

Streszczenie pracy doktorskiej

mgr Ewelina Hallmann

„Molekularne determinanty lekooporności szczepów wirusa grypy wywołujących zakażenia u ludzi w różnych sezonach epidemicznych w Polsce”

Promotor: dr hab. Aleksander Masny
Promotor pomocniczy: dr hab. Iwona Paradowska-Stankiewicz, Prof. NIZP PZH-PIB
Pracę wykonano w: Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego PZH – Państwowy Instytut Badawczy

Wprowadzenie

Lekooporność stanowi poważny problem współczesnej medycyny. Coraz więcej patogenów może namnażać się nawet po zastosowaniu odpowiednich leków, które powinny powodować ich niszczenie lub zahamowanie replikacji.

Światowa Organizacja Zdrowia informuje, że co roku do 650 000 ludzi umiera z powodu chorób układu oddechowego związanych z grypą sezonową. Najskuteczniejszą metodą walki z wirusem jest cosezonowe szczepienie. Natomiast jeśli już dojdzie do zakażenia powinny być stosowane leki przeciwwirusowe możliwie jak najszybciej. Zsyntetyzowana w latach 60. amantadyna i w latach 80. jej metylowa pochodna – rimantadyna z uwagi na wzrastającą w ich kierunku lekooporność wirusa grypy, zostały zastąpione przez leki nowej generacji – inhibitory neuraminidazy.

Cel pracy

W Polsce nie było do tej pory prowadzonych badań lekooporności wirusów grypy. W związku z czym celem pracy było badanie lekooporności szczepów wirusa grypy krążących w Polsce przez określenie występowania mutacji w genie neuraminidazy (NA).

Materialy i metody

Do badań zostały wykorzystane próbki kliniczne zebrane w ramach globalnego nadzoru wirusologiczno-epidemiologicznego nad grypą w Polsce – Global Surveillance and Response System (GISRS), a także ze szpitali, z następujących województw: podlaskie, kujawsko-pomorskie, lubelskie, łódzkie, małopolskie, mazowieckie, opolskie, podkarpackie, pomorskie, śląskie, warmińsko-mazurskie, wielkopolskie, zachodnio-pomorskie. W większości przypadków próbki stanowiły wymazy z nosa i gardła, ale także BALF (bronchoalveolar lavage fluid — płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego) pobrane od pacjentów z klinicznymi objawami choroby grypopodobnej (ILI), zdefiniowanymi jako osoby z nagłym początkiem choroby, z gorączką $>38^{\circ}\text{C}$

i kaszlem lub bólem gardła. Przebadano próby od pacjentów w wieku od 1 r.ż. do 89 r.ż. Analizie poddano łącznie 258 materiałów klinicznych.

Badania laboratoryjne składały się z pięciu etapów:

1. Izolacja materiału genetycznego wirusa.
2. Reakcja real-time RT-PCR w celu określenia typu/subtypu wirusa grypy.
3. Reakcja RT-PCR w celu wykrycia mutacji w genie neuraminidazy.
4. Elektroforeza i izolacja produktów PCR z żelu.
5. Sekwencjonowanie metodą Sanger.

Wykorzystane w badaniu metody biologii molekularnej, pozwoliły na porównanie szczepów wirusa grypy krążących w Polsce ze szczepami w świecie.

Wyniki

Wykazano, że szczepy wirusa grypy różnią się wykrytymi mutacjami w poszczególnych sezonach epidemicznych. Wirus grypy typu A, zgodnie z przyjętą hipotezą, jest bardziej zmienny genetycznie, niż wirus grypy typu B ($p < 0,001$, test Kruskala-Wallisa). Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie oporności między subtypami A/H1N1/pdm09 (4,8%) oraz A/H3N2/ (6,1%), nie wykryto istotnych różnic. Natomiast w przypadku genów niosących lekooporność, większe ich zróżnicowanie potwierdzono w wirusie grypy typu B ($p < 0,001$, test chi-kwadrat). Ponadto próbki kliniczne pochodzące od pacjentów z północy kraju, włączając tutaj województwa: zachodniopomorskie, pomorskie, kujawsko-pomorskie, warmińsko-mazurskie, podlaskie, lubuskie, wielkopolskie i mazowieckie, różnią się w sposób istotny ($p = 0,008$, test Manna-Whitneya) pod względem liczby wykrytych mutacji od próbek, pochodzących od pacjentów z południa kraju (województwa: dolnośląskie, opolskie, śląskie, podkarpackie, lubelskie, małopolskie, świętokrzyskie, łódzkie). Porównując mutacje występujące w próbkach pochodzących od pacjentów do 14 r.ż z próbkami osób po 14 r.ż do 89 r.ż wykazano brak istotnych różnic. Potwierdzono występowanie mutacji H275Y w subtypie A/H1N1/pdm09 oraz N294S oraz R292K w subtypie A/H3N2/, odpowiadające za oporność na oseltamiwir.

Wnioski

Potwierdzono występowanie w Polsce lekoopornych szczepów wirusa grypy. Mutacje odpowiadające za lekooporność wykryto w 33,16% przebadanych materiałów klinicznych.

Warto przeprowadzić dalsze analizy, stosując do porównania metodę chemiluminescencji, a także uwzględnić czynnik szczepień przeciwko grypie.