

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

Genotypowa i fenotypowa charakterystyka izolatów klinicznych i środowiskowych wirusów Coxsackie B krążących w Polsce w latach 1999-2019

Doktorant: mgr inż. Beata Gad

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Wieczorek

Wirusy Coxsackie B (CVB) należą do rodziny *Picornaviridae*, są jednymi z najczęściej wykrywanych enterowirusów na świecie. Wywołują szeroki wachlarz chorób, od łagodnych nieżytów żołądkowo-jelitowych, aż po ciężkie w przebiegu zapalenie mięśnia sercowego, płuc, wątroby, trzustki, mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych, ostre porażenia wiotkie czy sepsę noworodkową. Dodatkowo CVB uważa się za czynnik etiologiczny chorób przewlekłych tj. kardiomiopatii, cukrzycy typu 1 lub zespołu chronicznego zmęczenia. Możliwość wywoływania wielu chorób tłumaczy się pantropizmem CVB, czyli zdolnością do zakażenia wielu tkanek i narządów człowieka. Jednak w większości przypadków CVB odpowiadają za zachorowania bezobjawowe lub skąpo-objawowe, co wiąże się z ich cichym krążeniem w populacji. Powszechność występowania, namnażanie się w jelitach człowieka oraz wyjątkowa oporność na czynniki zewnętrzne sprawiają, że CVB często wykrywane są w próbkach środowiskowych.

Wirusy Coxsackie B charakteryzują się dużą zmiennością genetyczną i potencjalną zdolnością do tworzenia nowych wariantów genetycznych na drodze mutacji punktowych lub rekombinacji. Głównym antygenem stymulującym odpowiedź swoistych przeciwciał neutralizujących CVB jest białko kapsydowe VP1, dlatego mutacje w jego sekwencji mogą być preferencyjnie utrwalane, gdyż wiążą się z ucieczką przed układem immunologicznym gospodarza. Obok mutacji punktowych w ewolucji wirusa dużą rolę odgrywają rekombinacje. Najczęściej zachodzą pomiędzy typami tego samego gatunku i są związane z optymalnym dostosowaniem wirusa do środowiska replikacji.

Wirusy Coxsackie B są często wykrywane w Polsce, ale brak jest danych opisujących ich zróżnicowanie genetyczne oraz typy krążące w populacji. Zmienność CVB i ich potencjalna zdolność do tworzenia nowych wariantów genetycznych może mieć istotny wpływ na pojawianie się nowych ognisk zachorowań, diagnostykę oraz rozwijanie metod kontroli tych patogenów.

Celem pracy była charakterystyka izolatów klinicznych i środowiskowych wirusów Coxsackie B krążących w Polsce w latach 1999-2019.

Materiał do badań stanowiło 270 izolatów wirusów Coxsackie B z kolekcji Zakładu Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego PZH – PIB krążących w Polsce w latach 1999-2019,

w tym 140 klinicznych i 130 środowiskowych. Założone cele realizowano stosując metody molekularne i klasycznej wirusologii.

W charakterystyce molekularnej CVB szczególny nacisk położono na analizę pełnej sekwencji nukleotydowej genu 1D oraz aminokwasowej białka powierzchniowego VP1, która obejmowała: identyfikację typów krążących w Polsce; zbadanie stopnia zmienności genu 1D w poszczególnych typach i w zidentyfikowanych genogrupach oraz analizę pełnej sekwencji aminokwasowej białka VP1 w poszczególnych typach i genogrupach, w tym identyfikację grupowo-specyficznymi mutacji. W ramach pracy zbadano także stopień zmienności fragmentu genu 3D kodującego wirusową polimerazę wraz z identyfikacją rekombinantów wśród polskich izolatów CVB. Przeprowadzone w pracy badania regionu 1D oraz 3D obejmowały także analizę filogenetyczną z oceną ewolucyjnej zależności pomiędzy polskimi izolatami i wcześniej zidentyfikowanymi szczepami ze światowej bazy genów (GenBank). W części badań dotyczących charakterystyki fenotypowej określono *in vitro* różnice w tropizmie komórkowym i replikacji w wybranych hodowlach komórkowych (A549, HT-29, Huh 7.5, PANC-1, SHSY5Y) wyselekcjonowanych izolatów CVB3 i CVB5 na podstawie ich pochodzenia oraz zidentyfikowanych mutacji i rekombinacji.

Uzyskano następujące wyniki, na podstawie których sformułowano wnioski:

1. W puli badanych wirusów zidentyfikowano pięć z sześciu opisanych typów CVB (CVB1, CVB2, CVB3, CVB4 i CVB5). Wskazuje to na endemiczne krążenie CVB 1-5 w populacji polskiej w latach 1999-2019. Wykrycie stałego krążenia wirusów charakteryzujących się tropizmem do komórek trzustki, powinno zwrócić uwagę na potrzebę badań w kierunku diabetogennych CVB, szczególnie biorąc pod uwagę dane związane z rosnącą zapadalnością na cukrzycę typu 1 w Polsce.
2. Najczęściej oznaczanym typem CVB w Polsce, w latach 1999-2019, był CVB5. Analiza filogenetyczna uzyskanych sekwencji tego typu wskazała na epidemiczny charakter zachorowań wywoływanych przez CVB5 w Polsce w okresie ujętym badaniem. Sygnalizuje to także możliwość wystąpienia w przyszłości dużych ognisk zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych o etiologii CVB5.
3. Wśród oznaczonych typów CVB krążących w Polsce w latach 1999-2019, wykazano występowanie wielu genogrup oraz oznaczono dużą zmienność w regionie 1D kodującym białko powierzchniowe kapsydu VP1 (do 23%). Pojawianie się nowych wariantów genetycznych w puli wirusów krążących w populacji polskiej wiązało się ze wzrostem zmienności. Wskazuje to na potrzebę stałego monitoringu nowych wariantów genetycznych, zawleczonych lub wyłaniających się z lokalnie krążących wirusów.

4. Oznaczono większą zmienność genetyczną w regionie kodującym białko powierzchniowe kapsydu izolatów środowiskowych CVB (typów 2-5) niż klinicznych oraz zidentyfikowano genogrupy reprezentowane wyłącznie przez izolaty środowiskowe. Wskazuje to na użyteczność badań środowiskowych, pozwalających na identyfikację wariantów krążących w populacji, ale nie powodujących ciężkich zachorowań. Prowadzenie nadzoru klinicznego w połączeniu z nadzorem środowiskowym może pozwolić na uzyskanie pełniejszego obrazu epidemiologii zakażeń wywoływanych przez CVB.
5. Wśród CVB krążących w Polsce w latach 1999-2019, oznaczono dużą zmienność w regionie 3D kodującym wirusową polimerazę, wynoszącą ponad 23%. Dodatkowa analiza filogenetyczna oraz analizy porównawcze udowodniły występowanie częstych rekombinacji w historii ewolucji zidentyfikowanych typów. Zmienność genetyczna CVB i ich potencjalna zdolność do tworzenia nowych wariantów genetycznych na drodze mutacji punktowych bądź rekombinacji powinna być brana pod uwagę przy konstrukcji nowych testów diagnostycznych i metod kontroli tych patogenów.
6. Większość zaobserwowanych mutacji w regionie 1D analizowanych izolatów miało charakter synonimiczny, czyli nie wiązało się ze zmianą aminokwasu w kodowanym białku i miało miejsce w C i N końcowych regionach białka VP1 oraz pętlach pomiędzy harmonijkami β . Największy odsetek mutacji niesynonimicznych zaobserwowano w typie CVB5 i CVB3. Wskazuje to na zdominowanie ewolucji CVB przez synonimiczne mutacje i kształtowanie jej przez selekcję oczyszczającą.
7. Wykazano możliwość namnażania się wybranych izolatów we wszystkich użytych w pracy liniach komórkowych pochodzących z komórek nowotworowych różnych układów i narządów człowieka, co potwierdziło pantropizm izolatów CVB3 i CVB5. Właściwość ta może być wykorzystana w terapii nowotworów z zastosowaniem wirusów onkolitycznych stworzonych na modelu CVB.
8. Oznaczono różnice w replikacji wybranych izolatów CVB3 i CVB5 *in vitro* w użytych w pracy hodowlach komórkowych. Wykazane różnice mogą wskazywać na wpływ pewnych mutacji i/lub rekombinacji na wirulencję i tropizm badanych wirusów, ale dokładna identyfikacja czynników wirulencji wymaga dalszych badań.