

Běla Tůmová

Ptačí chřipka

trvalá hrozba pandemie



Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umístování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.



Životopis



RNDr. Běla Tůmová, DrSc., absolvovala Přírodovědeckou fakultu Univerzity Karlovy v roce 1952. V letech 1952–1956 pracovala na oddělení diagnostiky a výzkumu virových infekcí Institutu hygieny a epidemiologie v Praze, dále pak v rozmezí let 1957–1997 jako vedoucí Oddělení virových respiračních nákaz a Národní referenční laboratoře pro chřipku ve Státním zdravotním ústavu. Vybuodovala mezinárodně uznávané pracoviště aplikovaného a základního výzkumu, kde bylo prioritně dosaženo izolace nových chřipkových virů zvířat. Účastnila se na světovém výzkumu těchto kmenů a první klasifikaci a diagnostiky virových respiračních infekcí. V roce 1963 obhájila kandidátskou práci na téma *Výskyt chřipky v Československu v letech 1950–1962*. Doktorka Tůmová získala Cenu Vědecké rady Ministerstva zdravotnictví ČR (1974) za výsledky studia biologie a epidemiologie

respiračních virů, v roce 1982 získala Pracovní skupina virových respiračních infekcí (jíž byla členem) Národní cenu České republiky za výsledky výzkumné činnosti v diagnostice, epidemiologii a profylaxi virových nákaz dýchacích cest. Doktorskou práci na téma *Ekologie viru chřipky – nové aspekty studia chřipky lidí a zvířat* obhájila v roce 1984.

Ve World Influenza Centre v Londýně (WHO Collab. Centrum, Medical Research Council) pracovala autorka v rozmezí let 1963–1964, kdy zde byl prokázán reasortment mezi lidským a zvířecím virem. Jako visiting professor působila na University of Wisconsin v Madisonu, USA (1968–1970), kde se kromě výuky virologie zabývala výzkumem ekologie virů ptačí chřipky, přenosem viru migrujícími ptáky a příbuzností kmenů pandemie 1968 s kmeny izolovanými z vodních ptáků. V letech 1957–1998 se účastnila krátkodobých studií a pracovních pobytů v ústavech, zabývajících se virologickou tematikou, a to v Moskvě, Petrohradu, Berlíně, Atlantě, Helsinkách, Turku, Paříži, Stockholmu a v Glasgow.

V roce 1974 se stala členkou Českomoravské společnosti mikrobiologické ČSAV, v roce 2000 pak čestnou členkou České lékařské společnosti JEP v sekci mikrobiologie a epidemiologie, byla také přijata za členku New York Academy of Sciences (1994). Dále byla členkou WHO Expert Committee on Zoonosis, členkou poradní skupiny WHO – Advising Group for Human and Animal Influenza, členkou European Influenza Surveillance Scheme v Utrechtu (do roku 1998) a také členkou European Group of Virus Diagnostic v Londýně (do roku 1997). Viceprezidentkou vědecké společnosti European Scientific Working Group of Influenza v Bruselu pak byla v období let 1993–1996.

Doktorka B. Tůmová byla autorkou více než 250 vědeckých sdělení, publikovaných v domácích i zahraničních odborných časopisech a také spoluautorkou 8 zahraničních monografií. Přeložila publikaci „*Viruses of Vertebrates*“, která vyšla v r. 1977.

Od roku 2001 pracovala na původní verzi a novelách Národního pandemického plánu České republiky, nadále se na epidemiologickém oddělení Hygienické stanice Hlavního města Prahy účastnila analýzy epidemie SARS a výskytu viru A/H5N1 a lidských onemocnění ve světě.

Svoji životní publikaci o ptačí chřipce, kterou intenzivně připravovala dva roky, dokončila před svým úmrtím dne 18. dubna 2007.

RNDr. Běla Tůmová, DrSc. († 2007)

PTAČÍ CHŘIPKA – trvalá hrozba pandemie

Knihu uspořádali a k vydání připravili

RNDr. Augustin Štumpa, CSc., a MUDr. Martina Havlíčková, CSc.

Recenzenti:

Prof. MUDr. Vladimír Vonka, DrSc.

Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.

© Grada Publishing, a.s., 2008

Obrázky dodali autoři.

Cover Photo © profimedia.cz, 2008

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 3272. publikaci

Odpovědný redaktor Jan Lomíček

Sazba a zlom Linda Marečková

Počet stran 136 + 8 stran barevné přílohy

1. vydání, Praha 2008

Vytiskla tiskárna PBtisk, s.r.o.,

Prokopská 8, Příbram VI

Tato publikace je určena pro odbornou zdravotnickou veřejnost a pracovníky ve zdravotnictví vybraných oborů.

Autoři i nakladatelství se omlouvají za sníženou kvalitu některých obrázků, způsobenou nižší kvalitou jejich podkladů.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorů. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplývají pro autory, pořadatele ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.

ISBN 978-80-247-1986-3 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-6319-4 (elektronická verze ve formátu PDF)

© Grada Publishing, a.s. 2011

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
Předmluva	10
1 Úvod do problematiky	12
1.1 Virus chřipky	12
1.1.1 Struktura viru chřipky typu A	12
1.1.2 Genom, virové proteiny, jejich funkce a vlastnosti	14
1.2 Pandemie	20
2 Co je ptačí chřipka?	22
2.1 Historie	22
2.2 Charakteristika a evoluce linií viru chřipky	27
2.3 Charakteristika onemocnění a vlastnosti ptačí chřipky	31
2.3.1 Výskyt a šíření ptačích virů	34
2.3.2 Ptačí chřipka a mezidruhový přenos	38
2.3.3 Přenos ptačí chřipky na člověka	42
2.4 Poznatky z výskytů a šíření ptačí chřipky v období 1957–1980	44
3 Epizoozie patogenních kmenů ptačí chřipky (1997–2006)	48
3.1 Epizoozie ve světě před rokem 2003	48
3.1.1 Epizoozie subtypu H5 a H7 (HPAI) ve světě před rokem 2003	48
3.2 Panzoozie viru H5N1 v Asii	49
3.3 Expanze viru mimo Čínu a význam migrujících ptáků	54
4 Ptačí chřipka u lidí	61
4.1 Epidemiologie lidských infekcí	61
4.1.1 Průběh výskytu ptačí chřipky u lidí v Asii	63
4.1.2 Charakteristika výskytu H5N1 a H9N2 u lidí a jeho zvláštnosti	64
4.1.3 Nástup subtypu H5N1 – úvod k panzoozii a ptačí chřipka u lidí 2003–2005	66
4.1.4 Ptačí chřipka v období 2005 – únor 2007	69
4.1.5 Zvláštnosti výskytu jiných subtypů viru u lidí ve světě	75
4.1.6 Zdroj a cesta nákazy lidí ptačí chřipkou	78
4.1.7 Pacienti, inkubační doba infekce, věkové složení	84
4.1.8 Prevence ptačí chřipky u lidí, obecná opatření	86
4.2 Onemocnění lidí ptačí chřipkou	88
4.2.1 Klinický obraz a nálezy	90

4.2.2	Patogeneze, patologie	98
4.2.3	Stanovení diagnózy	105
4.3	Laboratorní diagnostika viru sezónní a ptačí chřipky	106
4.3.1	Odběr klinického materiálu	107
4.3.2	Odběr a zasilání vzorků	110
4.3.3	Hodnocení výsledků expresních testů	110
5	Ptačí chřipka – poučení, závěry a perspektiva	112
5.1	Proč nedošlo dosud k pandemii ptačí chřipky?	112
5.2	Je příští pandemie nevyhnutelná a jak jsme na ni připraveni?	114
5.2.1	Je příští pandemie nevyhnutelná?	114
5.2.2	Jak jsme připraveni?	118
	Zcela na závěr	120
	Použitá literatura	121
	Doporučení organizací	132
	Rejstřík	134

Seznam použitých zkratek

aa	aminoacid/aminokyseliny
ADNS	Animal diseases notification system
AGES	Austrian Health and Food Safety Agency
ARI	akutní respirační infekce
ARDS	syndrom akutní dechové tísně
BL3	stupeň bezpečnostního režimu práce
CNS	centrální nervový systém
CRLAI	Community reference laboratory for avian influenza
ČČK	Český červený kříž
D/kD	Dalton/kiloDalton
DD	domov důchodců
DEFRA	Department for Environment Food and Rural Affairs
DIC	diseminovaná intravaskulární koagulace
ECDC	Evropské centrum pro kontrolu a prevenci chorob
EDQM	European department for quality of medicines
EISS	European influenza surveillance scheme
EMA	European agency for the evaluation of medicinal products
ENSIP	European network for surveillance of influenza in pigs
ER	endoplazmatické retikulum
EU/EC	Evropská unie (European community)
EUROGROG	Francouzská organizace, Evropský systém surveillance
FAO	Food and agriculture organization
FVL	Fakulta veterinárního lékařství v Brně
GA	Golgiho aparát
GIT	gastronitestinální trakt
HA/H	hemaglutinin
HCD	horní cesty dýchací
HEF	hemaglutinin-esteráza fuzní protein
HIT	test inhibice hemaglutinace
HPAI	High pathogenic avian influenza (vysoce patogenní ptačí virus)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IF	test imunofluorescence
IFN	interferon (alfa, beta, gama)
ILI	Influenza like illness (chřipce podobná onemocnění)
INFOSAN	International Food Safety Authorities Network
KF, KFR	test vazby komplementu
LPAI	Low pathogenic avian influenza (nízko patogenní ptačí virus)
M1	Matrix protein
M2	membránový protein, iontový kanál

MDCK	buňky Madin darby canine kidney cells
Mr	relativní molekulová hmotnost
MS	Member states
NA/N	neuraminidáza
NCAED	Národní referenční centrum pro analýzu epidemiologických dat
NP	nukleoprotein (nukleokapsidový protein)
NPP	Národní pandemický plán
NRL/NIC	Národní referenční laboratoř (National influenza centre), označení dle WHO
NRL-NDAI	Národní referenční laboratoř pro patog. aviární influenzu
NS (1, 2)	nestrukturální protein/gen
nt	nukleotid
OIE	International office for epizootic
OIT	Community influenza outbreak investigation team
PA, PB1, PB2	polymerázy RNA
PAHO	Panamerican health organization
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PPEC	Pandemický plán EU (Community influenza pandemic preparedness plan)
PPG	Koordinační skupina Pandemického plánu (Community influenza pandemic preparedness coordination group)
PS NPP	pracovní skupina Národního pandemického plánu
PX	peroxidázový test
RDS	Respiratory distress syndrome (projev šokové plíce)
RNA	ribonukleová kyselina
mRNA	messenger RNA (matrice pro proteosyntézu)
ss	jednovláknitá RNA (z angl. single strand)
RNP	ribonukleoprotein (komplex RNA s proteiny)
SARS	Severe acute respiratory syndrome (těžký akutní respirační syndrom)
SVS	Státní veterinární správa
SVÚ	Státní veterinární ústav
SZO/WHO	Světová zdravotnická organizace
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TNF	Tumor necrosis factor
ÚSP	ústav sociální péče

Zkratky aminokyselin

Ala, A	alanin
Arg, R	arginin

Asn, N	asparagin
Asp, D	kyselina asparagová
Cys, C	cystein
His, H	histidin
Gln, Q	glutamin
GLu, E	kyselina glutamová
Gly, Gg	glycin
Lys, K	lysin
Leu, L	leucin
Pro, P	prolin
Ser, S	serin
Thr, T	treonin
Ura, U	uracil
Val, V	valin

Forma aa/číslo/aa znamená: změnu/substituci jedné aa za jinou aa na určité číslem označené pozici.

Předmluva

Než se v Hongkongu na začátku století začala šířit epizootie ptačího viru chřipky, málokdo věděl, kromě úzké skupiny odborníků, co je to ptačí chřipka. Rozhodně nikdo v té době nepředpokládal, že postupně zachvátí většinu asijských států a během několika měsíců se objeví v dalších kontinentech. Tehdy vzrůstaly obavy z vývoje vysoce patogenního ptačího viru v plně lidský patogen a vybavila se téměř zapomenutá souvislost s ptačím původem pandemií 20. století, včetně tolikrát s obavami citované smrtící pandemie v letech 1918–1919. Od posledních pandemií v roce 1968 a ještě před tím o 10 let dříve – v roce 1957, kdy se objevila zcela nová varianta viru, uplynulo 50 let. Pokud by skutečně platil často udávaný interval mezi dvěma pandemiemi 30–50 let, což je pouhý hypotetický odhad, můžeme být blízko první pandemie 21. století. Situace je ale složitější – chování viru a jeho genetického kódu se nedá předem ani odhadovat, ani vypočítat. Předchozích 50 let přineslo mnoho důležitých poznatků o struktuře a biologii viru chřipky a především objevilo a potvrdilo účast virů ptačí chřipky na vzniku shiftových, pandemických variant, a to včetně té z roku 1918. Ukazuje se ale, že to stále nestačí k tomu, abychom mohli říci, kdy, kde a zda vůbec právě teď dojde k další pandemii. Znalosti o vlastnostech chřipkového viru a o možnostech jeho nevyzpytatelného genomu jsou stále nedostatečné a známe velice málo o genofondu chřipkových virů i o jejich koloběhu v přírodě. Ani teď po desetiletých asijských zkušenostech nevíme, jak se vytvoří patogenní pandemický virus schopný mezilidského přenosu z těch mnoha variant a linií, které se dále šíří v populaci ptáků domácích i volně žijících a dokáží nejen vyhubit tisícíhlavé chovy, ale usmrtit i člověka.

Snaha ukázat výsledky mnoholeté práce desítek badatelů, a to v laboratořích i terénu, kteří stále usilují o každý i sebemenší pokrok v objasnění problémů, které nám zašifrovala příroda, byl jeden z důvodů, proč vznikla tato knížka. Také proto, že se na základech tohoto studia významně podílel i československý tým virologů, veterinářů a ornitologů v národní i mezinárodní spolupráci.

Předkládaná publikace seznámí čtenáře s pozoruhodnou historií vzniku „problému ptačí chřipky“, nebezpečím pandemií a hypotéz jejich vzniku, až po současnou panzoozii způsobenou virem H5N1, která se nesměle ohlásila v roce 1997, ale od konce roku 2003 do prvních měsíců roku 2007 postihla v obrovských rozměrech Asii a rozšířila nebezpečnou nákazu do Afriky, na Střední východ a do Evropy. Časovanou bombu (abych zachovala mediální kolorit) máme tedy přímo v domě. Stamilionové ztráty ekonomické, provázející současnou panzoozii, a zejména onemocnění lidí s vysokou až 70% smrtností je třeba brát vážně; stejné ztráty ekonomické a velmi pravděpodobně i lidské oběti budou provázet každou chřipkovou pandemií. Je proto nutné využít zkušenosti, které jsme nečekaně zís-

kali, a využít možností sice omezených, ale účinných preventivních opatření pro případ humanizace ptačího viru a jeho pandemického rozšíření, a to nejen v současné aktuální hrozbě H5N1, ale i v budoucnosti; nebezpečí nové ptačí varianty nám bude hrozit stále. V jaké podobě, to je stále otázka.

Knih je určena všem, kteří se o tuto problematiku zajímají z obecného zájmu nebo z profesní nutnosti – zdravotnickým a veterinárním pracovníkům, mladým přírodovědcům i státní správě, která by se rovněž měla systematicky na pandemii připravit.

Práce na knize, která by měla uchovat v paměti historii i současně probíhající panzoozii ptačí chřipky, byla velmi náročná, zejména výběr jenom podstatných zpráv ze záplavy informací včetně vědeckých článků, které se v posledních 7 letech rozrostly do nebývalých rozměrů. Zda se mi podařilo připravit srozumitelný přehled od raných začátků problému ptačí chřipky do stále otevřené budoucnosti, necht' posoudí vážený čtenář.

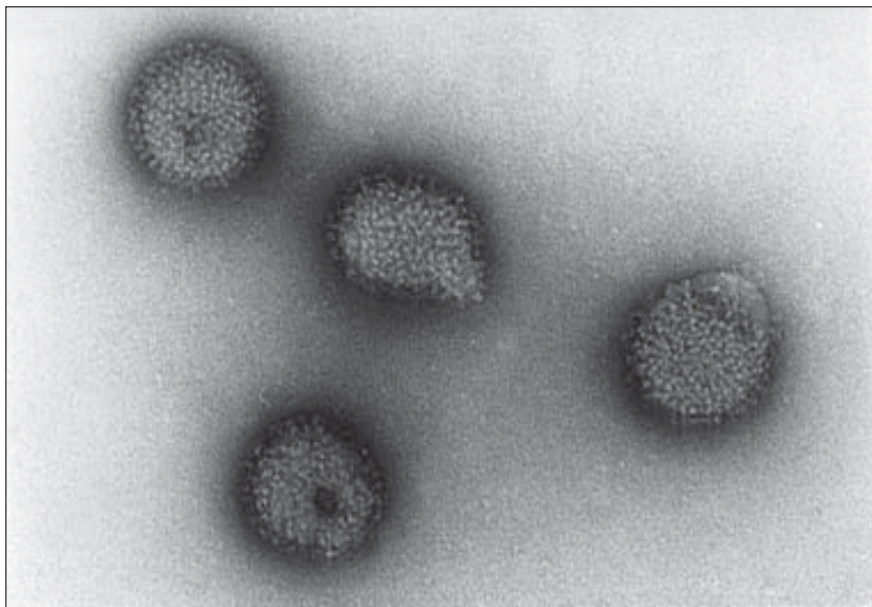
Závěrem musím poděkovat všem, kteří velkou měrou přispěli k tomu, že tato monografie vznikla a byla dokončena. Především děkuji nakladatelství Grada Publishing, recenzentům prof. MUDr. Jiřímu Beranovi, CSc., a prof. MUDr. Vladimíru Vonkovi, DrSc., za cenné připomínky, Dr. Schramlové za poskytnutí elektron-mikroskopického snímku viru chřipky, svým kolegyním z Národního chřipkového centra a z epidemiologického odboru a vedení mého současného pracoviště. Dík patří slečně Vlčkové za trpělivost s přepisováním a opravami textu i dokumentace a také mému manželovi Dr. Štumpovi za pochopení a toleranci.

Běla Tůmová

1 Úvod do problematiky

1.1 Virus chřipky

Viry chřipky patří do čeledi *Orthomyxoviridae* [7, 87], kterou tvoří celkem 4 rody: chřipka A, chřipka B, chřipka C a *Thogovirus*. Viry typu A, které tvoří skupinu nejpočetnější, jsou rozlišeny od typu B a C na základě antigenního rozdílu v NP (nukleokapsidový protein) a proteinech M (matrix a membránový protein). Influenza virus A je dále řazen do různých subtypů podle typu dvou hlavních povrchových glykoproteinů hemaglutininu – HA (nebo H) a neuraminidázy – NA (nebo N). V současnosti je známo celkem 16 subtypů HA a 9 NA, z nichž pouze tři HA a dvě NA se vyskytují u lidí, všechny ostatní jsou součástí skupiny ptačích virů.



Obr. 1.1 *Virus chřipky – elektronoptické zázornění sférické části s glykoproteinovými výběžky HA a NA na obalu viru*

1.1.1 Struktura viru chřipky typu A

Virová částice má pleiomorfní, kulovitý nebo vláknitý tvar o velikosti 80–120 nm. Lipidový obal je odvozený od plazmatické membrány hostitelské buňky. Obal viru je tvořen dvěma hlavními glykoproteiny ve tvaru výběžků ukotvených v lipidové dvouvrstvě o délce 10–14 nm, které tvoří HA a NA, poměr HA a NA je obvykle

Tab. 1.1 Složení genomu viru chřipky typu A; kódované proteiny, typ a funkce jednotlivých částí

Genom, kódované proteiny, typ a funkce jednotlivých částí						
genom		kódové proteiny		počet molekul virionu	typ	funkce
segment	délka	název	délka (aa)			
1	2341	PB2	759	30–60	polymerázový komplex	endonukleáza, zahájení transkripce mRNA
2	2341	PB1	759	30–60		transkripce – syntéza řetězce RNA
3	2233	PA	716	30–60		transkripce – replikace viru, proteolytická aktivita
4	1778	HA	566	500	membránový glykoprotein	adsorbce na buněčné receptory, neutralizační protilátky
5	1565	NP	498	1000	hlavní struktura protein asociující s virovou RNA	v komplexu RNA a transkriptázou umožňuje transport z cytoplazmy do jádra
6	1413	NA	454	100	membránový glykoprotein	enzym štěpící kyselinu sialovou uvolňuje virus z buňky protilátky omezují šíření viru
7	1027	M1	252	3000	strukturální protein pod obalem viru	účast na pučení viru z buňky, největší protein viru
		M2	97	20–60	integrální protein v obalu	iontový kanál
8	890	NS1	230		nestrukturální protein v jádře	inhibuje proces buněčné RNA, transport – sestřih – translace a proteosyntéza
		NS2	121		NEP	export virové RNA z jádra buňky do cytoplazmy

Viry s genomem RNA mají ve virové partikulě vlastní RNA dependentní RNA transkriptázu, která z negativního vlákna RNA přepisuje virovou mRNA, která slouží jako matrice pro syntézu virových proteinů. Syntéza proteinů probíhá v cytoplasmě infikované buňky.

1.1.2 Genom, virové proteiny, jejich funkce a vlastnosti

Základní znalosti funkce a vlastností proteinů jsou postupně měněny nebo doplňovány novými poznatky, které přinesla asijská panzooce ptačí chřipky. Týká se to zejména změn sekvence aminokyselin vnitřních proteinů, které souvisí s chováním a vlastnostmi viru, patogenity, virulence a druhů hostitelů.

Nukleoprotein (NP) je jedním z nejdůležitějších genů, který určuje druhovou specifitu hostitele, kóduje vnitřní – pro typ specifický protein a je značně stabilní, protože není vystaven vnějším tlakům. Lidský NP nashromáždil za 50 let výskytu 39 změn aminokyselin, zatímco ptačích pouze 0–10. Podle složení a pozice aminokyselin lze odlišit kmeny lidské od kmenů ptačích, prasat a koní.

Polymerázy, PB1, PB2 a PA tvoří největší komplex, uplatňují se v replikaci viru a při transkripci RNA a spoluurčují charakter patogenity viru [48].

Hemaglutinin je hlavním proteinem virového obalu, je kódován čtvrtým segmentem genomu a zodpovídá za schopnost virionu aglutinovat červené krvinky (odtud název). Je současně hlavním antigenem, proti nemuž jsou tvořeny obranné virus neutralizační protilátky, které brání nákaze antigeně shodným virem. Je spoluodpovědný za patogenitu, druhovou specifitu viru a za vstup do hostitelské buňky vazbou viru na specifické buněčné receptory. Hemaglutinin je syntetizován jako jedna molekula, tzv. prekurzorový hemaglutinin H0, který vyžaduje posttranslační rozštěpení na subjednotky HA1 a HA2 vzájemně spojené dvěma sulfidovými můstky. Podle charakteru štěpného místa a typu proteáz u ptačích kmenů rozlišujeme tzv. varianty vysoce a níže patogenní (HPAI – high pathogenity avian influenza a LPAI – low pathogenity avian influenza). Běžnou a nejčastější formou viru je varianta LPAI, vstup i replikace viru jsou vázány na buňky respiračního a zažívacího traktu, což je dáno přítomností proteáz serinového typu. Nahromaděním bazických aminokyselin v této oblasti umožní štěpení širokému spektru proteáz (trypsin-like), což viru umožní jeho invazi do celé řady tkání (HPAI).

Vysoce patogenní viry HPAI vyvolávají generalizovanou infekci provázenou vysokou úmrtností. U ptáků postihují všechny orgány [7, 22, 23, 28, 85]. U vodních ptáků, kteří jsou přirozeným rezervoárem virů chřipky, je infekce obvykle asymptomatická a lokalizace viru je většinou omezena na trávicí trakt. Patogenita, virulence a druhová specifita viru je sice kontrolována několika geny, ale HA pravděpodobně hraje v tomto procesu klíčovou roli. Některé úseky tohoto proteinu mohou být určující pro tzv. překročení druhové bariéry, tedy při adaptaci viru ze zvířecího rezervoáru na člověka. HA patří k nejdůležitějším zmapovaným proteinům viru chřipky a jsou známy úseky HA, které vstupují při adsorpci do vazby s povrchovými receptory na hostitelských buňkách. Tento proces je považován za určující pro vznik pandemické varianty [85]. Receptory pro vazbu virů jsou specifické a odlišné pro ptačí i lidské typy buněk. Virus ptačí či koňské chřipky se váže na receptor s alfa(2,3)-kyselinou sialovou, lidské viry se váží na receptory tvořené kyselinou sialovou v alfa (2,6) spojení s galaktózou postranního cukerného řetězce. Prase má na povrchu buněk trachey receptory s oběma typy vazby [7]. Toto zjištění podporovalo hypotézu o roli prasete jako tzv. „míchací nádoby“, vhodné pro vznik pandemického kmene. Prase je tedy možno infikovat jak viry ptačími, tak viry lidskými. Klíčovým místem HA (ne však jediným) je aminokyselina na pozici 226, která určuje predominantní afinitu na ptačí (glutamin), respektive savčí (leucin) typ povrchového receptoru. Přítomnost glutaminu na pozici 226 ale neznamená, že virus není schopen infikovat člověka za bližší nejasných podmínek. Tento fakt potvrzují opakované případy (od roku 1997) infekce člověka virem ptačí chřipky subtypu H5N1 v jihovýchodní Asii, což zpochybňuje hypotézu nutného mezičlánku (prasete) při přenosu viru chřipky na člověka. Na tomto místě je třeba podotknout, že celý proces infekce je komplexní, proto i vznik pandemické varianty je pravděpodobně výsledkem celého souhrnu postupných adaptačních změn.

Neuraminidáza

Jedná se o integrální membránový protein hrající roli v sestavení kompletní virové částice a jejího následného uvolnění z buňky. Protilátky tvořené proti tomuto antigenu i proti HA jsou virus neutralizační.

Nukleokapsidový protein (NP)

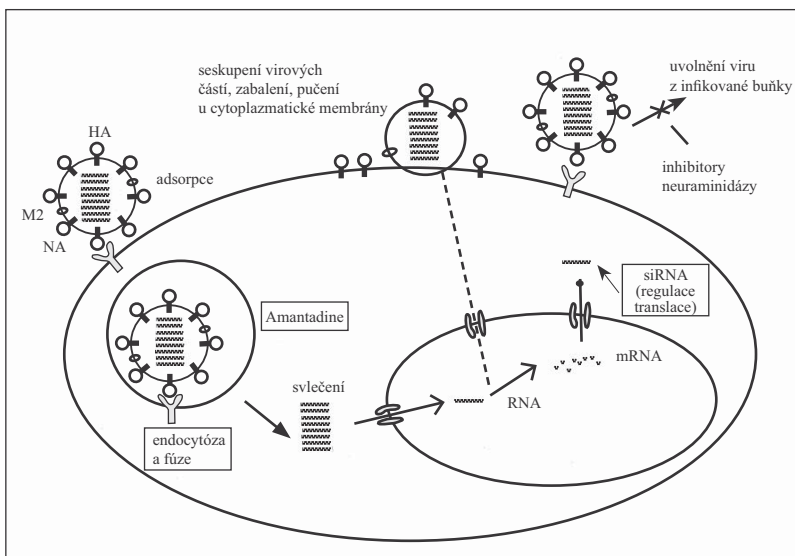
Je složkou zodpovědnou za aktivaci imunitní reakce zprostředkované cytotoxickými lymfocyty T. Po syntéze v cytoplazmě putuje NP do jádra, kde tvoří komplex s virovou negativní genomovou RNA a zahajuje transport RNP do cytoplazmy. Zdá se, že tento protein hraje klíčovou roli v regulaci virového cyklu, a to přepínáním z replikační fáze do fáze sestavení viru.

Matrix protein M2

Tvoří iontový kanál v membráně viru a je cílem pro specifickou terapii, amantadin, resp. Rimantadin. Hraje zřejmě roli ve svlečení viru, tedy uvolnění RNP do cytoplazmy.

Protein NS1

Protein NS1 je exprimován ve velkém množství v infikovaných buňkách, ale je prakticky nedetekovatelný ve virové partikulaci, je nestrukturním multifunkčním proteinem zodpovědným za regulaci životního cyklu viru, ovlivňuje cytokinovou reakci organismu a hraje tak významnou roli v patogenezi nemoci.



Obr. 1.3 Životní cyklus a replikace viru

Nestrukturní protein NS2

Obvykle se nachází v komplexu s matrixovým proteinem M1 a je považován za dalšího prostředníka zodpovědného za export RNP z jádra infikované buňky do cytoplazmy v průběhu virové replikace. Ve virionu se vyskytuje jen v limitovaném množství a někdy se označuje jako NEP – nukleus export protein.

Adsorpce a vstup viru do buňky a jeho „svlečení“

Virus se váže na specifické buněčné receptory (adsorpce) a do buňky vstupuje virus endocytózou zprostředkovanou receptorem. Dochází k vazbě HA na mukoproteiny s koncovou N-acetylovou neuraminidovou kyselinou na jejich proximálním konci (tzv. NANA). Internalizované vehikuly (váčky) fúzí s endozomy, tedy s buněčnými organelami s kyselým vnitřním prostředím, kde dochází ke svlečení viru a následně k uvolnění nukleokapsidy do cytoplazmy. RNP pak vstupuje do buněčného jádra, kde dochází k vlastní virové replikaci (viz obrázek 1.3).

Import RNP do jádra, replikace viru A

Nukleokapsida (RNP) je transportována do jádra infikované buňky, kde dochází k aktivaci virového enzymatického aparátu a k vlastní replikaci viru (tvorba RNA). Veškerá syntéza RNA probíhá v jádře infikované buňky, a z části využívá hostitelský aparát. Virus je zcela adaptován na specifický eukaryotický transkripční systém. Prostřednictvím komplexu replikačních enzymů (PB 2, PB1, PA), které jsou součástí virové partikule, dokáže zcela využít hostitelský aparát pro zahájení syntézy mRNA (tedy matrice pro virové proteiny) a pro replikaci vlastní virové jednořetězové (ss) RNA. Z každého vlákna ssRNA- se přepisují 2 typy pozitivní RNA; mRNA je exportována do cytoplazmy, adenylována a slouží jako matrice pro překlad proteinů a dále kompletní vRNA. Ta pak představuje tzv. progenomovou matrici pro syntézu negativního vlákna genomové RNA, která je asociována s proteiny a exportována do nově se tvořící virové partikule

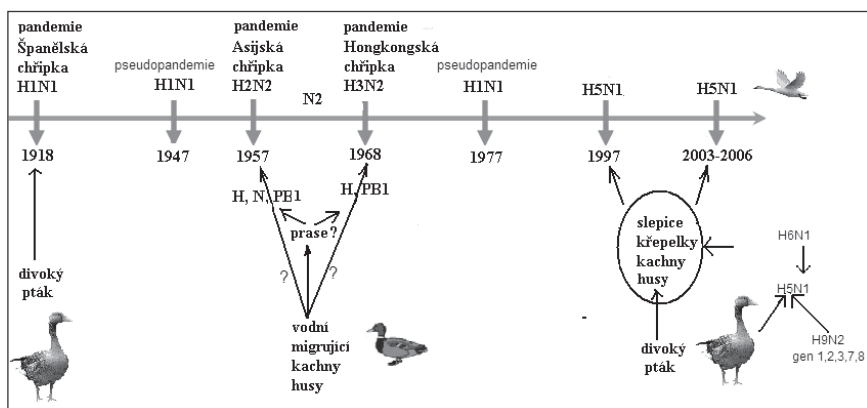
Tvorba virové partikule a její pučení a uvolnění viru z hostitelské buňky

Novotvořené RNA jsou exportovány z jádra do cytoplazmy (NS1, NEP). V cytoplazmě dochází k syntéze proteinů pomocí buněčného aparátu na membránách endoplazmatického retikula a k jejich tzv. posttranslační modifikaci, např. přidání cukerné složky, glykosylaci za pomoci buněčného aparátu (Golgi – GA). Jednotlivé komponenty jsou dopraveny prostřednictvím GA pod buněčnou membránu, kde dochází k seskupení všech virových složek (tedy segmentů RNP, NA, HA, M2), k pučení a následnému uvolnění viru z buňky. Proces vlastní tvorby virové částice není ještě definitivně znám, ale je zásadní pro vznik nového subtypu a tedy pro vznik případné pandemické varianty. Původní domněnka, že zabalení segmentů do virionu je náhodným procesem, není platná, čemuž odpovídá i chování viru. Na správném zabalení se zřejmě podílí cytoplazmatická HA [5] a za uvolnění viru z povrchu infikované buňky je zodpovědná NA. Uvolnění kompletního viru

z buňky zabraňují inhibitory NA, syntetické látky tohoto typu se používají k léčbě a prevenci chřipky – nejznámější preparáty na této bázi jsou zanamivir a oseltamivir (komerční název preparátů je Relenza a Tamiflu).

Antigenní shift versus antigenní drift, vznik pandemické varianty

Mechanismus replikace a následného sestřihu RNA přispívá k vysokému počtu mutací viru a tedy k možnosti jeho úniku obranným mechanismům hostitele. V podstatě jde o výměnu jednotlivých aminokyselin ve struktuře genu procesem nazývaným drift, což je postupná změna antigenních vlastností viru v průběhu cirkulace viru v lidské populaci. Segmentovaný genom a poměrně široké hostitelské spektrum viru chřipky typu A u lidí a zvířat umožňuje tvorbu zcela nových kombinací genů (shift), čímž vznikne náhle virus nových antigenních nebo biologicky odlišných kvalit. K takzvanému antigennímu shiftu může dojít při smíšené infekci jedné buňky dvěma a více subtypy viru. Při procesu balení virové částice může dojít ke kombinaci různých segmentů RNP v rámci tvorby jedné partikule a tedy k zabalení cizích genů do příslušné virové partikule (tzv. reassortment). Při zabalení jiného typu HA či NA dochází k dramatické změně antigenních vlastností viru, popřípadě hostitelského spektra a virulence (díky novému typu HA) a tedy ke vzniku zcela nové varianty viru v populaci – antigenní shift [10]. Důsledkem antigenního shiftu může být (a opakovaně byl) vznik pandemických variant, jak znázorňuje obrázek 1.4.



Obr. 1.4 Vznik shiftových pandemických variant viru chřipky

V pandemii roku 1918 není jasné, zda všech 8 segmentů RNP bylo přeneseno z ptačího rezervoáru, a rovněž role prasete v transmissi viru na člověka není prokázána; virus této takzvané pandemie „Španělské chřipky“ (označovaný dnes jako H1N1) byl pravděpodobně zavlečen vojáky v době 1. světové války

ze Severní Ameriky do Evropy a současně se začal šířit po celém světě. V roce 1957 tzv. „Asijský pandemický virus“ získal kromě PB1 další dva důležité nové geny z ptačího viru, takže mohla vzniknout dokonalá shiftová varianta A(H2N2) s oběma zcela novými obalovými antigeny H a N. Po adaptaci na člověka byla schopna snadno vyvolat pandemii ve zcela neimunní světové populaci. V roce 1968 se objevila pandemie tzv. Hongkongské chřipky A(H3N2), která měla pouze 2 geny PB1 a HA z ptačího zdroje a N2 shodný s kmeny z předchozí pandemie [2]. Tento shift vznikl velmi pravděpodobně reasortmentem ptačího a lidského kmeny. S rozšířením subtypu A(H3N2) vymizel subtyp A(H2N2). V roce 1977 došlo k epidemii tzv. „Ruské chřipky“ a pandemickému rozšíření staronového subtypu A(H1N1); původ a způsob vzniku nebyl jednoznačně objasněn. Nevylučuje se ani únik viru z laboratoře při používání živé protichřipkové vakcíny. V současnosti v lidské populaci cirkulují oba subtypy A(H1N1) a A(H3N2) a jejich téměř 40letý výskyt provázejí stále driftové změny, které při velkých driftech komplikují ochranný efekt vyráběných vakcín [4, 9, 10].

Mutační potenciál chřipkového viru je značný u lidských kmenů, ale ptačí kmeny se z evoluční stáze do vývojové fáze dostávají teprve při přechodu na nového hostitele; příkladem mohou být kmeny H5N1 v epizootiích u kuřat v Hongkongu a dalších zemích [15a]. Mechanismus, který tento proces přechodu na nového hostitele (převážně savce) ovlivňuje, není zcela jasný, předpokladem jsou změny ve struktuře HA a NA, které byly prokázány nejen u kmenů H5, H7 a H9 [33], ale i v dalších genech. Vysoká variabilita a časté změny obalových antigenů, jako je antigenní drift, což je typická vlastnost lidských a některých savčích kmenů (prasat a koní), nebyla potvrzena u ptačích virů, které nejsou ovlivňovány při své replikaci selekčním tlakem protilátek. Změny sekvencí aminokyselin proteinů nacházejících se jak na povrchu, tak uvnitř virionu byly však prokázány, ale nejsou vždy provázeny odlišným projevem viru v patogenезi onemocnění. Výměna antigenů HA a NA je ale naopak velmi častá a logicky vyplývá ze způsobu života ptáků a časté příležitosti k nové infekci odlišnými kmeny i subtypy; ty jsou zjišťovány v endemických oblastech a u volně žijících druhů. Změny pouze vnitřních genů bez změny HA a NA bývají výsledkem reasortmentu a nebo změn v uspořádání aminokyselin, jak byly zaznamenány při četných epizootiích v jihovýchodní Asii u kmene H5N1 a H9N2. Variabilitě podléhá také polymerázový komplex, zejména protein PB1 a PB2. Ptačí PB1 se nalézá v obou pandemických kmenech z let 1957 a 1968, což jsou, jak bylo potvrzeno, reasortanty.

Viry chřipky (včetně ptačích) byly původně klasifikovány pouze podle antigenů HA a NA. Teprve rozvoj molekulárně biologických metod analýzy genomu umožnil přesnější určení především ptačích virů izolovaných z různých druhů ptáků a savců. Tyto analýzy tak umožnily nahlédnout do vývoje a příbuznosti genů kódujících nejen obalové, ale i vnitřní proteiny a pomohly pochopit vztahy mezi

kmeny z různých hostitelů a oblastí. Velice to posunulo proniknutí do ekologie viru v celé její složitosti tak, jak je uvedeno v následující části 2.4. Nicméně zcela nové zkušenosti z let 1997–2006 ukázaly, že stále známe pouze fragment z toho, co bychom chtěli a potřebovali vědět pro pochopení vzniku shiftových variant patogenních pro člověka a použitelných pro lepší a účinnější prevenci pandemií chřipky.

Zásadně se například změnil názor na vznik pandemie 1918 a prvních postpandemických kmenů izolovaných z lidí a prasat; analýzy z rekonstruovaných kmenů z plic zemřelých osob v pandemii roku 1918 naznačují, že jejich ptačí původ je nejpravděpodobnější.

1.2 Pandemie

Podle starých historických pramenů se pandemie objevují 3–4krát za století, některé prameny uvádějí rozpětí 30–50 let. Za současných znalostí je to nutno brát jako čistě hypotetický odhad, i když je založen na základě rozboru starých písemných údajů [41]. Teprve ve druhé polovině 20. století byl celosvětový výskyt chřipky odborně dokumentován a přinesl ověřená data, z nichž můžeme vycházet. Mimo jiné i to, že podle definice byly skutečné pandemie v minulém století dvě, respektive tři; v letech 1957 a 1968 s ohniskem v Číně a historicky doložená a uznávaná pandemie v rozmezí let 1918–1920. Podle některých zpráv i tato pandemie vznikla v Číně, odkud byla zanesena migrací čínských přistěhovalců za prací do Ameriky, kde se pak začala šířit a odtud i se dostala i do Evropy. Název „Španělská“ je zcela mylný, sem totiž chřipka dorazila, když už byly lokální výskyty potvrzeny v přístavech Francie a Anglie. Další dva celosvětové výskyty 1946–1948 a 1976 až 1977 jsou dodnes sporné, protože nespĺňují všechna kritéria pandemií. V roce 1946 (po 2. světové válce) byl první virus izolován v Austrálii a jeho původ z Číny byl doložen později, což nebylo považováno za důvěryhodné; šíření bylo pomalé a ne explozivní [81], průběh onemocnění byl mírný s nízkou mortalitou [82]. Definitivně se později ukázalo, že virus vznikl extenzivní mutací z předchozího subtypu H1, dříve také označovaného H0. Návrat H1N1 v roce 1977 startoval ze tří provincií v Číně. K nám se informace dostala se zpožděním z Ruska; postižení byli mladiství pod 20 let a virus byl identifikován jako antigenně shodný s kmeny z let 1950–1956. Při znalostech vývoje driftových změn u lidských chřipkových virů a relativní stabilita ptačích kmenů vylučují uznání této, byť celosvětově rozšířené epidemie, za pandemii. Navíc se mohlo jednat o kmen, který se podle citovaných informací [6] dostal do populace při vakcinaci vojsk na Dálném Východě, a to živou protichřipkovou vakcínou. Uvádí se mimo jiné ještě jedna možnost, jak může virus v zakonzervované podobě přežít, a to je ve zmrzlém stavu [35].

Z původních dvou hypotéz vzniku pandemie se v současnosti uvažuje výhradně o ptačím původu příštího pandemického kmene. Francisova hypotéza (opakování