

"Diagnostyka szczepów wirusa grypy przy użyciu nowych metod molekularnych."

Streszczenie

Szacuje się, że każdego roku, sezonowe epidemie wirusa grypy są przyczyną od 2 do 5 milionów zachorowań oraz od 250 000 do 500 000 przypadków śmiertelnych na całym świecie. Pojawienie się w roku 2009 nowego szczepu wirusa grypy typu A zapoczątkowało trwającą ponad dwa lata pandemię, która tylko w pierwszym roku była powodem ponad 60 milionów zachorowań w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki. Powyższe liczby świadczą o tym jak poważnym zagrożeniem dla zdrowia publicznego są nowo pojawiające się szczepy wirusa grypy typu A.

Brak odporności na takie szczepy w populacji ludzi spowodowany jest ciągłą zmiennością genetyczną wirusa, u podstaw której leżą zjawiska takie jak: reasortacja (wymiana segmentów genetycznych pomiędzy dwoma różnymi wirusami), skok antygenowy (zmiana segmentów genetycznych kodujących główne antygeny powierzchniowe wirusa) czy przesunięcie antygenowe (powolne gromadzenie się małych zmian w sekwencjach kodujących główne antygeny powierzchniowe wirusa).

Szczepienia profilaktyczne skierowane przeciwko krążącym obecnie wśród ludzi szczepom, wykazują dużą skuteczność, jednak z powodu zmienności antygenów powierzchniowych hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA), muszą być powtarzane co roku z użyciem nowej szczepionki, której skład określany jest na podstawie badań przesunięcia antygenowego. Ponadto, w przypadku pojawienia się zupełnie nowego szczepu wirusa, powstałego w wyniku reasortacji, sezonowa szczepionka najprawdopodobniej okaże się mało efektywna.

Potencjalnym źródłem nowych niebezpiecznych szczepów wirusa grypy typu A może być wymiana segmentów genetycznych w czasie koinfekcji jednego organizmu szczepami pochodzącymi od różnych gospodarzy, która może prowadzić do przełamania barier gatunkowych i adaptacji wirusa do nowego gospodarza. Wiele specjalistycznych publikacji, instrukcji oraz dyrektyw wydawanych od 2009 roku przez Światową Organizację Zdrowia, WHO (ang. *World Health Organization*), Organizację Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa, FAO (ang. *Food and Agriculture Organisation*) czy Światową Organizację Zdrowia Zwierząt, OIE (ang. *World Organisation*

for Animal Health), opisuje ważkość problemu mieszanych zakażeń pomiędzy ludźmi i zwierzętami. Wymienione organizacje zalecają różne procedury postępowania w celu minimalizacji mieszania się odmiennych szczepów wirusa i wyraźnie stwierdzają, że zaadaptowanie się ludzkich wirusów wśród populacji zwierząt hodowlanych stwarzać będzie potencjał do reasortacji z innymi wirusami pochodzenia świńskiego lub ptasiego i powstania nowego bardziej wirulentnego szczepu. Według koncepcji "One Health", stanowiącej obecnie podstawę współpracy pomiędzy Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom, CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*), WHO, FAO i OIE, zdrowie ludzi połączone jest ze zdrowiem zwierząt i środowiska. Należy kłaść duży nacisk na monitoring, diagnostykę i nadzór zakażeń wirusem grypy nie tylko wśród ludzi, ale i zwierząt hodowlanych pozostających w naszym najbliższym sąsiedztwie, a także wśród dzikiego ptactwa wodnego stanowiącego rezerwuar wszystkich typów wirusa. Pozwoli to dysponować danymi i oceniać potencjalne zagrożenie, które może spowodować pojawienie się niebezpiecznego ludzkiego i/lub zwierzęcego szczepu wirusa.

Podobnym problemem jest powstawanie *quasi*-wariantów wirusa, w wyniku błędnej inkorporacji zasad przez wirusową polimerazę RNA w procesie replikacji. Takie warianty utrzymują się wraz z wariantem dominującym w organizmie gospodarza. W przypadku kiedy zdolność do przeżycia *quasi*-wariantów jest podobna do wariantu dominującego, mogą one być obecne w populacji wirusa na niskim poziomie. Jednak gdy presja immunologiczna ze strony gospodarza lub presja środowiskowa spowodują, że taki *quasi*-wariant będzie lepiej przystosowany do przeżycia w zmienionych warunkach, może dojść do zmiany wariantu dominującego na rzecz wariantu lepiej przystosowanego. Rezultatem takich wydarzeń może być unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez nowy wariant wirusa (także odpowiedzi stymulowanej przez szczepienia ochronne) oraz nabycie odporności na obecnie stosowane leki antywirusowe.

Większość technik stosowanych w rutynowej diagnostyce zawodziła w wykrywaniu mieszanych infekcji i *quasi*-wariantów wirusa z uwagi na limit detekcji oraz wysoką specyficzność. Metody oparte na technikach łańcuchowej reakcji polimerazy poprzedzonej reakcją odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) oraz łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (Real Time PCR) projektowane w celu detekcji bardzo specyficznych sekwencji, nie potrafiły ujawnić obecności innego wariantu wirusa w tej samej próbce. Małe zmiany w genomie, powstałe w wyniku akumulacji pojedynczych mutacji, powodują, że sondy lub startery wykorzystywane w powyższych metodach nie

przyczepiają się do odpowiedniego rejonu DNA co powoduje błędne odczyty. Z kolei testy serologiczne i immunoenzymatyczne posiadają zbyt małą czułość by rozróżnić dwa warianty wirusa. Odpowiedzią na ten problem mogą być nowe metody sekwencjonowania i spektroskopii masowej, które obecnie używane są do określenia poziomu występowania zakażeń mieszanych i *quasi*-wariantów, jednak z powodu kosztów i czasochłonnej procedury przygotowawczej ich wykorzystanie w rutynowej diagnostyce stoi pod znakiem zapytania.

Użyteczną alternatywą dla wymienionych wyżej metod diagnostycznych może być zastosowanie opracowanej w trakcie mojego doktoratu metody, opierającej się na polimorfizmie konformacyjnym pojedynczych nici DNA w zmiennej temperaturze: MSSCP (ang. *Multitemperature Single Strand Conformational Polymorphism*), która dzięki wysokiej czułości i niskiemu poziomowi detekcji sprawdza się bardzo dobrze przy wykrywaniu mutacji, mieszanych infekcji oraz mniejszościowych wariantów wirusa.

Technika MSSCP jest rozwinięciem techniki Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) opisanej po raz pierwszy w *Orita i wsp. 1989*. W standardowej technice pojedyncze nici DNA rozdzielane są w żelu poliakrylamidowym. Podczas rozdziału tworzą różne trójwymiarowe struktury, osiągając różną mobilność w zależności od sekwencji, siły jonowej, pH i temperatury. W technice MSSCP rozdziel elektroforetyczny jest przeprowadzany w żelu poddawany ściśle kontrolowanym zmianom temperatury, przez co zwiększa się prawdopodobieństwo, że analizowany produkt PCR przyjmie różne konformacje w zależności od zmian sekwencji, co zapewnia wyższą czułość detekcji przy skróconym czasie analizy.

W załączonych publikacjach zaproponowałem zastosowanie metody opartej na powyższej technice do:

- detekcji i różnicowania zakażeń mieszanych szczepami sezonowymi i pandemicznym wirusa grypy typu A wśród ludzi
- badania zmienności genetycznej genu hemaglutyniny pandemicznego szczepu oraz jej potencjalnego wpływu na rejony odpowiedzialne za interakcję z przeciwciałami neutralizującymi
- analizy koinfekcji różnymi wariantami szczepu A/H1N1 wśród populacji świń

W pierwszej publikacji analizie MSSCP poddano próbki pobrane od 23 pacjentów wykazujących objawy grypopodobne z różnych szpitali na terenie Polski, u których wcześniej potwierdzono infekcję pandemicznym szczepem A(H1N1)pdm09 przy użyciu

techniki real time-RT-PCR. We wszystkich próbkach potwierdzono obecność szczepu A(H1N1)pdm09, a ponadto w 4 z 23 próbek analiza MSSCP wykazała koinfekcję sezonowym i pandemicznym wariantem szczepu A/H1N1. Bezpośrednie sekwencjonowanie analizowanego materiału genetycznego potwierdziło uzyskane wyniki. Opisana metoda pozwoliła nie tylko na specyficzne różnicowanie konkretnych szczepów wirusa grypy typu A, ale również na ich detekcję w jednej próbce z bardzo wysoką czułością wykrywania mniejszościowego wariantu wirusa.

Druga publikacja opisuje analizę MSSCP specyficznego rejonu genu hemaglutyniny, który zawiera sekwencję jednego z głównych epitopów dla przeciwciał neutralizujących, w izolatach pandemicznego szczepu A(H1N1)pdm09 pozyskanych od pacjentów z Tajwanu w latach 2009-2011. W izolatach uzyskanych w latach 2010 i 2011 pojawiły się zmiany w sekwencji nukleotydowej w porównaniu z referencyjnym szczepem pandemicznym z 2009 roku. Większość zmian nie skutkowała poważnymi modyfikacjami struktury białkowej. Trzy z nich zlokalizowane były w obrębie epitopu E, a jedna z nich (E66K) znajdowała się w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie przeciwciał neutralizujących, co mogłoby wpłynąć na efektywność szczepionki. Tym samym praca wskazuje na użyteczność opisywanej metody do analizy zmienności genetycznej specyficznych rejonów genomu wirusa grypy typu A i detekcji potencjalnych wariantów mogących uniknąć odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

W trzeciej publikacji analizie MSSCP poddano próbki pozyskane od świń wykazujących objawy grypy, z różnych farm na terenie Polski. We wszystkich próbkach stwierdzono wcześniej obecność świńskiego wirusa A/H1N1 o ptasim pochodzeniu. Przeprowadzona analiza MSSCP wykazała obecność kilku wariantów wirusa grypy typu A wśród badanych próbek, co pokazuje, że opisywana metoda może być używana do detekcji mieszanych zakażeń wirusem grypy typu A oraz do różnicowania specyficznych wariantów wirusa krążących wśród populacji świń.

Czwarta z załączonych publikacji, stanowi pracę przeglądową, która traktuje o przydatności metod opartych na technice MSSCP do genotypowania izolatów wirusa grypy typu A oraz jej konkretnych zastosowaniach. W pracy opisana została zarówno metoda będąca przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej, jak i inne wykorzystujące technikę MSSCP do analizy zmienności genetycznej wirusów.

Wszystkie przedstawione publikacje dowodzą przydatności opracowanej przeze mnie metody do różnicowania i detekcji specyficznych wariantów wirusa grypy typu A,

wykrywania koinfekcji różnymi wariantami wirusa grypy typu A w jednej próbce, a także analizy zmienności genetycznej specyficznych rejonów genomu wirusa grypy typu A.