

Agnieszka Figas

„Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów wirusa polio izolowanych z próbek materiału środowiskowego w Polsce”

Praca na stopień doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej wykonana w Zakładzie Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny.

Promotor:

Dr hab. n. med. Bogumiła Litwińska, prof. NIZP-PZH

STRESZCZENIE

Wirus polio (PV) jest małym wirusem należącym do rodziny *Picornaviridae*, którego materiał genetyczny stanowi pojedyncza nić RNA. Jest czynnikiem etiologicznym *poliomyelitis* zwanego również chorobą Heinego-Medina. Zakażenie wirusem polio następuje drogą pokarmową. Po wnikięciu wirus zakaża wrażliwe komórki tkanki limfatycznej w jamie ustnej, nosie i gardle. Okres inkubacji trwa od 2 do 35 dni. Dochodzi wówczas do przemijającej wirerii a wirus rozprzestrzenia się do układu siateczkowo-śródbłonkowego nie wywołując objawów klinicznych – jest to tzw. postać poronna. W bardzo rzadkich przypadkach, u około 1-2% zakażonych osób, dochodzi do rozwoju *poliomyelitis*. Wirus przenika do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) drogą krwionośną i replikuje się w obrębie rdzenia kręgowego, pnia mózgu lub kory mózgowej. Powoduje to destrukcję neuronów ruchowych prowadząc głównie do ostrych porażień wiotkich mięśni szkieletowych kończyn (ang. *accute flaccid paralysis*, ostre porażenie wiotkie, AFP).

Szczepienia ochronne są niewątpliwie najskuteczniejszym sposobem zapobiegania zachorowaniom wywołanym zakażeniem wirusem polio. W chwili obecnej stosowane są w Polsce dwa rodzaje szczepionek: OPV (ang. oral polio vaccine, doustna szczepionka

przeciwko polio) w skład której wchodzi żywe, atenuowane szczepy wirusa oraz IPV (ang. inactivated polio vaccine, inaktywowana szczepionka przeciwko polio) zawierająca inaktywowane cząstki poliovirusa typu 1, 2 i 3. Szczepionka OPV podawana doustnie imituje naturalne zakażenie oraz stymuluje w układzie pokarmowym miejscową syntezę przeciwciał IgA. Z tego powodu jest niezwykle skuteczna, ponieważ w przypadku nadkażenia dzikim szczepem wirusa polio osoby zaszczepionej, wirus ten neutralizowany jest w przewodzie pokarmowym. Zapobiega to zarówno rozwojowi choroby, jak i wydalaniu z kałem dzikiego wirusa polio do środowiska. Z drugiej strony w wyniku długotrwałej replikacji w jelicie człowieka atenuowane szczepy wirusa polio mogą ewoluować do szczepów VDPV (ang. vaccine-derived poliovirus, neurowirulentny szczep wirusa polio pochodzenia szczepionkowego), które nabierają fenotypowych cech dzikiego wirusa polio. Powrót do neurowirulencji często wiąże się z błędami powstającymi w procesie replikacji wirusa w jelicie człowieka, które zdarzają się z częstością 10^{-4} na 1 parę zasad w 1 cyklu replikacyjnym. Zdolność do wywoływania przez szczepy VDPV zespołu objawów podobnych do *poliomyelitis* tzw. przypadki VAPP (ang. vaccine associated paralytic poliomyelitis, VAPP) jest związana z mutacjami oraz zmianami rekombinacyjnymi dotyczącymi regionu 5'UTR oraz VP1. Szczepy VDPV charakteryzuje ponadto utrata termowrażliwego fenotypu ts (ang. temperature sensitive, temperaturowrażliwy). W wyniku stosowania w Polsce OPV istnieje możliwość pojawienia się szczepów VDPV w środowisku. Badania ścieków komunalnych pozwalają zarówno wykryć w nich obecność krążących szczepów VDPV, jak również ocenić stopień eliminacji ze środowiska dzikiego szczepu polio. Należy podkreślić, iż badania środowiska w kierunku obecności poliovirusów nie były dotychczas prowadzone w Polsce. Z tego względu głównym celem pracy była izolacja i identyfikacja szczepów wirusa polio obecnych w środowisku oraz fenotypowa i molekularna charakterystyka szczepów wirusa polio wyizolowanych z próbek ścieków komunalnych w celu określenia ich pochodzenia.

W niniejszej pracy wykorzystano protokół oparty na koncentracji próbek ścieków komunalnych z zastosowaniem zawiesiny SiO₂ (metoda strąceniowa) i izolacji wirusa polio w hodowlach komórkowych L20B, RD, Caco-2 oraz identyfikacji materiału genetycznego wirusa techniką RT-PCR. Przeprowadzono badania polegające na określeniu czułości metody izolacji wirusa polio w liniach komórkowych oraz czułości wykrywania RNA enterowirusów (w tym wirusa polio) techniką RT-PCR. Czułość wykrywalności wirusa polio w zastosowanych liniach komórkowych wynosiła ~200 cząstek wirusowych, natomiast czułość reakcji RT-PCR była

~400 razy wyższa. Otrzymane wyniki badań wykazały, że metodyka opracowywania ścieków komunalnych wykorzystująca zawiesinę SiO₂ oraz warunki amplifikacji wirusowego RNA zostały odpowiednio dobrane.

W 2011 roku dokonano selekcji miejsc pobierania próbek ścieków komunalnych w oparciu o liczebność populacji. Wytypowano 14 miejskich oczyszczalni ścieków znajdujących się w Polsce w województwach: mazowieckim (Mińsk Mazowiecki, Warka, Radom, Warszawa „Czajka”, Warszawa „Południe”); lubelskim (Chełm); łódzkim (Piotków Trybunalski); śląskim (Bielsko-Biała, Pilchowice); dolnośląskim (Jelenia Góra) i pomorskim (Gdynia Rumia). Zgromadzono łącznie 165 próbek ścieków komunalnych, z których w dalszym etapie izolowano RNA i identyfikowano materiał genetyczny enterowirusów (w tym wirusa polio). Dodatni wynik reakcji RT-PCR uzyskano dla 127 próbek, co stanowiło 76,97% wszystkich analizowanych prób, co pozwala stwierdzić iż ścieki komunalne stanowią bogate źródło enterowirusów. Najczęściej materiał genetyczny enterowirusów oznaczano w próbkach ścieków komunalnych pobranych w miesiącach letnich i jesiennych, ze szczytem przypadającym na miesiąc lipiec i październik, gdzie materiał genetyczny enterowirusów identyfikowano w 92,3%. Wskazuje to na sezonowy charakter zakażeń o etiologii enterowirusowej.

W celu wykrycia zakaźnych cząstek wirusowych w 165 próbkach ścieków komunalnych, wykonano izolację wirusa polio w hodowlach komórek L20B, RD oraz Caco-2. Metoda ta nadal stanowi złoty standard w identyfikacji wirusów w badanych próbkach materiału i jest rekomendowana przez Światową Organizację Zdrowia (WHO, ang. World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia). Dodatni wynik izolacji wirusów polio w hodowli komórek L20B, RD oraz Caco-2 uzyskano dla 31 próbek, co stanowiło 18,78%. W hodowli komórek Caco-2 wyizolowano 47% wszystkich szczepów PV, co jednocześnie potwierdza, iż zastosowanie tej linii znacząco zwiększa czułość izolacji poliowirusów. Uzyskano łącznie 36 szczepów wirusa polio, których identyfikację prowadzono z zastosowaniem surowic poliklonalnych dla trzech typów poliowirusów oraz ich pul (serotypowanie). Siedem szczepów należało do serotypu PV 1, dziesięć do serotypu PV 2, a najczęściej izolowanym serotypem wirusa PV był typ 3 - dziewiętnaście szczepów.

Charakterystyka izolatów wirusa polio jest niezwykle istotna ze względu na ryzyko rewersji atenuowanych szczepów wirusa polio do fenotypu dzikiego. Metoda serotypowania nie pozwala na określenie pochodzenia izolowanych szczepów wirusa polio. W celu

dokładniejszej charakterystyki uzyskanych szczepów przeprowadzono typowanie molekularne izolatów z zastosowaniem primerów swoistych dla każdego z trzech typów wirusa polio: Sabin typ 1, 2 i 3. Uzyskany wynik potwierdził serotypy oznaczone w teście neutralizacji oraz wykazał, że wszystkie izolaty wirusa polio były pochodzenia szczepionkowego.

Uważa się, że niektóre zmiany mutacyjne w regionie VP1 są związane z ponownym nabyciem cech neurowirulencji i zniesieniem termowrażliwego fenotypu ts atenuowanych szczepów PV Sabin. Osłabiona zdolność replikacji wirusa w temperaturze 40°C stanowi jedną z cech atenuacji wirusa polio. Określenie fenotypu ts pozwala więc na różnicowanie szczepów pochodzenia szczepionkowego od neurowirulentnych rewertantów. W tym celu dokonano charakterystyki 36 izolatów wirusa polio w oparciu o marker temperaturowy. Zaobserwowano spadek miana infekcyjnego TCID₅₀ ($\geq 2 \log_{10}$) dla większości izolatów wirusa polio namnażanych w temperaturze 40°C w stosunku do wartości otrzymanych w temperaturze 37°. Na podstawie uzyskanych wyników można zatem przypuszczać, iż analizowane szczepy są pochodzenia szczepionkowego.

Genom wirusa polio charakteryzuje wysoki wskaźnik ewolucyjny. Uważa się, że wirus polio jest jednym z najszybciej ewoluujących wśród enterowirusów. Mechanizmem leżącym u podłoża zmienności wirusa polio są zmiany rekombinacyjne i mutacyjne. W celu molekularnej charakterystyki 36 izolatów wirusa polio wykonano analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragments length polymorphism, RFLP). Technika RFLP jest jedną z metod służącą do różnicowania poprzez analizę wzorów pochodzących z pocięcia DNA. Analizę RFLP przeprowadzono dla regionów VP1 oraz 3D_{pol} pochodzących z genomu wirusa polio stosując cztery enzymy restrykcyjne: *Hae*III, *Dde*I, *Hpa*II i *Rsa*I. Pośród 36 analizowanych szczepów tylko jeden izolat (szczep nr 25) miał odmienny profil RFLP-VP1 niż odpowiadający mu kontrolny szczep PV Sabin typ 3, co może wynikać z obecności mutacji punktowej w sekwencji DNA i wprowadzenia dodatkowego miejsca cięcia rozpoznawanego przez enzym restrykcyjny *Hae*III. Analiza RFLP-3D_{pol} ujawniła natomiast obecność rekombinantów w zakresie analizowanego regionu kodującego polimerazę wirusa polio 3D_{pol}. Szczep nr 2 należący do serotypu 1 miał identyczny profil restrykcyjny, co szczep kontrolny PV Sabin 2, co może wskazywać na rekombinację pomiędzy serotypem 1 i 2 wirusa polio (S1/S2). Wzór restrykcyjny otrzymany dla szczepów nr 19, 20, 22, 24, 25, 32, 33, 34, 36 należących do serotypu 3 był identyczny z otrzymanym dla szczepu kontrolnego PV Sabin 2. Otrzymane wyniki wskazują na rekombinację pomiędzy serotypem 3 i 2 wirusa polio (S3/S2).

Wzór restrykcyjny otrzymany dla szczepu nr 28 był identyczny ze szczepem PV Sabin 1, sugerując iż izolat ten jest najprawdopodobniej rekombinantem S3/S1.

W celu dalszej charakterystyki molekularnej 36 szczepów wirusa polio, izolowanych z próbek ścieków komunalnych w Polsce, przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu ich genomu w regionach 5'UTR, VP1 oraz 3D_{pol}. Klasyfikacja izolatów wirusa polio według Światowej Organizacji Zdrowia opiera się głównie na analizie sekwencji regionu VP1. Należy podkreślić iż mutacje dotyczące regionu VP1 mogą prowadzić do zniesienia cech atenuacji i rewersji do neurowirulentnego fenotypu wirusa polio. Według rekomendowanych przez WHO kryteriów klasyfikacji liczba zmian mutacyjnych dla szczepów Sabin powinna wynosić ≤ 9 (1%) dla serotypu 1, ≤ 5 (0,6%) dla serotypu 2 oraz ≤ 9 (1%) dla serotypu 3 wirusa polio (CDC, 2012). Wszystkie izolaty wykazywały wysoki stopień homologii bliski 100% z referencyjnymi szczepami kontrolnymi PV Sabin 1, 2, 3 w zakresie sekwencji nukleotydowych z regionów 5'UTR oraz VP1. Ilość obserwowanych różnic nukleotydów w regionie VP1 wynosiła odpowiednio od 0 do 4 dla serotypu 1, od 0 do 3 dla serotypu 2 oraz od 0 do 4 dla serotypu 3. Liczba zmian w sekwencji regionu VP1 uzyskanych izolatów wirusa polio wskazuje, że przewidywany czas replikacji wirusa był krótki. Uwzględniając wskaźnik ewolucyjny równy 3,3% na rok dla substytucji w obrębie trójek kodujących region VP1, szacowany czas replikacji izolatów wirusa polio był krótszy niż 12 miesięcy. Analiza sekwencji fragmentu DNA z regionu 3D_{pol} ujawniła obecność 10 rekombinantów wśród 36 izolatów wirusa polio. Genom dziewięciu szczepów stanowiły fragmenty DNA pochodzące z dwóch typów PV Sabin (7 szczepów - S3/S2, 1 szczep S2/S1, 1 szczep S3/S1), podczas gdy jeden szczep zawierał fragmenty genomu wszystkich trzech typów PV Sabin (S3/S2/S1). Analiza otrzymanych sekwencji nukleotydowych pozwoliła na określenie miejsca rekombinacji dla 3 szczepów. W przypadku szczepów nr 15 oraz 32 miejsce rekombinacji (S2/S1) zlokalizowane było odpowiednio pomiędzy 6708 i 6715 oraz 6364 i 6371 nukleotydem (liczone względem szczepu PV Sabin 2). Miejsce rekombinacji (S2/S3) szczepu nr 22 zlokalizowane było pomiędzy 6736 i 6741 nukleotydem (liczone względem szczepu PV Sabin 2).

Zastosowanie metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych oraz sekwencjonowania ujawniło pewne różnice w otrzymanych wynikach. Technika RFLP z powodzeniem jest stosowana do poszukiwania zmian rekombinacyjnych w analizowanym fragmencie genomu wirusa polio. Posiada jednak pewne ograniczenia. Pojawienie się spontanicznej mutacji punktowej (niezwiązanej ze zjawiskiem rekombinacji) w sekwencji

nukleotydowej rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny może skutkować wprowadzeniem dodatkowego miejsca cięcia. Sytuacja taka miała najprawdopodobniej miejsce w przypadku szczepu nr 2, którego profil RFLP 3D_{pol} określono jako S1/S2. Analiza wyników sekwencjonowania dla tego szczepu wskazuje jednak, iż szczep ten nie jest rekombinantem. Ponadto zastosowanie techniki RFLP nie pozwoliło na ujawnienie rekombinantów: S3/S2/S3 (szczep nr 22), S3/S2/S1 (szczep nr 32), S2/S1 (szczep nr 15) w analizowanym genie polimerazy 3D_{pol}. Miejsce rekombinacji znajdowało się bowiem poza fragmentem poddawany analizie restrykcyjnej.

Otrzymane wyniki wykazały, że w Polsce w ściekach komunalnych identyfikowane są atenuowane szczepy Sabin wirusa polio, co niewątpliwie jest wynikiem stosowania OPV. Wszystkie analizowane izolaty wirusa polio były pochodzenia szczepionkowego. Przeprowadzone analizy wykazały, że żaden z uzyskanych izolatów nie krążył w populacji przez długi okres czasu. Nie stwierdzono obecności szczepu dzikiego oraz szczepów VDPV wirusa polio w ściekach komunalnych. Uzyskane wyniki wskazują, iż monitoring środowiska w istotny sposób uzupełnia nadzór nad krążeniem wirusa polio w populacji.