolejnym etapem cyklu replikacyjnego jest synteza białek wirusowych. Genom CVB, ze względu na taką samą polarność jak informacyjny RNA (mRNA) stanowi bezpośrednią matrycę w procesie translacji [82]. Podobnie jak komórkowy mRNA zakończony jest ogonkiem poli(A), natomiast nie posiada czapeczki kap,

która poza zabezpieczaniem transkryptu przed degradacją pełni kluczową rolę w inicjacji translacji [47]. Materiał genetyczny wirusa wiąże się z rybosomem za pośrednictwem IRES, który imitując kap rekrutuje czynniki inicjujące, ulegając kap-niezależnej translacji [26, 47, 50, 82]. Produktem jest poliproteina o autokatalitycznych właściwościach, która podlega obróbce proteolitycznej przez wirusowe proteazy: 2A i 3C/3CD (2A^{pro} i 3C^{pro}/3CD^{pro}) [30, 50, 82]. Na początkowym etapie 2A^{pro} dokonuje cięcia w układzie *in cis* wiązania Tyr-Gly na swoim własnym końcu aminowym, w wyniku którego od poliproteiny zostaje oddzielony prekursor P1, kodujący wszystkie białka kapsydowe. Dalsze etapy obróbki potranslacyjnej obejmują cięcia w układzie *in cis* i *in trans* z udziałem 3C^{pro}/3CD^{pro} [50], co prowadzi do utworzenia białek strukturalnych VP0, VP1, VP3 oraz niestrukturnych: 2A^{pro}, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C^{pro}, 3D^{pol} [47, 69, 82].

Proteazy wirusowe działają także na transkrypcję i translację zachodzące w komórce, hamując w ten sposób syntezę białek gospodarza. Proteaza 2A tnie czynniki inicjujące translację eIF4G, DAP5 oraz białko wiążące poli(A) (PABP). 3C^{pro} unieczynnia czynnik transkrypcyjny TFIIC [10, 47, 59].

W procesie obróbki poliproteiny, obok ostatecznych produktów proteolizy powstają formy pośrednie (2BC, 3AB, 3CD), które odgrywają znaczącą rolę w replikacji CVB [82]. Białko 2BC (prekursor białek 2B i 2C) łączy się z błonami, wpływając na ich przepuszczalność, a tym samym na homeostazę w komórce oraz bierze udział w tworzeniu struktur replikacyjnych RO [8, 67]. 3AB kotwiczony kompleks replikacyjny, jednocześnie podnosi aktywność RNA-zależnej polimerazy RNA (RdRp), ponadto stymuluje proteazę 3CD [30, 47]. 3CD łącząc się jednocześnie z końcem 5' i 3' powoduje cyrkulizację genomu, wraz z innymi białkami tworzy kompleks replikacyjny [47]. W cyklu replikacyjnym wirusa dojrzałe białka niestrukturne pełnią wiele różnych funkcji, najważniejsze z nich przedstawia Tabela I.

Na terenie cytoplazmy komórki gospodarza, równolegle z syntezą białek, zachodzi proces powielania materiału genetycznego CVB [47]. Synteza RNA zachodzi

w kompleksach replikacyjnych utworzonych z białek niestrukturnych wirusa oraz przegrupowanych błon ER i/lub błon aparatu Golgiego [8, 47]. W tworzenie kompleksów replikacyjnych zaangażowane są także czynniki gospodarza, do których należą kinaza fosfotydyloinozytolu typu III (PI4KIIIβ) [77] oraz białko wiążące oksysterol (OSBP) [4]. Udział organelli komórkowych w tworzeniu kompleksów replikacyjnych wynika z aktywności białka 2B i wiąże się z zaburzeniem homeostazy jonowej (uwalnianie jonów Ca²⁺ z ER i aparatu Golgiego). W replikację zaangażowane są wszystkie białka niestrukturne wirusa, a najważniejszą funkcję pełni RdRp [10]. Polimeraza wirusowa posiada dwa typy aktywności katalitycznej, katalizuje syntezę komplementarnej nici na matrycy RNA oraz dokonuje addycji reszt urydyny do białka VPg [10]. Proces urydylacji zachodzi na matrycy poli(A), a czynnikiem stymulującym jest struktura spinki do włosów (*cre*), zlokalizowana w sekwencji kodującej białko 2C [26]. Urydylowane VPg (VPg-pU(pU)) jest dla RdRp specyficznym białkowym starterem syntezy nici zarówno o dodatniej jak i ujemnej polarności [26, 82]. W pierwszej kolejności następuje synteza ujemnej nici RNA, komplementarnej do RNA genomowego [10, 26, 30]. Proces ten wymaga nieuszkodzonej struktury CL na końcu 5'NTR [26] i prowadzi do utworzenia dwuniciowych, pośrednich form replikacyjnych RF (dsRNA) [10, 82]. Nici ujemna RNA staje się nicią matrycową, na której powstają liczne kopie genomowego RNA [10, 30]. Nowosyntetyzowane cząsteczki RNA mogą ulegać translacji, stanowić matrycę do syntezy nici ujemnej RNA, a część z nich staje się genomami potomnych wirionów [26]. Wirus kontroluje syntezę RNA w taki sposób, aby zostało utworzonych około 50 razy więcej nici dodatnich RNA niż ujemnych [26]. RNA wirusowe o ujemnej polarności występuje wyłącznie w postaci dwuniciowej RF, lub jako produkty pośrednie replikacji (RI) [10, 26, 82]. Sekwencja poli (A) na końcu 3' nici dodatniej jest syntezowana przez transkrypcję sekwencji poli (U) na końcu 5' nici ujemnej [51].

Kompletny wirion powstaje poprzez połączenie materiału genetycznego i białek strukturalnych wirusa [8]. Proces składania rozpoczyna się, gdy białko prekursorowe P1 ulega cięciu przez 3CD^{pro}, następnie tworzy się protomer złożony z białek VP0, VP1 i VP3 [50]. W kolejnym kroku pięć takich protomerów łączy się razem i formuje pentamer [9]. W ostatnim etapie składania połączone 12 pentamerów buduje prokapsyd. Nowo zsintetyzowana nici (+)ssRNA ulega enkapsydacji w obrębie prokapsydu, tworząc prowirion [9]. Proces ten jest na tyle wyspecjalizowany, że do kapsydu następuje pakowanie tylko nici RNA o dodatniej polarności [30]. Na wydajność procesu składania prawdopodobnie wpływa glutation lub proces od niego zależny [27, 73]. W trakcie enkapsydacji VP0 ulega cięciu do

Tabela I
Funkcje białek niestrukturnych wirusów Coxsackie B

Białko	Funkcja
2A	proteaza cysteinowa
2B	wiroporyna
2C	NTPaza
3A	białko wiążące błonę
3B	białko VPg
3C	proteaza cysteinowa
3D	RNA-zależna polimeraza RNA (RdRp)

VP2 i VP4 [9]. Proces ten nosi nazwę cięcia dojrzewającego i zamyka genom wirusa w stabilnym i dojrzłym wirionie [9]. Tworzy się uporządkowana sieć końców aminowych białek kapsydu, która stabilizuje cząsteczki wirusowe oraz daje im zdolność do zakażenia [9]. Wiriony uwalniane są przez lisę komórki [30], aczkolwiek istnieją badania *in vitro* wskazujące także na przetrwanie i niecytotolityczne zakażenia wywołane przez niektóre z CVB3 [64], CVB4 [29] i CVB5 [6].

4. Zmienność genetyczna

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inne RNA wirusy, charakteryzują się bardzo dużą zmiennością genetyczną, a co za tym idzie wysokim tempem ewolucji. Niestabilność genetyczna enterowirusów, w trakcie krótkiego cyklu replikacyjnego, daje możliwość tworzenia mutantów o nowych cechach i właściwościach. W zakażonym organizmie występują one jako heterogenna populacja, złożona z różnych wariantów molekularnych (tzw. pseudotypów) określanых jako *quasi-species*. Zmieniające się warunki środowiska faworyzują najlepiej dostosowane mutanty, przez co populacja ta wykazuje dużą dynamikę. Presja selekcyjna na różnych etapach zakażenia cały czas sprzyja powstawaniu nowych wariantów genetycznych wirusa, o zmienionym tropizmie komórkowym czy zwiększonej wirulencji. Głównym źródłem zmienności CVB są mutacje oraz rekombinacje [30, 54, 60, 67].

Mutacje, czyli błędy powstające na skutek nieprecyzyjnej replikacji RNA, można podzielić na: mutacje punktowe (zmiana pojedynczej zasady), insercje (wstawienie przynajmniej jednego dodatkowego nukleotydu) i delecje (utrata od jednego do kilku nukleotydów). Wynikają one z właściwości wirusowej RdRp, która nie posiada zdolności naprawy błędów powstałych podczas syntezy potomnych nici RNA. Związane jest to z brakiem domeny 3'-5' egz nukleazy o właściwościach korektorskich [30]. U wirusów Coxsackie B częstość powstawania mutacji szacuje się na 10^{-4} do 10^{-5} substytucji na nukleotyd [30, 66]. Mutacje zachodzą w każdym miejscu genomu, ale najbardziej zmienne są obszary kodujące białka strukturalne kapsydu. Liczne błędy polimerazy mogą prowadzić do eliminacji wariantów wirusów o niskiej zdolności adaptacyjnej (selekcja negatywna) [30]. Przeciwnie, w populacji wirusów utrwalane są takie zmiany, które prowadzą do zwiększenia wirulencji oraz dostosowania się do zmieniającego środowiska (selekcja pozytywna) [45]. Przykładowo pojedyncze mutacje w genie kodującym białko VP1 mogą spowodować atenuację szczepów CVB3 kardiowirulentnych dla myszy [23]. Błędy powstałe w czasie syntezy nici potomnych wpływają również na cykl replikacyjny wirusa. Insercje i delecje nukleotydów w regionie 5'NTR zabu-

rzają proces translacji [67]. Na wydajność syntezy RNA mają wpływ zmiany utrwalone w 3'NTR [51], natomiast na częstość tworzenia rekombinantów mutacje w regionie kodującym RdRp [54].

Obok mutacji, drugim szeroko rozpowszechnionym mechanizmem determinującym zmienność CVB jest rekombinacja (rearanżacja) [18, 60]. Proces ten, w obrębie enterowirusów, szczegółowo został opisany dla wirusa polio i w podobny sposób zachodzi u CVB [54]. Warunkiem rekombinacji jest występowanie w zakażonej komórce dwóch typów wirusa, a jej wynikiem jest powstanie genomów o innej konformacji niż w wirusach rodzicielskich [45, 60]. Ze względu na homologię nici rekombinujących można ją podzielić na: homologiczną (ogólną) oraz niehomologiczną (umiejscowioną) [24, 54, 60]. Możliwe są dwa typy mechanizmów rekombinacji CVB: replikacyjny „zmiany matrycy” oraz niereplikacyjny „pęknięcia nici i ponownego przyłączenia” [24, 45]. Ponadto, rekombinacja w zależności od pochodzenia nici rodzicielskich może być: intratypowa (zachodzi w obrębie jednego typu) [45, 49, 60, 66] oraz intertypowa (zachodzi pomiędzy różnymi typami tego samego gatunku) [44, 45, 66]. Jak dotąd, na podstawie analiz filogenetycznych, nie identyfikowano zdarzeń rekombinacyjnych w regionie kodującym genomu CVB poza gatunkiem HEV-B [45]. Nie obserwowano także rekombinacji pomiędzy typami zakażającymi człowieka i zakażającymi zwierzęta. Wyjątek stanowi wirus choroby pęcherzykowej świń (SVDV), który wykazuje 80% homologii z CVB5.

Dane literaturowe wskazują, iż reanżacja materiału genetycznego u wirusów Coxsackie B najczęściej: jest typu homologicznego, przebiega według mechanizmu replikacyjnego „zmiany matrycy”, jest intertypowa, występuje w regionach kodujących białka niestrukturalne, powstaje w miejscach genomu wirusa o stabilnej strukturze drugorzędowej (m.in. po zreplikowaniu dwóch nukleotydów UU) [54].

5. Przebieg zakażenia

Wirusy Coxsackie B dostają się do organizmu człowieka drogą pokarmową (fekalno-oralną) i kropelkową [34, 53, 67]. Pierwotnym miejscem replikacji są błony śluzowe jamy nosowo-gardłowej i jelita cienkiego [21]. Wirus przedostając się do jelita narażony jest na niskie pH w żołądku, działanie proteaz, żółci oraz innych enzymów wydzielanych do światła układu pokarmowego [21]. Kolejną barierę stanowi nabłonek błony śluzowej jelit, a dokładniej śluz pokrywający powierzchnię kosmków oraz połączenia zamykające (TJ) w części szczytowej komórek nabłonka jelit [46]. Połączenia zamykające tworzą wodoodporne uszczelnienia między komórkami, w tych miejscach

komórki są ściśle do siebie przyłączone głównie przez białka zwane kładynami [20, 46], ale w procesie tym biorą udział także molekuly adhezyjne typu JAM [46] np. CAR, będący receptorem dla CVB [20, 67]. Poza TJ, CAR nie jest ekspresowany na szczytowych częściach komórek nabłonka jelit, w przeciwieństwie do DAF, którego ekspresja jest obficie wyrażona. Jednak związanie z DAF nie jest warunkiem wystarczającym do zakażenia komórki, dlatego uważa się, że proces przekraczania bariery śluzówkowej następuje w TJ [20]. Na modelu wirusa polio wykazano, że enterowirusy mogą wykorzystywać komórki M, jako wrota zakażenia. Miejscem replikacji są kępkę Peyera oraz migdałki, w przypadku zakażeń górnych dróg oddechowych [63]. Następnie dochodzi do zasiedlenia okolicznych węzłów chłonnych, zależnie od miejsca replikacji szczytnych lub kreskowych [54]. Wirus przedostaje się do krwioobiegu wywołując pierwotną wiremę, ta faza zakażenia jest najczęściej bezobjawowa i zwykle zostaje zahamowana pod wpływem wrodzonej, a następnie nabytej odpowiedzi immunologicznej [15, 54]. Jednak w niewielkim odsetku przypadków wirus rozprzestrzenia się po organizmie, przedostając się do centralnego układu nerwowego, wątroby, płuc czy serca [15, 41, 54]. Temu etapowi zakażenia towarzyszy wtórna wiremę, charakteryzująca się wysokim mianem wirusa. CVB wykazują powinowactwo do wielu tkanek i narządów takich jak mózg, rdzeń kręgowy, serce, trzustka, skóra, płuca, wątroba [59, 81]. Do często zakażanych komórek należą: neurony [28], kardiomiocyty [43] oraz komórki β wysp trzustkowych [37, 55]. Jednak pierwotnym miejscem replikacji CVB są błony śluzowe jelit i jamy nosowo-gardłowej [15, 21, 53]. To skonkretyzowane umiejscowienie zakażenia w organizmie człowieka wiąże się ze sposobem rozprzestrzeniania się wirusa w populacji [7]. Niezależnie od przebiegu zakażenia (bezobjawowe, skąpo-objawowe, pełnoobjawowe) wirus intensywnie namnaża się w śluzówkach osiągając wysokie miano w wydzielinach [21, 34]. Liczbę cząstek zakaźnych enterowirusów szacuje się na 10^6 – 10^7 w 1 gramie kału osoby zakażonej. Długi czas wydalania wirusa sprzyja powszechnemu rozprzestrzenieniu. Wynosi on przeciętnie 2–4 tygodnie [15], ale może być dłuższy niż 11 tygodni, a u osób z niedoborami immunologicznymi może trwać latami. Wśród osób zakażonych wirusem polio znane są przypadki wydalania wirusa po zakażeniu od 10 miesięcy do 28 lat [53].

6. Patogeneza

Zakażenia CVB, nawet w 90% przypadków, mają charakter bezobjawowy lub skąpo-objawowy [15]. Od 2 do 10 dni po przedostaniu się wirusa do organizmu dochodzi do rozwoju choroby gorączkowej o charak-

terze samoograniczającym się, która trwa 3–4 dni [15, 41, 57]. Do najczęstszych objawów należą: gorączka, bóle głowy, brzucha, gardła, mięśni, złe samopoczucie, niekiedy nudności i wymioty [21, 35, 59]. W rzadkich przypadkach dochodzi do zajęcia jednego lub kilku organów poza miejscem pierwotnej replikacji [35]. Przebieg zakażenia może zależeć od wieku, płci i statusu immunologicznego. Szczególnie narażone na wystąpienie ciężkich postaci klinicznych oraz długotrwałych powikłań są osoby z obniżoną odpornością [15] oraz noworodki [2, 41] i niemowlęta [41].

Wirusy Coxsackie B charakteryzują się pantropizmem, czyli powinowactwem do wielu narządów i tkanek [41, 52]. Ta właściwość powoduje, że są czynnikiem etiologicznym szerokiego wachlarza chorób [2]. Poszczególne typy CVB mogą wywoływać różne choroby, a te same choroby mogą być wywoływane przez różne typy [41]. CVB zakaża większość układów narządowych w organizmie człowieka:

- centralny układ nerwowy: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (zomr), zapalenie mózgu, ostre porażenie wiotkie (AFP);
- układ pokarmowy: zapalenie trzustki, zapalenie wątroby, nieżyt żołądkowo-jelitowy, herpangina;
- układ oddechowy: zapalenie górnych i dolnych dróg oddechowych, w tym zapalenie płuc;
- układ sercowo-naczyniowy: zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie osierdzia;
- skóra: choroba dłoni, stóp i jamy ustnej (HFMD), choroby wysypkowe;
- mięśnie: pleurodynia (nagminne zapalenie mięśni, choroba bornholmska).

Do najcięższych w przebiegu zalicza się zachorowania u noworodków w pierwszym tygodniu życia, związane z transmisją wirusa przez łożysko. Choroba przypomina posocznicę bakteryjną i może być powikłana zapaleniem mięśnia sercowego, piorunującym zapaleniem wątroby, rozsianym wykrzepianiem wewnątrznaczyniowym, zomr, zapaleniem opon i mózgu oraz zapaleniem płuc [2, 12, 41, 49, 57].

CVB uważa się za czynnik etiologiczny chorób przewlekłych, niekiedy o podłożu autoimmunologicznym m.in. kardiomiopatii, przewlekłego zaciskającego zapalenia osierdzia, cukrzycy typu 1, miastonii, pierwotnego zespołu Sjögrena, zespołu chronicznego zmęczenia, przewlekłego kłębuszkowego zapalenia i niewydolności nerek, choroby Stilla czy reumatoidalnego zapalenia stawów [7, 16, 35, 37, 43, 56, 65, 67, 70, 71, 74].

Wirusy Coxsackie B, podobnie jak inne enterowirusy, wywołują aseptyczne zapalenie opon-mózgowo-rdzeniowych, które należy do częstych zakażeń OUN [25, 63]. Diagnozowane jest ono w każdej grupie wiekowej (u noworodków, niemowląt, dzieci i dorosłych) [2, 41, 53, 63], przy czym najczęściej chorują noworodki [28]. Zakażenie manifestuje się typowymi obja-

wami klinicznymi dla zapalenia opon (sztywność karku) oraz bólem głowy, gorączką, wymiotami [63, 75]. Symptomy te zwykle ustępują bez następstw neurologicznych [41, 75]. Inaczej jest w przypadku zapalenia mózgu, które występuje znacznie rzadziej, ale związane jest z ciężkim przebiegiem (zajęcie mięszu mózgu i rdzenia kręgowego) [53, 63] oraz powikłaniami m.in. miastenią, która manifestuje się zaburzeniami nerwowo-mięśniowymi [71].

CVB wykazują także szczególne powinowactwo do ludzkich kardiomiocytów, przez co stanowią główną przyczynę wirusowego zapalenia mięśnia sercowego (MC) [7, 23, 30, 65]. MC dotyczy przeważnie noworodków, niemowląt oraz osób w wieku 20–40 lat [44, 53]. W kardiologii schorzenie to jest jednym z najtrudniejszych do zdiagnozowania [59]. Na początkowym etapie może przebiegać zupełnie bezobjawowo [67], następnie pojawia się gorączka, duszność, skrócenie oddechu, ostry ból w klatce piersiowej, a nawet zaburzenie rytmu serca [7, 44, 65]. Zakażenie prowadzi do reakcji zapalnej, w wyniku której mogą zostać bezpośrednio uszkodzone tkanki i komórki mięśnia sercowego [30, 65]. Wykazano, że patologiczne zmiany zachodzące w mięśniu sercowym związane są z działaniem wirusowej proteazy 2A, która tnie dystrofinę, białko łączące szkielet aktynowy z kompleksem białek błonowych (DAP) [43, 47]. Dystrofina stabilizuje błonę komórkową oraz wpływa na jej przepuszczalność, potwierdzono, że rozwój zakażenia CVB jest skorelowany z obniżeniem poziomu tego właśnie białka w komórkach serca [43]. Zwiększenie przepuszczalności błony, związane z cięciem dystrofiny przez 2A^{pro}, może odgrywać rolę w uwalnianiu wirusa z kardiomiocytu [43]. W wyniku namnażania się wirusa w komórkach mięśnia sercowego uruchomiona zostaje nieswoista odpowiedź immunologiczna [43]. Wydzielane zostają cytokiny prozapalne, w tym interferon typu gamma (IFN- γ) [65], który z kolei warunkuje wytwarzanie tlenku azotu (NO) [83]. Na modelach zwierzęcych wykazano, że ciągła ekspozycja komórek na wysokie stężenie NO ma działanie cytotoksyczne prowadzące do uszkodzeń [83]. Komórki prezentujące antygen fagocytyują uwolnione cząsteczki wirusa i białka serca, co prowadzi do rozwoju odpowiedzi swoistej skierowanej przeciwko własnym białkom, tworzą się autoprzeciwciała sercowe mogące prowadzić do znacznych uszkodzeń serca [65]. Zapalenie mięśnia sercowego u dorosłych osób może przebiegać bez komplikacji, a gdy wirus zostanie wyeliminowany pacjenci samoistnie zdrowieją [53]. Niemniej zdarzają się przypadki zachorowań, w których konieczne jest wykonanie przeszczepu serca [21, 35]. Do możliwych powikłań zakażeń serca o etiologii CVB należy kardiomiopatia rozstrzeniowa, która rozwija się w trakcie procesu naprawczego po eliminacji wirusa z mięśnia sercowego [7, 59, 65, 67].

Już w latach 50. XX wieku Dalldorf opisywał tropizm CVB do trzustki w eksperymencie na ośeskach mysich. U ludzi, zapalenie trzustki o podłożu CVB, po raz pierwszy zostało opisane w 1958 roku u noworodka z posocznicą. Liczne badania wykazały, że wirusy te stanowią czynnik etiologiczny ostrego, nawracającego lub przewlekłego zapalenia trzustki oraz cukrzycy typu 1 [17, 56]. Choroby trzustki są szczególnie niebezpieczne u dzieci, ponieważ wiążą się ciężkim przebiegiem, a nawet śmiercią [37]. Do symptomów schorzenia należą m.in. silny ból brzucha promieniujący do pleców, nudności, wymioty oraz podwyższony poziom enzymów trzustkowych w surowicy (lipazy i amylazy) [17]. Zapalenie trzustki prowadzi do uszkodzenia komórek zewnątrzwydzielniczych i wynika z błędnej aktywacji enzymów trawiennych narządu [80]. Zakażenie trzustki przeważnie ulega samoograniczeniu, lecz w 10–15% przypadków prowadzi do niewydolności wielonarządowej [17, 80]. CVB mogą przetrwale zakażać komórki β trzustki, czyli komórki, które wytwarzają insulinę [56]. Wykazują one silną ekspresję CAR, który w przypadku tych komórek, jest głównie zlokalizowany w błonach pęcherzyków wydzielniczych [38, 55]. W następstwie zakażenia zostaje zakłócone prawidłowe funkcjonowanie komórek β lub ich trwałe uszkodzenie, co może prowadzić do rozwoju cukrzycy typu 1 [37, 70]. Dodatkowym czynnikiem rozwoju choroby jest aktywacja, pod wpływem zakażenia, produkcji autoprzeciwciał skierowanych przeciwko insulinie (IAA) lub dekarboksylazie kwasu glutaminowego [55, 56]. Dokładny mechanizm rozwoju cukrzycy pod wpływem zakażenia nie został jeszcze w pełni poznany [37, 70].

Po przeniknięciu przez łożysko CVB mogą uszkadzać zarówno zarodek jak i płód, powodując poronienia albo prowadzić do wystąpienia poważnych wad rozwojowych, najczęściej są to wady serca [28, 57, 67]. Zaobserwowano także dużą korelację między serokonwersją matki w czasie ciąży, a rozwojem cukrzycy u dziecka [57]. Szczególnie narażone na ciężkie choroby oraz długotrwałe powikłania są noworodki i niemowlęta, u których doszło do transmisji CVB przez łożysko pod koniec trwania ciąży lub w trakcie porodu [12, 25, 57]. Dlatego też kobiety ciężarne powinny unikać kontaktu z osobami chorymi, a w momencie podejrzenia zakażenia korzystne jest przedłużanie ciąży, dające szansę płodowi na nabycie przeciwciał neutralizujących od matki [2, 53]. U dzieci poniżej pierwszego roku życia antygeny CVB identyfikowane są w różnych typach komórek: neuronach, kardiomiocytach, hepatocytach, komórkach kanalików nerkowych, komórkach β wysp trzustkowych, komórkach nadnerczy, komórkach nabłonka pęcherzyków płuc, pęcherzykowych komórkach dendrytycznych śledziony [12, 14, 53]. Zakażenie wrodzone często przyjmuje postać ogólną (posocznica noworodkowa) i przebiega z zajęciem kilku narządów

[2, 53]. Objawy chorobowe rozwijają się w dwóch pierwszych tygodniach życia dziecka [2, 12, 14] i są to najczęściej: zapalenie mięśnia sercowego, ciężkie zaburzenia w funkcjonowaniu wątroby, niewydolność oddechowa, niewydolność nerek, zaburzenia neurorozwojowe, arytmia, ciężkie stany zapalne i uszkodzenia trzustki [2, 12, 28, 41, 67]. Uogólnione zakażenie noworodków może także być powikłane aseptycznym zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i zapaleniem mózgu, prowadzącym do trwałego upośledzenia umysłowego [2, 67, 28]. Śródmiażdżowe zapalenia płuc u noworodków, o etiologii CVB, jest związane z rozwojem nadciśnienia płucnego i wysoką śmiertelnością pacjentów [2, 28].

7. Epidemiologia

Wirusy Coxsackie B mają charakter kosmopolityczny, są jednymi z najczęściej wykrywanych enterowirusów na całym świecie [5], przy czym typy CVB2, CVB3, CVB4 i CVB5 oznaczane są znacznie częściej niż CVB1 i CVB6 [41, 42, 56, 63]. W klimacie tropikalnym i subtropikalnym zachorowania wywołane CVB występują przez cały rok, natomiast w klimacie umiarkowanym obserwuje się wzrost zapadalności w okresie letnio-jesiennym [21, 41, 53]. Krążenie wirusa w populacji może przyjąć charakter endemiczny, wtedy zachorowania występują sporadycznie, na podobnym poziomie przez wiele lat lub charakter epidemiczny związany z ogniskami zachorowań na danym obszarze pojawiającymi się cyklicznie co kilka lat [25, 42].

Częstość występowania przeciwciał przeciwko CVB jest wysoka w populacji ludzkiej, zależy od typu wirusa Coxsackie oraz od przedziału wiekowego grupy badanej i wynosi od 30 do 80% [67]. Zakażeniu może ulec każda osoba wrażliwa niezależnie od wieku, lecz najbardziej narażone są dzieci poniżej 10 roku życia [5, 53]. Typ objawów klinicznych występuje z inną częstością w różnych grupach wiekowych np.: zakażenia centralnego układu nerwowego dotyczą głównie dzieci w wieku 5–15 lat, zapalenia mięśnia sercowego z największą częstością występują w grupie 20–40 latków, natomiast zakażenia ciężkie oraz uogólnione u noworodków i niemowląt [12, 44, 53]. Zwiększona podatność na ciężkie zachorowania u dzieci poniżej pierwszego roku życia wynika z ich niedostatecznie dojrzałego układu odpornościowego. Ma to szczególne znaczenie w przypadku noworodków, które nie otrzymały matczynych przeciwciał neutralizujących wirusa [14, 53]. Objawy kliniczne oraz nasilenie choroby uwarunkowane są także wrodzonymi lub nabytymi niedoborami odporności. Ponadto, cechami predysponującymi do zachorowania jest płeć męska i wcześniactwo [2].

Zachorowania o etiologii CVB1 występują rzadko i najczęściej przyjmują epidemiczny wzór krążenia ze

wzrostami aktywności co kilka lat, w nieregularnych odstępach czasowych [18, 42]. Większość z zakażeń o etiologii CVB1 ma charakter skąpo-objawowy [18]. Ten typ wirusa Coxsackie jest najczęściej wiązany z ogniskami zachorowań na zomr [25] oraz pleurodynię [42]. Przeważnie jest wykrywany u dzieci poniżej pierwszego roku życia, najczęściej w materiale pobranym z dróg oddechowych [42]. Wiązany jest także z typem posocznicy noworodkowej, z piorunującym zapaleniem wątroby z koagulopatią, która przebiega podobnie jak przy zakażeniu wirusem ECHO11, w przeciwieństwie do posocznicy powikłanej zapaleniem mózgu i mięśnia sercowego charakterystycznej dla CVB2, CVB3 i CVB5 [18, 42, 49]. Zakażenie CVB1 jest jednym z głównych czynników ryzyka rozwoju cukrzycy typu 1 [18, 56].

CVB2 charakteryzuje endemiczny typ krążenia w populacji ze zmienną skalą zachorowań z roku na rok [42]. Istnieją także doniesienia o ogniskach zachorowań wywołanych tym typem, ale są one rzadko odnotowywane. Najczęściej jest przyczyną zomr, zapalenia mięśnia sercowego i posocznicy u noworodków i niemowląt [25, 35, 41, 42]. Grupa najmłodszych pacjentów poniżej pierwszego roku życia stanowi aż 60% wśród osób z potwierdzoną etiologią CVB2. Wirus najczęściej jest wykrywany w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr) [25, 42].

CVB3 cechuje epidemiczny typ krążenia w populacji w zróżnicowanych interwałach czasowych [42]. Jest on najczęściej przyczyną zapalenia mięśnia sercowego, zomr, posocznicy, zapalenia opon mózgowych i mózgu u osób z niedoborami odporności, herpanginy i chorób wysypkowych [12, 30, 41, 42, 44, 57, 59]. Obserwowano ogniska zachorowań wywołane tym typem, powiązane z przypadkami zapaleń mięśnia sercowego oraz wzrostem zachorowań u niemowląt i noworodków z charakterystyczną herpanginą [42]. Najczęściej jest identyfikowany u dzieci poniżej pierwszego roku życia, głównie w materiale pobranym z dróg oddechowych [42]. Zachorowania o etiologii CVB3 u noworodków cechuje ciężki przebieg i wysoka śmiertelność 30–50% [44].

CVB4 charakteryzuje endemiczny typ krążenia, tylko w jednostkowych przypadkach odnotowywane są ogniska zachorowań [42]. Zachorowania o etiologii CVB4 wiążą się głównie z gorączką i wysypką, objawami ze strony układu oddechowego, zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, zapaleniem mózgu, zapaleniem serca oraz posocnicą noworodkową [7, 14, 41, 42]. Zakażenie dotyczy głównie małych dzieci, a materiałem, w którym najczęściej wykrywa się CVB4 jest pmr [12, 42]. Zakażenia cechuje bardzo wyraźna sezonowość ze wzrostem odnotowywanych przypadków w okresie lato-jesień [42]. Z tym typem wirusa Coxsackie B wiąże się bardzo wysoka śmiertelność, jedną z najwyższych wśród enterowirusów [14, 42].

CVB5 jest jednym z najczęściej identyfikowanych enterowirusów [42, 49, 66]. Wykazuje on wyraźny epidemiczny wzór krążenia, z regularnym wzrostem zachorowań co 3–6 lat, trwających najczęściej jeden sezon. W latach epidemicznych często występują liczne ogniska zachorowań na zomr [42, 63, 66, 75]. Dodatkowo CVB5 wywołuje zapalenie mięśnia sercowego, posocznice, zapalenie opon i mózgu, ostre porażenia wiotkie, którym może towarzyszyć HFMD i herpangina [12, 41, 42, 49, 66]. Zakażenie CVB5 uważa się, za czynnik predysponujący do rozwoju cukrzycy typu 1 [42]. Zachorowania dotyczą głównie małych dzieci, wirus wykrywany jest najczęściej w pmr. Podobnie jak w przypadku CVB1 i CVB4 obserwuje się wyraźną sezonowość zachorowań, szczyt przypada w okresie letnio-jesiennym [25, 42].

Najrzadziej wykrywanym typem jest CVB6, najczęściej powoduje sporadyczne przypadki zachorowań. Poziom przeciwciał przeciwko temu typowi utrzymuje się na niskim poziomie w populacji [42, 63].

Wirusy Coxsackie B często izolowano ze ścieków, wykrywano je także w wodach powierzchniowych, gruntowych i wodzie pitnej. Możliwość przenoszenia CVB, podobnie jak innych enterowirusów, przez wodę stanowi szczególne zagrożenie dla krajów rozwijających się z niedostatecznym poziomem higieny, złymi warunkami sanitarnymi i brakiem dostępu do nieskażonej wody. Chociaż udowodnienie wodopochodnego zakażenia jest trudne, biorąc pod uwagę okres inkubacji, szybkie wtórne rozprzestrzenianie się w populacji oraz niejednorodność objawów, to jednak takie potwierdzenie uzyskano dla kilku ognisk związanych z zakażeniami CVB [53].

8. Diagnostyka i możliwości terapeutyczne

Choroby wywoływane przez CVB, nie są charakterystyczne tylko dla tej grupy wirusów, mogą być również spowodowane zakażeniem innym enterowirusem, dlatego też nie stosuje się diagnostyki kierunkowej dla CVB. Celem badania laboratoryjnego jest, na pierwszym etapie, ustalenie czy czynnikiem etiologicznym choroby jest enterowirus, dopiero dalsze oznaczenia pozwalają na identyfikację typu wirusa [34]. Wstępnym etapem badań diagnostycznych jest pobranie materiału od pacjenta, rodzaj próbki uzależniony jest od rozpoznania. Zalecane jest jak najszybsze pobranie materiału, najlepiej z miejsca objętego chorobą (Tab. II).

W zależności od rozpoznania do diagnostyki w kierunku enterowirusów używany jest różnego rodzaju materiał kliniczny: kał, płyn mózgowo-rdzeniowy, wymaz z odbytu, wymaz z gardła i nosogardła, płyn z pęcherzyków skórnych, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BALF), wymaz z oka, mocz, zamrożona lub utrwalona w formalinie tkanka, krew, surowica i osocze [2, 5, 34, 39, 53]. W przypadku powszechnych dla CVB neuroinfekcji (zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych) najlepszym materiałem diagnostycznym jest pmr, gdyż detekcja wirusa jednoznacznie potwierdza etiologię zakażenia [34, 78]. W przypadku zakażeń OUN identyfikacja wirusa w kale i próbkach z układu oddechowego jest pomocna w diagnostyce, ale nie określa ostatecznie przyczyny choroby [34]. W zakażeniach górnych i dolnych dróg oddechowych, odpowiednimi materiałami klinicznymi są kał oraz wymaz z gardła, niemniej identyfikacja wirusa nie potwierdza jedno-

Tabela II

Rekomendowane materiały kliniczne do diagnostyki w kierunku enterowirusów w zależności od rozpoznania [41]

Rozpoznanie	Typ materiału klinicznego*	Wskazania diagnostyczne
Zapalenie opon i mózgu/ zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	pmr , kał i próbka z dróg oddechowych, ewentualnie krew	W przypadku zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych materiał genetyczny wirusa jest wykrywany w większości próbek pmr, lecz nie zawsze u pacjentów z zapaleniem mózgu. Dzięki przedłużonej obecności wirusa w kale i wydzielinach z układu oddechowego jest on łatwo wykrywany, lecz jego detekcja nie potwierdza ostatecznie etiologii choroby.
Posocznica noworodkowa	pmr , kał, krew i próbka z dróg oddechowych	W zakażeniach uogólnionych miano wirusa może być wyższe we krwi niż w pmr; wskazana jest jednoczesna diagnostyka w kierunku ludzkiego parechowirusa.
Ostre porażenie wiotkie/ zapalenie rdzenia kręgowego	próbka z dróg oddechowych , pmr, kał i krew	W większości przypadków porażen wiotkich materiał genetyczny wirusa jest wykrywany w pmr, chociaż u niektórych pacjentów może występować tylko w próbkach z układu oddechowego i/lub kale.
HFMD/ Wysypka	płyn z pęcherzyków wysypkowych , próbka z dróg oddechowych i/lub kał	Wirus o wysokim mianie występuje w płynie z pęcherzyków wysypkowych.
Choroby układu oddechowego	próbka z dróg oddechowych , kał	Materiał genetyczny wirusa zazwyczaj wykrywany jest w wymazach z gardła i aspiratach z jamy nosowo-gardłowej. Zalecane jest jednoczesne wykonanie diagnostyki w kierunku ludzkiego rinowirusa.
Zapalenie mięśnia sercowego	kał, próbka z układu oddechowego, biopsja serca i/lub krew	Biopsja serca może zostać wykorzystana do potwierdzenia diagnozy. Wskazane jest wykonanie typowania wirusa.

* – Zalecany typ materiału do badań oznaczono pogrubioną czcionką.

znacznie etiologii zakażenia [7]. Pobieranie próbek kału jest polecane do typowania wirusa, bez względu na charakter symptomów klinicznych, gdyż osoby zakażone wydają z kałem duże ilości wirusa (10^6 – 10^7 cząstek na 1 gram kału) przez długi czas po ustąpieniu objawów (średnio 2–4 tygodnie) [15].

Standardowa diagnostyka laboratoryjna zakażeń CVB, podobnie jak innych EV, polega na detekcji materiału genetycznego wirusa w próbkach klinicznych przy użyciu technik biologii molekularnej. Dodatkowo do dalszej charakterystyki patogenu stosuje się izolację w hodowlach komórkowych, typowanie metodami molekularnymi lub przy użyciu surowic neutralizujących. Mniej popularne są metody serologiczne ze względu na niską czułość i specyficzność [34].

Diagnostyka enterowirusów przez wiele lat opierała się na izolacji w hodowlach komórkowych, a następnie ich identyfikacji w teście neutralizacji z wzorcowymi surowicami Lim Benyesh-Melnick. Izolacja wirusów długo stanowiła „złoty standard”. Obecnie metoda ta najczęściej służy do badań referencyjnych, naukowych oraz epidemiologicznych, dostarczając informacji o typach klinicznych i środowiskowych krążących w populacji [34]. Ponadto może być także używana do wykrywania zakażeń mieszanych oraz oceny działania leków przeciwwirusowych [34]. Wirusy Coxsackie B izolowane są w liniach komórkowych, wyprowadzonych zarówno ze zwierzęcych jak i ludzkich tkanek. Dobrze namnażają się w komórkach nerki małpiej oraz ludzkich liniach nowotworowych takich jak: A549, HeLa, Hep-2, HT-29 i RD [6, 29, 64].

Trudności w izolacji niektórych wariantów wirusów w hodowlach komórkowych doprowadziło do opracowania nowych metod diagnostycznych, opartych na technikach biologii molekularnej [5, 39]. Wykrywanie materiału genetycznego EV, bezpośrednio w badanym materiale klinicznym, oparte jest na łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR) [34]. Obecnie w celach diagnostycznych EV używa się różne odmiany reakcji PCR: RT-PCR w czasie rzeczywistym (rtRT-PCR) [78], multiplex-RT-PCR [13] oraz wewnętrzny (zagnieżdżony) RT-PCR (nRT-PCR) [39]. W podstawowym teście diagnostycznym, reakcji amplifikacji podlega wysoko konserwatywny region 5'NTR. Test ten charakteryzuje się wysoką czułością, swoistością oraz krótkim czasem realizacji. Umożliwia on także wykrywanie materiału genetycznego wariantów wirusów, które nie namnażają się w hodowlach komórkowych [34].

Typowanie CVB przebiega z użyciem metod molekularnych i jest możliwe dzięki zastosowaniu techniki PCR połączonej z sekwencjonowaniem [39]. Reakcja sekwencjonowania może obejmować cały genom wirusa lub region kodujący białka strukturalne kapsydu, zwłaszcza VP1 [34]. Obecnie typowanie mole-

kularne EV uważa się za standardową metodę (tzw. złoty standard) [34]. Służy ona do celów epidemiologicznych, grupowania, genotypowania, identyfikacji zdarzeń rekombinacyjnych oraz pojawiania się nowych rekombinantów i wariantów EV [5, 34, 39].

Uzyskanie wyniku badań potwierdzającego etiopatogenezę CVB, nie wiąże się z przyczynową terapią zakażenia, ze względu na brak preparatów działających selektywnie na wirusa [1, 2, 76, 79]. W ciężkich przypadkach zachorowań konieczna jest hospitalizacja chorego i wdrożenie leczenia objawowego, a nawet działań podtrzymujących życie [2, 14, 35]. Korzystny wpływ może przynieść podawanie pacjentowi dożylnych preparatów ludzkiej immunoglobuliny (IVIG), ale ta metoda leczenia nie została jednoznacznie potwierdzona [2, 67]. Lepsze zrozumienie patogenezы zakażenia CVB stanowi podstawę opracowania terapii przeciwwirusowej i strategii ochronnej. Głównym zadaniem nowych substancji terapeutycznych jest selektywne oddziaływanie na wirusa lub niezbędne do replikacji wirusa czynniki gospodarza (Tab. III).

Najbardziej obiecującymi związkami w terapii zakażeń enterowirusami, w tym CVB, są inhibitory wiązania kapsydu wirusa z receptorem komórkowym [1, 64]. Do tej grupy należy pleconaril, pirodavis, vapendavis, pocapavir [1, 2, 8]. Substancje te łączą się z hydrofobowym zagłębieniem w kapsydzie, tym samym zapobiegając połączeniu z receptorem [2]. Jak dotąd żadna z tych substancji nie została zarejestrowana do leczenia, ale przeprowadzono obiecujące badania kliniczne z użyciem pleconarilu na grupie noworodków z zakażeniem ogólnoustrojowym o etiologii enterowirusowej. Uzyskane wyniki dają nadzieję na skuteczną terapię i zmniejszenie śmiertelności w tej grupie chorych [2]. Do kapsydu wirusa wiążą się także pochodne benzenosulfonamidowe [1]. Związki te łączą się z kieszenią w kapsydzie w zagłębieniu białek VP1 i VP3, przez co hamują proces uwalniania materiału genetycznego wirusa do cytoplazmy komórki gospodarza [1]. Tego typu związki wydają się mieć szeroki zakres działania i jest nadzieja, że znajdą zastosowanie w terapii zakażeń wywołanych nie tylko przez enterowirusy, ale także rinowirusy [1]. Innym rodzajem substancji przeciwwirusowych są rozpuszczalne receptory, które konkurencyjnie wiążąc cząsteczki wirusa, przeciwdziałają zakażeniu komórki. Tego typu związkiem jest fuzyjne białko sCAR-Fc, zbudowane z zewnątrzkomórkowej domeny CAR i fragmentu ludzkiej immunoglobuliny typu G (IgG) [61]. Badania *in vitro* wykazały wysoką aktywność przeciwwirusową sCAR-Fc względem wszystkich szczepów referencyjnych dla każdego z sześciu typów CVB, ale także dużą skuteczność w stosunku do izolatów klinicznych [61].

Do innej grupy związków należą inhibitory proteazy 3C. Oddziałują one z aktywnym miejscem enzymu,

Tabela III
Substancje oddziałujące z wirusami Coxsackie B [1, 4, 8, 31, 33, 40, 48, 61, 64, 68, 73, 76, 77, 79]

Cel	Mechanizm działania	Substancja czynna
Kapsyd	Zaburzenie etapu przyłączania wirusa do receptora komórkowego	• Pleconaril i jego analog • Poczapavir (V-073) • sCAR-Fc • Pirodavisir • Vapendavisir
3C ^{pro}	Hamowanie procesu potranslacyjnej obróbki poliproteiny	• Rupintrivir i jego analog AG7404
3D ^{pol}	Hamowanie procesu replikacji genomu wirusa	• Gemcytabina • Rybawiryna • Amiloryd
2C	Hamowanie procesu replikacji genomu wirusa	• Fluoksetyna • Dibucaina • Pirlindole • Formoterol • Zuklopentyksol
Czynniki gospodarza	Ukierunkowane na HSP90, inhibicja obróbki proteolitycznej regionu P1 genomu	• Geldanamycyna i jej analog 17-AAG
	Ukierunkowane na PI4KB, inhibicja replikacji wirusa	• Enviroxime • GW5074 • PIK93 • BF738735
	Ukierunkowane na OSBP, inhibicja replikacji wirusa	• Itrakonazol • OSW-1
	Ukierunkowane na glutation, inhibicja procesu składania kapsydu	• Butionino-sulfoksymina • TP219

Oznaczenia: HSP90 – białko szoku cieplnego 90; PI4K β – kinaza4-fosfatidyloinozytolu; OSBP – białko wiążące oksysterol.

przez co hamują potranslacyjną obróbkę poliproteiny. Opracowanie inhibitorów 3C jest związane z syntezą złożonych cząsteczek peptydomimetycznych np. rupintriviru i jego analogu AG7404. Pozytywnym aspektem zastosowania tego typu związków w terapii jest ich szeroki zakres działania nie tylko na enterowirusy, ale także na rinowirusy. [8, 48]

Kolejną strategią w terapii antywirusowej jest hamowanie wirusowej polimerazy 3Dpol. Analogi nukleozydów (gemcytabina, rybawiryna) oraz inhibitor nienukleozydowy (amiloryd) wpływają na zahamowanie procesu replikacji [8, 48]. Mogą one zostać włączone do genomu wirusa, prowadząc do terminacji syntezy nowopowstającego łańcucha nukleotydowego [40] lub oddziaływać z polimerazą (amiloryd) zwiększając jej częstość błędów [48]. Związki wykazujące aktywność wobec polimerazy 3Dpol używane są w terapiach innych schorzeń. Mianowicie gamcytabina to lek przeciwnowotworowy stosowany w chemioterapii różnych nowotworów [40]. Rybawiryna stosowana jest w terapii przeciw RNA wirusom, takim jak wirus zapalenia wątroby typu C oraz wirus RS (RSV), a amiloryd to diuretyk [31, 40].

Do kolejnej grupy potencjalnych leków przeciw-wirusowych należą inhibitory białka enzymatycznego wirusa 2C. Hamują one proces replikacji materiału genetycznego wirusa, chociaż dokładny mechanizm ich działania nie jest poznany. Inhibitorem 2C jest m.in.

lek przeciwdepresyjny fluoksetyna (Prozac), dibucaina stosowana do miejscowych znieczuleń oraz lek przeciwdepresyjny pirlindole. [8, 33,76]

Wysoki wskaźnik mutacji RNA wirusów wpływa na szybkie pojawianie się wariantów opornych na działanie substancji aktywnych. Dlatego też rośnie zainteresowanie opracowywaniem leków przeciwwirusowych celujących w czynniki gospodarza, które są kluczowe w replikacji wirusa [8]. Zaburzenie procesu replikacji można uzyskać poprzez ukierunkowaną aktywność inhibitorów wobec czynników gospodarza biorących udział w tworzeniu struktury replikacyjnej RO tj. PI4KB oraz OSBP [4, 77]. OSBP jest blokowany przez lek przeciwczyłczy itrakonazol [8] oraz naturalny związek przeciwnowotworowy OSW-1 [4]. Inhibitory PI4KB (Enviroxime; GW5074; PIK93) wykazują szerokie spektrum działania, lecz ich stosowanie wiąże się wystąpieniem działań niepożądanych [8, 77]. Inhibitory czynników gospodarza mogą także prowadzić do zahamowania procesu składania cząsteczek potomnych wirusa [8]. Przykładem takich substancji są geldanamycyna [8], butionino-sulfoksymina [68] i TP219 [73]. Geldanamycyna oddziałuje z białkiem szoku cieplnego (HSP90), które bierze udział w cięciu proteiny P1 przez proteazę 3CD na VP0, VP1 i VP3 [50], natomiast butionino-sulfoksymina [68] wpływa na poziom glutationu w organizmie, podobnie jak TP219 [73], które

kowalencyjnie łączy się z tym peptydem [27]. Glutathion to tripeptyd, w którego skład wchodzi glutamina, cysteina i glicyna, bierze on udział w stabilizacji pentamerów budujących prokapsyd [27, 68].

Jak dotąd żadna z opisanych powyżej substancji nie została zatwierdzona do stosowania w terapii zakażeń CVB. Nie ma także dostępnej szczepionki przeciwko CVB. W trakcie badań klinicznych są obiecujące prototypowe szczepionki zapobiegające zakażeniom CVB3 [36] oraz CVB1 [37], które w modelach zwierzęcych ograniczają rozwój cukrzycy typu 1. Zakażeniom CVB nie można całkowicie zapobiec, ale należy pamiętać, że transmisja CVB zachodzi głównie drogą fekalno-oralną. Dlatego też przestrzeganie zasad higieny, częste i dokładne mycie rąk zmniejsza ryzyko zakażenia [2, 25].

9. Podsumowanie

Wirusy Coxsackie B to jedne z najczęściej wykrywanych enterowirusów na całym świecie. Wywołują szeroki wachlarz chorób od łagodnych nieżytów żołądkowo-jelitowych, do często ciężkich w przebiegu zapaleń mięśnia sercowego, wątroby, trzustki, opon mózgowo-rdzeniowych, mózgu oraz ostrych porażień wiotkich. Z zakażeniami CVB związany jest również rozwój chorób chronicznych: kardiomiopatii, cukrzycy typu 1 oraz zespołu chronicznego zmęczenia. Szeroki wachlarz jednostek chorobowych jakie wywołują związany jest z pantropizmem tych wirusów, czyli z możliwością zakażenia różnych tkanek i organów. Poznanie mechanizmów wnikania, patogenyzy oraz interakcji z białkami gospodarza jest tematem zainteresowania wielu badaczy. Mijmy nadzieję, że kolejne odkrycia i poszerzenie wiedzy w zakresie CVB pozwolą na skuteczną kontrolę zakażeń i zapobieganie ciężkim, jak również chronicznym postaciom choroby, oraz rozszerzą możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

Podziękowania

Praca powstała w ramach zadania BW-1/2021.

Piśmiennictwo

- Abdelnabi R., Neyts J. i wsp.: A novel druggable interprotomer pocket in the capsid of rhino- and enteroviruses. *PLoS Biol.* **17**, e3000281 (2019)
- Abzug M.J.: Presentation, diagnosis, and management of enterovirus infections in neonates. *Paediatr. Drugs.* **6**, 1–10 (2004)
- Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., Barry R.D.: Integrin $\alpha v \beta 6$ enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, **239**, 71–77 (1997)
- Albulescu L., Strating J.R.P.M., Thibaut H.J., van der Linden L., Shair M.D., Neyts J., van Kuppeveld F.J.M.: Broad-range inhibition of enterovirus replication by OSW-1, a natural compound targeting OSBP. *Antivir. Res.* **117**, 110–114 (2015)
- Angez M., Shaukat S., Zahra R., Alam M., Sharif S., Khurshid A., Zaidi S.: Characterization of group B coxsackieviruses isolated from non-polio acute flaccid paralysis patients in Pakistan: Vital Assessment Before polio eradication. *Epidemiol. Infect.* **145**, 2473–2481 (2017)
- Argo E., Gimenez B., Cash P.: Non-cytopathic infection of rhabdomyosarcoma cells by coxsackie B5 virus. *Arch. Virol.* **126**, 215–229 (1992)
- Baboonian C., Davies M.J., Booth J.C., McKenna W.J.: Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 31–52 (1997)
- Baggen J., Thibaut H.J., Strating J.R.P.M., van Kuppeveld F.J.M.: The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nat. Rev. Microbiol.* **16**, 368–381 (2018)
- Basavappa R., Filman D.J., Syed R., Flore O., Icenogle J.P., Hogle J.M.: Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: Structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* **3**, 1651–1669 (1994)
- Bedard K.M., Semler B.L.: Regulation of picornavirus gene expression. *Microbes. Infect.* **6**, 702–713 (2004)
- Bergelson J.M., Modlin J.F., Wieland-Alter W., Cunningham J.A., Crowell R.L., Finberg R.W.: Clinical Coxsackievirus B Isolates Differ from Laboratory Strains in Their Interaction with Two Cell Surface Receptors. *J. Infect. Dis.* **175**, 697–700 (1997)
- Bersani I., Auriti C., Piersigilli F., Dotta A., Diomedei-Camassei F., Di Pede A., Buttinelli G., Danhaive O.: Neonatal Acute Liver Failure Due to enteroviruses: a 14 years single NICU experience. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* **33**, 2576–2580 (2020)
- Billaud G., Peny S., Legay V., Lina B., Valette M.: Detection of rhinovirus and enterovirus in upper respiratory tract samples using a multiplex nested PCR. *J. Virol. Methods.* **108**, 223–228 (2003)
- Bissel S.J., Winkler C.C., DelTondo J., Wang G., Williams K., Wiley C.A.: Coxsackievirus B4 myocarditis and meningoencephalitis in newborn twins. *Neuropathology*, **34**, 429–437 (2014)
- Bopegamage S.: Enterovirus infections: Pivoting role of the adaptive immune response. *Virulence*, **7**, 495–497 (2016)
- Buchwald D., Ashley R.L., Pearlman T., Kith P., Komaroff A.L.: Viral serologies in patients with chronic fatigue and chronic fatigue syndrome. *J. Med. Virol.* **50**, 25–30 (1996)
- Chrysos G., Kokkoris S., Protosaltis J., Korantzopoulos P., Giannoulis G.: Coxsackievirus infection associated with acute pancreatitis. *JOP*, **5**, 384–387 (2004)
- Chu P.Y., Motomura K. i wsp.: Transmission and Demographic Dynamics of Coxsackievirus B1. *PLoS One*, **10**, e0129272 (2015)
- Chung S.K., Kim J.Y., Kim I.B., Park S. I., Paek K.H., Nam J.H.: Internalization and trafficking mechanisms of coxsackievirus B3 in HeLa cells. *Virology*, **333**, 31–40 (2005)
- Coyne C.B., Shen L., Turner J.R., Bergelson J.M.: Coxsackievirus Entry across Epithelial Tight Junctions Requires Occludin and the Small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host. Microbe.* **2**, 181–192 (2007)
- Crowell R.L., Landau B.J.: A short history and introductory background on the coxsackieviruses of group B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 1–11 (1997)
- Dalldorf G., Sickles G.M., Plager H., Gifford, R.: A virus recovered from the feces of poliomyelitis patients pathogenic for suckling mice. *J. Exp. Med.* **89**, 567–582 (1949)
- Dan M., Chantler J.K.: A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal injection. *J. Virol.* **79**, 9285–9295 (2005)

24. Domingo E., Martin V., Perales C., Escarmis C.: Coxsackieviruses and Quasispecies Theory: Evolution of Enteroviruses (w) Group B Coxsackieviruses, red. Tracy S., Oberste M.S., Drescher K.M. *Curr Top in Microbiol. Immunol.* **323**, 3–32 (2008)
25. Druyts-Voets E., Van Renterghem L., Gerniers S.: Coxsackie B virus epidemiology and neonatal infection in Belgium. *J. Infect.* **27**, 311–316 (1993)
26. Dutkiewicz M., Stachowiak A., Swiatkowska A., Ciesiołka J.: Structure and function of RNA elements present in enteroviral genomes. *Acta. Biochim. Pol.* **63**, 623–630 (2016)
27. Duyvesteyn H.M.E., Ren J., Walter T.S., Fry E.E., Stuart D.I.: Glutathione facilitates enterovirus assembly by binding at a druggable pocket. *Commun. Biol.* **3**, DOI: 10.1038/s42003-019-0722-x. (2020)
28. Euscher E., Davis J., Holzman I., Nuovo G.J.: Coxsackie virus infection of the placenta associated with neurodevelopmental delays in the newborn. *Obstet. Gynecol.* **98**, 1019–1026 (2001)
29. Frisk G., Lindberg M.A., Diderholm H.: Persistence of coxsackievirus B4 infection in rhabdomyosarcoma cells for 30 months. Brief report. *Arch. Virol.* **144**, 2239–2245 (1999)
30. Garmaroudi F.S., Marchant D., Hendry R., Luo H., Yang D., Ye X., Shi J., McManus B.M.: Coxsackievirus B3 replication and pathogenesis. *Future Microbiol.* **10**, 629–653 (2015)
31. Gazina E.V., Smidansky E.D., Holien J.K., Harrison D.N., Cromer B.A., Arnold J.J., Parker M.W., Cameron C.E., Petrou S.: Amiloride is a competitive inhibitor of coxsackievirus B3 RNA polymerase. *J. Virol.* **85**, 10364–10374 (2011)
32. Ghigo E.: A dilemma for viruses and giant viruses: which endocytic pathway to use to enter cells? *Intervirology*, **53**, 274–283 (2010)
33. Gofshsteyn J., Cárdenas A.M., Bearden D.: Treatment of Chronic Enterovirus Encephalitis With Fluoxetine in a Patient With X-Linked Agammaglobulinemia. *Pediatr. Neurol.* **64**, 94–98 (2016)
34. Harvala H., Fischer T.K. i wsp.: Recommendations for enterovirus diagnostics and characterisation within and beyond Europe. *J. Clin. Virol.* **101**, 11–17 (2018)
35. Hopkins K.A., Abdou M.H., Hadi M.A.: Coxsackie B2 Virus Infection Causing Multiorgan Failure and Cardiogenic Shock in a 42-Year-Old Man. *Tex. Heart. Inst. J.* **46**, 32–35 (2019)
36. Hunziker I.P., Harkins S., Feuer R., Cornell C.T., Whitton J.L.: Generation and analysis of an RNA vaccine that protects against coxsackievirus B3 challenge. *Virology*, **330**, 196–208 (2004)
37. Hyöty H., Leon F., Knip M.: Developing a vaccine for type 1 diabetes by targeting coxsackievirus B. *Expert. Rev. Vaccines*. **17**, 1071–1080 (2018)
38. Ifie E., Richardson S.J. i wsp.: Unexpected subcellular distribution of a specific isoform of the Coxsackie and adenovirus receptor, CAR-SIV, in human pancreatic beta cells. *Diabetologia*, **61**, 2344–2355 (2018)
39. Iturriza-Gómara M., Megson B., Gray J.: Molecular detection and characterization of human enteroviruses directly from clinical samples using RT-PCR and DNA sequencing. *J. Med. Virol.* **78**, 243–253 (2006)
40. Kang H., Cho, S. i wsp.: Synergistic antiviral activity of gemcitabine and ribavirin against enteroviruses. *Antiviral. Res.* **124**, 1–10 (2015)
41. Kaplan M.H., Klein S.W., McPhee J., Harper R.G.: Group B Coxsackievirus infections in infants younger than three months of age: a serious childhood illness. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 1019–1032 (1983)
42. Khetsuriani N., Lamonte-Fowlkes A., Oberst S., Pallansch M.A.: Enterovirus surveillance – United States, 1970–2005. *MMWR Surveill. Summ.* **55**, 1–20 (2006)
43. Knowlton K.U.: CVB infection and mechanisms of viral cardiomyopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **323**, 315–335 (2008)
44. Krogstad P., Hammon R., Halnon N., Whitton J.L.: Fatal neonatal myocarditis caused by a recombinant human enterovirus-B variant. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **27**, 668–669 (2008)
45. Kyriakopoulou Z., Pliaka V., Amoutzias G.D., Markoulatos P.: Recombination among human non-polio enteroviruses: implications for epidemiology and evolution. *Virus. Genes.* **50**, 177–188 (2015)
46. Lee S.H.: Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest. Res.* **13**, 11–18 (2015)
47. Lin J.-Y., Chen T.-C., Weng K.-F., Chang S.-C., Chen L.-L., Shih S.-R.: Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* **16**, 103 (2009)
48. Linden L., Wolthers K., van Kuppeveld F.: Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses*, **7**, 4529–4562 (2015)
49. Ma H., Huang X., Kang K., Li X., Tang X., Ren Y., Wang Y., Zhao G., Xu B.: Recombination in human coxsackievirus B5 strains that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan, China. *Arch. Virol.* **158**, 2169–2173 (2013)
50. Martínez-Salas E., Francisco-Velilla R., Fernandez-Chamorro J., Lozano G., Diaz-Toledano R.: Picornavirus IRES elements: RNA structure and host protein interactions. *Virus. Res.* **206**, 62–73 (2015)
51. Melchers W.J., Hoenderop J.G., Bruins Slot H.J., Pleij C.W., Pilipenko E.V., Agol V.I., Galama J.M.: Kissing of the two predominant hairpin loops in the coxsackie B virus 3' untranslated region is the essential structural feature of the origin of replication required for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* **71**, 686–696 (1997)
52. Mercer J., Helenius A.: Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.* **11**, 510–520 (2009)
53. Muehlenbachs A., Bhatnagar J., Zaki, S.R.: Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J. Pathol.* **235**, 217–228 (2014)
54. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F.: Recombination in Enteroviruses, a Multi-Step Modular Evolutionary Process. *Viruses*, **11**, 859 (2019)
55. Oikarinen M., Hyöty H. i wsp.: Analysis of pancreas tissue in a child positive for islet cell antibodies. *Diabetologia*, **51**, 1796–1802 (2008)
56. Oikarinen S., Hyöty H. i wsp.: Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes. *Diabetes*. **63**, 655–662 (2016)
57. Ornoy A., Tenenbaum A.: Pregnancy outcome following infections by coxsackie, echo, measles, mumps, hepatitis, polio and encephalitis viruses. *Reprod. Toxicol.* **21**, 446–457 (2006)
58. Panwar H.S., Ojha H., Ghosh P., Barage S.H., Raut S., Sahu A.: Molecular engineering of an efficient four-domain DAF-MCP chimera reveals the presence of functional modularity in RCA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9953–9958 (2019)
59. Peischard S., Ho H.T., Theiss C., Strutz-Seeböhm N., Seeböhm G.: A Kidnapping Story: How Coxsackievirus B3 and Its Host Cell Interact. *Cell Physiol. Biochem.* **53**, 121–140 (2019)
60. Pérez-Losada M., Arenas M., Galán J. C., Palero F., González-Candelas F.: Recombination in viruses: mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* **30**, 296–307 (2015)
61. Pinkert S., Dieringer B., Diedrich S., Zeichhardt H., Kurreck J., Fechner H.: Soluble coxsackie- and adenovirus receptor (sCAR-Fc); a highly efficient compound against laboratory and clinical strains of coxsackie-B-virus. *Antiviral. Res.* **136**, 1–8 (2016)
62. Pinkert S., Röger C., Kurreck J., Bergelson J. M., Fechner H.: The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor: Glycosylation and the

- Extracellular D2 Domain Are Not Required for Coxsackievirus B3 Infection. *J. Virol.* **90**, 5601–5610 (2016)
63. Rotbart H.A.: Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin. Infect. Dis.* **20**, 971–981 (1995)
 64. Schmidtke M., Selinka H. C., Heim A., Jahna B., Tonewa M., Kandolf R., Stelzner A., Zella R.: Attachment of coxsackievirus B3 variants to various cell lines: mapping of phenotypic differences to capsid protein VP1. *Virology*, **275**, 77–88 (2000)
 65. Schultz J.C., Hilliard A.A., Cooper L.T., Rihal C.S.: Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo. Clin. Proc.* **84**, 1001–1009 (2009)
 66. Shen H.: Recombination analysis of coxsackievirus B5 genotype C. *Arch. Virol.* **163**, 539–544 (2018)
 67. Sin J., Mangale V., Thienphrapa W., Gottlieb R. A., Feuer R.: Recent progress in understanding coxsackievirus replication, dissemination, and pathogenesis. *Virology*, **484**, 288–304 (2015)
 68. Smith A.D., Dawson H.: Glutathione is required for efficient production of infectious picornavirus virions. *Virology*, **353**, 258–267 (2006)
 69. Sun D., Chen X. i wsp.: Apoptosis and Autophagy in Picornavirus Infection. *Front. Microbiol.* **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.02032 (2019)
 70. Tang J.W., Holmes C.W.: Acute and chronic disease caused by enteroviruses. *Virulence*, **8**, 1062–1065 (2017)
 71. Thanaviratnanich S, Katirji B.: Myasthenia Gravis following Coxsackie Encephalitis. *SAJ Case Rep.* **4**, 304 (2017)
 72. Thevenin T., Lobert P.E., Hober D.: Inactivation of coxsackievirus B4, feline calicivirus and herpes simplex virus type 1: unexpected virucidal effect of a disinfectant on a non-enveloped virus applied onto a surface. *Intervirology*, **56**, 224–230 (2013)
 73. Thibaut H.J., Neyts J. i wsp.: Binding of glutathione to enterovirus capsids is essential for virion morphogenesis. *PLoS Pathog.* **10**, e1004039 (2014)
 74. Triantafyllopoulou A., Tapinos N., Moutsopoulos H.M.: Evidence for coxsackievirus infection in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis. Rheum.* **50**, 2897–2902 (2004)
 75. Tsuno K., Miyatake C., Nishijima H., Hotta C., Ogawa T., Asano T.: Coxsackievirus B5 Aseptic Meningitis in Infants in Chiba Prefecture, Japan, in 2016. *J. Nippon. Med. Sch.* **85**, 187–190 (2018)
 76. Ulferts R., de Boer S.M., van Kuppeveld F.J.M. i wsp.: Screening of a Library of FDA-Approved Drugs Identifies Several Enterovirus Replication Inhibitors That Target Viral Protein 2C. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **60**, 2627–2638 (2016)
 77. Van der Schaar H.M., van Kuppeveld F.J.M. i wsp.: Coxsackievirus mutants that can bypass host factor PI4KIII β and the need for high levels of PI4P lipids for replication. *Cell Res.* **22**, 1576–1592 (2012)
 78. Volle R., Nourrisson C., Mirand A., Regagnon C., Chambon M., Henquell C., Bailly J.-L., Peigue-Lafeuille H., Archimbaud C.: Quantitative real-time RT-PCR assay for research studies on enterovirus infections in the central nervous system. *J. Virol. Methods.* **185**, 142–148 (2012)
 79. Volobueva A., Egorova A., Galochkina A., Ekins S., Zarubaev V., Makarov V.: The Evolution of Pleconaril: Modified O-Alkyl Linker Analogs Have Biological Activity towards Coxsackievirus B3 Nancy. *Molecules*, **25**, DOI: 10.3390/molecules25061345. (2020)
 80. Vonlaufen A., Wilson J.S., Apte M.V.: Molecular mechanisms of pancreatitis: current opinion. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 1339–1348 (2008)
 81. Wehbi A., Kremer E.J., Dopeso-Reyes I.G.: Location of the Cell Adhesion Molecule “Coxsackievirus and Adenovirus Receptor” in the Adult Mouse Brain. *Front. Neuroanat.* **14**, DOI: 10.3389/fnana.2020.00028 (2020)
 82. Xiang W., Paul A.V., Wimmer E.: RNA Signals in Enterovirus and Rhinovirus Genome Replication. *Seminars in Virology*, **8**, 256–273 (1997)
 83. Zaragoza C., Ocampo C., Saura M., Leppo M., Wei X.-Q., Quick R., Moncada S., Liew F.Y., Lowenstein, C.J.: The role of inducible nitric oxide synthase in the host response to Coxsackievirus myocarditis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 2469–2474 (1998)
 84. Zautner A.E., Korner U., Henke A., Badorff C., Schmidtke M.: Heparan sulfates and coxsackievirus-adenovirus receptor: each one mediates coxsackievirus B3 PD infection. *J. Virol.* **77**, 10071–10077 (2003)
 85. Zell R. and ICTV Report Consortium: ICTV VirusTaxonomy Profile. Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2421–2422 (2017)