
Streszczenie

Wirus grypy (Influenza virus, IV) należy do rodziny *Orthomyxoviridae* i dzięki swoim zdolnościom adaptacyjnym jest jednym z najgroźniejszych patogenów na świecie. Wyróżnia się trzy typy wirusa grypy oznaczone jako A, B i C, przy czym głównie typ A stanowi poważny problem zdrowia publicznego, powodując u ludzi ostre infekcje, przebiegające z wysoką śmiertelnością wywoływane coraz częściej przez szczepy dotychczas uznawane za chorobotwórcze jedynie u zwierząt. Dane epidemiologiczne z ostatnich lat wskazują na możliwość wystąpienia kolejnych szczepów pandemicznych. Tylko w XX wieku wirusy grypy typu A wywołał 3 pandemie, które pochłonęły, jak szacuje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) około 100 milionów (!!!) ofiar.

Według WHO, każdego roku na infekcje wirusem grypy zapada nawet do 15% społeczeństwa (około 1 miliarda zachorowań), a śmiertelność z powodu komplikacji pogrypowych może dojść nawet do 500 000 osób rocznie. Na tle różnorodności czynników etiologicznych żaden inny patogen nie infekuje tak dużej części ludzkiej populacji i nie prowadzi do tak dużych strat ludzkich. Ta ogromna ilość zachorowań odbija się znacząco na gospodarce światowej. Straty Produktu Światowego Brutto (PSB) liczy się w setkach milionów, a nawet miliardów dolarów rocznie. Jak wyliczono, w przypadku wybuchu pandemii grypy światowa gospodarka mogłaby zanotować nawet 2% spadek PSB. Są to niewyobrażalne straty ekonomiczne, które mogłoby pogłębić sytuację gospodarczą większości państw.

Wirus grypy typu A cechuje się znaczącą łatwością adaptacji. Zdolność tą zawdzięcza bardzo dużej zmienności genetycznej wynikającej z dwóch procesów: pierwszy to dryft antygenowy (przesunięcie antygenowe czyli spontaniczne mutacje w genomie wirusa, będące cechą charakterystyczną wszystkich RNA wirusów), a drugi to reassortacja genowa (przemieszanie się segmentów wirusa podczas koinfekcji w wyniku czego mogą powstawać nowe warianty wirusa grypy – tak jak w przypadku szczepów pandemicznych z 2009 roku).

Najważniejszym rezerwuarem wszystkich szczepów wirusa jest dzięki ptactwo, u których infekcje wirusowe przechodzą na ogół bezobjawowo. Stanowią one główne źródło zakażenia ptactwa domowego jak i innych zwierząt. Podejrzewa się, że wszystkie szczepy infekujące ssaki, w tym ludzi, pochodzą od szczepów wirusów ptasich, które w drodze

adaptacji oraz mutacji uzyskały zdolność infekowania innych organizmów. Zakażenia ptaków dzikich następują najczęściej bezobjawowo na drodze kontaktu bezpośredniego z innym chorym zwierzęciem lub poprzez kontakt z materiałem zawierającym wirusa np. odchodami.

Grypę u ptaków dzielimy na niskopatogenną „LPAI” (Low Pathogenic Avian Influenza), często nie objawiającą się symptomatycznie lub powodującą łagodne objawy ze strony układu oddechowego oraz wysokopatogenną „HPAI” (Highly Pathogenic Avian Influenza), którą charakteryzuje wysoka infekcyjność i śmiertelność dochodząca do 100%. Według obowiązujących przepisów weterynaryjnych w przypadku wykrycia zakażenia wirusem grypy stada hodowlanego podlega ono całkowitej eksterminacji.

W związku z faktem, iż wirus grypy jest tak groźnym i zmiennym ludzkim patogenem niezbędna jest intensyfikacja właściwej diagnostyki i monitoringu rozprzestrzeniania się choroby wśród ludzi i ptaków, zwłaszcza podczas epidemii czy pandemii.

Drugim bardzo ważnym patogenem ptaków jest wirus rzekomego pomoru drobiu (wirus ND, NDV). Wirus ten jest członkiem rodziny *Paramyxoviridae* i podobnie jak u wirusa grypy jego materiałem genetycznym jest jednoniciowe RNA o ujemnej polarności. Oba wirusy mają podobną budowę morfologiczną, ale najważniejsze i zarazem najbardziej kłopotliwe dla lekarzy weterynarii są niemal identyczne objawy jakie wywołują oba wirusy w przypadku infekcji. Wirus ND został podzielony ze względu na swoją patogenność na trzy typy: welogeniczny (najbardziej zjadliwy), lentogeniczny (średniozjadliwy) oraz lentogeniczny (niepatogenny).

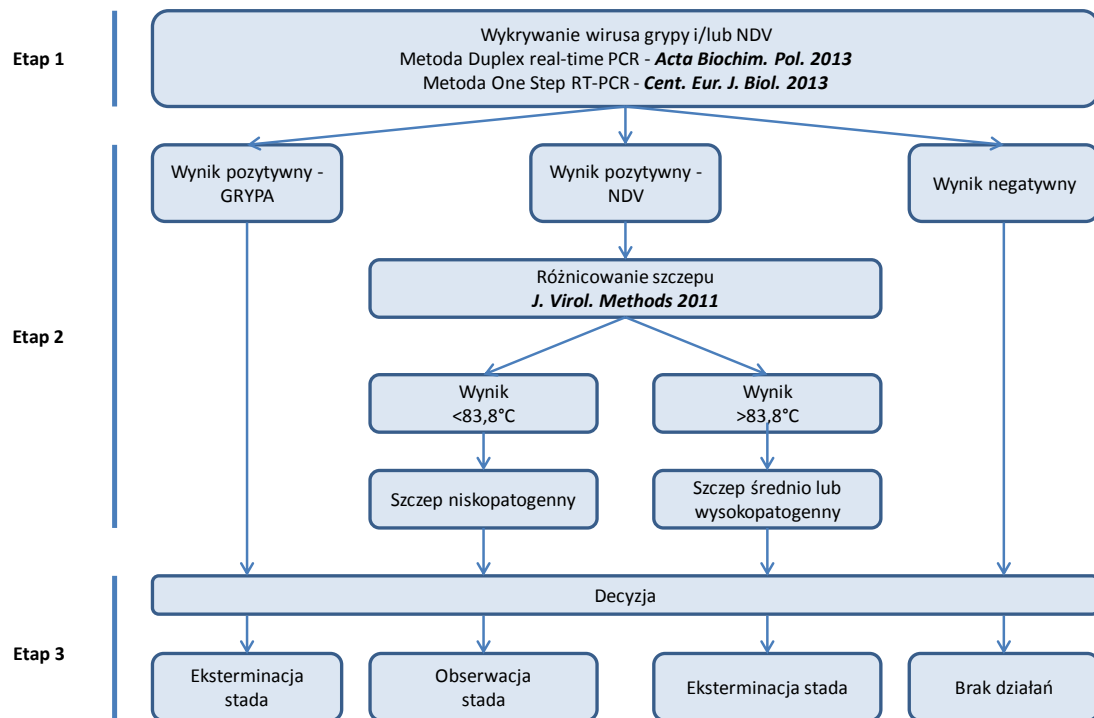
Podobnie jak wirus grypy, również wirus ND może powodować do 100% śmiertelności w zakażonym stadzie, a objawy obserwowane podczas infekcji tymi wirusami są niemal identyczne. Jednak z przyczyn epidemiologicznych, statystycznych oraz do celów monitoringu i zwalczania konieczne jest określenie patogenu infekującego ptactwo hodowlane.

Klasyczne metody diagnostyczne z racji swojej pracochłonności oraz czasochłonności są coraz częściej zastępowane nowoczesnymi metodami molekularnymi, które oferują znaczące skrócenie czasu diagnozy, zwiększenie czułości i znacznie prostsze wykonanie badań.

Celem niniejszej rozprawy jest zaproponowanie nowych metod diagnostycznych ułatwiających monitorowanie infekcji wirusa grypy oraz w przypadku ptactwa, dodatkowo diagnostyki wirusa rzekomego pomoru drobiu.

Zaproponowane metody zostały podzielone na dwa systemy do detekcji wirusa grypy u ludzi oraz diagnostyki obu wirusów u ptaków. Przedstawione testy zostały opracowane w oparciu o metody real-time PCR (z wykorzystaniem barwnika SYBR Green I oraz sond hydrolizujących TaqMan), metody One step RT-PCR (Reverse Transcription) oraz opracowany został nowy czujnik (immunosensor) wykorzystujący elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną.

Aby usprawnić wykrywanie i różnicowanie wirusów grypy i rzekomego pomoru drobiu u ptaków, zaproponowałem trzyetapowy schemat postępowania dzięki któremu możliwe jest określenie rodzaju wirusa oraz dodatkowo oznaczenie patogenności wirusa ND (Schemat 1).



Schemat 1 – System diagnostyki wirusów: grypy i rzekomego pomoru drobiu

W pierwszym etapie zaproponowałem dwie metody umożliwiające wykrycie i zróżnicowanie wirusa grypy i NDV także w przypadku koinfekcji. Taki test jest niezbędny gdyż objawy jakimi charakteryzują się infekcje tymi wirusami są niemal identyczne, a konsekwencje znacząco różne zarówno dla ptaków jak i osób pracujących z nimi. Pierwszy

test został oparty o metodę duplex real-time PCR. Wykorzystałem dwie sondy hydrolizujące typu TaqMan które różniły się barwnikami fluorescencyjnymi emitującymi światło o różnej długości fali. Obecność wirusa grypy potwierdzana jest przy długości fali 530 nm, a wirusa rzekomego pomoru drobiu przy długości 560 nm. W wyniku optymalizacji metody uzyskałem czułość metody na poziomie 100 kopii, także w przypadku koinfekcji. Czas analizy z wykorzystaniem tej metody to zaledwie 3 godziny od dostarczenia próbki i dzięki wykrywaniu dwóch wirusów w jednym czasie skróciłem ją przynajmniej o połowę.

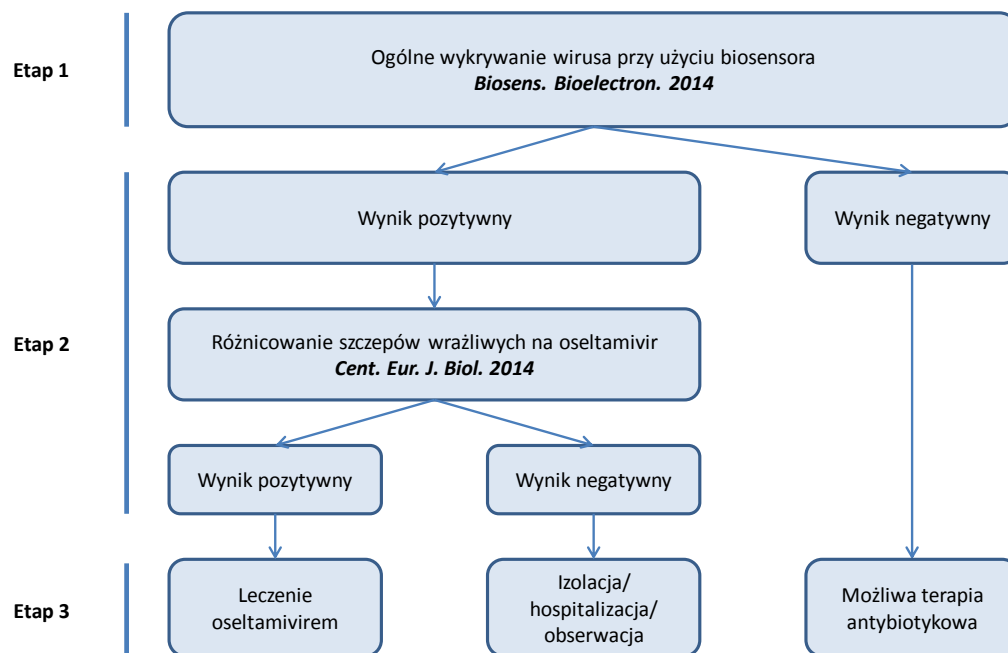
Metoda real-time PCR wymaga od laboratorium posiadania specjalistycznej aparatury, która mimo coraz niższej ceny, może stanowić poważny wydatek dla ośrodków weterynaryjnych. Z tego powodu zdecydowałem się opracować test wykorzystujący metodę jednoetapowej reakcji RT-PCR (One step RT-PCR). Opracowana metoda pozwala wykryć i zróżnicować dwa wirusy w czasie jednej reakcji wykorzystując jedynie specyficzne startery dla obu wirusów. Dzięki zastosowaniu reakcji jednoetapowej, znacząco został ograniczony czas reakcji oraz ryzyko kontaminacji. Opracowane startery pozwalają wykryć i zróżnicować oba wirusy poprzez uwidocznienie wyników reakcji RT-PCR w żelu agarozowym. Różnica wielkości produktów uzyskiwanych w wyniku powielania fragmentów genów wirusa grypy i NDV to aż 52 nukleotydy co znacząco ułatwia rozróżnienie prążków podczas odczytywania wyników. Oczywiście zastosowanie tej metody powoduje obniżenie czułości w porównaniu z metodą real-time PCR ale ilość kopii wirusów podczas infekcji jest na wystarczającym poziomie aby wykorzystując tę metodę wykryć zakażone zwierzęta, co zostało potwierdzone badaniami na zainfekowanym drobiu. Dowodzi to, iż metoda ta stanowi znacznie tańszą alternatywę dla laboratoriów diagnostycznych. Powyższe metody są także przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P- 391305.

W kolejnym etapie zaproponowałem nową metodę oznaczania patogenności wirusa ND z wykorzystaniem techniki real-time PCR, wykorzystując barwnik SYBR Green I. Metoda ta pozwala w krótkim czasie na oznaczenie szczepów wysoko i niskopatogennych co następnie pozwoli na podjęcie odpowiednich kroków sanitarnych i weterynaryjnych. W wyniku optymalizacji metody uzyskałem wartość graniczną dla szczepów niskopatogennych oraz dla średnio i wysokopatogennych. Uzyskanie wartości temperatury topnienia produktu reakcji PCR poniżej 83,8°C pozwala jednoznacznie stwierdzić, iż mamy do czynienia ze szczepem niskopatogennym nie zagrażającym stadu hodowlanemu. W przypadku uzyskania wartości powyżej 83,8°C możemy mieć do czynienia ze szczepami średnio lub

wyskopatogennymi co powinno skutkować podjęciem odpowiednich kroków sanitarnych, które należą już do 3 etapu.

Zaproponowane metody wykrywania i różnicowania wirusów grypy i ND uzupełnione o metody określania serotypów wirusa grypy (do celów statystycznych i epidemiologicznych) mogą stanowić kompletny system do szybkiego i jednoznacznego monitorowania wirusów (także w przypadku koinfekcji) oraz określania ich patogenności.

W przypadku diagnostyki zakażeń wirusem grypy u ludzi ponownie zaproponowałem trzyetapowy schemat postępowania, dzięki któremu znacząco skróci się czas oraz precyzja podejmowanych decyzji (Schemat 2).



Schemat 2 – System diagnostyki wirusa grypy u ludzi

Do realizacji pierwszego etapu postanowiłem opracować wspólnie z zespołem prof. Jerzego Radeckiego (Zakład Biosensorów, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie) nowy czujnik (immunosensor) do szybkiego, czułego i łatwego wykrywania wirusa grypy już podczas wizyty u lekarza pierwszego kontaktu. Czujnik ten będzie pozwalał w krótkim czasie wykryć wirusa grypy w wymazie z gardła pacjenta bez

konieczności izolacji materiału genetycznego czy zastosowania skomplikowanej aparatury. W wyniku realizacji projektu VENTURES opracowany został prototyp laboratoryjny takiego biosensora, którego czułość została oznaczona na poziomie ok 80-100 kopii wirusa na μ l, czyli porównywalnie z metodami molekularnymi (real-time PCR). Czujnik ten wymaga dalszych prac związanych z miniaturyzacją i dostosowaniem do działania w gabinecie lekarskim jednak uzyskane wyniki wskazały na możliwość opracowania takiego testu. Czujnik ten jest przedmiotem dwóch zgłoszeń patentowych: polskiego P-399993 oraz międzynarodowego PCT/PL2013/000092.

Drugim etapem diagnozy infekcji wirusowych jest określenie podatności szczepu wirusa na leczenie najbardziej skutecznym lekiem przeciwwirusowym – oseltamivirem. W tym celu opracowałem test oparty o metodę duplex real-time PCR z wykorzystaniem dwóch sond typu TaqMan. Zaproponowany test w jednej reakcji potwierdza obecności wirusa grypy w wymazie z gardła pacjenta i jednocześnie odpowiada na pytanie czy wirus nie posiada mutacji w genie neuraminidazy powodującej oporność na oseltamivir. Czas badania to zaledwie 1,5 godziny a czułość została oznaczona na 400 kopii wirusa. Po analizie wrażliwości/ oporności na lek, lekarz będzie miał pełną wiedzę na temat patogenu z którym ma do czynienia i będzie mógł podjąć świadomą decyzję co do dalszego postępowania (etap trzeci schematu). Również ta metoda jest przedmiotem zgłoszenia patentowego nr P-402673.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowałem 5 nowych metod diagnostycznych, które mogą formować dwa schematy postępowania w przypadku zakażeń wirusem grypy u ludzi oraz wirusami grypy i/lub ND u ptaków. Uzyskane wyniki pozwalają znacząco skrócić czas diagnozy badanych patogenów w porównaniu z wcześniej stosowanymi metodami.

Oczywiście dalsze prace nad wdrożeniem testów są niezbędne, jednak wydaje się, że wszystkie zaproponowane metody mogą być wykorzystywane komercyjnie w niedalekiej przyszłości. Najbardziej pracochłonne będzie zminiaturyzowanie czujnika do detekcji wirusa grypy, jednak jestem przekonany że jest to możliwe i wymaga jedynie odpowiednich środków finansowych.

Mam nadzieję, że moja praca, dzięki skróceniu i uproszczeniu procesu diagnostycznego, w przyszłości przyczyni się do poprawy bezpieczeństwa ludzi i jakości ich leczenia.
