

Wpływ zmienności na międzygatunkową transmisję zakażeń wirusem grypy

IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ANDRZEJ KOWALCZYK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.

Influence of evolution on interspecies transmission of the influenza virus

Summary

The main purpose of the paper was to review information about the most important mechanisms of influenza virus evolution and their consequences for immunoprophylaxis and the elaboration of diagnostic tests.

The influenza virus is the pathogen that indicates tropism on the epithelial cells of respiratory tract, responsible for frequent seasonal epidemics, caused by the rapid evolution of the viral genome. There are two main mechanisms of evolution: antigenic shift and genetic or antigenic drift. Hemagglutinin, the protein of the virus envelope, is the main place of these variations.

The study concerning receptor binding site structure and the specificity of human and animal influenza viruses have brought information about the mechanisms of interspecies spread of infections. It was confirmed that human influenza A viruses do not spread in birds while the species barrier between human and pigs is relatively low. Therefore pigs might functions as “mixing vessels” for the creation of new pandemic reassortants.

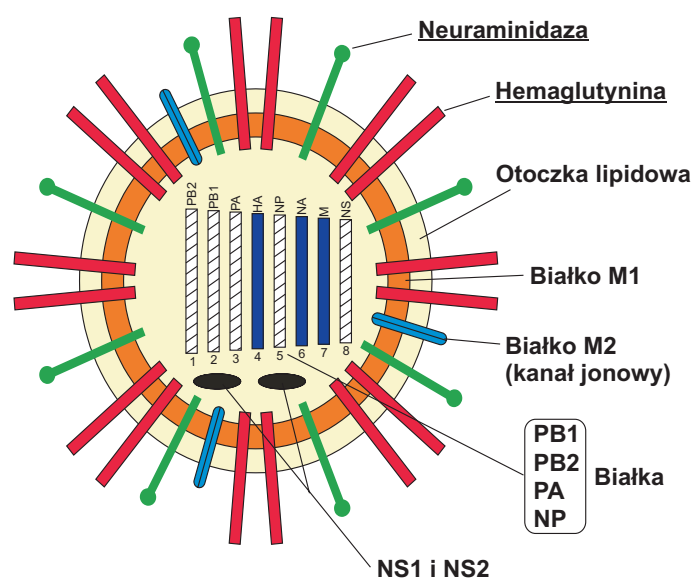
The variability of the influenza virus is very complex process. Antigenic drift and shift still cause the origin of immunologically distinct strains of influenza viruses. The rapid antigenic drift of new forming viruses explain why there is a need for regular monitoring of that process. Antigenic and genetic characteristics of currently circulating strains of influenza virus could be beneficial in evaluating new diagnostic methods as well as for vaccine composition, which have to be updated annually.

Keywords: influenza virus, interspecies infections

Budowa wirusa

Wirus grypy należy do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus* (IV) (8). Jego materiałem genetycznym jest jednoniciowy, negatywnie spolaryzowany RNA, podzielony na 8 segmentów kodujących polipeptydy strukturalne i niestrukturalne (10). Nukleokapsyd, stanowiący rdzeń wirusa, składa się z RNA połączonego z nukleoproteiną i 3 białkami polimerazy: PB1, PB2 oraz PA, inicjującymi replikację i odpowiedzialnymi za transkrypcję RNA. Wirus posiada otoczkę złożoną od wewnątrz z białka matrycowego M1, które jest głównym białkiem strukturalnym, od zewnątrz zaś znajduje się warstwa lipidowa oraz wypustki białkowe (ryc. 1). Opierając się na antygenowej odmienności nukleoprotein oraz białka M wyodrębniono trzy typy wirusa grypy: A, B i C. W etiologii choroby największe praktyczne znaczenie mają szczepy należące do typu A. Wywołują one zakażenia notowane zarówno u ludzi, jak i u zwierząt hodowlanych – świń, koni, a także ssaków wodnych oraz ptaków. Niekiedy mają one ciężki przebieg, z towarzyszącą im znaczną śmiertelnością. Infekcje te zaliczane są do zoonoz.

Typ A wirusa grypy został dalej podzielony na podtypy, na podstawie budowy białek powierzchniowych otoczki: hemaglutyniny (H), występującej w 16 odmianach,



Ryc. 1. Schemat organizacji genomu wirusa grypy

nach, oraz neuraminidazy (N), występującej w 9 odmianach. Hemaglutynina jest głównym antygenem powierzchniowym, miejscem istotnych determinant antygenowych. Jej zmienność jest najważniejszym czynnikiem umożliwiającym wirusowi efektywne unikanie neu-

tralizacji przez komórki odpornościowe organizmu, co utrudnia skuteczne kontrolowanie epidemii grypy drogą szczepień ochronnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w przyrodzie odnotowano występowanie niemal wszystkich możliwych kombinacji podtypów H i N, szczególnie w populacji ptactwa wodnego, które stanowi głównie rezerwuuar wirusa grypy.

Właściwości wirusa

Wirus grypy jest wyjątkowo „plastyczny”, tzn. z jednej strony ma bardzo dużą zdolność adaptacji do różnych gospodarzy, z drugiej zaś zdolność „unikania” ich układu odpornościowego (6). Pozwala to na zakażenie wielu różnych gospodarzy, niezależnie od szerokości geograficznej i pory roku. Szczepy typu A, zwłaszcza izolowane od ludzi, cechują się znaczną zmiennością antygenową. W sposób nierozzerwalny związana jest ona z segmentową budową RNA. Zmienność wirusa grypy jest jego najbardziej charakterystyczną cechą, wyróżniającą go spośród wszystkich znanych wirusów, a pojawianie się nowych odmian antygenowych jest przyczyną niepowodzeń w walce z tą groźną chorobą.

Szyft antygenowy

Istnieją dwa główne mechanizmy, za pomocą których wirus grypy potrafi ewoluować. Pierwszy z nich, określany szyftem genetycznym (antigenic shift) lub skokiem antygenowym, występuje na różnych szerokościach geograficznych. Polega on na reasortacji genów między różnymi szczepami w czasie infekcji mieszanych. Podczas zakażenia komórki przynajmniej dwoma różnymi typami wirusa, 16 segmentów wirusowych może „przetasaować się” między sobą, co w konsekwencji może dać 256 wirusów potomnych, z których każdy determinuje odmienne cechy biologiczne. Warto dodać, że wymiana segmentów genomu możliwa jest pomiędzy szczepami pochodzącymi od różnych gatunków. Reasortację antygenową stwierdzano pomiędzy wirusami ludzkimi, świńskimi oraz ptasimi. Nowo powstałe warianty wirusa, izolowane od pierwotnych gospodarzy, zwykle różniły się budową antygenową (32). Jeżeli reasortacja dotyczy segmentów kodujących antygeny H lub N, powstałe szczepy wykazują znaczną patogenność, ponieważ napotyka ją wrażliwą, nie uodpornioną populację. Istniejące przeciwciała nie są zdolne do neutralizacji wirusa, gdyż nie rozpoznają receptorów specyficznych dla nowego podtypu. Reasortanty mogą być przyczyną epidemii lub pandemii lub też przez kilka lat mogą ukrywać się w rezerwuuarze zwierzęcym. Dowodem tego były pandemie w latach 1957 i 1968 (18). Badania serologiczne wskazują, że od 1889 r. wystąpiło 6 skoków antygenowych (6). Infekcje zwierząt zmodyfikowanymi genetycznie typami wirusa grypy stanowią znaczący element w ewolucji ludzkiej odmiany wirusa (33).

Proces reasortacji genów wiąże się ściśle z przełamaniami bariery gatunkowej, głównie ptaki-świnie-człowiek, przy czym zaznaczyć należy, że świnie stanowią ogniwo pośrednie w międzygatunkowej transmisji zakażeń (29). Dotychczasowe pandemie grypy brały początek w Południowej Azji, z uwagi na fakt, że na tym

obszarze świnie żyją w bliskim sąsiedztwie zarówno z człowiekiem, jak z ptactwem wodnym (6).

Przykładem opisanych zjawisk mogą być epidemie grypy świń o ciężkim przebiegu, rejestrowane we Włoszech w latach 80. oraz w Wielkiej Brytanii w latach 1990-1992, spowodowane transmisją wirusa od ptactwa do świń (4). Nowo utworzony wariant wirusa określony został jako podtyp H1N2, z uwagi na fakt, że powstał on w wyniku wymiany genu H z ptasiego szczepu wirusa o wzorze antygenowym H1N1 („avian like”) oraz genu kodującego neuraminidazę z ludzkiego szczepu o wzorze antygenowym H3N2 („human-like”) (7). Szczegółowe analizy serologiczne statusu zdrowotnego stad świń w Anglii, prowadzone po 1993 roku, ujawniły związek kolejnych wybuchów grypy świń ze szczepem podtypu H1N2 (4). Stwierdzono wówczas serologiczną zbieżność wspomnianych infekcji z zakażeniami powodowanymi podtypem izolowanym we wcześniejszym okresie, w fermach nie utrzymujących żadnych kontaktów między sobą. Sugerowało to ustabilizowanie się nowych reasortantów w tym kraju i ich niezależne, szerokie rozprzestrzenienie. Pochodzenie tego wirusa przypisywano również ludzkiemu wariantowi H1N1 (krążącemu wśród ludzi w 1980 roku) oraz szczepowi „human-like” o wzorze antygenowym H3N2 izolowanemu od świń. W takim układzie świnie pozostawałyby niewątpliwym rezerwuarem szczepu, który mógłby zainfekować wrażliwą część ludzkiej populacji w Anglii i poza jej obszarem (5). Szczep H1N2 rozprzestrzenił się w kolejnych latach w pozostałych krajach europejskich. W badaniach z 1999 roku Van Reeth i wsp. (25) odnotowali wysoki poziom serokonwersji wobec szczepu H1N2, serologicznie zbliżonego do krążącego w 1994 r. w Szkocji. Szczep ten różnił się istotnie od innego typu reasortanta H1N2, krążącego w Japonii w 1978 roku i we Francji na przełomie lat 1987/1988. W badaniu filogenetycznym wykazywał on odległe pokrewieństwo w obrębie genu kodującego H, do klasycznych odmian – świńskiej i ptasiej podtypu H1N1.

Proces reasortacji materiału genetycznego wirusa grypy może być bardziej złożony. W badaniach nad izolatem H3N2 w USA stwierdzono, że jest on potrójnym reasortantem, zawierającym komponenty wirusa typu ludzkiego (H, N oraz PB1), świńskiego (M, NP, oraz NS), a także ptasiego (PA i PB2) (37). Na podstawie analizy sekwencji białka H3 izolatów terenowych wirusa stwierdzono dodatkowe rozbieżności i ustalono ich przynależność do dwóch, z co najmniej trzech, różniących się od siebie filogenetycznych klasterek białka H, występujących w USA. Wszystkie izolaty należące do określonych w ten sposób odmian H3 wykazywały zdolność do indukowania klinicznych objawów grypy, jednakże objawy chorobowe obserwowane u zainfekowanych świń różniły się w zależności od danej grupy antygenowej (27).

W nawiązaniu do powyższych informacji warto wspomnieć o szczepach wirusa grypy typu A izolowanych podczas wybuchów choroby u świń w Irlandii w latach 1991-1998. Lin i wsp. (17) przeprowadzili porównawcze badanie filogenetyczne tych wirusów ze szczepami krążącymi równolegle na świecie. Analiza sekwencji nukleo-

tydowych H i N podtypu H1N1 pokazała dużą ich zbieżność z izolatami azjatyckimi pochodzenia ptasiego: A/swine/HongKong/168/93 (H1N1 – podobieństwo 91%) oraz A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1 podobieństwo – 90%). Mniejsze podobieństwo filogenetyczne stwierdzono ze szczepami izolowanymi wówczas od świń w Europie. Również w tym przypadku stwierdzono wprowadzenie szczepu H1N1 ptasiego pochodzenia do populacji świń. Przekroczenie bariery gatunkowej było konsekwencją substytucji aminokwasowej, a mianowicie leucyna w pozycji 226 łańcucha hemaglutyniny uległa wymianie na glutaminę, zaś kwas glutaminowy (typowy dla ptasiej odmiany wirusa) zamieniony został w pozycji 190 na kwas asparaginowy (występujący w odmianie ludzkiej i świńskiej). Izolowane w Irlandii w tym samym okresie wirusy H3N2 wykazały ściślejsze korelacje nukleotydowe genu H ze szczepami izolowanymi w Wielkiej Brytanii niż ze szczepami pochodzącymi z Europy kontynentalnej, m.in. z Belgii z 1992 roku (25). Gen kodujący neuraminidazę drugą również okazał się filogenetycznie odległy od szczepów europejskich i podobnie jak hemaglutynina ewoluował niezależnie. Analiza porównawcza genów kodujących białka wewnętrznej części genomu wirusa, jak np. genu białka M izolatów pochodzących z 1993 roku, wykazała bliskie ich pokrewieństwo ze szczepami izolowanymi od ludzi, co zostało potwierdzone w dalszych badaniach, mających na celu ustalenie pochodzenia tych szczepów. Z kolei wykazano, że izolaty omawianego wirusa z roku 1998 zawierały sześć genów bliżej spokrewnionych z podtypem H1N1, co wskazywałoby na reasortację pomiędzy wirusami H3N2 a H1N1, współkrążącymi w populacji świń w Irlandii po 1993 roku.

Guan i wsp. (12) opublikowali dane na temat podobieństwa genetycznego europejskiego szczepu (A/Netherlands/5/93) wirusa grypy świń ze szczepami pochodzącymi z Chin, izolowanymi od tego gatunku na początku lat dziewięćdziesiątych. Takie pokrewieństwo, oprócz Irlandii, stwierdzono również w Holandii, Włoszech i Belgii. Wiąże się je z wprowadzeniem wirusa wraz eksportem świń z Europy do południowej części Chin w latach 90. (25). Na podkreślenie zasługuje fakt zakażenia ludzi tymi szczepami, zarówno w Holandii, jak i w Chinach, co stanowi kolejny dowód na międzygatunkową transmisję szczepów pochodzenia świńskiego do populacji ludzkiej (11).

Selekcja wysokopatogennych szczepów wirusów grypy ma miejsce również poza naturalnymi warunkami bytowania. Dla przykładu, wirus grypy typu A został wyizolowany od martwych fok w 1979 roku i wskazywał na wysokie pokrewieństwo z reasortantem ptasim (29). Kolejny przykład to izolacja wirusa grypy od chorych wielbłądów podczas kilku epizoozji tej choroby w Mongolii, obserwowanych od 1979 roku. Na przełomie lat 1978/1979 inaktywowane szczepy ludzkie A/PR/8/34 oraz A/USSR/90/77 zostały wykorzystane do przygotowania szczepionki rozpowszechnianej w Mongolii (1). Należy tu dodać, że jej zastosowanie powodowało lekkie stany chorobowe u dzieci. Wirusy szczepionkowe dostały się do populacji wielbłądów, nabierając

cech wysoce zjadliwych. Tak powstały mutant utrzymywał się w Mongolii do 1996 roku (1).

Dryft antygenowy

Drugi mechanizm zmienności wirusa grypy polega na powolnej ewolucji, mającej charakter stopniowo utrwalających się mutacji punktowych w segmentach RNA kodujących antygeny powierzchniowe, określonej jako przesunięcie lub dryft genetyczny (antigenic drift). Zmiany te mają charakter ciągły. Powoduje to powstawanie wariantów, z których każdy kolejny tylko nieznacznie różni się od poprzedniego, jednak na tyle, że staje się niewrażliwy na indukowane przez niego przeciwciała. Zmiany tego typu są mniej groźne, w porównaniu do szyfłu antygenowego, gdyż zwykle zachowana jest częściowa kompetencja immunologiczna organizmu. Podobnie jak wszystkie RNA-wirusy, także wirus grypy charakteryzuje się wysokim wskaźnikiem mutacji, który osiąga stopień 10^{-5} podstawień na jedno miejsce podczas jednego cyklu replikacji (22). Zjawisko to występuje w przypadku wszystkich 3 typów wirusów. Pod presją selekcji w postaci przeciwciał monoklonalnych lub naturalnej odpowiedzi immunologicznej wirusy z nową cechą ewoluują gwałtownie. Antygenowa ucieczka nowych mutantów związana jest najbardziej z zamianą aminokwasów w łańcuchu białkowym epitopu hemaglutyniny. Innym miejscem powstawania wariantów na drodze dryftu genetycznego wirusa grypy jest dobrze poznany gen kodujący nukleoproteinę (NP), białko wiążące i stabilizujące RNA wirusa, uznawane za główny czynnik determinujący specyficzność gatunkową (30). Analiza filogenetyczna na podstawie sekwencji nukleotydowej NP szczepów wirusa grypy pochodzących z różnych lat i zakątków świata, przedstawia drzewo powiązań, na którym zaznaczają się dwie główne gałęzie (29). Jedna o rodowodzie ptasim, druga stworzona na podstawie izolatów od ludzi, świń oraz koni. Wraz z izolatami ptasimi i ludzkimi rozrzucone są niektóre izolaty świńskie, co wskazuje na stosunkowo dużą łatwość przełamania bariery gatunkowej przez wirusa grypy i zdolność infekowania różnych gatunków. Gałęzie pokrewieństwa na poziomie informacji genetycznej wykazują dużą heterogenność wszystkich porównywanych grup zwierząt. Na poziomie fenotypowym, czyli budowy łańcucha aminokwasowego, tylko wśród wirusów izolowanych od ptactwa występuje bliskie pokrewieństwo, zobrazowane niewielkim rozrzutem linii filogenetycznych oraz ich niezależną drogą ewolucyjną. Wskazuje to, że większość mutacji nukleotydowych u tej grupy zwierząt jest „cicha” oraz że presja selekcyjna nie utrwaliła nowych zmian w ptasich odmianach wirusa.

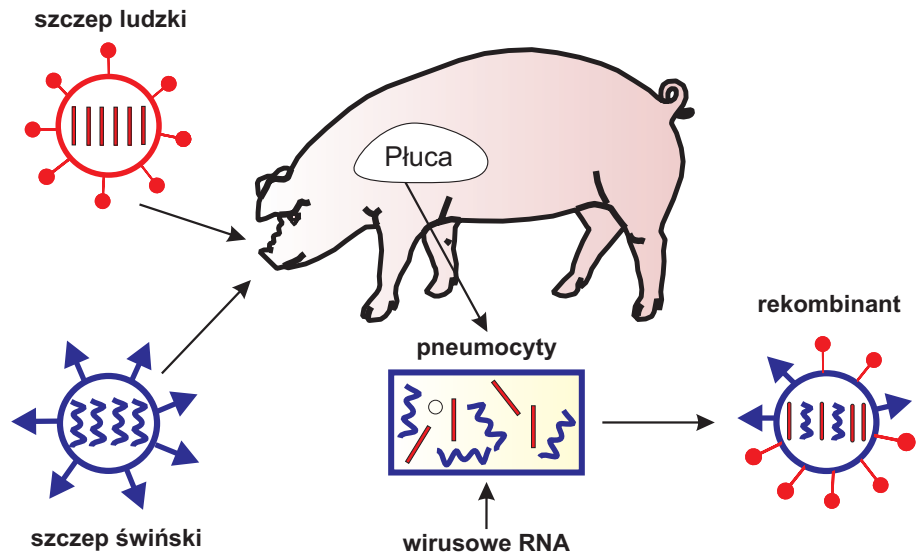
Stopień pokrewieństwa poszczególnych linii filogenetycznych związany ze zmiennością definiowany jest w znacznym stopniu przez selekcyjną presję środowiska, co kojarzone jest z drogą zakażenia (29). U ptactwa jest nią przewód pokarmowy (39). Wirus ptasi potrzebuje wydzielanej przez trzustkę trypsyny do aktywacji hemaglutyniny, dlatego też nie rozprzestrzenia się do krwi, czego konsekwencją jest słaba odpowiedź humoralna, która z pewnością nie jest czynnikiem utrwalają-

cym zmienność (28). Znajduje to potwierdzenie także w zmianach ewolucyjnych obrazujących relacje między szczepami ludzkimi i świńskimi. Zestawienia aminokwasowe NP świadczą o znacznym zróżnicowaniu w tych grupach. Presję selekcyjną u tych gatunków wiąże się z występowaniem odpowiedzi immunologicznej na wysokim poziomie (29).

Antygenowa zmienność wirusa grypy, wynikająca ze zmiany aminokwasów w łańcuchu białkowym epitopu H, wpływa w bezpośredni sposób na możliwość łączenia się z receptorami określonych gospodarzy. Miejsce rozpoznania H przez receptor gospodarza zdefiniowane jest przez kwas sialowy (sialic acid – SA) (8). Ptasi oraz koński wirus influenzy wykazuje powinowactwo do sialooligosacharydów połączonych wiązaniem 2,3 α między kwasem *N*-acetylneuraminowym (NA) a galaktozą (NA2,3 α Gal), podczas gdy ludzki jego podtyp łączy się z receptorami zakończonymi kwasem NA2,6 α Gal (34). Wirusy grypy wykazują również odrębność w rozpoznawaniu receptorów zakończonych różnymi podstawnikami, m.in. NeuAc oraz NeuGc. Bydłę, świńskie oraz końska tkanka eksponują na powierzchni obydwa typy kwasów: NeuAc oraz NeuGc, podczas gdy u ludzi spotykamy w wąskim zakresie postać NeuGc (mniej niż 0,1% całkowitego SA). U świń, ze względu na ekspresję na powierzchni nabłonka typu receptora NA2,3 α Gal oraz NA2,6 α Gal, spotykamy się z możliwością międzygatunkowego zakażenia różnymi typami wirusa. Z tego właśnie powodu świnia uważana jest za gospodarza będącego „naczyniem mieszającym” (mixing vessel) odpowiedzialnym za proces reasortacji genów wirusa (3) (ryc. 2).

Do niedawna uważano, że wirus grypy nie jest w stanie przekroczyć bariery gatunkowej pomiędzy człowiekiem i ptactwem. Niestety, infekcje ludzi związane z ptasią odmianą wirusa H5N1 i H9N2 w południowej Azji, pojawiające się od 1997 r., oraz wydarzenia w Europie z 2003 roku, gdzie wśród ludzi odnotowano zakażenia ptasią odmianą wirusa H7N7, jak również wcześniejsze przypadki subkliniczne, jednoznacznie demonstrują możliwość bezpośredniej transmisji wirusa od ptaków do ludzi (38). Niemniej jednak zwykle ptasi wirus grypy replikuje w typowy sposób u ssaków naczelnych w niewielkim stopniu, a wirus odmiany ludzkiej nie namnaża się wydajnie u ptaków (35).

Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowej hemaglutynin, w części odpowiadającej za wiązanie się z receptorem (receptor binding side – RBS), zwróciła uwagę na sześć wysoce konserwatywnych aminokwasów wśród ptasiej odmiany wirusa grypy (138A, 190E, 194L, 225G, 226Q i 228G), lecz wykazujących podstawienie w odmianie ludzkiej (20). Sugeruje to, że tego rodzaju mutacje w opisanych pozycjach były wynikiem adaptacji ptasiego podtypu do ludzkiego gospodarza.



Ryc. 2. Schemat powstawania reasortantów wirusa grypy w organizmie świnia

Obydwa hemaglutyniny ludzkie H2 i H3 posiadają te same zmiany: 226Q \rightarrow L oraz 228G \rightarrow S, zgodnie z pierwotnie istniejącym zapisem w sekwencji ptasiego wariantu. Pojedyncza mutacja 226L \rightarrow O w podtypie H3 zmienia specyficzność wiązania H z preferencją dla receptora nabłonkowego, zakończonego kwasem Neu α 2,6-Gal, zaś mutacja w miejscu 228 łańcucha umożliwia wiązanie się białka H do erytrocytów ludzkich. Znane są jednakże pewne odstępstwa w mutageniezie hemaglutyniny. Niektóre szczepy o wzorze antygenowym H2N2 izolowane od ludzi na początku pandemii w 1957 roku zawierały w swojej strukturze 228G, podobnie jak większość ptasich wirusów, natomiast nieliczne ptasie wirusy posiadały „ludzki” wariant H3 228S. Szczep wirusa grypy ludzkiej z roku 1960 roku, pomimo obecności mutacji 226L/228S wykazywał zdolność wiązania się według schematu wirusów ptasich. Trzy podstawienia w regionie RBS (137R \rightarrow Q, 158G \rightarrow E oraz 186N \rightarrow I), które wyodrębniają ten szczep spośród typowych wirusów ludzkich, uważane są za przyczynę odmienności w schemacie wiązania. Trudno jest zdefiniować determinanty określające powinowactwo białka powierzchniowego H wirusa grypy określonego pochodzenia do tkanki danego gospodarza ze względu na mnogość mutacji w genomie wirusa zaistniałych od czasu jego transmisji z populacji ptaków. Można jednak przypuszczać, że zdolność rozpoznawania receptora zakończonego Neu α 2,6-Gal jest cechą nabytą niedługo po wejściu wirusa ptasiego do populacji ludzi i świń (19).

W dalszych analizach mutacji 226Q \rightarrow L oraz 228G \rightarrow S porównywano wpływ pojedynczej zmiany oraz obydwu podstawień na funkcje białka H. Okazało się, że pojedyncza mutacja 228G \rightarrow S, a więc mutagenieza od postaci „ptasiej” wirusa grypy do postaci „ludzkiej” w szczepie ludzkim Undorn/72 nie powoduje zwiększenia siły asocjacji dla receptora Neu α 2,6-Gal, lecz redukuje o połowę powinowactwo dla jego postaci Neu α 2,3-Gal. Dla kontrastu, podstawienie 226Q \rightarrow L, występujące obok 228G \rightarrow S podnosi powinowactwo dla receptora zakończonego Neu α 2,6-Gal sześciokrotnie, a zmniejsza ośmio-

krotnie siłę asocjacji dla receptora typu Neu α 2,3-Gal. Badania te dowodzą zależności między mutacją w miejscu 226 a dryftem międzygatunkowym oraz wpływu podstawienia glicyny w miejscu 288, na granicę rozpoznawania dwóch różnych wariantów receptorów błonowych (20). Warto przy tym zaznaczyć, że nie wszystkie mutacje wpływają istotnie na siłę wiązania się wirusa ze swoim receptorem, dla przykładu: mutacje 228G \rightarrow R oraz 227S \rightarrow P nie powodują zmian w zakresie wiązania z receptorem Neu α 2,3-Gal.

Konsekwencje zmienności wirusów grypy w immunoprofilaktyce

Efektywność szczepień przeciwko grypie może zostać znacząco obniżona w wyniku rozdźwięku antygenowego między szczepami wytypowanymi do produkcji szczepionki, a szczepami aktualnie krążącymi w populacji. Dla przykładu, w Niemczech tylko niewielka liczba wszystkich szczepów H3N2 izolowanych w roku 1995 była antygenowo podobna do komponentów szczepionki użytej w sezonie 1996/1997, większość z nich była zbliżona do innego wariantu szczepu referencyjnego A/Sydney/5/97, uznanego za efekt dryftu genetycznego (31). Rok później, w okresie 1998/1999 odnotowano ciężkie przypadki chorobowe i zejścia śmiertelne ludzi związane z wybuchem epidemii, spowodowanej wysoce zjadliwym szczepem H3N2. Potwierdza to tezę o zależności między zmianami antygenowymi a pojawieniem się nowych szczepów odpowiedzialnych za kilkukrotne wybuchy epidemii – niekoniecznie podczas pierwszego pojawienia się reasortanta w otoczeniu. Zostało to również stwierdzone podczas wybuchów epidemii grypy w sezonie 1993/1994 w Finlandii (23) oraz w Anglii (9).

W badaniach filogenetycznych polegających na analizie sekwencji aminokwasów białka H wirusów pochodzących od europejskich świń stwierdzono relatywnie małą homologię, kształtującą się na poziomie 70,4-71,9%, pomiędzy podtypem H1N2 a podtypem H1N1 szczepu szczepionkowego, zastosowanego w profilaktyce choroby (26). W badaniach szczegółowych wyodrębniono około 40 mutacji. Wyjaśniałoby to niski poziom przeciwciał dla podtypu H1N2 u świń po poprzedniej immunizacji szczepem H1N1. Jednakże nie zawsze duża różnica genetyczna jest jednoznaczna z brakiem krzyżowej reakcji immunologicznej bądź krzyżowej odporności. Dla przykładu, Van Reeth i wsp. (24) wykorzystyła dwa szczepy podtypu H1N1 – New Jersey oraz sw/Belgium/1/98, pomiędzy którymi występowało 28 różnic aminokwasowych w pięciu miejscach antygenowych hemaglutyniny. Stwierdziła indukcję odpowiedzi immunologicznej na wysokim poziomie przeciwko szczepowi sw/Belgium/1/98 u świń uodpornianych szczepem New Jersey. Niestety, analizy genetyczne wirusa grypy są rzadko przeprowadzane kompleksowo, w połączeniu z badaniem odporności poszczepiennej i wciąż istnieje brak wystarczających danych dotyczących wpływu dryftu genetycznego na skuteczność szczepionek przeciwgrypowych.

W przeciwieństwie do glikoprotein powierzchniowych domena białkowa M2, będąca integralną częścią otoczki i jednocześnie kanałem jonowym, zachowuje wyższą konserwatywność (21). W badaniach nad immunogennością wykorzystano jako szczepionkę rekombinant DNA wykazujący ekspresję dwóch białek: M2 wirusa grypy i białka korowego wirusa żółtaczkowego typu B, oraz dodatkowo dokonano fuzji między białkiem M2 a nukleoproteiną wirusa grypy (M2eNP), celem stymulacji komórek Th oraz Tc (13). Wszystkie szczepionki doświadczalne indukowały odpowiedź humoralną przeciwko antygenom M2 i M2eNP oraz indukowały specyficzną dla wirusa grypy proliferację limfocytów. Jednakże opracowane biopreparaty nie posiadały wartości ochronnej, bowiem po zakażeniu doświadczalnym immunizowanych zwierząt szczepem H1N1 uodpornione świny wykazywały gwałtowniejsze objawy chorobowe niż zwierzęta z grupy kontrolnej, a 50% stawki padła po dwóch dniach po zakażeniu. Kolejne próby modyfikacji szczepionek przeciwko grypie polegały m.in. na zastosowaniu innych wektorów, opartych o mało konserwatywne białko H, wprowadzanych z adjuwantem, który stanowiła interleukina 6 (15). W tym przypadku zwierzęta immunizowane DNA kodującym hemaglutyninę pierwszą i do zakażenia kontrolnego wykorzystano również szczep podtypu H1N1. Poziom przeciwciał anty H1 był wyższy po immunizacji, zaś okres siewstwa wirusa u świń immunizowanych był o jeden dzień krótszy niż u zwierząt kontrolnych. Jednakże nie zaobserwowano istotnego wpływu dodatku interleukiny 6 na poziom odporności.

Konsekwencje zmienności wirusa grypy w diagnostyce molekularnej

Jak już wspomniano, genom IV stanowi nić RNA podzielona na osiem segmentów, z których każdy koduje syntezę białek strukturalnych wirusa. Segmenty zakończone są regionami nie podlegającymi translacji (UTRs – untranslated regions) na końcach 5' i 3' (36). Odpowiadają one za regulację ekspresji materiału genetycznego wirusa. Wśród nich wymienić należy przede wszystkim: miejsce promotorowe, sygnał poliadenylacji dla terminacji transkrypcji, miejsce wiązania polimerazy oraz miejsce odpowiedzialne za upakowanie wirusowego RNA w cząsteczce nukleoproteiny. Długość tych odcinków została określona na 12-13 nukleotydów w końcu 3' oraz 15-16 w końcu 5'. Po uformowaniu struktury II-rzędowej tworzą one z całej nici RNA segment o kształcie korkociągu. Struktura taka jest uznawana za sygnał rozpoczynający reakcje enzymatyczne (2). Formowanie tego układu możliwe jest dzięki sekwencjom komplementarnym znajdującym się wewnątrz odcinka UTRs. Ze względu na swoją stałą funkcję inicjatora ekspresji informacji genetycznej wirusa sekwencje te są uznawane za wysoce konserwatywne (14). Oprócz tego w zakończeniach nici RNA wokół otwartych ramek odczytu końca 5' i 3' znajdują się sekwencje wysoce zmienne, ułożone pomiędzy strukturą II-rzędową „korkociągu” a stop kodonem końca 3' oraz między ciągiem urydynowym a stop kodonem na końcu 5' (16). Znajdo-

mość sekwencji konserwatywnych i zmiennych ułatwia opracowywanie testów diagnostycznych. Konserwatywne miejsca genomu wykorzystywane są najczęściej jako matryca przy projektowaniu starterów do reakcji PCR, głównie do amplifikacji materiału genetycznego w celu dalszego wykorzystania go do określenia sekwencji nukleotydów w genomie. Takie postępowanie stosuje się w analizie genomowej szczepów słabo zdefiniowanych. Uniwersalne startery mogą natomiast być pomocne w generowaniu sekwencji unikalnych, zdeterminowanych tylko dla określonego szczepu lub podtypu. Dla przykładu, Hoffman i wsp. (14) amplifikowali genom wirusa grypy typu A izolowany od różnych gatunków przy użyciu starterów opracowanych dla wszystkich segmentów RNA. Sekwencje starterów różniły się tylko dwoma lub trzema pozycjami w końcu 3' i okazały się specyficznym narzędziem diagnostycznym.

Podsumowanie

Zmienność wirusa grypy jest niezwykle złożonym procesem. Jej konsekwencją jest często obserwowany brak jednoznaczności uzyskiwanych wyników badań. Antygenowy dryft i szyft wciąż powodują powstawanie immunologicznie odległych szczepów wirusa grypy. Ujawnienie się nowych wariantów wirusa grypy, formujących się razem z ucieczką antygenową, uzasadnia potrzebę stałego kontrolowania tego procesu. Analiza mutacji zachodzących w genomie wirusa rozszerza wiedzę na temat mechanizmów ewoluowania omawianego drobnoustroju. Z tego powodu antygenowa oraz genomowa charakterystyka aktualnie krążących szczepów wirusa grypy jest niezbędna zarówno do opracowywania nowych metod diagnostycznych jak i przy wyborze szczepów do aktualizowanych szczepionek, przygotowywanych na dany sezon epidemiologiczny.

Piśmiennictwo

1. *Anchlan D., Ludwig S., Nymadawa P., Mendsaikhan J., Scholtissek C.*: Previous H1N1 influenza A viruses circulating in the Mongolian population. *Arch. Virol.* 1996, 141, 1553-1569.
2. *Azzeh M., Flick R., Hobom G.*: Functional analysis of the influenza A virus cRNA promoter and construction of an ambisense transcription system. *Virology* 2001, 289, 400-410.
3. *Brown I. H.*: The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 2000, 74, 29-46.
4. *Brown I. H., Chakraverty P., Harris P. A., Alexander D. J.*: Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet. Rec.* 1995, 36, 328-329.
5. *Brown I. H., Harris P. A., Alexander D. J.*: Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-1992. *Epidemiol. Infect.* 1995, 114, 511-520.
6. *Brydak L. B.*: Grypa i jej profilaktyka, Springer PWN, Warszawa 1998.
7. *Castrucci M. R., Donatelli I., Sidoli L., Barigazzi G., Kawaoka Y., Webster R. G.*: Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 1993, 193, 503-506.
8. *Easterday B. C., Van Reeth K.*: Swine influenza, [w:] *Disease of swine*. Straw B. E., D'Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. (wyd.). The Iowa State University Press, USA 1999, 277-290.
9. *Ellis J. S., Chakraverty P., Clewley J. P.*: Genetic and antigenic variation in the haemagglutinin of recently circulating human influenza A (H3N2) viruses in the United Kingdom. *Arch. Virol.* 1995, 140, 1889-1904.
10. *Fujii K., Fujii Y., Noda T., Muramoto Y., Watanabe T., Takada A., Goto H., Horimoto T., Kawaoka Y.*: Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *J. Virol.* 2005, 79, 3766-3774.
11. *Gregory V., Lim W., Cameron K., Bennett M., Marozin S., Klimov A., Hall H., Cox N., Hay A., Lin Y. P.*: Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 1397-1406.
12. *Guan Y., Shortridge K. F., Krauss S., Li P. H., Kawaoka Y., Webster R. G.*: Emergence of avian H1N1 influenza viruses in pigs in China. *J. Virol.* 1996, 70, 8041-8046.
13. *Heinen P. P., Rijsewijk F. A., de Boer-Luijze E. A., Bianchi A. T.*: Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 2002, 83, 1851-1859.
14. *Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R. G., Perez D. R.*: Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 2001, 146, 2275-2289.
15. *Larsen D. L., Olsen C. W.*: Effects of DNA dose, route of vaccination, and co-administration of porcine interleukin-6 DNA on results of DNA vaccination against influenza virus infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 2002, 63, 653-659.
16. *Leahy M. B., Dobbyn H. C., Brownlee G. G.*: Hairpin loop structure in the 3' arm of the influenza A virus virion RNA promoter is required for endonuclease activity. *J. Virol.* 2001, 75, 7042-7049.
17. *Lin Y. P., Bennett M., Greorgey V., Grambas S., Ragazzoli V., Lenihan P., Hay A.*: Emergence of distinct avian-like influenza A H1N1 viruses in pigs in Ireland and their reassortment with cocirculating H3N2 viruses. *Intern. Congr. Series* 2004, 1263, 209-213.
18. *Lipatov A. S., Govorkova E. A., Webby R. J., Ozaki H., Peiris M., Guan Y., Poon L., Webster R. G.*: Influenza: emergence and control. *J. Virol.* 2004, 78, 8951-8959.
19. *Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T., Roberts N. A., Klenk H. D.*: Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 4620-4624.
20. *Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M. R., Donatelli I., Kawaoka Y.*: Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J. Virol.* 2000, 74, 8502-8512.
21. *Olsen C. W.*: DNA vaccination against influenza viruses: a review with emphasis on equine and swine influenza. *J. Virol.* 2005, 79, 3766-3774.
22. *Parvin J. D., Moscona A., Pan W. T., Leider J. M., Palese P.*: Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J. Virol.* 1986, 59, 3377-3383.
23. *Pyhala R., Ikonen N., Haanpaa M., Kinnunen L.*: HA1 domain of influenza A (H3N2) viruses in Finland in 1989-1995: evolution, egg-adaptation and relationship to vaccine strains. *Arch. Virol.* 1996, 141, 1033-1046.
24. *Van Reeth K., Brown I. H., Essen S., Pensaert M.*: Genetic relationships, serological cross-reaction and cross-protection between H1N2 and other influenza A virus subtypes endemic in European pigs. *Virus Res.* 2004, 103, 115-124.
25. *Van Reeth K., Brown I. H., Pensaert M.*: Isolations of H1N2 influenza A virus from pigs in Belgium. *Vet. Rec.* 2000, 146, 588-589.
26. *Van Reeth K., Labarque G., De Clercq S., Pensaert M.*: Efficacy of vaccination of pigs with different H1N1 swine influenza viruses using a recent challenge strain and different parameters of protection. *Vaccine* 2001, 19, 4479-4486.
27. *Richt J. A., Lager K. M., Janke B. H., Woods R. D., Webster R. G., Webby R. J.*: Pathogenic and antigenic properties of phylogenetically distinct reassortant H3N2 swine influenza viruses cocirculating in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 3198-3205.
28. *Scholtissek C.*: Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine* 1985, 3, 215-218.
29. *Scholtissek C.*: Molecular evolution of influenza viruses. *Virus Genes* 1995, 11, 209-215.
30. *Scholtissek C., Burger H., Kistner O., Shortridge K. F.*: The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology* 1985, 147, 287-294.
31. *Schweiger B.*: Nationale und globale Influenzasurveillance als Basis der jährlichen Impfstoffempfehlung. *Bundesgesundheitsblatt*. 2001, 44, 1153-1161.
32. *Schweiger B., Zadow I., Heckler R.*: Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 2002, 191, 133-138.
33. *Shortridge K. F., Stuart-Harris C. H.*: An influenza epicentre? *Lancet* 1982, 2, 812-813.
34. *Suzuki Y., Ito T., Suzuki T., Holland R. E. Jr, Chambers T. M., Kiso M., Ishida H., Kawaoka Y.*: Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* 2000, 74, 11825-11831.
35. *Suzuki Y.*: Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28, 399-408.
36. *Szymkowiak C., Kwan W. S., Su Q., Toner T. J., Shaw A. R., Youil R.*: Rapid method for the characterization of 3' and 5' UTRs of influenza viruses. *J. Virol. Methods*. 2003, 107, 15-20.
37. *Webby R. J., Swenson S. L., Krauss S. L., Gerrish P. J., Goyal S. M., Webster R. G.*: Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.* 2000, 74, 8243-8251.
38. *Webster R. G., Hulse D. J.*: Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev. Sci. Tech.* 2004, 23, 453-465.
39. *Webster R. G., Yakhno M., Hinshaw V. S., Bean W. J., Murti K. G.*: Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 1978, 84, 268-278.