

Malgorzata Sadkowska

ZASTOSOWANIE BIOLOGII MOLEKULARNEJ W EPIDEMIOLOGII NA PRZYKŁADZIE WŚCIEKLIZNY

Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. *W. Magdzik*

Na podstawie piśmiennictwa przedstawiono metody biologii molekularnej stosowane w badaniach epidemiologicznych oraz nowe elementy wiedzy na temat wścieklizny uzyskane dzięki użyciu tych metod.

I. WPROWADZENIE

Epidemiologia molekularna nie tworzy nowej gałęzi epidemiologii, dlatego też zdarza się, że termin ten w niektórych publikacjach opatrzony jest cudzysłowem. Pojęcie epidemiologii molekularnej należy rozumieć jako zastosowanie w badaniach epidemiologicznych technik laboratoryjnych nowej generacji umożliwiających poznanie procesów na poziomie molekularnym. Nie zmienia to kształtu i celu tej dyscypliny lecz pogłębia znajomość mechanizmów badanego procesu epidemiologicznego np. ściślejsze porównanie badanych grup, możliwość określenia indywidualnych funkcji narażenia itp.

Podobnie jak epidemiologia klasyczna, również epidemiologia molekularna posługuje się markerami biologicznymi, które badając zjawisko na poziomie molekularnym, dostarczają epidemiologom o wiele głębszej informacji o etiologii choroby, zmienności patogenu, procesie patogenezy, ryzyku narażenia osobniczego i grupowego na dany patogen – co w sumie ułatwia zwalczanie i zapobieganie chorobie. Rycina 1 ilustruje różnicę pomiędzy pojęciem epidemiologii klasycznej i molekularnej. Informacje zawarte w „czarnej skrzynce” zostają rozszyfrowane dzięki zastosowaniu technik biologii molekularnej (10).

INFORMACJA GENETYCZNA

Wszystkie informacje o budowie, właściwościach i potencjalnych możliwościach organizmu zawarte są w genomie. Nośnikiem tej informacji są kwasy nukleinowe. W większości przypadków jest to kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA), składający się z dwóch nici tworzących podwójną spiralę, a u niektórych wirusów informacja zapisana jest w kwasie rybonukleinowym (RNA) lub jednoniciowym DNA. Szkielet cząsteczki kwasu stanowi cukier (dezoksyryboza w przypadku DNA i ryboza, gdy

EPIDEMIOLOGIA KLASYCZNA

NARAŻENIE →  → CHOROBA



EPIDEMIOLOGIA MOLEKULARNA



Ryc. 1. Schemat przedstawia następstwa zdarzeń, występujące pomiędzy narażeniem a zachorowaniem, które możemy prześledzić dzięki epidemiologii molekularnej.

mamy do czynienia z RNA) połączony z fosforanem. Częsteczką cukru powiązana jest z jedną z czterech zasad: tyminą (T) (w przypadku RNA z uracyłem (U)), cytozyną (C), adeniną (A) lub guaniną (G). Nici kwasów nukleinowych są zawsze komplementarne – A zawsze łączy się z T tworząc dwa wiązania wodorowe, zaś C łączy się z G trzema wiązaniami wodorowymi. Najmniejszą jednostką, na poziomie której może być odczytywana informacja jest nukleotyd. Z 3 nukleotydów składa się kodon oznaczający jeden aminokwas, który jest najmniejszą cząstką polipeptydu. Gen jest funkcjonalną jednostką, która opisuje białko. Chromosom zawiera kilka tysięcy genów i jest najmniejszą jednostką replikacyjną (4).

II. PODSTAWOWE TECHNIKI BIOLOGII MOLEKULARNEJ (4)

Izolacja kwasu RNA. Do prowadzenia badań umożliwiających poznanie procesów na poziomie informacji genetycznej niezbędne jest otrzymanie kwasu nukleinowego danego organizmu w dużej ilości i o dużym stopniu czystości. W porównaniu z DNA, izolacja kwasu RNA jest utrudniona z powodu jego małej stabilności, spowodowanej powszechnym występowaniem RNaz – czyli enzymów trawiących cząsteczkę kwasu RNA, a tym samym prowadzących do jej degradacji. Dlatego też niezbędne jest wyeliminowanie tych enzymów z miejsca, sprzętu i roztworów używanych do izolacji RNA. W celu oczyszczenia kwasu z białek najczęściej przeprowadza się ekstrakcję próbki mieszaniną fenolu i chloroformu, a następnie wytrąca się go etanolem.

Synteza cDNA. Ze względu na wyżej wspomnianą małą stabilność kwasu RNA, przed przystąpieniem do dalszych badań prowadzących do poznania informacji genetycznej, niezbędne jest „przepisanie” go na bardziej stabilny kwas DNA. W tym celu w mieszaninie reakcyjnej umieszcza się:

- wyizolowaną nić RNA – służącą jako matryca do syntezy komplementarnej nici DNA,
- odwrotną transkryptazę – enzym naturalnie występujący u retrowirusów i mający zdolność syntezy DNA, wykorzystując jako matrycę nici RNA,
- oligonukleotydowy starter komplementarny do krótkiej sekwencji RNA – fragment RNA do którego polimeraza przyłącza kolejne nukleotydy podczas syntezy komplementarnej nici DNA,
- fosforany dezoksyrybonukleotydów.

PCR. Podstawowym zastosowaniem metody PCR jest powielenie małych ilości otrzymanego w wyniku izolacji kwasu nukleinowego tak – by można go było poddać dalszym obróbkom inżynierii genetycznej. Mieszanina reakcyjna zawiera:

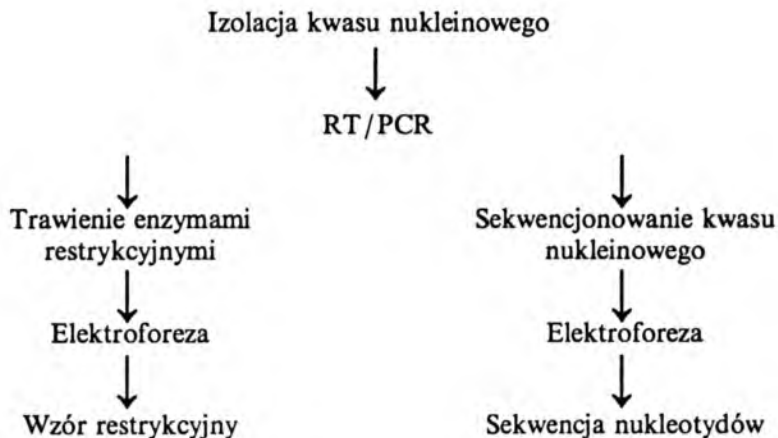
- podwójną nić kwasu nukleinowego,
- startery,
- polimerazy DNA, naturalnie występujące w termofilnych bakteriach żyjących w ciepłych źródłach,
- nukleotydy,
- jony magnezu.

Schemat reakcji: po podniesieniu temperatury mieszaniny reakcyjnej powyżej 95°C przez 1–2 minuty dochodzi do denaturacji i dysocjacji nici; następnie szybkie schłodzenie do temperatury około 50°C przez 1–2 minuty powoduje przyłączenie się starterów do obu nici; podniesienie temperatury do 70°C przez 30 sek. – 10 min. pozwala na syntezę komplementarnych nici. W wyniku tych reakcji następuje podwojenie cząsteczki. Powtarzanie tych cykli pozwala na otrzymanie w krótkim czasie dużej ilości określonego materiału genetycznego.

Enzymy restrykcyjne. Enzymy restrykcyjne są to enzymy naturalnie występujące w bakteriach i mające zdolność do cięcia podwójnej nici DNA w określonym miejscu (najczęściej są to sekwencje palindromowe). W bakteriach enzymy te pełnią rolę ochronną, uniemożliwiając wniknięcie obcego DNA do wnętrza komórki (własne DNA komórki chronione jest przed pocięciem przez metylację jednej lub więcej zasad w miejscu restrykcyjnym – modyfikacja).

Hybrydyzacja. W procesie hybrydyzacji wykorzystuje się jedną z właściwości kwasów nukleinowych, którą jest parowanie odpowiednich zasad. Próbkę zawierającą izolowany lub syntetyzowany fragment znanej sekwencji używa się do wyszukiwania komplementarnej sekwencji w próbce zawierającej heterogenny materiał.

Elektroforeza. Inną ważną techniką stosowaną w biologii molekularnej jest elektroforeza, w której kwasy lub białka rozdzielane są według ich wielkości i ładunku. Wykorzystane jest tu zjawisko poruszania się cząstek w polu elektrycznym. Rozdział prowadzony jest w żelu agarozowym (gdy rozdzielane są większe cząsteczki) lub poliakrylamidowym (gdy ma się do czynienia z mniejszymi molekułami), o odpowiednich rozmiarach porów. Im cząsteczka jest większa – tym wolniej będzie poruszała się w żelu. W związku z tym po elektroforezie na żelu otrzymuje się układ prążków, gdzie najniżej położony prążek będzie molekułą o najmniejszym ciężarze; im cząsteczka ma większy ciężar – tym wyżej będzie znajdowała się na żelu.



Ryc. 2. Kolejność technik możliwych do zastosowania w celu przeprowadzenia badania.

Klonowanie. Klonowanie polega na wstawieniu do wektora tzw. wstawki, którą może być każde uzyskane cDNA lub określony fragment genomu. Wektor jest cząsteczką DNA (plazmidowego lub wirusowego) mającego zdolność wnikania do komórek gospodarza i namnażania się w nich. Wektor wraz z wstawką wprowadza się do komórek biorcy, gdzie następuje ekspresja genów wprowadzonych na wektorze.

Sekwencjonowanie. Sekwencjonowanie ma na celu poznanie kolejności ułożenia nukleotydów wchodzących w skład genu. Najczęściej stosowaną metodą sekwencjonowania jest metoda dideoxy. Polega ona na wprowadzeniu do mieszaniny reakcyjnej dideoxy nukleotydów (dołączenie nukleotydu nie posiadającego wolnej grupy OH przy cukrze powoduje zakończenie syntezy nici). Jednocześnie prowadzone są cztery oddzielne reakcje. W każdej mieszaninie reakcyjnej znajdują się polimerazy i wszystkie cztery nukleotydy potrzebne do syntezy nici cDNA. Każda mieszanina zawiera małą ilość jednego z czterech dideoxynukleotydów. Ponieważ dideoxynukleotydy stanowią małą część wszystkich nukleotydów użytych do reakcji, będą one losowo włączane do syntetyzowanej nici, w wyniku czego otrzymamy mieszaninę nici o różnej długości, zakończonych dideoxynukleotydem. Po rozdziale na żelu 4 mieszanin reakcyjnych możemy odczytać ułożenie nukleotydów czytając od dołu do góry żelu.

Prowadząc badania na poziomie molekularnym na ogół stosuje się na raz kilka wyżej przedstawionych technik. Na przykład w celu poznania różnic genotypowych pomiędzy szczepami możliwe są następujące sekwencje zdarzeń przedstawione na rycinie 2.

III. CEL PRACY

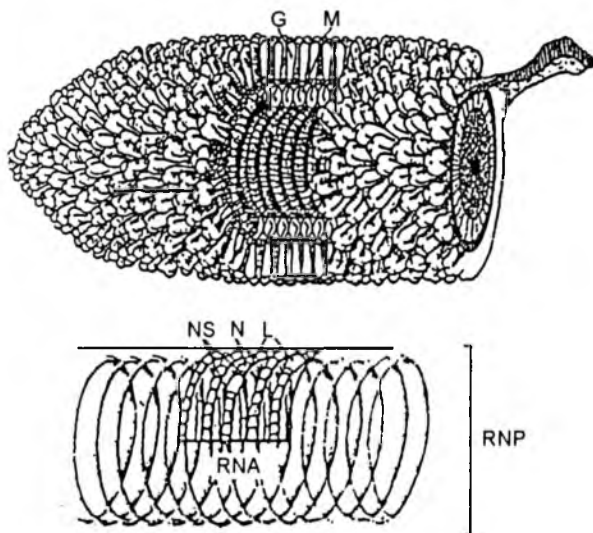
Celem tego artykułu jest prześledzenie na przykładzie wścieklizny zastosowania metod biologii molekularnej w poznaniu szczegółów procesu epidemiologicznego tej choroby, ukrytych w „czarnej skrzynce” dotychczasowej wiedzy o problemach epizootologicznych i epidemiologicznych wścieklizny.

IV. WIRUS WŚCIEKLIZNY

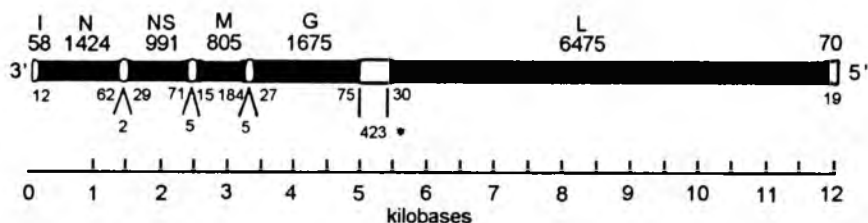
Materiałem genetycznym wirusa wścieklizny jest pojedyncza, niesegmentowana nić minus RNA (komplementarna do mRNA). Genom o długości 12 000 par zasad zawiera 5 genów kodujących pięć białek strukturalnych. Rdzeń wirionu tworzą RNA i trzy proteiny: nukleoproteina (N), białko związane z transkryptazą (NS) i transkryptaza (L). Dwa pozostałe białka powiązane z podwójną błoną lipidową, znajdującą się wokół nukleokapsydu tworzą otoczkę wirionu; matriksowe (M) białko zostało zlokalizowane na wewnętrznej powierzchni podwójnej lipidowej otoczki, a glikoproteina (G) znajduje się na powierzchni cząstki wirusa (ryc. 3 i ryc. 4) (14).

Zastosowanie typowania genetycznego jako narzędzia epidemiologicznego wymaga określenia obszaru genomu, którego będą dotyczyły badania oraz ustalenia niezbędnej długości tego odcinka.

W przypadku wirusa wścieklizny problem wyboru odpowiedniego odcinka do badań wiąże się z okresem wylęgania choroby, który może wynosić od kilku dni do paru lat. Jeżeli badania będą dotyczyły odcinka genomu o dużej zmienności to poszczególne izolaty pochodzące z tego samego źródła mogą być na tyle różne, że nie będą wykazywały wspólnego pochodzenia. Region silnie konserwatywny może mieć natomiast zbyt mało zmian genetycznych aby precyzyjnie zidentyfikować źródło infekcji lub rozróżnić próbki pochodzące z różnych epidemii.



Ryc. 3. Budowa wirusa wścieklizny. Rysunek powyżej ilustruje powierzchnię glikoproteinę (G) (peplomery, przedstawione jako trimery cząsteczki glikoproteiny) występującą na zewnętrznej stronie otoczki lipidowej, otaczającej wewnętrzny kompleks nukleokapsydu. Białko matriksowe (M) wyściela otoczkę lipidową od wewnątrz, oddziałując z cytoplazmatyczną domeną glikoproteiny powierzchniowej. Helikalny rdzeń nukleokapsydu (rysunek poniżej) zbudowany jest z rybonukleoproteiny (RNP) w skład której wchodzi pojedyncza nić genomowego RNA i nukleoproteina (N) oraz fosfoproteina (NS) połączona z cząsteczką transkryptazy (L). *Wunner W.H.* i wsp. według *The Natural History of Rabies* (14).



Ryc. 4. Organizacja pojedynczej niesegmentowej nici genomu wirusa wścieklizny. Czytając od końca 3' (strona lewa) do końca 5' (strona prawa) genom wirusa wścieklizny zawiera sekwencję liderową (1), po której kolejno następują geny: N, NS, M, G i L, kodujące transkrypty mRNA i region niekodujący 5'. Liczby powyżej linii opisują długość nici plus liderowego RNA i transkryptów mRNA (włączając w to 7 nukleotydów dołączanych w procesie poliadenylacji przy każdym mRNA) i sekwencję niekodującą 5'. Liczby tuż pod linią opisują długość nietranslacyjnych nukleotydów w każdym mRNA. Liczby poniżej odnoszą się do regionów pomiędzy genami i opisują długość niekodujących sekwencji międzygenowych; * oznaczony jest region międzygenomowy *ψ*. *Tordo N.* i wsp. według The Natural History of Rabies (14).

Badania wirusa wścieklizny opierają się na analizie regionu genu nukleoproteiny o długości 200 par zasad (pb) lub obszaru genomu ψ (Psi), nie kodującego żadnego białka, znajdującego się pomiędzy genem glikoproteiny i genem kodującym polimerazę (13). Wybór genu N, do genetycznych badań porównawczych, wynika z funkcji nukleoproteiny, które są związane z ochroną i replikacją kwasu nukleinowego. Powoduje to, że w mniejszym stopniu gen ten podlega selekcji układu immunologicznego. Natomiast region ψ genomu jest obszarem mogącym być wykorzystanym jako zegar ewolucyjny szczepów wirusa wścieklizny.

V. ZASTOSOWANIE TECHNIK BIOLOGII MOLEKULARNEJ W BADANIACH WŚCIEKLIZNY

Techniki biologii molekularnej pozwoliły na rozszerzenie i pogłębienie wiedzy w następujących dziedzinach rabiologii:

1. Ustalenie podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami:

– a) pochodzącymi z różnych terenów oraz z różnych epidemii na tym samym terenie.

W analizie podobieństwa genetycznego pomiędzy różnymi szczepami wykorzystano porównanie fragmentu genomu, którym był region nukleoproteiny o długości 200 par zasad. Porównywano szczepy pochodzące z zachodniego Meksyku i z krajów północnej Afryki (np. Tunezji). Na obu tych terenach rezerwuarem wirusa wścieklizny są psy. Cztery szczepy wyizolowane w marcu 1988 roku od wściekłych psów podczas epidemii w mieście Sonara różniły się tylko jednym podstawieniem nukleotydowym a szczepy pochodzące z okolic Sonary i Zachodniego Meksyku, izolowane kolejno w latach 1961, 1981 i 1991, różniły się dwoma lub trzema nukleotydami. Prawie całkowite (99%) podobieństwo między szczepami na terenie

Sonary wskazuje na rozprzestrzenienie terytorialne jednego wariantu wirusa i na bardzo dużą stabilność jego sekwencji nukleotydowych, utrzymującą się tak długi okres czasu. Porównując natomiast szczepy izolowane w zachodnim Meksyku i w Tunezji – stwierdzono tylko 93% podobieństwo sekwencji nukleotydowych, co umożliwia wyciąganie wniosków epizootologicznych odnośnie źródeł ich pochodzenia. Szczepy uzyskane z różnych epidemii występujących na terenie Meksyku są bardziej podobne do siebie niż do szczepów pochodzących z Tunezji. Również szczepy izolowane z trzech różnych krajów Afryki Północnej są genetycznie bliższe sobie niż szczepom izolowanym na terenie Meksyku.

Taki sam stopień homologii pomiędzy szczepami obserwuje się gdy do porównania używa się sekwencji nukleotydowej regionu genomu wirusa międzygenowego tzw. regionu ψ (psi) (13).

– b) pochodzącymi z tych samych terenów i z terenów z nimi sąsiadujących.

Analizowano 12 dzikich szczepów, izolowanych we Francji pomiędzy sierpniem 1989 roku i majem 1990 roku. Szczepy te podzielono na 4 grupy według obszaru geograficznego, na którym występowały. Różnice nukleotydowe pomiędzy wszystkimi szczepami wynosiły średnio 1,8% (15,7 podstawień). Jeszcze większe podobieństwo obserwowano gdy porównywano szczepy należące do jednej grupy: cztery szczepy należące do grupy 2, rozprzestrzenione na obszarze 80 km, wykazywały maksymalnie różnicę dwóch podstawień (9).

– c) pochodzącymi od dwóch różnych gospodarzy zwierzęcych zamieszkujących ten sam teren oraz pochodzących od tego samego gospodarza z odrębnych geograficznie terenów (np. tereny przedzielone barierą geograficzną taką jak góry lub rzeki).

Szczepy izolowane na terenie kanadyjskiej prowincji Ontario z dwóch różnych zwierzęcych rezerwarów wirusa (lisy i skunksy), nie wykazywały różnic genetycznych genu N, pozwalających na rozróżnienie wariantów wirusa specyficznych dla danego gospodarza. Natomiast szczepy wirusa izolowane również na terenie Ontario lecz z odrębnych pod względem geograficznym regionów wykazywały różnicę w sekwencji nukleotydowej, pozwalającą na ich rozróżnienie (6).

2. Systematyczny podział szczepów wirusa wścieklizny według kryteriów genetycznych

Jeżeli klasyfikacja systematyczna organizmów opiera się na pokrewieństwie genetycznym to podobieństwo pomiędzy przedstawicielami tego samego genotypu jest zawsze nie mniejsze niż 91,8% w przypadku porównywania sekwencji nukleotydowej regionu konserwatywnego i 97,1% gdy porównuje się sekwencję aminokwasową tego genu. Homologia pomiędzy nukleotydami regionu konserwatywnego jest ściślejsza niż pomiędzy nukleotydami regionu zmiennego, dla którego wynosi odpowiednio 83,5% i 86,7%. Natomiast podobieństwo nukleotydów i aminokwasów pomiędzy genotypami nigdy nie jest większe niż 79,8% dla nukleotydów i 93,3% dla aminokwasów.

Na podstawie podobieństw nukleotydowych genu N (region konserwatywny genomu wirusa wścieklizny) i aminokwasowych nukleoproteiny, dokonano klasyfikacji rodzaju *Lyssa* wirusów na następujące sześć genotypów:

1. wirus wścieklizny
2. wirus Lagos
3. wirus Mokola
4. wirus Duvenhage
5. wirus EBL1
6. wirus EBL2 (1, 2)

Biotypy EBL1 i EBL2 do tej pory były klasyfikowane jako jeden serotyp. Dzięki porównaniu sekwencji nukleotydowych rozdzielono je na dwa biotypy i stwierdzono, że wirus EBL1 jest bliższy genotypowo wirusowi Duvenhage niż wirusowi EBL2 (2).

Przeanalizowano sekwencję nukleotydową całego genu nukleoproteiny oraz międzygenomowego regionu, znajdującego się pomiędzy genem nukleoproteiny szczepów wirusa, należących do genotypu 1, zebranych z 40 krajów z całego świata. Otrzymane wyniki pozwoliły podzielić szczepy wirusa genotypu 1 na 9 następujących filogenetycznie odległych grup: Afrykański 1, Afrykański 2, Azjatycki, Arktyczny, Europejski i Blisko-Wschodni, Łacinoamerykański 1, Łacinoamerykański 2 i dwie grupy szczepów szczepionkowych (1).

3. Ustalenie zwierzęcego źródła zakażenia oraz określenie terytorium na którym nastąpiło zakażenie

Szczep izolowany od człowieka zmarłego na wściekliznę w 1991 r. w Teksasie był identyczny ze szczepami izolowanymi od wściekłych psów, pochodzących z terenów granicznych Meksyku i Teksasu i z łatwością można go było odróżnić od szczepów występujących u lisów na tych terenach (12).

W 1994 roku w Kaliforni zmarł 44 letni mężczyzna. Retrospektywnie ustalono, że przyczyną zgonu była wścieklizna. Ponieważ wywiad epidemiologiczny nie ustalił możliwości narażenia na wściekliznę, wyizolowany szczep badano metodą przeciwciał monoklonalnych oraz przeprowadzono analizę jego sekwencji nukleotydowej. Wyniki tych badań wykazały genetyczne podobieństwo tego szczepu do szczepu wirusa wścieklizny krążącego w populacji nietoperzy *Lasionycteris noctivagans* (8).

Porównanie sekwencji nukleotydowej niektórych szczepów, izolowanych na terenach Stanów Zjednoczonych, dotychczas wolnych od wścieklizny, ze szczepami z Ameryki Łacińskiej, Afryki i Azji wskazuje na import zakażenia do USA z tamtych terenów. Na przykład szczep izolowany w 1981 r. od zmarłego pacjenta w Phoenix różnił się tylko dwoma nukleotydami od szczepów izolowanych na terenie Sonary (Meksyk) w 1988 r. Wyniki te potwierdził wywiad epidemiologiczny, który wykazał, że pacjent był narażony na zakażenie poprzez pokąsanie przez psa na terenie Meksyku (12).

4. Poznanie nowych elementów procesu patogenezy

W Stanach Zjednoczonych, w kilku przypadkach ustalania źródła zakażenia wirusem wścieklizny, stwierdzono, że okres wylegania wścieklizny może być dłuższy niż dotąd uważano i może się wahać od kilku dni do sześciu lat. Badano szczepy wirusa izolowane od trzech zmarłych na wściekliznę imigrantów, pochodzących z endemicznych dla tej choroby terenów takich jak Laos, Filipiny i Meksyk. Porównywano

wzory restrykcyjne tych szczepów ze szczepami izolowanymi zarówno od ludzi i od zwierząt z terenu USA, Tajlandii, Filipin i Meksyku. Ustalono, że szczepy te mają takie same wzory restrykcyjne jak szczepy izolowane od wściekłych zwierząt, pochodzących z kraju lub jego okolic, w których dany pacjent żył przed emigracją do USA. Natomiast nie znaleziono podobnych wariantów wśród szczepów pochodzących od wściekłych zwierząt z terenów Stanów Zjednoczonych. Otrzymane wyniki wskazują, że narażenie na zakażenie wirusem wścieklizny tych pacjentów nastąpiło na terenie Laosu, Filipin i Meksyku. Ponieważ osoby te mieszkały w USA odpowiednio 4 lata, 6 lat oraz 11 miesięcy – uzyskane wyniki stanowiłyby dowód na możliwość latentnego lub powolnego zakażenia wirusem wścieklizny (11). Możliwość długiego okresu wylęgania wścieklizny sugeruje również przypadek śmierci 10 letniej dziewczynki w Australii, kontynentu wolnego od wścieklizny. Dziewczynka, przebywająca stale od pięciu lat w Australii, była emigrantką z Wietnamu. Ponieważ nie powiodły się pośmiertne próby izolacji wirusa, zastosowano metodę PCR w celu namnożenia odcinków genomu charakterystycznych dla szczepów wirusa wścieklizny (powielane były dwa fragmenty genu nukleoproteiny – jeden o długości 413bp, drugi – 513bp oraz fragment genu glikoproteiny o długości 403bp). Porównanie sekwencji nukleotydowych tych fragmentów z odpowiadającymi im odcinkami genomu należącymi do znanych szczepów wirusa wścieklizny pozwoliło stwierdzić, że wirus ten należy do serotypu wirusa wścieklizny i jest podobny do szczepów izolowanych na terenie Południowo-Wschodniej Azji (5).

5. Ocena zmienności genetycznej szczepów szczepionkowych i szczepów challenge

Biorąc pod uwagę ten sam 200bp region genomu wirusa wścieklizny analizowano różnice i podobieństwa sześciu standardowych szczepów wirusa wścieklizny CVS pochodzących z różnych laboratoriów. Wirus CVS jest używany jako szczep challenge do oceny mocy ochronnej szczepionki i surowicy przeciw wściekliznie oraz do testów diagnostyki serologicznej, przede wszystkim testu neutralizacji. Wśród sześciu badanych szczepów CVS, pięć nie różniło się między sobą, niezależnie od pasażowania ich metodą *in vivo* i *in vitro*. Szczepy te były identyczne ze szczepem wyjściowym wirusa CVS, przechowywanym w NIH (National Institutes of Health, Bethesda) (13).

Porównując sekwencję nukleotydową genu nukleoproteiny różnych szczepów ustalonych – PAS, ERA, PV, CVS, Av01, SADB19 I HEP – podzielono je na trzy grupy. Pierwszą z nich tworzą: oryginalny szczep Pasteura PAS i szczep PV (różniące się między sobą tylko jednym podstawieniem); na drugą grupę składają się szczepy ERA i SADB19 (dwa podstawienia); trzecia grupa obejmuje szczep CVS (który jest identyczny ze szczepem Av01) i szczep PM (trzy podstawienia). Szczep HEP jest najbliższ spokrewniony z grupą CVS(Av01)-PM (9).

6. Ocena podobieństwa genetycznego pomiędzy szczepami szczepionkowymi i szczepami ulicznymi

Porównując sekwencję nukleotydową odcinka genomu, zawierającego: pseudogen ψ (region międzygenowy genomu, najbardziej zmienny) i sąsiadujący z nim region glikoproteiny, 12 dzikich szczepów wirusa wścieklizny, izolowanych na terenie

Francji stwierdzono, że szczepy te wykazują bardzo duży stopień podobieństwa, niezależnie od gospodarza i terenu z którego pochodziły: największa różnica wynosiła 3,4%. Tak duże podobieństwo, chociaż było to zaskakujące, można wytłumaczyć adaptacją wirusa do jedyne go zwierzęcego źródła zakażenia, którym we Francji jest lis rudy. Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami, w których porównywano patogenność dwóch szczepów izolowanych od lisów w odstępie 10 lat, wykazując różnicę w ich adaptacji do lisiego gospodarza (ustalenie się okresu wylegania choroby). Uogólniając można powiedzieć, że po okresie adaptacji do nowego gospodarza następuje ustalenie sekwencji genomu szczepów, utrzymujące się nawet po kilkakrotnym pasażu przez nowego gospodarza (9).

Badane szczepy uliczne porównywano z następującymi szczepami szczepionkowymi: PAS, ERA, PV, CVS, Av01, SADB19 i HEP. Szczepy te wykazujące duże podobieństwo pomiędzy sobą (2–3%), różnią się aż o 14,7% od szczepów szczepionkowych. Są one bardziej podobne do szczepów szczepionkowych z grupy ERA-SADB19 (szczepy stosowane w szczepionkach do uodparniania zwierząt) niż do szczepów należących do grupy PV-PVS. Najbardziej zaś odległe są od szczepów należących do grupy CVS(Av01)-PM, używanych do produkcji i kontroli szczepionki dla ludzi.

Wyniki tych badań porównawczych mogą tłumaczyć przyczyny niepowodzenia szczepień oraz mogą pomóc w wyborze szczepu szczepionkowego najbardziej zbliżonego antygenowo do krążących wariantów wirusa ulicznego.

W porównywaniu szczepów szczepionkowych i szczepów ulicznych ważne jest nie tylko ustalenie stopnia podobieństwa pomiędzy szczepami lecz także ustalenie jak szybko zachodzą zmiany, co pozwala nie tylko na kontrolę skuteczności szczepionki ale i na możliwość przewidywania jak długo będzie ona skuteczna (9).

7. Produkcja szczepionek rekombinowanych do doustnego uodparniania zwierząt dzikich przeciw wścieklicznie.

Do konstrukcji szczepionki rekombinowanej użyto gen glikoproteiny wirusa wściekliczny, jedyne go białka tego wirusa indukujące go do wytwarzania przeciwciał neutralizujących (3). Gen glikoproteiny wycięto z genomu wirusa wściekliczny (szczep ERA) i wklonowano w gen TK (gen kodujący kinazę tymidyny) wirusa krowianki (szczep „Kopenhaga”), co spowodowało spadek wirulencji krowianki w porównaniu ze szczepem wyjściowym (7).

Zastosowanie szczepionki rekombinowanej eliminuje potencjalne niebezpieczeństwo uzjadliwienia się żywego wirusa szczepionkowego wściekliczny o zmniejszonej wirulencji, stosowanego w takich szczepionkach jak np. SADB19 i inne.

M. Sadkowska

USE OD MOLECULAR BIOLOGY IN EPIDEMIOLOGY IN RABIES.

SUMMARY

On the basis of a literature review, the use of molecular biology techniques in epidemiological research and new insight into the knowledge about rabies obtained by such methods were discussed.

PIŚMIENICTWO

1. Bourhy H., Kissi B., Lafon M., Sacramento D., Tordo N.: J. Clinical Microb., 1992, 30, 2419. – 2. Bourhy H., Kissi B., Tordo N.: Virology, 1993, 196, 70. – 3. Cox J.H., Dietzhold B., Schnaider L.G.: Infect. Immun., 1977, 16, 754. – 4. Hurst R.E., Rao J.Y.: Molecular Epidemiology, Academic Press, 1993, 45. – 5. McColl K.A., Gould A.R., Selleck P.W., Hooper P.T., Westbury H.A., Smith J.S.: Aust. Vet. J., 1993, 70, 84. – 6. Nadin-Davis S.A., Casey G.A., Wandeler A.: J. Gen. Virol., 1993, 74, 829. – 7. Postoret P.P., Brochier B., Blancou J., Artois M., Aubert M., Kieny M.P., Lecocq J.P., Languet B., Chappuis G., Desmettre P.: Recombinant poxviruses; CRC Press, 1992, 163. – 8. Rabies Bulletin Europe: 1994, 1, 9. – 9. Sacramento D., Badrane H., Borhy H., Tordo N.: J. Gen. Virol., 1992, 73, 1149. – 10. Schulte P.A.: Molecular Epidemiology, Academic Press, 1993, 3.
11. Smith J.S., Fishbein D.B., Rupprecht Ch.E., Clark K.: N. Engl. J. Med., 1991, 324, 205.
- 12. Smith J.S., Orciari L.A., Yager P.A., Seidel H.D., Warner C.K.: J. Infect. Dis., 1992, 166, 296.
- 13. Smith J.S., Seidel S.: Prog Med. Virol., 1993, 40, 82. – 14. Wunner W.H.: The Natural History of Rabies, ed. 2, Boca Raton, CRC Press, 1991.

Adres: Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie,
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24