



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Maciej Kosiński

Opracowanie szybkiej metody detekcji wirusowych infekcji dróg oddechowych opartej na sekwencjonowaniu w czasie rzeczywistym

Development of the rapid method for detection of
respiratory tract viral infections using real time
sequencing

Praca przedstawiona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: **dr hab. Andrea Lipińska**
Promotor pomocniczy **dr Łukasz Rąbalski**
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Zakład Szczepionek Rekombinowanych

GDAŃSK 2025

Dziękuję za wsparcie w tworzeniu niniejszej pracy mojej rodzinie oraz przyjaciołom.

Współpracownikom z obu zakładów dziękuję za miłą atmosferę i czas który razem spędziliśmy.

Promotorom mojej pracy bardzo dziękuję za wsparcie merytoryczne i przekazywanie swojej wiedzy.

Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu:

1 Spółki Vaxican z o.o, dzięki której możliwe było przygotowanie bibliotek, wykonanie procesów sekwencjonowania oraz analizy danych



2 Projektu „Infekcje towarzyszące przy zakażeniach SARS-CoV-2. Baza Infekcji Towarzyszących COVID-19” -dodatkowa subwencja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego uzyskana przez dr Łukasza Rąbalskiego



3 Projektu „Właściwości immunomodulacyjne białek koronawirusa SARS-CoV-2” NCN - Opus 20 przyznanego dr hab. Andrei Lipińskiej



4 Europejskiego Archiwum Wirusów – EVAg przyznanego mgr Maciejowi Kosińskiemu



Spis treści

1	Wykaz skrótów	- 6 -
2	Streszczenie	- 11 -
3	Abstract	- 13 -
4	Wstęp.....	- 14 -
4.1	Najczęściej występujące objawy zakażeń górnych dróg oddechowych	- 14 -
4.2	Wirusy powodujące zakażenia górnych dróg oddechowych	- 15 -
4.3	Metody diagnostyczne w chorobach wirusowych	- 26 -
4.4	Rozwój metod sekwencjonowania	- 34 -
4.5	Podsumowanie metod sekwencjonowania.....	- 49 -
5	Cel Pracy	- 52 -
6	Materiały	- 53 -
6.1	Sekwencje wirusów	- 53 -
6.2	Wirusy.....	- 54 -
6.3	Oligonukleotydy	- 56 -
6.4	Plazmidy (kontrola pozytywne)	- 63 -
6.5	Odczynniki	- 80 -
6.6	Komórki	- 80 -
6.7	Pożywki wzrostowe	- 81 -
6.8	Antybiotyki	- 82 -
6.9	Wzorce masowe	- 82 -
6.10	Bufory i roztwory	- 82 -
6.11	Odczynniki chemiczne	- 82 -
6.12	Zestawy komercyjne	- 83 -
6.13	Aparatura i oprogramowanie	- 83 -
6.14	Dodatkowe materiały	- 84 -

6.15	Przeciwciężła	- 84 -
7	Metody	- 85 -
7.1	Pozyskanie sekwencji z baz danych	- 85 -
7.2	Zestawienie sekwencji dostępnych w bazach do stworzenia sekwencji referencyjnych - 85 -	
7.3	Projektowanie starterów	- 85 -
7.4	Przygotowanie plazmidów kontrolnych	- 86 -
7.5	Izolacja wirusowego materiału genetycznego.....	- 90 -
7.6	Multiplex PCR.....	- 90 -
7.7	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym- -	91
7.8	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) z analizą krzywej topnienia	- 93 -
7.9	Zautomatyzowana elektroforeza DNA o wysokiej czułości	96
7.10	Adherentna hodowla komórek ssaczy	96
7.11	Miareczkowanie wirusa grypy typu A.....	96
7.12	Test immunodetekcji białek in situ (IPMA).....	97
7.13	Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania metodą nanoporową	97
7.14	Proces sekwencjonowania metodą nanoporową	98
7.15	Analiza danych uzyskanych z sekwencjonowania przy zastosowaniu zautomatyzowanego potoku bioinformatycznego	98
8	Wyniki.....	101
8.1	Opracowanie metody wykrywania panelu wirusowych patogenów oddechowych 101	
8.2	Walidacja metody diagnostycznej	116
9	Dyskusja.....	139
10	Wnioski	152

11	Spis rycin.....	153
12	Spis tabel	158
13	Bibliografia.....	160

1 Wykaz skrótów

A - adenina

AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności (z ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)

ATP - adenozynotrifosforan

BHQ1 – (z ang. *Black Hole Quencher 1*) wygaszacz w podwójnie znakowanych sondach fluorescencyjnych

BLAST - narzędzie do wyszukiwania podobieństwa pomiędzy sekwencjami (z ang. *Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA - surowicza albumina bydlęca (z ang. *bovine serum albumin*)

C - cytozyna

cDNA - komplementarny DNA (z ang. *complementary DNA*)

CHO - linia komórkowa jajnika chomika chińskiego *Cricetulus barabensis griseus* (ang. *chinese hamster ovary*)

COVID-19 - choroba wywoływana przez SARS-CoV-2 (z ang. *Coronavirus disease 2019*)

CRS - zespół różyczki wrodzonej (z ang. *congenital rubella syndrome*)

Ct - cykl progowy (z ang. *threshold cycle*)

ddH₂O - woda podwójnie destylowana (z ang. *double distilled water*)

ddNTPs - dideoksynukleotydy (z ang. *dideoxynucleotide triphosphates*)

ddPCR - ilościowa analiza PCR z techniką emulsyjną (z ang. *droplet digital PCR*)

dNTPs - deoksynukleotydy (z ang. *deoxynucleotide triphosphate*)

EBV - wirus Epsteina-Barr (z ang. *Epstein-Barr virus*)

ELISA - test immunoenzymatyczny (z ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

EV – enterowirus (z ang. *enterovirus*)

FAM – właśc. 6-FAM – 6- Karboksylfluoresceina – barwnik fluorescencyjny o piku absorpcji fali światła długości 495 nm i emisji 517 nm

FDA - Agencja Żywności i Leków (z ang. *Food and Drug Administration*)

FFT-NS2 - szybkie przyrównanie dla zbiorów poniżej 30000 sekwencji używające Transformaty Fouriera

FFT-NS-i - szybkie przyrównanie sekwencji używające Transformaty Fouriera

G - guanina

HA - hemaglutynina (z ang. *hemagglutinin*)

hAdV - ludzkie adenowirusy (z ang. *human adenoviruses*)

HBoV - bokawirus ludzki (z ang. *human bocavirus*)

HCV - wirus zapalenia wątroby typu C (z ang. *hepatitis C virus*)

HEX – heksachlorofluoresceina - barwnik fluorescencyjny o piku absorpcji fali światła długości 533 nm i emisji 549 nm.

HIV - ludzki wirus niedoboru odporności (z ang. *human immunodeficiency virus*)

hMPV - ludzki metapneumowirus (z ang. *human metapneumovirus*)

HPIV - wirus grypy rzekomej (z ang. *human parainfluenza virus*)

HRP - peroksydaza chrzanowa (z ang. *horseradish peroxidase*)

HSV-1 - wirus opryszczki pospolitej typu 1 (z ang. *herpes simplex virus type 1*)

HSV-2 - wirus opryszczki pospolitej typu 2 (z ang. *herpes simplex virus type 2*)

IAV – (z ang. *Influenza A virus*) – wirus grypy typu A

IBV – (z ang. *Influenza B virus*) – wirus grypy typu B

IHC - immunohistochemia (z ang. *immunohistochemistry*)

IPMA - detekcja białek in situ w jednowarstwowych hodowlach komórkowych (z ang. *immunoperoxidase monolayer assay*)

ITS – wewnętrzny transkrybowany region spacerowy (z ang. *Internal transcribed spacer*)

k- - kontrola negatywna

LFD – urządzenie testu przepływowego (z ang. *lateral flow device*)

LFT – test przepływowy/test kasetkowy (z ang. *lateral flow test*)

L-INS-i - dokładne przyrównanie dla zbiorów poniżej 200 sekwencji

LOD - granica wykrywalności (z ang. *limit of detection*)

MAFFT - przyrównanie wielu sekwencji z użyciem szybkiej Transformaty Fouriera (z ang. *Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*)

MDCK – linia komórek nabłonkowych nerki psa Madina i Darby'ego (z ang. *Madin-Darby canine kidney*)

MERS - bliskowschodni zespół oddechowy (z ang. *Middle East Respiratory Syndrome*)

MRSA - gronkowiec złocisty oporny na metycylinę (z ang. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)

MSC - miejsce wielokrotnego klonowania (z ang. *multiple cloning site*)

MspA - poryna mykobakterii (z ang. *Mycobacterium smegmatis porin A*)

NA - neuraminidaza

NCBI - Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (z ang. *National Center for Biotechnology Information*)

NGS - sekwencjonowanie nowej/następnej generacji (z ang. *next-generation sequencing*)

NTC – kontrola niezawierająca matrycy (z ang. *no template control*)

PB1 - podjednostka 1 polimerazy RNA wirusa grypy (z ang. *influenza polymerase basic 1*)

PBS - sól fizjologiczna buforowana fosforanami (z ang. *phosphate buffered saline*)

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (z ang. *polymerase chain reaction*)

PFU – liczba cząstek wirusowych tworząca łysinki wirusowe (z ang. *plaque forming unit*)

phi29 DNAP - polimeraza DNA faga phi29

POTEE – białko E z domeną ankirynową (z ang. *POTE Ankyrin Domain Family Member E*)

pz - pary zasad

qPCR - łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (z ang. *quantitative PCR*)

RdRp - polimeraza RNA zależna od RNA (z ang. *RNA-dependent RNA polymerase*)

RPM - jednostka miary częstotliwości obrotu (z ang. *revolutions per minute*)

rpoB - podjednostka beta DNA-zależnej polimerazy RNA (z ang. *DNA-directed RNA polymerase subunit beta*)

RSV - syncytialny wirus oddechowy (z ang. *respiratory syncytial virus*)

RT-qPCR - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (z ang. *reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*)

SARS - ciężki ostry zespół oddechowy (z ang. *severe acute respiratory syndrome*)

SARS-CoV-2 - koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (z ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)

SBS - sekwencjonowanie przez syntezę (z ang. *sequencing by synthesis*)

SMRT - pojedyncza cząsteczka w czasie rzeczywistym (z ang. *single molecule, real time*)

ssDNA - jednoniciowy DNA (z ang. *single stranded DNA*)

ssRNA - jednoniciowy RNA (z ang. *single stranded RNA*)

T - tymina

TAE - bufor tris-octanowy (z ang. *tris-acetate buffer*)

TB - gruźlica (z ang. *tuberculosis*)

TPCK – keton chlorometylowy L-1-tosylo-2-fenyloalaniny (z ang. *L-1-tosylamido-2-phenylethyl chloromethyl ketone*)

UCK - Uniwersyteckie Centrum Kliniczne

UNG - glikozylaza uracylu w DNA (z ang. *uracil-DNA glycosylase*)

VZV - wirus ospy wietrznej i półpaśca (z ang. *varicella-zoster virus*)

WGS - sekwencjonowanie całego genomu (z ang. *whole genome sequencing*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (z ang. *World Health Organization*)

WZW - wirusowe zapalenie wątroby

ZMW - osłona chroniąca przed dostępem niechcianych fal światła w technologii firmy PacBio
(z ang. *zero-mode waveguide*)

2 Streszczenie

Choroby układu oddechowego stanowią istotne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Miliony osób każdego roku cierpią na infekcje wirusowe, wywołujące objawy uniemożliwiające im normalne funkcjonowanie, przynoszące znaczne straty ekonomiczne oraz, w krajach nisko rozwiniętych, wzmożoną śmiertelność. Infekcje wirusami oddechowymi są zwykle diagnozowane przez lekarzy pierwszego kontaktu i leczone objawowo, często antybiotykami, co powoduje wzrost antybiotykoodporności bakterii i trudności w leczeniu zakażeń wtórnych. Aktualnie dostępne metody diagnozy wirusowych chorób górnych dróg oddechowych sprowadzają się do testów qPCR oraz szybkich testów kasetkowych, posiadających liczne ograniczenia.

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowej metody diagnostycznej do detekcji infekcji wirusowych z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji. Pracę badawczą podzielono na trzy etapy : i) opracowanie metody oraz prace *in silico*; ii) optymalizacja metody i iii) eksperymentalne testowanie nowo opracowanej metody.

W kolejnych etapach niniejszej pracy przedstawiam proces tworzenia nowej metody z wykorzystaniem:

- metod komputerowych umożliwiających opracowanie panelu starterów dla 44 patogenów wirusowych;
- technik laboratoryjnych umożliwiających optymalizację warunków przeprowadzanych reakcji, jak również opracowanie kontroli pozytywnych niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania metody;
- sekwencjonowania nanoporowego – w czasie rzeczywistym umożliwiającego kontrolę procesu i uzyskiwanych z niego danych w czasie rzeczywistym;
- technik bioinformatycznych, dzięki którym możliwe było wydajne i dokładne analizowanie uzyskanych danych.

Wynikiem niniejszej pracy jest opracowanie nowej technologii diagnostycznej na poziomie rozwoju, testów działania technologii w Środowisku Prawdziwym (TRL 5). Opracowana metoda została przetestowana w kierunku diagnostyki patogenów oddechowych w próbkach

klinicznych, aby ocenić jej działanie w warunkach zbliżonych do tych, w których będzie używana. Wykazała ona zadowalające efekty, porównywalne z innymi metodami diagnostycznymi.

Jednocześnie niniejsza praca pozwoliła zidentyfikować kluczowe punkty rozwoju technologii diagnostycznej opartej o wykorzystanie sekwencjonowania nanoporowego, które powinny być uwzględnione w przyszłości podczas rozwijania metody o kolejne panele patogenów.

3 Abstract

Respiratory diseases are a significant public health concern, with millions of people suffering from infections caused by viruses that induce symptoms severe enough to disrupt their normal functioning. This leads to considerable economic losses due to workplace absenteeism and the burden on healthcare facilities, and, in low-income countries, increased mortality. Respiratory virus infections are usually diagnosed by primary care physicians and treated symptomatically, often with antibiotics, which causes increased antibiotic resistance in bacteria and difficulties in treating secondary infections. Currently available methods for diagnosing viral upper respiratory tract diseases are limited to qPCR tests and rapid cassette tests, which have numerous limitations.

The aim of this study was to develop a new diagnostic method using next-generation sequencing (NGS). The research was divided into three stages: theoretical development of the method and *in silico* work, practical creation and optimization of the method, and testing the functionality of the newly developed method.

In the following stages of this study, I present the process of creating the new method using:

- computational methods for designing a primer panel for 44 pathogens;
- laboratory techniques for optimizing reaction conditions and creating positive controls essential for the proper functioning of the method;
- nanopore sequencing for process control and real-time data acquisition;
- bioinformatic techniques for efficient and accurate data analysis.

The outcome of this study is the development of a new diagnostic technology at the Proof of Concept in a Relevant Environment stage (TRL 5). The developed method was tested for diagnosis of respiratory pathogens in clinical samples to evaluate its performance under conditions similar to those in which it will be used. It showed satisfactory results, comparable to other diagnostic methods.

Additionally, this study identified key points in the development of diagnostic technology based on nanopore sequencing that should be considered in future expansions of the method to include additional pathogen panels.

4 Wstęp

4.1 Najczęściej występujące objawy zakażeń górnych dróg oddechowych

Czynnikami etiologicznymi infekcji górnych dróg oddechowych – jamy nosowej, zatok, gardła i krtani – są wirusy, bakterie, grzyby i pierwotniaki.

Większość patogenów atakujących górne drogi oddechowe wywołuje u ludzi zespół objawów podobnych do przeziębienia, takich jak: kaszel, ból gardła, nieżyt nosa, ból głowy, podwyższona temperatura, kichanie, złe samopoczucie oraz bóle mięśniowe. Odpowiednio dobrane leczenie umożliwia zmniejszenie dyskomfortu wywoływanego przez objawy, skraca czas ich trwania oraz redukuje ryzyko hospitalizacji w przypadku wystąpienia choroby u osób z osłabioną odpornością lub innymi obciążeniami, takimi jak choroby współistniejące. Prawidłowo dobrana terapia zmniejsza również możliwość wystąpienia powikłań lub infekcji wtórnych, w szczególności zakażeń bakteryjnych [1]. Szybka diagnoza pozwala lekarzom na uniknięcie stosowania niepotrzebnej antybiotykoterapii.

Do najczęstszych infekcji wirusowych układu oddechowego dochodzi poprzez zarażenie się wirusem z jednej z następujących rodzin: *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Orthoherpesviridae*, *Matonaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae* oraz *Poxviridae*. Szacunkowy podział procentowy przedstawiono w Tabeli 1.

Według Światowej Organizacji Zdrowia infekcje górnych i dolnych dróg oddechowych są czwartą co do częstości przyczyną śmierci [2]. Dzieci są szczególnie podatne na zakażenia górnych dróg oddechowych ze względu na niedojrzałość układu odpornościowego. Przebywają one również często w miejscach o wysokiej gęstości zaludnienia, takich jak przedszkola czy szkoły. U dzieci w wieku szkolnym i przedszkolnym może dochodzić do 6-8 zachorowań na infekcje górnych dróg oddechowych rocznie. U dorosłych są to średnio 2 do 4 zachorowania [3].

Tabela 1 Szacunkowy podział częstości zakażeń górnych dróg oddechowych przez wirusy. Na podstawie-Heikkinen, *The common cold* [3]

Czynnik	Roczny rozkład zachorowań
Rinowirusy	30–50%
Koronawirusy	10–15%
Wirusy grypy	5–15%

RSV	5%
Wirusy paragrypy	5%
Adenowirusy	<5%
Enterowirusy	<5%
Metapneumowirus	Brak danych
Inne, nieokreślone	20–30%

4.2 Wirusy powodujące zakażenia górnych dróg oddechowych

4.2.1 *Adenoviridae*

Adenowirusy stanowią szeroką grupę wirusów zdolnych do infekowania zarówno ludzi, jak i zwierząt. Do tej pory wyszczególniono 7 gatunków adenowirusów infekujących ludzi (hAdV), oznaczonych literowo od A do G, w skład których wchodzi 88 serotypów.

Są to wirusy bezosłonkowe, o ikozaedralnej strukturze kapsydu, w który upakowany jest genom w postaci dwuniciowego liniowego DNA.

Proces wnikania rozpoczyna się od adsorpcji wirusa na powierzchni komórki poprzez przyłączenie białka włókna podstawy pentonowej kapsydu do receptora CAR. W kolejnym etapie następuje internalizacja wirionów, endocytoza oraz uwolnienie wirionów do cytoplazmy. Rdzeń wirusowy jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie następuje transkrypcja przy użyciu polimerazy RNA II gospodarza, replikacja DNA oraz formowanie wirionów potomnych.

Adenowirusy są odpowiedzialne za szereg infekcji, głównie w obrębie górnych dróg oddechowych, ale mogą również powodować choroby przewodu pokarmowego, zapalenie rogówki oraz, rzadziej, infekcje układu moczowo-płciowego i nerwowego. Poza objawami charakterystycznymi dla przeziębienia, infekcja hADV może powodować zapalenie płuc, zapalenie mięśnia sercowego czy nawet ciężkie infekcje okołoporodowe u noworodków. Szczególne duże znaczenie patogen ten odgrywa u dzieci poniżej 3 roku życia ze względu na brak humoralnej odpowiedzi odpornościowej; takie zakażenie może prowadzić do śmierci dziecka [4–6].

Do zakażenia dochodzi głównie drogą kropelkową, ale również przez kontakt fizyczny z zakażoną osobą, przedmioty używane przez zakażone osoby oraz wodę [7].

4.2.2 *Coronaviridae*

Rodzina koronawirusów obejmuje szeroką grupę wirusów. Ich materiał genetyczny to jednonicowy RNA o dodatniej polarności. Charakterystyczną cechą tych wirusów jest ich wyjątkowy kształt wirionów obserwowanych w mikroskopii elektronowej, przypominający koronę, spowodowany obecnością wypustek białkowych na ich powierzchni, co dało początek nazwie "*coronavirus*". Ich białka powierzchniowe są kluczowe dla zdolności wirusa do wiązania się z komórkami gospodarza i ich infekowania.

Koronawirusy przyłączają się do zewnątrzkomórkowych receptorów wejścia z użyciem białka kolca (z ang. *Spike protein*) prezentowanego na ich powierzchni. Następnie są transportowane do wnętrza komórki na drodze endocytozy. Tam następuje fuzja z błoną endosomu i uwolnienie zawartości wirusa do cytoplazmy. Infekcja wirusa rozwija się w cytoplazmie komórki, w pierwszej kolejności dochodzi do translacji RNA białek niestrukturalnych Nsp które formują kompleksy transkrypcyjne i replikacyjne. Białka strukturalne są transportowane do siateczki śródplazmatycznej, następnie do aparatu Golgiego, gdzie pakowany jest ich materiał genetyczny, po czym dochodzi do uwolnienia potomnych wirusów na drodze egzocytozy [8].

Koronawirusy są odpowiedzialne za różnorodne zakażenia, od łagodnych chorób układu oddechowego, takich jak przeziębienie, po ciężkie i potencjalnie śmiertelne choroby, jak ciężki ostry zespół oddechowy (SARS), bliskowschodni zespół oddechowy (MERS) oraz choroba wywołana przez koronawirusa SARS-CoV-2 (COVID-19), która była przyczyną globalnej pandemii w latach 2020-2023.

Wirusy te są zdolne do przeskoku gatunkowego, co oznacza, że mogą przenosić się między różnymi gatunkami (pomiędzy zwierzętami, ze zwierząt na ludzi i odwrotnie). Prowadzi to do powstania nowych, wcześniej nieznanych jednostek chorobowych u ludzi. Dodatkowo, genomy koronawirusów są stosunkowo duże jak na wirusy RNA, co zwiększa ich potencjał ewolucyjny poprzez mutacje i rekombinacje, prowadząc do powstawania nowych wariantów wirusa [9,10].

Koronawirusy roznoszą się drogą kropelkową oraz przez bezpośredni kontakt z osobą zakażoną a także pośredni kontakt z przedmiotami i powierzchniami na których występuje wirus. Droga

fekalno-oralna nie została potwierdzona, mimo występowania dużych ilości materiału genetycznego wirusa w próbkach kału [11].

4.2.3 *Orthoherpesviridae*

Herpeswirusy to zróżnicowana grupa wirusów DNA. Liczy ona ponad 100 gatunków wirusów, będących patogenami ssaków, ptaków oraz gadów. Wirusy te posiadają charakterystyczną cechę latencji - utrzymywania się w organizmie gospodarza przez całe życie, często z okresami aktywacji, podczas których wirus ponownie się replikuje i może wywoływać objawy kliniczne.

Rodzina ta obejmuje trzy podrodziny Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae i Gammaherpesvirinae. Do najbardziej rozpowszechnionych herpeswirusów należą HSV-1 (wirus opryszczki pospolitej, *herpes simplex virus 1*) i HSV-2 (*herpes simplex virus 2*), odpowiedzialne za opryszczkę wargową i narządów płciowych, VZV (*varicella zoster virus*), który wywołuje ospę wietrzną i półpaśca, oraz EBV (wirus Epsteina-Barr), wywołujący mononukleozę oraz o własnościach onkogennych.

Herpeswirusy oddziałują z komórkami ssaczymi poprzez glikoproteiny osłonki gC, gB oraz gD. Jedna z glikoprotein osłonkowych wiąże specyficzny receptor komórkowy, a glikoproteina gB odpowiada za fuzję osłonki wirusowej z błoną komórkową. Następnie kapsyd zostaje uwolniony do cytoplazmy i przy pomocy mikrotubul jest transportowany do jądra komórkowego. W kolejnym etapie DNA zostaje uwolniony do jądra komórkowego, gdzie dochodzi do transkrypcji i replikacji wirusowego genomu. W końcowym etapie cyklu litycznego wirusowy DNA jest pakowany do kapsydów, które następnie zostają opłaszczane osłonką i transportowane w kierunku błony komórkowej, gdzie dochodzi do uwolnienia wirionów potomnych na drodze egzocytozy [12].

Infekcje herpeswirusami mogą manifestować szerokie spektrum objawów – od łagodnych skórnych owrzodzeń po poważne komplikacje neurologiczne zagrażające życiu osób z obniżoną odpornością [13,14].

Do zakażenia wirusami HSV dochodzi poprzez bezpośredni kontakt z osobą zarażoną bądź z jej płynami ustrojowymi. Zakażenie VZV odbywa się głównie drogą kropelkową natomiast do zakażenia wirusem EBV dochodzi najczęściej przez kontakt ze śliną zawierającą wirusa. Z tego względu mononukleozę jest nazywana potocznie w USA „chorobą pocałunków” (z ang. *kissing disease*) [15–17].

4.2.4 *Matonaviridae*

Matonaviridae to rodzina bardzo małych wirusów ośtonkowych (50–90 nm średnicy wirionu), posiadających genom w postaci jednonicowego RNA o dodatniej polarności. W rodzinie tej zawarty jest jeden rodzaj- *Rubivirus*. Głównymi jego przedstawicielami są wirus różyczki - *Rubivirus rubellae* (RuV) oraz wirusy Ruhugu i Rustrela. RuV jest jedynym do tej pory poznanym ludzkim patogenem należącym do tej rodziny [18].

Wirusy z tej rodziny dostają się do komórek poprzez endocytozę zależną od klatryny, następnie w cytoplazmie dochodzi do fuzji błon umożliwiającej uwolnienie nukleokapsydu do cytoplazmy. Translacja, transkrypcja oraz replikacja genomu zachodzą w cytoplazmie, po czym elementy strukturalne wirusów potomnych są transportowane do siateczki śródplazmatycznej oraz aparatu Golgiego. Potomne nukleokapsydy są otaczane błoną wchodząc do aparatu Golgiego. Następnie pęcherzyki transportowe aparatu Golgiego przenoszą cząstki wirusowe na powierzchnię komórki, gdzie wiriony potomne są uwalniane [19].

Różyczka jest zazwyczaj łagodną chorobą zakaźną, charakteryzującą się niewielką gorączką, wysypką oraz powiększeniem węzłów chłonnych. Choć dla większości zakażonych osób różyczka nie stanowi poważnego zagrożenia, infekcja w czasie ciąży może prowadzić do ciężkiego uszkodzenia płodu, znanego jako zespół różyczki wrodzonej (CRS), obejmującego wady serca, głuchotę, ślepotę i inne poważne zaburzenia. Wirus różyczki jest przenoszony drogą kropelkową oraz poprzez bezpośredni kontakt z wydzielinami osoby zakażonej, np. podczas kaszlu czy kichania. Jedną z najskuteczniejszych metod zapobiegania różyczce jest szczepienie ochronne, które jest częścią standardowych programów szczepień w wielu krajach. Dzięki skutecznym kampaniom szczepień, liczba przypadków różyczki znacznie spadła na przestrzeni lat, co przyczyniło się do ograniczenia ryzyka CRS. Niestety, mimo tych wysiłków, różyczka nadal stanowi problem zdrowia publicznego w niektórych częściach świata, zwłaszcza tam, gdzie dostęp do szczepień jest ograniczony [20].

4.2.5 *Orthomyxoviridae*

Rodzina *Orthomyxoviridae* gromadzi groźne patogeny ludzi i zwierząt, wywołujące grypę. Charakterystyczną cechą wirusów z tej rodziny jest ich zdolność do szybkiej ewolucji poprzez dwie główne ścieżki: skok antygenowy (z ang. *antigenic shift*) i przesunięcie/dryf antygenowy

(z ang. *antigenic drift*), co utrudnia wytworzenie długotrwałej odporności i jest przyczyną konieczności corocznego aktualizowania składu szczepionek przeciw grypie.

Genom ortomyksowirusów składa się z siedmiu (IBV) lub ośmiu (IAV, IBV) segmentów jednoniciowego RNA o ujemnej polarności, co umożliwia im szybką rekombinację genetyczną oraz adaptację do nowych gospodarzy. Oślonka zawiera białka hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA), które odgrywają kluczowe role w infekcji komórek gospodarza oraz w uwalnianiu nowo powstałych wirionów, a tym samym są głównymi celami dla odpowiedzi antywirusowej układu immunologicznego [21].

Wejście wirusa do komórki następuje na drodze endocytozy poprzez przyłączenie się hemaglutyniny zakotwiczonej w oślonce lipidowej wirusa z receptorami kwasu sjałowego w komórkach gospodarza. Następnie genom wirusowy jest transportowany do jądra komórkowego, gdzie zachodzi jego replikacja z użyciem wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp). Do produkcji białek wirusowych jest wykorzystywana maszyna transkrypcyjna komórki. Odpowiednie kompleksy wirusowych rybonukleoprotein są transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie następuje formowanie cząstek wirusowych podczas odpączkowania wirusów potomnych z błony komórkowej [22].

Wirusy z tej rodziny są przyczyną sezonowych epidemii grypy, które corocznie dotyczą miliony ludzi na całym świecie, powodując znaczne obciążenie dla systemów ochrony zdrowia oraz ekonomii. Pandemie grypy, takie jak pandemia grypy hiszpanki w 1918 roku, grypy azjatyckiej w 1957 roku, grypy Hongkongu w 1968 roku oraz pandemia grypy H1N1 w 2009 roku, podkreślają potencjalne zagrożenie, jakie wirusy z tej rodziny mogą stanowić dla zdrowia ludzkiego [23].

4.2.6 *Paramyxoviridae*

Wirusy z rodziny *Paramyxoviridae* są odpowiedzialne za infekcje dróg oddechowych, układu nerwowego oraz skóry u ludzi i zwierząt. Do najbardziej znanych paramyksowirusów zalicza się wirusy paragrypy (grypy rzekomej / parainfluenzy) (*Respirovirus*), świnki (*Mumps rubulavirus*), odry (*Morbillivirus hominis*) oraz syncytialny wirus oddechowy (*Orthopneumovirus hominis*), który jest główną przyczyną infekcji dolnych dróg oddechowych u małych dzieci.

Paramyksowirusy posiadają oślonkę, co jest charakterystyczne dla wielu wirusów RNA. W jej skład wchodzi białka powierzchniowe, w tym glikoproteiny odpowiedzialne za wiązanie z

receptorami komórkowymi gospodarza i fuzję z błoną komórkową, co umożliwia wirusom wnikanie do wnętrza komórek [24].

Po wejściu do komórki gospodarza replikacja materiału genetycznego oraz synteza białek wirusowych zachodzą w cytoplazmie. W kolejnym etapie powstają rybonukleoproteiny, składane w cytoplazmie i transportowane w okolice błony komórkowej, gdzie znajdują inne białka osłonki wirusowej, tam dochodzi do ich odpączkowania wraz z błoną komórkową [25].

Choroby wywoływane przez paramyksowirusy mogą prowadzić do poważnych powikłań, szczególnie w populacjach wysokiego ryzyka, takich jak dzieci, osoby starsze czy osoby z obniżoną odpornością. Przykładowo, odra może spowodować zapalenia mózgu i płuc, a RSV jest główną przyczyną hospitalizacji dzieci z powodu ostrego zapalenia oskrzelików, zapalenia oskrzeli i płuc.

Profilaktyka w chorobach wywołanych przez paramyksowirusy opiera się głównie na szczepieniach ochronnych. Skuteczne szczepionki przeciwko odrze i śwince znacznie zmniejszyły liczbę przypadków tych chorób na świecie. Jednakże dla niektórych wirusów, mimo intensywnych badań, nadal nie opracowano skutecznej szczepionki, a nowo zatwierdzona szczepionka przeciw RSV jest na razie rekomendowana dla ciężarnych i osób w podeszłym wieku [26–28].

Wirusy z tej rodziny rozprzestrzeniają się głównie drogą kropelkową oraz przez bezpośredni kontakt z wydzielinami osób zakażonych [29,30].

4.2.7 *Parvoviridae*

To rodzina małych (23–28 nm średnicy wirionu), bezosłonkowych wirusów infekujących zwierzęta oraz ludzi. Ich materiał genetyczny to jednoniciowy DNA. Rodzina ta dzieli się na dwie podrodziny i 14 rodzajów.

Do zainfekowania komórki gospodarza parwowirusy wykorzystują endocytozę zależną od klatryny. Zawartość endosomów zostaje uwolniona w przestrzeni około-jądrowej. Kapsydy są następnie transportowane przez pory jądrowe do wnętrza jądra komórkowego, gdzie dopisywana jest nić komplementarna do ssDNA, po czym dochodzi do replikacji wirusowego materiału genetycznego. Do transkrypcji jest używana maszyna komórkowa gospodarza.

Potomne cząstki wirusowe są składane w jądrze komórkowym a do ich uwolnienia dochodzi na skutek lizy komórki [31].

Najważniejszymi przedstawicielami tej rodziny atakującymi ludzi są ludzki parwovirus B19 (B19V) oraz ludzki bokawirus (HBoV). Są one przenoszone głównie drogą kropelkową, szczególnie na i przez osoby z niedoborem odporności. Dochodzi natomiast czasem do zainfekowania osób zdrowych. Parwovirus wywołuje często wysypki i bóle stawowe. Podczas zakażenia mogą wystąpić również wybroczyny na twarzy oraz zespół rękawiczkowo-skarpetkowy. HBoV typu 1 ma natomiast większe powinowactwo do układu oddechowego- wywołuje on różnorodne objawy zakażenia dróg oddechowych o przebiegu od łagodnego po ciężki. Infekcje te mogą przyczyniać się również do zapalenia oskrzelików płucnych, płuc czy krup. Jest to jeden z trzech głównych czynników etiologicznych wywołujących u człowieka infekcje układu oddechowego. Wirus ten może odpowiadać za nawet 20% zakażeń. Ponadto, wirus ten może także infekować układ pokarmowy, wywołując dodatkowe objawy takie jak biegunka oraz wymioty. HBoV typu 2-4 wywołują głównie choroby dróg pokarmowych o różnej intensywności objawów. W przebiegu choroby obserwowane są również ból gardła, trudności w oddychaniu oraz niedotlenienie krwi [32,33].

4.2.8 *Picornaviridae*

Jest to rodzina małych wirusów o średnicy ikosaedralnych cząsteczek około 30 nm. Nie posiadają one osłonki a ich materiał genetyczny to ssRNA o dodatniej polarności. Do rodziny tej należą, między innymi, aftowirusy, hepatowirusy, enterowirusy i rinowirusy [34].

Pikornawirusy posiadają zróżnicowane cykle życiowe; niektóre z nich wnikają do komórek gospodarza poprzez endocytozę, inne jedynie wpuszczają materiał genetyczny do komórki. Wirusy z tej rodziny wykorzystują komórkowe czynniki inicjacyjne w celu zapoczątkowania translacji swojego genomu. W procesie transkrypcji dochodzi również do replikacji genomu wirusowego. Wirusy potomne są formowane z nadprodukowanych białek z użyciem dużej ilości proteaz a złożone wiriony mogą opuścić komórkę gospodarza po jej zniszczeniu na drodze lizy [31].

Ze względu na choroby układu oddechowego najważniejszymi przedstawicielami tej rodziny są enterowirusy oraz rinowirusy. Te ostatnie odpowiadają za większość zachorowań na przeziębienie; u dzieci są to średnio dwie infekcje rocznie, u dorosłych jedna. Szczególnie

narażone na powikłania oraz cięższe objawy choroby są osoby o osłabionym układzie odpornościowym, chorujące na astmę oraz choroby przewlekłe [35].

Wirusy te mogą być przenoszone na różne sposoby: drogą fekalno-oralną, przez kontakt bezpośredni lub drogą kropelkową. Są odporne na warunki środowiskowe. Zwykle wywołują klasyczne objawy przeziębienia, które trwają około tygodnia; zaliczają się do nich: kaszel, ból gardła, ból głowy, kichanie, gorączka, niedrożność dróg oddechowych i inne. W bardziej poważnych przypadkach zakażenie rinowirusem może prowadzić do ostrego zapalenia ucha środkowego, zapalenia błony śluzowej nosa i zatok przynosowych, podgłośniowego zapalenia krtani- tak zwanego krupu, zapalenia oskrzelików a nawet zapalenia płuc. Podczas rutynowych badań u lekarzy pierwszego kontaktu nie praktykuje się zwykle wykonywania badań na obecność tych wirusów. Komercyjnie dostępne są natomiast testy PCR. Choroby wywoływane przez rinowirusy są leczone objawowo [36].

4.2.9 *Pneumoviridae*

Rodzina wirusów *Pneumoviridae* obejmuje ważne patogeny oddechowe, które są głównymi przyczynami infekcji dolnych dróg oddechowych u dzieci, a także mogą powodować choroby u dorosłych. Są to duże, osłonkowe wirusy o morfologii sferycznej lub filamentowej, ich genom stanowi niesegmentowany jednonicowy RNA o ujemnej polarności. Dwa najbardziej znaczące ekonomicznie patogeny w tej rodzinie to syncytialny wirus oddechowy (RSV) i metapneumowirus ludzki (hMPV), które są odpowiedzialne za szeroki zakres infekcji oddechowych, od łagodnych objawów przypominających przeziębienie po poważne infekcje, takie jak zapalenie oskrzeli i zapalenie płuc [37].

Pneumowirusy łączą się z receptorami komórek ssaczych za pomocą glikoprotein obecnych na ich powierzchni. Po przyłączeniu się dochodzi do połączenia błony komórkowej z osłonką wirusową i uwolnienie zawartości wirusa do wnętrza komórki. Następnie w cytoplazmie zachodzi replikacja i transkrypcja materiału genetycznego wirusa. Glikoproteiny powierzchniowe są produkowane, modyfikowane posttranslacyjnie i transportowane poprzez retikulum endoplazmatyczne oraz aparat Golgiego, gdzie dojrzewają. Nukleokapsydy są następnie pakowane i uwalniane poprzez odpączkowanie z błony komórkowej [38].

RSV jest najczęstszą przyczyną zapalenia oskrzeli i zapalenia płuc u niemowląt i małych dzieci. Infekcje mogą być szczególnie ciężkie u noworodków, osób z osłabionym układem

odpornościowym oraz u osób starszych. Mimo że większość infekcji u dzieci ma łagodny przebieg, RSV jest główną przyczyną hospitalizacji dzieci z powodu infekcji dolnych dróg oddechowych na całym świecie. Wirus ten może powodować zapalenie oskrzelików, zapalenie płuc oraz krup. Przeniesienie się pierwszej infekcji tym wirusem na dolne drogi oddechowe jest obserwowane nawet u połowy zakażonych noworodków i małych dzieci. Nawet do 3% zakażonych dzieci wymaga hospitalizacji [39].

hMPV, wywołuje objawy podobne do RSV. Tak jak RSV, hMPV jest szczególnie niebezpieczny dla małych dzieci, osób starszych oraz pacjentów z osłabioną odpornością. hMPV może powodować choroby górnych i dolnych dróg oddechowych, w tym zapalenie krtani, zapalenie oskrzeli oraz zapalenie płuc. Objawy infekcji mogą obejmować gorączkę, kaszel, duszności oraz ogólne symptomy przypominające gripę [40].

Na ludzkiego metapneumowirusa nie istnieje szczepionka, natomiast od niedawna na rynek został wprowadzony preparat chroniący przed RSV. Szczepionki Arexvy oraz Abrysvo zostały dopuszczone na rynek przez Europejską Agencję Leków, jak również amerykańskie FDA. Są one przeznaczone dla osób w wieku 60+. Druga z wymienionych szczepionek może być również stosowana u kobiet w ciąży tworząc profilaktyczną ochronę niemowlęcia do 6 miesiąca życia. Są to szczepionki podjednostkowe stworzone na bazie rekombinowanych białek wirusowych. Ich produkcja odbywa się *in vitro* w linii komórkowej CHO. Nie są one refundowane w Polsce, a jedna dawka tego preparatu kosztuje w momencie powstawania tej pracy ponad 1000 zł [41,42].

4.2.10 *Poxviridae*

Rodzina wirusów *Poxviridae* obejmuje patogeny zdolne do infekowania zwierząt, w tym ludzi. Wśród nich znajdują się wirusy odpowiedzialne za poważne choroby, takie jak oспа prawdziwa (variola virus, VARV), która została wyeradykowana dzięki globalnym wysiłkom szczepiennym oraz wirus wywołujący ospę krowią (vaccinia virus, VACV). Chociaż większość zainteresowania pokswirusami koncentruje się na ich wpływie na skórę i tkanki, niektóre z nich mogą powodować również objawy ze strony układu oddechowego, zwłaszcza w fazie początkowej infekcji. W niektórych przypadkach może dochodzić także do dolegliwości układu pokarmowego. W 2022 roku zaobserwowano ogniska wirusa ospy małpiej Mpox (ang.

monkeypox) należącego do tej rodziny. Powoduje on u ludzi gorączkę, bóle mięśni i głowy, wysypkę oraz powiększenie węzłów chłonnych.

Ze względu na szybkie rozprzestrzenianie się tych wirusów dokładna i szybka diagnostyka jest szczególnie ważnym zagadnieniem umożliwiającym izolację i leczenie, co potwierdzają przypadki małpiej ospy wykrytej na przełomie 2022-2023 roku u ponad 87000 osób w 110 krajach [43].

Pokswirusy wnikają do komórek przez bezpośrednią fuzję osłonki wirusowej z błoną komórkową, uwalniając zawartość wirionu do cytoplazmy. Tam dochodzi do replikacji oraz transkrypcji materiału genetycznego. Do składania potomnych wirusów dochodzi w wirosomach, zwanych czasem fabrykami wirusów. Wiriony potomne mogą być uwalniane poprzez egzocytotę, pączkowanie lub rozpad komórki gospodarza [44].

Do zakażenia dochodzi poprzez kontakt bezpośredni, jak również droga kropelkową, co świadczy o obecności wirusów w układzie oddechowym chorych.

Kontrola i prewencja opierają się na szybkiej identyfikacji przypadków, izolacji zakażonych osób, stosowaniu środków ochrony osobistej i w przypadku dostępności, szczepieniu przy zastosowaniu szczepionki opartej na wirusie vaccinia [45,46].

4.2.11 Podsumowanie

W celu lepszego zobrazowania podobieństwa objawów występujących w zakażeniach wywoływanych przez powyższe rodziny wirusów, zbiór objawów przedstawiono w Tabeli 2.

Występowanie tych objawów lub ich częstość może różnić się w zależności od układu odpornościowego danego organizmu, wieku pacjenta, innych przebytych chorób czy nawet, jako wyjście wirusa z cyklu latencji - zachorowanie lub szczepienie na ospę wietrzną i półpasiec.

Tabela 2. Objawy wywoływane przez infekcje wirusami należącymi do poszczególnych rodzin

Objaw	<i>Adenoviridae</i>	<i>Coronaviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Matonaviridae</i>	<i>Orthomyxovirida</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Parvoviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>	<i>Pneumoviridae</i>	<i>Poxviridae</i>
Gorączka	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ból głowy	✓	✓			✓	✓		✓	✓	✓
Ból mięśni	✓	✓	✓		✓	✓				✓
Kaszel	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Ból gardła	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Katar- nieżyt nosa	✓	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Duszności	✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓	
Ból w klatce piersiowej	✓	✓			✓			✓	✓	
Zapalenie gardła	✓	✓	✓		✓	✓	✓			
Zapalenie krtani	✓	✓			✓	✓	✓			
Zapalenie oskrzeli	✓	✓			✓	✓	✓		✓	
Zapalenie płuc	✓	✓			✓	✓	✓		✓	
Nieżyt układu pokarmowego	✓	✓			✓		✓			
Utrata węchu i smaku		✓								
Zapalenie spojówek		✓		✓	✓					
Powiększenie węzłów chłonnych	✓	✓	✓	✓	✓	✓				✓
Zmęczenie	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Wysypka			✓	✓		✓		✓		✓

4.3 Metody diagnostyczne w chorobach wirusowych

4.3.1 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym - qPCR

Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *quantitative polymerase chain reaction*) - znana także jako reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym, jest jedną z najszerzej stosowanych metod służących do wykrywania patogenów. Jest to szybka, czuła i specyficzna metoda wykrywania DNA lub RNA patogenów co uczyniło ją w tej chwili podwaliną diagnostyki różnorodnych zakażeń. Została ona opracowana pod koniec lat 90 XX wieku i od tamtego czasu wielokrotnie ulepszana.

Metoda ta opiera się na klasycznej łańcuchowej reakcji polimerazy umożliwiającej wykrycie produktu w próbce w czasie rzeczywistym dzięki barwnikowi interkalującemu lub specyficznym sondom ze znacznikami fluorescencyjnymi. Podczas zachodzenia reakcji specyficzne startery przyłączają się do matrycy a polimeraza umożliwia amplifikację fragmentów. Po powielaniu marker fluorescencyjny przyłącza się do rozpoznawanej cząsteczki. Fluorescencja zostaje wzbudzona i zmierzona pomiędzy każdym cyklem reakcji. Wzrost obserwowanej fluorescencji jest proporcjonalny do ilości produktu PCR, co umożliwia śledzenie reakcji w czasie rzeczywistym. Gdy sygnał uzyskany w próbce znacznie przekroczy sygnał tła, możemy stwierdzić, że w próbce zachodzi oczekiwana reakcja. Cykl, w którym taka zmiana jest wykrywana, jest nazywany cyklem progowym (z ang. *threshold cycle* – Ct) [47,48].

Zastosowanie qPCR w diagnostyce jest bardzo szerokie, od wykrywania infekcji wirusowych, takich jak zakażenia powodowane przez wirusy grypy, żółtaczki czy HIV, infekcji bakteryjnych, np. *Mycobacterium tuberculosis* czy pasożytniczych jak malaria. Dodatkowo, często spotykanym zastosowaniem tej metody jest wykrywanie genów antybiotykooporności u bakterii [49].

Ze względu na wysoką czułość metoda ta jest podatna na zanieczyszczenia pochodzące z innych próbek lub z otoczenia, prowadzące do wyników fałszywie pozytywnych oraz negatywnych. Wyniki fałszywie pozytywne i fałszywie negatywne mogą być również powodowane przez rozpad sond, np.: w wyniku nieprawidłowego przechowywania. Z tego względu kluczowe jest stosowanie różnego rodzaju kontroli reakcji podczas wykonywania każdego badania, to jest kontroli pozytywnej, kontroli negatywnej, NTC- kontroli bez matrycy. Analiza pozyskanych wyników wymaga natomiast technicznego zrozumienia działania metody i

wyspecjalizowanego personelu. Urządzenia potrzebne do wykonania reakcji qPCR stają się coraz bardziej dostępne cenowo, lecz aby laboratorium mogło prowadzić takie badania, niezbędny jest wydatek kilkudziesięciu do kilkuset tysięcy złotych [50,51].

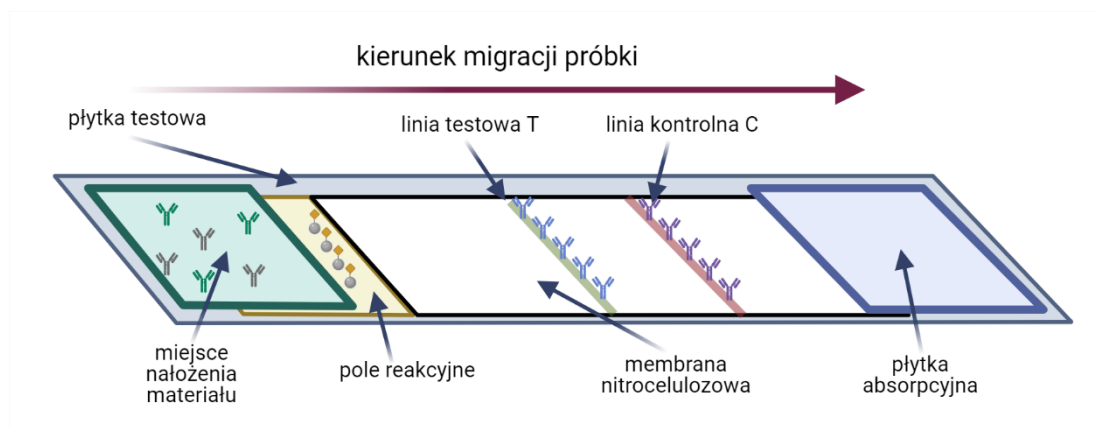
Pandemia COVID-19 uwydatniła rolę qPCR w diagnostyce chorób zakaźnych, podczas której była stosowana na najszerzą dotąd skalę i rozpromowana przez media niemal wśród wszystkich ludzi.

4.3.2 Testy kasetkowe (immunochematografia)

Szybkie testy immunochematograficzne, w języku angielskim nazywane LFT (z ang. *lateral flow test*) lub LFD (z ang. *lateral flow device*), są prostymi w użyciu i wykonaniu testami diagnostycznymi, służącymi głównie do samotestowania w warunkach domowych, bez konieczności posiadania jakiegokolwiek sprzętu laboratoryjnego.

Zasada działania opiera się na połączeniu chromatografii bibułowej stosowanej już od lat 40 XX wieku oraz technikach immunopowinowactwa opracowanych w latach 60. i 70. XX wieku. Techniki te połączono w latach 80. XX wieku a pierwszy test immunochematograficzny trafił na rynek w 1988 roku. Był to test Clearblue umożliwiający wykrywanie hormonów związanych z ciążą w warunkach domowych [52].

Testy składają się zwykle z kilku błon połączonych ze sobą i przytwierdzonych do plastikowego szkieletu (Ryc. 1). Pierwsza z nich będąca polem nałożenia próbki ma na celu odfiltrowanie niepożądanych cząsteczek, takich jak krwinki czy komórki nabłonka, które mogą zablokować przepływ wewnątrz testu. Jest ona połączona z kolejną membraną będącą polem reakcyjnym – w tym miejscu znajdują się wyznakowane antygeny lub przeciwciała (zależy to od rodzaju wykonywanego testu). Odczynniki, którymi opłaszczona jest ta warstwa, często występują w formie liofilizowanej, aby ich przemieszczanie się wewnątrz testu możliwe było dopiero w obecności buforu. Pole reakcyjne jest połączone z membraną nitrocelulozową, na której znajduje się pole testowe i gdzie możliwe jest odczytanie wyniku testu. Znajdują się tam w określonych miejscach (najczęściej liniach) cząsteczki specyficzne dla wykrywanych celów molekularnych oraz kontroli poprawności wykonania testu. Na końcu błony nitrocelulozowej znajduje się medium absorbcyjne gwarantujące odpowiedni przepływ na całej długości testu [53].



Rycina 1 Schemat budowy testu immunochematograficznego znajdującego się wewnątrz plastikowych kasetek

Testy te zawdzięczają swoją popularność bardzo niskiej cenie, łatwej dostępności i prostocie wykonania. Podczas pandemii COVID-19 bardzo popularne stały się testy do samodiagnozy zakażenia wirusem SARS-CoV-2 dostępne niemal w każdym sklepie. Przyczyniło się to znacznie do rozpowszechnienia tego rodzaju środków i wprowadzenia na rynek również tak zwanych testów „combo” – wykrywających kilka patogenów na raz. Najpopularniejsze z nich wykrywają grype A i B, RSV oraz SARS-CoV-2 [54].

Testy immunochematograficzne mają szczególnie wysokie znaczenie w krajach rozwijających się, gdzie dostęp do infrastruktury laboratoryjnej oraz medycznej jest ograniczony. Umożliwiły one wykrywanie takich chorób zakaźnych jak gruźlica u osób chorych na AIDS, powodując ich skuteczniejsze leczenie [55].

Zwykle testy kasetkowe mają niższy poziom specyficzności i czułości niż laboratoryjne testy diagnostyczne. Może to skutkować otrzymywaniem fałszywie negatywnych lub fałszywie pozytywnych wyników. Na podstawie przeprowadzonego testu niemożliwe jest też uzyskanie danych ilościowych, co jest ważną informacją przy monitorowaniu efektywności leczenia. Na działanie takiego testu mogą też wpływać warunki zewnętrzne takie jak wilgotność czy temperatura powietrza oraz w bardzo dużym stopniu błędy popełnianie przez niedoświadczonych użytkowników [56].

4.3.3 Systemy zamknięte

Systemy zamknięte są znaczącym postępem w dziedzinie diagnostyki, a w szczególności w wykrywaniu chorób zakaźnych. Systemy te integrują wszystkie kroki procesu, takie jak przygotowanie próbki, powielenie kwasów nukleinowych oraz detekcja w jednym urządzeniu.

Użytkownik najczęściej nie ma żadnego fizycznego wpływu na przebieg reakcji. Dzięki temu umożliwiają one szybkie, dokładne i zautomatyzowane badanie próbek. Każdy z tych systemów został zaprojektowany do szybkiej i efektywnej diagnostyki różnych patogenów, wykorzystując zamknięte, jednorazowe kasetki lub wkłady, co jest kluczowe w minimalizowaniu ryzyka kontaminacji i zapewnieniu precyzyjnych wyników diagnostycznych. Użytkowanie jak również zakup tego typu urządzeń wiąże się z wysokimi kosztami jednorazowych kasetek do nich dedykowanych, przez co wiele ośrodków nie decyduje się na ich zakup.

Na rynku istnieje wiele tego rodzaju systemów, między innymi:

1.Cepheid i system GeneXpert: GeneXpert jest szeroko stosowany do szybkiej diagnostyki różnych infekcji, w tym gruźlicy (TB) i jej form lekoopornych, wirusowego zapalenia wątroby typu C (HCV), ludzkiego wirusa niedoboru odporności (HIV) oraz gronkowca opornego na metycylinę (MRSA). System opiera się na technologii PCR w czasie rzeczywistym i jest doceniany przez użytkowników za swoją szybkość (20-100 minut) oraz łatwość użycia [57].

2. BioMérieux i system BioFire FilmArray: System FilmArray to kolejny przykład zamkniętego systemu diagnostycznego, który umożliwia testowanie szerokiego spektrum patogenów (20-30) z jednej próbki. FilmArray integruje procesy lizy, amplifikacji, wykrywania i analizy, dostarczając wyniki w ciągu około godziny [58].

3.Roche i systemy ePlex oraz Cobas Liat: Cobas Liat to kompaktowe urządzenie przeznaczone do szybkich testów diagnostycznych w punktach opieki (z ang. *point of care*), które wykorzystuje technologię PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania patogenów takich jak wirusy grypy A i B, RSV, SARS-CoV-2 oraz *Streptococcus* grupy A, jak również *Clostridioides difficile*. System ePlex jest oparty na mikromacierzach, w których zachodzą reakcje odwrotnej transkrypcji oraz PCR. Jest to system posiadający szeroką gamę testów wykrywających wirusy oraz bakterie [59,60].

4.Abbott i system ID NOW: ID NOW jest jednym z najszybszych dostępnych systemów diagnostycznych, dostarczającym wyniki w ciągu kilku minut. Jest on używany głównie do wykrywania wirusa grypy, RSV, SARS-CoV-2 oraz *Streptococcus* grupy A [61].

5.Quidel i system Sofia: Sofia wykorzystuje technologię fluorescencyjnego testu immunologicznego do szybkiego wykrywania patogenów. Chociaż nie jest to system oparty na

PCR, jest przykładem zamkniętego systemu diagnostycznego, który minimalizuje ryzyko kontaminacji i ułatwia obsługę. System ten posiada testy umożliwiające wykrywanie między innymi grypy, RSV, SARS-CoV-2 oraz różnorodnych bakterii [62].

4.3.4 ELISA

Test immunoenzymatyczny (ELISA- ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) jest często stosowany w laboratoriach diagnostycznych do wykrywania jakościowego oraz ilościowego antygenów lub przeciwciał związanych z chorobami zakaźnymi. Jest to bardzo ważna metoda wykorzystywana zarówno w diagnostyce, epidemiologii, jak i podczas badań naukowych [63].

ELISA jest techniką płytkową zaprojektowaną w celu wykrywania substancji zawartych w roztworze, takich jak białka, peptydy, przeciwciała, antygeny czy hormony.

Testy diagnostyczne ELISA najczęściej stosuje się do wykrywania wirusów takich jak HIV, grypa, HCV oraz HBV. Test na obecność wirusa HIV wykrywa przeciwciała skierowane przeciwko temu wirusowi w krwi obwodowej, co jest bardzo ważne w diagnozowaniu i leczeniu HIV oraz AIDS. Stosuje się je także do wykrywania alergii pokarmowych oraz w toksykologii do wykrywania niektórych rodzajów narkotyków [64,65].

Ze względu na sposób detekcji możemy wyróżnić cztery główne typy testów ELISA:

ELISA bezpośrednia (z ang. *direct ELISA*): W tym typie testu antygen jest immobilizowany na powierzchni płytki. Następnie dodawane są swoiste wobec antygeny przeciwciała skoniugowane z enzymem. Po dodaniu substratu dla enzymu, reakcja produkująca sygnał (zwykle barwny) wskazuje na obecność antygeny.

ELISA pośrednia (z ang. *indirect ELISA*): Podobnie jak w metodzie bezpośredniej, antygen jest immobilizowany na płytce. Jednak tutaj stosuje się dwa przeciwciała: nieznakowane przeciwciała pierwszorzędowe, swoiste wobec antygeny, a następnie znakowane przeciwciała drugorzędowe, swoiste wobec gatunku, z jakiego zostały wyprowadzone przeciwciała pierwszorzędowe. Ta metoda zwiększa czułość testu dzięki amplifikacji sygnału.

ELISA typu "sandwich" (z ang. *sandwich ELISA*): W tym wariantcie testu przeciwciała wychytujące swoiste wobec antygeny jest immobilizowane na płytce. Po dodaniu próbki, antygen wiąże się z przeciwciałami. Następnie dodawane są przeciwciała detekcyjne

skoniugowane z enzymem, które również wiążą się z antygenem (wykrywają inny epitop), tworząc "kanapkę".

ELISA kompetycyjna (z ang. *competitive ELISA*): W tej metodzie antygen z próbki i antygen skoniugowany z enzymem konkurują o miejsce wiązania przeciwciał immobilizowanych na płytce. Im więcej antygeny jest w próbce, tym mniej antygeny znakowanego wiąże się z przeciwciałami immobilizowanymi na płytce, co skutkuje słabszym sygnałem. Ta metoda jest stosowana do wykrywania niewielkich ilości antygeny [66].

Niezależnie od typu testu, w końcowym jego etapie dodawany jest substrat dla enzymu, z którym koniugowane są przeciwciała lub antygen. Efektem reakcji enzymatycznej może być zmiana barwy roztworu, luminescencja (testy CLIA) lub fluorescencja. Następnie dokonywany jest pomiar absorbancji lub intensywności sygnału w specjalnie do tego przeznaczonych czytnikach płytek. Na podstawie krzywej wzorcowej wykonanej przy zastosowaniu preparatu o znanym stężeniu antygeny, można określić zawartość antygeny w próbce.

ELISA jest wysoce czułą i specyficzną metodą umożliwiającą wykrycie małych ilości przeciwciał i antygenów co czyni ją bardzo skutecznym narzędziem diagnostycznym. Umożliwia ona uzyskanie wyników jakościowych jak i ilościowych, jest skalowalna w prosty sposób a różne jej typy mogą być stosowane w zależności od potrzeby diagnostycznej.

W zależności od typu metody oraz stosowanych odczynników, jej koszty mogą się znacząco różnić. Niektóre zestawy do przeprowadzania testów ELISA są tanie, natomiast techniki takie jak ELISA typu *sandwich* są z zasady droższe ze względu na wykorzystanie większej ilości przeciwciał. Do prawidłowego przeprowadzenia tego rodzaju testów niezbędny jest także przeszkolony personel posiadający umiejętności techniczne oraz wiedzę niezbędną do interpretacji wyników testu.

4.3.5 Immunohistochemia

Immunohistochemia (IHC) jest metodą szeroko wykorzystywaną w histopatologii w celu detekcji specyficznych antygenów wewnątrz tkanek. Umożliwia ona diagnozowanie infekcji poprzez wykorzystanie oddziaływań antygen-przeciwciała w celu zwizualizowania antygenów i określenia ich lokalizacji w tkance. Stosuje się ją głównie w skrawkach mikroskopowych tkanek, do których są dodawane przeciwciała skierowane przeciwko antygenom poszukiwanego patogenu. W celu uwidocznienia antygenów najczęściej stosuje się

przeciwciała drugorzędowe wyznakowane enzymem (np. peroksydazą chrzanową), złotem koloidalnym lub fluoroforem. Metoda ta jest szczególnie ważna w przypadku ograniczonej ilości dostępnej próbki lub gdy patogen występuje w organizmie w bardzo małej ilości. Technika ta służy również do wykrywania patogenów trudnych bądź niemożliwych w hodowli, np. wirusów Ebola czy Nipah, ze względu czwarty poziom klasy zabezpieczeń (z ang. *biosafety level-4*, BSL-4), który spełnia ograniczona liczba jednostek na świecie [67–69].

IHC znalazła zastosowanie także w weterynarii, gdzie używa się jej do wykrywania szeregu patogenów takich jak wirusy, bakterie, priony oraz pasożyty. Do jej zalet należą niskie koszty wykonania badania, możliwość analizy próbek z blochków parafinowych nawet po długotrwałym przechowywaniu i szeroki wachlarz wykrywanych patogenów ze względu na dostępność dużej ilości przeciwciał komercyjnych [70].

Wśród minusów IHC można wyróżnić skomplikowany protokół, który wymaga precyzyjnej kontroli przetwarzania tkanki, selekcji przeciwciał i warunków barwienia. Brak dokładności na którymkolwiek etapie może prowadzić do fałszywie ujemnych bądź dodatnich wyników. Interpretacja wyników może być subiektywna i wymaga specjalistycznej wiedzy zarówno w zakresie patologii, jak i chorób zakaźnych.

4.3.6 Hodowle *in vitro*

Użycie hodowli komórkowych jest jedną z fundamentalnych metod w mikrobiologii i wirusologii. Początki tej metody sięgają 1913 roku, kiedy wirus krowianki został po raz pierwszy namnożony w komórkach. W diagnostyce hodowle *in vitro* były stosowane od lat 50. do końca lat 70. XX wieku, kiedy to tańsze i szybsze metody zaczęły je wypierać. Metoda ta polega na propagowaniu komórek w kontrolowanych warunkach, a następnie na wprowadzaniu do nich próbek z potencjalnym patogenem. Po odpowiednio długiej hodowli i namnażaniu wirusa, które może trwać od 1 doby do kilku tygodni, hodowle są poddawane obserwacji mikroskopowej mającej na celu potwierdzenie efektu cytopatycznego. Może on przybierać różnorodne formy, takie jak: puchnięcie, zmniejszanie, zaokrąglanie się komórek, tworzenie syncytiów lub całkowite zniszczenie warstwy komórek. Metoda ta rozwijała się wraz z rozwojem technik laboratoryjnych oraz standaryzacji związanej z bankami komórek, firmami tworzącymi gotowe pożywki hodowlane i zmianą naczyń hodowlanych ze szklanych na tworzywa sztuczne [71,72].

Hodowle komórkowe zostały wyparte przez techniki molekularne głównie ze względu na szybkość protokołu i czułość. Techniki molekularne, takie jak PCR, analiza metagenomiczna czy szybkie testy kasetkowe, umożliwiają wykrywanie specyficznych sekwencji genetycznych wirusów bezpośrednio z próbki pacjenta, co skraca czas oczekiwania na wyniki z dni lub tygodni do kilku godzin. Dodatkowo, metody nowych generacji są w stanie wykryć wirusy nawet przy bardzo niskim mianie wirusa, gdzie tradycyjne hodowle mogłyby nie wykazać obecności patogenu. Techniki molekularne minimalizują również ryzyko skażenia próbek i wymagają mniej pracy laboratoryjnej. Wreszcie, umożliwiają one badanie wirusów, które są trudne lub niemożliwe do hodowania w warunkach laboratoryjnych, otwierając nowe drogi dla badań i diagnostyki. Hodowle komórkowe są natomiast jedyną z przedstawionych technik, która potwierdza obecność integralnego, aktywnego wirusa [73,74].

4.3.7 Podsumowanie metod wykrywania

Większość przedstawionych metod wykrywania zakażeń jest stale rozwijana i udoskonalana. Na rynek są wprowadzane coraz tańsze, dokładniejsze i bardziej przyjazne w obsłudze urządzenia diagnostyczne umożliwiające szybkie rozpoznanie patogenu. Niektóre z nich, takie jak hodowle komórkowe, są wypierane przez nowsze metody, często jednak pozostają w użyciu podczas badań naukowych.

Nie można pominąć wpływu ostatniej pandemii Covid19, która znacznie wpłynęła na rozwój testów diagnostycznych, jak również na świadomość społeczeństwa o tych testach. Wzmogła także dostęp do środków samo-testowania, których ilość znacznie wzrosła a cena spadła.

Poniżej przedstawiam Tabelę 3 z krótkim porównaniem opisanych technik diagnostycznych, stosowanych w detekcji infekcji wirusowych.

*Tabela 3 Porównanie głównych cech wybranych technik diagnostycznych. *Cena wykonania testów oszacowana na podstawie analizy dostępnych komercyjnie testów w czasie tworzenia niniejszej pracy*

	qPCR	Testy kasetkowe (immunochromatografia)	Systemy zamknięte	ELISA	Immunohistochemia	Hodowle komórkowe
Czas wykonania	1,5-2godziny	10-20 minut	30-90 minut	Od kilku godzin do całego dnia	Od kilku godzin do kilku dni	3 dni do kilku tygodni
Cena (zł)*	300-500	Od 5	200-1200	50-300	100-1000	200-1500
Dokładność testu	Bardzo wysoka	Średnia do wysokiej	Bardzo wysoka	Bardzo wysoka	Wysoka	Średnia do wysokiej
Czytelność wyniku	Prosty odczyt wyniku	Bardzo prosty odczyt wyniku	Bardzo prosty odczyt wyniku	Prosty odczyt wyniku	Skomplikowany w interpretacji	Skomplikowany w interpretacji
Wykwalifikowany personel	Niezbędne wykształcenie kierunkowe	Brak wymagań- samo testowanie	Niezbędne wykształcenie kierunkowe	Niezbędne wykształcenie kierunkowe	Niezbędne wykształcenie kierunkowe	Niezbędne wykształcenie kierunkowe

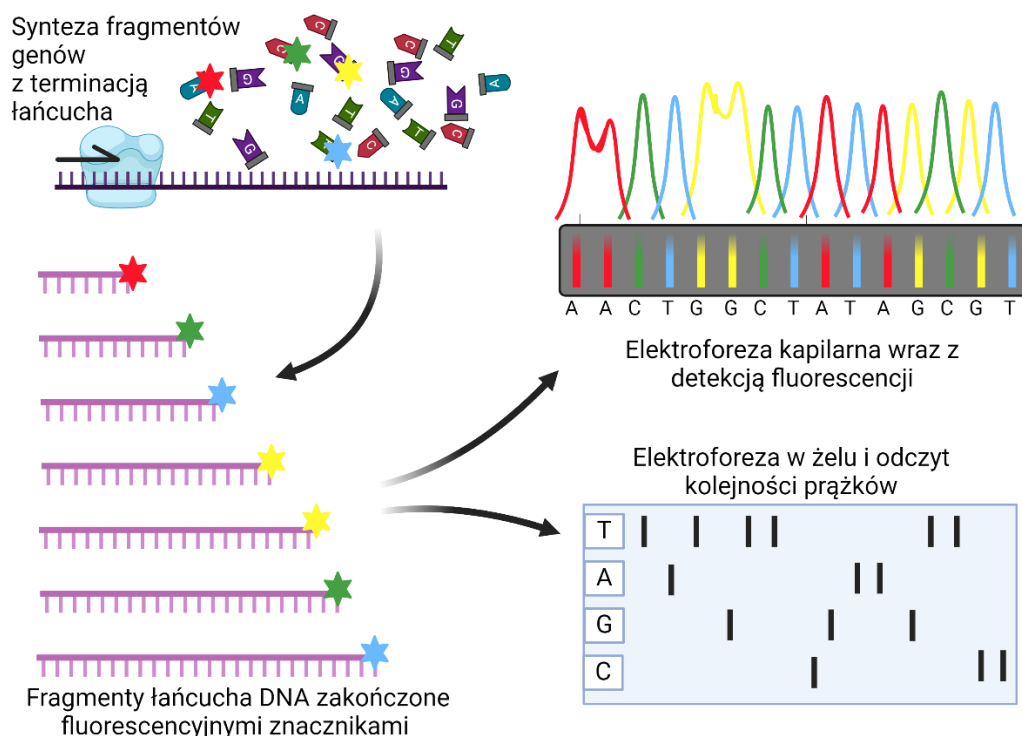
4.4 Rozwój metod sekwencjonowania

Na przestrzeni ostatnich niemalże 50 lat w technikach sekwencjonowania kwasów nukleinowych dokonano ogromnych zmian i postępów. W poniższym rozdziale przedstawię krótko historię rozwoju głównych metod sekwencjonowania.

4.4.1 Metoda Sanger

W 1977 r. brytyjski biochemik Fryderyk Sanger wraz ze swoim zespołem opracował metodę odczytywania kolejności nukleotydów zawartych we fragmentach DNA poprzez ich kopiowanie z użyciem DNA-zależnej polimerazy DNA [75]. Metoda ta, nazywana również metodą terminacji polega na wbudowywaniu dideoksynukleotydów (ddNTPs) kończących proces replikacji DNA. Podczas zachodzenia tej reakcji syntetyzowana jest nić komplementarna od końca 3' rozpoczynająca się od startera komplementarnego do matrycy DNA. Polimeraza wydłuża syntetyzowany fragment przy użyciu klasycznych deoksynukleotydów (dNTPs) i znakowanych fluorescencyjnie ddNTP, które kończą proces elongacji. Takie fragmenty są następnie rozdzielane w żelu w celu określenia sekwencji nukleotydowej [76]. Metoda ta jest znana z bardzo wysokiej dokładności (99,999%), lecz ograniczonej długości odczytów- około 1000 par zasad [77].

Poprzez lata rozwoju tej technologii z czasem wprowadzono wiele zmian ją unowocześniających. Zmniejszono ilość naczyń reakcyjnych z czterech do jednego poprzez zastąpienie radioznakowania fosforem lub trytem przez znakowanie fluorescencyjne (Ryc. 2) [78]. Detekcja została również usprawniona poprzez wprowadzenie elektroforezy kapilarnej posiadającej wyższą czułość i rozdzielczość niż metoda klasyczna [79].



Rycina 2 Schemat zasady działania metody sekwencjonowania Sangera, przedstawia klasyczną metodę wykorzystującą elektroforezę żelową oraz nowszą odmianę tej techniki, w której stosuje się zautomatyzowane odczyty przy użyciu elektroforezy kapilarnej i fluorescencji.

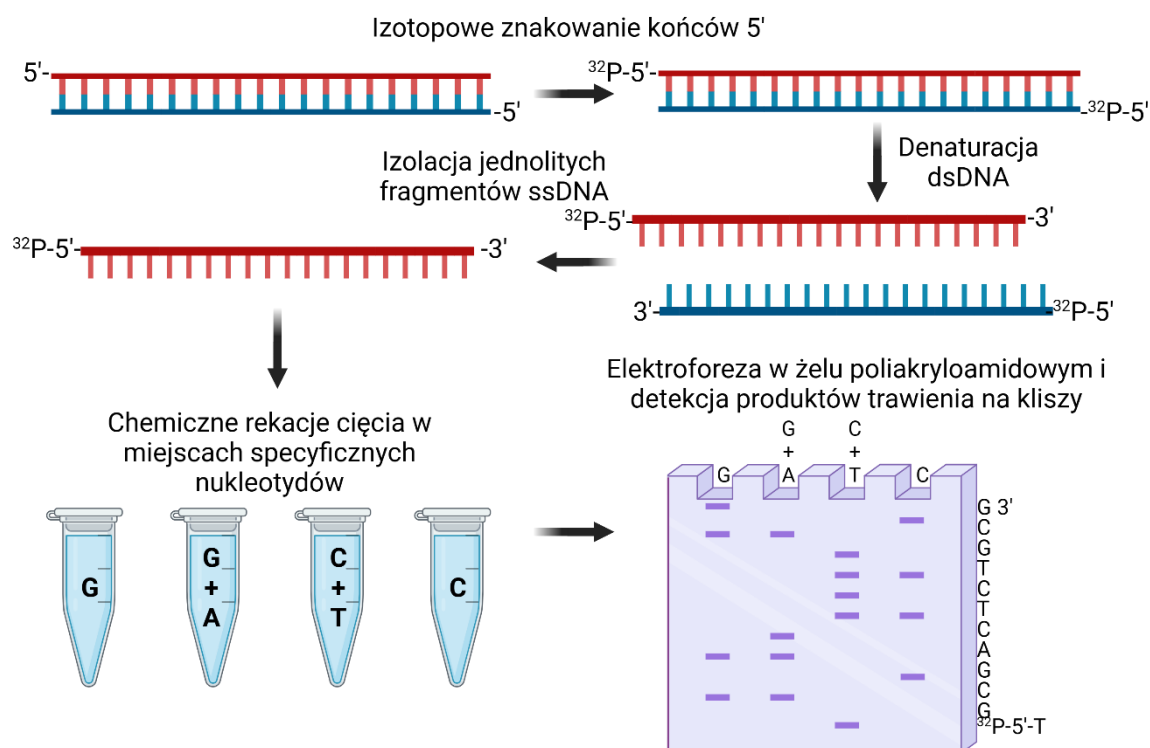
Zastąpienie znaczników radioaktywnych przez znaczniki fluorescencyjne nie tylko uczyniło proces bezpieczniejszym, ale również pozwoliło na wprowadzenie sekwencjonowania w czasie rzeczywistym z użyciem automatycznych sekwenatorów. Dzięki temu możliwe stało się szybsze odczytywanie sekwencji oraz jednoczesne przetwarzanie wielu próbek [80].

Kolejną poprawą było wprowadzenie techniki nazwanej „*shotgun sequencing*” umożliwiającej poznawanie sekwencji fragmentów dłuższych niż 1000 par zasad. Polegało ono na stworzeniu wielu nachodzących na siebie fragmentów, które były sekwencjonowane osobno, a następnie składane, co pozwalało uzyskać jedną długą sekwencję – tak zwany kontig - złożenie [81,82].

4.4.2 Metoda Maxama-Gilberta

Opublikowana w tym samym roku, co metoda Sangera, metoda Maxama-Gilberta nie opiera się na syntezie nowej nici DNA; wykorzystuje natomiast reakcję chemiczną specyficznej degradacji DNA. Polega ona na radioaktywnym znakowaniu dwuniciowego DNA poprzez przyłączanie trójfosforanów deoksyadenozyny wyznakowych izotopem fosforu ^{32}P [83]. Reakcja ta zachodzi przy działaniu kinazy polinukleotydowej. Następnie dwuniciowe cząsteczki DNA są rozdzielane na jednoniciowe, tak przygotowany ssDNA poddawany jest czterem

reakcjom chemicznym z hydrazyną, hydrazyną z chlorkiem sodu, kwasem mrówkowym lub siarczanem dimetylu (Ryc. 3). Umożliwia to cięcie jednoniciowego DNA przez piperydynę na fragmenty zakończone określonym nukleotydem [84]. Produkty tych reakcji są rozdzielane w żelu poliakryloamidowym i uwidaczniane na kliszy w celu odczytania długości produktów trawienia. Dzięki temu możliwe jest odszyfrowanie sekwencji DNA.



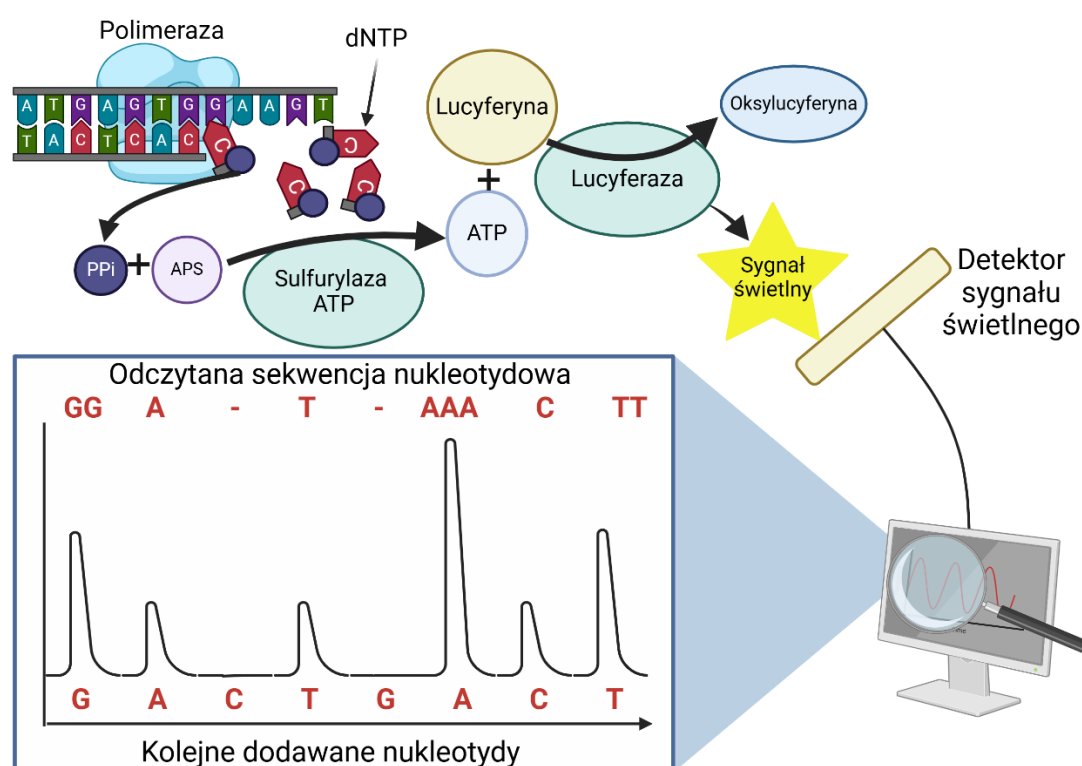
Rycina 3 Schemat przedstawiający kolejne etapy procesu sekwencjonowania metodą Maxama-Gilberta

Ze względu na problemy ze zwiększeniem skali sekwencjonowania poprzez stosowanie niebezpiecznych substancji i trudności technologiczne metoda ta została wyparta przez metodę Sangera [85].

4.4.3 Pirosekwencjonowanie

Początki tej metody sięgają połowy lat 80. XX wieku, wtedy to Pål Nyrén opisał działanie enzymów niezbędnych do przeprowadzenia pirosekwencjonowania [86,87]. Metoda pirosekwencjonowania opiera się na syntezie i wykrywaniu pirofosforanów uwalnianych podczas przyłączania się nukleotydów do nowo syntetyzowanej nici DNA. Trifosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP) podczas przyłączania przez polimerazę DNA do ssDNA uwalniają pirofosforany, które są konwertowane do ATP przez sulfurylazę ATP. Następnie ATP umożliwia przemianę lucyferyny w oksylucyferynę która generuje sygnał świetlny rejestrowany

przez kamerę ze światłoczułą matrycą CCD (Ryc. 4). Ilość otrzymanego sygnału świetlnego jest proporcjonalna do ilości przyłączonych nukleotydów. W sposób zautomatyzowany dodawane są do reakcji pojedynczo kolejne nukleotydy. Pomiędzy cyklami dodawania nukleotydów, nieprzyłączone podczas reakcji nukleotydy są degenerowane przez apyrazę [88,89]. Problem z odczytem dłuższych ciągów jednolitych nukleotydów występuje, gdy sekwencja zawiera przynajmniej 4 identyczne nukleotydy. Pirosekwencjonowanie umożliwia otrzymanie odczytów do długości około 500 par zasad [90]. Mimo swoich wad było jednak pierwszą w pełni zautomatyzowaną metodą sekwencjonowania bez konieczności rozdzielania produktów w żelu.



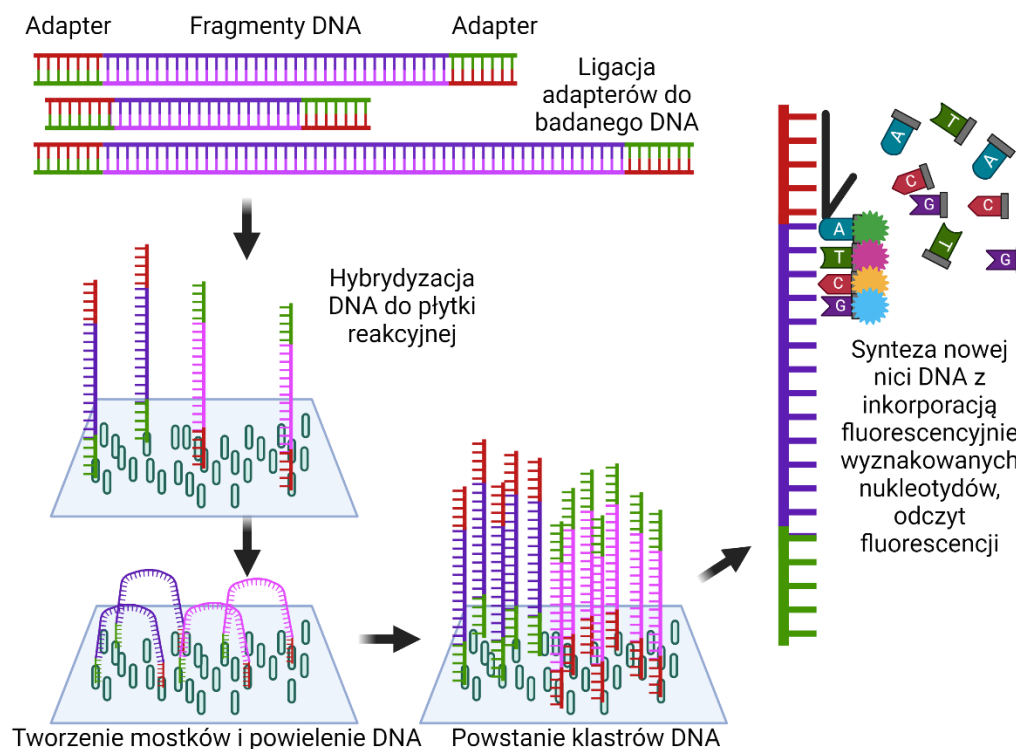
Rycina 4 Schemat działania metody pirosekwencjonowania

Rozwinięciem powyższej metody było sekwencjonowanie zastrzeżone przez firmę 454 Life Sciences, które poprzez rozwój przepustowości i wydajności zostało skomercjalizowane jako pierwsza technika sekwencjonowania następnej generacji (sekwencjonowanie drugiej generacji). Technika ta została później przejęta przez firmę Roche.

4.4.4 Illumina (SBS-sekwencjonowanie przez syntezę)

Sekwencjonowanie zastosowane w sekwenatorze firmy Illumina jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod drugiej generacji. Pozwala ona na jednoczesny odczyt milionów fragmentów DNA, przez co jest niezwykle efektywna. Podobnie jak metoda Sangera, jest to technika sekwencjonowania przez syntezę. Próbkę DNA są w pierwszej kolejności fragmentowane mechanicznie bądź enzymatycznie. Następnie do fragmentów dołączane zostają adaptory umożliwiające związanie się DNA do powierzchni komory przepływowej do sekwencjonowania (inaczej chip sekwencjonowania). Następnie jest przeprowadzana mostkowa reakcja PCR, która tworzy klastry – zbiory identycznych kopii DNA powstałych z pojedynczego fragmentu (Ryc. 5) [77].

Proces sekwencjonowania odbywa się poprzez syntezę polegającą na cyklicznym dołączaniu jednego z czterech rodzajów wyznakowanych fluorescencyjnie zmodyfikowanych nukleotydów. Są one zablokowane odwracalnym terminatorem uniemożliwiającym dalszą elongację. Sygnały są odczytywane przez detektor fluorescencji i przekształcane w sekwencję nukleotydów przy użyciu specjalistycznego oprogramowania. W kolejnym etapie terminator oraz znacznik fluorescencyjny zostają odcięte, co pozwala na zajęcie kolejnego cyklu reakcji [91].



Rycina 5 Schemat przedstawiający kolejne etapy sekwencjonowania przez syntezę w sekwencjonatorze Illumina

Sekwencjonowanie Illumina jest bardzo precyzyjne, przez co może być wykorzystywane do wykrywania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (z ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP). W tej metodzie homologiczne powtórzenia nukleotydów (homopolimery) nie są tak problematyczne jak w innych metodach [92].

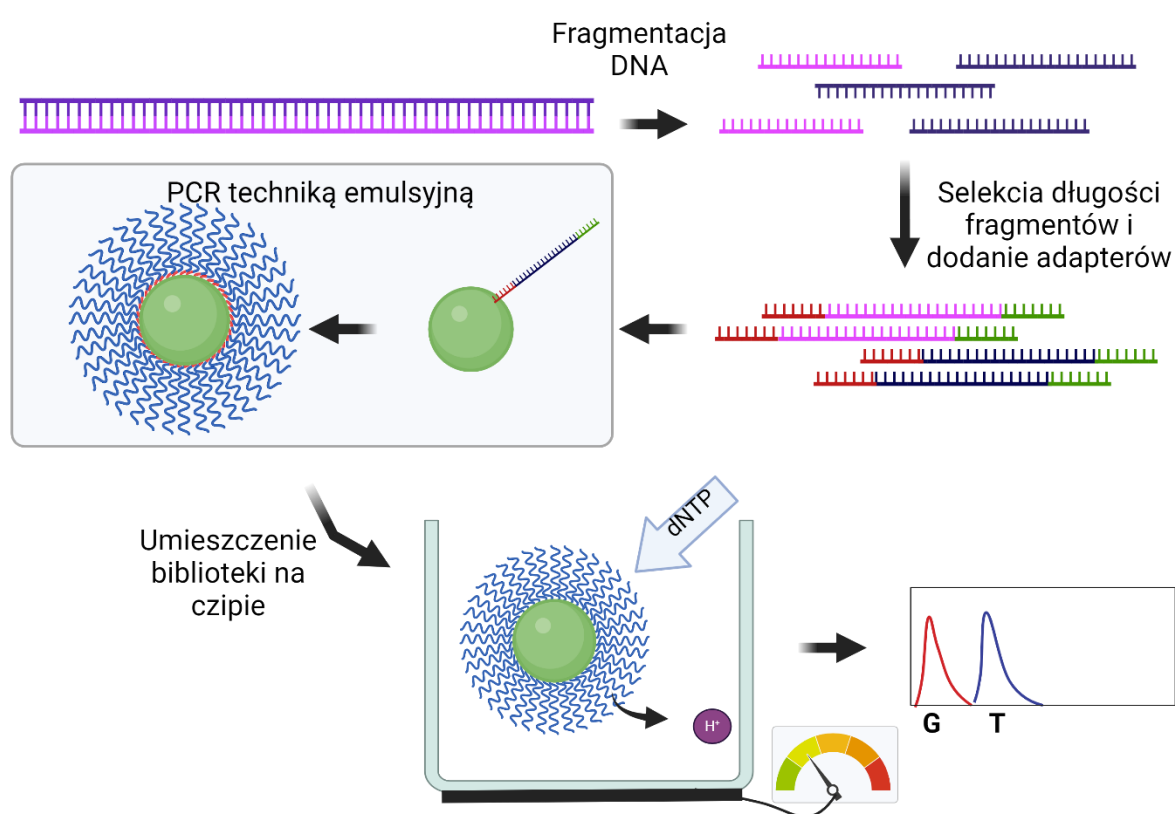
Początkowo technologia ta umożliwiała sekwencjonowanie bardzo krótkich fragmentów 35- 75 par zasad; współcześnie w systemie Nextseq 1000 i Nexseq 2000 można uzyskać nawet 2x 300 zasad w trybie parzystym [93].

4.4.5 Ion Torrent

Technologia Ion Torrent z wykorzystaniem potencjału jonowego należy do drugiej generacji sekwencjonowania. Tak jak technika firmy Illumina, to również technologia polegająca na sekwencjonowaniu przez syntezę. Została ona udostępniona publicznie w 2011 roku [94].

Przygotowanie próbek w tej technice polega na fragmentacji DNA, dodaniu do niego adapterów i następnie normalizacji długości fragmentów biblioteki – poprzez elektroforezę lub izolację za pomocą kulek magnetycznych. Tak przygotowane fragmenty są poddawane reakcji PCR w emulsji, gdzie w każdej kropli emulsji znajduje się jeden fragment DNA i jedna struktura

ISP (z ang. *ion sphere particle*). Podczas reakcji PCR amplifikowane fragmenty DNA otaczają i przyłączają się do ISP. Tak przygotowana próbka jest nanoszona na płytkę półprzewodnikową zawierającą mikrostudzienki. Do każdej z mikrostudzienek może dostać się 1 ISP. W trakcie trwania procesu sekwencjonowania płytka jest obmywana przez kolejne nukleotydy. Gdy dany nukleotyd jest inkorporowany w studzience zostaje uwalniany jon wodoru, prowadząc do zmiany pH w mikrostudzience. Zmiana ta jest rejestrowana przez wrażliwą na zmianę pH środowiska warstwę studzienki. Sygnał ulega przekonwertowaniu na elektryczny i przekazaniu urządzeniu jako odczytany nukleotyd (Ryc. 6).



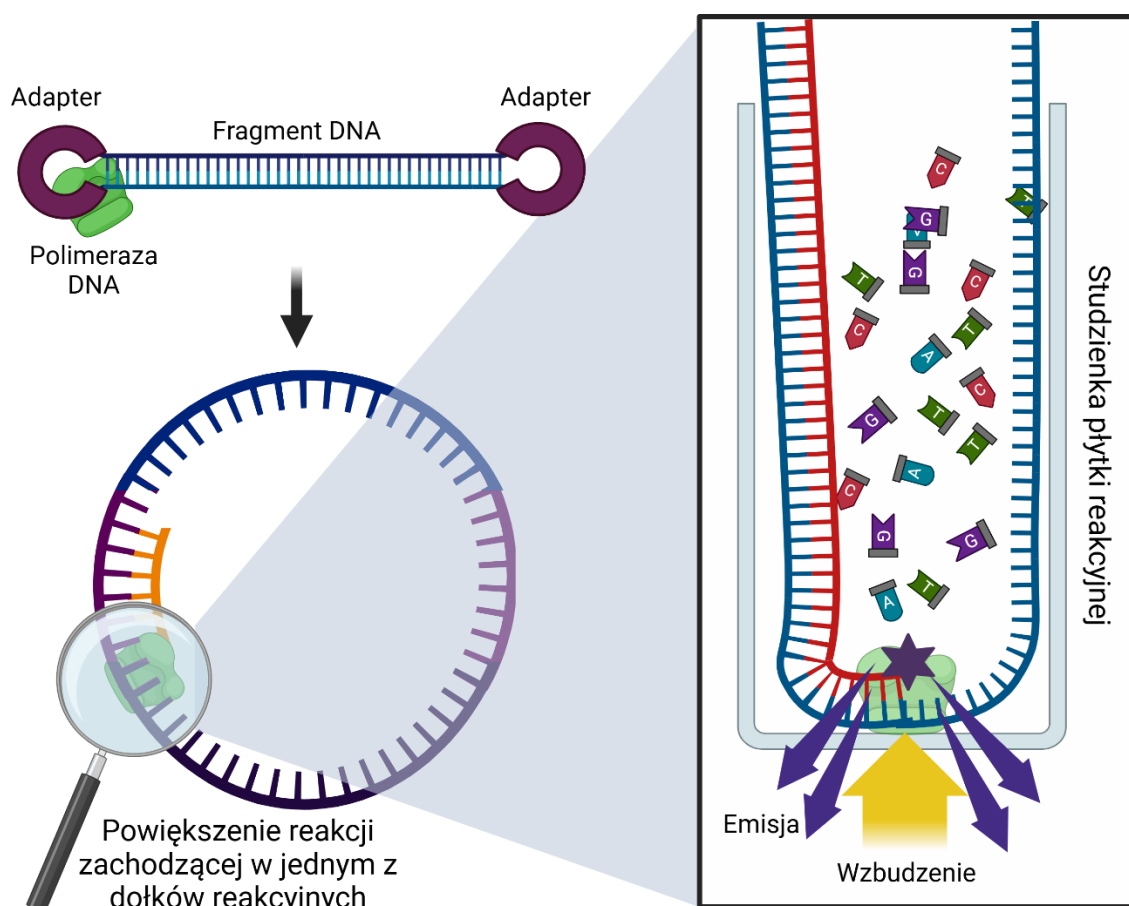
Rycina 6 Schemat przedstawiający podstawy działania techniki sekwencjonowania Ion torrent

Metoda ta umożliwia sekwencjonowanie fragmentów o długości od 200 do 600 par zasad. W porównaniu do innych metod drugiej generacji Ion Torrent oferował znaczne przyspieszenie procesu sekwencjonowania oraz obniżenie jego ceny [95,96].

4.4.6 Pacbio (Pacific Biosciences)

Technologia PacBio nazywana również sekwencjonowaniem pojedynczej cząsteczki w czasie rzeczywistym (ang. *single molecule, real-time SMRT*) została skomercjalizowana i wprowadzona na rynek w 2011 roku [97]. Technologia ta jest kategorizowana jako

sekwencjonowanie trzeciej generacji, ponieważ w przeciwieństwie do sekwencjonowania drugiej generacji nie potrzebuje przerwy pomiędzy cyklami sekwencjonowania [98]. Przygotowanie biblioteki polega na dodaniu struktur typu spinki do włosów do fragmentów DNA na obu końcach tworząc przy tym kolistą strukturę o nazwie SMRTbell. Tak przygotowane matryce są następnie umieszczane na czipie do sekwencjonowania (SMRTcell), zawierającym wiele nanostruktur Zero-mode waveguides (ZMW). Są to fizyczne nanostruktury kierujące i ograniczające sygnały świetlne, pozwalające na zmniejszenie objętości reakcji oraz ograniczenie kontaminacji krzyżowej z innych reakcji zachodzących w tym samym czasie w identycznych strukturach znajdujących się w pobliżu [99]. Częsteczka polimerazy, znajdująca się na dnie każdego z ZMW tworzy kompleks ze SMRTbell. Dochodzi do syntezy nowej nici DNA na podstawie wprowadzonego szablonu poprzez przyłączanie fluorescencyjnie wyznakowanych nukleotydów. Fluorescencja jest wzbudzana przez światło lasera a długość fali emisji jest zależna od wbudowanego nukleotydu (Ryc. 7). Następnie fluorofor zostaje usunięty a polimeraza przesuwa nić do kolejnej pozycji, dobudowując następny nukleotyd. Metoda ta pozwala na uzyskanie bardzo długich odczytów, często dłuższych niż pierwotna cząsteczka DNA ze względu na struktury spinki do włosów. Polimeraza jest zdolna przemieścić się po tej strukturze kontynuując syntezę nici na „spince” a następnie na nici komplementarnej. Powstający w ten sposób odczyt pozwala na uzyskanie wielokrotnego pokrycia sekwencjonowanego fragmentu [100,101].



Rycina 7 Schemat przedstawiający zasadę działania sekwencjonowania SMRT

Dzięki zastosowanej technologii uzyskiwane odczyty są znacznie dłuższe niż we wszystkich opisanych wcześniej metodach. Przy odpowiednim przygotowaniu matrycy DNA jest możliwe uzyskanie sekwencji o długości od 15 do 20 tysięcy zasad.

4.4.7 Sekwencjonowanie nanoporowe ONT (Oxford Nanopore Technologies)

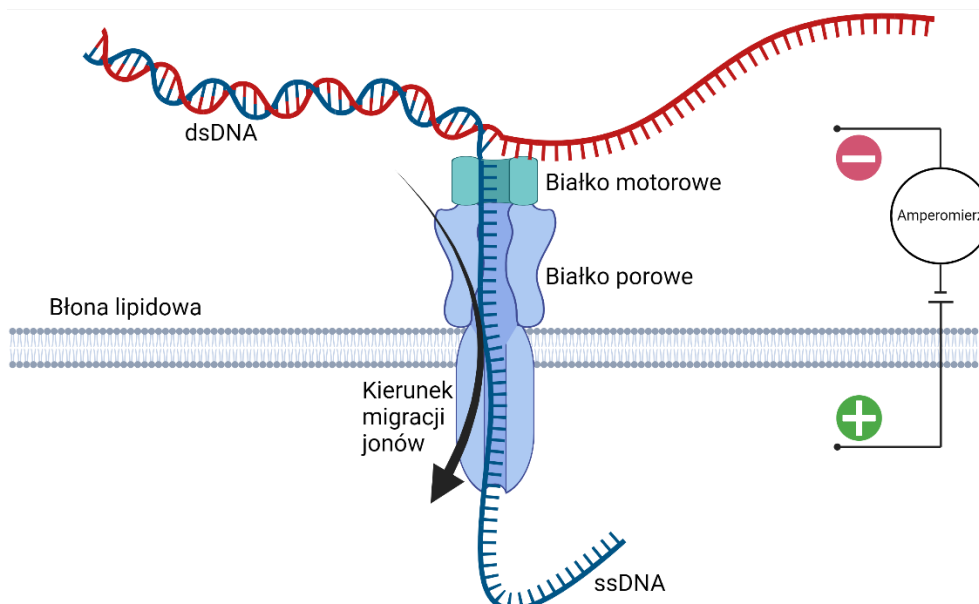
Tak jak SMRT, technologia nanoporowa należy do trzeciej generacji sekwencjonowania. Została ona opatentowana w 2007 roku i udostępniona do użytku w 2010 roku. Historia tej metody jest natomiast dłuższa, ponieważ już w latach 90. XX wieku rozpoczęto prace nad opracowaniem sekwencjonowania opartego na nanoporach [102].

Początkowo białkiem, które wykorzystywano w badaniach była α -hemolizyna – heptamer z wewnętrznym kanałem o średnicy od 1,4 do 2,4 nm. Podczas translokacji kwasów nukleinowych zauważono, że 5 nm obszar wykrywania odpowiada 12 nukleotydów wpływającym jednocześnie na mierzone natężenie prądu i uniemożliwia identyfikację poszczególnych nukleotydów. W celu usprawnienia działania wynalazku α -hemolizynę zastąpiono poryną *Mycobacterium smegmantis* MspA, która posiada lejkowaty kanał o

szerokości około 1,2 nanometra i obszarze wykrywania o długości około 0,6 nm. Mimo prawie idealnych wymiarów nukleotydy nie były wykrywane a jednoniciowy DNA nie przemieszczał się przez por. Zaprojektowano więc mutanty MspA, w których aminokwasy z negatywnym ładunkiem zostały zastąpione aminokwasami z ładunkiem dodatnim lub obojętnym. Umożliwiło to translokację ssDNA z użyciem polimerazy DNA phi29 (phi29 DNAP) oraz rozróżnienie zmian potencjałów dla każdego z czterech nukleotydów [103].

Jest to technika umożliwiająca sekwencjonowanie DNA jak również bezpośrednio RNA bez konieczności wcześniejszego uzyskiwania cDNA.

W zależności od wybranej metody możliwe jest przeprowadzenie sekwencjonowania 1D bądź 2D- oznacza to, że sekwencjonowana jest pojedyncza nić lub obydwie nici, wiodąca i komplementarna. Przygotowanie próbek do sekwencjonowania zależy od wybranej metody i różni się skomplikowaniem protokołu oraz czasem niezbędnym na przeprowadzenie analizy. W każdym z przypadków do kwasu nukleinowego dodaje się adaptory umożliwiające łączenie się nici z białkiem motorowym, które posiada aktywność helikazy, co umożliwia rozplecenie dwuniciowego DNA lub kompleksów RNA-DNA [104]. Przygotowana i oczyszczona biblioteka jest umieszczana w komorze przepływowej – wymiennej, zużywalnej części umieszczonej w sekwenatorze, w której znajduje się błona z nanoporami (w systemie ONT nazywana Flowcell). Białko motorowe umożliwia przemieszczanie się nici DNA przez nanopor- co powoduje zmianę potencjałów elektrycznych. Odczyt zmian potencjałów umożliwia analizę przemieszczanych przez por nukleotydów przy użyciu zaawansowanych algorytmów bioinformatycznych, które pozwalają na odtworzenie sekwencji nukleotydów na podstawie wzorców zmian w natężeniu prądu (Ryc. 8). Ogromną zaletą systemu ONT jest generowanie bardzo długich odczytów mogących przekraczać długość kilkuset tysięcy zasad/par zasad. Umożliwia to między innymi prostszą analizę uzyskanych danych [105].



Rycina 8 Schemat przedstawiający działanie sekwencjonowania nanoporowego

4.4.8 Rozwój technologii NGS, metagenomika

Metagenomika to dziedzina genomiki zajmująca się sekwencjonowaniem i analizą materiału genetycznego bezpośrednio z próbek środowiskowych, bez potrzeby izolowania i namnażania poszczególnych mikroorganizmów. To podejście umożliwia badanie złożonych mikrobiomów i ich funkcji w różnych środowiskach, takich jak gleba, woda, układ pokarmowy zwierząt i ludzi.

Ze względu na brak możliwości hodowli części mikroorganizmów w warunkach laboratoryjnych, analiza metagenomiczna jest jedyną metodą pozwalającą na odkrycie nieznanych dotąd gatunków, analizę ich różnorodności, strukturę społeczności mikrobiologicznych oraz zrozumienie ich funkcji ekologicznych i biologicznych [106,107].

Wraz z rozwojem metod sekwencjonowania zmieniały się stosowane w metagenomice techniki. Ze względu na skomplikowany i czasochłonny proces w początkowych latach stosowania sekwencjonowania skupiano się na poznawaniu sekwencji pojedynczych genów a następnie prostych, niedużych genomów.

Lata 70 XX wieku - uzyskanie genomu pierwszego bakteriofaga MS2 RNA - nie było to jeszcze podejście metagenomiczne lecz zapoczątkowało sekwencjonowanie całych organizmów [108].

Lata 80 XX wieku – automatyzacja i komercyjna dostępność do sekwenatorów pozwala na rozszerzenie badań i zwiększenie skali poznawania większych genomów.

Lata 90 – Termin „metagenomika” został po raz pierwszy użyty przez Jo Handelsmana w 1998 roku [109]. Wtedy przygotowanie bibliotek metagenomicznych opierało się na „metodzie shotgun”, w której fragmenty genomu klonowano w wektorach plazmidowych, a następnie transformowano nimi komórki bakteryjne i po izolacji poddawano je sekwencjonowaniu metodą Sanger. Ze względu na konieczność namnażania biblioteki w hodowlach bakteryjnych mogło dochodzić do wprowadzania niekontrolowanych mutacji w sekwencji. Co więcej niektóre fragmenty nie były w ogóle sekwencjonowane z powodu ich cytotoksyczności. W rezultacie wczesne próby przeprowadzenia analiz metagenomicznych były obarczone błędami sekwencji oraz często przedstawiały niekompletny obraz genomu [110].

Lata 2000 – Początek sekwencjonowania nowej generacji znacznie obniżył koszty oraz czas uzyskania danych. Rozwój sekwencjonowania umożliwił również rozwój metagenomiki. Cena uzyskania sekwencji miliona pz wynosiła w niektórych przypadkach około 1,5zł (0,34 Funt Brytyjskiego). Dzięki temu naukowcy dostali możliwość analizowania dużo większej ilości próbek. Zaproponowano użycie mikromacierzy DNA do jednoczesnego wykrywania przekroju patogenów poprzez powielenie specyficznych genów. Było to szczególnie przydatne do wykrywania infekcji bakteryjnych i grzybiczych, w szybszy sposób niż hodowle [111]. Rozwój technologii umożliwił również profilowanie skomplikowanych mikrobiomów z próbek środowiskowych, umożliwiając poznanie różnorodności gatunkowej, struktury środowiska i zależności w nim występujących, co jest bardzo ważnym zagadnieniem w szerokim zakresie dziedzin [112].

Lata 2010 - W 2014 roku odnotowano pierwszy przypadek użycia sekwencjonowania następnej generacji w celu zdiagnozowania zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych u 14 letniego pacjenta. Uzyskane poprzez sekwencjonowanie dane umożliwiły diagnozę i odpowiednią terapię dla chłopca [113]. Kolejne spadki cen, czasu potrzebnego na sekwencjonowanie oraz rozwój technik bioinformatycznych spowodowały rozprzestrzenienie się sekwencjonowania do ośrodków badających szeroki przekrój próbek, od arktycznych wód morskich przez badanie aktybiotykooporności do porównywania mikrobiomów bliźniaczych pacjentów.

Obecnie - Metagenomika po 2020 roku nie tylko kontynuuje eksplorację mikrobiologicznej różnorodności, ale także zaczyna przekładać to zrozumienie na praktyczne aplikacje w medycynie, biotechnologii, ochronie środowiska i wielu innych dziedzinach. Postęp w tej

dziedzinie będzie nadal zależał od innowacji technologicznych, rozwoju metod analizy danych i interdyscyplinarnej współpracy.

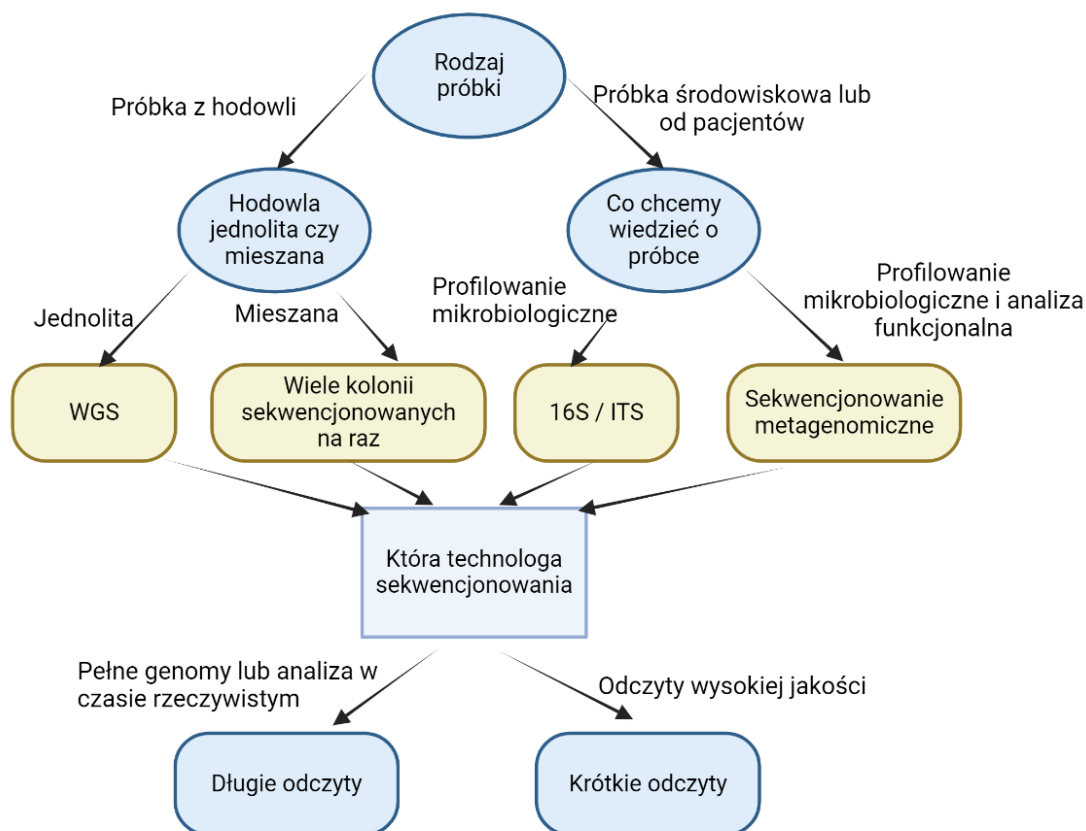
Rozwój metatranskryptomiki i metaproteomiki pozwala nie tylko na analizę kompozycji mikrobiomu, ale również na zrozumienie funkcji ekspresji genów i białek w różnych środowiskach. To pozwala lepiej zrozumieć, jak mikrobiomy reagują na zmiany środowiskowe, interakcje międzygatunkowe i stres [114,115].

Zastosowanie algorytmów sztucznej inteligencji (AI) i uczenia maszynowego w analizie danych metagenomicznych rewolucjonizuje identyfikację wzorców, predykcję funkcji genów i ścieżek metabolicznych, a także klasyfikację mikrobiologiczną na poziomie gatunkowym i szczepowym [116].

Integracja danych metagenomicznych z innymi typami danych omiowych, takimi jak metatranskryptomika, metaproteomika i metabolomika, prowadzi do kompleksowego zrozumienia funkcji mikrobiomów w kontekście ich interakcji z gospodarzem i środowiskiem [117,118].

Zastosowanie metagenomiki w monitorowaniu różnorodności biologicznej i ocenie stanu ekosystemów, a także w identyfikacji mikroorganizmów zdolnych do degradacji zanieczyszczeń, przyczynia się do rozwoju strategii ochrony środowiska i bioremediacji. Badania metagenomiczne pomagają w lepszym zrozumieniu roli mikroorganizmów w globalnych cyklach biogeochemicznych, takich jak cykl węgla, azotu czy siarki, co ma kluczowe znaczenie dla przewidywania zmian klimatycznych i zarządzania zasobami naturalnymi [119,120].

W zależności od rodzaju próbek, których dotyczy praca badawcza, naukowcy muszą wybierać pomiędzy różnymi metodami sekwencjonowania (Ryc. 9). Pozwala to na optymalizację kosztów i umożliwia otrzymanie odpowiedniego rodzaju danych.



Rycina 9 Schematyczne przedstawienie protokołu prowadzącego do wybrania najlepszej strategii metody sekwencjonowania.
Rycina na podstawie Purushothaman i wsp. [121]

WGS (z ang. *whole genome sequencing*) - sekwencjonowanie całego genomu umożliwia najdokładniejsze poznanie pojedynczego badanego mikroorganizmu. W zależności od złożoności genomu wzrasta koszt i skomplikowanie przeprowadzenia tego typu sekwencjonowania.

Sekwencjonowanie genów markerowych takich jak 16S/18S rRNA, ITS, czy *rpoB* znacznie skraca czas sekwencjonowania, co przyspiesza otrzymanie wyniku i obniża jego koszty. Dzięki rozwojowi tej dziedziny sekwencjonowania poznawanych jest coraz więcej takich genów, jak na przykład te odpowiedzialne za antybiotykooporność.

Rzeczywisty rozwój nowych technologii oraz coraz bardziej zaawansowane algorytmy bioinformatyczne pozwalają na połączenie obydwu technik, aby uzyskać dane o jeszcze lepszej jakości. Zwiększa to również pewność otrzymanego wyniku zwiększając skuteczność terapii/szanse pacjentów na wyzdrowienie [121–123].

4.4.9 Sekwencjonowanie celowane (z ang. *targeted sequencing*)

Metoda ta polega na sekwencjonowaniu konkretnych, wybranych fragmentów genów, które są wybierane zwykle ze względu na ich biologiczne znaczenie – są to fragmenty genów odpowiedzialnych za zachodzenie procesów biologicznych, wywołujące choroby, czy zawierające ważne informacje o badanym organizmie. Żeby podczas sekwencjonowania próbki możliwe było uzyskanie jedynie konkretnych sekwencji analizowane próbki muszą zostać poddane szczególnym procesom przy tworzeniu biblioteki.

Najczęściej stosowane są dwie metody wzbogacania: pierwsza polegająca na powieleniu fragmentu przez PCR – wzbogacanie oparte o amplikony, oraz druga, z zastosowaniem sond wychwytyjących fragmenty DNA – wzbogacanie przez sondy.

Pierwsza z tych metod wymaga zaprojektowania starterów powielających badane geny a następnie przeprowadzeniu reakcji PCR na analizowanych próbkach. Zapewnia to zwykle duże ilości materiału genetycznego do dalszego przygotowania biblioteki.

Druga metoda polega na użyciu biotynylowanych sond hybrydujących do określonych fragmentów kwasów nukleinowych na wcześniej pofragmentowanym materiale genetycznym. Są one następnie oczyszczane poprzez izolację na kulkach magnetycznych opłaszczonych streptawidyną. Tak przygotowane próbki są gotowe do procesu sekwencjonowania, mogą natomiast zawierać bardzo mało materiału genetycznego, jeśli badana próbka zawiera niedużą ilość celów molekularnych.

Dzięki zastosowaniu sekwencjonowania celowanego możliwe jest znaczne obniżenie kosztów sekwencjonowania w porównaniu do metody WGS, ułatwia ono również analizę danych, ponieważ generujemy głównie sekwencje celów molekularnych. Przy krótszym czasie sekwencjonowania i jego niższym koszcie możemy również uzyskać wyższe pokrycie fragmentów, co daje większą pewność uzyskanego wyniku [124–126].

4.5 Podsumowanie metod sekwencjonowania

W każdej z generacji sekwencjonowań istnieją bardziej i mniej udane techniki, a ich wykorzystanie często zależy od rodzaju analizy, którą chcemy przeprowadzić oraz dostępności

środków. Poniższa grafika (Ryc. 10) oraz Tabela 4 podsumowują najważniejsze informacje o głównych technikach sekwencjonowania.



Rycina 10 Podział rodzajów sekwencjonowania na generacje

Tabela 4 Podsumowanie dostępnych metod sekwencjonowania

	Metoda Sangera	Metoda Maxam-Gilberta	Pirosekwencjonowanie	Ion torrent	SBS	Pacbio	ONT
Koszt za 1000 pz (zł)	~20	Brak danych	40-200	Brak danych	40-80	60-80	25-90
Koszt urządzenia (zł)	Od około 120 tysięcy	Zakup wielu sprzętów laboratoryjnych od około 100 tysięcy	Od 280 tysięcy	Od 220 tysięcy	Od 500 tysięcy	Od 600 tysięcy	Od 7 tysięcy

Dokładność uzyskanych danych	Rodzaj pozyskiwanych danych	Długość odczytów	Długość przygotowania	Czas do uzyskania wyniku	
99.99%	Chromatogram i sekwencja nukleotydowa	500-1200 pz	30min-1 godzina	4-7 godzin	Metoda Sangera
95-98%	Obraz żelu do analizy	100-800 pz	1-2 godziny	19-36 godzin	Metoda Maxam-Gilberta
99%	Pirogram i sekwencja nukleotydowa	100-500pz	4-6 godzin	2-4 godziny	Pirosekwencjonowanie
99%	Surowe sekwencje, dane jakościowe, złożone sekwencje	200-500 pz	8-14 godzin	2-7 godzin	Ion torrent
99,9%	Surowe sekwencje, dane jakościowe, złożone sekwencje	2x75 do 2x300 pz	6-8 godzin	24-68 godzin	SBS
Standard- 87-90% HiFi- 99%	Surowe sekwencje, dane jakościowe, złożone sekwencje	10000-20000 pz	8godzin-2 dni Rapid- 4-6 godzin	20-30 godzin (może zostać zatrzymane w każdym momencie)	Pacbio
99-99,9%	Surowe sekwencje, dane jakościowe, złożone sekwencje	10000-30000 pz Rekord 2 Mpz	2-3 godziny Rapid 10 min-1 godzina	6-72 godzin (może zostać zatrzymane w każdym momencie)	ONT

5 Cel Pracy

Ze względu na wzrastającą liczbę różnorodnych zakażeń wirusowych dających podobne objawy, a także rozwój możliwości technicznych, celem niniejszej pracy było opracowanie szybkiej, ekonomicznej i łatwej metody wykrycia wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych przy użyciu sekwencjonowania w czasie rzeczywistym, która mogłaby konkurować z dostępnymi na rynku metodami diagnostycznymi.

Pracę tą można podzielić na trzy części:

Część 1 – Opracowanie nowej metody detekcji infekcji wirusowych:

- Teoretyczne opracowanie zasad działania metody.
- Wybór wykrywanych patogenów.
- Analiza sekwencji wirusowych oraz tworzenie „alignmentów”.
- Zaprojektowanie panelu starterów.

Część 2 – Optymalizacja metody:

- Konstrukcja panelu kontroli pozytywnych.
- Uzyskiwanie założonych produktów reakcji PCR.
- Optymalizacja reakcji PCR.
- Przeprowadzenie testów potwierdzających działanie wstępnych założeń.

Część 3 – Walidacja metody:

- Określenie limitu detekcji metody.
- Detekcja wirusów w hodowli *in vitro*.
- Analiza detekcji wirusów w próbkach klinicznych – porównanie nowej metody do systemu BioFire.

6 Materiały

6.1 Sekwencje wirusów

Pełny zbiór analizowanych sekwencji znajduje się w aneksie do niniejszej pracy na płycie CD i udostępniany jest na życzenie, ze względu na dużą liczbę sekwencji.

Liczby sekwencji dla poszczególnych wirusów znajdują się w Tabeli 17.

6.1.1 *Adenoviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla:

ludzkiego mastadenowirusa A, ludzkiego mastadenowirusa B, ludzkiego mastadenowirusa C, ludzkiego mastadenowirusa D, ludzkiego mastadenowirusa E, ludzkiego mastadenowirusa F

6.1.2 *Coronaviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla:

ludzkiego koronawirusa 229E, ludzkiego koronawirusa HKU1, ludzkiego koronawirusa NL63, ludzkiego koronawirusa OC43, ludzkiego koronawirusa MERS, ludzkiego koronawirusa SARS Urbani,

6.1.3 *Orthoherpesviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusa ospy wietrznej i półpaśca

6.1.4 *Matonaviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusa różyczki

6.1.5 *Orthomyxoviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusów grypy A oraz grypy B

6.1.6 *Paramyxoviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusów:

ludzkiego respirowirusa typu 1, ludzkiego respirowirusa typu 3, ludzkiego rubulawirusa typu 2, ludzkiej paragrypy typu 4a oraz 4b, wirusa świnki i wirusa odry

6.1.7 *Parvoviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusów:

ludzkiego bokawirusa typu 1, ludzkiego bokawirusa typu 2, ludzkiego bokawirusa typu 3 oraz ludzkiego bokawirusa typu 4 NI

6.1.8 *Picornaviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusów:

ludzkiego enterowirusa A71, ludzkiego enterowirusa A21, ludzkiego enterowirusa A104, ludzkiego enterowirusa C109, ludzkiego enterowirusa C117, ludzkiego enterowirusa C118, ludzkiego enterowirusa D68, ludzkiego rinowirusa typu A, ludzkiego rinowirusa typu B oraz ludzkiego rinowirusa typu C

6.1.9 *Pneumoviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla wirusów:

ludzkiego metapneumowirusa, syncytialnego wirusa oddechowego A oraz syncytialnego wirusa oddechowego B

6.1.10 *Poxviridae*

Sekwencje nukleotydowe pobrane z bazy danych NCBI dla *Orthopoxvirus monkeypox*

6.1.11 Gen ludzki POTEE

Sekwencja nukleotydowa o numerze NM_001083538 pobrana z bazy danych NCBI data dostępu maj 2022 roku

6.2 Wirusy

Większość wirusów otrzymałem w ramach grantu z EVAg (European Virus Archive - GLOBAL) wspierającego współpracę z ośrodkami badawczymi w całej Europie.

- 6.2.1 Coronavirus RNA specificity panel (Erasmus Medical Center, Holandia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.2 SARS-CoV-2 izolat kliniczny z 2020 roku, zbiory Zakładu Szczepionek Rekombinowanych Uniwersytetu Gdańskiego
- 6.2.3 Human Influenza B/Yamagata virus, B/Paris/883/2015 (Institute Pasteur, Francja) - otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.4 Human Influenza B/Victoria virus, B/Rennes/2483/2015 (Institute Pasteur, Francja) - otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.5 Human parainfluenza virus 2 (Human rubulavirus 2) (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.6 Human parainfluenza type 1 (Erasmus Medical Center, Holandia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.7 Human respiratory syncytial virus B (Erasmus Medical Center, Holandia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.8 Human respiratory syncytial virus A (Erasmus Medical Center, Holandia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.9 Human mastadenovirus C, type 6 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.10 Human mastadenovirus C, type 2 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.11 Human mastadenovirus C, type 1 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.12 Human mastadenovirus C, type 5 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.13 Human mastadenovirus B, type 3 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg

- 6.2.14 Human parainfluenza virus 3 (University of Ljubljana, Słowenia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.15 Human bocavirus (Erasmus Medical Center, Holandia)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.16 Enterovirus D68, szczep prototypowy Fermon (Institute Pasteur, Francja)- otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.17 Enterovirus A71 szczep BrCr (Institute Pasteur, Francja) - otrzymane w ramach współpracy i dofinansowania EVAg
- 6.2.18 Grypa A typ H₃N₂ – zbiory Zakładu Szczepionek Rekombinowanych Uniwersytetu Gdańskiego
- 6.2.19 Grypa B – zbiory Zakładu Szczepionek Rekombinowanych Uniwersytetu Gdańskiego

6.3 Oligonukleotydy

Startery do reakcji PCR zostały zsyntetyzowane w firmie Eurofins, Niemcy.

Liczby po numerze nagłówka opowiadają roboczym numerom starterów.

Pełna lista starterów oraz nazw wirusów do których się odnoszą znajduje się w pliku Excel w aneksie do pracy.

6.3.1	1	For (forward) 5'-ACCTTTGTGCGCCTGTTT=3'
6.3.2	2	For (forward) 5'-CGTGGCGGCTAGTACTCTG=3'
6.3.3	3	For (forward) 5'-ACACTTGCCACTCCTGGTTC=3'
6.3.4	4	For (forward) 5'-TGGAAGATGCCATGTACGGG=3'
6.3.5	5	For (forward) 5'-TGGGTGTCCGTGTTTCCTTT=3'
6.3.6	6	For (forward) 5'-GTCACTGGACATCCCCACAG=3'
6.3.7	7	For (forward) 5'-TCGTTGCTGCCATACCTGAG=3'
6.3.8	8	For (forward) 5'-TGGGCGGGTTCCTTGAAATT=3'
6.3.9	9	For (forward) 5'-GGGGCAAAATCGTTATCCGC=3'
6.3.10	10	For (forward) 5'-AGCATGATGGCCACAGGAAA=3'
6.3.11	11	For (forward) 5'-TTCGGTACCTTTGTACGCCT=3'
6.3.12	12	For (forward) 5'-GACTGCAGACAACGCCTAGT=3'
6.3.13	13	For (forward) 5'-AGCTGGAGGCAATGCTACAG=3'
6.3.14	14	For (forward) 5'-GAGATGCAGGTCTCGCTTCA=3'
6.3.15	15	For (forward) 5'-GGTTGTGAAGCAGCAGGACT=3'
6.3.16	16	For (forward) 5'-CGCTGCAAATCTCTTCTGGC=3'
6.3.17	17	For (forward) 5'-GCACAGGAGACATCACACCA=3'
6.3.18	18	For (forward) 5'-CTCAGACCAAGCGACGAAGA=3'
6.3.19	19	For (forward) 5'-AACGACCTAACAGCTGGTGT=3'
6.3.20	20	For (forward) 5'-TTCTGGCTACGCGTCCTTTT=3'
6.3.21	21	For (forward) 5'-CAGAAGCATCGGAAGTGGGT=3'
6.3.22	22	For (forward) 5'-ACAGATGGGCAAGCAGAACA=3'
6.3.23	23	For (forward) 5'-GTGAAACAACCAGCGGTGAC=3'
6.3.24	24	For (forward) 5'-TGGTTTTAGGGCATGCCGAT=3'
6.3.25	25	For (forward) 5'-CCGGTGAAACATTTTGGCGT=3'
6.3.26	26	For (forward) 5'-GGCATATGCTCCATGGTGGT=3'
6.3.27	27	For (forward) 5'-ATGGGTGTAGGTGTAGGCCA=3'
6.3.28	28	For (forward) 5'-ATGAGGGTGGTTGCAACACA=3'
6.3.29	29	For (forward) 5'-TCAATGGCTGTGGGCGTAAT=3'

6.3.30	30	For (forward) 5'-GTCTGTCTTGGTGCAGGTCA=3'
6.3.31	31	For (forward) 5'-CAGCCAGGGACGTGTTGTAT=3'
6.3.32	32	For (forward) 5'-GTTTAACGAGGTGCAGCTGC=3'
6.3.33	33	For (forward) 5'-GCTCTTACTTGCCGAATGCG=3'
6.3.34	34	For (forward) 5'-CCCGTGAGCTTGAACCTGAA=3'
6.3.35	35	For (forward) 5'-TCGGGCGATTGTGTCTCATC=3'
6.3.36	36	For (forward) 5'-TGCACGTCTCCTGAGTTGTC=3'
6.3.37	37	For (forward) 5'-GTACCTTTGAGCTGCAGGGT=3'
6.3.38	38	For (forward) 5'-CTGCATCTCCCAGGCTTTCA=3'
6.3.39	39	For (forward) 5'-TAGGAGTCTTGCAGCTTGGC=3'
6.3.40	40	For (forward) 5'-CGGGAGAGGCATGATGAGAC=3'
6.3.41	41	For (forward) 5'-TTTGATTTTTCGCGCACGGT=3'
6.3.42	42	For (forward) 5'-GGGATGACATGTTCCAGGGG=3'
6.3.43	43	For (forward) 5'-AATCTGTGGACGGCTACGAC=3'
6.3.44	44	For (forward) 5'-TGCGGCARTTTTCAGACAATGC=3'
6.3.45	45	For (forward) 5'-TGCAAATATGAAGTRCGGGGCA=3'
6.3.46	46	For (forward) 5'-ACGATAGGCCTGAACGGTTG=3'
6.3.47	47	For (forward) 5'-GTTCATATCGCACCAGGGGT=3'
6.3.48	48	For (forward) 5'-GTTACGCCATGGGAGTTGGA=3'
6.3.49	49	For (forward) 5'-AGTGGTGCAATCCATGTTGC=3'
6.3.50	50	For (forward) 5'-ACATCTCACCATGCAAGCCA=3'
6.3.51	51	For (forward) 5'-AGGAGCCATTGTGTCATGCT=3'
6.3.52	52	For (forward) 5'-AGGCAATGCAGCAGGTCTAG=3'
6.3.53	53	For (forward) 5'-TGCAAAGCCAAAAACACACCA=3'
6.3.54	54	For (forward) 5'-CACCGCTGATAGGGACAACA=3'
6.3.55	55	For (forward) 5'-TCGGAAAGGGCTACTGCTTC=3'
6.3.56	56	For (forward) 5'-GCAGCAGAGGCAAAATCCAA=3'
6.3.57	57	For (forward) 5'-GGTAGCACCTTGCCAATTGT=3'
6.3.58	58	For (forward) 5'-AGAAGACGGCGATGTGTTGT=3'

6.3.59	59	For (forward)	5'-CTGGACTCATTCTGCGGTT=3'
6.3.60	60	For (forward)	5'-CTAATCCAGGCTTGGGTGAT=3'
6.3.61	61	For (forward)	5'-GGCAAGCCATGGATCAATTT=3'
6.3.62	62	For (forward)	5'-CAAGCACTTCTGTYWCCCCGG=3'
6.3.63	63	For (forward)	5'-YCCYACCAYCCGACCCACD=3'
6.3.64	64	For (forward)	5'-TGCACTCCGTGAACTCACTC=3'
6.3.65	65	For (forward)	5'-TTACAGCTTTCTGCCGGGAG=3'
6.3.66	66	For (forward)	5'-RARYACTTCTGTTTCCCCGG=3'
6.3.67	67	For (forward)	5'-KCAAGCACTYCTGTYTCCCCG=3'
6.3.68	68	For (forward)	5'-WCGGTTCTTTGYAYGCCTGT=3'
6.3.69	69	For (forward)	5'-YCAAGYACTYCTGTYTCCCCGG=3'
6.3.70	70	For (forward)	5'-KCCAGCRCAAAATGCYATAAGCAC=3'
6.3.71	71	For (forward)	5'-ACAAYATGATAAAYAATGACCTTGGM=3'
6.3.72	72	For (forward)	5'-YCGAATCTGCACTGGGATAA=3'
6.3.73	73	For (forward)	5'-TATCCGTGCCAACCTGCAAT=3'
6.3.74	74	For (forward)	5'-CGCYGAGCAGGAYTTCCGCG=3'
6.3.75	75	For (forward)	5'-ACATCTCKTCTAGTTTCACTAGTACCT=3'
6.3.76	76	For (forward)	5'-CATCAAGCACCGCCTAAAAA=3'
6.3.77	77	For (forward)	5'-GCCTGTTGAATCTTGTCCAC=3'
6.3.78	1	Rev (reverse)	5'-ACCCAAAGTAGTCGGTTCCG=3'
6.3.79	2	Rev (reverse)	5'-GGATTAGCCGCATTCAGGG=3'
6.3.80	3	Rev (reverse)	5'-GCACTGGACTGTAGCCCAAT=3'
6.3.81	4	Rev (reverse)	5'-TACCATCTTGAGGGCCTCGA=3'
6.3.82	5	Rev (reverse)	5'-CCAATCACTGCGTTAGCTGC=3'
6.3.83	6	Rev (reverse)	5'-TGAGGGCTTCAAACCAAGCT=3'
6.3.84	7	Rev (reverse)	5'-GCCCATTAAACTCGCAGCAC=3'
6.3.85	8	Rev (reverse)	5'-TGGTGTCTCAATCCCCTGA=3'
6.3.86	9	Rev (reverse)	5'-GCTGACACTTGAGCTCCCAT=3'
6.3.87	10	Rev (reverse)	5'-TTGGTAGTGCCCGTCTCAAC=3'

6.3.88	11	Rev (reverse)	5'-CAAAGTAGTCGGTTCGCCA=3'
6.3.89	12	Rev (reverse)	5'-GGACAAAGGACCCCAAGAGG=3'
6.3.90	13	Rev (reverse)	5'-TAGTTGGTGCCAGACATCCG=3'
6.3.91	14	Rev (reverse)	5'-GGCTGATCCACCTGTTGGTT=3'
6.3.92	15	Rev (reverse)	5'-TGCTCCACCTAGAAATGCCC=3'
6.3.93	16	Rev (reverse)	5'-AAGATGTTCCACGGACCAC=3'
6.3.94	17	Rev (reverse)	5'-GGCTGATTGGGTGTTCTGA=3'
6.3.95	18	Rev (reverse)	5'-ATAACCAGGAAGCACCCACC=3'
6.3.96	19	Rev (reverse)	5'-AGACCTGGTCCTGTCATCCA=3'
6.3.97	20	Rev (reverse)	5'-AAGATGTTCCACGGACCAC=3'
6.3.98	21	Rev (reverse)	5'-GAACCCACACCATCCTGGAG=3'
6.3.99	22	Rev (reverse)	5'-GCCAGCAAGAGTACAGTCGT=3'
6.3.100	23	Rev (reverse)	5'-TAGGACGATTGGCGTTGTC=3'
6.3.101	24	Rev (reverse)	5'-TTGCGTAGTGTGTGCAAAGC=3'
6.3.102	25	Rev (reverse)	5'-TAGCACCTGCACGCATACAA=3'
6.3.103	26	Rev (reverse)	5'-ACACGGCCTACATTAGCAGT=3'
6.3.104	27	Rev (reverse)	5'-CACCAGTAGCTACAGGCCAG=3'
6.3.105	28	Rev (reverse)	5'-TGGGCCCCGACAATACAAACA=3'
6.3.106	29	Rev (reverse)	5'-ACAACCTAGCGCGAAGGG=3'
6.3.107	30	Rev (reverse)	5'-CACAACATGCCATGCCACAA=3'
6.3.108	31	Rev (reverse)	5'-GCCGAAACAAACCATGGTC=3'
6.3.109	32	Rev (reverse)	5'-CCGAAGCACAGGGAGAAGAC=3'
6.3.110	33	Rev (reverse)	5'-ACTGTTCCAATTGAAGGCGC=3'
6.3.111	34	Rev (reverse)	5'-GGACTTCTACGAGGCCATGG=3'
6.3.112	35	Rev (reverse)	5'-CACTTCAATGCATGGCTGGG=3'
6.3.113	36	Rev (reverse)	5'-TCCGTCTTCTGGAGGAGGAG=3'
6.3.114	37	Rev (reverse)	5'-TCGTCCAAAACCTCCTCTGC=3'
6.3.115	38	Rev (reverse)	5'-CCGAAACGAGGAAGTCTGCT=3'
6.3.116	39	Rev (reverse)	5'-ACTTTCGCTCTGCCTAACCC=3'

6.3.117	40	Rev (reverse)	5'-TTGGCCATAAAGACCGTCCC=3'
6.3.118	41	Rev (reverse)	5'-CAAATTCCCCAAGTGCACCG=3'
6.3.119	42	Rev (reverse)	5'-AATCACAAGCCCGACAACCT=3'
6.3.120	43	Rev (reverse)	5'-GCACAAGTATGGACCGGGAA=3'
6.3.121	44	Rev (reverse)	5'-CTTCCTGTGCTRACTTTGCA=3'
6.3.122	45	Rev (reverse)	5'-RGGAGTTTTGCTCATCTCCA=3'
6.3.123	46	Rev (reverse)	5'-TGTCTGGTCCCATAAGCAGC=3'
6.3.124	47	Rev (reverse)	5'-TTGTTACCTGGTCTTGGGGC=3'
6.3.125	48	Rev (reverse)	5'-TTTCAAGCTCCGGCATCAGT=3'
6.3.126	49	Rev (reverse)	5'-ACGAACACCTGCTCTCCTTT=3'
6.3.127	50	Rev (reverse)	5'-GCTGATTCCAAGCTGGGGAT=3'
6.3.128	51	Rev (reverse)	5'-TGTGACTGGTGTGCTTCTGG=3'
6.3.129	52	Rev (reverse)	5'-GGGTTTTCTTGGGTAGTTGGC=3'
6.3.130	53	Rev (reverse)	5'-GCATGAGGAGGCCATTCAAA=3'
6.3.131	54	Rev (reverse)	5'-GTTTTTCGTGGTGCCTCTCCT=3'
6.3.132	55	Rev (reverse)	5'-CGGGGCGATAAACCTCCATT=3'
6.3.133	56	Rev (reverse)	5'-GCACACCTGGGATTACACCA=3'
6.3.134	57	Rev (reverse)	5'-GAGGGTCGGCACACTTACAT=3'
6.3.135	58	Rev (reverse)	5'-AAGATCCGGAAGCTGCAACA=3'
6.3.136	59	Rev (reverse)	5'-AGCAGAGCCCATCAGCAAAT=3'
6.3.137	60	Rev (reverse)	5'-GTATCTGGCTTGTTCTCCGA=3'
6.3.138	61	Rev (reverse)	5'-AAATTCTGTTACCGGCGTTG=3'
6.3.139	62	Rev (reverse)	5'-DGAAACACGGACAYCCAAAGT=3'
6.3.140	63	Rev (reverse)	5'-RGGGTTDRGGTTAGCCGCAT=3'
6.3.141	64	Rev (reverse)	5'-CAACAGGGTACACAGAGCGT=3'
6.3.142	65	Rev (reverse)	5'-GCAAGCTGCTTCACGATAGC=3'
6.3.143	66	Rev (reverse)	5'-RGAAACACGGACACCCAAAG=3'
6.3.144	67	Rev (reverse)	5'-GGAAACACGGACACCCAAAG=3'
6.3.145	68	Rev (reverse)	5'-AGCCRCATTCAGGGGCCGG=3'

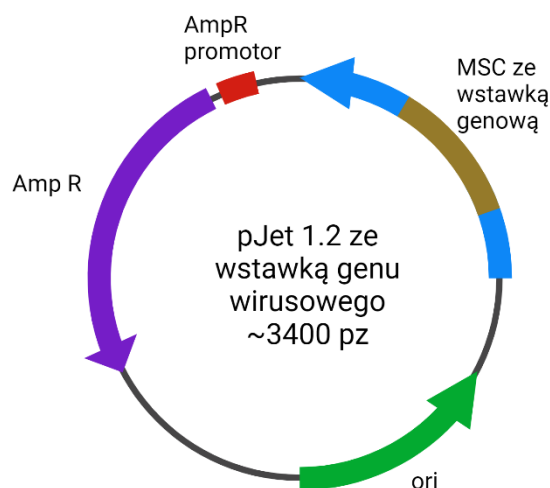
6.3.146	69	Rev (reverse)	5'-MARGAAACACGGACACCCAA=3'
6.3.147	70	Rev (reverse)	5'-DACTTCTATRGTGTTGGCYAATGC=3'
6.3.148	71	Rev (reverse)	5'-WATYCCCCTTTGGCTYGTGTT=3'
6.3.149	72	Rev (reverse)	5'-GGGCAAGAYCCTGAGGTTCC=3'
6.3.150	73	Rev (reverse)	5'-RATCAAACAGAAGACGGAGG=3'
6.3.151	74	Rev (reverse)	5'-CCCASCCRCCTTGGAGCCAG=3'
6.3.152	75	Rev (reverse)	5'-TGGGATTTAGAAAYAGTGCTCT=3'
6.3.153	76	Rev (reverse)	5'-GTGTGTGTCTCCTCCTATGG=3'
6.3.154	77	Rev (reverse)	5'-CCGGGAGAATGTATGTTGGA=3'
6.3.155	86	For (forward)	5'-TCAGGTGATGGCACAACAAGTC=3'
6.3.156	86	Rev (reverse)	5'-ACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTACGC=3'
6.3.157	Grypa A For (forward) 1		5'-CAAGACCAATCYTGTACCTCTGAC=3' [127]
6.3.158	Grypa A For (forward) 2		5'-CAAGACCAATYCTGTACCTYTGAC=3' [127]
6.3.159	Grypa A Rev (reverse)1		5'-GCATTYTGACAAAVCGTCTACG=3' [127]
6.3.160	Grypa A Rev (reverse)2		5'-GCATTTTGGATAAAGCGTCTACG=3' [127]
6.3.161	Grypa B For (forward)		5' TCCTCAAYTCACTCTTCGAGCG=3' [127]
6.3.162	Grypa B Rev (reverse)		5'-CGGTGCTCTTGACCAAATTGG=3' [127]
6.3.163	Paragrypa 1, 3 For (forward) 1		5'ATCCAAGAGGRGGAATAGA=3' [128]
6.3.164	Paragrypa 1, 3 For (forward) 2		5'ACCCAAGAGGGGGTATAGA=3' [128]
6.3.165	Paragrypa 1, 3 Rev (reverse)		5'-GTCTCCTTGAACCATTGC=3' [128]
6.3.166	RSV For AATACAGCCAAATCTAACCAACTTTACA=3'		[129]
6.3.167	RSV Rev (reverse)		5'-GCCAAGGAAGCATGCAATAAA=3' [129]
6.3.168	Enterovirus For GGCCCTGAATGCGGCTAATCC=3'		[130]
6.3.169	Enterovirus Rev (reverse)		5'-GCGATTGTCACCATWAGCAGYCA=3' [130]
6.3.170	Adenovirus For GCCCAGTGGTCTTACATGCACATC=3'		[131]
6.3.171	Adenovirus Rev (reverse)		5'-GCCACGGTGGGGTTTCTAAACTT=3' [131]
6.3.172	Grypa A 5'-sonda [FAM] TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG [BHQ1]=3'		[127]
6.3.173	Grypa B 5'-sonda [HEX] CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG [BHQ1]=3'		[127]

- 6.3.174 Paragrypa 1, 3 5'-sonda [FAM] TCTATAAGTGCAATMCATCTAGCAGCTGTT [BHQ1]=3' [128]
- 6.3.175 RSV A 5'-sonda [FAM] TGCTATTGTGCACTAAAG [BHQ1]=3' [129]
- 6.3.176 RSA B 5'-sonda [HEX] CACTATTCCTTACTAAAGATGTC [BHQ1]=3' [129]
- 6.3.177 Enterowirus 5'-sonda [HEX] CCGACTACTTTGGGWGTCCGTGT [BHQ1]=3' [130]
- 6.3.178 Adenowirus 5'-sonda [HEX] TGCACCAGACCCGGGCTCAGGTACTCCGA [BHQ1]=3' [131]

6.4 Plazmidy (kontrola pozytywna)

W nawiasie po nazwie konstrukt znajduje się numer komplementarnych starterów.

6.4.1 Plazmidy oparte na pJET1.2/blunt



Rycina 11 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pJet 1.2 ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrola pozytywna

6.4.1.1 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa 229E (25)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki	:
CCGGTGAAACATTTTGGCGTTACAAC	TTTGATATAACTGAAAGCAAGTATTCTTGCAAAGAGGTTTTTA		
AAAATTGTAATGTTTTGGATGATTCATCGTGTTTACAATAATGGGACCAATGTAACGCAGGTTAAAA			
TGCTAGTGTTTACTTTTCACAGTTGTTGTGTAGGCCATTAAATTAGTTGACAGTGAACTTTTGTCCACT			
TTGTCAGTTGATTTTAATGGTGTCTTACACAAGGCATACATMGATGTACTACGTAATAGCTTTGGTAAAG			

ATCTTAATGCTAATATGTCTTTAGCCGAKTGCAAGAGTGCTTTAGGCYTGTCTATTAGTGATCATGAATTT
 ACTAGTGCTATTTCTAATGCACATCGTTGTGACGTGTTGTTATCTGATTTGTCATTTAACAACCTTTGTCAG
 TTCGTATGCTAAACCTGAGGAAAAATTATCAGCTTATGACTTGGCGTGTTGTATGCGTGACAGGTGCTA

6.4.1.2 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa NL63 (29)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TCAATGGCTGTGGGCGTAATGTCCAGGGACATGTTGTTGTCGTCAGCCTTGAAATTGTATAAACCTAGTG		
TTATTCATGAYATTGGTAATCCTAAAGGTGTACGTTGTGCTGTYACTGATGCCAAATGGTACTGTTATGAC		
AAGCAACCTGTTAATAGTAATGTCAAGTTGTTGGATTATGATTATGCAACYCATGGTCAACTTGATGGTCT		
TTGTYTATTCTGGAATTGTAATGTTGATATGTATCCAGAATTTTCAATTGTGTGTCGTTTTGACACACGTAC		
TCGTTCTGTTTTTAATTTAGAAGGTGTTAATGGTGGTTCTCTTTATGTTAACAACATGCGTTTCATACAC		
CAGCATATGATAAACGTGCTTTTGTAAATTTAAACCTATGCCYTTTTTTTAYTTTGATGACAGTGATTGT		
GATGTTGTGCAAGAACAAGTTAATTATGTACCCCTTCGCGCTAGTAGTTGT		

6.4.1.3 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa OC43 (31)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CAGCCAGGGACGTGTTGTATCCTAGGCAGTGGCCCWCCCATAGGTCACAATGTCGAAGATCAACAAAT		
ACGGTCTCGAACTACACTGGGCTCCAGAATTTCCATGGATGTTTGAGGACGCAGAGGAGAAGTTGGAY		
AACCCTAGTAGTTCAGAGGTGGATATGATTTGCTCCACCACTGCGCAAAAAGCTGGAAACAGACGGAAT		
TTGTCCTGAAAATCATGTGATGGTGGATTGTCGCCGACTTCTTAAACAAGAGTGTTGTGTGCAGTCTAG		
CCTAATACGTGAAATTGTTATGAATGCAAGTCCATATBATTGGAGGTGCTACTTCAAGATGCTTTGCAG		
TCCCGTGAAGCAGTTTTGGTTACAACCCCYTTAGGTATGTCYTTAGAGGCATGCTATGTGAGAGGTTGT		
AATCCTAAAGGATGGACCATGGGTTTGTTCGGC		

6.4.1.4 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa MERS (Wirus Bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej) (59)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CTGGACTCATTCTGCGGTTATGATTATGTCTACAACCCTTTCTTTGTCGATGTTCAACAGTGGGGTTATG		
TAGGCAATCTTGCTACTAATCACGATCGTTATTGCTCTGTCCATCAAGGAGCTCATGTGGCTTCTAATGAT		
GCAATAATGACTCGTTGTTTAGCTATTCTTCTGTTTTATAGAACGTGTGGATTGGGATATAGAGTATCC		

TTATATCTCACATGAAAAGAAATTGAATTCCTGTTGTAGAATCGTTGAGCGCAACGTCGTACGTGCTGCT
CTTCTTGCCGGTTCATTTGACAAAGTCTATGATATTGGCAATCCTAAAGGAATTYCTATTGTTGATGACCC
TGTGGTTGATTGGCATTATTTTATGATGCACAGCCCTTGACCAGRAAGGTACAACAGCTTTTCTATACAGA
GGACATGGCCTCAAGATTTGCTGATGGGCTCTGCT

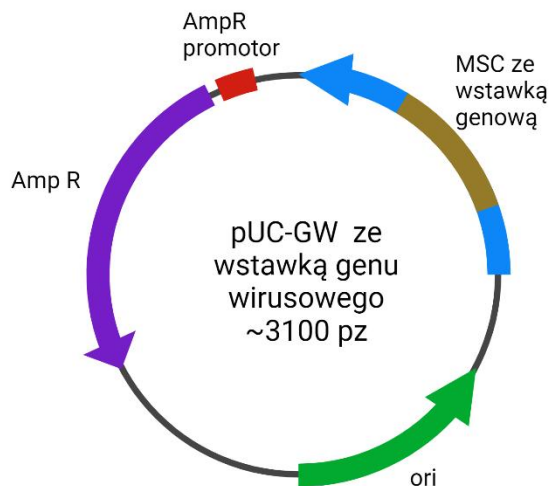
6.4.1.5 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa SARS Urbani HKU-39849 (64)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TGCACTCCGTGAACTCACTCGTGAGCTCAATGGAGGTGCAGTCACTCGCTATGTGACAACAATTTCTG		
TGGCCCAGATGGGTACCCTCTTGATTGCATCAAAGATTTTCTCGCACGCGCGGGCAAGTCAATGTGCAC		
TCTTTCCGAACAACCTTGATTACATCGAGTCGAAGAGAGGTGTCTACTGCTGCCGTGACCATGAGCATGA		
AATTGCCTGGTTCACTGAGCGCTCTGATAAGAGCTACGAGCACCAGACACCCTTCGAAATTAAGAGTG		
CCAAGAAATTTGACACTTTCAAAGGGGAATGCCCAAAGTTTGTGTTTCTCTTAACCTCAAAAGTCAAAG		
TCATTCAACCACGTGTTGAAAAGAAAAAGACTGAGGGTTTCATGGGGCGTATACGCTCTGTGTACCCTG		
TTG		

6.4.1.6 Plazmid pJET1.2 niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa SARS-Cov-2 (86)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TCAGGTGATGGCACAACAAGTCCTATTTCTGAACATGACTACCAGATTGGTGGTTATACTGAAAAATGG		
GAATCTGGAGTAAAAGACTGTGTTGTATTACACAGTTACTTCACTTCAGACTATTACCAGCTGTACTCAA		
CTCAATTGAGTACAGACACTGGTGTGTAACATGTTACCTTCTTCATCTACAATAAAATTGTTGATGAGCC		
TGAAGAACATGTCCAAATTCACACAATCGACGTTTCATCCGGAGTTGTTAATCCAGTAATGGAACCAATT		
TATGATGAACCGACGACGACTACTAGCGTGCCTTTGTAAGCACAAGCTGATGAGTACGAACCTTATGTAC		
TCATTGTTTTCGGAAGAGACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTTCGT		

6.4.2 Plazmidy oparte na pUC-GW



Rycina 12 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pUC-GW ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrole pozytywne

6.4.2.1 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa A, EV-A71 (1)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
ACCTTTGTGCGCCTGTTTTAYDNNCCYNYNCCCNNADNWGWA	ACTTAGAAGCWRYDNNNAVYMMY	
GATCARTAGYAGGCRTRRCRCWCCAGYYATGTCTYGATCAAGC	ACYTCTGTTTCCCCGGACYGAGTATCA	
ATAGRCTGYTYRCRCGGYYGAAGGAGAAARCGTYCGTTAYCC	GGCYARCTACTTCGRRAARCYAGTAVC	
RCCATKRAMRHKRCRGAGWGYTTCGYTCMRCACWHCCCCMGT	GTAGATCAGGYGATGAGTCACYG	
CRWYCCCCAYGGGCGACCRGTGGCRGTGGCTGCGYTGGCGGC	CTGCCYATGGRGHAAYCCATRGGRCG	
CTCTAATDYDGACATGGTGYGAAGAGYCTAYTGAGCTAGYTR	GTAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCT	
AATCCYAACTGCGGAGCACAYGCCYWCAANCCAGHGGGTRGT	GTGTCGTAAYGGGYAACTCTGCAGC	
GGAACCGACTACTTTGGGT		

6.4.2.2 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa C, CV-A21 (2)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CGTGCGCGCTAGTACTCTGGTAYYACGGTACCYTTGTACGCCT	GTTTTATATCCCYTCCCCNCGYAACTTT	
AGAAGHWWWWCANMMAGTTCAAYAGSRGGGGTRCRADCCAGY	ACCWCYAYGAACAAGYACTTCT	
GTYTCCCCGGTGAWDTYACATAGRCTGTACCCACGGYYRAAG	TRAWTGATCCGTTAYCCGCTTGAGTA	

CTTCGAGAAGCCTAGTAYCACCTTGGGRATCTYCGAYGCGTTGCGYTCRRCACTMTAMCCCCGRGTGTAGC
TTAGGCTGATGAGTCTGGGCRHYCCYCACYGGYGACRGTGGCCCAGGCTGCGTTGGCGGCCTACCCRT
GGCTAACGCYAYGGGACGCTAGTTKTGAACAAGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACYAAGARTCCTCC
GGCCCCTGAATGCGGCTAATCC

6.4.2.3 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa C, EV-A104 (3)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
ACACTTGCCACTCCTGGTTCYAACCAATTTCTGACATCAGACAACCTACCAGTCTCCATGYGCRATACCTG ATTTTGACGTYACTCCHCCTATACACATTCCGGGTGAGGTCAAGAACATAATGGAGCTAGCAGAGATTG ATAGYGTCAATTCCAATGAATGCYGTGGCGACAAAGGTCAATCAAATGGAAGCATACCCCATYCCTCTYAY ACACGGGRCARCAGAAAYACARACAGGCAATCTTTGCRCTCAGCCTGAGCCCAGCATCYGAYGGGCGGY TGTCACGCACRYTGTTAGGTGAGATTCTCAACTACTACCCCACTGGACTGGGTCTTAAAGTTTACCTT TCTCTTCTGTGGTAGTATGATGGCAACWGGAAAGATCCTGCTCAGCTACTGCCACCTGGTGCGCAAC CCCCGAAGACRCGAAARGAGGCCATGCTTGGTACYCACYTAATATGGGACATTGGGCTACAGTCCAGT GC		

6.4.2.4 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa C, EV-C109 (5)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TGGGTGTCCGTGTTTCCTTTTATCTNYTTTGAATGTTTATGGTGACAATTGTTGTGTACAGTTGTTTRCCAT AGTTTGCATTCARAAATAAACCYTAACACTTYCCAATTATTTGTYACAATGGGYGCTCARGTKTCYGCRCAR AAYAACGGTACTCATGARAATTCCAAYAGTGCGAGTGGTGGATCAACTATYAATTACACYACRATAAAYTA YTAYAAAGAYAGCGCCAGYAAYGCGGCRKCYAAGYTAGATTTCTCTCAGGAYCCTTCYAAATTCAGTGAAC CAGTYAAGGATGTGATGATTAARACAGCACCTGCYCTYAATTCACCAAATATAGARGCRTGTGGYTACAG YGACCGTGTRTTRCAACTTACCCTTGGTAATTCYACRATTACTACTCARGAAGCAGCTAACGCAGTGATT GG		

6.4.2.5 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa C, EV-110 (7)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TCGTTGCTGCCATACCTGAGTTYATGATGGCAAGTAACTCAGCCGACTCCACYGGAGGGATCACGTACG AGAAGGCCAATCCAGGCGARGCGGGTGGTAAGTTCCAACCCACCTTCACTCCNRTCTRGYAGGATG		

GAAAGAAAAACACCTTCGCACCCGTYGMCTGGTTRCTCGGGTGTGGGGTGATGGCTGGCAATGTCAC
RGTGTTYCCYACCAAATTATCAACTTACGCACCAACAACCTGCGCAACGYTGGTRCTHCCGTATGTRAAC
TCCACTTCCACGGAYTCTATGGCTAAACACAACAACCTGGGGAATCGTCGTRTTGCCTTTTGTCCCATTGG
ACTACGATTCAGGCGCGACYCCGAATGTGCCYATYACAGTCACCATTGCCCCGATGTGCTGCGAGTTTAA
TGGGC

6.4.2.6 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa C, EV-118 (9)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GGGGCAAAATCGTTATCCGCTTGATTACTGCGGGACGCCTAGTATCACYATGGATTGACWTGAGGGTT		
GCGCTCAGCACAYCCCCAGTGTAGCTTGGGCCGATGAGGCTCCRAATTCCCCACGGGCGACCGTGTyr		
GAGCCTGCGTTGGCGGCCTACCCGCGCCTCACGGCGTGGGACGCTCATTTATGACATGGTGCGAAGA		
GTCTACTGCGCTARTCAAGRYTCCTCCGGCCCCCTGAATGTGGCTAATCCTAACCACTGATCCTGTGAGCA		
CRCRCCAGTGCCYAGCAGGTCGTAATGCGCAAGTCGGTGGCGGAACCAACTACTTTGGGTGTCCGTGT		
TTCCTTTATTTCTCATTGAATGCTTATGGTGACAATTGTTGAGTACAGTTGTTACCATTACTGCAYTCTSC		
AAATAGTGAATAAACYACRCAACAATATAACACAATGGGAGCTCAAGTGTCAGC		

6.4.2.7 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej enterowirusa D, EV-D68 (11)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TTCGGTACCTTTGTACGCCTGTTTTATCTCCCTYCCCAATGTAAYTTAGAAGYTYTYAAATCRADGCTCRRT		
AGGTGGRGCGCAARCCAGCGCTYTCRTGAGCAAGCACTYCTGTYTCCCCGGTGHGGTTGTATARACTG		
TTYCCACGGTTGAAAACAACYTATCCGTTATCCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTAYCACCTTTGGAT		
TGTTGAYGCGTTGCGCTCAGCACACTAACCCGTGTGTAGCTTGGGYGATGAGTCTGGACRYACCYCAC		
TGGYGACAGTGGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCCTACTCATGGTGAAARCCATGAGACGCTARACATGAA		
CAAGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCYTAACCAT		
GGAGCAAGTGCTCACARRCCAGTGRGTTGCTTGTCGTAAYGCGCAAGTCCGTGGCGGAACCGACTACT		
TTG		

6.4.2.8 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego bokawirusa (12)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GACTGCAGACAACGCCTAGTTGTTTGGTGGGAGGAGTGCTTAATGCACCAGGATTGGGTGGAACCTG		

CAAAGTGTATCTTGGGCGGGACAGAATGCAGAATTGACGTCAAGCATAGAGACAGTGTACTTTTAACT
 CAAACACCTGTAATTATATCCACTAACCACGATATCTACGCGGTTGTTGGTGGCAATTCTGTTTCTCATGT
 TCACGCGGCTCCATTAAAAGAAAGAGTGATTGAGCTAAATTTTATGAAACAACTTCTCAAACATTTGG
 AGAAATCACTGCTACTGAGATTGCAGCTCTTCTACAGTGGTGTTCATGAGTACGACTGTACTCTGACA
 GGATTTAAACAAAAATGGAATTTAGATAAAATTCCAAACTCATTCCTCTTGGGGTCCTTTGTCC

*6.4.2.9 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 respirowirusa 3 (14)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GAGATGCAGGTCTCGCTTCATTCTTCAATACAATCAGATATGGAATTGAGACYAGAATGGCAGCTTTGA		
CTYTATCCACTCTCAGACCRGATATMAATAGATTAAAAGCTCTRATGGAAYTGATTTTCAAAARGGRCC		
ACGCGCTCCHTTTCATYTGATCCTCAGAGATCCYATACATGGTGAGTTYGCACCAGGCAACTATCCTGCY		
ATATGGAGYTATGCAATGGGRGTGGCAGTTGTACAAAAYAGAGCCATGCAACAGTATGTGACRGAAG		
RTCATATCTAGAYATTGAYATGTTCCAGCTAGGACAAGCAGTAGCACGYGATGCTGAAGCTCAGATGAGC		
TCAACACTRGAAGATGAACTYGGAGTDACACACGAAGCCAAAGAAAGCYTGAAAAGACATATAAGGA		
ACATAAACAGYTCAGAKACATCYTTCCAYAAACCAACAGGTGGATCAGCC		

*6.4.2.10 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 bokawirusa 1 (16)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CGCTGCAAATCTCTTCTGGCTACACGTCCTTTTGAACCTGAAGAGGCTGACATATTCACACTTTAAAAA		
AGGCTGAGCGAGAGGCATGGGGTGGAGTTACTGGCGGCAACATGCAAATCCTTCAATATAGAGATCG		
CAGAGGAGACCTTCATGCACAAACAGTGGATCCTCTTCGCTTCTTCAAAAACCTTTTACCTAAAAAT		
AGATGTATTTTCATCTTACAGCAAACCTGATGTTTGTACTTCTCCTGACAACTGGTTCATTTTAGCTGAAAA		
AACTTACTCTCACACTCTTATTAACGGGCTGCCGCTTCCAGAACATTACAGAAAAAACTACCACGCAAC		
CCTAGATAACGAAGTCATTCCAGGGCCTCAAACAATGGCCTATGGAGGACGTGGTCCGTGGGAACATC		
TT		

*6.4.2.11 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 bokawirusa 2 (18)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CTCAGACCAAGCGACGAAGACGARGGAGARAACATCGGGGGGGAATAGAACCAATCCTTATACTGT		
RTTCAGTCAACAYAGGGCTAATCMTYCAGATGCTCCTGGATGGTGYGGRTTTTACTGGCATTCTACT		

MGRCTTGCTAGAGATGGSACTAATTGTATCTTTAATGAAATGAAACAAGAAKTTCAAGARYTRCAAA
TWAATGGRAAAATHACYTGGGAYAATGYTAGAGAAAYTRYTGTTTAGYCAGAAAAARAARCTAGATCA
RAAATAYAGAAAYATGCTGTAYCATTTAGACAYARYVCTGATTGTCCTAGATGTGATTATTGGGATR
ATGHTTACCGTARRCACTTAGCTCATGTCTCTTCACAGGAATCAGAGGAGGTWACAGACGAAGAAA
TGCTTTCTGCTGTTGAAAGCATGGAWACAAATGCCTCCAATTAAACGCCARCCTGGAGGGTGGGTG
CTTCCTGGTTAT

*6.4.2.12 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
bokawirusa 3 (20)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TTCTGGCTACGCGTCCTTTTGAACCGGAAGAGGCAGAAATTTATCATGCTTTAAARCGAGCTGAGMGA		
GAAGCTTGGGGTGGAGTTACTAGCGGCAACCTACAAATTCTYCAATACAGAGATCGCAGAGGAGACCT		
TCACGCACAACAAGTGGATGCTCTTCGCTTCTTCAAAAACCTACCTATTRCCWAAAAATAGATGCATTAC		
MTCTTACAGCAGACCTGATGTCTGTACTTCTCCAGAAAACCTGGTTTGTTTTAGCTGAAAAAACTTACTG		
TCACACTCTTGTTAACGGGCTGCCGCTTCCAGAACATTACAGAAAACACTACCACGCAACCCTAGATAA		
CGAAGTTCTACCAGGGCCTCAGACAATGGCCTTTGGGGGACGTGGTCCGTGGGAACATCTT		

*6.4.2.13 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
bokawirusa 4NI (22)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
ACAGATGGGCAAGCAGAACACTATTTGCTTTTATGGCCCTGCTTCAACAGGCAAAACAAACTTTGCAA		
AAGCTATAGTTCAGGGCGTTCGCCTTTATGGCTGTGTTAATCATTTAAACAAGGGGTTTGTTTTAAACGA		
TTGCAGACAACGCCTTATAATTTGGTGGGAAGAATGTTTAATGCATCAAGATTGGGTAGAACCTGCTAA		
ATGTATTTTAGGCGGAACTGAATGTAGAATTGATGTTAAACATAAAGATAGTGTTCTCCTTCAACAAACA		
CCAGTAATCATTTCCACTAACCATGACATCTACTCTGTAGTTGGTGGCAATACTGTTTCTCATGTTCATGC		
AGCACCATTTAAAGAACGAGTTCTTCAGCTAAATTTTATGAAACAACCTACCACAAACATTTGGAGAAAT		
CTCTCCAAGTGAAATTGCAGAACTTTTGCAATGGTGCTTTAATGAGTACGACTGTACTCTTGCTGGC		

*6.4.2.14 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
mastadenowirusa A (32)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GTTTAACGAGGTGCAGCTGCCGTCKTCKYGGAGRAGYGGRGCCACHTCR TTCATCATTTGY YKGACKYR		
BRTGTTTTGYTTRRCHAGTTCCCYBARMAGRCGYTCWCCGCCYARSGADAGYAACTCYTG YAAAGAKTT		

RAAAKTTTTWARWGGYTTYARRCCRTCRGCCATWGGCATGTGRTCYAGGGTTTGYTTYARCAGYTGCA
 RSCGRTCCCAAGYTSWGTWAYRTTTTCTATKSCATCTCGATCCARCARAYTTCTCGTTGCGGGGRTTK
 GGYTGGCTGTTGCTGTAAGGRAYRAGRCGRTGAGCRTCYARRTGSRCASAGRGTTCCTGTCYTCCAKGGW
 CGYAAKGTGCGYKTSAGRGTGTTTCSGTCAACKGTRAAYGGATGCGCYCCTGGTTGDGCGCTGGCCARY
 GTGCGCTTYAARCTSRKRCGGCTGGTRCTGAASYGBGYGTCTTCTCCCTGTGCTTCGG

*6.4.2.15 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 mastadenowirusa B (34)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CCCGTGAGCTTGAACCTGAAAGAGAGTTCAACAGAATCAATYTCGGTATCGTTTRAYRGCRGCTTGYCT		
MAGKATTTCTTGACGTCRCCAGAGTTRTCCTGGTAGGCGATCTCSGCCATGAACTGCTSGATYCTTCC		
TCYTGAAGATCTCCGCGRCCCGCTCTYTCGACGGTGGCCGCGAGGTCRTTGGAGATRCGSCCMATGAG		
TTGRGAGAATGCATTCATGCCCCGCTCGTTCCAGACGCGGCTGTARACCACRGCCCCCWCGGRRTCTC		
TYGCGCGCATVACCACCTGRGCGAGGTTTRAGCTCYACGTGKCKGGTGAAGACCGCATAGTTGCATAGRC		
GCTGRAAAAGGTAGTTGAGTGTGGTGGCRATGTGYTCGGYGACRAAGAAATACATGATCCATCGTCTCA		
RCGGCATYTCGCTGACATCGCCAGMGCTTCCAAGCGCTCCATGGCCTCGTAGAAGTCC		

*6.4.2.16 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 mastadenowirusa C (36)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TGCACGTCTCCTGAGTTGTCTTGATAGGCGATYTCGGCCATGAACTGCTCGATCTCTCCTCCTGGAGAT		
CTCCGCGTCCGGCTCGCTCCACGGTGGCGGCKAGGTCGTTGGARATGCGGGCCATGAGCTGCGAGAA		
GGCGTTGAGGCCTCCCTCGTTCCAGACGCGGCTGTAGACCACGCCCCCTTCGGCATCGCGGGCGCGC		
ATGACCACCTGCGCGAGATTGAGCTCCACGTGCCGGGCGAAGACGGCGTAGTTKCGCAGGCGCTGAA		
AGAGGTAGTTGAGGGTGGTGGCGGTGTGTTCTGCCACGAAGAAGTACATAACCCAGCGYCGCAACGT		
GGATTCGTTGATATCCCCCAAGGCCTCAAGGCGCTCCATGGCCTCGTAGAAGTCCACGGCGAAGTTGA		
AAAACCTGGGAGTTGCGCGCCGACACGGTYAACTCCTCCTCCAGAAGACGGA		

*6.4.2.17 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 mastadenowirusa D (38)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CTGCATCTCCAGGCTTTCATCTCGGAGGGGGGRATCATGTCCACCTGCGGGGCGATGAAAAAAYGG		
TTTCCGGGGGCKGGGGTGATGAGCTGCGARGADAGCAGGTTTCTYARCAGCTGGGACTTGCCGCACCC		

GGTYGGRCCGTAGATGACCCCGATGACKGGTTGCAGGTGGTAGTTCAAGGASATGCAGCTGCCGTCGT
 CCCGGAGGAGGGGGGCGYACCTSGTTRAGCATGTCYCTSACTTGGAGGTTTTCCCGRACRAGCTCGCYR
 AGRAGGCGGTCTCCGCCAGCGAGAGSAGYTTTGCAGGGAAGCAAAGTTTTTYAGGGGCTTRAGYC
 CGTCGGCCATGGGCATCTTGCGAGGGTSTGCGAGAGGAGYTCSARSCGGTCCCABAGCTCGGTGAC
 GTGCTCTACGGCATCTSGATCCAGCAGACTTCCTCGTTTCGG

*6.4.2.18 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 mastadenowirusa E (40)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CGGGAGAGGCATGATGAGACTAATCAYAGAAATGAACTRACTGTGGGTCTRATGAGCCGCAAGCGTCC		
AGAAACAGTGTGGTGGYATGAGGTGCAGTYRACTGGCACAGATGAGGTGTCAGTCATGCATGAGARAT		
TTTCCCTAGAACAAGTYAARACTTGTTGGTTGGAGCCTGAGGATGATTGGGAGGTAGCCATCAGGAAT		
TATGCYAAGCTGGCTCTRAGGCCAGATAGAAAGTACAAGATTACTAAGCTKATAAATATYAGAAATGCCT		
GCTACATCTCAGGGAATGGGGCTGAAGTGGAGATCTGTCYSCAGGATAGAGTGGCTTTCAGATGCTGC		
ATGATGAATATGTACCCGGGRGTGGTGKACATGGATGGGGTCACCTTTATGAACATKAGGTTYAGGGGA		
GATGGGTATAATGGGACGGTCTTTATGGCCAA		

*6.4.2.19 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 mastadenowirusa F (42)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GGGATGACATGTTCCAGGGGYTGCTGGAGRCTGARYATSYGTTTGATTTCCTGAACCTTCTSAGGCTTY		
TGAAGARATDTGCTTCAYRATCTTTTTGATGTGGAGSTGGATSRKTYGGAAGRGGAYSCSAAYSAGGAA		
GCGGTWGATGGTATGTTTCCYRASWGGWTGCTGTCCGAGGMYSASAGYGCTGMMRRBRGYGNNNS		
TTCGGGYGATTCTGGGGTTGGMGAAGASYTGKTGSMGGTTRATYTGGAYTTGAAATGCTATGAAGASG		
GTTTGCCTCCTAGCGRYCKGARRCTGATGARGCTRMAGARNNNNNNGMGGARGAAGAGRCGGCT		
RTGYCGAMTTATGTGAANNNNNNTGARRRTGMWARTSAGCTGGTGYTGACTGTCCAGARAACCK		
GGRCGAGGTTGTCTGGGCTTGTGATT		

*6.4.2.20 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
 metapneumowirusa (44)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TGCGGCARTTTTCAGACAATGCWGGGRATAACACCAGCAATATCHTTRGACYTAATGACWGATGCTGAR		
YTRGCCAGRGCYGTWTCHWACATGCCRACATCTGCAGGRCARATAAAAYTRATGTTRGARAACCGYGC		

RATGGTRMGRAGRAARGGRTTYGGAATCYTRATAGGRGTYTACGGRAGCTCYGTRATTTACATGGTB
 RYTGCCRATCTTTGGBGTYATAGAYACRCCTTGYTGGATARTVAARGCAGCYCCYTCTTGYTCHGAAAAA
 RABGGRAAYTAYGCTTGCCTCYTAAGAGARGAYCARGGRTGGTATTGTMARAATGCAGGRTCMACTGT
 YTACTACCCAAATGARAARGACTGYGAAACAAGRGGWGAYCATGTYTTTTGYGACACAGCAGCAGGRA
 TYAATGTNGCTGAGCARTCAARRGARTGCAACATYAACATATCYACYACHAAYTACCCRTGCAAAGTYAG
 CACAGGAAG

*6.4.2.21 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiej
 paragrypy 4a (46)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
ACGATAGGCCTGAACGGTTGCATTYAGGTCACTCAATCGTTCAGGCYACTATAATYTCYAATTCYGRACA		
AAAYTGAYAAAATGAGYTTTGAAATAAGTGTAGAGGAAATTGARGAGCTCATYGARACTGGCAATCTCA		
ACATAGACCATGCACTAAAAGAATTAGGTGCAACCAGTCAACCRTCAMTARACAACTTCCATCCCAAR		
RYAGCAGAACAGAAARGAAATRATGRYRGAACCAAGATTTCAAGAAATCTGGCCCCAGYAGAGRCACCY		
GMCCRCATCTCCAMAGCACAACRGCRRYACAATGAAGAGAATGAATCAGRAAAACAAARTCTRGACA		
ACCTCTCCATGATATCCAACAAACCCAGACAGGTACGCTGCTTATGGGACCAGACA		

*6.4.2.22 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiej
 paragrypy 4b (48)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GTTACGCCATGGGAGTTGGAAGTGTCCAGGATCCAYTGATYAGAACTATCAGTTTGGAAGGAACTTCT		
TRAAYACCAGYTATTTTCARTATGGTGTGAGACTGCAATGAARCACCAGGGWACAGTTGACCCYAAAY		
TGGCYTAGAGCTTGGAATAACYGATGAAGACAGAGTRGAYATTATGCAGTCYGTGAAAAGCACATAT		
CAGGAAAAGCTGGWGATGAYATATCACAGCCTGCAGGTGCATTTRCAATGTCYCTAARCAGATCAGCTT		
TCATYAACAAYAACACTTCYCAAGACTTCTCAGGRGCAAGACTCTCCAACCTACGARCAAGGATGGTCYG		
GCACAAATCAAGATGAAACGAGAGATRYTATCCAGAAYCYACAATGCAYAGACTCCMRAACATTGAAY		
YRACTGACTCAGATCACAATGARCTACTGATGCCGGAGCTTGAAA		

6.4.2.23 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej RSV A (50)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
ACATCTCACCATGCAAGCCATYATCYATACYATAAAGTAGTTAATTNAAAAATAGTCATAACAATGAAC		
TGATATTAAGACYAAMAAYAACGYTGGGGCAAATGCAAACATGTCCAAAACCAAGGACCAACGCRCCG		
CCAAGACACTAGAAARGACCTGGGACACTCTCAATCATCTRTTATTCATATCATCGTGCTTATACAAGTTA		

AATCTTAAATCTATAGCACAAATCACATTATCYATTYTGGAATGATAATCTCAACYTCACTTATAATTGYAG
CYATCATATTCATAGCCTCRGCAAACMACAAAGTCACACTAACAACTGCAATCATACAAGATGCAACRAR
CCAGATCAAGAACACAACCCCAACAYACCTSACCCAGAATCCCCAGCTTGGAATCAGC

6.4.2.24 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej RSV B (52)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
AGGCAATGCAGCAGGTCTAGGCATAATGGGAGAGTAYAGAGGTACACCAAGAAACCARGATCTYTATG ATGCAGCCAAAGCATATGCAGAGCAACTCAAAGAAAATGGAGTAATAAACTACAGTGTATTAGACTTAA CARCAGAAGAATTGGAAGCCATAAAGMATCAACTCAACCCYAAAGAAGATGAYGTAGAGCTYTAAGTT AACAAAAAATACGGGGCAAATAAGTCAACATGGAGAAGTTTGCACCTGAATTTTCATGGAGAAGATGCA AATAACAAAGCTACCAAATTCCTAGAATCAATAAARGGCAAGTTYGCATCATCYAAAGATCCTAAGAAGA AAGATAGCATAATATCTGTAACTCAATAGAYATAGAAGTMACTAAAGAGAGCCCGATAACATCTGGCA CCAACATYATCAATCCAAYAAGYGAAGCYGAYAGTACCCAGAAARCYAAAGCCAACTACCCAAGAAAAC CC		

*6.4.2.25 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
respirowirusa 1 (paragrypy 1) (54)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CACCGCTGATAGGGACAACAAAAAYTGGGCAAATGAYAGCAACGAAAGATGGATGAATCACTCYACCA ACAACCACACAATCACGATTCATGGTGCAGAAGAACTCGAAGAAGAGACAAATGATGAAGACATCATT GAYATAGAAAACAAGATTGCACGAAGGYTGGCYGAYAGAAAACAGAACTAAGCCAAGCAARCAACA AACGAGACATCAGCAGTGATGCGAYTATGAAAATGATGATGATGCTACAGCGGCTGCAGGGATAGGA GGAATYTAACAGGATAWTTGGACAGYAGAARCCAGATCAAAAGTAAGAAAAACTTAGGGTGAATGRC AATTCACAGATCAGCTCAACCAGACAYCATCAGCATAACGAAACCAACCTTCACAGTGGATACCYCAG CATCCAAAACCTCTCTTCCCGAATGGATCAGGATGCCTTCTTYYTTGAGAGGGATCCTGAGGCCGAAGG AGAGGCACCACGAAAAC		

*6.4.2.26 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego
rubulawirusa 2 (56)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GCAGCAGAGGCAAAATCCAAACCAGYYGCYRCTGGTCCAGTRAAACCCAGRCGGAAGAAAGTGAYCA GCAATRCYACYCCATACACTRTTGCAGACAAYAYYCCACCYGAGAAGCTACCWATCAACACTCCAATACC CAATCCATTACTTCCACTGGCACGCCCYCAMGGAAAGATGACAGACATTGACATTGTCACTGGGAMCA		

TYACAGAAGGATCATACAAAGGTGTGGAGCTTGCYAAATTAGGGAAGCAAACACTACTCACRAGGTTC
ACCTCBAATGAGCCARTCTCCTCAGCTGGATCYGCCCAAGACCCCAACTTTAAGAGGGGGGGAGCTAA
TAGAGAAAGAGCAAGAGGCAACCATAGGAGAGAATGGAGTATTGCATGGGTCTGGAGATCARGTCAAA
GTCTTCGAGTGGTGTAAATCCCAGGTGTGC

*6.4.2.27 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa
świnki (61)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GGCAAGCCATGGATCAATTTATAAAACAAGATGARACTGGTGATTTAATTGAGACAGGAATGAATGTTG CAAATCAYTTCCTATCYGCCCCATTARGGAACCAACTYGYTGAGCAAGGCYACAATCATCCCYGGYGT TGCACCAGTACTCATTGGCAATCCAGARCAAAAGAACATTCAGTACCCACACATCAGGGATC CAAGTCAAAGGGMAGARGCTCAGGGGCCARGCCCATCATAGTCTCATCYTCCGAAGKAGGCACTGGA GGGACTCAGATTCCTGAGCCCCCTTTTGCACAAACMGGACARGGTGGCAYTGTACCACCGTTTATCA RGATCCAACATCCAACCAACAGGTTATACCGAAGTGTGGAATTGGCTAAGATAGGAAAAGAGAGAA TGATTAATCGRTTGTGAAAAACCMAGRACCTCAACGCCGGTAACAGAATTT		

*6.4.2.28 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej rinowirusa
A (62)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CAAGCACTTCTGTYWCCCCGGYBDVNDHKRATAYGCTYYMNMARGGCRRAARCWDHHNNNRTCG TTAYCCSCAMRRYRMCTACRSRRARCYTAGTANBDYYYYNRADDDWNYHHGRYTGGTYNHTCMNBYR NNNNNNHNCNNNYRNARACCTKGNAGATGRGGCTRGRHRHHCCYWCYNGYRANRGWGDYNYA GCCYGCGTGGCTGCCTGCDYACNNNNNNHNBRRGTRYGAAGCCWWDNDHHDGACARGGTGYGAAG AGYCBMSTGTGCTYRYKTGANTCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGCTAAYCYTAAMCCYGYAKCYRDDRYN YRYAADCCARYRNRTNKNYRGTCGTAAYGRGYAAYTRYGGGAYGGRACCRACCTTTGGRTGTCCGTG TTTCH		

*6.4.2.29 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej rinowirusa
B (63)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
YCCYACCAYCCGACCCACDGGGTGTRGTRCWCTGGTAYTHTGTACCYTTGYAYGCCTGTTYNNNNNNN NNNNNCYHYHYVHHVHHHYMCNHHYYMHNNNNNNNNNNNNNNNGWAACNTTAGAAGHWNBDV DHHNNNNNNNGYRCAAYAGGWDNYRYAYMHCCARTRRYRKNWDNGYRCRAGYAMTYCTKKTMMCC		

CGGRGCKRRRTATARRYKGYNNMMCRYBRYYRAAARYYYTYAACCGTTAYCCGCCARYYAACTRCGHRAH
 RRCTAGTANYATYWTKHHBNBNHNNDGRYGTTCGATCAGGTRRNNNNNNNNHMMCNNNNNYACTA
 GTYTGGTCGATGAGGCTRRRARNYCCYCACRGGYRACYGTGTYYYAGCCTGCGTGGCGGCCARCCCRRC
 NHHWGYGGGACGCCHWWNDNDGACATGGTGYGAAKAYYYDMDTGYGCTTTRYTGADTCCTC
 CGGCCCCTGAATGCGGCTAACCYHAACCCY

*6.4.2.30 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej rinowirusa
 C- drzewo 1 (66)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
RARYACTTCTGTTTCCCCGGNNNNNBDDBAWWHGVYTYVMMMRGGYDRAARVYVHDNBNVTCG		
TTAYCCGCAHWRBKMCTACGVRAMKSYAGTADYASHYTBRAWRBYNHDDGGBKKKYCGYTCVRYHR		
NWNHYCCNNANYDRYAGRYYWGGBMRATGRGGCWRVRYDYDCCCCACYRGYGAYRGTGRYBYWGC		
CYGCGTGGYKSCCTRCNYRBSMYNNNNYKSVYRNGAMKCCHVDNRDYGACARGGTGTGAAGRSMC		
YMBTGTGCTMVYWDTGABTCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGCTAAYCYTNACCCYRYAKCYRYRCAHRYR		
HNCCARYDTGYVKGYRGTCGTAAAYGRGYAAYTRYGGGAYGGRACCRACCTACTTTGGGTGTCCGTGTTTC		
Y		

*6.4.2.31 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej rinowirusa
 C- drzewo 3 (68)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
WCGGTTTCCTTTGYAYGCCTGTTTTMHVHNYYCHWBYYYBWYWNYYTYWNNNNNNNNNNNNNNNN		
NNMRHRTAANTTAGAMGYWDNRYMNAYNAGYYCAATAGGAVNYRRYYMAYCCANRRYYRYNHHR		
RCAAGYACTTCTGTYWCCCCGGRYGYGTGAATAGRCYNNHMMMRGGYTGAAGCTGWAGCRYTCGTT		
AYCCGCWYWYSTACTRCRCRRWRRYTAGTADCWHHYTKVNHDBBBBHDTGGYGTTTCRCTCRGCRBN		
NNNWHCCCCMVYGYAGATCAGGGYAATGRGGCTRCRBRWCCYCACYGGYGACRGTGDYGYAGCCY		
GCGTRGTGCCCYGCCYRRRYHNNNVNYYYYRGGACRCCAYDBNHWGACAGGGTGWGAAGRYYBK		
MGTGYGCTASRDRTGARTCCTCCGGCCCCCTGAATGYGGCT		

*6.4.2.32 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej rinowirusa
 C- drzewo 4 (69)*

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
YCAAGYACTYCTGTYTCCCCGGYWYDNVGDGNRHTARRYHBYNYMMRVGRYYRARRCYHBRWDWRT		
CGTTAYCCRCRYDNNWACTRVRCRRARCYYAGTANYNCYYYRVNMNNYHBNHYGKYTGGTYRYTCMRY		

BANNNNWHYCCMHTVRYARACCYGGCAGATGRGGCWGAVDYWCCYCACTGGYRACAGTGKTCYW
GCCYGCGTGGCTGCCTGYHCMCYWHNNNNNGKGDRAAGCCRWYNDRYDGACARGGTGHSAAAGAG
CCSMGTDYGCTWNNWRTGANTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCYAACCCYRCAKCYRTBRCAYR
SAWDCCASYRTGTRBRYRGTCGTAAYGRGYAAYTGYGGGACGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTT
TCYTK

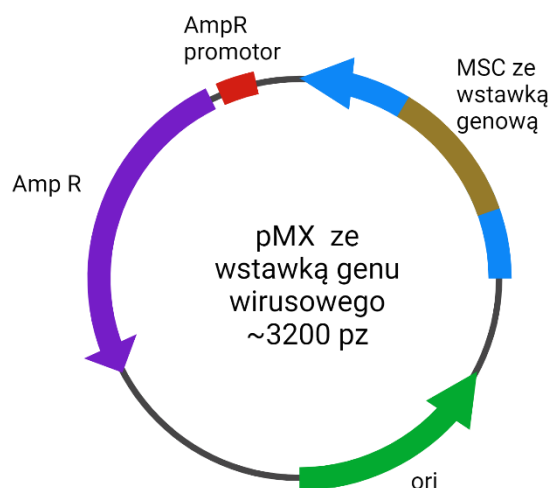
6.4.2.33 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa grypy A (70)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
KCCAGCRCAAATG	CYATAAGCACMACW	TTYCCTTATACTGGWGAYCCTCCWTACAGCCATGGRACAG
GRACAGGRTACAC	YATGGAYACAGTMAACAG	RACACAYCARTAYTCAGARARRGGRARRTGGACRAM
AAAYACMGARACT	GGDGCDCCSCARCTHAACCC	RATTGAYGGDCCACTACCWGARGAYAATGARCCA
AGTGGVTATGCMCA	AACAGAYTGTGTHYTRG	ARGCWATGGCYTTYCTTGAAGAATCCCAYCCHGGDAT
MTTGGARAAYTCNT	GYMTTGAAACAATGGARG	YYGTTCARCARACAAGRGTRGAYAACTRACHCAA
GGYMGMCAGACYT	ATGAYTGGACWYTAAYAG	RAAYCARCKGCWGCMACWGCAATTRGCCAACACY
ATAGAAGTH		

6.4.2.34 Plazmid pUC-GW niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa grypy B (73)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
RATCAAACAGAAG	ACGGAGGRCTACCACAA	AGYGGYAGAATTGTGTTGATTACATGRTGCARAAAYCT
GGRAAAACAGGA	ACAATTRYCTATCAAAG	RGGTRTTTTRTTGCCTCAAAARGTGTGGTGCGCRAGTGG
CAGGAGCAARGT	AATAAAAGGRTCMTTG	CCYTTAATTGGWGAAGCAGATTGCCTYCAAGAARAATAYG
GTGGATTAAACAA	AAAGCAAGCCTTACTAC	ACAGRRRAACATGCAAARGCCATAGGAAATTGCCCAATAT
GGGTRAAACACCY	TTGAAGCTKGCYAATG	GAACCAATATAGACCYCCTGCAAACTATTRAARGAAA
GRGGTTTCTTCG	GAGCYATTGCTGGTTTC	YTAGARGGAGGATGGGAAGGAATGATTGCAGGTTGGCAC
GGATA		

6.4.3 Plazmidy oparte na pMX (pUC19)



Rycina 13 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pMX ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrole pozytywne

6.4.3.1 Plazmid pMX niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa różyczki (74)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
AGCGCACCTACGCCGAGCAGGATTTCCGCGTCGGCGGTACGCGCTGGCACCGATTGCTGCGCATGCCA		
GTGCGCGGCCTTGACGGCGACAGCGCCCCGCTCCCCCCCCACACCACCGAGCGTATCGAGACCCGCTC		
GGCGCGCCATCCTTGCGCATTCGCTTCGGTGCCCCTCAGGTCTTCCTTGCCGGGCTCCTGCTCGCGGC		
CGTTGCCGTCGGCACCGCGCGGGCTGGCCTCCAGCCCCGCACTGACATCGCGGCACCCCCTGCGCCG		
CCGCAGGCCCCCTCGCGCGCATGGGAAGCATTACGGCCACCACCACCATCAGCTGCCGTTCTTGGGCA		
CGACGGCCACCACGGCGGCACCCTGCGCGTCGGCCAGCACCATCGAAACGCTAGCGACGTGCTGCCC		
GGCCACTGGCTCCAAGGCAGCTGGGGTTGCTACAAC		

6.4.3.2 Plazmid pMX niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusów ospy (wirusy z rodzaju Orthopox) (75)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GAAACTTGGAACATCTCTTCTAGTTTCACTAGTACCTTTATTAATTCTTTCAGGTACAGATTTTGAATTC		
GACGATGCCGAGTATTTTATTGTTGTATATTTCTTCTTCGATTGCATAATCAGATTCTTATATACCGCTCA		
AACTCTATTTTAAAATTATTAAACAATACTCTACTATTAATCAGTCGTTCTAACTCCTTTGCTATTTCTATGG		
ACTTATCGACATCTTGACTGTCTATCTCTGTAAACACGGAGTCGGTATCTCCATACACGCTACGAAACCG		

AAATCTGTAATCTATCGGTAACGATGTTTTCACTATAGGATTAATATCTCTATCGTCCATATAAAATGGATTA
CTTAATGGGTTTGCAAAATGTAACATACCGTTAGATAACTCTGCTCCATTTAGTACCGATTCTAGATACAA
GATCATTCTACGTCCTATGGATGTGCAACTCTTAGCCGAAGCGTATGAGTATAGAGCACTGTTTCTAAATC
CCATCAGTCCATA

6.4.3.3 Plazmid pMX niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa odry (76)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
GTGTCAGAACATCAAGCACCGCCTAAAAACGGATTTTCCAATCAAATGATTATAAACAATGTGGAAGT		
TGGGAATGTCATCAAGTCCAAGCTTAGGAGCTATCCCGCCCACTCATATTCCATATCCAAATTGTAATC		
AGGATTTATTTAACATAGAAGACAAAGAGTCAACAAGGAAGATCCGTGAGCTCCTCAAAAAGGGAAAT		
TTGCTGTACTCCAAAGTCAGTGATAAAGTTTTCCAATGCCTGAGGGACACTAACTCACGGCTTGGCCTA		
GGCTCCGAATTGAGGGAGGACATCAAGGAGAAAATTATTAACCTGGGGGTTTACATGCATAGCTCCCA		
ATGGTTTGAGCCCTTTCTGTTTTGGTTTACAGTCAAGACTGAGATGAGGTCAGTGATTAAATCACAAAC		
CCATACTTGCCATAGGAGGAGACACACACCTACATTCTT		

6.4.3.4 Plazmid pMX niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej wirusa ospy wietrznej i półpaśca (77)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
CGCCGCGGCCGCTGTTGAATCTTGTCACATATGCGGTATGATTGCGATCAATAATGTCATTAACCCCA		
GGATTAAACTGTCCAGGTGCAGGCGGTAGGACCTGCAACCGTATAAGCGCATCCATAACAGAATGTGA		
CGTTAAGGCGCCTTGATCATACCGCCCCCACGAGCATGAACTGGTCGCGTGGTAGACGATCATAGCA		
AAATTGATAACTGTTTTTATTTTCGTGTGTTGTCATATAATTCACAAATGTCTCAGTATATTCCGGTAGGTG		
CTCTATAAGGTTCCCGAAGGACGAACTTGAGGTTCTGTTGACACTATTAGATGTCCTATACATTAAATAT		
AAACATAATACCGCACACTCGAACGCGGAGTACGCTCTATCTCCAACATACATTCTCCCGGCGGACTGTA		
G		

6.4.3.5 Plazmid pMX niosący wstawkę z fragmentem sekwencji nukleotydowej ludzkiego koronawirusa HKU1 (26)

Sekwencja	nukleotydowa	wstawki:
TCCTGCTAATGGGCATATGCTCCATGGTGGTGGAGTTGCAAAAGCTATAGCTGTAGCTGCAGGTAAAAA		
ATTTTCTAAAGAACTGCTGCTATGGTTAAATCTAAAGGTGTTTGCCAAGTAGGAGATTGTTATGTTTCT		
ACCGGTGGTAAATTATGTAAACAATTCTTAATATTGTAGGTCCTGATGCTAGACAAGATGGAAGACAAT		

CTTATGTTTTGTTAGCACGTGCTTATAAGCATCTTAATAAKTATGATTGTTGTTTGTCTACTCTCATATCGG
CTGGTATATTTAGTGTTCTGCTGATGTGTCATTAACCTTACCTTCTAGGTGTTGTTGATAAACAAGTTATCC
TTGTTAGTAATAATAAAGAAGATTTTGATATTATTCAAAAATGTCAAATTACTTCAGTTGTTGGTACTAAA
GCATTGGCTGTTAGATTAACCTGCTAATGTAGGCCGTGTTATTAAATT

6.5 Odczynniki

- 6.5.1 Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix DNA Polymerase, (New England Biolabs, USA)
- 6.5.2 T4 DNA Ligase (z CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Fisher Scientific, USA).
- 6.5.3 2X Reaction Buffer (z CloneJET PCR Cloning Kit; Thermo Fisher Scientific, USA).
- 6.5.4 LunaScript® RT SuperMix (New England Biolabs, USA)
- 6.5.5 Woda ultraczysta, wolna od DNaz i RNaz (Eurx, Polska)
- 6.5.6 SG qPCR Master Mix (Eurx, Polska)
- 6.5.7 TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 6.5.8 Enzym restrykcyjny XhoI FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 6.5.9 Enzym restrykcyjny XbaI FastDigest (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 6.5.10 Bufor do analizy restrykcyjnej, FastDigest Green Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific, USA)

6.6 Komórki

- 6.6.1 *Escherichia coli* szczep Mach1-T1^R- $\Delta recA1398$ $endA1$ $tonA$ $\Phi80\Delta lacM15$ $\Delta lacX74$ $hsdR$ ($r_K^- m_K^+$) (Invitrogen, USA).
- 6.6.2 MDCK (z ang. *Madin-Darby canine kidney*) – komórki pozyskane z dorosłego cocker spaniela płci żeńskiej (Thermo Fisher Scientific, USA)

6.7 Pożywki wzrostowe

6.7.1 Pożywka wzrostowa płynna LB (Luria Broth)

Bacto-trypton (Difco, USA)	10 g
Ekstrakt drożdżowy (Difco, USA)	5 g
NaCl	10 g

Składniki zostały rozpuszczone w 1 litrze wody dejonizowanej, pH ustalono na 7 i wyjałowione w autoklawie.

6.7.2 Pożywka wzrostowa stała LA (Luria Agar)

Bacto-trypton (Difco, USA)	10 g
Ekstrakt drożdżowy (Difco, USA)	5 g
NaCl	10 g
Bacto-agar (Difco, USA)	15 g

Składniki zostały rozpuszczone w 1 litrze wody dejonizowanej, pH ustalono na 7 i wyjałowione w autoklawie.

6.7.3 Podłoże wzrostowe DMEM (z ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium; firmy GIBCO, USA) podłoże zawierające D-glukozę, pirogronian sodu, 200 mM L-glutaminę oraz węglan sodu, suplementowane 10% FBS, mieszaniną antybiotyków AA oraz 0,2% BSA

6.7.4 Podłoże wzrostowe DMEM do infekcji (z ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium; firmy GIBCO, USA) Podłoże zawierające D-glukozę, pirogronian sodu, 200 mM L-glutaminę oraz węglan sodu, suplementowane mieszaniną antybiotyków AA, 0,2% BSA oraz roztworem TCPK-trypsyny o końcowym stężeniu 1 µg/ml

6.7.5 Roztwór metylocelulozy 1% w pożywce DMEM

Skład: Metyloceluloza (Sigma-Aldrich, USA) – 4 g, DMEM 10x – 40 ml, FBS – 25 ml, NaHCO₄ – 12 ml, AA – 2,8 ml oraz TPCK-Trypsyna dodana do uzyskania ostatecznego stężenia 2 µg/ml

Metylocelulozę zawieszono w 320 ml H₂O destylowanej, a następnie jałowiono (0,5 h; 0,7 atm., 121°C). Po czym pozostawiono do rozpuszczenia na mieszadle magnetycznym przez noc w temperaturze 4°C. Następnie dodano pozostałe składniki i ponownie wymieszano na mieszadle.

6.8 Antybiotyki

- 6.8.1 Ampicylina, Sigma-Aldrich (USA), roztwór wodny, stężenie końcowe 50 µg/ml
- 6.8.2 Kanamycyna, Sigma-Aldrich (USA), roztwór wodny, stężenie końcowe 50 µg/ml
- 6.8.3 Roztwór antybiotyków AA (z ang. *Antibiotic/Antimycotic*), 100 x, Sigma-Aldrich (USA)
skład: 10000 U/ml penicyliny, 1000 µg/ml streptomycyny, 25 µg/ml amfoterycyny B

6.9 Wzorce masowe

- 6.9.1 GeneRuler™ DNA Ladder Mix, 100-10000 kpz (Thermo Fisher Scientific, USA)
Fragmenty DNA o wielkości: 10000 pz, 8000 pz, 6000 pz, 5000 pz, 4000 pz, 3500 pz, 3000 pz, 2500 pz, 2000 pz, 1500 pz, 1200 pz, 1031 pz, 900 pz, 800 pz, 700 pz, 600 pz, 500 pz, 400 pz, 300 pz, 200 pz, 100 pz.

6.10 Bufory i roztwory

- 6.10.1 Bufor TAE (z ang. Tris + Acetate + EDTA)
Skład: 10 mM EDTA + 40 mM Tris-octan; pH 8,3.
- 6.10.2 Bufor obciążający do próbek DNA 6x stężony
Skład: 40% sacharoza + 200 mM EDTA + 0,25% błękit bromofenolowy.
- 6.10.3 2M CaCl₂ w H₂O
Roztwór jałowiono przez sączenie przy użyciu filtra strzykawkowego 0,22 µm.
- 6.10.4 0,1 M CaCl₂ w H₂O
- 6.10.5 0,1 M CaCl₂ + 10% glicerol
- 6.10.6 Bufor PBS (z ang. *phosphate buffered saline*) – roztwór soli fizjologicznej buforowany fosforanami
Skład: 137 mM NaCl + 15 mM KCl + 10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄; pH 7,4.
- 6.10.7 4% roztwór paraformaldehydu w PBS

6.11 Odczynniki chemiczne

- 6.11.1 CaCl₂, (Sigma-Aldrich USA))
- 6.11.2 Glicerol (POCH, Polska)
- 6.11.3 Barwnik interkalujący do kwasów nukleinowych SimplySafe (Eurx, Polska)

6.11.4 Octan sodu (Sigma-Aldrich, USA)

6.11.5 Agaroza (Prona, Belgia)

6.11.6 Trypsyna 0,25% (Life Technologies, USA)

6.11.7 Etanol CZDA (POCH, Polska)

6.11.8 Paraformaldehyd (POCH, Polska)

6.11.9 Tween 20, (POCH, Polska)

6.11.10 FBS, (GIBCO, USA)

6.12 Zestawy komercyjne

6.12.1 Zestaw do pomiaru stężenia dsDNA QuantiFluor® dsDNA System (PROMEGA, Niemcy).

6.12.2 Zestaw do izolacji plazmidowego DNA „Plasmid Mini” (A&A BIOTECHNOLOGY, Polska).

6.12.3 Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego “DNA Gel-Out concentrator” (A&A BIOTECHNOLOGY, Polska).

6.12.4 Zestaw do izolacji RNA/DNA wirusowego „CoV RNA” (A&A BIOTECHNOLOGY, Polska).

6.12.5 Zestaw do zautomatyzowanej elektroforezy o wysokiej rozdzielczości D1000 ScreenTape System (Agilent Technologies, USA)

6.12.6 Zestaw do szybkiego znakowania nukleotydowego sekwencji Rapid Barcoding kit 96 SQK-RBK110.96 (Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.12.7 Zestaw do barwienia w teście IPMA, VECTOR NovaRED Peroxidase Substrate Kit (VECTOR LABORATORIES, USA)

6.13 Aparatura i oprogramowanie

6.13.1 2200 TapeStation System (Agilent Technologies, USA)

6.13.2 GridION Mk1 Sequencing Device (GRD-MK1)(Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.13.3 MinION Sequencing Device (MIN-101B)(Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.13.4 MinKnow (Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.13.5 Geneious Prime (GraphPad Software LLC, Nowa Zelandia)

6.13.6 Język programowania Python 3.8 (Python Software Foundation License, USA)

6.13.7 Pomoxis- 0.3.6 (Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.13.8 Minimap2- 2.26(r1175) (Dana-Farber Cancer Institute, USA)

6.13.9 Racon v1.4.3 (MIT, USA)

6.14 Dodatkowe materiały

6.14.1 Statyw magnetyczny 16-Tube SureBeads™ Magnetic Rack (Bio-Rad, USA)

6.14.2 Naczynia plastikowe do hodowli komórkowych – płytki wielodołkowe, probówki wirownicze, butelki, szalki (Corning, USA)

6.14.3 Komora przepływowa do sekwencjonowania nanoporowego, Flow Cell (R9.4.1) FLO-MIN106D (Oxford Nanopore Technologies, Wielka Brytania)

6.15 Przeciwciała

6.15.1 Przeciwciała poliklonalne królicze przeciwko białku NP wirusa grypy A (PA5-32242) (Thermo Fisher Scientific, USA)

6.15.2 Przeciwciała kozie anty-królicze, sprzężone z HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA)

7 Metody

Wszystkie poniższe analizy bioinformatyczne wykonywano z wykorzystaniem oprogramowania Geneious Prime (6.13.5), chyba że zaznaczono inaczej.

7.1 Pozyskanie sekwencji z baz danych

Sekwencje nukleotydowe zostały pobrane z bazy danych NCBI (dostęp czerwiec 2021 roku) dla każdego z wirusów Materiały 6.1.1-6.1.4 i 6.1.6-6.1.9 oraz NCBI (dostęp maj 2022 roku) dla Materiały 6.1.10. Dla wszystkich z wirusów użyto filtrowania względem kompletności sekwencji – pobrano wyłącznie pełne sekwencje nukleotydowe genomów wirusów oraz filtrowania względem gospodarza wirusa – wybrano jedynie wirusy ludzkie. Dokonano także samodzielnego przeglądu każdej z pobranych sekwencji, w celu walidacji ich poprawności. Odrzucono sekwencje niekompletne, zawierające zbyt duże ilości luk lub nieokreślonych nukleotydów. Dla wirusów grypy A i B (Materiały 6.1.5) pobrano z baz danych pełne sekwencje segmentów PB1 i HA (dostęp czerwiec 2021 roku). Sekwencja nukleotydowa ludzkiego genu POTEK została pobrana z bazy danych NCBI w maju 2022 roku.

7.2 Zestawienie sekwencji dostępnych w bazach do stworzenia sekwencji referencyjnych

Dla każdego z wirusów przeprowadzono dopasowanie wielu sekwencji oparte na szybkiej transformacie Fouriera (MAFFT) z zastosowaniem strategii L-INS-i, FFT-NS-i lub FFT-NS2 w zależności od złożoności i liczby porównywanych genomów. Dodatkowo stworzeniu przerwy przypisano karę o wartości 1,53; a wartość przedłużenia przerwy ustawiono na 0,123.

Dla wirusów, dla których niemożliwe było uzyskanie odpowiedniej sekwencji konsensusowej na podstawie sekwencji nukleotydowych, stworzono kladogram wykorzystując narzędzie Geneious Tree Builder opierające się na modelu Tamura-Nei z wykorzystaniem metody łączenia sąsiadów (Neighbor-joining). Sekwencje podzielono następnie na podgrupy o zbliżonym pokrewieństwie i dla tak przygotowanych sekwencji, przeprowadzono dopasowanie sekwencji w celu otrzymania sekwencji konsensusowych.

7.3 Projektowanie starterów

Pary starterów zostały zaprojektowane przy wykorzystaniu zmodyfikowanej wersji Primer3, w taki sposób, aby uzyskać produkt o długości 450-500 nukleotydów. Parametry starterów

zostały zadane tak, aby miały one długość 18-27 nukleotydów, temperaturę topnienia od 57 do 63°C i zawartość par GC jak najbliżej poziomowi 50%. Gdy nie było możliwości zaprojektowania starterów w pełni komplementarnych spełniających powyższe kryteria, zezwolono na projektowanie starterów zdegenerowanych.

7.4 Przygotowanie plazmidów kontrolnych

7.4.1 Przygotowanie komórek kompetentnych

Hodowlę nocną odmłodzono poprzez przeniesienie 2 ml hodowli do 100 ml nowej pożywki LB (Materiały 6.7.1). Odmłodzoną hodowlę inkubowano w 37°C z wytrząsaniem do uzyskania $OD_{600} = 0,4$. Po uzyskaniu odpowiedniej gęstości hodowlę przeniesiono do jałowych 50 ml probówek i schłodzono w lodzie przez 10 minut. Następnie odwirowano hodowlę przez 10 minut przy 5000 RPM w 4°C. Pożywkę zlano, a osad delikatnie zawieszono w 40 ml zimnego 0,1 M $CaCl_2$ (Materiały 6.10.4). Po zawieszeniu w chlorku wapnia próbkę inkubowano 30 min w lodzie, po czym odwirowano ją ponownie w identycznych warunkach. Po wirowaniu usunięto supernatant, a osad zawieszono w 4 ml 0,1 M $CaCl_2$ z 10% glicerolem (Materiały 6.10.5). Próbkę poporcjonowano po 100 µl do probówek 1,5 ml, a następnie umieszczono w – 70°C.

7.4.2 Odwrotna transkrypcja

Proces odwrotnej transkrypcji przeprowadzany był przy użyciu transkryptazy Lunascript (Materiały 6.5.4). 8 µl wyizolowanego RNA umieszczano w probówce reakcyjnej PCR lub na płytce 96 dołkowej, następnie do każdej z próbek dodawano po 2 µl transkryptazy. Próbkę zamykano, a płytkę zaklejało folią. Próbkę mieszało przez worteksowanie i odwirowano. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano w termocyklerze w następujących warunkach:

Tabela 5 Warunki przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem transkryptazy Lunascript

Krok cyklu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Przyłączanie starterów	25°C	2 minuty	1x
Synteza cDNA	55°C	10 minut	
Inaktywacja cieplna	95°C	1 minuta	
Schłodzenie i przechowywanie	4°C	∞	

7.4.3 Łańcuchowa reakcja polimerazy

Łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) przeprowadzano przy użyciu polimerazy Q5 (Materiały 6.5.1) oraz starterów odpowiednich do danego konstruktu poprzez wymieszanie w probówce 0,2 ml następujących składników:

Tabela 6 Skład reakcji PCR z użyciem polimerazy Q5

Składnik		Objętość	Odkodnik
cDNA		3 µl	[7.4.2]
startery „forward” i „reverse”	ludzkiego koronawirusa 229E	1 µl for, 1 µl	[6.3.25 i 6.3.102]
	ludzkiego koronawirusa NL63	rev, o	[6.3.29 i 6.3.106]
	ludzkiego koronawirusa OC43	stężeniu 10	[6.3.31 i 6.3.108]
	ludzkiego koronawirusa MERS	µM	[6.3.59 i 6.3.136]
	ludzkiego koronawirusa SARS Urbani HKU-39849		[6.3.64 i 6.3.141]
			[6.3.166 i 6.3.167]
Q5 Master mix		12,5 µl	[6.5.1]
woda		Do 25 µl	[6.5.5]

Próbki zostały umieszczone w termocyklerze i poddane następującym warunkom w celu przeprowadzenia reakcji amplifikacji DNA:

Tabela 7 Warunki zachodzenia reakcji PCR wraz z zastosowanymi czasami i temperaturami

Krok cyklu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	30 sekund	1
Denaturacja	98°C	5 sekund	35
Przyłączanie starterów	63°C	20 sekund	
Elongacja	72°C	20 sekund	

Końcowa elongacja	72°C	2 minuty	1
Schłodzenie i przechowywanie	4°C	∞	1

7.4.4 Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Agarozę (1 g) (Materiały 6.11.5) rozpuszczono w buforze TAE 1X (100 ml) (Materiały 6.10.1) poprzez podgrzanie do wrzenia w kuchence mikrofalowej. Po schłodzeniu roztworu do około 50°C dodano do niego 5 µl SimplySafe (Materiały 6.11.3) w celu uwidocznienia rozdzielanego w żelu DNA. Następnie żel wylano do foremki i włożono grzebień w celu uformowania studzienek. Do próbek rozdzielanych w żelu dodano 1/6 ich objętości buforu obciążającego (Materiały 6.10.2) i nakładano do studzienek żelu. Elektroforezę prowadzono w buforze 1x TAE pod napięciem 70 V przez około 30 min. Żel analizowano przy długości fali światła 420 nm.

7.4.5 Izolacja DNA z żelu agarozowego

Za pomocą skalpela z żelu wycięto odpowiednie prążki i umieszczono w próbkówkach 1,5 ml. Izolację przeprowadzono przy pomocy zestawu „DNA Gel-Out concentrator” (Materiały 6.12.3), zgodnie z instrukcją producenta

7.4.6 Klonowanie fragmentów DNA do wektorów bakteryjnych

Fragmenty DNA o zmierzonym stężeniu umieszczono w mieszaninie reakcyjnej, obliczając dla każdej ze wstawek odpowiednią objętość na podstawie wzoru:

$$\frac{\text{ilość wektora (ng)} * \text{długość wstawki (pz)}}{\text{długość wektora (pz)}} * 3 = \text{ilość wstawki (ng)}$$

Do niskoadhezyjnej probówki typu Eppendorf dodano:

- 10 µl buforu reakcyjnego 2x (Materiały 6.5.2),
- x µl wstawki otrzymanej po ekstrakcji z żelu (Metody 7.4.5),
- 9-x µl H₂O,
- 1 µl pJet 1.2 blunt (Materiały 6.4.1),
- 1 µl ligazy DNA T4 (Materiały 6.5.3).

Mieszaninę ligacyjną inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej.

7.4.7 Transformacja komórek bakteryjnych

Płytki z ampicyliną do wysiewu bakterii przygotowano rozpuszczając pożywkę LA (Materiały 6.7.2) w mikrofalówce, po ochłodzeniu się pożywki do około 50°C dodano

ampicylinę do stężenia 100 µg/ml lub kanamycynę do stężenia 50 µg/ml (Materiały 6.8.1 lub 6.8.2), a następnie pożywkę rozlano do szalek Petriego i osuszono w temperaturze 37°C.

Do rozmrożonych komórek kompetentnych *E. coli* Mach1 dodano całość inkubowanej mieszaniny ligacyjnej (20 µl), rozpipetowano i inkubowano przez 30 minut w lodzie. Następnie umieszczono je w termobloku (42°C) na minutę, w celu poddania bakterii szokowi termicznemu, po czym szybko przeniesiono je na 2 minuty do lodu. Do próbki dodano 900 µl pożywki LB bez antybiotyku (Materiały 6.7.1), wymieszano przez kilkukrotne odwracanie próbówki i umieszczono w wytrząsarce w temperaturze 37°C na 1 godzinę. Po inkubacji komórki wysiano na płytki z pożywką LA (Materiały 6.7.2) zawierającą odpowiedni antybiotyk (Materiały 6.8.1 lub 6.8.2), używając 50 i 100 µl zawiesiny komórkowej. Płytki inkubowano w 37°C przez noc.

7.4.8 Hodowla bakteryjna

Pożywkę płynną LB (Materiały 6.7.1) z ampicyliną lub kanamycyną (Materiały 6.8.1, 6.8.2) rozporcjowano po 5 ml do 50 ml probówek typu Falcon. Otrzymane na płytkach kolonie przepikowano pojedynczo przy użyciu końcówek do pipet do osobnych, ponumerowanych probówek. Probówki przeniesiono do wytrząsarki powietrznej i hodowano w 37°C przez noc.

7.4.9 Oczyszczanie plazmidowego DNA

DNA plazmidowy oczyszczano przy użyciu zestawu Plasmid Mini (Materiały 6.12.2) zgodnie z instrukcją producenta.

7.4.10 Pomiar stężenia DNA

Stężenie DNA zmierzono metodą fluorescencyjną przy użyciu zestawu QuantiFluor® dsDNA System (Materiały 6.12.1) zgodnie z instrukcją producenta oraz fluorymetru Quantus (Promega).

7.4.11 Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

Po namnożeniu, izolacji i zmierzeniu stężenia plazmidy kontrolne zostały poddane trawieniu enzymami restrykcyjnymi w celu potwierdzenia poprawności klonowania wstawki.

Każdy z plazmidów został rozcieńczony w celu uzyskania 1 µg DNA w 16 µl wody (Materiały 6.5.5), do próbki dodano po 1 µl enzymów *Xho*I i *Xba*I (Materiały 6.5.8 i 6.5.9) oraz 2 µl buforu (Materiały 6.5.10), wymieszano i umieszczono w 37°C na 45 minut. Dla każdej z próbek

wykonano także kontrolę negatywną bez enzymów restrykcyjnych. Po inkubacji, próbki poddano elektroforezie w żelu agarozowym.

7.5 Izolacja wirusowego materiału genetycznego

Izolację materiału genetycznego wirusów przeprowadzono z użyciem zestawu „CoV RNA” (Materiały 6.12.4) zgodnie z dołączoną przez producenta instrukcją. Eluaty zostały wykorzystane do następnych czynności laboratoryjnych lub umieszczone w zamrażarce -70°C.

7.6 Multipleks PCR

Pary starterów zawarte w Tabeli 18 (Wyniki 8.1.2) zostały połączone równo objętościowo w jednej mieszaninie. Tak przygotowane startery używane były w reakcjach multipleks PCR przygotowywanych na płytkach 96 dołkowych lub w próbkówkach reakcyjnych 200 µl. Na każdą przeprowadzoną reakcję użyto następujące odczynniki:

Tabela 8 Skład reakcji multipleks PCR z użyciem polimerazy Q5

Składnik	Objętość	Oдноśnik
cDNA	3 µl	[7.4.2]
Mieszanina starterów	2 µl o stężeniu 100 µM	[8.1.2] Tabela 18
Q5 Master mix	6,25 µl	[6.5.1]
woda	1,25 µl	[6.5.5]

Próbki zostały następnie umieszczone w termocyklerze i poddane następującej reakcji:

Tabela 9 Warunki reakcji multipleks PCR

Krok cyklu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	98°C	30 sekund	1
Denaturacja	98°C	15 sekund	35
Przyłączanie starterów oraz elongacja	63°C	5 minut	
Schłodzenie i przechowywanie	4°C	∞	1

7.7 Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym

Wyzolowany materiał genetyczny wirusów (Metody 7.5) został umieszczony na lodzie na czas przygotowania reakcji RT-qPCR. Dla każdego z wyizolowanych wirusów użyto specyficznych starterów i sond w następujących stężeniach:

Tabela 10 Stężenia poszczególnych starterów oraz sond użytych podczas reakcji Real-time PCR. Wartości zaczerpnięte z publikacji opisujących dane startery

Wirus	Startery	Stężenie starterów w reakcji	Sonda	Stężenie sondy w reakcji
Wirus grypy typu A	[6.3.157] [6.3.158] [6.3.159] [6.3.160]	400 nM 400 nM 600 nM 200 nM	[6.3.172]	200 nM
Wirus grypy typu B Victoria	[6.3.161] [6.3.162]	800 nM 800 nM	[6.3.173]	200 nM
Wirus grypy typu B Yamagata	[6.3.161] [6.3.162]	800 nM 800 nM	[6.3.173]	200 nM
Wirus paragrypy 1	[6.3.163] [6.3.164] [6.3.165]	600 nM 600 nM 900 nM	[6.3.174]	250 nM
Wirus paragrypy 3	[6.3.163] [6.3.164] [6.3.165]	600 nM 600 nM 900 nM	[6.3.174]	250 nM
RSV A	[6.3.166] [6.3.167]	400 nM 400 nM	[6.3.175]	100 nM
RSV B	[6.3.166] [6.3.167]	400 nM 400 nM	[6.3.176]	100 nM
Enterowirus A71	[6.3.168] [6.3.169]	200 nM 200 nM	[6.3.177]	250 nM
Enterowirus D68	[6.3.168] [6.3.169]	200 nM 200 nM	[6.3.177]	250 nM

Adenowirus 1	[6.3.170]	500 nM	[6.3.178]	100 nM
	[6.3.171]	500 nM		
Adenowirus 2	[6.3.170]	500 nM	[6.3.178]	100 nM
	[6.3.171]	500 nM		
Adenowirus 3	[6.3.170]	500 nM	[6.3.178]	100 nM
	[6.3.171]	500 nM		
Adenowirus 5	[6.3.170]	500 nM	[6.3.178]	100 nM
	[6.3.171]	500 nM		
Adenowirus 6	[6.3.170]	500 nM	[6.3.178]	100 nM
	[6.3.171]	500 nM		

Przygotowano mieszaniny reakcyjne dla każdego z patogenów, używając dla każdej z reakcji następujących odczynników:

Tabela 11 Skład reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Składnik	Objętość	Odkośnik
cDNA	5 µl	[7.4.2]
Mieszanina starterów i sondy	2,4 µl	Tabela 10
Polimeraza DNA	5 µl	[6.5.7]
Woda	7,6 µl	[6.5.5]

Tak przygotowane próbki umieszczono na nieprzezroczystej płytce reakcyjnej, którą uszczelniono folią. Płytke ostrożnie mieszano i wirowano, a następnie umieszczono w termocyklerze LightCycler 480 II. Profil temperaturowy reakcji przedstawiono w Tabeli 12.

Tabela 12 Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Etapy	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Inkubacja UNG	37°C	2 minuty	1
Odwrotna transkrypcja	50°C	15 minut	1
Wstępna denaturacja	95°C	2 minuty	1

Denaturacja	95°C	3 sekundy	45
Przyłączanie starterów, amplifikacja i odczyt sygnału	60°C	30 sekund	

7.8 Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR) z analizą krzywej topnienia

Kontrole pozytywne (10000 kopii genu/reakcja) zmieszano wraz z pozostałymi składnikami mieszaniny reakcyjnej w objętościach zestawionych w Tabeli 13. Dopasowanie plazmidów oraz odpowiadających im starterów zestawiono w Tabeli 14.

Tabela 13 Skład mieszaniny do reakcji qPCR

Składnik	Objętość	Oдноśnik
Plazmidowy DNA	3 µl	[6.4.1- 6.4.3.4]
Startery for i rev	2 µl 10 µM	Tabela 14
Polimeraza SG qPCR Master Mix	7,5 µl	[6.5.6]
Woda	2,5 µl	[6.5.5]

Tabela 14 Dopasowanie poszczególnych plazmidów kontrolnych do starterów w reakcjach qPCR

Plazmid	Startery
[6.4.2.1]	[6.3.1 i 6.3.78]
[6.4.2.2]	[6.3.2 i 6.3.79]
[6.4.2.3]	[6.3.3 i 6.3.80]
[6.4.2.4]	[6.3.5 i 6.3.82]
[6.4.2.5]	[6.3.7 i 6.3.84]
[6.4.2.6]	[6.3.9 i 6.3.86]
[6.4.2.7]	[6.3.11 i 6.3.88]
[6.4.2.8]	[6.3.12 i 6.3.89]
[6.4.2.9]	[6.3.14 i 6.3.91]
[6.4.2.10]	[6.3.16 i 6.3.93]
[6.4.2.11]	[6.3.18 i 6.3.95]
[6.4.2.12]	[6.3.20 i 6.3.97]
[6.4.2.13]	[6.3.22 i 6.3.99]
[6.4.1.1]	[6.3.25 i 6.3.102]
[6.4.3.5]	[6.3.26 i 6.3.103]
[6.4.1.2]	[6.3.29 i 6.3.106]
[6.4.1.3]	[6.3.31 i 6.3.108]
[6.4.2.14]	[6.3.32 i 6.3.109]
[6.4.2.15]	[6.3.34 i 6.3.111]
[6.4.2.16]	[6.3.36 i 6.3.113]
[6.4.2.17]	[6.3.38 i 6.3.115]
[6.4.2.18]	[6.3.40 i 6.3.117]
[6.4.2.19]	[6.3.42 i 6.3.119]
[6.4.2.20]	[6.3.44 i 6.3.121]
[6.4.2.21]	[6.3.46 i 6.3.123]
[6.4.2.22]	[6.3.48 i 6.3.125]
[6.4.2.23]	[6.3.50 i 6.3.127]
[6.4.2.24]	[6.3.52 i 6.3.129]
[6.4.2.25]	[6.3.54 i 6.3.131]

Plazmid	Startery
[6.4.2.26]	[6.3.56 i 6.3.133]
[6.4.1.4]	[6.3.59 i 6.3.136]
[6.4.2.27]	[6.3.61 i 6.3.138]
[6.4.2.28]	[6.3.62 i 6.3.139]
[6.4.2.29]	[6.3.63 i 6.3.140]
[6.4.1.5]	[6.3.64 i 6.3.141]
[6.4.2.30]	[6.3.66 i 6.3.143]
[6.4.2.31]	[6.3.68 i 6.3.145]
[6.4.2.32]	[6.3.69 i 6.3.146]
[6.4.2.33]	[6.3.70 i 6.3.147]
[6.4.2.34]	[6.3.73 i 6.3.150]
[6.4.3.1]	[6.3.74 i 6.3.151]
[6.4.3.2]	[6.3.75 i 6.3.152]
[6.4.3.3]	[6.3.76 i 6.3.153]
[6.4.3.4]	[6.3.77 i 6.3.154]
[6.4.1.6]	[6.3.155 i 6.3.156]

Dla każdej z próbek wykonano także kontrolę negatywną, w której plazmid zastąpiono wodą. Próbkę przeniesiono na 96-dołkową białą płytkę do qPCR. Płytkę zafoliowano, wymieszano i odwirowano, a następnie umieszczono w termocyklerze LightCycler 480 II i poddano reakcji w warunkach opisanych w Tabeli 15.

Tabela 15 Warunki reakcji qPCR z analizą krzywej topnienia

Krok cyklu	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Wstępna denaturacja	95°C	10 minut	1
Denaturacja	94°C	15 sekund	40
Przyłączanie starterów	60°C	30 sekund	
Wydłużanie i odczyt danych	72°C	30 sekund	
Krzywa topnienia	97-40°C		1

7.9 Zautomatyzowana elektroforeza DNA o wysokiej czułości

Próbki po reakcji PCR zostały poddane zautomatyzowanej elektroforezie o wysokiej czułości. W tym celu do probówek PCR w paskach 8 dołkowych dodano po 3 µl buforu reakcyjnego. Do pierwszej studzienki dodano 1 µl wzorca masowego (z zestawu Materiały 6.12.5) a do kolejnych po 1 µl próbek po reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Paski zamknięto, wymieszano i odwirowano a następnie umieszczono w urządzeniu do elektroforezy (Materiały 6.13.8) wraz z odpowiednim żelem, w którym przeprowadzono elektroforezę z odczytem wielkości produktów.

7.10 Adherentna hodowla komórek ssaczych

Komórki ssacze linii MDCK (Materiały 6.6.2) hodowano w odpowiednio suplementowanej pożywce DMEM (Materiały 6.7.3) w naczyniach polistyrenowych do hodowli jednowarstwowej (Materiały 6.14.3). Po uzyskaniu około 90% konfluencji pożywkę zebrano, a hodowlę dwukrotnie płukano buforem PBS (Materiały 6.10.6). Po płukaniu do komórek dodano 1 ml roztworu trypsyny (Materiały 6.11.6), a butelkę hodowlaną umieszczono w cieplarni na 10-15 minut. Po inkubacji roztwór trypsyny neutralizowano 2 ml pożywki z FBS. Oderwane od powierzchni naczynia komórki zliczono na hemocytometrze. Do komórek dodano odpowiednią ilość pożywki wzrostowej i porcjowano do nowych naczyń, po czym hodowlę inkubowano w atmosferze z 5% CO₂ w temperaturze 37°C.

7.11 Miareczkowanie wirusa grypy typu A

W celu oznaczenia miana wirusa na płytki 6-dołkowe wysiano komórki MDCK, po czym inkubowano je do następnego dnia w celu uzyskania konfluencji na poziomie około 100%. Wykonano seryjne rozcieńczenia wirusów w pożywce do infekcji (Materiały 6.7.4), które następnie naniesiono w objętości 600 µl na komórki. Komórki z wirusem inkubowano 1 godzinę w 37°C i stężeniu CO₂ 5%, po czym zebrano inokulum, a komórki pokryto roztworem metylocelulozy (Materiały 6.7.5). Po 48 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C i stężeniu CO₂ 5%, łysinki wirusowe wybarwiono za pomocą testu IPMA i zliczono je w celu określenia miana wirusa.

7.12 Test immunodetekcji białek in situ (IPMA)

Komórki zainfekowane wirusem grypy typu A przepłukano trzykrotnie buforem PBS (Materiały 6.10.6), wysuszono i zamrożono w temperaturze -20°C. Następnie utrwalono komórki roztworem zimnego paraformaldehydu o stężeniu 4% (Materiały 6.10.7) przez inkubację trwającą 10 minut. Komórki przepłukano trzykrotnie buforem PBS z 0,5% Tween 20 (Materiały 6.11.9). Do próbek dodano następnie roztwór przeciwciał pierwszorzędowych (Materiały 6.15.1) zawieszonych w buforze PBS z Tween 20 oraz 5% FBS (Materiały 6.11.10), inkubację prowadzono przez 1 godzinę na kołysce laboratoryjnej w temperaturze pokojowej. Przeciwciała usunięto, a płytki płukano trzykrotnie buforem PBS z Tween 20. Następnie próbki inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi (Materiały 6.15.2) sprzężonymi z HRP (z ang. *horseradish peroxidase*) zawieszonymi w buforze PBS z Tween 20 oraz 5% FBS. Do uwidocznienia łysinek wirusowych użyto zestawu Vector NovaRed (Materiały 6.12.7) zgodnie z zaleceniami producenta.

7.13 Przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania metodą nanoporową

Próbki po reakcji PCR zostały przeniesione w objętości 7,5 µl do nowej płytki 96-dołkowej. Do każdego z dołków dodano znacznik nukleotydowy (Materiały 6.12.6.1) w objętości 2,5 µl. Płytkę szczelnie zamknięto folią, wmieszano i odwirowano, a następnie umieszczono w termocyklerze na 30°C przez 2 minuty i 80°C przez 2 minuty, po czym płytkę schłodzono do 4°C. Wszystkie próbki następnie połączono i przeniesiono do wysokoretencyjnej probówki 1,5 ml. Do próbek dodano kulki magnetyczne (Materiały 6.12.6.2) w stosunku objętościowym 1:1 i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Próbkę umieszczono następnie na statywie magnetycznym (Materiały 6.14.1) do czasu, aż płyn stanie się przejrzysty. Gdy wszystkie kulki zostały przyciągnięte do magnesu, usunięto supernatant oraz wykonano dwukrotne płukanie 80% roztworem etanolu (Materiały 6.11.7) uważając, aby nie wzruszyć osadu. Etanol dokładnie usunięto i odczekano 2 minuty, w celu osuszenia osadu z resztek alkoholu. Osad zawieszono w 31 µl buforu elucyjnego (z zestawu Materiały 6.12.6) i inkubowano poza statywem magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po inkubacji próbkę umieszczono na statywie magnetycznym, odczekano aż eluat stanie się klarowny i przeniesiono go do nowej wysokoretencyjnej probówki 1,5 ml. W próbce zmierzono stężenie i znormalizowano je tak, żeby w 11 µl znajdowało się 800 ng DNA.

7.14 Proces sekwencjonowania metodą nanoporową

Komorę przepływową do sekwencjonowania nanoporowego (Materiały 6.14.4) wyjęto z lodówki i umieszczono w temperaturze pokojowej na 30 minut w celu ogrzania. Po wyrównaniu się temperatur komorę umieszczono w urządzeniu GridION (Materiały 6.13.9) lub MinION (Materiały 6.13.10), po czym przeprowadzono zautomatyzowany test jakości komory mówiący o liczbie aktywnych porów. Przygotowano mieszaninę do przepłukania komory przepływowej z buforu stabilizującego poprzez zmieszanie Flush buffer 1100 μ l (zawarte w Materiały 6.12.6) z Flush tether 30 μ l (zawarte w Materiały 6.12.6). Tak przygotowaną mieszaninę naniesiono na komorę w objętości 800 μ l. W tym samym czasie do wcześniej przygotowanej biblioteki dodano 1 μ l adapterów, rozpipetowano i inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej. Po 5 minutach do biblioteki dodano 37,5 μ l buforu do sekwencjonowania (Materiały 6.12.6.3) i 25,5 μ l kulek do sekwencjonowania (Materiały 6.12.6.6), całość delikatnie wymieszano. Na komorę przepływową nałożono resztę mieszaniny płuczającej oraz przygotowaną bibliotekę.

W oprogramowaniu MinKnow wybrano parametry odpowiednie do zestawu, którym przygotowywano bibliotekę – SQK-RBK110.96. W kolejnych krokach w oprogramowaniu ustalono „basecalling” na najwyższym poziomie dokładności oraz sortowanie próbek na poszczególne indeksy. Długość odczytów ustalono na sekwencje dłuższe niż 100 nukleotydów, aby pozbyć się zakłóceń wynikających z obecności starterów i indeksów. Sekwencjonowanie prowadzono do czasu uzyskania średnio 20 tysięcy odczytów spełniających kryteria jakości dla każdej z próbek.

7.15 Analiza danych uzyskanych z sekwencjonowania przy zastosowaniu zautomatyzowanego potoku bioinformatycznego

W celu usprawnienia procesu analizy sekwencjonowania i identyfikacji potencjalnych patogenów wirusowych, utworzono dodatkowe oprogramowanie służące automatyzacji rzeczonego procesu. Program napisano w języku Python 3.8, wykorzystując szereg pakietów zewnętrznych ułatwiających obsługę interfejsu, operacje na plikach bioinformatycznych, czy obsługę danych tabelarycznych [132–135]. Interfejs linii poleceń przygotowanego oprogramowania jest następujący:

użycie: `python -m viralpipeline.run_pipeline [-h] --input_dir INPUT_DIR --output_dir OUTPUT_DIR --ref_genomes REF_GENOMES [--threads THREADS] [--no_clean] [--unpack]`

argumenty:

- `-h, --help` Pokaż pomoc dla aplikacji
- `--input_dir INPUT_DIR` Ścieżka do folderów barcode zawierających pliki do analizy
- `--output_dir OUTPUT_DIR` Ścieżka do folderu, gdzie zostaną zapisane wyniki
- `--ref_genomes REF_GENOMES` Ścieżka do pliku fasta z genomami referencyjnymi
- `--threads THREADS` Liczba wątków procesora do użycia (domyślnie: 10)
- `--no_clean` Nie usuwaj plików pomocniczych po przetworzeniu
- `--unpack` Rozpakuj pliki z odczytami przed przetworzeniem

Oprogramowanie przyjmuje jako jedno z wejść ścieżkę do folderu komputerowego, w którym zostały zapisane foldery zawierające pliki w formacie fastq (opcjonalnie skompresowane programem gzip) z wynikami sekwencjonowania DNA. Wymogiem jest, aby nazwy danych folderów zaczynały się od słowa „barcode”, a reszta nazwy zawierała unikalny identyfikator (niepowtarzające się nazwy plików), który w przebiegu analizy jest wykorzystywany do odróżnienia poszczególnych zestawów danych.

Drugim istotnym wejściem jest plik FASTA z genomami referencyjnymi wirusów, do których zestawy odczytów będą porównywane. Plik ten musi zawierać dłuższe sekwencje nukleotydów z unikalnymi identyfikatorami w nagłówku fasta (niezawierającymi znaku spacji), które posłużą za oznaczenie wykrytych genomów.

Każdy folder barcode jest poddawany osobnej analizie, podczas której najpierw następuje zgromadzenie podanych w plikach odczytów w kontigi. W tym celu wykorzystano skrypt udostępniony w ramach zbioru oprogramowania Pomoxis (Materiały 6.13.7) przygotowanego przez Oxford Nanopore Technologies Ltd. [136]:

```
mini_assemble -i INPUT_FASTQ -o TEMP_OUTPUT_DIR -r REF_GENOMES -t THREADS -m 1
```

gdzie:

INPUT_FASTQ — plik fastq zawierający wszystkie sekwencje znalezione w plikach danego barcode'u.

TEMP_OUTPUT_DIR — tymczasowy folder do zapisywania plików analizy.

REF_GENOMES — plik FASTA z genomami referencyjnymi wirusów.

THREADS — liczba wątków procesora do użycia

Powyższy skrypt dokonuje szybkiego montażu odczytów, dopasowując do referencyjnej bazy danych poprzez oprogramowanie minimap2 (Materiały 6.13.8) [137,138], a następnie koryguje surowe kontigi, stosując program Racon (Materiały 6.13.9) [139]. W efekcie, dla każdego indeksu zostaje utworzony plik „bc-<ID barcode'u>-contigs.fasta” zawierający sekwencje konsensusowe oraz opis ich konstrukcji dla zidentyfikowanych genomów z referencji.

Następnie, z wyżej wymienionych plików FASTA eksportowane są nazwy wykrytych genomów wraz ze statystykami utworzonych kontigów i zapisywane w formacie tabelarycznym (Tabela. 16) w jednym pliku podsumowującym analizę „bc-all-contig-stats.tsv”. Plik zawiera informacje dotyczące: źródłowego indeksu, z którego pochodzą krótkie odczyty („Barcode”), zidentyfikowanego genomu referencyjnego pasującego do kontigu („Genome”), długości kontigu („Length”), liczbie wpasowujących się w kontig odczytów („Read count”) oraz procentowej wartości skorygowanych okien sekwencji („Polished windows”) części sekwencji które zostały poprawione przez algorytm na podstawie uzyskanych odczytów w celu stworzenia sekwencji konsensusowej.

Tabela 16 Przykładowy wynik automatycznej analizy sekwencjonowania

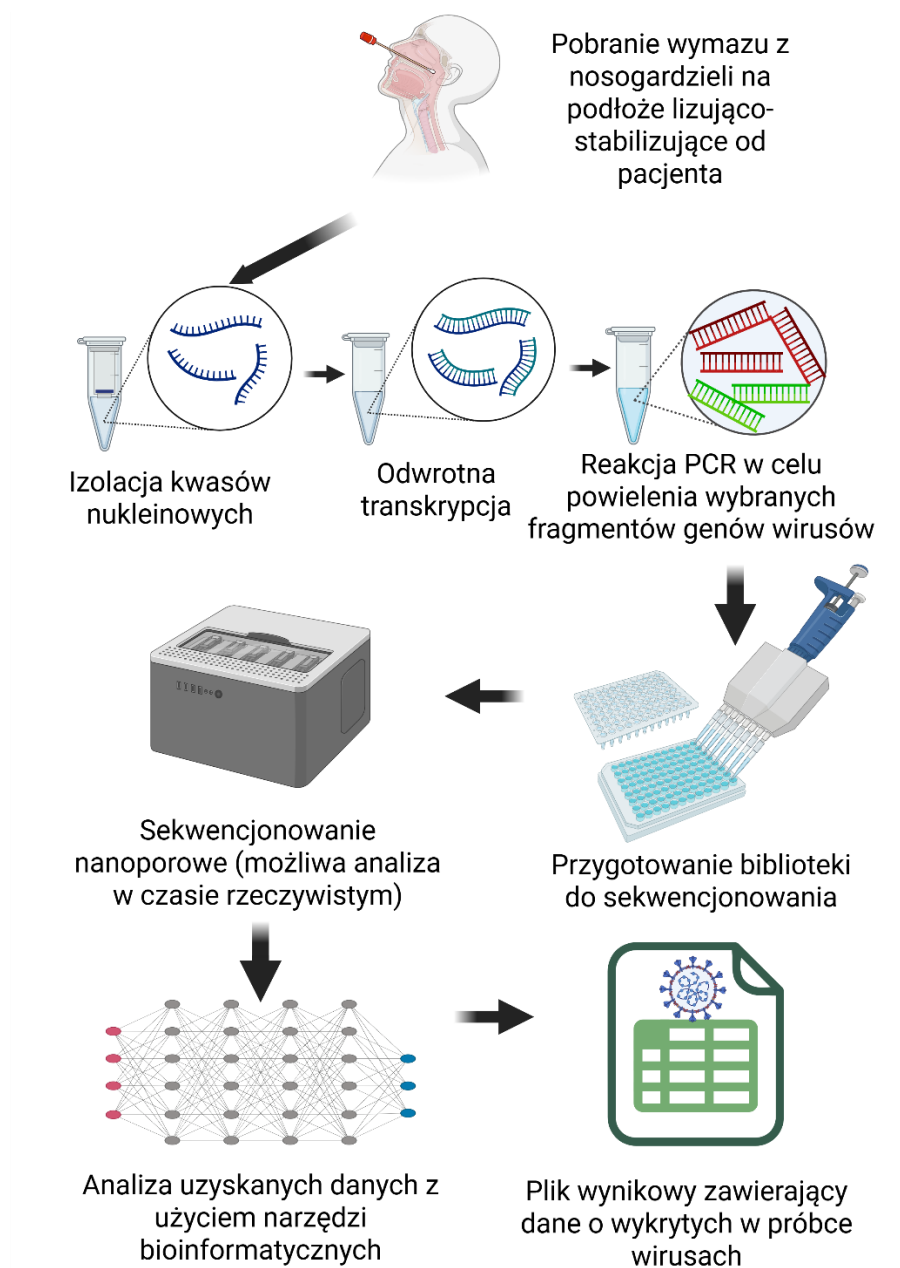
Barcode	Genome	Length	Read count	Polished windows
1	wirus_1	437	541	1
1	wirus_2	509	123	1
2	wirus_1	437	975	1
2	wirus_5	551	3	0.5
3	wirus_7	328	786	1

8 Wyniki

8.1 Opracowanie metody wykrywania panelu wirusowych patogenów oddechowych

Przed podjęciem czynności laboratoryjnych ustalono podstawowe założenia dla opracowywanej metody. Dotyczyły one, m.in., zasady przygotowania próbek, rodzaju sekwencjonowania i sposobu uzyskania wyniku.

Opracowana przeze mnie metoda detekcji polega na wykrywaniu infekcji wirusowych w wymazach z nosogardzieli pacjentów, ze względu na prostotę wykonania tego rodzaju wymazu oraz jego skuteczność – rutynowo stosowany w podobnych testach. Po pobraniu wymazów na podłoże lizująco-stabilizujące, dokonuje się izolacji materiału genetycznego wirusów przy pomocy zestawu do izolacji zarówno DNA jak i RNA. Następnie zostaje przeprowadzona reakcja odwrotnej transkrypcji, by uzyskać cDNA w przypadku wirusów RNA. Umożliwia to jednoczesne wykrywanie wirusów DNA oraz RNA w jednej reakcji, oraz umożliwia wykorzystanie szybszego i jednocześnie prostszego protokołu przygotowania biblioteki. Zdecydowałem, iż najbardziej korzystną metodą wykrywania będzie sekwencjonowanie amplikonów z użyciem szybkiego przygotowania biblioteki w systemie Oxford Nanopore Technologies – sekwencjonowania nanoporowego. Przygotowanie amplikonów zwiększa czułość metody oraz umożliwia zmniejszenie czasu i kosztów sekwencjonowania. Wykorzystanie technologii ONT umożliwia natomiast analizę ilości i jakości odczytów w czasie rzeczywistym, co ogranicza czas potrzebny do uzyskania wyniku. Końcowym etapem metody jest częściowo zautomatyzowany system przedstawiający wyniki sekwencjonowania w czytelny sposób – dane określające ilość dopasowań uzyskanych w poszczególnych próbkach dla każdego z wykrytych wirusów przedstawione w tabeli. Schematyczne przedstawienie działania tworzonej metody przedstawiłem na Rycinie 14.



Rycina 14 Schemat przedstawiający kolejność działań w nowo opracowywanej metodzie wykrywania wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych

8.1.1 Uzyskanie sekwencji konsensusowych dla wybranych wirusów

Pierwszym etapem tworzenia nowej metody diagnostycznej było zaprojektowanie starterów umożliwiających powielenie fragmentów genomów wybranych wirusów. W celu uzyskania sekwencji konsensusowej różnych genomów spośród tego samego gatunku, pobrałem wszystkie dostępne pełne sekwencje nukleotydowe genomowe poniższych wirusów z bazy danych NCBI. Dodatkowo przeprowadziłem manualną kurację genomów, odrzucając genomy nieprawidłowo przypisane, niekompletne i o niskiej jakości. Liczby poprawnych oraz

przeanalizowanych i dopasowanych sekwencji dla każdego z wirusów przedstawiłem w Tabeli 17.

Tabela 17 Podsumowanie uzyskania sekwencji konsensusowych dla poszczególnych wirusów z uwzględnieniem liczby analizowanych genomów

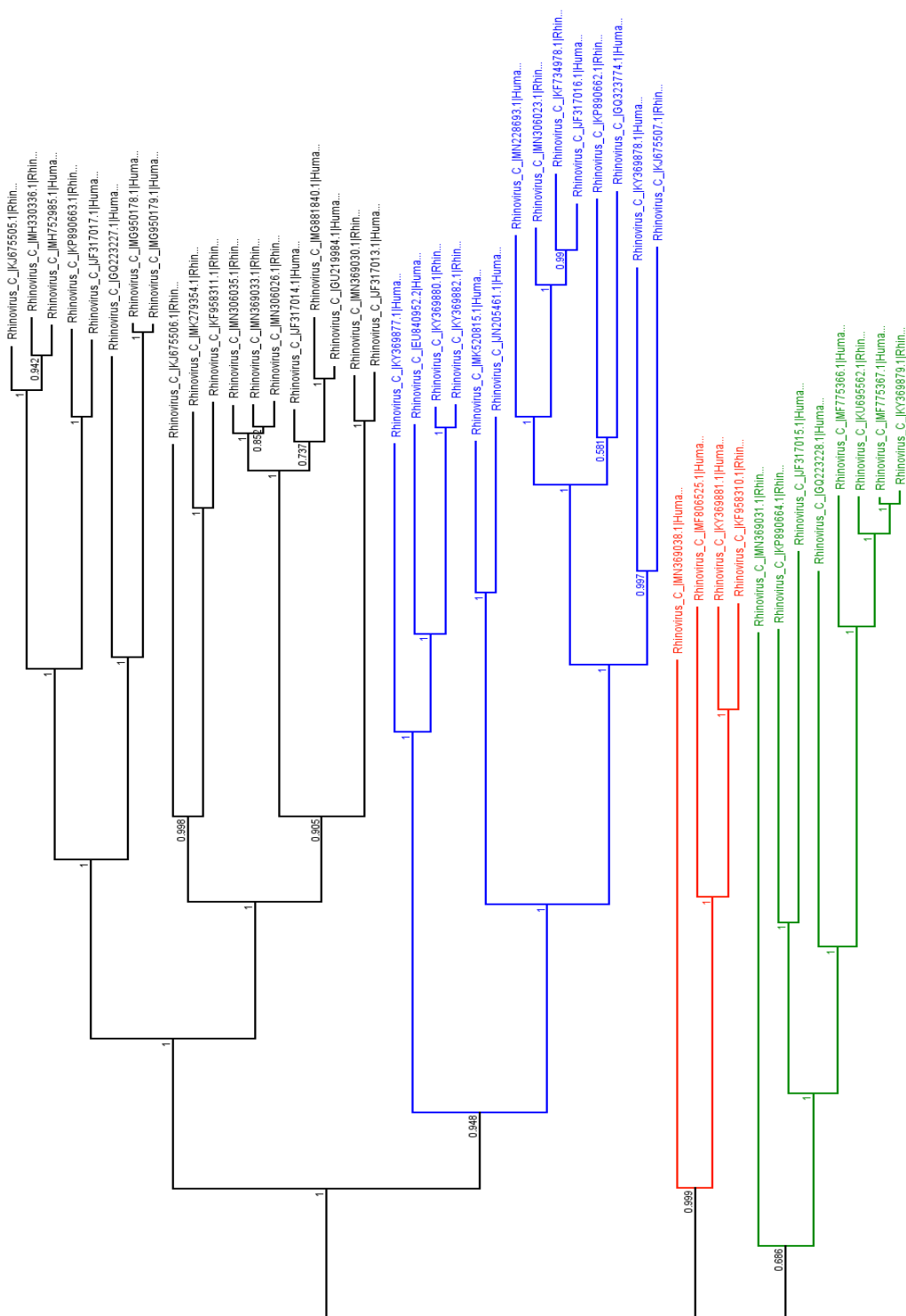
Wirus	Liczba sekwencji genomowych	Sekwencja konsensusowa
Ludzki enterowirus A EV-A71	803	✓
Ludzki enterowirus C CV-A21	8	✓
Ludzki enterowirus C EV-A104	8	✓
Ludzki enterowirus C EV-C109	3	✓
Ludzki enterowirus C EV-C117	3	✓
Ludzki enterowirus C EV-C118	3	✓
Ludzki enterowirus D EV-68	529	✓
Ludzki bokawirus	108	✓
Ludzki bokawirus 1	3	✓
Ludzki bokawirus 2	13	✓
Ludzki bokawirus 3	11	✓
Ludzki bokawirus 4NI	2	✓
Ludzki respirowirus 3	2	✓
Ludzki koronawirus 229E	27	✓
Ludzki koronawirus HKU1	18	✓
Ludzki koronawirus NL63	55	✓
Ludzki koronawirus OC43	138	✓
Ludzki mastadenowirus A	6	✓
Ludzki mastadenowirus B	300	✓
Ludzki mastadenowirus C	71	✓
Ludzki mastadenowirus D	135	✓
Ludzki mastadenowirus E	49	✓
Ludzki mastadenowirus F	32	✓
Ludzki metapneumowirus	154	✓

Wirus	Liczba sekwencji genomowych	Sekwencja konsensusowa
Wirus paragrypy 4a	11	✓
Wirus paragrypy 4b	9	✓
Syncytialny wirus oddechowy A	319	✓
Syncytialny wirus oddechowy B	157	✓
Wirus paragrypy 1	70	✓
Ludzki rubulawirus 2	58	✓
Wirus MERS	258	✓
Wirus świnki	505	✓
Ludzki rinowirus A	68	✓
Ludzki rinowirus B	18	✓
Ludzki rinowirus C	45	4 sekwencje
Wirus grypy A	45437	Dla 1 genu
Wirus grypy B	100	Dla 1 genu
Ludzki koronawirus SARS Urbani HKU-39849	135	✓
Wirus ospy wietrznej i półpaśca	266	✓
Wirus odry	478	✓
Wirus ospy małpiej	230	✓
Wirus różyczki	96	✓

Przyrównanie sekwencji rinowirusów C nie przyniosło oczekiwanych rezultatów, prawdopodobnie z powodu znacznego zróżnicowania genetycznego patogenów tej grupy. W związku z tym, przy pomocy programu Geneious Tree Builder utworzyłem kladogram (Rycina 15), wskazujący zróżnicowanie sekwencji na 4 grupy, dla których uzyskałem sekwencje konsensusowe.

W celu uzyskania sekwencji konsensusowych dla grypy A oraz dla grypy B przyrównywane były wybrane segmenty ich genomów wykazujące najmniejsze zróżnicowanie w oparciu o wiedzę

literaturową, co umożliwiło zwiększenie liczby analizowanych sekwencji i ułatwiło uzyskanie sekwencji konsensusowych [140,141].



Rycina 15 Kladogram umożliwiający podział ludzkich rinowirusów C na grupy (klady) w celu identyfikacji sekwencji konsensusowych

8.1.2 Opracowanie panelu starterów

Na podstawie opracowanych sekwencji konsensusowych, przy użyciu oprogramowania Primer3 opracowałem panel starterów (Tabela 18) komplementarnych do regionów o najwyższym stopniu identyczności. W celu otrzymania jak najlepszych wyników projektowałem startery o jak najniższym stopniu degeneracji. Dla większości wirusów zaprojektowałem po 2 pary starterów, z których do stworzenia panelu wybrałem startery o najbardziej zbliżonych temperaturach przyłączania i o jak najniższym stopniu degeneracji. Stopień degeneracji starterów został założony podczas procesu projektowania starterów a następnie potwierdzony przy użyciu dostępnych narzędzi bioinformatycznych [142]. Nukleotydy zdegenerowane, które występują w użytych starterach, posiadają następujące symbole:

- D – A, G lub T
- R – A lub G
- Y – C lub T
- W – A lub T

Tabela 18 Opracowane sekwencje nukleotydowe starterów dla poszczególnych wirusów wraz ze stopniem ich degeneracji. FOR-starter przyłączający się do końca 5', REV- starter przyłączający się końca 3'

nr	Nazwa	Sekwencja FOR	Stopień degeneracji	Sekwencja REV	Stopień degeneracji
1	Ludzki enterowirus A EV-A71	ACCTTTGTGCGC CTGTTT	1	ACCCAAAGTA GTCGGTCCG	1
2	Ludzki enterowirus C CV-A21	CGTGGCGGCTA GTACTCTG	1	GGATTAGCCG CATTCAGGG	1
3	Ludzki enterowirus C EV-A104	ACACTTGCCACT CCTGGTTC	1	GCACTGGACT GTAGCCCAAT	1
5	Ludzki enterowirus C EV-C109	TGGGTGTCCGT GTTTCCTTT	1	CCAATCACTGC GTTAGCTGC	1
7	Ludzki enterowirus C EV-C117	TCGTTGCTGCCA TACCTGAG	1	GCCCATTAAAC TCGCAGCAC	1
9	Ludzki enterowirus C EV-C118	GGGGCAAATC GTTATCCGC	1	GCTGACACTTG AGCTCCCAT	1
11	Ludzki enterowirus D EV-68	TTCGGTACCTTT GTACGCCT	1	CAAAGTAGTC GGTTCCGCCA	1
12	Ludzki bokawirus	GACTGCAGACA ACGCCTAGT	1	GGACAAAGGA CCCCAAGAGG	1
14	Ludzki respirowirus 3	GAGATGCAGGT CTCGCTTCA	1	GGCTGATCCA CCTGTTGGTT	1
16	Ludzki bokawirus 1	CGCTGCAAATCT CTTCTGGC	1	AAGATGTTCCC ACGGACCAC	1

nr	Nazwa	Sekwencja FOR	Stopień degeneracji	Sekwencja REV	Stopień degeneracji
18	Ludzki bokawirus 2	CTCAGACCAAG CGACGAAGA	1	ATAACCAGGA AGCACCCACC	1
20	Ludzki bokawirus 3	TTCTGGCTACGC GTCCTTTT	1	AAGATGTTCCC ACGGACCAC	1
22	Ludzki bokawirus 4NI	ACAGATGGGCA AGCAGAACA	1	GCCAGCAAGA GTACAGTCGT	1
25	Ludzki koronawirus 229E	CCGGTGAAACA TTTTGGCGT	1	TAGCACCTGCA CGCATACAA	1
26	Ludzki koronawirus HKU1	GGCATATGCTCC ATGGTGGT	1	ACACGGCCTA CATTAGCAGT	1
29	Ludzki koronawirus NL63	TCAATGGCTGTG GGCGTAAT	1	ACAACACTAG CGCGAAGGG	1
31	Ludzki koronawirus OC43	CAGCCAGGGAC GTGTTGTAT	1	GCCGAAACAA ACCCATGGTC	1
32	Ludzki mastadenowirus A	GTTTAACGAGG TGCAGCTGC	1	CCGAAGCACA GGGAGAAGAC	1
34	Ludzki mastadenowirus B	CCCGTGAGCTTG AACCTGAA	1	GGACTTCTACG AGGCCATGG	1
36	Ludzki mastadenowirus C	TGCACGTCTCCT GAGTTGTC	1	TCCGTCTTCTG GAGGAGGAG	1
38	Ludzki mastadenowirus D	CTGCATCTCCCA GGCTTTCA	1	CCGAAACGAG GAAGTCTGCT	1
40	Ludzki mastadenowirus E	CGGGAGAGGCA TGATGAGAC	1	TTGGCCATAAA GACCGTCCC	1
42	Ludzki mastadenowirus F	GGGATGACATG TTCCAGGGG	1	AATCACAAGC CCGACAACCT	1
44	Ludzki metapneumowirus	TGCGGCARTTTT CAGACAATGC	2	CTTCCTGTGCT RACTTTGCA	2
46	Wirus paragrypy 4a	ACGATAGGCCT GAACGGTTG	1	TGTCTGGTCCC ATAAGCAGC	1
48	Wirus paragrypy 4b	GTTACGCCATG GGAGTTGGA	1	TTTCAAGCTCC GGCATCAGT	1
50	Syncytialny wirus oddechowy A	ACATCTCACCAT GCAAGCCA	1	GCTGATTCCAA GCTGGGGAT	1
52	Syncytialny wirus oddechowy B	AGGCAATGCAG CAGGTCTAG	1	GGGTTTTCTTG GGTAGTTGGC	1
54	Wirus paragrypy 1	CACCGCTGATA GGGACAACA	1	GTTTTCGTGGT GCCTCTCCT	1
56	Ludzki rubulawirus 2	GCAGCAGAGGC AAAATCCAA	1	GCACACCTGG GATTACACCA	1
59	Wirus Bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej	CTGGACTCATTC CTGCGGTT	1	AGCAGAGCCC ATCAGCAAAT	1

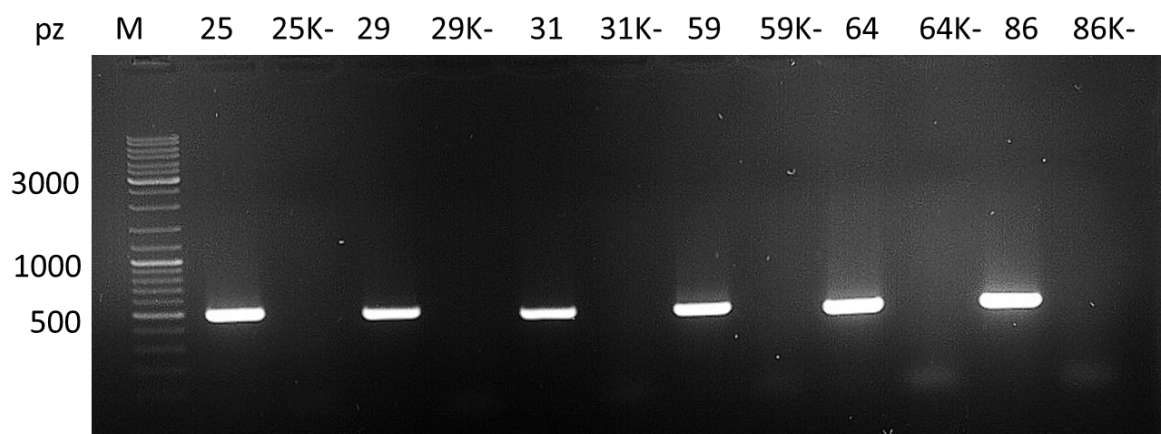
nr	Nazwa	Sekwencja FOR	Stopień degeneracji	Sekwencja REV	Stopień degeneracji
61	Wirus świnki	GGCAAGCCATG GATCAATTT	1	AAATTCTGTTA CCGGCGTTG	1
62	Ludzki rinowirus A	CAAGCACTTCTG TYWCCCCGG	4	DGAAACACGG ACAYCCAAAGT	6
63	Ludzki rinowirus B	YCCYACCAYCCG ACCCACD	24	RGGGTTDRGG TTAGCCGCAT	12
64	Ludzki koronawirus SARS Urbani HKU-39849	TGCACTCCGTGA ACTCACTC	1	CAACAGGGTA CACAGAGCGT	1
66	Ludzki rinowirus C wersja 1	RARYACTTCTGT TTCCCCGG	8	RGAAACACGG ACACCCAAAG	2
68	Ludzki rinowirus C wersja 2	WCGGTTCTTT GYAYGCCTGT	8	AGCCRCATTCA GGGGCCGG	2
69	Ludzki rinowirus C wersja 3	YCAAGYACTYCT GTYTCCCCGG	16	MARGAAACAC GGACACCCAA	4
70	Wirus grypy A	KCCAGCRCAAA ATGCYATAAGCA C	8	DACTTCTATRG TGTTGGCYAAT GC	12
73	Wirus grypy B	TATCCGTGCCAA CCTGCAAT	1	RATCAAACAG AAGACGGAGG	2
74	Wirus różyczki	CGCYGAGCAGG AYTTCCGCG	4	CCCASCCRCCT TGGAGCCAG	4
75	Wirus ospy małpiej	ACATCTCKTCTA GTTTCACTAGTA CCT	2	TGGGATTTAG AAAYAGTGCTC T	2
76	Wirus odry	CATCAAGCACC GCCTAAAAA	1	GTGTGTGTCTC CTCCTATGG	1
77	Wirus ospy wietrznej i półpaśca	GCCTGTTGAATC TTGTCCAC	1	CCGGGAGAAT GTATGTTGGA	1
-	POTEE gen ludzki	GTGCTATGTTGC CCTGGACT	1	ACTCCTGCTTG CTGATCCAC	1

W tabeli 18 przedstawiłem wszystkie zaprojektowane startery użyte do opracowania nowej metody. Fragment genu POTEE (ang. *POTE ankyrin domain family member E*) został dodany ze względu na jego obecność w różnorodnych tkankach ludzkich oraz unikalność dla człowieka. Dodatkowo w projektowanej metodzie użyłem starterów 86L oraz 86R dla SARS-CoV-2 z Artic Network [143].

8.1.3 Konstrukcja kontroli pozytywnych

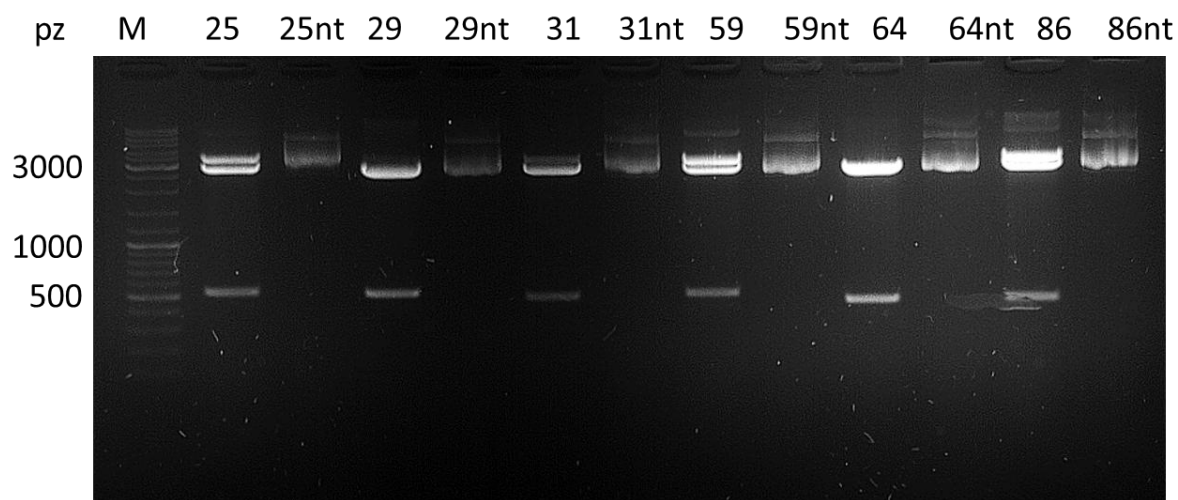
Na podstawie sekwencji konsensusowych zamówiłem kontrole pozytywne w formie genów syntetycznych klonowanych w plazmidach pUC-GW i pMX. Dla części wirusów, których materiał genetyczny był dostępny w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych (ludzki koronawirus 229E, ludzki koronawirus NL63, ludzki koronawirus OC43, wirus Bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej, ludzki koronawirus SARS Urbani HKU-39849, oraz drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego- SARS-CoV-2), wykonałem amplifikację i klonowanie genów w plazmidzie pJet1.2.

Fragmenty odpowiednie do umieszczenia w plazmidzie uzyskałem metodą odwrotnej transkrypcji wirusowych RNA i amplifikacji cDNA w reakcji PCR, w przypadku wszystkich próbek otrzymując amplikon o pożądanej wielkości około 500 pz (Rycina 16).



Rycina 16 Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym produktów PCR na podstawie próbek 25, 29, 31, 59, 64 oraz 86 (numeracja z Tabeli 16). W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne reakcji PCR niezawierające matrycy

Produkty wyizolowano z żelu i poddano ligacji z pustymi liniowanymi plazmidami. Przeprowadzono hodowlę bakterii na płytkach, a następnie namnożenie bakterii w hodowlach płynnych. Rekombinowane plazmidy wyizolowano i poddano trawieniu enzymatycznemu w celu potwierdzenia obecności wstawki. We wszystkich analizowanych plazmidach stwierdziłem obecność wstawki (Rycina 17).



Rycina 17 Rozdział elektroforetyczny produktów ligacji po trawieniu enzymatycznym (dla próbek 25, 29, 31, 59, 64 oraz 86). W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literami nt zawierają odpowiednie kontrole-próbki nietrawione

8.1.4 Optymalizacja warunków reakcji PCR

Wykonałem eksperymenty z wykorzystaniem różnych temperatur przyłączania starterów, polimeraz oraz czasów wydłużania łańcucha nukleotydowego. Następnie podzieliłem startery na grupy o najbardziej zbliżonych wartościach temperatur przyłączania, obliczonych przy użyciu programu IDT Oligo Analyzer [144]. Powtórzyłem eksperymenty z wykorzystaniem różnych temperatur oraz czasów wydłużania łańcucha dla tak przygotowanych mieszanin starterów. W późniejszych eksperymentach zdecydowałem o stworzeniu jednej mieszaniny reakcyjnej dla wszystkich opracowanych starterów, dla której również przeprowadziłem optymalizację temperatury i czasu wydłużania łańcucha. Otrzymane dane eksperymentalne wskazały, jest możliwe otrzymanie produktów reakcji przy zastosowaniu jednej uśrednionej temperatury przyłączania oraz jednego czasu wydłużania dla wszystkich starterów, zgodnie z wartościami przedstawionymi w podrozdziale Metody 7.6.

8.1.5 Analiza jednorodności produktów PCR

Ważnym elementem nowej metody jest jednorodność powstających produkty PCR. Ich określona długość i sekwencja umożliwia szybkie dopasowanie wyniku do bazy danych. W celu potwierdzenia poprawności i jednorodności otrzymywanych produktów PCR, przeprowadziłem doświadczenie qPCR z analizą krzywej topnienia (Metody 7.8).

W Tabeli 19 zestawiono uzyskane temperatury topnienia produktów reakcji qPCR. Temperatura dla jednego produktu mówi o powstawaniu czystego, jednorodnego produktu. Powstanie większej liczby produktów jest widoczne w próbkach, w których występują

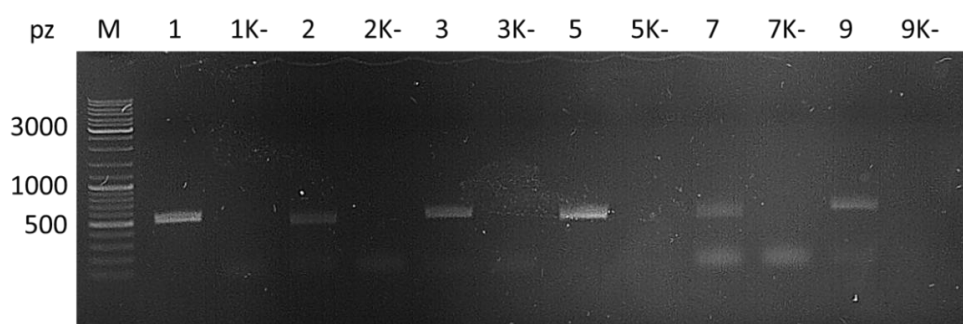
dotychczasowe temperatury topnienia; uzyskanie temperatur topnienia - w kontroli negatywnej oraz obecność drugiego produktu reakcji oznacza wystąpienie niespecyficznych reakcji, np. dimeryzacji starterów.

Tabela 19 Temperatury topnienia produktów reakcji qPCR dla poszczególnych kontroli pozytywnych

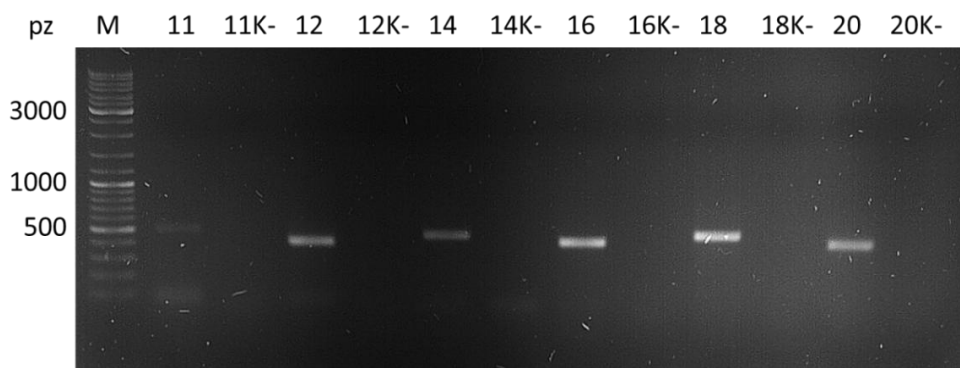
Próbka	Temperatura topnienia pierwszego produktu (°C)	Temperatura topnienia drugiego produktu (°C)	Temperatura topnienia produktu w kontroli negatywnej (°C)
1	84,46	brak	75,75
2	87,52	83,22	77,99; 81,65
3	84,81	brak	77,01
5	81,21	brak	brak
7	84,33	76,73	77,12
9	87,3	80,08	brak
11	84,71	78,82	79,49
12	81,56	brak	brak
14	81,8	78,52	76,95
16	81,65	brak	brak
18	80,72	brak	brak
20	82,17	brak	brak
22	79,58	brak	brak
25	77,4	80,16	78,96
26	78,08	brak	80
29	78,83	brak	brak
31	82,22	brak	brak
32	86,73	84,1	77,14

34	86,9	brak	brak
36	77,31	82,4	76,97
38	87,42	brak	brak
40	82,3	brak	75,74
42	84,92	76,07	77,46
44	82,66	brak	74,6
46	81,6	brak	71,04
48	81,45	brak	75,55
50	80,61	77,01	77,03
52	79,42	76,16	brak
54	82	brak	79,3; 75,9
56	82,65	brak	brak
59	81,26	brak	80,30; 77,1
61	83,93	brak	74,6
62	85,25	brak	74,37
63	86,4	83,75	80,53
64	83,72	brak	brak
66	85,98	brak	brak
68	86,12	83,19	80,35
69	84,96	72,9	73,8
70	81,68	brak	brak
73	81,18	brak	81,18
74	92,37	77,59	77,89
75	78,58	74,84	71,84
76	81,21	brak	brak
77	83,65	79,75	82,12
86	80,2	brak	78,42

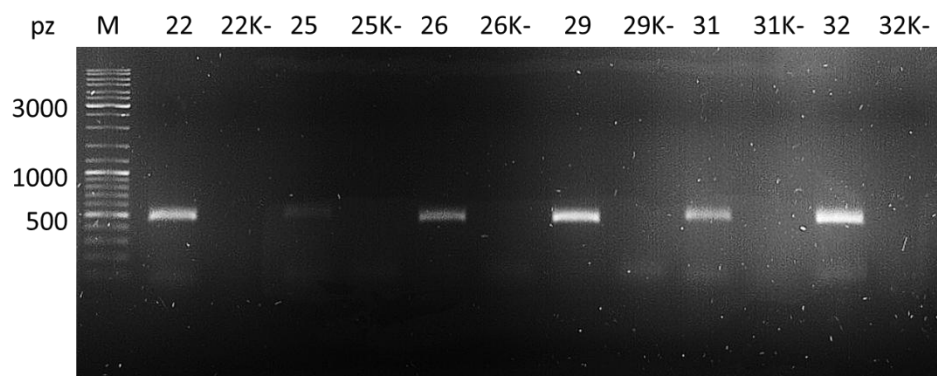
W celu potwierdzenia wyników uzyskanych na podstawie analizy krzywych topnienia obliczonych z użyciem oprogramowania termocyklera Light Cycler 480 oraz zobrazowania niespecyficznych produktów, dla wszystkich próbek przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym (Ryciny 18-25). Zakładanym wynikiem był produkt długości około 500 pz odpowiadający całemu zaprojektowanemu ampliconowi. W większości próbek najbardziej widocznym prążkiem był produkt wymaganej długości około 500 pz jak jest to widoczne np. w próbkach 12,14,16,18,20 na Rycinie 19. Oprócz głównego produktu były widoczne również krótsze fragmenty o długości około 100 pz, np. w próbkach 7, 11, 31, 59, 66 (Ryciny 18, 19, 20, 23) oraz w kontrolach negatywnych 7K-, 29K-, 44K- 54K- (Ryciny 18, 20, 21, 22). W kilku próbkach nie zaobserwowałem produktu o oczekiwanej wielkości – 36, 50, 54, 69 (Ryciny 21, 22, 24). Wyniki te były powtarzalne w kolejnych próbach amplifikacji.



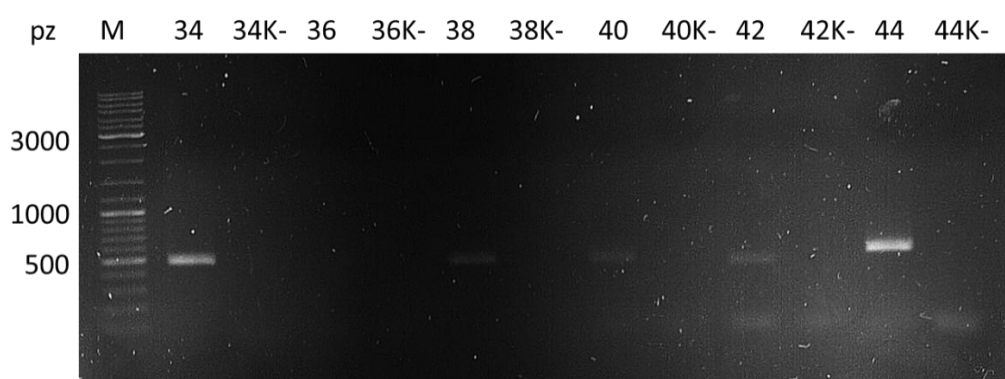
Rycina 18 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 1,2,3,5,7 oraz 9. W studziencie opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



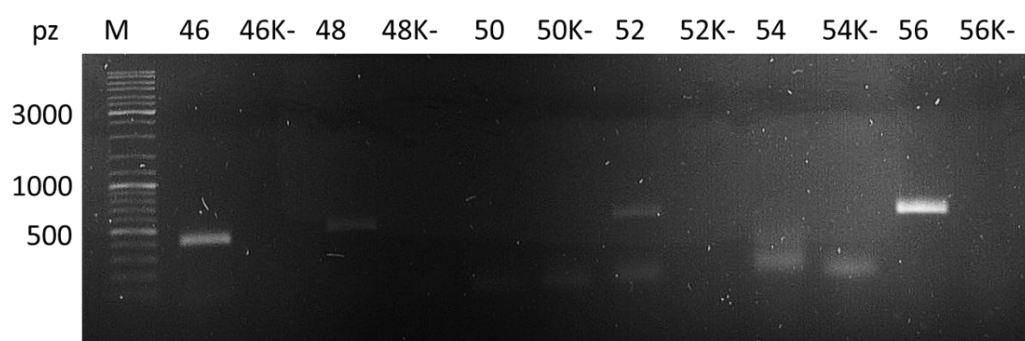
Rycina 19 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 11, 12, 14, 16, 18 oraz 20. W studziencie opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



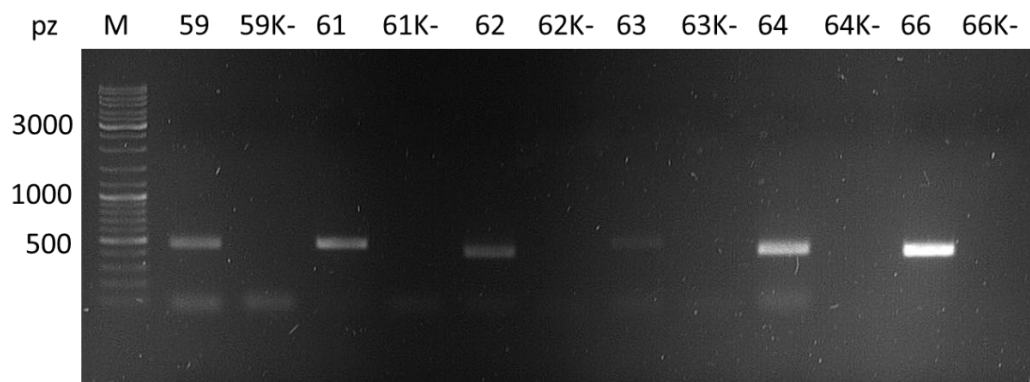
Rycina 20 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 22, 25, 26, 29, 31 oraz 32. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



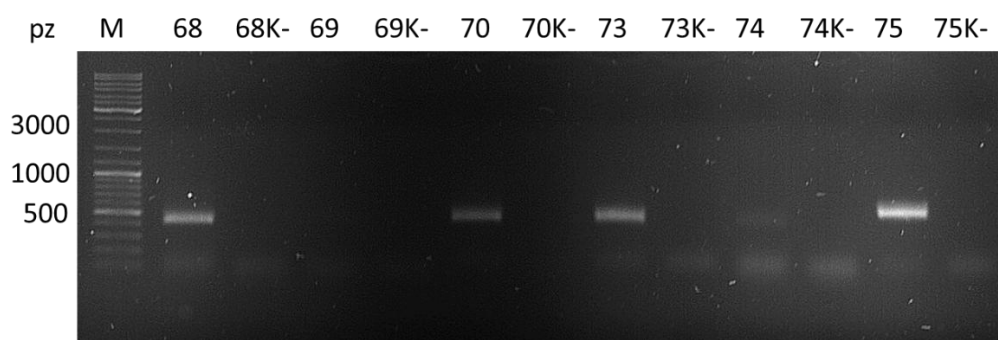
Rycina 21 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 34, 36, 38, 40, 42 oraz 44. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



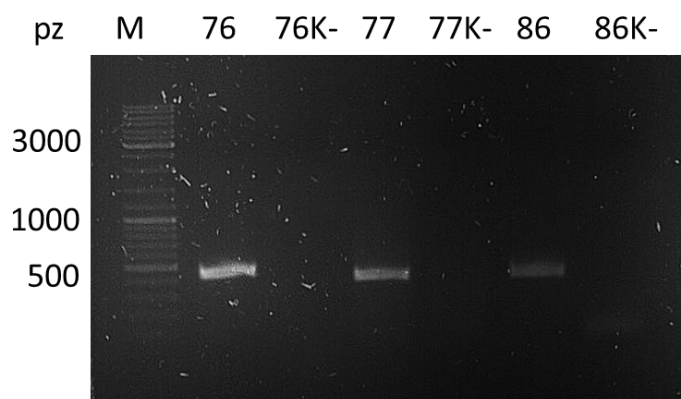
Rycina 22 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 46, 48, 50, 52, 54 oraz 56. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



Rycina 23 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 59, 61, 62, 63, 64 oraz 66. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy



Rycina 24 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 68, 69, 70, 73, 74 oraz 75. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy

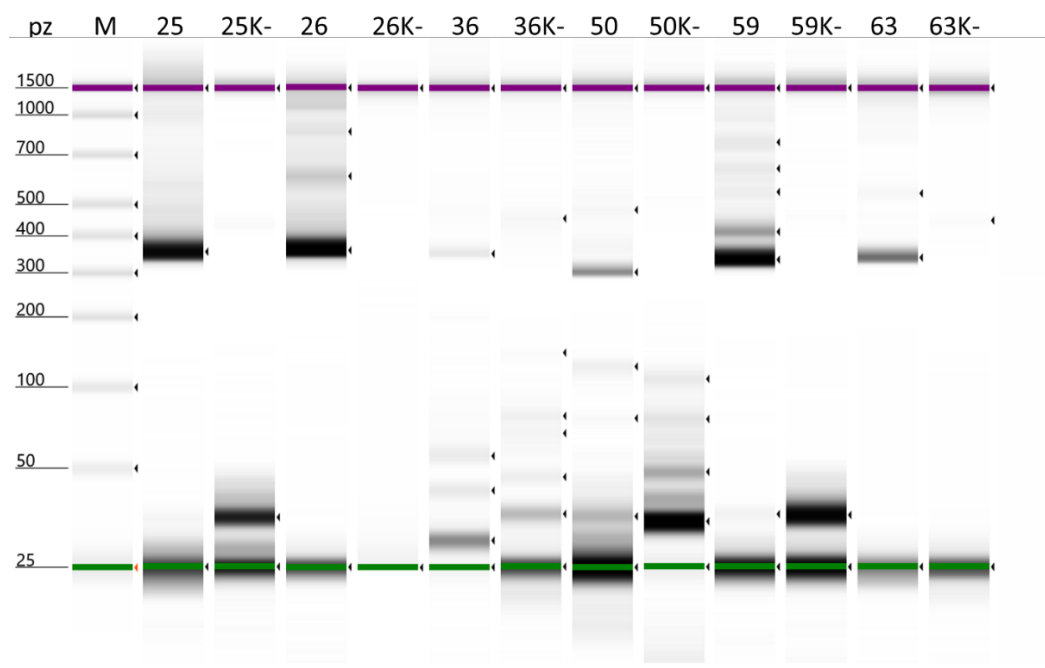


Rycina 25 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 76, 77 oraz 86. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy

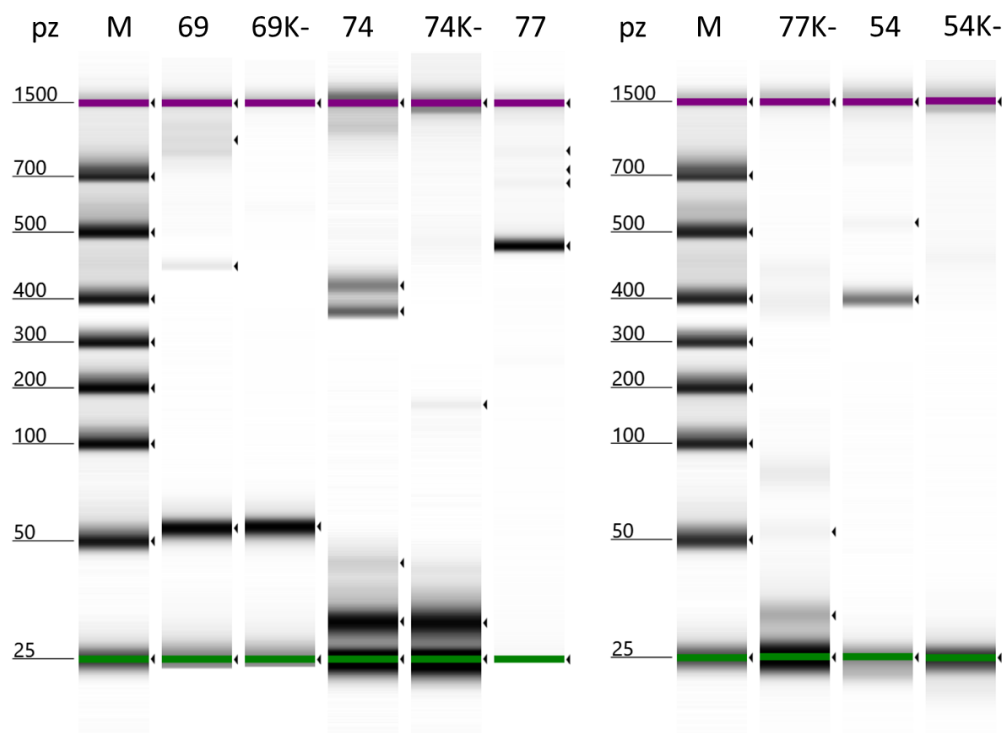
Dla próbek o niejednoznacznym wyniku uzyskanym podczas eksperymentu krzywej topnienia (mała różnica temperatur topnienia produktów i kontroli bez matrycy) i próbek, dla których nie był wyraźnie zauważalny prążek w żelu agarozowym wykonałem

zautomatyzowaną elektroforezę (Rycina 26, 27) o wysokiej czułości umożliwiającą zobrazowanie mniejszych stężeń produktu (nawet 0,1 ng/μl).

Próbki 36, 50, 54 oraz 69, dla których nie obserwowano produktu w klasycznej elektroforezie, zawierały małe ilości produktu uwidocznione z użyciem dokładniejszej metody (Rycina 26, 27). W części próbek były możliwe do zaobserwowania dodatkowe produkty reakcji qPCR.



Rycina 26 Wizualizacja wyników wysokoczulej zautomatyzowanej elektroforezy próbek 25, 26, 36, 50, 59 oraz 63. Jako markera- M użyto dołączonego do zestawu D1000 Ladder. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy. System automatycznie oznacza kropkami widoczne prążki DNA



Rycina 27 Wizualizacja wyników wysokoczułej zautomatyzowanej elektroforezy próbek 69, 74, 77, oraz 54. Jako markera- M użyto dołączonego do zestawu D1000 Ladder. Próbki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy. System automatycznie oznacza kropkami widoczne prążki DNA

8.2 Walidacja metody diagnostycznej

8.2.1 Określenie limitu detekcji (Limit of detection, LOD)

Na podstawie przeprowadzonych testów działania metody przeprowadzonych na kontrolach pozytywnych, określiłem limity detekcji dla każdego z wykrywanych patogenów (liczba kopii materiału genetycznego wirusa w reakcji). Liczbę kopii genu obliczyłem w oparciu o wzór:

$$\text{Liczba kopii DNA na } \mu\text{l} = \frac{\text{Stężenie DNA } \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}}\right) \times \text{Stała Avogadra}}{\text{długość DNA (pz)} \times \text{przelicznik na ng} \times \text{uśredniona masa pary zasad (Da)}}$$

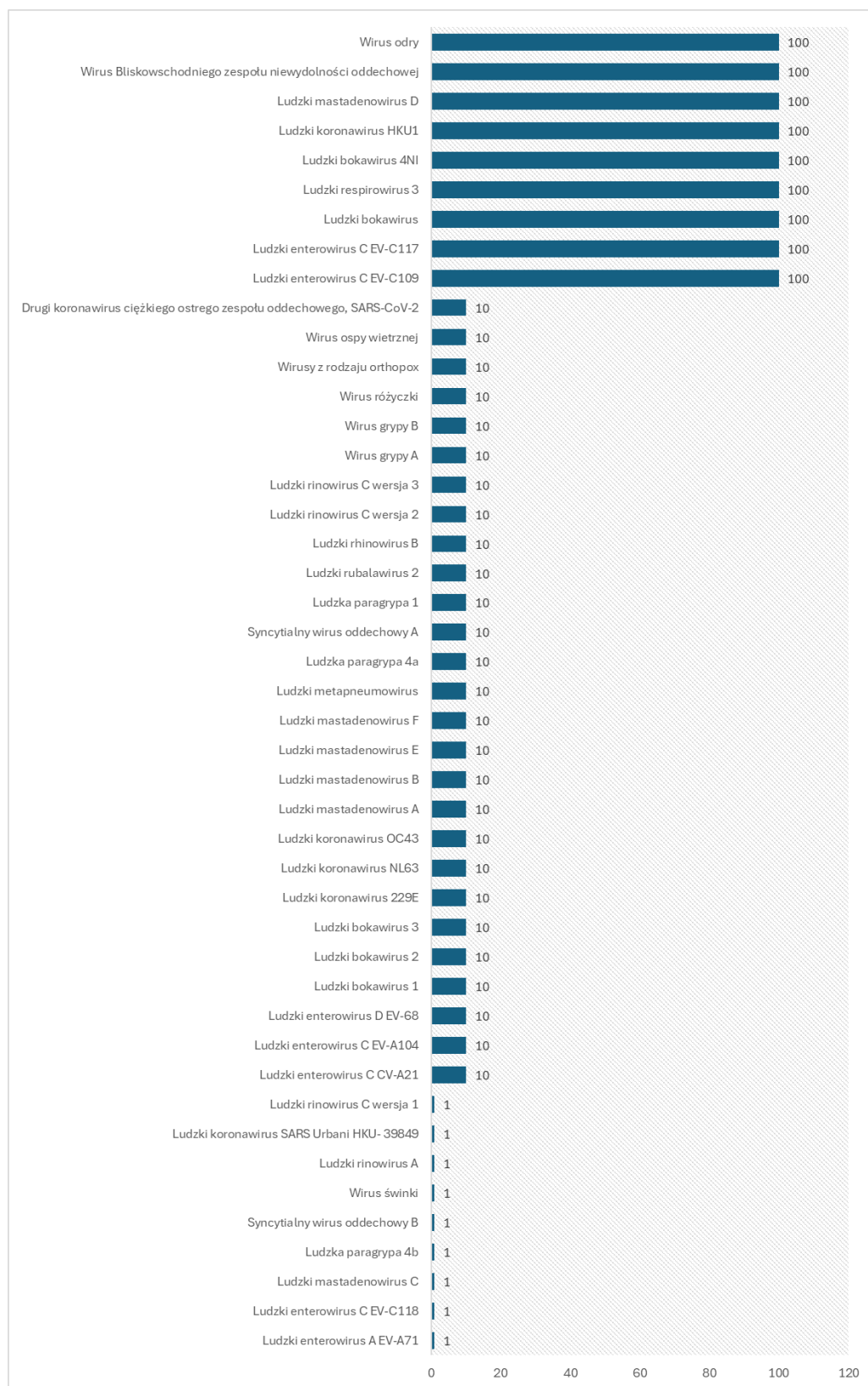
Gdzie:

- Stała Avogadra = $6,022 \times 10^{23}$
- Uśredniona masa pary zasad = 650
- Przelicznik z μg na ng = 1×10^9

Na tej podstawie, poprzez seryjne rozcieńczenia dla każdej z kontroli pozytywnych otrzymałem próbki zawierające 1000, 100, 10 oraz 1 kopię genu w 3 µl roztworu (badanej próbce). Na przygotowanych próbkach przeprowadziłem amplifikację fragmentu PCR oraz sekwencjonowanie, które wykonałem w 10 powtórzeniach, aby uzyskać odpowiednią ilość danych.

LOD to najmniejsza liczba kopii sekwencji nukleotydowej które mogą być wykrywane w reakcji. Określa się go, gdy cel molekularny jest wykrywany w 95% reakcji. W przypadku 10 powtórzeń wszystkie z nich musiały dać wynik pozytywny w danym rozcieńczeniu.

Limity wykrycia liczby kopii wahały się dla poszczególnych wirusów pomiędzy 1 a 100 kopiami na reakcję, co przedstawiono na Rycinie 28 oraz w Tabeli 20.



Rycina 28 Limity wykrycia poszczególnych wirusów w opracowanej metodzie. Liczby określają liczbę kopii obecnych w całej reakcji

Tabela 20 Tabela zawierająca wszystkie cele molekularne opracowanej metody wraz z limitem kopii wykrywanego genu

Cel molekularny	Limit detekcji kopii w próbce	Limit detekcji kopii na μl reakcji
Ludzki enterowirus A EV-A71	1	0,08
Ludzki enterowirus C EV-C118	1	0,08
Ludzki mastadenowirus C	1	0,08
Ludzka paragrypa 4b	1	0,08
Syncytialny wirus oddechowy B	1	0,08
Wirus świnki	1	0,08
Ludzki rinowirus A	1	0,08
Ludzki koronawirus SARS Urbani HKU-39849	1	0,08
Ludzki rinowirus C wersja 1	1	0,08
Ludzki enterowirus C CV-A21	10	0,8
Ludzki enterowirus C EV-A104	10	0,8
Ludzki enterowirus D EV-68	10	0,8
Ludzki bokawirus 1	10	0,8
Ludzki bokawirus 2	10	0,8
Ludzki bokawirus 3	10	0,8
Ludzki koronawirus 229E	10	0,8
Ludzki koronawirus NL63	10	0,8
Ludzki koronawirus OC43	10	0,8
Ludzki mastadenowirus A	10	0,8
Ludzki mastadenowirus B	10	0,8
Ludzki mastadenowirus E	10	0,8
Ludzki mastadenowirus F	10	0,8
Ludzki metapneumowirus	10	0,8
Ludzka paragrypa 4a	10	0,8
Syncytialny wirus oddechowy A	10	0,8
Ludzka paragrypa 1	10	0,8
Ludzki rubalawirus 2	10	0,8

Cel molekularny	Limit detekcji kopii w próbce	Limit detekcji kopii na μ l reakcji
Ludzki rinowirus B	10	0,8
Ludzki rinowirus C wersja 2	10	0,8
Ludzki rinowirus C wersja 3	10	0,8
Wirus grypy A	10	0,8
Wirus grypy B	10	0,8
Wirus różyczki	10	0,8
Wirusy z rodzaju <i>Orthopox</i>	10	0,8
Wirus ospy wietrznej i półpaśca	10	0,8
Drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego, SARS-CoV-2	10	0,8
Ludzki enterowirus C EV-C109	100	8
Ludzki enterowirus C EV-C117	100	8
Ludzki bokawirus	100	8
Ludzki respirowirus 3	100	8
Ludzki bokawirus 4NI	100	8
Ludzki koronawirus HKU1	100	8
Ludzki mastadenowirus D	100	8
Wirus Bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej	100	8
Wirus odry	100	8

8.2.2 Wykrycie wirusów za pomocą RT-qPCR

Dla wszystkich dostępnych wirusów pozyskanych z hodowli komórkowych wyizolowałem materiał genetyczny i przeprowadziłem reakcje RT-PCR w czasie rzeczywistym. Każdą z reakcji zawierających wykrywane wirusy wykonałem w trzykrotnym powtórzeniu. Wykonałem także kontrolę negatywną, gdzie w procesie izolacji zamiast pożywki z hodowli użyłem czystej pożywki nie używanej do hodowli wirusów oraz kontrolę w której nie znajdowała się matryca dla starterów (z ang. *NTC*). Eksperyment ten przeprowadziłem w celu potwierdzenia posiadania odpowiednich kontroli wirusowych przy użyciu tak zwanego „złotego standardu”

diagnostycznego i porównaniu uzyskanych z niego wyników z opracowywaną metodą. Wyniki przedstawiłem w Tabeli 21.

Tabela 21 Podsumowanie wykrycia wirusów izolowanych z hodowli komórkowych metodą RT-qPCR

Wirus	Ct średnie	Potwierdzone wykrycie
Grypa A	27,5	✓
Grypa B Victoria	12	✓
Grypa B Yamagata	11,5	✓
Paragrypa 3	16	✓
Paragrypa 1	-	-
RSV A	-	-
RSV B	-	-
Ludzki adenowirus 1	19	✓
Ludzki adenowirus 2	19,5	✓
Ludzki adenowirus 3	24,5	✓
Ludzki adenowirus 5	23	✓
Ludzki adenowirus 7	19,4	✓
Ludzki enterowirus A71	18,3	✓
Ludzki enterowirus D68	20,1	✓

Trzy z czternastu testowanych wirusów nie zostały wykryte podczas przeprowadzonych testów qPCR – wirus paragrypy 1, syncytialny wirus oddechowy typu A oraz typu B. Pozostałe jedenaście wirusów zostało wykryte we wszystkich powtórzeniach (3) wykonanych dla każdego z nich. Cykl progowy (z ang. *Ct -threshold cycle*) przypadał pomiędzy 11 a 31 cyklem, wskazując jednoznacznie na pozytywność próbek. W trzech przypadkach – hodowlach grypy B Yamagata, ludzkiego adenowirusa 2 oraz ludzkiego adenowirusa 3 negatywna kontrola izolacji wykazała wzrost fluorescencji po 40 cyklu, co nie dyskwalifikuje pozytywnego wyniku powyższych testów.

8.2.3 Wykrycie wirusa grypy metodą klasyczną – barwienie immunochemiczne w hodowli komórkowej

Ze względu na możliwość namnażania wirusa grypy A w hodowli komórkowej w moim laboratorium, zdecydowałem się po namnożeniu wirusa przeprowadzić jego detekcję immunochemiczną metodą IPMA (z ang. *immunoperoxidase monolayer assay*) podczas miareczkowania wirusa uzyskanego w hodowli.

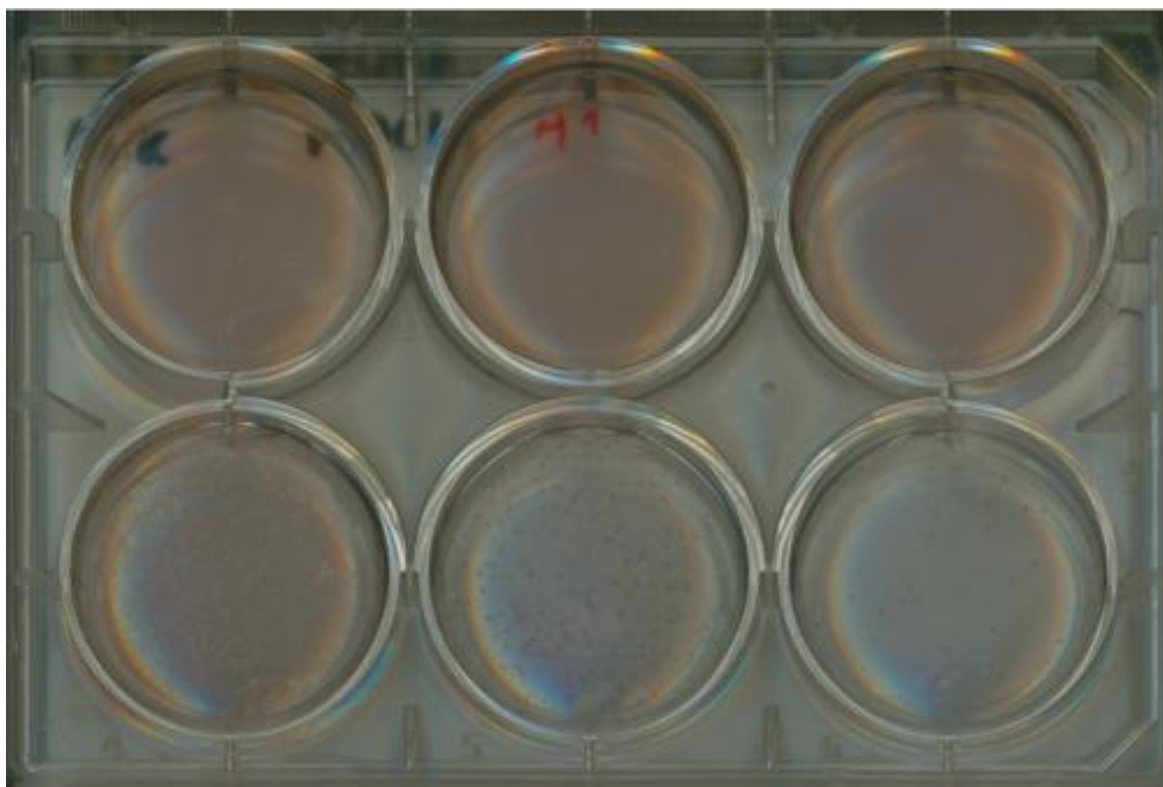
W rozcieńczeniu dziesiętnym 10^{-6} zliczyłem 40 łysinek – (z ang. *PFU-plaque-forming unit*) a miano wirusa obliczyłem ze wzoru:

$$PFU/ml = \frac{\text{liczba łysinek}}{\text{rozcieńczenie}} \times \frac{1}{\text{objętość dodanego rozcieńczenia (ml)}}$$

$$PFU/ml = \frac{40}{10^{-6}} \times \frac{1}{0,6}$$

$$PFU/ml = 6,6 \times 10^7$$

Metoda ta potwierdziła występowanie infekcyjnego wirusa grypy typu A w analizowanej próbce co dodatkowo obrazują wybarwione łysinki wirusowe (Rycina 29).



Rycina 29 Skan płytki sześciodołkowej po wykonaniu testu IPMA. czerwono-różowe pola oznaczają łysinki wirusowe wytworzone przez wirusa grypy A wyznakowane przy użyciu specyficznych przeciwciał

8.2.4 Potok informatyczny umożliwiający analizę danych „viralpipeline”

We współpracy z informatykiem dr inż. Aleksandrem Pałkowskim z Międzynarodowego Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi w Gdańsku przygotowałem potok informatyczny umożliwiający dokładniejszą, szybszą i bardziej jednoznaczną analizę wyników otrzymanych z sekwencjonowania nanoporowego. Przedstawia on wyniki w formie dopasowania sekwencji dla pojedynczej próbki oraz w formie tabeli zbiorczej dla wszystkich próbek badanych podczas jednego procesu sekwencjonowania. Kod niniejszego programu napisany w języku Python znajduje się poniżej.

```
""" """

import gzip
import os
import shutil
from pathlib import Path

from tqdm import tqdm

from .externals import mini_assemble
from .tools import contigs_coverage_2, merge_fastq_files, merge_table_files


def analyse_barcode(
    barcode_fastq,
    barcode_id,
    ref_genomes,
    output_dir,
    temp_dir=None,
    threads=None,
    clean=True,
):
    """ """

    def write_no_contigs_report(output_dir, barcode_id):
        with open(output_dir.joinpath("contigs-not-created.txt"), "a") as handle:
            handle.write(f"barcode{barcode_id}\n")

    output_dir = Path(output_dir)
    output_dir.mkdir(parents=True, exist_ok=True)
    if temp_dir is None:
        temp_dir = Path(barcode_fastq).parent.joinpath("temp")
    temp_dir = Path(temp_dir)
    temp_dir.mkdir(parents=True, exist_ok=True)

    # Filtering
    # filtered_fastq = temp_dir.joinpath(filtered_fastq)
    # filter_sequences_by_length(input_fastq, filtered_fastq, min_read_len, max_read_len)
```

```

# Assembly
assembly_dir = temp_dir.joinpath("assembly")
contigs_file = mini_assemble(
    barcode_fastq,
    assembly_dir,
    ref_genomes,
    threads=threads,
    clean=clean,
    racon_rounds=1,
)
try:
    contigs_filesize = Path(contigs_file).stat().st_size
except FileNotFoundError:
    write_no_contigs_report(output_dir, barcode_id)
else:
    if contigs_filesize > 0:
        shutil.copy(
            contigs_file, output_dir.joinpath(f"bc-{barcode_id}-contigs.fasta")
        )

# Polishing
# medaka_dir = temp_dir.joinpath(medaka_dir)
# contigs_polished_file = medaka(
#     filtered_fastq, contigs_file, medaka_dir, medaka_model, threads=threads
# )

# Contigs coverage
contig_stats_file = f"bc-{barcode_id}-contig-stats.tsv"
contig_stats_file = output_dir.joinpath(contig_stats_file)
# contigs_coverage(
#     contigs_file,
#     barcode_fastq,
#     contig_stats_file,
#     temp_dir,
#     barcode_id=barcode_id,
# )
contigs_coverage_2(contigs_file, contig_stats_file, barcode_id=barcode_id)

# Classification
# kraken_output_file = output_dir.joinpath(kraken_output_file)
# kraken_report_file = output_dir.joinpath(kraken_report_file)
# kraken2(
#     contigs_polished_file,
#     krakendb_path,
#     kraken_output_file,
#     report_file=kraken_report_file,
#     threads=threads,
# )
else:
    write_no_contigs_report(output_dir, barcode_id)

```

```

if clean:
    shutil.rmtree(temp_dir)

def viralpipeline(
    input_dir,
    output_dir,
    ref_genomes,
    krakendb_path=None,
    min_read_len=300,
    max_read_len=550,
    medaka_model="r941_min_high_g360",
    threads=None,
    clean=True,
    unpack=False,
):
    """Run the entire pipeline."""
    # filtered_fastq = "filtered-reads.fastq"
    # medaka_dir = "medaka"
    # kraken_output_file = "kraken-contigs-output.tsv"
    # kraken_report_file = "kraken-contigs-report.tsv"
    contig_stats_file = "bc-all-contig-stats.tsv"

    output_dir = Path(output_dir)
    temp_dir = output_dir.joinpath("temp")
    temp_dir.mkdir(parents=True, exist_ok=True)

    barcode_dirs = [
        d
        for d in Path(input_dir).iterdir()
        if d.is_dir() and d.name.startswith("barcode")
    ]
    barcode_dirs.sort()

    for bc_dir in tqdm(barcode_dirs, desc="Analysing barcode directories"):
        bc_id = bc_dir.name.replace("barcode", "")
        bc_out_dir = output_dir
        bc_temp_dir = temp_dir.joinpath(bc_id)
        bc_temp_dir.mkdir(parents=True, exist_ok=True)
        bc_files = [
            f
            for f in bc_dir.iterdir()
            if f.is_file() and (f.suffix == ".fastq" or f.suffix == ".gz")
        ]
        if len(bc_files) == 0:
            print(f"No reads in: {bc_dir}")
            continue
        if unpack:
            bc_files_gz = [
                f for f in bc_dir.iterdir() if f.is_file() and f.suffix == ".gz"
            ]
            for bcf in bc_files_gz:

```

```

        with gzip.open(bcf, "rb") as infile:
            with open(bcf.parent.joinpath(bcf.stem), "wb") as outfile:
                shutil.copyfileobj(infile, outfile)
    bc_files = [
        f for f in bc_dir.iterdir() if f.is_file() and f.suffix == ".fastq"
    ]
    if len(bc_files) == 1:
        barcode_fastq = bc_files[0]
    else:
        barcode_fastq = bc_temp_dir.joinpath(f"bc-{bc_id}-reads.fastq")
        merge_fastq_files(bc_files, barcode_fastq)
    analyse_barcode(
        barcode_fastq,
        bc_id,
        ref_genomes,
        bc_out_dir,
        temp_dir=bc_temp_dir,
        threads=threads,
        clean=clean,
    )
    if clean and unpack:
        for bcf in bc_files:
            os.remove(bcf)

stats_files = [
    f
    for f in output_dir.iterdir()
    if f.is_file
    and f.name.endswith("-contig-stats.tsv")
    and f.name != contig_stats_file
]
stats_files.sort()
contig_stats_file = output_dir.joinpath(contig_stats_file)
merge_table_files(stats_files, contig_stats_file, clean=clean)

if clean:
    shutil.rmtree(temp_dir)

```

8.2.5 Analiza detekcji infekcji wirusowych w hodowlach komórkowych *in vitro* z wykorzystaniem nowej metody

Dla każdego z posiadanych wirusów (wykorzystanych także w Wyniki 8.7) uzyskanych z hodowli komórkowych przeprowadziłem izolację kwasów nukleinowych, odwrotną transkrypcję, powielenie materiału genetycznego z użyciem zaprojektowanych starterów, sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym oraz analizę bioinformatyczną w celu detekcji ich obecności w próbce.

Otrzymane wyniki wykrytych w próbkach celów molekularnych pokryły się całkowicie z testowanymi próbkami, co zostało przedstawione w Tabeli 22.

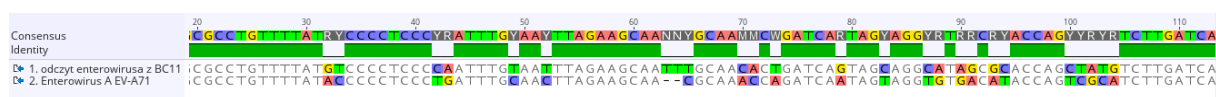
Tabela 12 Wyniki detekcji materiału genetycznego analizowanych wirusów w supernatancie z hodowli komórkowych nową metodą. Procenty przedstawiają ilość odczytów przypasowanych do celu molekularnego (referencji) spośród wszystkich odczytów uzyskanych w sekwencjonowaniu dla danej próbki

Próbka/referencja	Grypa A	Grypa B	RSV A	RSV B	HPIV 1	Piv 2	Piv 3	EV-A71	EV-D68	HAdV C	HAdV B
Grypa A	2%										
Grypa B Victoria		79%									
GrypaB Yamagata		80%									
RSV A			27%								
RSV B				5%							
HPIV1					40%						
HPIV 2						50%					
HPIV 3							35%				
EV-A71								41%			
EV-D68									43%		
HAdV 1 (C)								2%	2%	57%	
HAdV 2 (C)									8%	53%	
HAdV 3 (B)											74%
HAdV 5 (C)										57%	
HAdV 6 (C)										54%	
k-											

W przedstawionej powyżej Tabeli wszystkie z testowanych próbek zostały oznaczone jako pozytywne i jednoznacznie przypasowane do odpowiedniego wirusa przez „viralpipeline”. Kontrola negatywna nie posiadała żadnych odczytów, które mogły zostać przypasowane do bazy danych. We wszystkich próbkach wirusowych potwierdziłem obecność ludzkiego genu

kontrolnego POTEE, co świadczy o prawidłowo przeprowadzonym procesie izolacji, amplifikacji oraz przygotowania biblioteki.

Stosując nową metodę, wykryłem i sklasyfikowałem wirusy, które nie były poprzednio wykryte z użyciem metody qPCR, to jest wirusa paragrypy 1, syncytialnego wirusa oddechowego typu A oraz typu B, pomimo użycia do obydwu technik tej samej ilości izolatu wirusowego. W próbce, w której znajdował się wirus grypy A, jedynie 2% odczytów zostało przypasowanych do wirusa, większość odczytów należała do kontrolnego genu POTEE służącego jako kontrola pozytywna izolacji próbki, procesu amplifikacji DNA oraz przygotowania biblioteki. Dla ludzkiego adenowirusa 1 możemy zauważyć, że wykryte zostały również odczyty dla enterowirusa A71 -2% oraz enterowirusa D68-2%. Dzięki technologii sekwencjonowania i zastosowanemu potokowi informatycznemu otrzymałem również sekwencję obydwu tych wirusów, które mogłem porównać do innych próbek laboratoryjnych zawierających te wirusy (**Rycina 30**). Porównałem sekwencje enterowirusów wykrytych w hodowlach adenowirusów do odczytów uzyskanych z próbek hodowli enterowirusów w celu ustalenia pochodzenia niepoprawnych odczytów.



Rycina 30 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa A71 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające największą różnicę

Dodatkowo, po zaobserwowaniu różnic w sekwencji nukleotydowej poddałem sekwencje analizie przy użyciu narzędzia BLAST [145], które umożliwiło dokładną identyfikację składu próbek (**Rycina 31**).

Download

GenBank

Graphics

Human enterovirus 71 genomic RNA, complete genome, sub_strain:BrCr-TR

Sequence ID: [AB204852.1](#) Length: 7408 Number of Matches: 1

Range 1: 64 to 564

GenBank

Graphics

▼ Next Match ▲

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
915 bits(495)	0.0	499/501(99%)	0/501(0%)	Plus/Plus
Query 7	CGGGACCTTTTGTGCGCTGTTTTATACCCCTCCCTGATTTGCAACTTAGAAGCAACGCA	66		
Sbjct 64	CGGTACCTTTGTACGCTGTTTTATACCCCTCCCTGATTTGCAACTTAGAAGCAACGCA	123		
Query 67	AACAGATCAATAGTAGGTGTGACATACAGTCGCATCTTGATCAAGCACTTCTGTATCC	126		
Sbjct 124	AACAGATCAATAGTAGGTGTGACATACAGTCGCATCTTGATCAAGCACTTCTGTATCC	183		
Query 127	CCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAAAGCTCGTTACCCGCG	186		
Sbjct 184	CCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAAAGCTCGTTACCCGCG	243		
Query 187	TAAC TACTT CGAGAACTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGCACTC	246		
Sbjct 244	TAAC TACTT CGAGAACTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTCAGCACTC	303		
Query 247	CCCCCGGTAGATCAGTGCATGAGTACCGCAATCCCAACGGCGACCGTGGCGGTGCG	306		
Sbjct 304	CCCCCGGTAGATCAGTGCATGAGTACCGCAATCCCAACGGCGACCGTGGCGGTGCG	363		
Query 307	TGCGTTGGCGGCTGCCTATGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGCGTGA	366		
Sbjct 364	TGCGTTGGCGGCTGCCTATGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACATGGCGTGA	423		
Query 367	AGAGTCATTAGCTAGTGTAGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGTTAATCTAACTGCG	426		
Sbjct 424	AGAGTCATTAGCTAGTGTAGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGTTAATCTAACTGCG	483		
Query 427	GAGCACATACCCCTTAATCCAAAGGGCAGTGTGCTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACC	486		
Sbjct 484	GAGCACATACCCCTTAATCCAAAGGGCAGTGTGCTAACGGGCAACTCTGCAGCGGAACC	543		
Query 487	GACTACTTTGGGTGTCCTGT 507			
Sbjct 544	GACTACTTTGGGTGTCCTGT 564			

Download

GenBank

Graphics

Enterovirus A71 isolate B5-107, complete genome

Sequence ID: [MH716364.1](#) Length: 7380 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 542

GenBank

Graphics

▼ Next Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
824 bits(446)	0.0	488/509(96%)	0/509(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTTCCACGGGACCTTTTGTGCGCTGTTTTATGTCCCTCCCAATTTGTAATTTAGAAGC	60		
Sbjct 34	GTTCCACGGGACCTTTTGTGCGCTGTTTTATGTCCCTCCCAATTTGTAATTTAGAAGC	93		
Query 61	AATTTGCAACACTGATCAGTAGCAGGCATAGCCACAGCATGTCTTGATCAAGCACTT	120		
Sbjct 94	AATTTGCAACACTGATCAGTAGCAGGCATAGCCACAGCATGTCTTGATCAAGCACTT	153		
Query 121	CTGTATCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAAAGCTCGT	180		
Sbjct 154	CTGTATCCCGGACCGAGTATCAATAGACTGTGCACACGGTTGAAGGAGAAAAAGCTCGT	213		
Query 181	TACCCGGCTAACTACTTCGAGAACTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTC	240		
Sbjct 214	TATCCGGCTAACTACTTCGAGAACTAGTAACGCCATTGAAGTTGCAGAGTGTTCGCTC	273		
Query 241	CAGCACTCCCCCGGTAGATCAGGTGCATGAGTACCGCAATCCCAACGGGCAACGTG	300		
Sbjct 274	CCACACTCCCCCGGTAGATCAGGTGCATGAGTACCGCAATCCCAACGGGCAACGTG	333		
Query 301	CGGCTGGCTGCGTTGGCGGCTGCCTATGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACA	360		
Sbjct 334	GCAGTGGCTGCGTTGGCGGCTGCCTATGGGTAACCATAGGACGCTCTAATACGGACA	393		
Query 361	TGGCGTGAAGAGTCTATTAGCTAGTGTAGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	420		
Sbjct 394	TGGTGAAGAGTCTATTAGCTAGTGTAGTAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	453		
Query 421	TAAC TCGGAGCACATGCCTTCAATCCAGAGGTTAGTGTGCTGAATGGGCAACTCTGCA	480		
Sbjct 454	TAAC TCGGAGCACATGCCTTCAATCCAGAGGTTAGTGTGCTGAATGGGCAACTCTGCA	513		
Query 481	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 509			
Sbjct 514	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 542			

Rycina 31 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa A71, po prawej odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1

Te same czynności powtórzyłem dla wykrytego w tej próbce enterowirusa D68 (Ryciny 32-33).

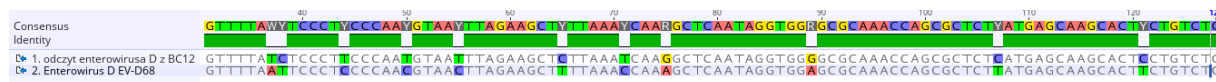


Rycina 32 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa D68 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające najwięcej różnic

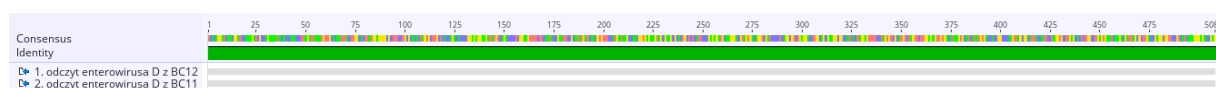
Download GenBank Graphics					Download GenBank Graphics				
Enterovirus D isolate DW-RAT-205 genome assembly, chromosome: 1					Enterovirus D68 isolate CF194006-FRA-2016, complete genome				
Sequence ID: OZ035228.1 Length: 7368 Number of Matches: 1					Sequence ID: MT791930.1 Length: 7333 Number of Matches: 1				
Range 1: 53 to 560 GenBank Graphics					Range 1: 53 to 560 GenBank Graphics				
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
928 bits(502)	0.0	506/508(99%)	0/508(0%)	Plus/Plus	883 bits(478)	0.0	498/508(98%)	0/508(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTAGA	60	Query 1	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTTATCCTCCCTCCCAATGTAATTAGA	60				
Sbjct 53	ACTCTGGTATCTCGGTACTTTGTACGCTGTTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTAGA	112	Sbjct 53	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTTATCCTCCCTCCCAATGTAATTAGA	112				
Query 61	AGCTTTTAAACCAAAGCTCAATAGGTGGAGCGCAAAACAGCGCTCTTATGAGCAAGCACT	120	Query 61	AGCTCTTAAATCAAGGCTCAATAGGTGGGGCGCAAAACAGCGCTCTATGAGCAAGCACT	120				
Sbjct 113	AGCTTTTAAACCAAAGCTCAATAGGTGGAGCGCAAAACAGCGCTCTTATGAGCAAGCACT	172	Sbjct 113	AGCTCTTAAATCAAGGCTCAATAGGTGGGGCGCAAAACAGCGCTCTATGAGCAAGCACT	172				
Query 121	TCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGGTTGAAACAACTTATCCGTTA	180	Query 121	CCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGGTTGAAACAACTTATCCGTTA	180				
Sbjct 173	TCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGGTTGAAACAACTTATCCGTTA	232	Sbjct 173	CCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAAAGCTGTTCACAGGTTGAAACAACTTATCCGTTA	232				
Query 181	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	240	Query 181	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	240				
Sbjct 233	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	292	Sbjct 233	TCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATCACCTTTGGATGTTTGACGCGTTGCGCTCA	292				
Query 241	GCACACTAACCCGTGTAGCTTGGGTGATGAGTCTGGAGTACCCCACTGGCGACAGT	300	Query 241	GCACACTAACCCGTGTAGCTTGGGTGATGAGTCTGGAGTACCCCACTGGCGACAGT	300				
Sbjct 293	GCACACTAACCCGTGTAGCTTGGGTGATGAGTCTGGAGTACCCCACTGGCGACAGT	352	Sbjct 293	GCACACTAACCCGTGTAGCTTGGGTGATGAGTCTGGAGTACCCCACTGGCGACAGT	352				
Query 301	GGTCACAGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGTTGAAACCATGAGACCTAGACATGAACA	360	Query 301	GGTCACAGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGTTGAAACCATGAGACCTAGACATGAACA	360				
Sbjct 353	GGTCACAGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGTTGAAACCATGAGACCTAGACATGAACA	412	Sbjct 353	GGTCACAGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGTTGAAACCATGAGACCTAGACATGAACA	412				
Query 361	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	420	Query 361	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	420				
Sbjct 413	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	472	Sbjct 413	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	472				
Query 421	TAAACATGGAGCAAGTGCTACAAACAGTGAAGTACTTGTGCTAACGCGCAAGTCCGTG	480	Query 421	TAAACATGGAGCAAGTGCTACAGGCCAGTGAAGTACTTGTGCTAACGCGCAAGTCCGTG	480				
Sbjct 473	TAAACATGGAGCAAGTGCTACAAACAGTGAAGTACTTGTGCTAACGCGCAAGTCCGTG	532	Sbjct 473	TAAACATGGAGCAAGTGCTACAGGCCAGTGAAGTACTTGTGCTAACGCGCAAGTCCGTG	532				
Query 481	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 508		Query 481	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 508					
Sbjct 533	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 560		Sbjct 533	CGGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGT 560					

Rycina 33 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa D68, po prawej odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać jedynie ludzkiego adenowirusa 1

W próbce ludzkiego adenowirusa 2 wykryłem natomiast 8% odczytów należących do enterowirusa D68. Również dla tej próbki wykonałem przedstawione wyżej analizy (Ryciny 35-36).



Rycina 34 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa D68 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 2 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające najwięcej różnic



Rycina 35 Porównanie sekwencji nukleotydowych enterowirusów D z próbki mającej zawierać ludzkiego adenowirusa 1 (dolna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 2 (górna sekwencja)

Download	GenBank	Graphics	Download	GenBank	Graphics
Enterovirus D isolate DW-RAT-205 genome assembly, chromosome: 1			Enterovirus D68 isolate CF194006-FRA-2016, complete genome		
Sequence ID: OZ035228.1 Length: 7368 Number of Matches: 1			Sequence ID: MT791930.1 Length: 7333 Number of Matches: 1		
Range 1: 53 to 560 GenBank Graphics Next Match			Range 1: 53 to 560 GenBank Graphics Next Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
928 bits(502)	0.0	506/508(99%)	0/508(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTTAGA	60	Query 1	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTTAGA	60
Sbjct 53	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTTAGA	112	Sbjct 53	ACTCTGGTACTTCGGTACCTTTGTACGCTGTTTAAATCCCTCCCAACGTAACCTTAGA	112
Query 61	AGCTTTTAAACCAAAGCTCAATAGGTGGAGCGCAAAACAGCGCTCTTATGAGCAAGCACT	120	Query 61	AGCTCTTAAATCAAGGCTCAATAGGTGGGCGCAAAACAGCGCTCTCATGAGCAAGCACT	120
Sbjct 113	AGCTTTTAAACCAAAGCTCAATAGGTGGAGCGCAAAACAGCGCTCTTATGAGCAAGCACT	172	Sbjct 113	AGCTCTTAAATCAAGGCTCAATAGGTGGGCGCAAAACAGCGCTCTCATGAGCAAGCACT	172
Query 121	TCGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGTTGAAAACAACTTATCCGTTA	180	Query 121	CCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGTTGAAAACAACTTATCCGTTA	180
Sbjct 173	TCGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGTTGAAAACAACTTATCCGTTA	232	Sbjct 173	CCTGTCTCCCGGTGTGGTTGTATAGACTGTCCCAACGTTGAAAACAACTTATCCGTTA	232
Query 181	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATTGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	240	Query 181	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATTGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	240
Sbjct 233	ACCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATTGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	292	Sbjct 233	TCCGCTATAGTACTTCGAGAAACCTAGTATTGCCCTCGGAGTGTGATGCGTTGCGCTCA	292
Query 241	GCACACTAACCCGTGTGAGCTTGGGTGATGAGCTCGGACGTACCCCACTGGCGACAGT	300	Query 241	GCACACTAACCCGTGTGAGCTTGGGTGATGAGCTCGGACGTACCCCACTGGCGACAGT	300
Sbjct 293	GCACACTAACCCGTGTGAGCTTGGGTGATGAGCTCGGACGTACCCCACTGGCGACAGT	352	Sbjct 293	GCACACTAACCCGTGTGAGCTTGGGTGATGAGCTCGGACGTACCCCACTGGCGACAGT	352
Query 301	GGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGGTGAAGAAACCATGAGACGCTAGACATGAACA	360	Query 301	GGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGGTGAAGAAACCATGAGACGCTAGACATGAACA	360
Sbjct 353	GGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGGTGAAGAAACCATGAGACGCTAGACATGAACA	412	Sbjct 353	GGTCCAGGCTGCGTTGGCGGCTACTCATGGTGAAGAAACCATGAGACGCTAGACATGAACA	412
Query 361	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	420	Query 361	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	420
Sbjct 413	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	472	Sbjct 413	AGGTGTGAAGAGTCTATTGAGCTACTATAGAGTCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC	472
Query 421	TAAACATGGAGCAAGTGCTCACAACCAAGTGAAGTACTTGTCTGAACGCGCAAGTCCGTG	480	Query 421	TAAACATGGAGCAAGTGCTCACAACCAAGTGAAGTACTTGTCTGAATGCGCAAGTCCGTG	480
Sbjct 473	TAAACATGGAGCAAGTGCTCACAACCAAGTGAAGTACTTGTCTGAACGCGCAAGTCCGTG	532	Sbjct 473	TAAACATGGAGCAAGTGCTCACAACCAAGTGAAGTACTTGTCTGAATGCGCAAGTCCGTG	532
Query 481	GCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTG 508		Query 481	GCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTG 508	
Sbjct 533	GCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTG 560		Sbjct 533	GCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCTGTG 560	

Rycina 36 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa D68, po prawej odczytu enterowirusa D uzyskanego z próbki mającej zawierać jedynie ludzkiego adenowirusa 2

Na podstawie uzyskanych wyników mogę stwierdzić, że niespodziewane dodatkowe odczyty wykryte w próbkach ludzkiego adenowirusa 1 oraz 2 nie są identyczne do odczytów uzyskanych z niezależnych próbek zawierających enterowirusa A71 oraz enterowirusa D68.

8.2.6 Symulacja koinfekcji

Aby potwierdzić możliwość wykorzystania opracowanej metody do analizy próbek od pacjentów, którzy mogą przechodzić koinfekcję różnymi gatunkami wirusów oddechowych [146], utworzyłem próbki symulujące koinfekcję kilkoma wirusami w liczbie 1000 kopii genu na próbkę (taka sama dla każdego wirusa) poprzez połączenie wybranych plazmidów kontrolnych

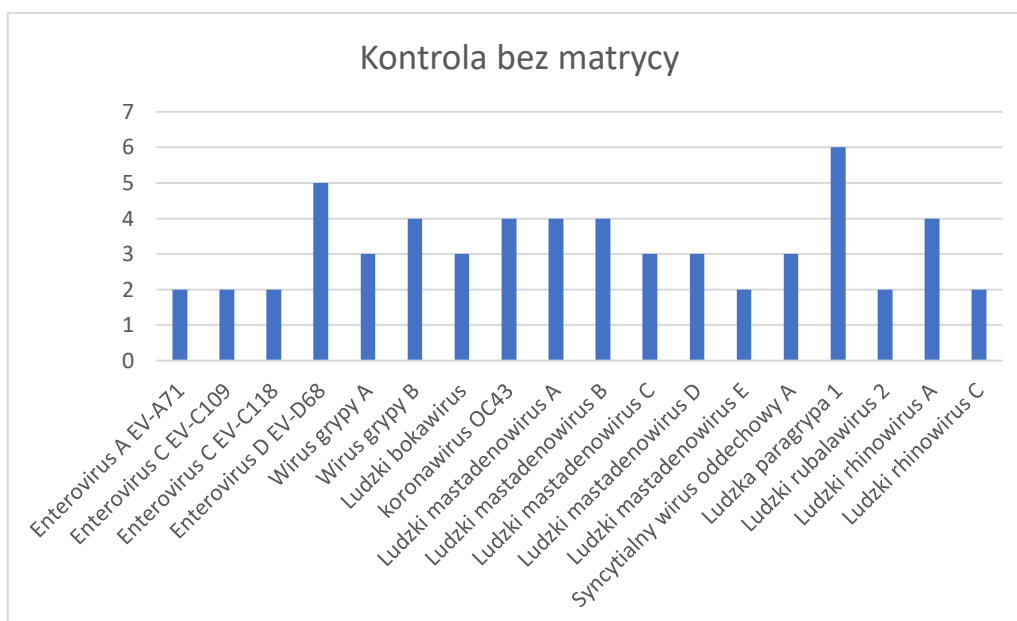
w jedną próbkę (Tabela 23). Mieszaniny oznaczyłem jako koinfekcje 1-8 i poddałem analizie nowo opracowaną metodą.

Tabela 23 Skład poszczególnych próbek symulujących koinfekcję wirusami

Nazwa	Skład
Koinfekcja 1	Ludzki enterowirus A EV-A71 Ludzki enterowirus C CV-A21 Ludzki enterowirus C EV-A104 Ludzki enterowirus C EV-C117 Ludzki enterowirus C EV-C118 Wirus różyczki
Koinfekcja 2	Ludzki enterowirus D EV-68 Ludzki bokawirus Ludzki respirowirus 3 Ludzki bokawirus 1 Ludzki bokawirus 3 Ludzki mastadenowirus F
Koinfekcja 3	Ludzki bokawirus 4NI Ludzki mastadenowirus A Ludzki mastadenowirus B Ludzki mastadenowirus C Ludzki mastadenowirus D Ludzki mastadenowirus E
Koinfekcja 4	Ludzki bokawirus 2 Ludzki metapneumowirus Ludzka paragrypa 4a Ludzka paragrypa 4b Syncytialny wirus oddechowy A Syncytialny wirus oddechowy B
Koinfekcja 5	Ludzka paragrypa 1 Ludzki rubulawirus 2 Wirus świnki

Nazwa	Skład
	Ludzki rinowirus A Ludzki rinowirus B Ludzki rinowirus C wersja 1
Koinfekcja 6	Ludzki enterowirus C EV-C109 Ludzki rinowirus C wersja 2 Ludzki rinowirus C wersja 3 Wirus grypy A Wirus grypy B
Koinfekcja 7	Wirusy z rodzaju orthopox Wirus odry Wirus ospy wietrznej i półpaśca SARS-Cov-2 Ludzki koronawirus HKU1
Koinfekcja 8	Ludzki koronawirus SARS Urbani HKU-39849 Ludzki koronawirus 229E Wirus Bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej Ludzki koronawirus NL63 Ludzki koronawirus OC43

W celu obliczenia progu wartości odczytu pozytywnego wykonałem także sekwencjonowanie próbki zawierającej wszystkie składniki mieszaniny PCR bez matryc. Po jej sekwencjonowaniu uzyskałem 338 odczytów genu kontrolnego, co oznacza przedostanie się do próbek niewielkiej ilości ludzkiego DNA oraz następujące liczby dopasowania do genów wirusowych (Rycina 37).

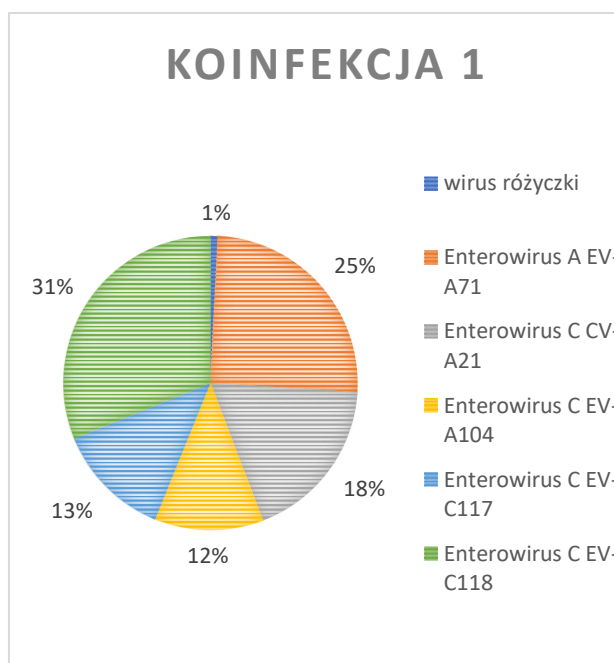


Rycina 37. Wykres przedstawiający ilości odczytów dopasowanych do poszczególnych wirusów w próbce do której nie dodano matrycy. Przedstawione na osi Y liczby określają liczbę błędnie wykrytych sekwencji danego celu molekularnego

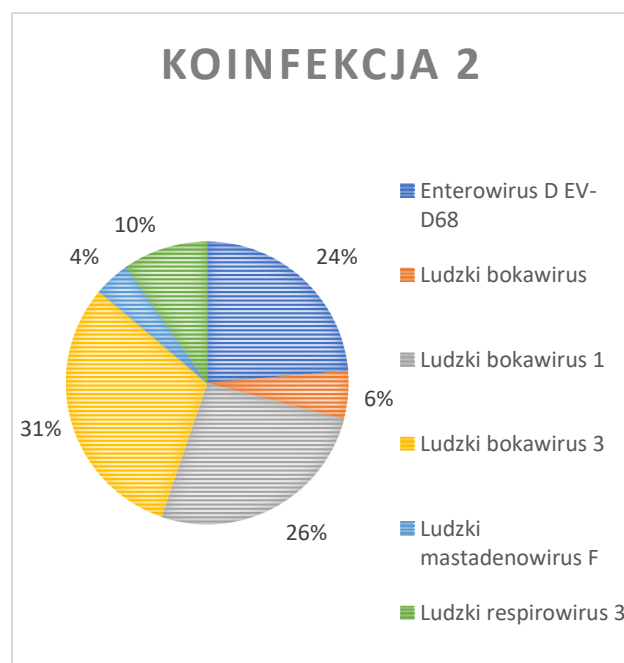
Liczbę tę zaokrągliłem do 10 odczytów na 338 sekwencji i wyznaczyłem próg wartości odczytu pozytywnego dla każdej z próbek, nie zmniejszając go jednak poniżej 10 dopasowań i zaokrąglając do pełnej jednostki (Tabela 24). Umożliwiło to pozbycie się wyników fałszywie pozytywnych. Wyniki w postaci procentowego rozkładu wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych przedstawiają Ryciny 38-45.

Tabela 24 Przedstawienie granicznej ilości odczytów poniżej której wynik był uznawany za negatywny

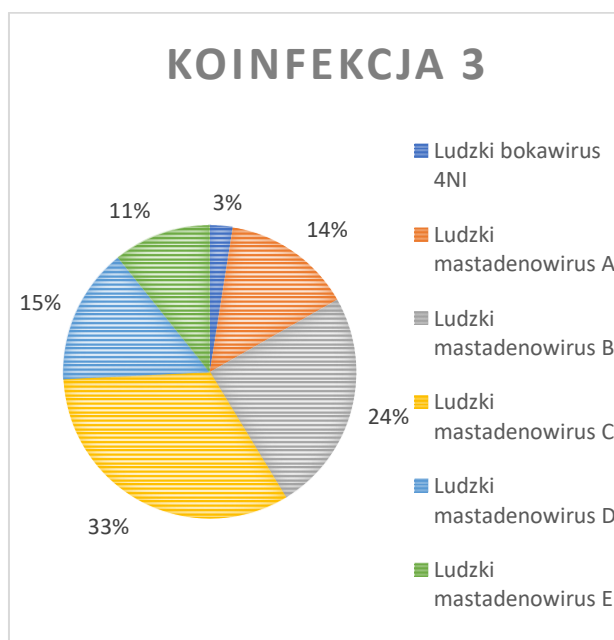
Próbka	Ilość odczytów genu kontrolnego	Graniczna ilość odczytów dla wyniku pozytywnego
Koinfekcja 1	486	15
Koinfekcja 2	179	10
Koinfekcja 3	250	10
Koinfekcja 4	443	14
Koinfekcja 5	395	12
Koinfekcja 6	281	10
Koinfekcja 7	507	15
Koinfekcja 8	524	16



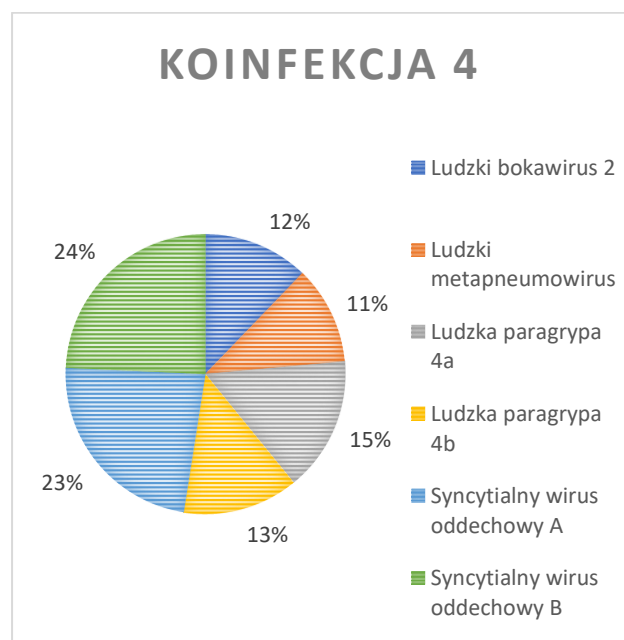
Rycina 38 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 1. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



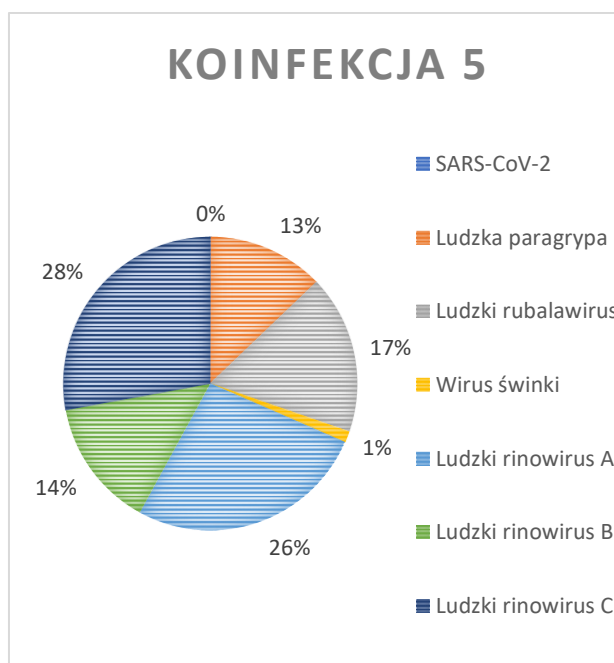
Rycina 39 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 2. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



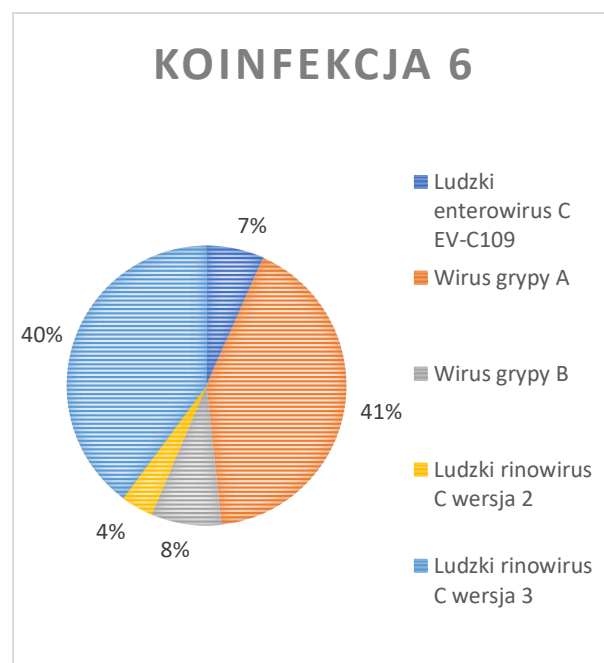
Rycina 40 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 3. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



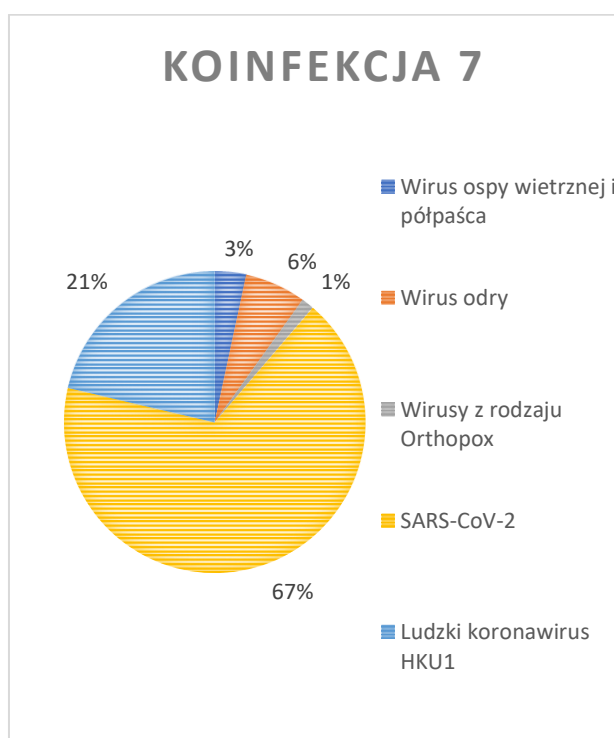
Rycina 41 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 4. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



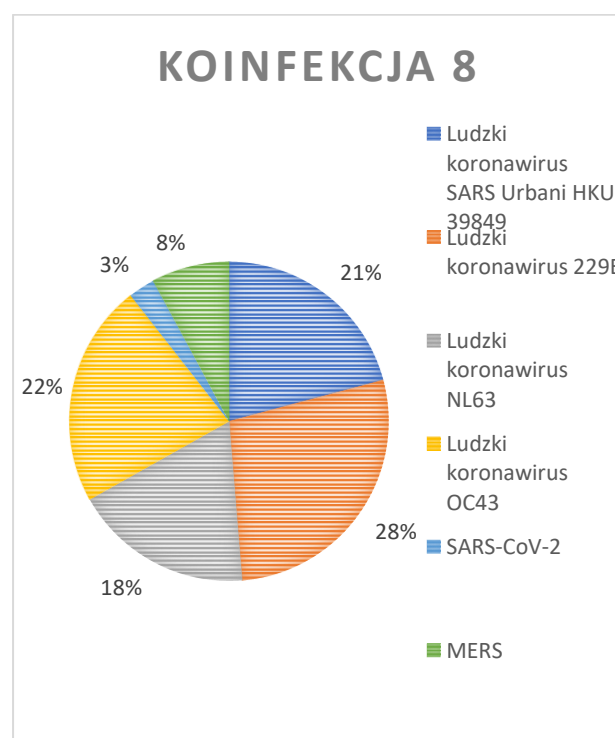
Rycina 42 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 5. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



Rycina 43 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 6. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych

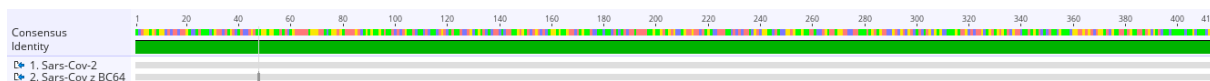


Rycina 44 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 7. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych



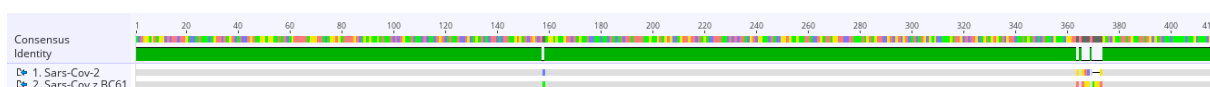
Rycina 45 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 8. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych

We wszystkich próbkach koinfekcji wykryto spodziewane wirusy. W próbkach Koinfekcja 5 i Koinfekcja 8 wykryłem dodatkowo sekwencje SARS-CoV-2, porównałem je więc do sekwencji kontroli pozytywnej (Ryciny 46-47).



Rycina 46 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbki kontrolnej zawierającej koronawirusa SARS-CoV-2 (górna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z próbki Koinfekcja 8, w której nie powinien się on znajdować. Zielony kolor porównania świadczy o identyczności sekwencji nukleotydowej.

W przypadku próbki Koinfekcja 8 sekwencje wykazały 100% identyczności, co świadczy najprawdopodobniej o kontaminacji próbki, na którymś z etapów przeprowadzenia doświadczenia.



Rycina 47 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbki zawierającej koronawirusa SARS-CoV-2 (górna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z Koinfekcji 5, w której nie powinien się znajdować.

W próbce Koinfekcja 5 sekwencja nukleotydowa różniła się nieznacznie od sekwencji kontroli pozytywnej posiadając 97,8% identycznych nukleotydów. Co również wskazuje kontaminację genomem SARS-CoV-2

8.2.7 Przetestowanie próbek od pacjentów za pomocą nowej metody

W ramach współpracy z Uniwersyteckim Centrum Klinicznym otrzymałem zamrożone izolaty DNA/RNA z próbek klinicznych przetestowanych przez UCK na obecność patogenów oddechowych z użyciem testu Respiratory Panel 2.1 z systemu Biofire firmy bioMérieux [147]. Próbki te poddałem analizie z użyciem opracowanej metody (Tabela 25).

Tabela 25 Porównanie wyników uzyskanych przez Uniwersyteckie Centrum Kliniczne z nowo opracowaną metodą. Kolorem zielonym oznaczyłem próbki, w których wyniki były zgodne, kolorem czerwonym zaznaczyłem próbki w których nowa metoda nie wykryła wszystkich spodziewanych wirusów, na żółto zaznaczyłem pola, w których nowa metoda wykryła większą liczbę wirusów niż metoda użyta w UCK

Nr próbki	Patogeny wykryte UCK Biofire Respiratory panel 2.1	Patogeny wykryte z użyciem nowej metody
6955483	Ludzki koronawirus OC43 Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	Ludzki koronawirus OC43 SARS-CoV-2 Ludzki rinowirus A Ludzki rinowirus B

Nr próbki	Patogeny wykryte UCK Biofire Respiratory panel 2.1	Patogeny wykryte z użyciem nowej metody
6943503	Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	Ludzki rinowirus A Ludzki rinowirus B
6942426	Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus Ludzki wirus paragrypy 1	Ludzki wirus paragrypy 1 Ludzki rinowirus C wersja 2
6950139	Adenowirus	Ludzki mastadenowirus B Ludzki mastadenowirus C
6951612	Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus Ludzki respirowirus 3 (paragrypa 3)	Ludzki respirowirus 3 (paragrypa 3) Ludzki rinowirus A
6949254	Ludzki wirus paragrypy 3 Syncytialny wirus oddechowy	Brak pozytywnego wyniku, pojedyncze odczyty dla 29 celów
6843593	Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	Ludzki rinowirus B Ludzki rinowirus C wersja 2
6970742	SARS-CoV-2 Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	SARS-CoV-2 Ludzki rinowirus B
6974836	Ludzki koronawirus OC43 ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	Ludzki koronawirus OC43

Nr próbki	Patogeny wykryte UCK Biofire Respiratory panel 2.1	Patogeny wykryte z użyciem nowej metody
6776886	Ludzki rinowirus LUB ludzki enterowirus	Ludzki rinowirus A
6753762	Ludzki wirus paragrypy 3	Ludzki bokawirus 2 Ludzki respirowirus 3 (paragrypa 3)
6752489	Ludzki metapneumowirus	Ludzki metapneumowirus
6661850	Grypa AH3	Grypa_A Ludzki enterowirus C EV-A104
6539961	Grypa AH3	Grypa_A

W 10 na 15 próbek otrzymałem identyczne wyniki, jak w systemie Biofire. W 3 z próbek wykryłem dodatkowe wirusy, nieobecne w wyniku z metody Biofire. W 2 próbkach nowa metoda nie zdołała potwierdzić wyniku otrzymanego przez Respiratory panel 2.1.

9 Dyskusja

Infekcje górnych dróg oddechowych należą do najbardziej rozpowszechnionych chorób na świecie, dotykając miliony osób. Są powodowane głównie przez wirusy opisane we wstępie niniejszej pracy. Wywołują one zespół objawów, w których najczęściej powtarzającymi się są ból gardła, kaszel, zmęczenie, katar oraz gorączka.

Infekcje te dotyczą wszystkich grup wiekowych, ale dzieci, osoby w podeszłym wieku oraz z upośledzonym układem odpornościowym są bardziej narażone na zachorowania i ciężkie powikłania.

U osób starszych infekcje te częściej mogą powodować powikłania, na przykład infekcje wtórne lub też choroby przewlekłe, takie jak astma.

Wirusowe zakażenia górnych dróg oddechowych powodują znaczne straty ekonomiczne. W Stanach Zjednoczonych szacowany łączny koszt wizyt lekarskich wynikających z tego rodzaju chorób to prawie 8 miliardów dolarów rocznie. Dodatkowym kosztem jest również nieobecność w pracy, którą szacuje się w USA na około 20 milionów dni rocznie [148].

Bardzo poważnym zagadnieniem jest również nadmierne używanie antybiotyków przy zakażeniach wirusowych. Wpływa ono bardzo często negatywnie na czas rekonwalescencji pacjenta i może prowadzić do antybiotykooporności w przypadku pojawienia się wtórnych infekcji bakteryjnych.

Z powodu danych epidemiologicznych oraz opisanych powyżej problemów, opracowanie kompleksowych, szybkich i niedrogich metod diagnostycznych wirusowych zakażeń dróg oddechowych stanowi ważne zagadnienie badawcze.

Obecnie najczęściej stosowaną metodą rozpoznawania zakażeń górnych dróg oddechowych jest diagnoza na podstawie objawów u danego pacjenta wykonywana przez lekarza pierwszego kontaktu po badaniu podmiotowym i przedmiotowym [3]. Niektórzy lekarze decydują się jednak na przeprowadzenie dodatkowych badań w kierunku wykrycia wirusów; wśród nich można wyróżnić testy antygenowe oraz testy PCR. Testy antygenowe są bardzo szeroko rozpowszechnione, tanie i bardzo łatwe w użyciu. Są stosowane do tak zwanego samo testowania w przypadku pojawienia się objawów. Zaletą tych testów jest również uzyskanie wyniku po krótkim czasie, ponieważ często wystarcza 15 minut, aby

uzyskać wynik. Testy PCR są natomiast przeprowadzane w wyspecjalizowanych laboratoriach, gdzie próbki są analizowane przez przeszkolony personel w ściśle kontrolowanych warunkach. Testy PCR są metodą o wyższej precyzji i dokładności, co oznacza, że ich wyniki są bardziej wiarygodne [149].

W krajach wysoce rozwiniętych część ośrodków badawczych oraz placówek ochrony zdrowia stosuje w celach diagnostycznych zamknięte systemy do wykrywania patogenów. Oferują one bardzo często panele umożliwiające wykrywanie wielu mikroorganizmów w jednej próbce. Niestety, aby przeprowadzać tego rodzaju testy, niezbędne są duże środki finansowe. Bardzo wysoką kwotą w porównaniu do innych technik (np. PCR) jest koszt zakupu urządzeń umożliwiających przeprowadzanie tego rodzaju badań. Dodatkowym kosztem są stosowane w takich systemach „chipy”, które zawierają komplet odczynników niezbędnych do przeprowadzenia testu. Są one zwykle dopasowane do konkretnego systemu, niewymienne z innymi urządzeniami i prawie zawsze jednorazowe, co generuje pokaźne sumy przy większej liczbie pacjentów (Tabela 3). Dodatkowym kosztem wynikającym z używania systemów zamkniętych może być również konieczność zakupu specjalistycznych materiałów jednorazowych niezbędnych do funkcjonowania konkretnego systemu. Pomimo ich ciągłego rozwoju, zastosowanie systemów zamkniętych ograniczone jest jedynie do kilku rodzajów testów produkowanych przez dostawcę sprzętu. Na chwilę obecną nie istnieje konkurencja produkująca tańsze zamienniki chipów/kasetek, co uzależnia użytkownika od portfolio danego dostawcy. Do niewątpliwych zalet systemów zamkniętych należą natomiast krótki czas otrzymania wyniku, mniejsze prawdopodobieństwo kontaminacji próbki oraz brak wstępnej obróbki próbek przez pracowników laboratoryjnych przed właściwym procesem analizy.

Inne metody wykrywania drobnoustrojów oddechowych są wypierane przez powyższe techniki ze względu na szybkość otrzymywania wyników, niezbędny nakład pracy oraz cenę odczynników. Są natomiast nadal używane w ośrodkach badawczych lub w celu potwierdzenia wyników niejednoznacznych lub jeśli ważnym celem jest wykrycie obecności konkretnych białek wirusowych [150].

Pomimo niewygórowanej ceny testów PCR badania te zlecane są przez lekarzy pierwszego kontaktu dość rzadko. Dalsze obniżenie kosztów i możliwość szerszego badania niż kilka celów molekularnych mogłoby przyczynić się do większego zainteresowania placówek

ochrony zdrowia wykonywaniem testów na obecność wirusów górnych dróg oddechowych. Przełożyłoby się to na większą świadomość lekarzy o patogenach, w kierunku których należy wykonywać czynności prewencyjne lub lecznicze, a dla naukowców na zbieranie dokładnych danych środowiskowych umożliwiających badania nad przenoszeniem się, obecnością w populacji czy sezonowością poszczególnych patogenów.

Ze względu na brak satysfakcjonującego narzędzia diagnostycznego na rynku opracowałem nową metodę identyfikującą wirusowe infekcje górnych dróg oddechowych z wykorzystaniem sekwencjonowania w czasie rzeczywistym z użyciem sekwenatorów nanoporowych.

Głównym założeniem było opracowanie metody wykrywającej najszerszy zakres patogenów, o protokole skracającym znacznie czas wydania wyniku oraz o przystępnej cenie analizy próbki.

Z oczywistych względów konkutowanie z czasem wykonania testu kasetkowego nie jest możliwe przy użyciu którejkolwiek z technik sekwencjonowania. Natomiast liczba testowanych celów molekularnych klasyfikuje te testy w zupełnie innych niszach rynkowych.

Po analizie dostępnych na rynku paneli oddechowych i publikacji naukowych o tematyce związanej z zakażeniami górnych dróg oddechowych zdecydowałem się na opracowanie metody wykrywającej infekcje wirusami z następujących rodzin: *Adenoviridae*, *Coronaviridae*, *Herpesviridae*, *Matonaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Pneumoviridae* oraz *Poxviridae*. Wszystkie z tych wirusów wykrywa się obecnie w Polsce innymi metodami.

Wybór ten był pokierowany chęcią stworzenia metody z większą liczbą wykrywanych patogenów niż te dostępne na rynku, jak na przykład dostępny komercyjnie test PCR [151].

Następnym etapem planowania był sposób przygotowania próbek do testowania. Zdecydowałem o amplifikacji próbek za pomocą reakcji PCR aby zwiększyć próg detekcji, szczególnie dla koinfekcji w których ilości wirusów nie są równe, oraz aby umożliwić analizę wirusów RNA i DNA w jednej reakcji [152]. Przeprowadzenie reakcji PCR zwiększa szansę

wykrycia patogenów, które są obecne w próbce w bardzo małej ilości. Jest to zatem rodzaj metody sekwencjonowania wzbogacania w cel molekularny (z ang. *Target sequencing*). Zdecydowałem się na wykorzystanie metody z użyciem PCR a nie biotynylowanych sond ze względu na mniejszy stopień skomplikowania przygotowania biblioteki do sekwencjonowania oraz ze względu na niższe koszty.

Decyzja o przeprowadzaniu reakcji PCR była pokierowana również względami ekonomicznymi – sekwencjonowanie produktów PCR jest prostsze, tańsze i szybsze do wykonania niż sekwencjonowanie pełnych genomów obecnych w próbce. Sekwencjonowanie produktów PCR pozwala na ograniczenie czasu z kilkunastu godzin dla genomu na kilkanaście do kilkudziesięciu minut dla jednej próbki. Umożliwia ono również jednoczesną analizę do nawet 96 próbek (a po planowanym wpuszczeniu na rynek przez firmę ONT większego zakresu indeksów nawet 384 próbki).

Startery do reakcji PCR zaprojektowałem tak, aby długość produktów PCR mieściła się w zakresie od 400 do 500 par zasad. Taka wielkość produktu wystarcza do łatwego rozpoznania genu, jest powielana w dość krótkim czasie reakcji PCR oraz może być bardzo szybko sekwencjonowana w czasie rzeczywistym. Dodatkowo są to fragmenty łatwe do odróżnienia od dimerów starterów oraz proste do oddzielenia indeksów używanych do sekwencjonowania oraz adapterów poprzez izolację DNA z wykorzystaniem kulek magnetycznych.

Ostatnim etapem projektowania nowej techniki pozostało wykrycie i analiza fragmentów genów znajdujących się w próbkach. Ze względu na liczbę celów molekularnych odrzuciłem możliwość wykrywania ich z użyciem technik ddPCR oraz qPCR, ponieważ obydwie te metody ogranicza liczba rozpoznawanych przez sensor kolorów. Możliwe byłoby podzielenie próbki na kilka reakcji, w których wykrywane byłyby patogeny, lecz chciałem uniknąć takiej sytuacji ze względu na podniesienie kosztów metody oraz zmniejszenie liczby próbek mogących być wykrywanych jednocześnie. Podjąłem więc decyzję o użyciu sekwencjonowania jako metody wykrycia patogenów.

Na przekroju ostatnich czterech dekad koszty sekwencjonowania zostały znacznie zmniejszone, głównie z powodu rozwoju technologii i powstawania nowych, bardziej wydajnych metod. Zmiana ceny i dostępności sprzętowej umożliwiła przeniesienie

sekwencjonowania z dużych, zaawansowanych ośrodków posiadających pokaźne finansowanie do niemalże wszystkich potrzebujących tego laboratoriów.

Mimo spadku ceny sekwencjonowania, szczególnie sekwencjonowanie następnej generacji całych genomów pozostaje kosztowną metodą. Koszty wynikają nie tylko z samego procesu sekwencjonowania, ale również z konieczności analizy danych oraz potrzeby dużej ilości miejsca do ich przechowywania [153].

W niektórych przypadkach przygotowanie biblioteki NGS jest wielostopniowym procesem, który może być czasochłonny i zabierać nawet kilka dni, co w przypadku diagnostyki jest niedopuszczalne. Proces sekwencjonowania może trwać nawet 2 dni.

Sekwencjonowanie nanoporowe, w odróżnieniu od metod drugiej generacji, generuje znacznie mniejsze koszty; przygotowanie bibliotek jest szybsze i mniej skomplikowane a dane pozyskiwane są w czasie rzeczywistym.

Urządzenia sprzedawane przez firmę ONT, takie jak MinION, są znacznie mniej kosztowne niż tradycyjne platformy NGS. Zakup urządzenia to około 2000 USD, co stanowi ułamek kosztu najmniej zaawansowanego sekwenatora Illumina. Taka przystępność cenowa umożliwia poszerzenie dostępu do zaawansowanych technik sekwencjonowania dla niemal wszystkich placówek badawczych. Przygotowanie biblioteki w metodzie ONT nie jest tak skomplikowane i czasochłonne jak w przypadku innych metod NGS. Część protokołów dopuszcza pominięcie etapu amplifikacji DNA podczas przyłączania indeksów, znacznie skracając czas potrzebny na przygotowanie próbki [154].

Pozyskiwanie danych w czasie rzeczywistym jest jedną z najważniejszych zalet sekwencjonowania nanoporowego ONT. Uzyskiwanie danych w czasie rzeczywistym umożliwia stały nadzór nad ilością i jakością danych oraz wcześniejszą ich analizę. Pozwala również na zatrzymanie procesu sekwencjonowania po uzyskaniu odpowiedniej ilości danych [155].

Pełne genomy wybranych patogenów pobrałem z bazy NCBI, która jest największym ogólnodostępnym zbiorem tego typu danych. Dla każdego z wirusów pobrałem wszystkie dostępne w czasie realizacji tego zadania sekwencje genomowe pochodzące z danych eksperymentalnych, tj. z wirusów wyizolowanych z hodowli *in vitro* lub z próbek

klinicznych. Dodatkowo dokonałem filtrowania, aby pozyskać jedynie pełne genomy wirusów. Następnie przeprowadziłem manualną kurację, usuwając genomy posiadające długie ciągi nieokreślonych nukleotydów oraz te, które mimo opisanie jako pełne genomy, były zbyt krótkie.

Ze względu na segmentową budowę genomu wirusów grypy typu A i B, pobrałem z baz danych pełne sekwencje odpowiednio segmentów PB1 i HA. Dla grypy A był to jasny wybór ze względu na najwyższy stopień konserwowania segmentu PB1 [140,141]. Natomiast grypa B jest znacznie rzadziej występującym patogenem a w ostatnich latach niemal niewykrywanym [156], dlatego w tym przypadku postanowiłem użyć innego niż dla grypy A, bardziej zmiennego fragmentu, który również koduje konserwowane struktury [157].

Analizy oraz przyrównania genomów wykonałem w programie Geneious Prime- najnowszej wersji oprogramowania bioinformatycznego do analizy oraz przechowywania i tworzenia baz sekwencji.

Ze względu na ilość porównywanych sekwencji zdecydowałem o zastosowaniu dopasowania MAFFT, które zapewniało najszybsze i najdokładniejsze działanie na dostępnych dla mnie komputerach, równocześnie wykorzystując w znacznym stopniu ich zasoby obliczeniowe [158,159]. Dla ludzkich rinowirusów typu C nie uzyskałem tą metodą zadowalającej sekwencji konsensusowej ze względu na zbyt duże zróżnicowanie pomiędzy genomami wirusów zebranych w tej grupie. Aby dalej pogrupować posiadane genomy, stworzyłem kladogram umożliwiający odseparowanie od siebie sekwencji najmniej podobnych. Tym sposobem stworzyłem 4 dodatkowe sekwencje konsensusowe rinowirusów C.

Projektowanie starterów wykonałem na otrzymanych z dopasowań sekwencjach konsensusowych w programie Geneious Prime. Tak jak większość programów umożliwiających projektowanie starterów, używa on programu Primer3, który daje bardzo szerokie możliwości ustawień parametrów w celu uzyskania najlepszych wyników. Wszystkie dostępne ustawienia programu Primer 3 znajdują się na stronie udostępnionej przez twórców programu [160]. Dla wszystkich celów molekularnych zaprojektowałem startery w taki sposób, aby powstający produkt spełniał kryteria długości 450-500 par zasad. W 10 parach starterów zaprojektowałem startery zdegenerowane ze względu na

brak możliwości uzyskania starterów niezdegenerowanych, brak odpowiedniego produktu lub niewłaściwe temperatury topnienia. Najwyższy stopień degeneracji wyniósł 24. Zgodność sekwencji starterów, ich temperatury topnienia i struktury drugorzędowe zostały przeanalizowane przy użyciu narzędzia Oligo-Analyzer [144]. Nie wpłynęło to znacząco na uzyskane wyniki, dla większości z tych wyników uzyskałem LOD w wysokości 10 kopii w próbce. Wszystkie z nich w testach tworzyły jednorodny, oczekiwany produkt

Geny do wykonania kontroli pozytywnych uzyskałem poprzez izolację materiału genetycznego wirusów i amplifikację przy pomocy PCR. Plazmidy kontrolne, do których stworzenia wirusy lub ich materiał genetyczny nie był dostępny zamówiłem w formie genów syntetycznych w plazmidach lub syntetycznych genów w formie liniowej. Kontrole zamówione w formie liniowej zostały umieszczone w plazmidach.

Dla jednej z par starterów – rinowirus C wersja 4, nie uzyskałem matrycy do kontroli pozytywnej. Synteza tego fragmentu DNA okazała się zbyt trudna i żadna z firm zajmujących się tworzeniem takich produktów nie dostarczyła próbki. Z dalszych doświadczeń usunąłem więc tę parę starterów (startery nie zawarte również w tabeli z rozdziału Wyniki 8.1.3).

W celu uzyskania optymalnych warunków reakcji PCR, wykonałem wiele powtórzeń eksperymentów ze zmiennymi warunkami reakcji PCR, w tym temperatury przyłączania starterów i czasów wydłużania oraz testy polimeraz. Ze względu na powtarzalność otrzymanych wyników oraz wysoką wierność jej działania, zdecydowałem się na użycie jedynie polimerazy Q5 firmy NEB [161]. W trakcie wykonywania doświadczeń optymalizacyjnych utworzyłem mieszaniny starterów o najbardziej zbliżonych temperaturach przyłączania do matrycy. Na takich mieszaninach przeprowadziłem optymalizacje oraz próbne sekwencjonowania – wyniki nie publikowane w tej pracy. Po wykonaniu kilku prób z powyższymi mieszaninami zdecydowałem o połączeniu wszystkich starterów w jedną mieszaninę, ponieważ niski koszt wykonania badania miał być jednym z głównych założeń opracowywanej metody. Dla takiej mieszaniny starterów wykonałem również optymalizacje temperaturowe oraz inne zmienne ustawienia reakcji PCR omawiane na forach tematycznych [162].

Zaletą dla powyższej pracy byłaby z pewnością próba powtórzenia tych doświadczeń z większą liczbą różnych polimeraz a szczególnie z superszybkimi polimerazami, takimi jak Platinum SuperFi II czy PrimeSTAR Max DNA Polymerase [163,164]. Umożliwiłoby to skrócenie czasu reakcji, co z kolei przyspieszyłoby otrzymanie wyniku.

Dla wszystkich par starterów wykonałem analizę otrzymywanych produktów w celu sprawdzenia poprawności projektowania starterów oraz specyficzności powstającego produktu w kontrolach pozytywnych. Wyniki przedstawiono w rozdziale 8.1.6. Dla plazmidów kontrolnych 1, 3, 5, 12, 16, 18, 20, 22, 26, 29, 31, 34, 38, 40, 44, 46, 48, 52, 54, 56, 59, 61, 62, 64, 66, 68, 70, 73, 76 i 86 uzyskałem tylko jeden produkt reakcji, co sugerowało powstawanie specyficznych produktów. Próbkami 2, 7, 9, 11, 14, 25, 32, 36, 42, 50, 63, 69, 74, 75, 77 posiadały dwa produkty o różnych temperaturach topnienia; może to sugerować niespecyficzną amplifikację lub niejednorodność matrycy. W części kontroli negatywnych również wystąpił produkt; może to świadczyć o kontaminacji, niespecyficznym wiązaniu starterów lub tworzeniu dimerów starterów. Na to ostatnie może wskazywać fakt, że temperatury topnienia w kontrolach negatywnych znacznie różnią się od temperatur topnienia próbek [165,166]. W celu dodatkowego potwierdzenia powstawania odpowiednich produktów amplifikacji rozdzieliłem uzyskane produkty w żelu agarozowym. Dla próbek o niejednoznacznym wyniku widocznym na żelu przeprowadziłem również zautomatyzowaną wysokoczułą elektroforezę. Wyniki tych doświadczeń jednoznacznie pokazują różnice pomiędzy kontrolami negatywnymi a produktami w próbce. W niektórych próbkach można było zaobserwować więcej niż jeden prążek widoczny po rozdziale elektroforetycznym. Oznacza to dodatkowe niespecyficzne produkty lub powielenie większej części plazmidu. Wynik taki nie jest dyskwalifikujący dla użycia tych starterów w metodzie ze względu na użycie sekwencjonowania nanoporowego a następnie technik bioinformatycznych, które umożliwiają odfiltrowanie niespecyficznych produktów reakcji. Produkty widoczne na rycinach przedstawiających wyniki wysokoczułej elektroforezy (Ryc. 26,27) mogą być obarczone niewielkim błędem np. ze względu na wielkość, produkty w próbkach 25, 26, 36, 50, 59 i 63 zostały sklasyfikowane jako fragmenty o długości 350 par zasad.

Następnym etapem mojej pracy było określenie progu detekcji dla wykrywanych przez metodę patogenów. Obliczyłem liczbę kopii genu i wykonałem seryjne rozcieńczenia

plazmidów kontrolnych. Wykonałem każdą z reakcji w 4 rozcieńczeniach i co najmniej 10 powtórzeniach, co dało łącznie 1840 próbek poddanych reakcji PCR a następnie sekwencjonowaniu. Po sekwencjonowaniu dokonałem analizy otrzymanych wyników w programie Geneious Prime. „Manualna” analiza i odczyt wyników okazał się bardzo niewydajnym, niedokładnym i czasochłonnym procesem. Zdecydowałem w tym czasie o potrzebie automatyzacji obróbki i interpretacji wyników sekwencjonowania. Wspólnie z bioinformatykiem dr Aleksandrem Pałkowskim stworzyliśmy potok bioinformatyczny w języku Python, umożliwiający analizę wszystkich odczytów otrzymanych w jednym eksperymencie sekwencjonowania. Używa on pliku referencyjnego, czyli bazy danych przeszukiwanej pod względem dopasowań do uzyskanych z sekwencjonowania odczytów. Plik ten w przypadku moich badań składał się z wybranych fragmentów genów wirusów wykrywanych nową metodą. Potok bioinformatyczny dla każdej z próbek prowadzi montaż odczytów oraz ich korekcję. Na końcu dostarcza on wynik w postaci sekwencji konsensusowych oraz dopasowań do pliku referencyjnego. Informuje również o ilości pasujących odczytów oraz ich długości. Dzięki zastosowaniu opisanego potoku możliwa była szybka analiza otrzymanych wyników. Analiza z użyciem potoku bioinformatycznego zajmowała kilka minut, manualne dopasowywanie wyników natomiast kilkanaście-kilkadziesiąt godzin.

Na podstawie analizy danych otrzymanych po sekwencjonowaniu rozcieńczeń DNA kontrolnych otrzymałem wyniki, które podzieliłem na 3 grupy pod względem progu detekcji – DNA wykrywane w liczbie 100 kopii na reakcję (9 wirusów), 10 kopii na reakcję (27 wirusów) oraz w 1 kopii na reakcję (9 wirusów), co daje końcową wartość kolejno 8, 0,8 oraz 0,08 kopii materiału genetycznego na μ l reakcji. Limity detekcji z zastosowaniem nowej metody dorównywały, a w wielu przypadkach przewyższały LOD reakcji qPCR (2-1000 kopii na reakcję), stanowiącej w obecnie podstawowe narzędzie diagnostyczne [167–169]. Różnice te mogą wynikać z niespecyficznych oddziaływań pomiędzy starterami, jak i ze zróżnicowania nukleotydowego powielanych sekwencji i miejsc przyłączania starterów.

Dzięki współpracy międzynarodowej z Instytutem Pasteura, Uniwersytetem Ljubljany, Centrum Medycznym Erasmus w Holandii, oraz uzyskaniu finansowania na zakup wirusów z projektu organizacji EVAg [170], udało mi się uzyskać dostęp do aktywnych izolatów wirusowych części moich celów molekularnych. RNA tych wirusów izolowałem z użyciem

kolumnienek krzemowych w laboratorium BSL klasy 2+. Obecność wirusowego materiału genetycznego potwierdziłem przy użyciu dokładnie opisanych sond i starterów reakcji qPCR [127–131]. Prowadziłem również konsultacje z częścią autorów powyższych publikacji, którzy z chęcią dokładniej opisali stworzoną przez nich metodę. Dla części z reakcji qPCR uzyskałem dużo bardziej szczegółowe protokoły niż prezentowane w tych publikacjach. Dla 3 z testowanych wirusów nie udało mi się potwierdzić ich obecności w próbce, mogło być to spowodowane błędem technicznym, niewystarczającą ilością wirusowego RNA lub rozpadem sond fluorescencyjnych.

Ze względu na małą ilość lizatu wirusa grypy A, który pochodził ze zbiorów Zakładu ZSR wydziału MWB UG-GUMed wykonałem propagację wirusa w hodowli komórek MDCK. Następnie wykryłem wirusa metodą klasyczną – wykonując test IPMA, pozwolił on również na obliczenie miana wirusa z hodowli. Na podstawie przedstawionych w rozdziale 8.2.3 obliczeń otrzymałem $6,6 \times 10^7$ cząstek wirusa grypy A na ml hodowli. Tak przygotowany lizat posłużył mi później po rozcieńczeniu do przeprowadzania dalszych doświadczeń.

Pomimo niewykrycia materiału genetycznego trzech z testowanych wirusów w metodzie qPCR zdecydowałem się na użycie wszystkich dostępnych izolatów wirusowych do przetestowania działania nowej metody. Wykonałem wszystkie kroki zgodnie z opracowanym protokołem a z analizy danych otrzymanych z potoku bioinformatycznego utworzyłem tabelę umieszczoną w rozdziale 8.2.5. We wszystkie testowane próbki wykryłem obecność konkretnych fragmentów genów z użyciem nowej metody, co wskazuje na przewagę nowej metody nad detekcją metodą qPCR z zastosowanymi sondami. W dwóch próbkach metoda była w stanie wykryć również inne fragmenty materiału wirusowego. Dzięki wykorzystaniu w tej metodzie sekwencjonowania uzyskałem możliwość analizy dodatkowych odczytów z tych próbek. Wykonałem więc wstępną analizę z użyciem programu Geneious Prime a następnie wyszukałem otrzymane sekwencje w bazie danych NCBI z użyciem narzędzia BLAST. Na podstawie uzyskanych z tych czynności danych można wyciągnąć wnioski, że nie są to kontaminacje pochodzące z analizowanych razem próbek, gdyż ich sekwencje posiadają znaczne różnice. Nie są to również zanieczyszczenia wynikające z nieprawidłowej izolacji, ponieważ w kontroli negatywnej nie otrzymałem żadnego dopasowanego fragmentu, dodatkowo takie szczepy wirusów nie były w tym czasie propagowane w laboratorium. Najbardziej prawdopodobną

przyczyną wykrycia dodatkowego wirusowego materiału genetycznego jest ich obecność w hodowlach komórkowych w macierzystym laboratorium lub pierwotna izolacja z materiału pacjenta, który uległ koinfekcji.

Wykonałem również symulację koinfekcji wirusowych, mieszając ze sobą 5-6 kontroli pozytywnych w jedną próbkę. Tak przygotowane próbki poddałem procesowi przygotowania biblioteki i sekwencjonowaniu. Po analizie wyników stwierdziłem wykrycie wszystkich spodziewanych genów wirusów w próbkach koinfekcji. Nierówne ilości genów wykrytych w próbkach mogą być skutkiem degeneracji starterów lub nierównego powinowactwa starterów do matryc. W dwóch z próbek znalazłem również sekwencje koronawirusa SARS-CoV-2. Wysoki stopień dopasowania tych sekwencji do sekwencji kontroli pozytywnej tego wirusa sugeruje rzeczywistą obecność genomu SARS-CoV-2 w tych próbkach, z powodu zanieczyszczenia krzyżowego pomiędzy próbkami bądź zanieczyszczenia któregoś z odczynników kontrolą pozytywną SARS-CoV-2. Należy nadmienić, iż okres przeprowadzania przeze mnie powyższego eksperymentu zbiegł się z dużą liczbą zachorowań na COVID-19, a laboratoria MWB wykonywały intensywnie detekcję RNA tego wirusa, wspomagając laboratoria diagnostyczne.

Ostatnim z doświadczeń potwierdzających działanie nowej metody było przetestowanie nią próbek klinicznych otrzymanych dzięki współpracy z Uniwersyteckim Centrum Klinicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Probki te zostały pobrane w formie wymazów z nosogardzieli od chorych pacjentów przebywających w szpitalu. Wymazy te były testowane przez UCK przy użyciu urządzenia Biofire i testu Respiratory panel 2.1. Jest to w pełni zautomatyzowana metoda wykrywająca 22 patogeny. Probki zostały mi dostarczone w formie wyizolowanego RNA w lodzie. Po przeprowadzeniu procedury nowej metody i potoku bioinformatycznego, wyniki zestawilem z danymi otrzymanymi wraz z próbkami. Tabela porównawcza wyników jest przedstawiona w rozdziale 8.2.7. W dwóch z 15 próbek opracowana metoda nie wykryła spodziewanych i potwierdzonych przez UCK patogenów. W 10 próbkach uzyskałem identyczne wyniki jak szpital, mogąc natomiast rozróżnić zakażenie rinowirusem od zakażenia enterowirusem, typy RSV oraz poszczególne gatunki ludzkiego mastadenowirusa. W 3 próbkach moja metoda wykryła większą liczbę wirusów w próbkach niż Biofire. Różnice pomiędzy nowo opracowaną metodą a zamkniętym systemem stosowanym przez UCK są widoczne na przestrzeni

przeanalizowanych próbek. Część z nich może wynikać z różnic pomiędzy celami molekularnymi obu technik – Respiratory Panel 2.1 nie wykrywa ludzkich bokawirusów, posiada też znacznie wyższy limit detekcji dla ludzkiego enterowirusa C, ~1000 kopii/ml w porównaniu do 80 kopii wykrywanych przez moją metodę. Różnice pomiędzy otrzymanymi wynikami mogą wynikać również z czasu, który minął pomiędzy wykonanymi doświadczeniami. Ze względu na wysokie koszty użycia systemu Biofire tylko mała część pacjentów UCK jest nim badana. Próbkę są następnie przechowywane w zamrażarkach. Próbkę, które otrzymałem, zostały wyizolowane w nieznanym dla mnie czasie, przebadane systemem Biofire, a następnie zamrożone zanim przetransportowałem je do laboratorium na terenie Uniwersytetu Gdańskiego. Idealnym rozwiązaniem tego problemu byłoby powtórzenie powyższego doświadczenia z wymazami otrzymanymi w roztworze lizującym – stabilizującym lub wykonanie badania obydwiema metodami w tym samym czasie. Było to niestety niewykonalne podczas przeprowadzania tych eksperymentów ze względów finansowych (tylko wybrani pacjenci są badani z użyciem systemu Biofire, a sekwencjonowanie każdej z próbek oddzielnie generuje wysokie koszty) oraz obostrzeń spowodowanych pandemią koronawirusa, która ograniczyła dostęp do laboratoriów UCK.

W literaturze naukowej związanej z tematem niniejszej pracy znajdują się publikacje o podobnej tematyce, lecz zawierające znaczne różnice w założeniach metody bądź też wykorzystanej metodyce. Jednym z bardzo dobrze opisanych podejść było wykrywanie patogenów oddechowych poprzez sekwencjonowanie metagenomiczne, które posiada wiele zalet, lecz nie może konkurować z opisywaną przeze mnie metodą pod względem ekonomicznym oraz czasem uzyskania wyniku [171]. Inne metody skupiały się na małej liczbie patogenów i powielaniu większych części ich genomów [172].

Porównując opublikowane dane, napotkałem także badania z 2022 roku w dużym stopniu pokrywające się z moimi. Publikacja ta przedstawia nowoczesną metodę nazwaną RespiCoV opracowaną przez zespół badaczy z Instytutu Roberta Kocha w Niemczech we współpracy z WHO [173]. Opiera się ona na powielaniu ampikonów wirusowych w reakcji multiplex PCR, tak jak w przypadku mojej metody. Różnicą w tych metodach jest część patogenów, liczba starterów dla każdego z nich (moja metoda używa jednej pary starterów na patogen, opisana w publikacji wiele par), zastosowana polimeraza oraz rodzaj przeprowadzanej reakcji PCR. Kolejnymi różnicami pomiędzy tymi metodami jest

przygotowanie biblioteki do sekwencjonowania; w opisywanej przeze mnie metodzie używam szybkiej metody (z ang. *rapid sequencing*), niemiecki zespół natomiast przygotowywał bibliotekę klasyczną metodą. Zaproponowane przeze mnie rozwiązanie jest znacznie szybsze oraz tańsze, przez co metoda ta powinna być bardziej konkurencyjna na rynku. Dodatkowo wieloetapowy proces przygotowania biblioteki metodą klasyczną zwiększa możliwość kontaminacji próbek i wydania nieprawidłowego wyniku.

Bardzo ważną zaletą przedstawianej przeze mnie metody jest możliwość szybkiego jej rozwoju poprzez dodanie do niej kolejnych celów molekularnych. Projektowanie starterów dla pojedynczego celu a następnie analiza reakcji PCR dla jednej próbki jest relatywnie mało pracochłonnym działaniem. W czasie pisania niniejszej pracy WHO nie wyznaczyło nowych wirusów atakujących drogi oddechowe ludzi, które zostałyby uznane za zagrożenie populacyjne [174]. Możliwy jest nadal teoretyczny jak i praktyczny rozwój metody w przypadku pojawienia się nowych wirusów, które warto monitorować. Metoda ta nie musi ograniczać się także jedynie do wirusów. Możliwe jest również używanie jej do wykrywania innych patogenów oraz czynników niepatogennych, takich jak bakterie czy grzyby. Zaprojektowany potok bioinformatyczny może natomiast zostać użyty do przyrównania dowolnych danych uzyskanych z sekwencjonowania nanoporowego do dowolnej autorskiej bazy danych.

10 Wnioski

- ❖ Opracowałem podstawy nowej metody diagnostycznej wirusowych patogenów górnych dróg oddechowych z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji.
- ❖ Zaprojektowałem panel starterów umożliwiających powielenie wybranych, ściśle określonych fragmentów genów najważniejszych patogennych wirusów układu oddechowego ludzi.
- ❖ Stworzyłem działającą metodę wykrywania wyżej wspomnianych patogenów przy użyciu sekwencjonowania nanoporowego wraz z szybką analizą bioinformatyczną przedstawiającą wyniki sekwencjonowania w formie tabeli, co ułatwia obsługę oprogramowania dostarczanego przez ONT i umożliwia przeprowadzanie analizy osobom ze znikomymi umiejętnościami programistycznymi.
- ❖ Dla prezentowanej metody wykonałem testy limitu wykrywanych kopii sekwencji nukleotydowej, które wykazały jej wysoką czułość oraz użyłem jej do wykrycia wszystkich dostępnych dla mnie wirusów zawartych w panelu. Nowa metoda wykryła wszystkie wirusy, dostarczając lepsze wyniki niż qPCR, umożliwiła również wykrycie kontaminacji w hodowli komórkowej.
- ❖ Dokonałem porównania nowej metody z zamkniętym systemem marki Biofire na próbkach od pacjentów, uzyskując zadowalające wyniki.

11 Spis rycin

Rycina 1 Schemat budowy testu immunochromatograficznego znajdującego się wewnątrz plastikowych kasetek	- 28 -
Rycina 2 Schemat zasady działania metody sekwencjonowania Sangera, przedstawia klasyczną metodę wykorzystującą elektroforezę żelową oraz nowszą odmianę tej techniki, w której stosuje się zautomatyzowane odczyty przy użyciu elektroforezy kapilarnej i fluorescencji.	- 36 -
Rycina 3 Schemat przedstawiający kolejne etapy procesu sekwencjonowania metodą Maxama-Gilberta.....	- 37 -
Rycina 4 Schemat działania metody pirosekwencjonowania	- 38 -
Rycina 5 Schemat przedstawiający kolejne etapy sekwencjonowania przez syntezę w sekwenatorze Illumina	- 40 -
Rycina 6 Schemat przedstawiający podstawy działania techniki sekwencjonowania Ion torrent....	- 41 -
Rycina 7 Schemat przedstawiający zasadę działania sekwencjonowania SMRT	- 43 -
Rycina 8 Schemat przedstawiający działanie sekwencjonowania nanoporowego	- 45 -
Rycina 9 Schematyczne przedstawienie protokołu prowadzącego do wybrania najlepszej strategii metody sekwencjonowania. Rycina na podstawie Purushothaman i wsp. [121].....	- 48 -
Rycina 10 Podział rodzajów sekwencjonowania na generacje	- 50 -
Rycina 11 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pJet 1.2 ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrole pozytywne	- 63 -
Rycina 12 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pUC-GW ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrole pozytywne	- 66 -
Rycina 13 Poglądowy schemat przedstawiający budowę plazmidów pMX ze wstawkami genów wirusowych użytymi jako kontrole pozytywne	- 78 -
Rycina 14 Schemat przedstawiający kolejność działań w nowo opracowywanej metodzie wykrywania wirusowych zakażeń górnych dróg oddechowych	102
Rycina 15 Kladogram umożliwiający podział ludzkich rinowirusów C na grupy (klady) w celu identyfikacji sekwencji konsensusowych	105
Rycina 16 Rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym produktów PCR na podstawie próbek 25, 29, 31, 59, 64 oraz 86 (numeracja z Tabeli 16). W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne reakcji PCR niezawierające matrycy	109

Rycina 17 Rozdział elektroforetyczny produktów ligacji po trawieniu enzymatycznym (dla próbek 25, 29, 31, 59, 64 oraz 86). W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literami nt zawierają odpowiednie kontrole-próbkki nietrawione.....	110
Rycina 18 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 1,2,3,5,7 oraz 9. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy.....	112
Rycina 19 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 11, 12, 14, 16, 18 oraz 20. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	112
Rycina 20 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 22, 25, 26, 29, 31 oraz 32. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	113
Rycina 21 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 34, 36, 38, 40, 42 oraz 44. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	113
Rycina 22 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 46, 48, 50, 52, 54 oraz 56. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	113
Rycina 23 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 59, 61, 62, 63, 64 oraz 66. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	114
Rycina 24 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 68, 69, 70, 73, 74 oraz 75. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkki oznaczone numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy	114

Rycina 25 Rozdział elektroforetyczny produktów PCR z próbek 76, 77 oraz 86. W studzience opisanej jako M znajduje się marker molekularny - GeneRuler. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy.....	114
Rycina 26 Wizualizacja wyników wysokoczułej zautomatyzowanej elektroforezy próbek 25, 26, 36, 50, 59 oraz 63. Jako markera- M użyto dołączonego do zestawu D1000 Ladder. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy. System automatycznie oznacza kropkami widoczne prążki DNA ..	115
Rycina 27 Wizualizacja wyników wysokoczułej zautomatyzowanej elektroforezy próbek 69, 74, 77, oraz 54. Jako markera- M użyto dołączonego do zestawu D1000 Ladder. Próbkę oznaczoną numerem oraz literą K- zawierają odpowiednie kontrole negatywne- reakcje zawierające startery, lecz niezawierające matrycy. System automatycznie oznacza kropkami widoczne prążki DNA ..	116
Rycina 28 Limity wykrycia poszczególnych wirusów w opracowanej metodzie. Liczby określają liczbę kopii obecnych w całej reakcji.....	118
Rycina 29 Skan płytki sześciodołkowej po wykonaniu testu IPMA. czerwono-różowe pola oznaczają tysiące wirusów wytworzonych przez wirusa grypy A wyznakowane przy użyciu specyficznych przeciwciał	122
Rycina 30 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa A71 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające największą różnic	128
Rycina 31 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa A71, po prawej odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1.....	129
Rycina 32 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa D68 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 1 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające największą różnic	129
Rycina 33 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa D68, po prawej odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać jedynie ludzkiego adenowirusa 1.....	129

Rycina 34 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbek enterowirusa D68 (dolna sekwencja) z hodowli oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 2 (górna sekwencja). Pokazane zostało miejsce sekwencji zawierające najwięcej różnic	130
Rycina 35 Porównanie sekwencji nukleotydowych enterowirusów D z próbki mającej zawierać ludzkiego adenowirusa 1 (dolna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z próbki mającej zawierać wyłącznie ludzkiego adenowirusa 2 (górna sekwencja)	130
Rycina 36 Przedstawienie najlepszych dopasowań uzyskanych z analizy sekwencji nukleotydowych w aplikacji BLAST na podstawie danych NCBI. Po lewej stronie dopasowanie dla sekwencji próbki enterowirusa D68, po prawej odczytu enterowirusa D uzyskanego z próbki mającej zawierać jedynie ludzkiego adenowirusa 2.....	130
Rycina 37. Wykres przedstawiający ilości odczytów dopasowanych do poszczególnych wirusów w próbce do której nie dodano matrycy. Przedstawione na osi Y liczby określają liczbę błędnie wykrytych sekwencji danego celu molekularnego	133
Rycina 38 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 1. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	134
Rycina 39 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 2. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	134
Rycina 40 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 3. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	134
Rycina 41 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 4. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	134
Rycina 42 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 5. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	135
Rycina 43 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 6. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	135
Rycina 44 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 7. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	135
Rycina 45 Wynik sekwencjonowania próbki koinfekcja 8. Sektory przedstawiają procentowy rozkład wszystkich odczytów dopasowanych do wykrywanych sekwencji wirusowych	135
Rycina 46 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbki kontrolnej zawierającej koronawirusa SARS-CoV-2 (górna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z próbki Koinfekcja 8, w której nie	

powinien się on znajdować. Zielony kolor porównania świadczy o identyczności sekwencji nukleotydowej.....	136
Rycina 47 Porównanie sekwencji nukleotydowych próbki zawierającej koronawirusa SARS-CoV-2 (górna sekwencja) oraz odczytu uzyskanego z Koinfekcji 5, w której nie powinien się znajdować.	136

12 Spis tabel

Tabela 1 Szacunkowy podział częstości zakażeń górnych dróg oddechowych przez wirusy. Na podstawie- Heikkinen, The comon cold[3]	14
Tabela 2 Objawy wywoływane przez infekcje wirusami należącymi do poszczególnych rodzin	24
Tabela 3 Porównanie głównych cech wybranych technik diagnostycznych. *Cena wykonania testów oszacowana na podstawie analizy dostępnych komercyjnie testów w czasie tworzenia niniejszej pracy	33
Tabela 4 Podsumowanie dostępnych metod sekwencjonowania	50
Tabela 5 Warunki przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji z użyciem transkryptazy Lunascript	86
Tabela 6 Skład reakcji PCR z użyciem polimerazy Q5	87
Tabela 7 Warunki zachodzenia reakcji PCR wraz z zastosowanymi czasami i temperaturami	87
Tabela 8 Skład reakcji multipleks PCR z użyciem polimerazy Q5.....	90
Tabela 9 Warunki reakcji multipleks PCR	90
Tabela 10 Stężenia poszczególnych starterów oraz sond użytych podczas reakcji Real-time PCR. Wartości zaczepnięte z publikacji opisujących dane startery.....	91
Tabela 11 Skład reakcji PCR w czasie rzeczywistym	92
Tabela 12 Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	92
Tabela 13 Skład mieszaniny do reakcji qPCR	93
Tabela 14 Dopasowanie poszczególnych plazmidów kontrolnych do starterów w reakcjach qPCR	94
Tabela 15 Warunki reakcji qPCR z analizą krzywej topnienia	95
Tabela 16 Przykładowy wynik automatycznej analizy sekwencjonowania	100
Tabela 17 Podsumowanie uzyskania sekwencji konsensusowych dla poszczególnych wirusów z uwzględnieniem liczby analizowanych genomów	103

Tabela 18 Opracowane sekwencje nukleotydowe starterów dla poszczególnych wirusów wraz ze stopniem ich degeneracji. FOR-starter przyłączający się do końca 5', REV- starter przyłączający się końca 3	106
Tabela 19 Temperatury topnienia produktów reakcji qPCR dla poszczególnych kontroli pozytywnych.	111
Tabela 20 Tabela zawierająca wszystkie cele molekularne opracowanej metody wraz z limitem kopii wykrywanego genu	119
Tabela 21 Podsumowanie wykrycia wirusów izolowanych z hodowli komórkowych metodą RT-qPCR	121
Tabela 22 Wyniki detekcji materiału genetycznego analizowanych wirusów w supernatancie z hodowli komórkowych nową metodą. Procenty przedstawiają ilość odczytów przypasowanych do celu molekularnego (referencji) spośród wszystkich odczytów uzyskanych w sekwencjonowania dla danej próbki	127
Tabela 23 Skład poszczególnych próbek symulujących koinfekcję wirusami	131
Tabela 24 Przedstawienie granicznej ilości odczytów poniżej której wynik był uznawany za negatywny	133
Tabela 25 Porównanie wyników uzyskanych przez Uniwersyteckie Centrum Kliniczne z nowo opracowaną metodą. Kolorem zielonym oznaczyłem próbki, w których wyniki były zgodne, kolorem czerwonym zaznaczyłem próbki w których nowa metoda nie wykryła wszystkich spodziewanych wirusów, na żółto zaznaczyłem pola, w których nowa metoda wykryła większą liczbę wirusów niż metoda użyta w UCK	136

13 Bibliografia

1. van Doorn, H.R.; Yu, H. 33 - Viral Respiratory Infections. In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)*; Ryan, E.T., Hill, D.R., Solomon, T., Aronson, N.E., Endy, T.P., Eds.; Elsevier: London, 2020; pp. 284–288 ISBN 978-0-323-55512-8.
2. The Top 10 Causes of Death Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (accessed on 20 June 2024).
3. Heikkinen, T.; Järvinen, A. The Common Cold. *Lancet* **2003**, *361*, 51–59, doi:10.1016/S0140-6736(03)12162-9.
4. Zhao, M.; Guo, Y.; Qiu, F.; Wang, L.; Yang, S.; Feng, Z.; Li, G. Molecular and Clinical Characterization of *Human Adenovirus* Associated with Acute Respiratory Tract Infection in Hospitalized Children. *Journal of Clinical Virology* **2020**, *123*, 104254, doi:10.1016/j.jcv.2019.104254.
5. Lynch, J.P.; Fishbein, M.; Echavarria, M. Adenovirus. *Semin Respir Crit Care Med* **2011**, *32*, 494–511, doi:10.1055/s-0031-1283287.
6. Benkő, M.; Aoki, K.; Arnberg, N.; Davison, A.J.; Echavarría, M.; Hess, M.; Jones, M.S.; Kaján, G.L.; Kajon, A.E.; Mittal, S.K.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Adenoviridae* 2022. *Journal of General Virology* **2022**, *103*, 001721, doi:10.1099/jgv.0.001721.
7. CDC About Adenovirus Available online: <https://www.cdc.gov/adenovirus/about/index.html> (accessed on 27 July 2024).
8. V'kovski, P.; Kratzel, A.; Steiner, S.; Stalder, H.; Thiel, V. Coronavirus Biology and Replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* **2021**, *19*, 155–170, doi:10.1038/s41579-020-00468-6.
9. Leao, J.C.; Gusmao, T.P. de L.; Zarzar, A.M.; Leao Filho, J.C.; Barkokebas Santos de Faria, A.; Morais Silva, I.H.; Gueiros, L.A.M.; Robinson, N.A.; Porter, S.; Carvalho, A. de A.T. Coronaviridae—Old Friends, New Enemy! *Oral Diseases* **2022**, *28*, 858–866, doi:10.1111/odi.13447.

10. Zhou, Z.; Qiu, Y.; Ge, X. The Taxonomy, Host Range and Pathogenicity of Coronaviruses and Other Viruses in the *Nidovirales* Order. *Animal Diseases* **2021**, *1*, 5, doi:10.1186/s44149-021-00005-9.
11. CDC Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Available online: <https://www.cdc.gov/covid/index.html> (accessed on 27 July 2024).
12. Zhu, S.; Viejo-Borbolla, A. Pathogenesis and Virulence of Herpes Simplex Virus. *Virulence* *12*, 2670–2702, doi:10.1080/21505594.2021.1982373.
13. Whitley, R.J. Herpesviruses. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Ed.; University of Texas Medical Branch at Galveston: Galveston (TX), 1996 ISBN 978-0-9631172-1-2.
14. Gatherer, D.; Depledge, D.P.; Hartley, C.A.; Szpara, M.L.; Vaz, P.K.; Benkő, M.; Brandt, C.R.; Bryant, N.A.; Dastjerdi, A.; Doszpoly, A.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Herpesviridae 2021. *Journal of General Virology* **2021**, *102*, 001673, doi:10.1099/jgv.0.001673.
15. CDC About Epstein-Barr Virus (EBV) Available online: <https://www.cdc.gov/epstein-barr/about/index.html> (accessed on 28 July 2024).
16. CDC About Chickenpox Available online: <https://www.cdc.gov/chickenpox/about/index.html> (accessed on 28 July 2024).
17. Herpes Simplex Virus Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus> (accessed on 28 July 2024).
18. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Matonaviridae* 2022 | Microbiology Society Available online: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001817> (accessed on 25 March 2024).
19. Das, P.K.; Kielian, M. Molecular and Structural Insights into the Life Cycle of Rubella Virus. *Journal of Virology* **2021**, *95*, doi:10.1128/JVI.02349-20.
20. Winter, A.K.; Moss, W.J. Rubella. *The Lancet* **2022**, *399*, 1336–1346, doi:10.1016/S0140-6736(21)02691-X.

21. Orthomyxoviridae | ICTV Available online: https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae (accessed on 25 March 2024).
22. Samji, T. Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle. *Yale J Biol Med* **2009**, *82*, 153–159.
23. Webster, R.G.; Govorkova, E.A. Continuing Challenges in Influenza. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2014**, *1323*, 115–139, doi:10.1111/nyas.12462.
24. Rima, B.; Balkema-Buschmann, A.; Dundon, W.G.; Duprex, P.; Easton, A.; Fouchier, R.; Kurath, G.; Lamb, R.; Lee, B.; Rota, P.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Paramyxoviridae. *Journal of General Virology* **2019**, *100*, 1593–1594, doi:10.1099/jgv.0.001328.
25. Aguilar, H.C.; Lee, B. Emerging Paramyxoviruses: Molecular Mechanisms and Antiviral Strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **2011**, *13*, e6, doi:10.1017/S1462399410001754.
26. Mourez, T.; Dina, J. Mumps Virus: A Comprehensive Review: Virologie. *Virologie* **2018**, *22*, E14-28, doi:10.1684/vir.2018.0745.
27. Moss, W.J.; Griffin, D.E. Paramyxoviruses: Measles. In *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*; Kaslow, R.A., Stanberry, L.R., Le Duc, J.W., Eds.; Springer US: Boston, MA, 2014; pp. 537–552 ISBN 978-1-4899-7448-8.
28. Collins, P.L.; Fearn, R.; Graham, B.S. Respiratory Syncytial Virus: Virology, Reverse Genetics, and Pathogenesis of Disease. In *Challenges and Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccines*; Anderson, L.J., Graham, B.S., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2013; pp. 3–38 ISBN 978-3-642-38919-1.
29. CDC Measles (Rubeola) Available online: <https://www.cdc.gov/measles/index.html> (accessed on 28 July 2024).
30. CDC How RSV Spreads Available online: <https://www.cdc.gov/rsv/causes/index.html> (accessed on 28 July 2024).
31. Goździcka-Józefiak, A. *Wirusologia*; wyd. II.; Wydawnictwo Naukowe PWN, 2022; ISBN 978-83-01-22238-3.

32. Cotmore, S.F.; Agbandje-McKenna, M.; Canuti, M.; Chiorini, J.A.; Eis-Hubinger, A.-M.; Hughes, J.; Mietzsch, M.; Modha, S.; Ogliastro, M.; Pénzes, J.J.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Parvoviridae. *Journal of General Virology* **2019**, *100*, 367–368, doi:10.1099/jgv.0.001212.
33. Edyta Abramczuk; Marcin Gordon; Karina Jahnz-Różyk; Katarzyna Pancer Ludzkie wirusy Boca – nowe parwowirusy wywołujące zakażenia u ludzi. *Evereth Publishing*. FORUM ZAKAŻEŃ 2015;6(1):43–47 DOI : dx.doi.org/10.15374/FZ2014066
34. Zell, R.; Delwart, E.; Gorbalenya, A.E.; Hovi, T.; King, A.M.Q.; Knowles, N.J.; Lindberg, A.M.; Pallansch, M.A.; Palmenberg, A.C.; Reuter, G.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *Journal of General Virology* **2017**, *98*, 2421–2422, doi:10.1099/jgv.0.000911.
35. Rhinoviruses: Common Colds | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/ncird/rhinoviruses-common-cold.html> (accessed on 3 April 2024).
36. Jacobs, S.E.; Lamson, D.M.; St. George, K.; Walsh, T.J. Human Rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews* **2013**, *26*, 135–162, doi:10.1128/cmr.00077-12.
37. Rima, B.; Collins, P.; Easton, A.; Fouchier, R.; Kurath, G.; Lamb, R.A.; Lee, B.; Maisner, A.; Rota, P.; Wang, L.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae. *Journal of General Virology* **2017**, *98*, 2912–2913, doi:10.1099/jgv.0.000959.
38. Bawage, S.S.; Tiwari, P.M.; Pillai, S.; Dennis, V.; Singh, S.R. Recent Advances in Diagnosis, Prevention, and Treatment of Human Respiratory Syncytial Virus. *Adv Virol* **2013**, *2013*, 595768, doi:10.1155/2013/595768.
39. Borchers, A.T.; Chang, C.; Gershwin, M.E.; Gershwin, L.J. Respiratory Syncytial Virus—A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* **2013**, *45*, 331–379, doi:10.1007/s12016-013-8368-9.
40. Shafagati, N.; Williams, J. Human Metapneumovirus - What We Know Now. *F1000Res* **2018**, *7*, 135, doi:10.12688/f1000research.12625.1.
41. Kopera, E.; Czajka, H.; Zapolnik, P.; Mazur, A. New Insights on Respiratory Syncytial Virus Prevention. *Vaccines* **2023**, *11*, 1797, doi:10.3390/vaccines11121797.

42. Augustynowicz, E. Co wiemy o dwóch nowych szczepionkach przeciw RSV? Available online: <https://szczepienia.pzh.gov.pl/co-wiemy-o-dwoch-nowych-szczepionkach-przeciw-rsv/> (accessed on 4 April 2024).
43. Mpox (Monkeypox) Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox> (accessed on 4 April 2024).
44. Chapter 7 - Poxviridae. In *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*; MacLachlan, N.J., Dubovi, E.J., Eds.; Academic Press: Boston, 2017; pp. 157–174 ISBN 978-0-12-800946-8.
45. McInnes, C.J.; Damon, I.K.; Smith, G.L.; McFadden, G.; Isaacs, S.N.; Roper, R.L.; Evans, D.H.; Damaso, C.R.; Carulei, O.; Wise, L.M.; et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023: This Article Is Part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles Collection. *Journal of General Virology* **2023**, *104*, doi:10.1099/jgv.0.001849.
46. Srinivasan Rajsri, K.; Rao, M. Poxvirus-Driven Human Diseases and Emerging Therapeutics. *Therapeutic Advances in Infection* **2022**, *9*, 20499361221136751, doi:10.1177/20499361221136751.
47. Heid, C.A.; Stevens, J.; Livak, K.J.; Williams, P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Res.* **1996**, *6*, 986–994, doi:10.1101/gr.6.10.986.
48. Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *Nat Biotechnol* **1992**, *10*, 413–417, doi:10.1038/nbt0492-413.
49. Yang, S.; Rothman, R.E. PCR-Based Diagnostics for Infectious Diseases: Uses, Limitations, and Future Applications in Acute-Care Settings. *The Lancet Infectious Diseases* **2004**, *4*, 337–348, doi:10.1016/S1473-3099(04)01044-8.
50. Avoiding False Positives with PCR | IDT Available online: <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/how-to-avoid-false-positives-in-pcr-and-what-to-do-if-you-get-them> (accessed on 8 April 2024).

51. Real-Time PCR (qPCR) Machines | Biocompare Available online: <https://www.biocompare.com/PCR-Real-Time-PCR/22353-Real-Time-PCR-Thermal-Cyclers-Thermocyclers/> (accessed on 8 April 2024).
52. van Amerongen, A.; Veen, J.; Arends, H.A.; Koets, M. Chapter 7 - Lateral Flow Immunoassays. In *Handbook of Immunoassay Technologies*; Vashist, S.K., Luong, J.H.T., Eds.; Academic Press, 2018; pp. 157–182 ISBN 978-0-12-811762-0.
53. Ching, K.H. Lateral Flow Immunoassay. In *ELISA: Methods and Protocols*; Hnasko, R., Ed.; Methods in Molecular Biology; Springer: New York, NY, 2015; pp. 127–137 ISBN 978-1-4939-2742-5.
54. Ferrani, S.; Prazuck, T.; Béchet, S.; Lesne, F.; Cohen, R.; Levy, C. Diagnostic Accuracy of a Rapid Antigen Triple Test (SARS-CoV-2, Respiratory Syncytial Virus, and Influenza) Using Anterior Nasal Swabs versus Multiplex RT-PCR in Children in an Emergency Department. *Infectious Diseases Now* **2023**, *53*, 104769, doi:10.1016/j.idnow.2023.104769.
55. Singhroy, D.N.; MacLean, E.; Kohli, M.; Lessem, E.; Branigan, D.; England, K.; Suleiman, K.; Drain, P.K.; Ruhwald, M.; Schumacher, S.; et al. Adoption and Uptake of the Lateral Flow Urine LAM Test in Countries with High Tuberculosis and HIV/AIDS Burden: Current Landscape and Barriers. *Gates Open Res* **2020**, *4*, 24, doi:10.12688/gatesopenres.13112.2.
56. Di Nardo, F.; Chiarello, M.; Cavallera, S.; Baggiani, C.; Anfossi, L. Ten Years of Lateral Flow Immunoassay Technique Applications: Trends, Challenges and Future Perspectives. *Sensors* **2021**, *21*, 5185, doi:10.3390/s21155185.
57. Rodzina Systemów GeneXpert Available online: <https://www.cepheid.com/pl-PL/systems/genexpert-family-of-systems/genexpert-system.html> (accessed on 12 March 2024).
58. The BioFire® FilmArray® System Available online: <https://www.biofire.com/products/filmarray/> (accessed on 12 March 2024).

59. Cobas® Modular Analyzer Systems Available online: <https://diagnostics.roche.com/global/en/article-listing/cobas-modular-analyzer-systems.html> (accessed on 1 August 2024).
60. ePlex® System Available online: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/eplex-system-sys-356.html> (accessed on 12 March 2024).
61. ID NOW Available online: <https://www.globalpointofcare.abbott/us/en/product-details/id-now.html> (accessed on 12 March 2024).
62. Sofia® Platform Available online: <https://www.quidelortho.com/global/en/products/sofia-platform> (accessed on 27 June 2024).
63. Yolken, R.H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Practical Tool for Rapid Diagnosis of Viruses and Other Infectious Agents. *Yale J Biol Med* **1980**, *53*, 85–92.
64. Tiwari, A.K.; Upadhyay, A.P.; Arora, D.; Wadhwa, T.; Aggarwal, G.; Pabbi, S.; Luthra, A.S.; Rawat, S.S. Head-to-Head Comparison of Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Enhanced Chemiluminescence Immunoassay (ECLIA) for the Detection of Transfusion Transmitted Disease (TTD) Markers; HIV, HCV and HBV in Blood Donors, in India. *Journal of Virological Methods* **2020**, *285*, 113962, doi:10.1016/j.jviromet.2020.113962.
65. Koch, P.; Schächli, G.F.; Poms, R.E.; Wüthrich, B.; Anklam, E.; Battaglia, R. Comparison of Commercially Available ELISA Kits with Human Sera-Based Detection Methods for Peanut Allergens in Foods. *Food Additives & Contaminants* **2003**, *20*, 797–803, doi:10.1080/02652030310001594469.
66. Aydin, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, *72*, 4–15, doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012.
67. Zaki, S.R.; Shieh, W.-J.; Greer, P.W.; Goldsmith, C.S.; Ferebee, T.; Katshitshi, J.; Tshioko, F.K.; Bwaka, M.A.; Swanepoel, R.; Calain, P.; et al. A Novel Immunohistochemical Assay for the Detection of Ebola Virus in Skin: Implications for Diagnosis, Spread, and

Surveillance of Ebola Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases* **1999**, *179*, S36–S47, doi:10.1086/514319.

68. Jessie, K.; Fong, M.Y.; Devi, S.; Lam, S.K.; Wong, K.T. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *The Journal of Infectious Diseases* **2004**, *189*, 1411–1418, doi:10.1086/383043.

69. Eyzaguirre, E.; Haque, A.K. Application of Immunohistochemistry to Infections. *Arch Pathol Lab Med* **2008**, *132*, 424–431, doi:10.5858/2008-132-424-AOITI.

70. Dagleish, M.P.; Benavides, J.; Chianini, F. Immunohistochemical Diagnosis of Infectious Diseases of Sheep. *Small Ruminant Research* **2010**, *92*, 19–35, doi:10.1016/j.smallrumres.2010.04.003.

71. Storch, G.A. Diagnostic Virology. *Clinical Infectious Diseases* **2000**, *31*, 739–751, doi:10.1086/314015.

72. Leland, D.S.; Ginocchio, C.C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin Microbiol Rev* **2007**, *20*, 49–78, doi:10.1128/CMR.00002-06.

73. Mokili, J.L.; Rohwer, F.; Dutilh, B.E. Metagenomics and Future Perspectives in Virus Discovery. *Current Opinion in Virology* **2012**, *2*, 63–77, doi:10.1016/j.coviro.2011.12.004.

74. Hodinka, R.L.; Kaiser, L.; Hodinka, R.L.; Kaiser, L. Point-Counterpoint: Is the Era of Viral Culture Over in the Clinical Microbiology Laboratory? *Journal of Clinical Microbiology* **2020**, *51*, 2–8, doi:10.1128/jcm.02593-12.

75. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5463–5467.

76. Shendure, J.A.; Porreca, G.J.; Church, G.M.; Gardner, A.F.; Hendrickson, C.L.; Kieleczawa, J.; Slatko, B.E. Overview of DNA Sequencing Strategies. *Current Protocols in Molecular Biology* **2011**, *96*, 7.1.1–7.1.23, doi:10.1002/0471142727.mb0701s96.

77. Shendure, J.; Ji, H. Next-Generation DNA Sequencing. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1135–1145, doi:10.1038/nbt1486.

78. Prober, J.M.; Trainor, G.L.; Dam, R.J.; Hobbs, F.W.; Robertson, C.W.; Zagursky, R.J.; Cocuzza, A.J.; Jensen, M.A.; Baumeister, K. A System for Rapid DNA Sequencing with

Fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. *Science* **1987**, *238*, 336–341, doi:10.1126/science.2443975.

79. Swerdlow, H.; Gesteland, R. Capillary Gel Electrophoresis for Rapid, High Resolution DNA Sequencing. *Nucleic Acids Research* **1990**, *18*, 1415–1419, doi:10.1093/nar/18.6.1415.

80. Hunkapiller, T.; Kaiser, R.J.; Koop, B.F.; Hood, L. Large-Scale and Automated DNA Sequence Determination. *Science* **1991**, *254*, 59–67, doi:10.1126/science.1925562.

81. Anderson, S. Shotgun DNA Sequencing Using Cloned DNase I-Generated Fragments. *Nucleic Acids Research* **1981**, *9*, 3015–3027, doi:10.1093/nar/9.13.3015.

82. Green, E.D. Strategies for the Systematic Sequencing of Complex Genomes. *Nat Rev Genet* **2001**, *2*, 573–583, doi:10.1038/35084503.

83. Maxam, A.M.; Gilbert, W. A New Method for Sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 560–564, doi:10.1073/pnas.74.2.560.

84. Gastra, W. Chemical Cleavage (Maxam and Gilbert) Method for DNA Sequence Determination. *Methods Mol Biol* **1985**, *2*, 333–341, doi:10.1385/0-89603-064-4:333.

85. Dorado, G.; Gálvez, S.; Budak, H.; Unver, T.; Hernández, P. Nucleic-Acid Sequencing. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering*; Narayan, R., Ed.; Elsevier: Oxford, 2019; pp. 443–460 ISBN 978-0-12-805144-3.

86. Nyrén, P. Enzymatic Method for Continuous Monitoring of DNA Polymerase Activity. *Analytical Biochemistry* **1987**, *167*, 235–238, doi:10.1016/0003-2697(87)90158-8.

87. Nyrén, P.; Lundin, A. Enzymatic Method for Continuous Monitoring of Inorganic Pyrophosphate Synthesis. *Analytical Biochemistry* **1985**, *151*, 504–509, doi:10.1016/0003-2697(85)90211-8.

88. Ronaghi, M.; Karamohamed, S.; Pettersson, B.; Uhlén, M.; Nyrén, P. Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal Biochem* **1996**, *242*, 84–89, doi:10.1006/abio.1996.0432.

89. Ahmadian, A.; Ehn, M.; Hober, S. Pyrosequencing: History, Biochemistry and Future. *Clin Chim Acta* **2006**, *363*, 83–94, doi:10.1016/j.cccn.2005.04.038.
90. Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W.E.; Attiya, S.; Bader, J.S.; Bemben, L.A.; Berka, J.; Braverman, M.S.; Chen, Y.-J.; Chen, Z.; et al. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature* **2005**, *437*, 376–380, doi:10.1038/nature03959.
91. Hu, T.; Chitnis, N.; Monos, D.; Dinh, A. Next-Generation Sequencing Technologies: An Overview. *Human Immunology* **2021**, *82*, 801–811, doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012.
92. Heydari, M.; Miclotte, G.; Van de Peer, Y.; Fostier, J. Illumina Error Correction near Highly Repetitive DNA Regions Improves de Novo Genome Assembly. *BMC Bioinformatics* **2019**, *20*, 298, doi:10.1186/s12859-019-2906-2.
93. Sequencing Platforms | Illumina NGS Platforms Available online: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms.html> (accessed on 12 February 2024).
94. Rusk, N. Torrents of Sequence. *Nat Methods* **2011**, *8*, 44–44, doi:10.1038/nmeth.f.330.
95. Ion Torrent NGS Instruments - PL Available online: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-workflow/ion-torrent-next-generation-sequencing-run-sequence.html> (accessed on 31 July 2024).
96. Gupta, A.K.; Gupta, U. Chapter 20 - Next Generation Sequencing and Its Applications. In *Animal Biotechnology (Second Edition)*; Verma, A.S., Singh, A., Eds.; Academic Press: Boston, 2020; pp. 395–421 ISBN 978-0-12-811710-1.
97. PacBio Ships First Two Commercial Systems; Order Backlog Grows to 44 Available online: <https://www.genomeweb.com/sequencing/pacbio-ships-first-two-commercial-systems-order-backlog-grows-44> (accessed on 12 February 2024).

98. Schadt, E.E.; Turner, S.; Kasarskis, A. A Window into Third-Generation Sequencing. *Human Molecular Genetics* **2010**, *19*, R227–R240, doi:10.1093/hmg/ddq416.
99. Kieleczawa, J. *DNA Sequencing: Optimizing the Process and Analysis*; Jones & Bartlett Learning, 2005; ISBN 978-0-7637-4782-4.
100. Rhoads, A.; Au, K.F. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2015**, *13*, 278–289, doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002.
101. Athanasopoulou, K.; Boti, M.; Adamopoulos, P.; Skourou, P.; Scorilas, A. Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life* **2021**, *12*, 30, doi:10.3390/life12010030.
102. Jain, M.; Olsen, H.E.; Paten, B.; Akeson, M. The Oxford Nanopore MinION: Delivery of Nanopore Sequencing to the Genomics Community. *Genome Biology* **2016**, *17*, 239, doi:10.1186/s13059-016-1103-0.
103. Deamer, D.; Akeson, M.; Branton, D. Three Decades of Nanopore Sequencing. *Nat Biotechnol* **2016**, *34*, 518–524, doi:10.1038/nbt.3423.
104. Wang, Y.; Zhao, Y.; Bollas, A.; Wang, Y.; Au, K.F. Nanopore Sequencing Technology, Bioinformatics and Applications. *Nat Biotechnol* **2021**, *39*, 1348–1365, doi:10.1038/s41587-021-01108-x.
105. Wan, Y.K.; Hendra, C.; Pratanwanich, P.N.; Göke, J. Beyond Sequencing: Machine Learning Algorithms Extract Biology Hidden in Nanopore Signal Data. *Trends in Genetics* **2022**, *38*, 246–257, doi:10.1016/j.tig.2021.09.001.
106. Hugenholtz, P.; Tyson, G.W. Metagenomics. *Nature* **2008**, *455*, 481–483, doi:10.1038/455481a.
107. Sleator, R.D.; Shortall, C.; Hill, C. Metagenomics. *Letters in Applied Microbiology* **2008**, *47*, 361–366, doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x.
108. Fiers, W.; Contreras, R.; Duerinck, F.; Haegeman, G.; Iserentant, D.; Merregaert, J.; Min Jou, W.; Molemans, F.; Raeymaekers, A.; Van den Berghe, A.; et al. Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene. *Nature* **1976**, *260*, 500–507, doi:10.1038/260500a0.

109. Handelsman, J.; Rondon, M.R.; Brady, S.F.; Clardy, J.; Goodman, R.M. Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown Soil Microbes: A New Frontier for Natural Products. *Chemistry & Biology* **1998**, *5*, R245–R249, doi:10.1016/S1074-5521(98)90108-9.
110. Sorek, R.; Zhu, Y.; Creevey, C.J.; Francino, M.P.; Bork, P.; Rubin, E.M. Genome-Wide Experimental Determination of Barriers to Horizontal Gene Transfer. *Science* **2007**, *318*, 1449–1452, doi:10.1126/science.1147112.
111. Miller, M.B.; Tang, Y.-W. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* **2009**, *22*, 611–633, doi:10.1128/cmr.00019-09.
112. Palmer, C.; Bik, E.M.; Eisen, M.B.; Eckburg, P.B.; Sana, T.R.; Wolber, P.K.; Relman, D.A.; Brown, P.O. Rapid Quantitative Profiling of Complex Microbial Populations. *Nucleic Acids Research* **2006**, *34*, e5, doi:10.1093/nar/gnj007.
113. Wilson, M.R.; Naccache, S.N.; Samayoa, E.; Biagtan, M.; Bashir, H.; Yu, G.; Salamat, S.M.; Somasekar, S.; Federman, S.; Miller, S.; et al. Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing. *New England Journal of Medicine* **2014**, *370*, 2408–2417, doi:10.1056/NEJMoa1401268.
114. Dubey, R.K.; Tripathi, V.; Prabha, R.; Chaurasia, R.; Singh, D.P.; Rao, Ch.S.; El-Keblawy, A.; Abhilash, P.C. Metatranscriptomics and Metaproteomics for Microbial Communities Profiling. In *Unravelling the Soil Microbiome: Perspectives For Environmental Sustainability*; Dubey, R.K., Tripathi, V., Prabha, R., Chaurasia, R., Singh, D.P., Rao, Ch.S., El-Keblawy, A., Abhilash, P.C., Eds.; SpringerBriefs in Environmental Science; Springer International Publishing: Cham, 2020; pp. 51–60 ISBN 978-3-030-15516-2.
115. Bei, Q.; Moser, G.; Wu, X.; Müller, C.; Liesack, W. Metatranscriptomics Reveals Climate Change Effects on the Rhizosphere Microbiomes in European Grassland. *Soil Biology and Biochemistry* **2019**, *138*, 107604, doi:10.1016/j.soilbio.2019.107604.
116. Mathieu, A.; Leclercq, M.; Sanabria, M.; Perin, O.; Droit, A. Machine Learning and Deep Learning Applications in Metagenomic Taxonomy and Functional Annotation. *Frontiers in Microbiology* **2022**, *13*.

117. Proctor, L.M.; Creasy, H.H.; Fettweis, J.M.; Lloyd-Price, J.; Mahurkar, A.; Zhou, W.; Buck, G.A.; Snyder, M.P.; Strauss, J.F.; Weinstock, G.M.; et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature* **2019**, *569*, 641–648, doi:10.1038/s41586-019-1238-8.
118. Lacroix, V.; Cassard, A.; Mas, E.; Barreau, F. Multi-Omics Analysis of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Diseases: What Benefits for Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Tools? *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 11255, doi:10.3390/ijms222011255.
119. Grossart, H.-P.; Massana, R.; McMahon, K.D.; Walsh, D.A. Linking Metagenomics to Aquatic Microbial Ecology and Biogeochemical Cycles. *Limnology and Oceanography* **2020**, *65*, S2–S20, doi:10.1002/lno.11382.
120. Wani, A.K.; Akhtar, N.; Naqash, N.; Chopra, C.; Singh, R.; Kumar, V.; Kumar, S.; Mulla, S.I.; Américo-Pinheiro, J.H.P. Bioprospecting Culturable and Unculturable Microbial Consortia through Metagenomics for Bioremediation. *Cleaner Chemical Engineering* **2022**, *2*, 100017, doi:10.1016/j.clce.2022.100017.
121. Purushothaman, S.; Meola, M.; Egli, A. Combination of Whole Genome Sequencing and Metagenomics for Microbiological Diagnostics. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, 9834, doi:10.3390/ijms23179834.
122. Pérez-Cobas, A.E.; Gomez-Valero, L.; Buchrieser, C. Metagenomic Approaches in Microbial Ecology: An Update on Whole-Genome and Marker Gene Sequencing Analyses. *Microbial Genomics* **2020**, *6*, e000409, doi:10.1099/mgen.0.000409.
123. von Bredow, B.; Caldera, J.; Cerón, S.; Chan, J.L.; Gray, H.K.; Garner, O.B.; Yang, S. Clinical Next-Generation Sequencing Assay Combining Full-Length Gene Amplification and Shotgun Sequencing for the Detection of CMV Drug Resistance Mutations. *Journal of Clinical Virology* **2023**, *165*, 105520, doi:10.1016/j.jcv.2023.105520.
124. Mamanova, L.; Coffey, A.J.; Scott, C.E.; Kozarewa, I.; Turner, E.H.; Kumar, A.; Howard, E.; Shendure, J.; Turner, D.J. Target-Enrichment Strategies for next-Generation Sequencing. *Nat Methods* **2010**, *7*, 111–118, doi:10.1038/nmeth.1419.
125. Singh, R.R. Target Enrichment Approaches for Next-Generation Sequencing Applications in Oncology. *Diagnostics (Basel)* **2022**, *12*, 1539, doi:10.3390/diagnostics12071539.

126. Targeted Sequencing Available online: <https://sequencing.roche.com/global/en/article-listing/targeted-sequencing.html> (accessed on 31 July 2024).
127. Shu, B.; Kirby, M.K.; Davis, W.G.; Warnes, C.; Liddell, J.; Liu, J.; Wu, K.-H.; Hassell, N.; Benitez, A.J.; Wilson, M.M.; et al. Multiplex Real-Time Reverse Transcription PCR for Influenza A Virus, Influenza B Virus, and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1821–1830, doi:10.3201/eid2707.210462.
128. Cordey, S.; Thomas, Y.; Cherpillod, P.; van Belle, S.; Tapparel, C.; Kaiser, L. Simultaneous Detection of Parainfluenza Viruses 1 and 3 by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Virological Methods* **2009**, *156*, 166–168, doi:10.1016/j.jviromet.2008.11.006.
129. Williams, T.; Jackson, S.; Barr, I.; Bi, S.; Bhiman, J.; Ellis, J.; von Gottberg, A.; Lindstrom, S.; Peret, T.; Rughooputh, S.; et al. Results from the Second WHO External Quality Assessment for the Molecular Detection of Respiratory Syncytial Virus, 2019–2020. *Influenza Other Respir Viruses* **2023**, *17*, e13073, doi:10.1111/irv.13073.
130. Oberste, M.S.; Peñaranda, S.; Rogers, S.L.; Henderson, E.; Nix, W.A. Comparative Evaluation of Taqman Real-Time PCR and Semi-Nested VP1 PCR for Detection of Enteroviruses in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Virology* **2010**, *49*, 73–74, doi:10.1016/j.jcv.2010.06.022.
131. Lu, X.; Trujillo-Lopez, E.; Lott, L.; Erdman, D.D. Quantitative Real-Time PCR Assay Panel for Detection and Type-Specific Identification of Epidemic Respiratory Human Adenoviruses. *J Clin Microbiol* **2013**, *51*, 1089–1093, doi:10.1128/JCM.03297-12.
132. Cock, P.J.A.; Antao, T.; Chang, J.T.; Chapman, B.A.; Cox, C.J.; Dalke, A.; Friedberg, I.; Hamelryck, T.; Kauff, F.; Wilczynski, B.; et al. Biopython: Freely Available Python Tools for Computational Molecular Biology and Bioinformatics. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1422–1423, doi:10.1093/bioinformatics/btp163.
133. McKinney, W. Data Structures for Statistical Computing in Python.; January 1 2010; pp. 56–61.
134. team, T. pandas development Pandas-Dev/Pandas: Pandas 2023.

135. Costa-Luis, C. da; Larroque, S.K.; Altendorf, K.; Mary, H.; richardsheridan; Korobov, M.; Raphael, N.; Ivanov, I.; Bargull, M.; Rodrigues, N.; et al. Tqdm: A Fast, Extensible Progress Bar for Python and CLI 2022.
136. Nanoporetech/Pomoxis 2024.
137. Li, H. Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 3094–3100, doi:10.1093/bioinformatics/bty191.
138. Li, H. New Strategies to Improve Minimap2 Alignment Accuracy. *Bioinformatics* **2021**, *37*, 4572–4574, doi:10.1093/bioinformatics/btab705.
139. Vaser, R.; Sović, I.; Nagarajan, N.; Šikić, M. Fast and Accurate de Novo Genome Assembly from Long Uncorrected Reads. *Genome Res* **2017**, *27*, 737–746, doi:10.1101/gr.214270.116.
140. Wu, K.-W.; Chien, C.-Y.; Li, S.-W.; King, C.-C.; Chang, C.-H. Highly Conserved Influenza A Virus Epitope Sequences as Candidates of H3N2 Flu Vaccine Targets. *Genomics* **2012**, *100*, 102–109, doi:10.1016/j.ygeno.2012.06.003.
141. Chu, C.; Fan, S.; Li, C.; Macken, C.; Kim, J.H.; Hatta, M.; Neumann, G.; Kawaoka, Y. Functional Analysis of Conserved Motifs in Influenza Virus PB1 Protein. *PLoS One* **2012**, *7*, e36113, doi:10.1371/journal.pone.0036113.
142. Fiorini, L. *Oligonucleotide/Primer Degeneracy Automatic Calculator*; 2021;
143. Quick, J. nCoV-2019 Sequencing Protocol V1 2020.
144. Oligo Analyzer Available online: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> (accessed on 10 June 2024).
145. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 16 June 2024).
146. Trepas, K.; Gibeaud, A.; Trouillet-Assant, S.; Terrier, O. Exploring Viral Respiratory Coinfections: Shedding Light on Pathogen Interactions. *PLOS Pathogens* **2024**, *20*, e1012556, doi:10.1371/journal.ppat.1012556.

147. BIOFIRE® Respiratory 2.1 (RP 2.1) Panel Available online: <https://www.biomerieux.com/us/en/our-offer/clinical-products/biofire-respiratory-panels.html> (accessed on 19 June 2024).
148. Fendrick, A.M.; Monto, A.S.; Nightengale, B.; Sarnes, M. The Economic Burden of Non–Influenza-Related Viral Respiratory Tract Infection in the United States. *Arch Intern Med* **2003**, *163*, 487, doi:10.1001/archinte.163.4.487.
149. Testing and Respiratory Viruses | Respiratory Illnesses | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/respiratory-viruses/prevention/testing.html> (accessed on 22 June 2024).
150. Ryu, W.-S. Diagnosis and Methods. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* **2017**, 47–62, doi:10.1016/B978-0-12-800838-6.00004-7.
151. Panel Respiratory met. PCR, infekcje górnych dróg oddechowych - 23 patogeny (bakterie, wirusy) Available online: <https://diag.pl/sklep/badania/infekcje-drog-oddechowych-identyfikacja-23-patogenow-bakterie-wirusy-met-pcr/> (accessed on 24 June 2024).
152. Sanz, I.; Perez, D.; Rojo, S.; Domínguez-Gil, M.; de Lejarazu, R.O.; Eiros, J.M. Coinfections of Influenza and Other Respiratory Viruses Are Associated to Children. *An Pediatr (English version) (Barc)* **2022**, *96*, 334–341, doi:10.1016/j.anpede.2021.03.002.
153. Schrijver, I.; Aziz, N.; Farkas, D.H.; Furtado, M.; Gonzalez, A.F.; Greiner, T.C.; Grody, W.W.; Hambuch, T.; Kalman, L.; Kant, J.A.; et al. Opportunities and Challenges Associated with Clinical Diagnostic Genome Sequencing. *J Mol Diagn* **2012**, *14*, 525–540, doi:10.1016/j.jmoldx.2012.04.006.
154. Zheng, P.; Zhou, C.; Ding, Y.; Liu, B.; Lu, L.; Zhu, F.; Duan, S. Nanopore Sequencing Technology and Its Applications. *MedComm* **2023**, *4*, e316, doi:10.1002/mco2.316.
155. Petersen, L.M.; Martin, I.W.; Moschetti, W.E.; Kershaw, C.M.; Tsongalis, G.J. Third-Generation Sequencing in the Clinical Laboratory: Exploring the Advantages and Challenges of Nanopore Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* **2019**, *58*, 10.1128/jcm.01315-19, doi:10.1128/jcm.01315-19.

156. Paget, J.; Caini, S.; Del Riccio, M.; van Waarden, W.; Meijer, A. Has Influenza B/Yamagata Become Extinct and What Implications Might This Have for Quadrivalent Influenza Vaccines? *Euro Surveill* **2022**, *27*, 2200753, doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.39.2200753.
157. Dreyfus, C.; Laursen, N.S.; Kwaks, T.; Zuijdgeest, D.; Khayat, R.; Ekiert, D.C.; Lee, J.H.; Metlagel, Z.; Bujny, M.V.; Jongeneelen, M.; et al. Highly Conserved Protective Epitopes on Influenza B Viruses. *Science* **2012**, *337*, 1343–1348, doi:10.1126/science.1222908.
158. Katoh, K.; Rozewicki, J.; Yamada, K.D. MAFFT Online Service: Multiple Sequence Alignment, Interactive Sequence Choice and Visualization. *Brief Bioinform* **2017**, *20*, 1160–1166, doi:10.1093/bib/bbx108.
159. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Mol Biol Evol* **2013**, *30*, 772–780, doi:10.1093/molbev/mst010.
160. Primer3 Input Available online: <https://primer3.ut.ee/> (accessed on 26 June 2024).
161. Potapov, V.; Ong, J.L. Examining Sources of Error in PCR by Single-Molecule Sequencing. *PLOS ONE* **2017**, *12*, e0169774, doi:10.1371/journal.pone.0169774.
162. ResearchGate | Find and Share Research Available online: <https://www.researchgate.net/> (accessed on 26 June 2024).
163. Platinum SuperFi II DNA Polymerase—High-Fidelity PCR Enzyme - PL Available online: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/pcr/pcr-enzymes-master-mixes/platinum-high-fidelity-pcr-enzyme.html> (accessed on 26 June 2024).
164. PrimeSTAR Max DNA Polymerase—Fast and High-Fidelity PCR Available online: <https://www.takarabio.com/products/pcr/high-fidelity-pcr/primestar-max-dna-polymerase> (accessed on 26 June 2024).
165. Ririe, K.M.; Rasmussen, R.P.; Wittwer, C.T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry* **1997**, *245*, 154–160, doi:10.1006/abio.1996.9916.

166. Ausubel, F.M. *Current Protocols in Molecular Biology*; Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience, 2003; ISBN 978-0-471-50338-5.
167. Abbasi, H.; Nikoo, H.R.; Fotouhi, F.; Khosravi, A. Development of a Robust TaqMan Probe-Based One-Step Multiplex RT-qPCR for Simultaneous Detection of SARS-CoV-2 and Influenza A/B Viruses. *BMC Microbiology* **2023**, *23*, 335, doi:10.1186/s12866-023-03048-9.
168. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time RT-PCR. *Euro Surveill* **2020**, *25*, 2000045, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
169. Parker, J.; Fowler, N.; Walmsley, M.L.; Schmidt, T.; Scharrer, J.; Kowaleski, J.; Grimes, T.; Hoyos, S.; Chen, J. Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses. *PLOS ONE* **2015**, *10*, e0143164, doi:10.1371/journal.pone.0143164.
170. EVAg | European Virus Archive - GLOBAL Available online: <https://www.european-virus-archive.com/> (accessed on 27 June 2024).
171. Chapman, R.; Jones, L.; D'Angelo, A.; Suliman, A.; Anwar, M.; Bagby, S. Nanopore-Based Metagenomic Sequencing in Respiratory Tract Infection: A Developing Diagnostic Platform. *Lung* **2023**, *201*, 171–179, doi:10.1007/s00408-023-00612-y.
172. Wang, M.; Fu, A.; Hu, B.; Tong, Y.; Liu, R.; Liu, Z.; Gu, J.; Xiang, B.; Liu, J.; Jiang, W.; et al. Nanopore Targeted Sequencing for the Accurate and Comprehensive Detection of SARS-CoV-2 and Other Respiratory Viruses. *Small* **2020**, *16*, 2002169, doi:10.1002/smll.202002169.
173. Brinkmann, A.; Uddin, S.; Ulm, S.-L.; Pape, K.; Förster, S.; Enan, K.; Nourilil, J.; Krause, E.; Schaade, L.; Michel, J.; et al. RespiCoV: Simultaneous Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and 46 Respiratory Tract Viruses and Bacteria by Amplicon-Based Oxford-Nanopore MinION Sequencing. *PLOS ONE* **2022**, *17*, e0264855, doi:10.1371/journal.pone.0264855.

174. Weekly Threats Reports (CDTR) Available online:
<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-and-data/monitoring/weekly-threats-reports> (accessed on 13 April 2025).