



Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-17-0445**

Prevenia a mechanizmus synergie chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie s ťažkým priebehom ochorenia.

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Eva Varečková, DrSc.**

Príjemca **Biomedicínske centrum SAV, v. v. i. - Virologický ústav**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Projekt bol riešený na Virologickom ústave Biomedicínskeho centra SAV

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Počas projektu sme neformálne spolupracovali so zahraničnými inštitúciami a s nasledovnými vedeckými pracovníkmi:

Prof. Ervín Fodor, Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, UK

Prof. Peter Šebo, Mikrobiologický ústav AVČR, Praha, ČR (Institute of Microbiology of the ASCR, v.v.i., Prague, Czech Republic)

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo užitočné vzory, ktoré sú výsledkami projektu

neboli

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Najdôležitejšie publikácie:

Výsledky získané počas riešenia projektu sme publikovali v 11 vedeckých článkoch v medzinárodných vedeckých časopisoch evidovaných v CC a prezentovali sme ich na 6 domácich a 2 zahraničných konferenciách. Naše poznatky sme popularizovali v dennej tlači, v populárno-vedeckom periodiku (Quark, 2020) ako aj v rozhlase (Nočná pyramída, 2020). Okrem toho sme svoje skúsenosti a vedomosti uplatnili aj v pedagogickej činnosti (prednášky, Deň otvorených dverí, príspevok k napísaniu vysokoškolského textu-učebnice).

Najvýznamnejšie publikácie:

1/ Jakubcová L, Vozárová M, Hollý J, Tomčíková K, Fogelová M, Polčicová K, Kostolanský F, Fodor E, Varečková E: Biological properties of influenza A virus mutants with amino acid substitutions in the HA2 glycoprotein of the HA1/HA2 interaction region. J Gen Virol. 2019, 100(9):1282-1292. doi: 10.1099/jgv.0.001305.

2/ Tomčíková K and Varečková E: Different mechanisms of the protection against influenza A infection mediated by broadly reactive HA2 gp -specific antibodies. Acta Virol. 2019;63(4), 347-365. doi:10.4149/av_2019_408.

3/ DUNAJOVÁ, Aneta Anna - GÁL, Miroslav** - TOMČÍKOVÁ, K. - SOKOLOVÁ, Romana - KOLIVOŠKA, Viliam** - VANĚČKOVÁ, Eva - KIELAR, Filip - KOSTOLANSKÝ, František - VAREČKOVÁ, Eva - NAUMOWICZ, Monika**. Ultrasensitive impedimetric immunosensor for

- influenza A detection. In *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2020, vol. 858, art.no. 113813. (2019: 3.807 - IF, Q1 - JCR, 0.758 - SJR, Q1 - SJR). ISSN 0022-0728.
- 4/ MATUŠKOVÁ, Vlasta** - ZATLOUKAL, Marek - VOLLER, Jiří - GRÚZ, Jiří - PĚKNÁ, Zuzana - BRIESTENSKÁ, Katarína - MISTRÍKOVÁ, Jela [SAVBIOMED] - SPÍCHAL, Lukáš - DOLEŽAL, Karel** - STRNAD, Miroslav. New aromatic 6-substituted 2'-deoxy-9-(β)-D-ribofuranosylpurine derivatives as potential plant growth regulators. In *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2020, vol. 28, no. 2, projektu15230. (2019: 3.073 - IF, Q2 - JCR, 0.739 - SJR, Q1 - SJR). ISSN 0968-0896.
- 5/ KOSTOLANSKÝ, František - TOMČÍKOVÁ, Karolína - BRIESTENSKÁ, Katarína - MIKUŠOVÁ, Miriam - VAREČKOVÁ, Eva**. Universal anti-influenza vaccines based on viral HA2 and M2e antigens. In *Acta Virologica*, 2020, vol. 64, no., p. 417-426. (2019: 0.793 - IF, Q4 - JCR, 0.358 - SJR, Q3 - SJR). ISSN 0001-723X
- 6/ BRIESTENSKÁ, Katarína - MIKUŠOVÁ, Miriam - TOMČÍKOVÁ, Karolína - KOSTOLANSKÝ, František - VAREČKOVÁ, Eva** Quantification of bacteria by in vivo bioluminescence imaging in comparison with standard spread plate method and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). In *Archives of Microbiology*, 2021, vol. 203, no. 7, p. 4737-4742. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02458-5>
- 7/ HOLLÝ, Jaroslav - TOMČÍKOVÁ, Karolína - VOZÁROVÁ, Mária - FOGELOVÁ, Margaréta - JAKUBCOVÁ, Lucia - VAREČKOVÁ, Eva - KOSTOLANSKÝ, František** DNA vaccine targeting the ectodomain of influenza M2 protein to endolysosome pathway enhances anti-M2e protective antibody response in mice. In *Acta Virologica*, 2021, vol. 65, no. 2, p. 181-191. (2020: 1.162 - IF, Q4 - JCR, 0.412 - SJR, Q3 - SJR, karentované - CCC). (2021 - Current Contents). ISSN 0001-723X. Dostupné na: https://doi.org/10.4149/av_2021_207
- 8/ Mikušová, M.; Tomčíková, K.; Briestenská, K.; Kostolanský, F.; Varečková, E.*: The Contribution of Viral Proteins to the Synergy of Influenza and Bacterial Co-Infection. *Viruses* 2022, 14, 1064. <https://doi.org/10.3390/v14051064>
- 9/ Mikušová Miriam, Tomčíková Karolína, Briestenská Katarína, Varečková Eva*: The less effective induction of virus-neutralizing antibodies after influenza infection differs dependently on the time and the dose of Oseltamivir application. *Acta virologica*, vol. 66, No. 3., 2022, in press.

Uplatnenie výsledkov projektu

Uplatnenie výsledkov projektu:

Výsledky získané počas riešenia nášho projektu nabádajú k zváženiu liečby chrípky antivirotikami hlavne u imunitne kompromitovaných jedincov, ale rozhodne poukazujú na pozitívny účinok očkovania proti chrípke, ktorý môže zabrániť ťažkému priebehu chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie. Podobne môžeme hľadať paralelu u SARS-CoV-2 infikovaných jedincov, u ktorých býva často vírusový zápal pľúc komplikovaný bakteriálnou koinfekciou a dochádza k synergii patologických zmien spôsobených koinfekciou, ktorá sa nie vždy dá zvrátiť a úspešne vyliečiť.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Najdôležitejšie výsledky:

Riešenie projektu prinieslo viacero nových významných a prioritných výsledkov v oblasti výskumu vírusu chrípky, ale aj v poznatkoch o procesoch prebiehajúcich počas chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie.

Hlavný cieľ riešenia projektu spočíval v hľadaní spôsobu ako zabrániť synergii chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie, ktorá sa môže rozvinúť do ťažkého priebehu ochorenia spojeného s nezvratným poškodením epitelu dýchacích ciest a zlyhávaním orgánov. Na modeli inbredných BALB/c myši sme optimalizovali dávky stredne virulentného vírusu A/Mississippi/1/85(3N2) a bioluminiscentných baktérií *Streptococcus pneumoniae*, ktorými boli myši infikované 7 dní po vírusovej infekcii. Uvedené dávky vírusu, resp. baktérií samostatne nespôsobili ochorenie s klinickými príznakmi infekcie, avšak koinfekcia viedla k 100% hynutiu myši. Na imunizáciu sme ako imunogén vybrali, z mnohých u nás pripravených konštruktov, DNA konštrukt obsahujúci gény pre hemaglutinín subtypu H1 vírusu A/PR8/34(H1N1), ktorý mal deletovanú oblasť génov kódujúcich globulárnu časť

hemagglutíninu a jeho produkt obsahoval len konzervatívnu kmeňovú časť HA. Takto imunizované myši boli infikované heterológnym vírusom chrípky H3 subtypu. Zistili sme, že imunizácia krížovo-protéktívnou vakcínou zlepšuje prežívanie takto duálne infikovaných myší o 20% v porovnaní s neimunizovanými myšami. Paralelne sme sledovali cytokínový profil a protiátkovú odpoveď u takto imunizovaných a koinfikovaných myší.

Ďalším dôležitým výsledkom, ktorý sme získali počas riešenia projektu, bol vplyv najčastejšie používaného antivirotika proti chrípke, Oseltamivir fosfátu (OS), na priebeh chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie. Zistili sme, že OS v závislosti na dávke a spôsobe podávania (profylakticky-6h pred, alebo terapeuticky-42 h vírusovej infekcii) nielen zmierni chrípkovú infekciu, ale úplne zabráni rozvoju bakteriálnej koinfekcie. Paralelne sme sa sústredili aj na imunitné parametre počas koinfekcie, t.j. na tvorbu vírus-neutralizujúcich protiátok a na cytokínový profil u jedincov liečených s OS a neliečených. Zistili sme, že OS terapeuticky podávaný vo vyššej dávke (60 mg/kg) zabráni patologickým zmenám na pľúcach infikovaných myší. Vírus-neutralizačné protéktívne protilátky sú indukované v dostatočnej miere, hoci ich titre sú v porovnaní s titrami u neliečených myší mierne znížené. Pritom cytokínový profil počas bakteriálnej koinfekcie kopíroval zníženie zápalového procesu u OS liečených myší v porovnaní s neliečenými.

Uvedené výsledky nabádajú k zväženiu liečby chrípky antivirotikami hlavne u imunitne kompromitovaných jedincov, ale rozhodne poukazujú na pozitívny účinok očkovania proti chrípke, ktoré môže zabrániť ťažkému priebehu chrípkovej a bakteriálnej koinfekcie. Podobne by sme mohli hľadať paralelu u SARS-CoV-2 infikovaných jedincov, kde býva často vírusový zápal pľúc komplikovaný bakteriálnou koinfekciou a dochádza k synergii patologických dopadov koinfekcie, ktorá sa nie vždy dá zvrátiť.

Okrem týchto výsledkov sme počas riešenia projektu získali niekoľko ďalších originálnych výsledkov:

1/ Navrhli sme a metódou reverznej genetiky sme pripravili a analyzovali nové ešte nepopísané varianty vírusu chrípky s presne definovanou mutáciou v HA2 glykoproteíne, ktoré mali zmenenú fuzogénnu aktivitu a s tým súvisiacu zmenu patogenity (Jakubcová et al., J.Gen.Virol., 2019).

2/ V spolupráci s FCHPT Slovenskej Technickej Univerzity v Bratislave sme pripravili vysoko citlivý imunosenzor na detekciu chrípkového vírusu na báze monoklonovej protilátky špecifickej voči nukleoproteínu vírusu chrípky typu A, ktorá bola skonštruovaná na Virologickom ústave SAV (Dunajová et al., Journal of Electroanalytical Chemistry, 2020).

3/ Určili sme hranicu detekcie bioluminiscentných baktérií *Streptococcus pneumoniae* pomocou zobrazovacej metódy bioimaging na prístroji MIS a porovnali sme s citlivosťou detekcie štandardnými metódami RT-qPCR a kultivačnou, spread plate method (Briestenská et al., Archives of Microbiology, 2021)

4/ Ako prví sme popísali targetovanie antigénu do endolizozómov u vírusu chrípky na zvýšenie imunogenicity konzervovaného vírusového antigénu, ektodomény M2e (Hollý et al., Acta virol., 2021).

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The work on this project brought several new and original results in the area of influenza research, as well as new knowledge about the processes triggered in the host during influenza and bacterial coinfection.

The main goal of this project was to find a way how to prevent the synergy of influenza and bacterial coinfection, which often results in the irreversible damage of respiratory tract epithelium and organ failure.

In a mouse model of inbred BALB/c mice, we optimized the doses of medium virulent virus A/Mississippi/1/85(H3N2) and bioluminescent bacteria *Streptococcus pneumoniae*, by which were mice coinfecting 7 days after the viral infection. These doses of virus or bacteria did not cause the disease with clinical symptoms after individual infection; however, the coinfection resulted in death of all coinfecting animals. For the immunization of mice, we selected a DNA construct containing genes of hemagglutinin of H1 subtype of A/PR8/34(H1N1) virus prepared in our laboratory, with deleted genes encoding the globular part of HA; thus, the product contained only conserved HA2 stem. Immunized mice were infected with the influenza virus of the heterologous H3 subtype. Immunization with this cross-protective

vaccine improved the survival of coinfecting mice by 20% in comparison to non-immunized mice. Moreover, the cytokine profile and antibody response in the immunized coinfecting mice were monitored.

Another important result was obtained by the study of the influence of the most commonly used antiviral drug against influenza, Oseltamivir phosphate (OS), on the course of influenza and bacterial coinfection. Our results showed that OS not only moderates the influenza infection depending on the dose and time of application (prophylactically-6h before or therapeutically- 42h after viral infection), but fully prevents the development of bacterial coinfection. We monitored the immune parameters during coinfection, i.e. induction of virus-neutralizing (VN) antibodies and the cytokine profile in individuals cured with OS and uncured. We showed that OS applied therapeutically in the high dose (60 mg/kg) prevents the pathologic changes in the lungs of coinfecting mice, but VN protective antibodies are induced at a sufficient level, though titers are lower as in untreated mice. The cytokine profile during coinfection was in correlation with the decreased inflammation process in OS cured mice.

These results pointed to the consideration of antiviral drug therapy mainly in the immunocompromised patient, and underline the significance of vaccination in the prevention of the severe course of viral and bacterial coinfection. Similarly, we could find the parallel in SARS-CoV-2-infected patients, where the pneumonia of viral origin is often complicated by bacterial coinfection and results in the synergy of pathologic disorders of coinfection, which not always can be reverted.

Other original results also arose during the work on this research project:

1/ We designed, prepared and analyzed new undescribed variants of influenza A virus with defined mutations in HA2 gp, with changes in the fusion activity linked with changes in their pathogenic properties (Jakubcová et al., J.Gen. Virol., 2019).

2/ In collaboration with FCHPT of the Slovak University of Technology, we developed a very sensitive immunosensor for the detection of influenza virus based on the monoclonal antibody specific to influenza A virus nucleoprotein, prepared at the Institute of Virology of The Academy of Sciences in Bratislava, SR (Dunajová et al., Journal of Electroanalytical Chemistry, 2020).

3/ We determined the detection limit for bioluminescence imaging of bacteria *Streptococcus pneumoniae* and compared it with standard methods, reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) and spread plate method (Briestenská et al., Archives of Microbiology, 2021)

4/ For the first time we have shown that the targeting of conserved M2e of influenza A virus into the endolysosomes results in its increased immunogenicity (Hollý et al., Acta Virol., 2021).