

# Molekularna varijabilnost virusa gripe

---

Čerina, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:268489>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno - matematički fakultet  
Biološki odsjek

**MOLEKULARNA VARIJABILNOST VIRUSA GRIPE**  
**MOLECULAR VARIABILITY OF INFLUENZA VIRUS**

SEMINARSKI RAD

Dora Čerina  
Preddiplomski studij biologije  
(Undergraduate Study of Biology)  
Mentor: doc.dr.sc. Silvija Černi

Zagreb, 2018

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. VIRIS GRIPE .....	2
2.1. Struktura viriona .....	2
2.2. Replikacijski ciklus.....	4
2.3. Nomenklatura .....	5
2.4. Epidemiologija .....	6
3. MEHANIZMI ANTIGENSKE VARIJABILNOSTI .....	7
3.1 Antigensko skretanje .....	7
3.2. Antigenska izmjena .....	8
3.3. Pandemije virusa gripe .....	8
3.3.1. Pandemija svinjske gripe (H1N1) 2009. godine.....	9
3.4. Ptičja gripa .....	11
3.5. Čimbenici koji utječu na razvoj pandemičnih sojeva .....	12
4. LIJEČENJE, PREVENCIJA I KONTROLA .....	13
4.1. Cjepivo .....	13
4.2. Antivirusni lijekovi .....	13
5. ZAKLJUČAK.....	14
6. LITERATURA .....	15
7. SAŽETAK.....	17
8. SUMMARY.....	18

## 1. UVOD

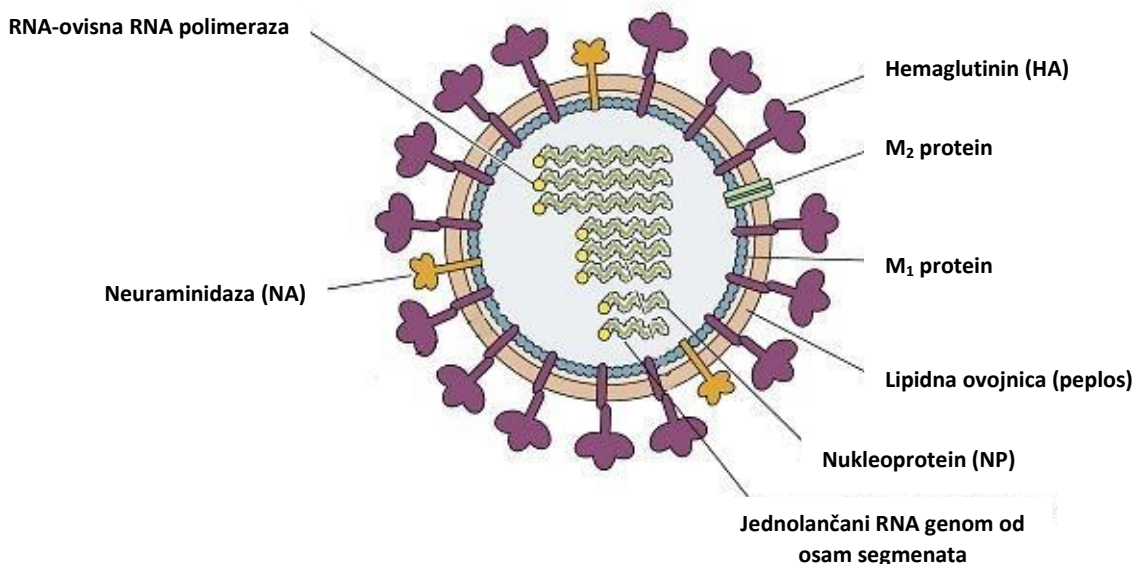
Gripa je kozmopolitska virusna bolest koja se pojavljuje sezonski na gotovo svim kontinentima u obliku akutne bolesti dišnog sustava od koje se mogu zaraziti sve dobne skupine. U svijetu se svake godine pojavi 3 do 5 milijuna slučajeva bolesti gripe, te oko 650 000 smrtnih slučajeva ([http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))). Jedna od najpoznatijih svjetskih pandemija, je ona španjolske gripe koja se pojavila 1918. godine od koje je umrlo oko 40 milijuna ljudi. Smatra se da je u toj pandemiji umrlo više ljudi nego u Prvom svjetskom ratu (Murray i sur., 2016.).

Uzročnici gripe pripadaju porodici virusa pod nazivom *Orthomyxoviridae*. Unutar nje razlikujemo tri roda virusa gripe: A, B i C. Virus tipa A prirodno uzrokuje bolesti kod akvatičkih ptica, iako može zaraziti različite sisavce, uključujući i čovjeka, konja ili svinju. Tip B inficira samo ljude, a tip C može inficirati i svinje te uzrokuje puno blaže simptome od ostalih tipova. Najčešći simptomi su povišena temperatura, bol u mišićima, glavobolja, te upaljeno grlo i kašalj. Čestice virusa gripe karakterizira vanjski proteinski omotač sa specifičnim glikoproteinima, unutar kojeg se nalazi segmentirani jednolančani RNA genom. Segmentirani genom omogućava ovim virusima brze antigenske promjene izmjenom segmenata između ljudskih i životinjskih sojeva prilikom koinfekcije. Izražena genska nestabilnost razlog je pojave godišnjih epidemija, ali i periodičkih pandemija zarazom gripe (Zambon, 1999.). Zbog širokog kruga domaćina, te velike antigenske varijabilnosti virusa tipa A u daljnjem tekstu biti će pretežito riječ o njemu.

## 2. VIRUS GRIPE

### 2.1. Struktura viriona

Virion gripe može biti kuglastog do izduženog oblika, promjera od 80 do 120 nm. Genom virusa sastoji se od jednolančane RNA molekule negativnog smisla podijeljene u sedam (virus gripe C) ili osam segmenata (virus gripe A i virus gripe B). Segmenti variraju u veličini od 890 do 2341 nukleotida (Ghedini i sur., 2005.). Svaki segment kodira po jedan virusni protein (PB2, PB1, PA, HA, NP i NA), osim segmenata 7 i 8 koji svaki kodira po dva proteina ( $M_1$  i  $M_2$ , te  $NS_1$  i  $NS_2$ ). Svaki segment virusne RNA upakiran je s nukleoproteinom NP, dok je na krajevima svakog segmenta dodatno vezan i enzim RNA-ovisna RNA polimeraza građena od podjedinica PB1, PB2 i PA (Bouvier & Palese, 2008.). Ovako građen ribonukleoprotein okružen je vanjskim proteinskim omotačem (tzv. matriks) građeni od proteina  $M_1$ . Površina viriona građena je od lipidne ovojnice (peplos) na čijoj se površini nalaze dva tipa glikoproteinskih izdanaka (peplomere): hemaglutinin (HA) i neuraminidaza (NA) duljine 10 do 14 nm, te transmembranski protein  $M_2$  (Slika 1.). Protein  $M_2$  važan je u procesu oslobađanja nukleokapside u citoplazmu stanice domaćina prilikom ulaska virusa endocitozom (Presečki i sur., 2002.).  $NS_1$  i  $NS_2$  su nestrukturani proteini s različitim bitnim funkcijama u replikacijskom ciklusu. Djeluju na regulacijske proteine za inicijaciju translacije virusne mRNA, ali i u sprječavanju apoptoze stanice (Klenk, Garten & Matrosovich, 2011.).



**Slika 1.** Pojednostavljeni prikaz strukture virusa gripe A. Preuzeto i prilagođeno sa: <http://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus/>

Hemaglutinin (HA) je štapićasti trimer koji čini oko 40% mase virusa, te igra ključnu ulogu u patogenezi gripe. Ima sposobnost spajanja za receptore na ciljnoj stanici i pomaže u fuziji virusne ovojnice sa staničnom membranom. Pomoću HA virusne čestice se mogu pričvrstiti na eritrocite ptica i sisavaca i potaknuti agregaciju crvenih krvnih stanica. Taj proces se zove hemaglutinacija, te se može specifično inhibirati antitijelima. Ova inhibicija je osnova testa za identifikaciju virusa gripe (Jong i sur., 2000.). Prilikom infekcije i sinteze proteina, početni oblik HA<sub>0</sub> se veže na staničnu membranu domaćina pomoću kratkog transmembranskog područja na C kraju. U završnoj fazi formiranja viriona, potrebno je da dođe do proteolitičkog cijepanja specifične regije HA pomoću staničnih enzima, što rezultira nastajanjem dvije podjedinice HA<sub>1</sub> i HA<sub>2</sub> povezane disulfidnim mostom. Tek u takvom obliku HA postaje biološki aktivan za sljedeću infekciju (Zambon, 1999.). Malo se zna o enzimima koji aktiviraju HA u prirodnom okruženju. Smatra se da tu funkciju vrše dvije serinske proteaze TMPRSS2 i HAT iz ljudskog dišnog epitela (Klenk, Garten & Matrosovich, 2011.).

Neuraminidaza (NA) je tetramer sa ulogom u odvajanju viriona prilikom izlaska iz stanice pupanjem (Murray i sur., 2016.). Ova funkcija sprječava gomilanje virusa i ubrzava kretanje virusa kroz sloj mukoze epitelnog tkiva (Matrosovich, 2004.). Za razliku od virusa gripe A i B, tip C na površini virusne ovojnice ima samo specifičan glikoprotein hemaglutinin (HEF), a neuraminidaza mu nedostaje (Rappuoli & Del Giudice, 2011.).

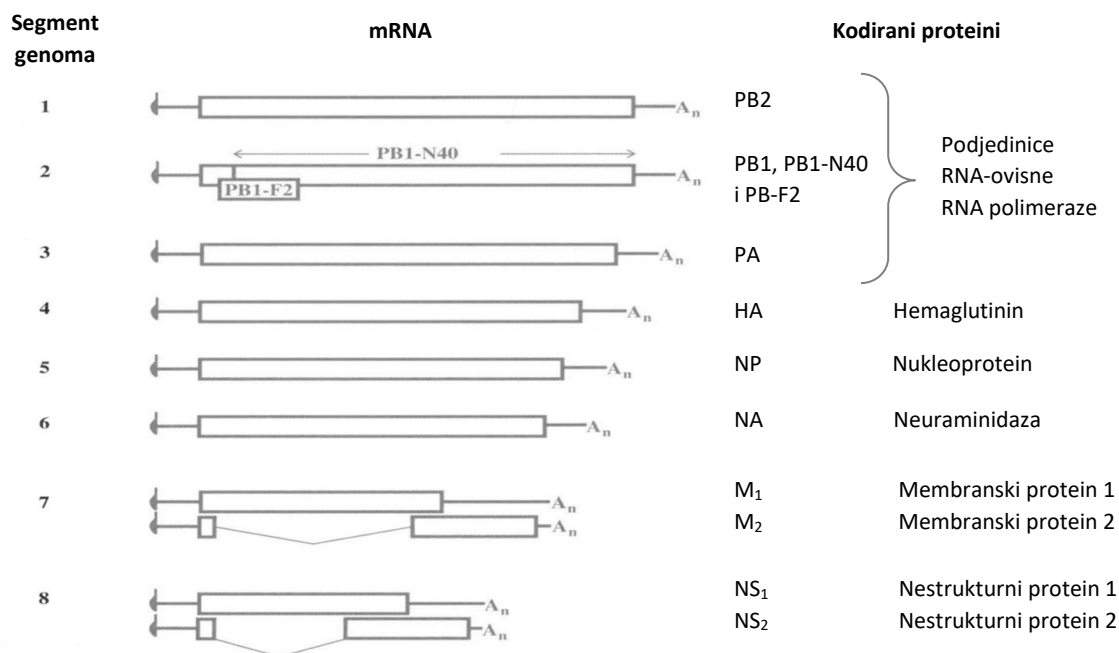
Danas je poznato 15 tipova HA i 9 tipova NA, što omogućuje 135 mogućih kombinacija. Različiti podtipovi virusa gripe A mogu se razlikovati pomoću ova dva antigena, a najpoznatiji tipovi hemaglutinina koji uzrokuju bolesti kod ljudi su H1, H2 i H3, te N1 i N2 tip neuraminidaze (Nelson & Williams, 2014.). Poznato je da su vodne ptice reda *Anseriformes* (patke i guske) i *Charadriiformes* (galebovi i močvarni kameničari) prirodni domaćini virusa gripe A. Od 135 mogućih kombinacija podtipova, 105 ih je nađeno u pticama (Klenk, Wolfgang & Matrosovich, 2011.).

## 2.2. Replikacijski ciklus

Infekcija počinje vezanjem virusnih HA za N-acetilsijaličnu kiselinu na glikoproteinima membrane epitelnih stanica dišnog sustava. To vezanje omogućeno je postojanjem specifičnog „džepa“ na molekuli HA, koji veže različite strukture sijalične kiseline što determinira koju vrstu organizma određeni podtip virusa može inficirati. Nakon adsorpcije nastupa endocitoza, u kojoj se virus obavija staničnom membranom i formira endosom. Niske pH vrijednosti u endosomu aktiviraju HA na virusnoj ovojnici, nakon čega nastupa fuzija ovojnice i membrane endosoma. To dovodi do konformacijske promjene  $M_2$  proteina što rezultira ulaskom protona u unutrašnjost virusne čestice (Carter & Saunders, 2013.). Zakiseljavanje uzrokuje odvajanje proteina  $M_1$  od ribonukleoproteina i raspad samog virusnog omotača, te se virusna nukleokapsida otpušta u citoplazmu (Bouvier & Palese, 2008.).

Za razliku od ostalih virusa, nukleokapsida virusa gripe prenosi se u jezgru stanice domaćina (Murray i sur., 2016.). Unutar jezgre pridruženi kompleks RNA-ovisne RNA polimeraze započinje transkripciju negativnih segmenata virusne RNA u pozitivne RNA koje imaju dvije sudbine: služiti će kao mRNA za translaciju virusnih proteina ili kao komplementarna RNA koja služi kao kalup za transkripciju puno novih kopija virusnih RNA negativnog smisla. Poli(A)-rep na 3' kraju virusne mRNA je kodiran od strane virusnog genoma sa slijedom od 5 do 7 uracila, dok se kapa na 5' kraju uzima s pre-mRNA stanice domaćina (Bouvier & Palese, 2008.).

Zrele mRNA se u citoplazmi transliraju u proteine (Slika 2.). Proteini virusne ovojnice HA, NA i  $M_2$  se sintetiziraju na ribosomima vezanim za endoplazmatski retikulum, nakon čega se sklapaju i prenose u Golgijev kompleks gdje prolaze posttranslacijske modifikacije. Sva tri proteina imaju signalne sljedove koji ih usmjeravaju prema staničnoj membrani. Negativni segmenti RNA sintetizirani u jezgri udružuju se sa kompleksom RNA-ovisne RNA polimeraze i NP proteinima.  $NS_2$  protein olakšava prijenos novostvorene nukleokapside do  $M_1$  proteina na citoplazmatskoj strani membrane koji povezuje segmente sa virusnim membranskim proteinima. Signali na krajevima RNA osiguravaju da se samo jedna kopija svakog segmenta inkorporira u novi virion (Carter & Saunders, 2013.).



**Slika 2.** Deset različitih mRNA nastaju iz osam segmenata genoma virusa gripe A. Translacijom svake mRNA nastaje deset proteina, osim kod segmenta 2 čijom translacijom mogu nastati tri proteina: PB1, PB1-N40 (skraćena verzija PB1 na N-terminalnom kraju) i PB-F2 (kodirana kod većine virusa, ali ne i svih). Preuzeto i prilagođeno prema: Carter & Saunders, 2013.

Ciklus virusa završava formiranjem zrelih virusnih čestica koje pupanjem izlaze iz domaćinske stanice. Nakon što se virion odvojio od stanice ostaje kratko vezan preko HA na glikoproteine stanice sve dok NA ne pocijepa terminalne sijalične kiseline i tako omogući potpuno odvajanje (Bouvier & Palese, 2008.).

### 2.3. Nomenklatura

Virusni sojevi gripe A klasificiraju se prema sljedećim karakteristikama: (1) tip virusa, (2) lokacija gdje je virus prvi put izoliran, (3) mjesec i godina izolacije virusa i (4) tip HA i NA. Na primjer, A/Bangkok/1/79 (H3N2) što označava da je virus gripe A prvi put izoliran u gradu Bangkoku u siječnju 1979. godine i da sadrži hemaglutinin tip H3 i neuraminidaze tip N2 antigen (Murray i sur., 2016.).



## 2.4. Epidemiologija

Virus se širi aerosolom, stoga se lako prenosi pričanjem i kašljanjem. Na infekciju su jednako osjetljive sve dobne skupine, no mala djeca, osobito predškolske dobi najčešće obolijevaju. Teške komplikacije gripe prisutne su u dojenčadi, starijih od 60 godina, te u bolesnika koji boluju od kroničnih srčanih, plućnih i metaboličkih bolesti (Presečki i sur., 2002.).

Virus gripe svake godine uzrokuje epidemije ili sporadične infekcije, a tijekom prošlih 100 godina uzrokovao je čak pet pandemija. Pandemije ove respiratorne bolesti se javljaju kada se pojavi virus gripe koji nije prije kružio među ljudima i na koju većina ljudi nema imunitet. Najčešće započinju iz jednog uskog geografskog područja gdje dođe do antigenske promjene virusa, te se očituju u brzom širenju uzročnika u gotovo sve zemljopisne regije i može uzrokovati bolest globalnih razmjera. Pandemije su najčešće uzrokovane virusom gripe tipa A, dok tip B uzrokuje lakše infekcije i smatra se da ne uzrokuje pandemije. Bolesti uzrokovane virusom tipa C su većinom blage i ne povezuju se sa epidemijama (Nelson & Williams, 2014.). Iako je prvi virus gripe izoliran tek 1933. godine postoje opisi epidemija i pandemija u zadnja četiri stoljeća (Presečki i sur., 2002.). Vjerojatno najpoznatija globalna pandemija je španjolska gripa H1N1 koja je pogodila svijet 1918. godine. Nakon nje pojavile su se još neke pandemije: 1957. godine azijska gripa (H2N2), 1968. godine Hong Kong gripa (H3N2), 1977. godine ruska gripa (H1N1), te 2009. godine svinjska gripa (H1N1) (Nelson & Williams, 2014.).

Zaraze gripom brojnije su tijekom zimskih mjeseci jer niske temperature i manja vlaga stabiliziraju sam virus. Zbog toga godišnje epidemije imaju predvidljiv obrazac. U umjerenom klimatskom pojasu na sjevernoj hemisferi sezonske gripe traju od mjeseca studenog do ožujka, dok na južnoj hemisferi traju od svibnja do rujna. U tropskim i suptropskim krajevima epidemije se pojavljuju u vlažnom dijelu godine, te se smatra da upravo cirkulacija virusa u ovim područjima povezuje umjerena područja dviju hemisfera. Iako u godinama pandemije umre veliki broj ljudi, puno više smrti uzrokuje upravo pojava tog novog soja. Tako je u pandemiji virusa H3N2 1968. godine u Sjedinjenim Američkim Državama umrlo oko 34 000 ljudi, ali uzrokovao je ukupno više od 300 000 smrti u godišnjim epidemijama tijekom 21 godine, koliko je i cirkulirao ovaj soj virusa (Nelson & Williams, 2014.). Prema podacima na stranici Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, procjenjuje se da u Hrvatskoj zbog gripe umire do 500-tinjak osoba godišnje, od kojih samo manji broj bude i službeno prijavljen. Najviše prevladava virus gripe B (72 %) i to linija Yamagata, dok je među uzorcima s potvrđenim

virusom gripe A, 60% je H3N2, a 40% H1N1 (<https://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/gripauhrvatskojusezoni2017201814-1-2018/>).

Svaka epidemija i pandemija variraju po brojnosti oboljelih i jačini infekcije. Određene su stupnjem antigene varijabilnosti novog virusa, njegove virulentnosti i mogućnosti prijenosa, te razinom postojećeg zaštitnog imuniteta kod populacije (Nelson & Williams, 2014.).

### **3. MEHANIZMI ANTIGENSKE VARIJABILNOSTI**

Nakon što je cirkulirao nekoliko godina u ljudskoj populaciji, određeni podtip virusa gripe se suočava s stvorenim specifičnim imunitetom razvijenim u prethodnoj infekciji istim podtipom. Kako bi zaobišao stvoren imunitet virus mora pokazivati varijabilnost u antigenima koje prepoznaje ljudski organizam (Jong i sur., 2000.)

Povremene antigenske promjene podtipova virusa dešavaju se na hemaglutininu i neuraminidazi, neovisno jedne o drugima. Te promjene mogu biti manje, odnosno djelomične ili cjelovite. Ako dođe do mutacije u genu za određenu aminokiselinu u polipeptidnom lancu HA ili NA tada govorimo o antigenskom skretanju. Dok su druge promjene, tzv. antigenske izmjene, rezultat pseudorekombinacije genoma različitih sojeva virusa, često uključujući i životinjske (Murray i sur., 2016.) .

#### **3.1. Antigensko skretanje**

Antigensko skretanje obuhvaća manje promjene u površinskim glikoproteinima, antigenima HA i NA, te su uzrok gotovo svih sezonskih epidemija virusa gripe. Ovaj proces se može dešavati i kod virusa tipa A i B. Javlja se zbog relativno velike učestalosti spontanih mutacija RNA virusa. RNA-polimeraza je sklonija pogreškama od DNA-polimeraze, jer nema mehanizama za provjeru točnosti replikacije (5'-3' egzonukleazna aktivnost). Nakon infekcije u vrlo kratkom vremenu replicira se čitav genom virusa, no zbog te niske točnosti replikacije veće su vjerojatnosti da će doći do promjene u sekvenci aminokiselina. Ako je neka promjena za virus povoljna, ona će se zadržati i omogućiti će virusu veću infektivnost (Murray i sur., 2016.). Zbog akumuliranja promjena aminokiselina, može se reći da antigeni „skrenu“ iz jednog oblika u drugi koji je manje prepoznatljiv domaćinu (Boni, 2008.) Visoke stope mutacije vidljive su u pet epitopa HA koje okružuju „džep“ specifičan za vezanje na glikoproteine stanica. Taj dio HA prepoznaje imunološki sustav, te proizvodi posebna

antitijela koja se vežu i blokiraju ih. Smatra se da nakon 10 do 30 godina većina ljudske populacije razvije antitijela na određeni virusni soj, što dodatno pojačava selekcijski pritisak za nastanak novih varijanti (Nelson & Williams, 2014.).

Zbog antigenskih skretanja virusa postoji potreba za ažuriranjem cjepiva protiv gripe gotovo svake godine. Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization, WHO) provodi globalni nadzor u svrhu ranijeg otkrivanja novih varijanti ([http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/en/](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/en/)). Proučavanje promjena virusa od jedne epidemije do druge, može pomoći razumijevanju mehanizama koji potiču dugoročnu evoluciju gripe (Boni, 2008.).

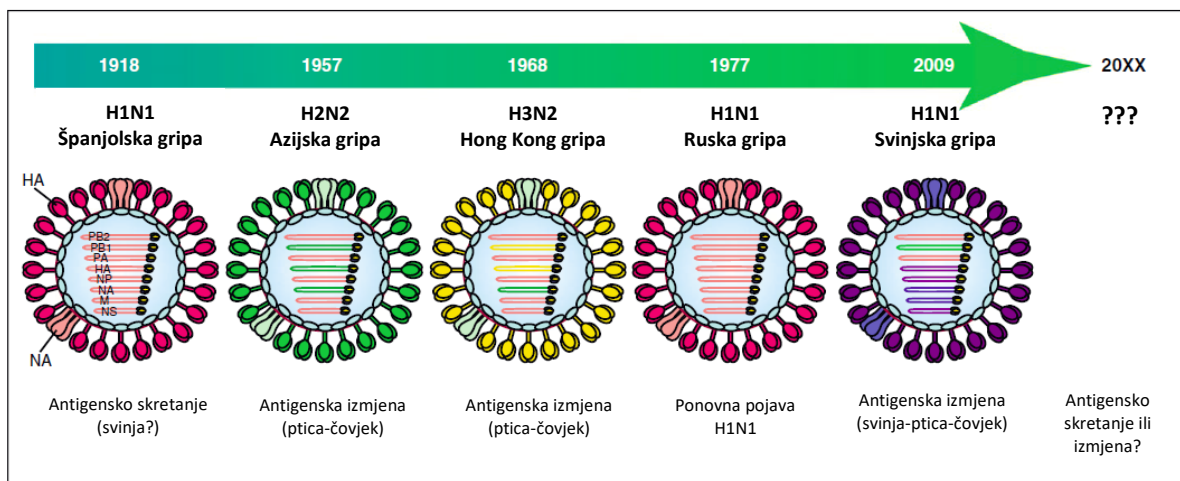
### **3.2. Antigenska izmjena**

Antigenska izmjena podrazumijeva značajne promjene HA, NA ili oba površinska antigena, što rezultira nastajanjem novog podtipa virusa. Virusi sa segmentiranim genom vrlo brzo mogu proizvesti nove varijante izmjenom ili pseudorekombinacijom RNA segmenata sa drugim podtipom, često onim koja inficira druge životinje. Ako dođe do koinfekcije jedne animalne stanice s dva različita virusna podtipa od kojih svaki ima genom od osam segmenata, miješanjem segmenata i slučajnim sklapanjem virusa, teoretski može nastati  $2^8$  odnosno 256 novih varijanti. Velika većina nastalih hibrida nisu vijabilni, no ako jedna od varijanti zadrži mogućnost replikacije u čovjeku, može se efektivno rasprostranjivati i na ovojnici ima nove HA i/ili NA antigene koje mogu izbjeći prethodno stvorena antitijela, takav novi virusni podtip može uzrokovat pandemiju (Nelson & Williams, 2014.). Ovaj proces uočen je samo kod virusa gripe tipa A jer se on može replicirati u ljudima ali i u životinjama, kao što su ptice i svinje. Nakon što je stvoren pandemični soj, može doći do promjena virulencije tijekom replikacija pri čemu se razvije učinkovitija sposobnost zaraze ljudi (Zambon, 1999.).

### **3.3. Pandemije virusa gripe**

Pandemije se javljaju u nepravilnim intervalima i mogu varirati u jačini. U prošlosti uzrok većine pandemija je bila pseudorekombinacija između ljudskog i ptičjeg virusa (Slika 3.). Sekvencioniranjem genoma virusa H2N2 iz 1957. godine otkriveno da su RNA segmenti koji kodiraju HA, NA i još jedan protein podrijetlom iz ptičjeg virusa gripe, dok su ostalih pet segmenata iz ljudskog H1N1 virusa. Iz 1968. virusa H3N2 samo gen za HA i još jedan protein su bili podrijetlom iz ptičjeg izvora, dok su ostalih šest segmenata iz ljudskog H2N2 virusa. Nije poznato u kojoj je životinji došlo do rekombinacije 1957. i 1968. virusnog soja. Podtip

H1N1 virusa se ponovno u potpunosti pojavio 1977. godine, nakon što je prestao cirkulirati u populaciji 1950-tih godina. Taj isti podtip uzrokovao je 1918. godine najveći svjetsku pandemiju španjolske gripe (Jong i sur., 2000.). Prvi pandemijski val započeo je u proljeće 1918., no tek je drugi val u rujnu 1918. bio izuzetno smrtonosan (Kamps, Hoffmann & Preiser, 2006.). Još uvijek ne postoji potpuno objašnjenje za visoku razinu smrtnosti infekcijom H1N1 virusa 1918. godine. Neki dokazi pokazuju da je uzrok velike smrtnosti bila posljedična sekundarna bakterijska upala pluća (Salomon & Webster, 2009.). Svinje su osjetljive na infekciju ljudskim virusima gripe, stoga nije ni iznenađujuće da je pseudorekombinant ljudskog i svinjskog virusa upravo izoliran iz njih. Zna se da je svinja bila izvor pandemičkog virusnog soja 2009. godine. (Jong i sur., 2000.).

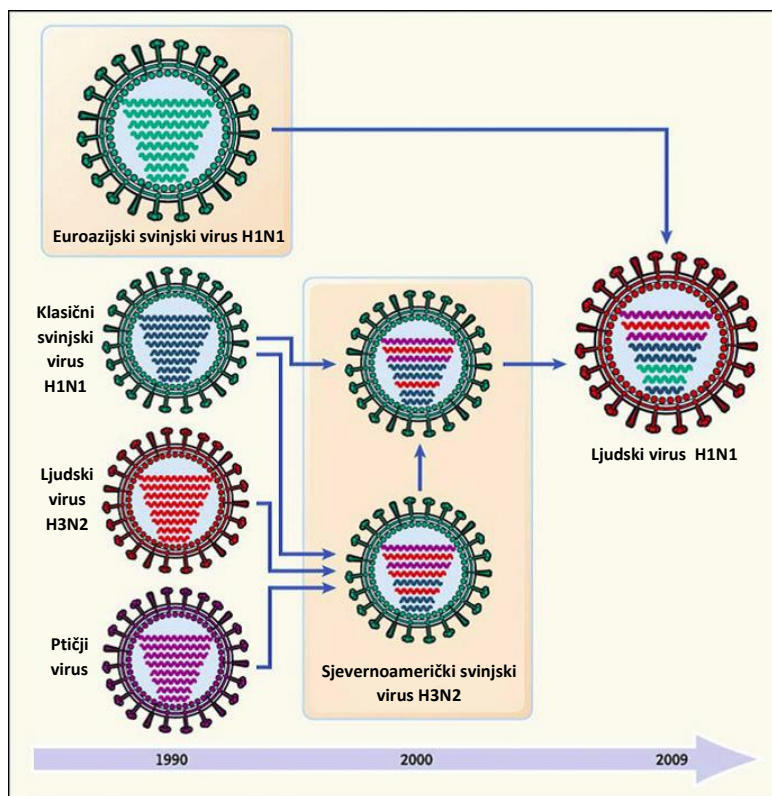


**Slika 3.** Vremenska crta koja pokazuje evoluciju pandemičnih virusa gripe. Pandemije 20-tog stoljeća većinom su uzrokovane infekcijom rekombinanta ljudskog i ptičjeg virusa. Ponovno pojavljivanje H1N1 soja dovelo je do blage pandemije 1977.godine. Pandemični soj H1N1 2009. godine nastao je pseudorekombinacijom ptičjeg, ljudskog i svinjskog genoma. U budućnosti, novi pandemični podtipovi mogli bi se pojaviti preko bilo kojeg od mehanizama antigenske varijabilnosti: antigenskog skretanja, antigenske izmjene između različitih podtipova ili ponovnim pojavljivanjem virusa na koji trenutna ljudska populacija nije imuna. Preuzeto i prilagođeno prema: Watanabe i sur., 2012.

### 3.3.1. Pandemija svinjske gripe (H1N1) 2009. godine

Novi virusni genotip je prvi puta detektiran u Meksiku u proljeće 2009. godine, a izoliran i identificiran je u Kaliforniji. Smatra se da se soj pojavio u svinji i nakon toga prešao na ljude i brzo se proširio po Sjedinjenim Američkim Državama, te preko zračnih linija i do Europe, Azije i Južne Amerike. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) proglasila je prvu pandemiju gripe dvadeset i prvog stoljeća, te je nazvala soj A (H1N1) pdm09 (Nelson & Williams, 2014.).

Virus ima vrlo kompleksno podrijetlo (Slika 4.), kojeg su znanstvenici razotkrili prateći stopu mutacija RNA segmenata. Nastao je pseudorekombinacijom između virusa gripe sjevernoameričke H3N2 i euroazijske H1N1 svinje. Segmenti NA i M potječu od virusa euroazijske svinje. Nadalje, virus H3N2 koji inficira sjevernoameričku svinju je rezultat trostruke pseudorekombinacije između ptičjeg, klasičnog svinjskog i ljudskog virusa gripe A. Segmenti klasičnog svinjskog virusa H1N1 koji su prisutni u novom virusu kodiraju za HA, NP i NS, te pokazuju zajedničko podrijetlo s virusom gripe iz 1918. pandemije. Segment za PB1 podrijetlom je od ljudskog virusa H3N2. Zadnje komponente su podjedinice RNA-ovisne RNA polimerazne PB2 i PA koje su podrijetlom iz virusa koji inficira akvatične ptice. Jasno je da su tijekom godina, sva tri virusna podtipa kružila u svinjama. Ideja da novi virusni hibridi gripe koji su sposobni uzrokovati bolesti kod ljudi dolaze izravno iz svinja kao posrednika različitih ljudskih, ptičjih i svinjskih sojeva, predložena je kao uzrok pandemije 1957., ali i 1918. godine (Rappuolu & Del Giudice, 2011.).

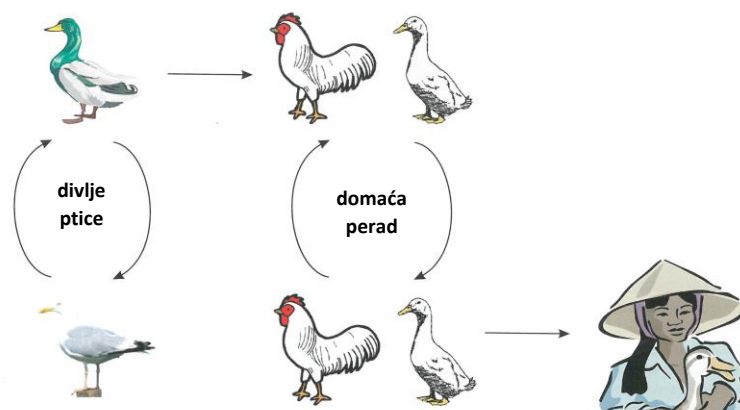


**Slika 4.** Pseudorekombinacije koje su uzrok nastanka svinjske gripe 2009. godine. Preuzeto i prilagođeno prema: Rappuoli & Del Giudice, 2011.

Ovaj virus gripe uzrokovao je smrt oko 25 000 ljudi širom svijeta. Zaslužno za smanjeni broj smrtnosti je djelomična imunost odraslih starosti 60 ili više godina na virus H1N1 koji se pojavio 1918. godine. Pandemija je proglašena završenom u kolovozu 2010. godine, te se ovaj virus nadalje počeo pojavljivati sezonski s blažim simptomima (Rappuoli & Del Giudice, 2011.).

### 3.4. Ptičja gripa

Zbog visoke gustoće naseljenosti i velike bliskosti ljudi i životinja, u azijskim zemljama česte su pojave novih rekombinanata virusa, ali i u prošlosti izvor mnogih pandemija gripe. 1997. godine izoliran je visoko patogeni soj ptičje gripe A (H5N1) od kojeg je umrlo šest osoba u Hong Kongu. Ptičji virus gripe A obično uzrokuje asimptomatske infekcije kod vodenih ptica, te se razmnožava u njihovim crijevima. Lako se rasprostranjivao domaćim i divljim pticama, te i na ljude preko direktnog kontakta ili izmeta (Slika 5.). Nijedna aminokiselinska promjena nije razdvojila ptičji i ljudski virus već je on ostao nepromijenjen (Jong i sur., 2000.). Imao je HA gen podrijetlom iz virusa prvi put izoliranog iz guske A/Guangdong/1/96 (H5N1) (Klenk, Garten & Matrosovich, 2011.). Iako je bio prvenstveno ptičji virus, inhalacije velikih količina virusa dovele su do snažne infekcije dišnih putova. Virus nije imao mogućnosti prijenosa sa čovjeka na čovjeka, stoga se nije uspio znatno proširiti. Smrtnost tog soja u prijavljenim slučajevima iznosila je 57% (Nelson & Williams, 2014.). Virus H5N1 zarazio je i ostale životinjske vrste, od domaćih mačaka do tigrova i leoparda u zoološkom vrtu (Carter & Saunders, 2013.). Zbog potencijalne mogućnosti da se dogodi određena mutacija ili pseudorekombinacija koja bi dovela do povećanog rasprostranjivanja virusa, u Hong Kongu su morali usmrtniti 1,6 milijuna inficiranih kokoši (Murray i sur., 2016.).



**Slika 5.** Prijenos ptičje gripe. Virusi su prisutni u divljim pticama i prenose se na domaću perad. Povremeno zbog bliskog kontakta može inficirati i ljude. Preuzeto i prilagođeno prema: Carter & Saunders, 2013.

### 3.5. Čimbenici koji utječu na razvoj pandemičnih sojeva

Nova varijanta virusa gripe koja bi imala potencijal izazivanja pandemije mora imati određene karakteristike: specifične antigene na koje čovjek nije razvio imunost, mora biti visoko infektivna i sposobna replicirati se i prenositi među ljudima (Watanabe i sur., 2012.). Za takav virus također bi bilo najbolje da bude jače patogen od ostalih cirkulirajućih sojeva gripe, primjerice potencijalni virus H5N1 pokazuje veću patogenost od cirkulirajućima H1N1 i H3N2 (Kamps, Hoffmann & Preiser, 2006.).

Svi virusi gripe se specifično vežu na receptore stanice domaćina pomoću HA „džepa“ za vezanje na površini virusa. Većina ptičjih virusa gripe preferencijalno se vežu na oligosaharide u kojima je na sijaličnu kiselinu vezan galaktozni ostatak sa  $\alpha 2,3$ -vezom (SA $\alpha 2,3$ Gal). Takve stanice se nalaze u crijevima patke, gdje se i virusi ptičje gripe repliciraju. Nasuprot tome, ljudski virus gripe A se veže SA $\alpha 2,6$ Gal kojeg na površini membrane imaju epitelne stanice ljudskog dušnika. No, zanimljivo je to da membrane epitelnih stanica u trahejama svinja sadrže SA $\alpha 2,3$ Gal i SA $\alpha 2,6$ Gal, što objašnjava visoku osjetljivost ove životinje na ljudski i ptičji virus, te i samu pojavu podtipa iz 2009. godine. Prije 1997. godine ovo objašnjenje zadovoljavalo je činjenicu da ptičji virusi nisu izolirani kod čovjeka. Stoga je neočekivano u Hong Kongu nepromijenjen virus ptičje gripe inficirao i uspješno se replicirao u ljudskom dišnom sustavu, no nije se mogao dalje prenositi na ljude (Jong i sur., 2000.). Analize masene spektrometrije ljudskog dišnog epitela pokazale su veću raznolikost sijaličnih kiselina nego što se prije smatralo. Iako prevladavaju SA $\alpha 2,6$ Gal na alveolarnom epitelu nađene su i SA $\alpha 2,3$ Gal u manjim količinama (Watanabe i sur., 2012.). Ova zapažanja upućuju na to da je odlučujući čimbenik u razvoju pandemskih sojeva upravo učinkoviti prijenos koji najviše ovisi o strukturi HA i NA. Optimalne adaptacije proteina stječu se mutacijama. To može objasniti period koji je morao proći da ptičji virus uveden u ljudsku populaciju izazove pandemiju. Genomske analize dokazale su da se zajednički predak ljudskog i svinjskog H1N1 virusa pojavio između 1905. i 1914. godine, a do pandemije je došlo tek 1918 (Jong i sur., 2000.).

Jedna od funkcija NA je da prilikom zaraze smanji razinu mukoproteina sluzi u dišnom traktu. Razgradnja smanjuje viskoznost sluzi i potiče kihanje i kašljanje. Ptičji NA nije u stanju učinkovito razbiti mukoproteina dišnog puta čovjeka, što je jedan od uzroka nemogućnosti prijenosa među ljudima (Jong i sur., 2000.).

## **4. LIJEČENJE, PREVENCIJA I KONTROLA**

Trenutne strategije za smanjenje pobola od gripe su korištenje cjepiva za sprječavanje zaraze, te antivirusnih lijekova uz praćenje pojave novih varijanti iz godine u godinu.

### **4.1. Cjepivo**

Danas je cijepljenje kamen temeljac kontrole gripe. Proizvedena su inaktivirana i živa oslabljena cjepiva. Živo cjepivo je još u fazi pripreme, a smatra se da bi imunost ovim tipom cjepiva trajala duže (Presečki i sur., 2002.). Trenutna cjepiva su 50% do 80% djelotvorna u sprječavanju infekcije i komplikacija gripe. Standardizirana i često korištena cjepiva sadrže 15 do 20 µg HA antigena po dozi. Priprijetuju se umnožavanjem virusa u oplodnim kokošjim jajima. Iz alantoinne tekućine se umnožene virusne čestice pročiste ultracentrifugiranjem, te se inaktiviraju dodatkom formaldehida ili beta-propiolaktona (Nelson & Williams, 2014.). Proces proizvodnje ovakvih inaktiviranih virusa traje 6 do 8 mjeseci, stoga se rade istraživanja za korištenje animalnih kultura kojim bi se smanjilo razdoblje čekanja u slučaju pojave pandemije (Jong i sur., 2000.). Zbog ovog dužeg perioda potrebnog u proizvodnji, cjepivo za određenu sezonu zna biti neusklađeno s cirkulirajućim virusom. Tako je tijekom sezonske gripe 2007.-2008., neusklađenost u cjepivu protiv gripe uzrokovala povećanu smrtnost u male djece na sjevernoj hemisferi (Salomon & Webster, 2009.).

Velika varijabilnost virusa pomoću antigenskih skretanja i izmjena podrazumijeva potrebu za proizvodnjom novih cjepiva svake godine. WHO u siječnju radi globalni pregled sojeva gripe na sjevernoj i južnoj hemisferi, te se odabiru oni virusni tipovi A i B koji pokazuju veću vjerojatnost pojave sljedeće sezone. Nakon toga se proizvode cjepiva koja se distribuiraju do kraja rujna kako bi bili spremni za sljedeću epidemiju (Nelson & Williams, 2014.). Godišnje cijepljenje se vrši u ožujku za populaciju na južnoj hemisferu i u rujnu za sjevernu hemisferu (Boni, 2008.). Čine se veliki naponi da se razviju super-cjepiva koja uključuju sve podtipove virusa gripe u jednoj dozi bez potrebe da se mijenjaju svake godine (Kamps, Hoffmann & Preiser, 2006.).

### **4.2. Antivirusni lijekovi**

U pandemijskim okolnostima antivirusni lijekovi igraju važniju ulogu od cjepiva. Klasični antivirusni lijekovi, amantadin i rimantadin inhibiraju replikacijski ciklus virusa tipa A tako što interferiraju sa M<sub>2</sub> proteinima. Kada se uzmu profilaktički, pokazuju 70% do 90% učinkovitosti u sprječavanju zaraze tijekom epidemije (Nelson & Williams, 2014.). Nedavno otkriveni inhibitori NA, zanamivir (Relenza) i oseltamivir (Tamiflu) djeluju kao analozi



sijalične kiseline. Smanjuju trajanje gripe tipa A i B i ublažavaju simptome (Jong i sur., 2000.).

Nažalost, javljaju se rezistentni sojevi na antivirusne lijekove, što može uzrokovati velike probleme u nadolazećim epidemijama. Većina H5N1 virusa gripe pokazuju otpornost na adamantane (Salomon & Webster, 2009.). Interakcije virusa i proteina stanica domaćina su ključni za replikaciju i prijenos infekcije. Razumijevanje tih kompleksnih putova prijenosa signala može nam otkriti nove mete za primjenu antivirusnih lijekova (Salomon & Webster, 2009.).

## **5. ZAKLJUČAK**

Glavni cilj svih patogenih mikroba je što uspješnija replikacija i prijenos, no kako bi to ostvarili moraju imati načine izbjegavanja imunog odgovora domaćina. Kod virusa gripe varijabilnost antigena postiže se mutacijama i pseudorekombinacijama, koje ovaj virus čine nepredvidljivim. Iz ovog razloga nova pandemija gripe može započeti bilo gdje na planeti, a može biti ili relativno blaga, kao što su bile epidemije 1968. i 1957. godine, ili izuzetno zloćudna, kao ona iz 1918. (Kamps, Hoffmann & Preiser, 2006.). Pojava svinjske gripe 2009. godine naznačila je probleme u odgovarajućoj reakciji svijeta na pandemije. Iako je bila relativno slaba istaknula je slabu pripravnost samog sustava zdravstvene zaštite, te je pružila jedinstvenu priliku za poboljšanje i razvitak učinkovitijeg plana. Više puta tijekom prošlog i ovog stoljeća, određena varijanta virusa gripe je prešla barijeru vrste i uspostavila se u ljudskoj populaciji. Događaj u Hong Kongu 1997. ukazao je kako ptičji virusi predstavljaju veliku prijetnju za ljude, te da se ponovno pojavljivanje pandemije u bliskoj budućnosti ne može isključiti.

I u zemljama s dobrim vakcinaljskim programima, gripa predstavlja bitan zdravstveni problem. Mutacije iz godine u godinu čine virus gotovo nedohvatljivim, pa je nužna potreba za ažuriranjem cjepiva. Sadašnji antivirusni lijekovi ograničeni su na ometanje dvaju procesa u replikacijskom ciklusu virusa. Bolje razumijevanje svakog od koraka replikacije moglo bi pružiti novi uvid i dovest do razvoja novijih terapeutika. Sveobuhvatni sustav nadzora cirkulirajućih sojeva bi mogao pomoći u identifikaciji potencijalnih kandidata na koje ljudska populacija trenutno nema imunitet.

## 6. LITERATURA

- Boni M. F. (2008.): Vaccination and antigenic drift in influenza. *Vaccine* **26S**, C8–C14
- Bouvier N. M. & Palese P. (2008.): The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26**, 49.-53.
- Carter J. & Saunders V. (2013.): *Influenza Virus U: Virology, Principles and Applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom, pp. 183.-194.
- Ghedini E., Sengamalay N. A., Shumway M., Zaborsky J., Feldblyum T., Subbu V., Spiro D. J., Sitz J., Koo H., Bolotov P., Dernovoy D., Tatusova T., Bao Y., St George K., Taylor J., Lipman D. J., Fraser C. M., Taubenberger J. K. & Salzberg S. L. (2005): Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* **437**, 1162.-1166.
- Jong J. C., Rimmelzwaan G. F., Fouchier R. A. M. & Osterhaus A. D. M. E. (2000.): Influenza Virus: a Master of Metamorphosis. *Journal of Infection* **40**, 218.-228.
- Kamps B. S., Hoffmann C. & Preiser W. (2006.): *Influenza Report 2006*, Flying Publisher, Paris, pp. 1.-225.
- Klenk H. D., Garten W. & Matrosovich M. (2011.): Molecular mechanisms of interspecies transmission and pathogenicity of influenza viruses: Lessons from the 2009 pandemic. *Bioessays* **33**, 180–188
- Matrosovich M. N., Matrosovich T. Y., Gray T., Roberts N. A. & Klenk H.-D. (2004.): Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *PNAS* **101**, 4620–4624
- Murray P. R., Rosenthal K. S. & Pfaller M. A. (2016.): *Orthomyxoviruses U: Medical Microbiology*, 8th ed., Elsevier Inc., Philadelphia, PA, pp. 487.-495.
- Nelson K. E. & Williams C. M. (2014.): *Epidemiology and Prevention of Influenza U: Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice*, 3th ed., Jones & Bartlett Learning, Burlington, MA, pp. 467.-486.
- Presečki V. i sur. (2002.): *Virologija*, Medicinska naklada, Zagreb, pp. 195.-201.
- Rappuoli R. & Del Giudice G. (2011.): *Influenza Vaccines for the Future (Birkhäuser Advances in Infectious Diseases)*, 2nd ed., Springer Basel, Switzerland, pp. 95.-107.
- Salomon R. & Webster R. G. (2009.): The Influenza Virus Enigma. *Cell* **136**, 402–410
- Watanabe Y., Ibrahim M. S., Suzuki Y. & Ikuta K. (2012.): The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). *Trends in Microbiology* **20**, pp. 11.-20.

Zambon M. C. (1999.): Epidemiology and pathogenesis of influenza. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **44**, Topic B, 3.-9.

<http://www.hzjz.hr/sluzba-epidemiologija-zarazne-bolesti/gripauhrvatskojusezoni2017201814-1-2018/>

<http://www.virology.ws/2009/04/30/structure-of-influenza-virus/>

[http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/en/](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/en/)

[http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))

## 7. SAŽETAK

Gripa je kozmopolitski rasprostranjena virusna bolest koja većinom zahvaća dišne putove čovjeka. Razlikujemo tri roda virusa gripe A, B i C, od kojih je tip A odgovoran za većinu simptoma koje se pripisuju gripi. Unatoč maloj veličini genoma i nekolicini gena koje kodira, ovaj virus pokazuje veliku varijabilnost koja ga čini nepredvidljivim. Promjenljiva priroda ovih virusa omogućava im formiranje novih varijanti sposobnih zaobići imunosnu obranu čovjeka. Godišnje epidemije gripe rezultat su mutacija površinskih antigena HA i NA (antigensko skretanje). Zbog segmentiranog genoma, formiranje novih varijanata virusa gripe A može se ostvariti i preko pseudorekombinacija segmenata različitih sojeva (antigenska izmjena). Ovaj rijetki događaj može rezultirati pandemijom gripe, kojih je tijekom prošlih 100 godina bilo pet. Kako bi pokušali smanjiti opasnost pojave nove pandemije potrebno je razumjeti molekularne mehanizme koji stoje iza procesa koji dovode do varijabilnosti, a ti su mehanizmi pojašnjeni detaljnije u ovom radu kao i primjeri iz prošlosti. Virus gripe koji bi imao potencijal izazivanja pandemije mora imati sposobnost replikacije u čovjeku, na ovojnici nove HA i/ili NA antigene, te se mora efektivno rasprostranjivati u ljudskoj populaciji. Brza evolucija virusa gripe naglašava važnost postojanja nadzora, kako bi se na vrijeme prepoznali novih sojevi. Trenutne metode prevencije i liječenja gripe uključuju cijepljenje i korištenje antivirusnih lijekova.

## **8. SUMMARY**

Influenza is a widespread viral disease that mainly affects the human respiratory system. The influenza virus is divided into three types A, B and C. Type A virus is the most virulent human pathogen among the three types and causes the severest disease. Despite the small size of the genome and the few genes encoded by it, this virus shows a high degree of variability that makes it unpredictable. The changeable nature of these viruses allows them to create new variants capable of bypassing human immune defence. Annual flu epidemics are the result of mutations in genes for surface antigens HA and NA (antigenic drift). The formation of new variants of influenza A virus can also be achieved through reassortment of the segmented genome (antigenic shift). Such changes are often associated with the occurrence of pandemics, which happened during the past 100 years five times. In order to reduce the risk of emergence of new pandemics, it is necessary to understand the molecular mechanisms behind the processes that lead to variability. These mechanisms are further explained in this paper, as well as examples from the past. The influenza virus that would have the potential to cause a pandemic must have the ability to replicate in humans, new HA or NA antigen present on the surface and the ability to be effectively transmitted. The rapid evolution of influenza viruses highlights the importance of surveillance in identifying novel circulating strains. The current methods of prevention and treatment of influenza include vaccination and the use of antiviral drugs.