



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Mr Jelena Radovanov

**ZASTUPLJENOST I KARAKTERIZACIJA INFLUENZA A VIRUSA
IZOLOVANIH IZ RESPIRATORNIH UZORAKA PACIJENATA
SA TERITORIJE JUŽNOBAČKOG OKRUGA**

- doktorska teza -

Novi Sad, 2016.

Mojoj porodici

SADRŽAJ

Lista ilustracija.....	v
Lista tabela.....	vi
Lista skraćenica.....	vii
Zahvala.....	ix
UVOD.....	1
Cilj rada.....	4
OPŠTI DEO.....	5
Taksonomski status influenza A virusa.....	6
Karakteristike viriona Influenca A virusa.....	8
Replikacija influenza A virusa.....	16
<i>Prepoznavanje virusa i osetljive ćelije.....</i>	<i>17</i>
<i>Ulazak virusa u ćeliju.....</i>	<i>17</i>
<i>Transkripcija i translacija virusne RNK.....</i>	<i>19</i>
<i>Formiranje i oslobađanje novih viriona.....</i>	<i>25</i>
Genetička i antigenska varijabilnost virusa influence A.....	28
Klinički i patogeni aspekti infekcija influenza A virusima.....	33
Imuni odgovor na infekciju influenza A virusima.....	35
Virulentnost influenza A virusa.....	39
Specifičnost prema domaćinu influenza A virusa.....	42
Epidemijski i pandemijski potencijal influence.....	47
Istorijat epidemija i pandemija influence.....	51
<i>Influenca u periodu do XVIII veka.....</i>	<i>51</i>
<i>Influenca tokom XVIII i XIX veka.....</i>	<i>52</i>
<i>„Španski grip“ – pandemija 1918-1920. godine.....</i>	<i>52</i>
<i>„Azijski grip“ – pandemija 1957-1958. godine.....</i>	<i>54</i>
<i>„Hong-Kongški grip“ – pandemija 1968-1970. godine.....</i>	<i>55</i>
<i>„Ruski grip“ – pandemija 1977-1978. godine.....</i>	<i>55</i>
<i>„Ptičiji grip“.....</i>	<i>55</i>
<i>„Svinjski grip“ – pandemija 2009. godine.....</i>	<i>57</i>
Prevenција i lečenje influenza virusnih infekcija.....	58
<i>Vakcina protiv influenza virusa.....</i>	<i>58</i>
<i>Lekovi u terapiji i profilaksi influence.....</i>	<i>61</i>
<i>Rezistencija na antivirusne lekove.....</i>	<i>63</i>
<i>Tendencije u razvoju novih lekova.....</i>	<i>67</i>
Primena filogenetskih metoda u izučavanju influenza A virusa.....	68
Dijagnostika influenza virusnih infekcija.....	71
<i>Izolacija influenza A virusa.....</i>	<i>72</i>
<i>Dokazivanje antigena influenza A virusa.....</i>	<i>73</i>
<i>Dokazivanje nukleinskih kiselina influenza A virusa.....</i>	<i>74</i>
<i>Serološka dijagnostika influence.....</i>	<i>76</i>
MATERIJAL I METODE.....	79
Period istraživanja i odabir pacijenata.....	80

Uzimanje i obrada uzoraka.....	80
Dokazivanje influenza A virusa rRT-PCR testom.....	81
<i>Izolacija virusne RNK.....</i>	81
<i>Izvođenje rRT-PCR testa.....</i>	82
<i>Interpretacija rezultata rRT-PCR testa.....</i>	85
Antigenaska karakterizacija influenza A virusa.....	86
<i>Umnožavanje MDCK ćelijskih kultura.....</i>	86
<i>Inokulacija uzoraka u MDCK ćelijske kulture.....</i>	87
<i>Izvođenje reakcije hemaglutinacije.....</i>	87
<i>Izvođenje reakcije inhibicije hemaglutinacije.....</i>	88
Ispitivanje osetljivosti influenza A virusa na oseltamivir.....	91
<i>Priprema referentnih virusa.....</i>	92
<i>Priprema radnog razređenja oseltamivira.....</i>	94
<i>Izvođenje testa inhibicije aktivnosti neuraminidaze.....</i>	94
Ispitivanje odabranih influenza A virusa u KCIIR u Londonu.....	95
Statistička analiza rezultata istraživanja.....	96
Sastav i način pripreme hranljivih podloga i rastvora.....	96
REZULTATI.....	99
Rezultati dokazivanja influenza A virusa u respiratornim uzorcima rRT PCR testom.....	100
<i>Sezonska distribucija influenza A virusa.....</i>	100
<i>Uzrastna distribucija influenza A virusa.....</i>	101
<i>Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničkih manifestacija influence.....</i>	103
<i>Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja.....</i>	104
<i>Faktori rizika za nastanak teških oblika influence.....</i>	105
<i>Rezultati logističke regresione analize.....</i>	107
Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK ćelijskim kulturama i ispitivanja sposobnosti hemaglutinacije.....	109
Rezultati antigenske i genetičke karakterizacije influenza A virusa.....	111
<i>Influenca virusi A(H1N1)pdm09 podtipa.....</i>	111
<i>Influenca virusi A(H3N2) podtipa.....</i>	118
Rezultati ispitivanja osetljivosti influenza A virusa na oseltamivir.....	125
DISKUSIJA.....	128
Sezonska distribucija influenza virusa.....	129
Uzrastna distribucija influenza A virusa.....	133
Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničke manifestacije influence.....	134
Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja.....	136
Faktori rizika za nastanak teških oblika infekcije.....	136
Izolacija influenza A virusa na ćelijskim kulturama.....	143
Ispitivanje sposobnosti hemaglutinacije influenza A virusa.....	146
Antigenske i filogenetske osobine influenza A(H1N1)pdm09 virusa.....	148
Antigenske i filogenetske osobine influenza A(H3N2) virusa.....	150
Osetljivost influenza A virusa na oseltamivir.....	154
ZAKLJUČCI.....	157
LITERATURA.....	160

LISTA ILUSTRACIJA

1.	Pleomorfizam viriona influenza virusa, krio-elektronska tomografija.....	9
2.	Shematski prikaz građe viriona influenza A virusa.....	9
3.	Shematski prikaz strukture ribonukleoproteinskih kompleksa influenza A virusa.....	10
4.	Struktura površinskih glikoproteina influenza A virusa.....	13
5.	Replikacioni ciklus influenza A virusa.....	16
6.	Vezivanje influenza virusa za ćeliju respiratornog trakta.....	18
7.	Mehanizmi sinteze proteina influenza A virusa.....	22
8.	Pupljenje sferoidnih viriona influenza virusa na membrani inficirane ćelije.....	26
9.	Model pupljenja influenza virusa.....	27
10.	Genetički odnosi između humanih i svinjskih influenza virusa u periodu 1918-2009. godine.....	31
11.	Opseg mogućih domaćina influenza A virusa	43
12.	„Source-sink“ model evolucije influenza A virusa.....	48
13.	Relativne stope smrtnosti usled influence	53
14.	Učestalost rezistencije na adamantane kod A(H3N2) izolata i na oseltamivir kod A(H1N1).....	64
15.	MDCK kultura ćelija.....	73
16.	Shema obeležavanja mikrotitar ploča u reakciji virusne hemaglutinacije.....	88
17.	Shema obeležavanja mikrotitar ploča u izvođenju povratne titracije virusnih izolata i referentnih virusa.....	89
18.	Shema obeležavanja mikrotitar ploča u izvođenju reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije	90
19.	Plan izvođenja postupka određivanja radnog razređenja virusa.....	93
20.	Shema izvođenja testa inhibicije aktivnosti neuraminidaze pomoću oseltamivir karboksilata.....	95
21.	Filogenetsko stablo A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013 na osnovu genetičke sličnosti HA gena.....	116
22.	Filogenetsko stablo A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014 na osnovu genetičke sličnosti HA gena.....	117
23.	Filogenetsko stablo A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013 na osnovu genetičke sličnosti HA gena.....	123
24.	Filogenetsko stablo A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014 na osnovu genetičke sličnosti HA gena.....	124

LISTA TABELA

1.	Karakteristike pripadnika familije <i>Orthomyxoviridae</i>	7
2.	Segmenti genoma influenza A virusa i polipeptidi kodirani tim segmentima.....	11
3.	Aminokiselinske substitucije u okviru molekula neuraminidaze povezane sa rezistencijom ili redukovanom osetljivošću na NAi.....	66
4.	Sekvence prajmera i proba.....	83
5.	Interpretacija rezultata real time RT-PCR testiranja.....	85
6.	Referentni influenza A virusi i njihove IC ₅₀ vrednosti.....	92
7.	Zastupljenost influenza virusa u uzorcima ispitanim u periodu 2010/2011-2013/2014.....	100
8.	Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od uzrasta pacijenata.....	102
9.	Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničke manifestacije influence.....	104
10.	Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja.....	105
11.	Faktori rizika za nastanak teških oblika influence.....	107
12.	Rezultati logističke regresione analize.....	108
13.	Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK kulturama ćelija.....	109
14.	Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK kulturama ćelija u zavisnosti od Ct vrednosti dobijene u real-time RT PCR testu.....	110
15.	Rezultati antigenske karakterizacije izolata influenza A(H1N1)pdm09 virusa.....	111
16.	Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013, izvedene u KCR II u Londonu.....	113
17.	Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014, izvedene u KCR II u Londonu.....	114
18.	Rezultati antigenske karakterizacije izolata influenza A(H3N2) virusa.....	118
19.	Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013, izvedene u KCR II u Londonu.....	120
20.	Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014, izvedene u KCR II u Londonu.....	121
21.	Karakteristike pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani influenza A virusi podvrgnuti ispitivanju osetljivosti na oseltamivir	125
22.	Rezultati ispitivanja osetljivosti na oseltamivir testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze u NIC Novi Sad	126
23.	Rezultati ispitivanja osetljivosti na oseltamivir testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze u KCR II u Londonu.....	127

LISTA SKRAĆENICA

ARDS.....	Akutni respiratorni distres sindrom
cDNK.....	Komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
CI.....	Interval pouzdanosti (<i>eng. Confidence Interval</i>)
CNS.....	Centralni nervni sistem
CPE.....	Citopatogeni efekat
cRNK.....	Komplementarna ribonukleinska kiselina
Ct.....	Ciklus u kojem je nivo detektovane fluorescencije prešao nivo nespecifične, pozadinske fluorescencije u real-time PCR testu (<i>eng. threshold cycle</i>)
DNK.....	Dezoksiribonukleinska kiselina
dsRNK.....	Dvolančana ribonukleinska kiselina
ECDC.....	Evropski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (<i>eng. European Centre for Disease Control and Prevention</i>)
ELISA.....	Enzimski imunoesej (<i>eng. Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ER.....	Endoplazmatični retikulum
FR.....	Fiziološki rastvor
FTS.....	Fetalni teleći serum
GISAID.....	Platforma za globalnu razmenu virusoloških i epidemioloških podataka vezanih za influenza viruse (<i>eng. Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>)
GISRS.....	Globalna mreža za nadzor nad influencom (<i>eng. Global Influenza Surveillance and Response System</i>)
HA.....	Hemaglutinin
HAI.....	Hemaglutinaciona jedinica
HB/S.....	Hronična bolest ili stanje
IFN.....	Interferon
ILI.....	Infekcija nalik influenci (<i>eng. influenza-like illness</i>)
IRR.....	Organizacija za distribuciju reagenasa za laboratorijsku dijagnostiku influence (<i>eng. Influenza Reagent Resource</i>)
ISIRV-AVG.....	Grupa za antivirolike Međunarodnog udruženja za influencu i druge respiratorne virusne bolesti (<i>eng. International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases Antiviral Group</i>)
KCRII.....	Kolaborativni centar za referentnost i istraživanje influence SZO
KEr.....	Kontrola eritrocita
LR.....	“Lipidni splavovi” (<i>eng. lipid rafts</i>)
MDCK.....	Ćelijska kultura bubrežnih ćelija psa (<i>eng. Madin-Darby canine kidney</i>)
M1.....	Matriks protein
mRNK.....	Informaciona ribonukleinska kiselina
NA.....	Neuraminidaza
NAI.....	Inhibitori neuraminidaze
NES.....	Nuklearna eksport sekvenca
NEP.....	Nuklearni eksport protein
NIC.....	Nacionalni influenza centar
NLR.....	Intracelularni receptori uključeni u aktivaciju nespecifičnog imunog odgovora (<i>eng. NOD-like receptors, nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>)
NP.....	Nukleoprotein
NS1.....	Nestrukturani protein 1
NTC.....	Kontrola bez ciljne DNK sekvence (<i>eng. no template controle</i>)

OD.....	Stepen verovatnoće (<i>eng. Odd ratio</i>)
OK.....	Oseltamivir karboksilat
ORF.....	Okvir čitanja (<i>eng. open reading frame</i>)
PA.....	Polimeraza acidni protein
PAMP.....	Strukture specifične za patogene (<i>eng. pathogen-associated marker pattern</i>)
PB1.....	Polimeraza bazni protein 1
PB2.....	Polimeraza bazni protein 2
PBS.....	Puferisani fosfatni rastvor (<i>eng. phosphate buffer saline</i>)
PCR.....	Lančana reakcija polimeraze (<i>eng. polymerase chain reaction</i>)
PKR.....	Protein kinaza R
PRR.....	Receptori prepoznavanja struktura specifičnih za patogene (<i>eng. pattern recognition receptors</i>)
RDE.....	Enzim koji razara receptore (<i>eng. receptor destroying enzym</i>)
RH.....	Reakcija hemaglutinacije
RIG-I.....	Intracelularni receptori uključeni u aktivaciju nespecifičnog imunog odgovora (<i>eng. retinoic acid inducible gene I</i>)
RIH.....	Reakcija inhibicije hemaglutinacije
RNK.....	Ribonukleinska kiselina
RNP.....	Ribonukleoprotein
RP.....	Ribonukleaza P gen
rRT PCR.....	Reakcija reverzne transkriptaze i lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (<i>eng. real-time reverse transcription and polymerase chain reaction</i>)
RT PCR.....	Reakcija reverzne transkriptaze i lančane reakcije polimeraze (<i>eng. reverse transcription and polymerase chain reaction</i>)
RVK.....	Reakcija vezivanja komplementa
SARI.....	Teška akutna respiratorna bolest (<i>eng. severe acute respiratory illness</i>)
SNL.....	Signal jedarne lokalizacije
SZO.....	Svetska zdravstvena organizacija
sRNK.....	Jednolančana ribonukleinska kiselina
TLR.....	Intracelularni receptori uključeni u aktivaciju nespecifičnog imunog odgovora (<i>eng. Toll-like receptors</i>)
TP.....	Test pufer
tRNK.....	Transportna ribonukleinska kiselina
UTM.....	Univerzalni transportni medijum
vRNK.....	Genomska, virusna ribonukleinska kiselina

Hvala,

Dr Vesni Milošević, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, mentorki ovog rada, na svim korisnim savetima, sugestijama, pomoći i podršci bez kojih ovaj rad ne bi bio mogući;

Dr Ivici Tamašu, naučnom saradniku Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, mentoru ovog rada, na stručnim i korisnim sugestijama i savetima u interpretaciji rezultata ispitivanja;

Nataši Bogdanović, na ogromnoj pomoći u izvodenju praktičnog dela ovog rada, a najviše na prijateljstvu i na tome što je verovala u mene;

Dipl. inženjeru Zoranu Topalovu na pomoci oko statističke obrade podataka;

Svim dragim kolegama Centra za virusologiju za iskrenu podršku;

Mojoj porodici za ljubav.

UVOD

Influenca virusi su važni humani patogeni, koji predstavljaju vodeće uzročnike akutnih respiratornih infekcija širom sveta. Pripadaju porodici RNA virusa sa segmentiranim genomom *Orthomyxoviridae*. Svrstani su u tri roda: rod *Influenzavirus A* sa vrstom *Influenza A virus*, rod *Influenzavirus B* sa vrstom *Influenza B virus*, i rod *Influenzavirus C* sa vrstom *Influenza C virus*. Samo kod vrste *Influenza A virus* sreću se antigenski različiti podtipovi označeni podtipom površinskih glikoproteina virusa - hemaglutinina i neuraminidaze. Trenutno, u ljudskoj populaciji cirkulišu dva podtipa influenza A virusa: A(H1N1)pdm09 i A(H3N2).

Među influenza virusima, influenza A virusi se izdvajaju po svom značaju, odnosno uticaju na morbiditet i mortalitet. Izazivaju sezonske epidemije influence, gripa, kojima može biti zahvaćeno 5-10% odraslih i 20-30% dece širom sveta. Influenca se u većini slučajeva manifestuje kao akutno obolenje gornjih respiratornih organa, praćeno blagim ili umereno blagim simptomima, koji spontano prolaze. Međutim, širom sveta godišnje se beleži 3-5 miliona teških slučajeva gripa, praćenih različitim komplikacijama, uključujući infekcije donjih respiratornih organa, kao i pogoršanja od ranije postojećih hroničnih bolesti. Između 250 i 500 hiljada smrtnih slučajeva godišnje, može biti povezano sa influencom. Pored toga, influenza A virusi su jedini pripadnici svoje porodice sa pandemijskim potencijalom. U pandemijskim sezonama antigenski novim virusom može biti inficirano i do 50% svetske populacije. U poslednjih 100 godina zabeležene su 4 pandemije influence, 1918., 1957., 1968. i 2009. godine, pri čemu se pandemija 1918. godine smatra najfatalnijim pojedinačnim događajem u ljudskoj istoriji, koji je odneo između 30 i 50 miliona života.

Prirodni rezervoar influenza A virusa predstavljaju divlje, akvatične ptice među kojima cirkuliše veliki broj genetički različitih podtipova. Česte mutacije gena i povremeni rearanžmani segmenta genoma, uslovljavaju izrazitu genetičku varijabilnost influenza A virusa, koja je osnova njihove brze evolucije. Genetička promenljivost stoji u osnovi brojnih karakteristika i specifičnosti ovih virusa. Kao prvo, influenza A virusi su u stanju da preskoče prirodnu biološku barijeru i adaptiraju se na čitav niz toplokrvnih životinja, uključujući i čoveka. Svi humani podtipovi influenza A virusa imaju avijarno poreklo, a konstantno se beleže i slučajevi influence ljudi izazvani animalnim podtipovima, poput A(H5N1) i A(H7N9). Pored toga, genetička promenljivost omogućuje nastanak varijanti virusa sa izmenjenim svojstvima uključujući antigenske osobine, receptor specifičnost, sposobnost transmisije između domaćina, patogenost, osetljivost prema određenom antivirusiku, itd. Usled brzih i potpuno nepredvidivih evolutivnih promena u svakom momentu otvorene su brojne mogućnosti: od nestanka postojećeg podtipa, do nastanka novog podtipa sa pandemijskim potencijalom.

Iako su influenza A virusi predmet intenzivnog izučavanja već više od 80 godina, mnoga pitanja vezana za osnove njihovih fundamentalnih bioloških svojstava, i dalje su bez odgovora. Sve komponente i mehanizmi odigravanja različitih faza procesa virusne replikacije, kao i faktori koji uslovljavaju varijacije virulencije i specifičnosti prema domaćinu, još su u

velikoj meri nejasni. Takođe, promenljivost influenza A virusa u značajnoj meri utiče na efikasnost preventivnih i terapijskih mera protiv influence. Promene antigenskih svojstava i osetljivosti na antivirusne lijekove, nameću potrebu kontinuiranog praćenja i ispitivanja ovih karakteristika, koje su od ključnog značaja za proizvodnju vakcine protiv gripa, kao i za odabir adekvatne antivirusne terapije.

CILJ RADA

U okviru ovog istraživanja postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Utvrditi zastupljenost influenza A virusa u respiratornim uzorcima pacijenata sa simptomima gripa, dokazivanjem ribonukleinske kiseline virusa pomoću molekularno biološke metode real-time RT PCR, u toku četiri uzastopne sezone virusološkog nadzora 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013 i 2013/2014.
2. Odrediti učestalost pojedinačnih podtipova influenza A virusa u zavisnosti od uzrasta pacijenata, kliničkih manifestacije influenza virusne infekcije i prisustva određenih hroničnih bolesti ili stanja koja mogu predstavljati rizik za nastanak komplikacija.
3. Izvršiti izolaciju influenza A virusa iz respiratornih uzoraka, metodom izolacije virusa na ćelijskoj kulturi i ispitati sposobnost aglutinacije eritrocita kokške, čoveka i zamorca, od strane dobijenih izolata.
4. Izvršiti antigensku karakterizaciju virusnih izolata pomoću referentnih imunih seruma, reakcijom inhibicije hemaglutinacije i utvrditi antigensku sličnost ispitivanih virusa i referentnih, vakcinalnih virusa.
5. Izvršiti genetičku karakterizaciju reprezentativnih virusnih izolata metodom sekvenciranja hemaglutinin i neuraminidaza gena, u cilju utvrđivanja povezanosti njihovih genetičkih i fenotipskih osobina i određivanja filogenetskih odnosa ispitivanih virusa i influenza virusa različitog geografskog porekla.
6. Ispitati osetljivost virusnih izolata na antivirusik oseltamivir, testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze.

OPŠTI DEO

Taksonomski status influenza A virusa

Influenca virusi su svrstani u familiju *Orthomyxoviride* (grčki *orthos* – pravi, *myxa* – mukus). Prema trenutno važećoj klasifikaciji Internacionalnog komiteta za taksonomiju virusa, familija *Orthomyxoviridae* obuhvata šest rodova: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Thogotovirus*, *Isavirus* i *Quaranjavirus* (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>).

Virione pripadnika familije *Orthomyxoviride* odlikuje pleomorfizam, pri čemu se sreću varijacije oblika od sfernog do filamentoznog. Prečnik sfernih viriona se kreće u granicama od 80-120 nm, dok su filamentozne forme dugačke do nekoliko mikrometara. Relativna molekulska masa viriona iznosi 250×10^6 . Svi ortomiksovirusi imaju segmentiran genom predstavljen negativno polarizovanom, jednolančanom ribonukleinskom kiselinom (RNK). Njegova veličina iznosi 10-14,6 kb, a dužina pojedinih segmenata genoma varira od 874-2396 nukleotida [1]. Ortomiksovirusi poseduju spoljašnju lipidnu ovojnicu, koja je proizvod ćelijske membrane. Svaka virusna partikula se sastoji od otprilike 70-75% proteina, 20-24% lipida, 5-8% ugljenih hidrata i 1% RNK [2].

I pored sličnosti u morfologiji i opštoj organizaciji viriona, pripadnici različitih rodova familije *Orthomyxoviride*, razlikuju se po antigenskoj varijabilnosti, broju segmenata genoma, opsegu prirodnih domaćina, epidemiologiji, kliničkim manifestacijama oboljenja koja izazivaju, kao i sposobnosti umnožavanja u živim sistemima u laboratorijskim uslovima (Tab. 1).

Influenca B i C virusi su tipični humani virusi, koji se retko sreću kao uzročnici infekcija kod životinja. Za razliku od njih, prirodni rezervoar influenza virusa tipa A predstavljaju divlje, akvatične ptice, odakle se virus širi i u stanju je da uspešno inficira brojne toplokrvne organizme uključujući ljude, svinje, konje, pse, mačke [3]. Influenca A i B virusi su važni humani patogeni. Uzročnici su akutnog respiratornog oboljenja – gripa, koje se često javlja u vidu manjih ili većih epidemija. Pri tome, influenza A virusi poseduju i sposobnost izazivanja globalnih epidemija - pandemija. Nasuprot njima, influenza C virusi izazivaju blage respiratorne infekcije, nemaju epidemijski potencijal i od manjeg su medicinskog značaja.

Za razliku od influenza C virusa, koji se umnožavaju samo u amnionu embrionisanih kokošijih jaja, tipovi A i B influenza virusa, nakon adaptacije, uspešno se replikuju i u alantoisu, kao i u brojnim primarnim i kontinuiranim kulturama ćelija sisara.

Genom influenza A i B virusa ima 8, a influenza C virusa 7 segmenata. Influenca A viruse odlikuje velika genetička varijabilnost, naročito delova genoma koji kodiraju površinske glikoproteine hemaglutinin (HA) i neuraminidazu (NA). Ona uslovljava postojanje više antigenski različitih tipova HA i NA. Danas je poznato 16 podtipova HA (H1-H16) i 9 NA

(N1-N9). Influenca A virusi su podeljeni na podtipove koji se obeležavaju oznakama u kojima je naveden podtip HA i NA. Svi do danas poznati podtipovi HA i NA, u brojnim kombinacijama, izolovani su iz akvatičnih ptica, dok su kod ljudi zabeleženi samo: H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N8, H6N1 [4, 5, 6]. U okviru svakog podtipa sreće se više antigenskih sojeva, odnosno varijanti.

Tabela 1: Karakteristike pripadnika familije *Orthomyxoviridae*

Rod	Vrsta	Podtipovi dokazani u ljudima	Broj segmenata genoma	Prirodni domaćin/put prenošenja	Živi sistemi u kojima se umnožavaju
<i>Influenzavirus A</i>	<i>Influenza A virus</i>	H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H6N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N8	8	Ljudi i drugi sisari, ptice/aerosol	Amnion i alantois embrionisanih kokošijih jaja, ćelijske kulture sisara
<i>Influenzavirus B</i>	<i>Influenza B virus</i>	-	8	Ljudi, foke/aerosol	Amnion i alantois embrionisanih kokošijih jaja, ćelijske kulture sisara
<i>Influenzavirus C</i>	<i>Influenza C virus</i>	-	7	Ljudi, svinje/aerosol	Amnion embrionisanih kokošijih jaja
<i>Thogotovirus</i>	<i>Thogoto virus</i>	-	6	Krpelji, komarci,	-
	<i>Dhori virus</i>	-	7	Ljudi i drugi sisari/aerosol	-
<i>Isavirus</i>	<i>Infectious salmon anemia virus</i>	-	8	Ribe (atlantski losos)/voda	Ćelijska kultura bubrega lososa
<i>Quarantavirus</i>	<i>Quaranfil virus</i>	-	6	Krpelji, ptice,	-
	<i>Johnston Atoll virus</i>	-	6	Ljudi/krpelji	-

Nedavno su u slepim miševima, u slivu reke Amazon na severu Perua i Gvatemali, otkriveni novi influenza A virusi. Filogenetske analize su pokazale da su se davno odvojili od ostalih influenza virusa i da već relativno dugo evoluiraju u slepim miševima. Utvrđeno je da koriste drugačije receptore u odnosu na ostale influenza viruse i da se ne mogu umnožavati u kulturama koje se standardno koriste za izolaciju influenza virusa. Predloženo je da ovi novootkriveni virusi budu označeni kao influenza A podtipovi H17N10 i H18N11 [7, 8].

Influenca B i C viruse odlikuje znatno manja genetička varijabilnost, odsustvo podtipova i istovremena ko-cirkulacija više antigenski različitih sojeva. Od sredine 80-tih godina prošlog veka, u humanoju populaciji cirkulišu dva soja influenza B virusa: soj Yamagata

i soj Victoria [9]. Pored toga, iako među proteinima različitih influenza virusa postoje velike funkcionalne sličnosti, utvrđene su i izvesne razlike. Na primer, za influenza C viruse je karakteristično to da poseduju samo jedan površinski glikoprotein - hemaglutinin-esteraza fuzioni protein koji, iako koristi drugačiji receptor, funkcionalno odgovara HA i NA influenza A i B virusa [10]. Takođe, influenza B virusi poseduju dva, a influenza A virusi samo jednu vrstu jonskog kanala, a neki sojevi A tipa imaju i dodatne proteine koji doprinose njihovoj virulenciji [11].

Pripadnici roda *Thogotovirus* i *Isavirus* su od manjeg medicinskog značaja. Isavirusi se prenose vodom i inficiraju nekoliko vrsta riba, prvenstveno lososa. Togotoviruse prenose krpelji i komarci, a inficiraju razne kičmenjake kao što su krave, ovce, magarci, kamile, pacovi. Humane infekcije ovim virusima praćene su povišenom temperaturom, a u težim slučajevima encefalitisom [1]. Na osnovu različite strukturne organizacije genoma, antigenih osobina, kao i razlika u aminokiselinskoj sekvenci nukleoproteina i proteina omotača, u okviru roda *Thogotovirus* izdvojene su dve vrste, *Dhoiri virus* i *Thogoto virus*.

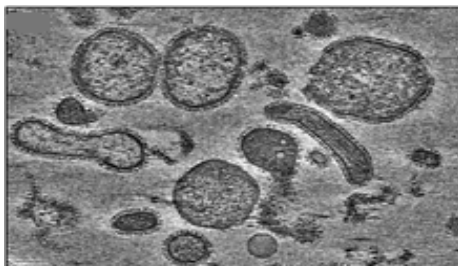
Internacionalni komitet za taksonomiju virusa nedavno je ratifikovao predlog za formiranje novog genusa u okviru familije *Orthomyxoviridae*, nazvanog *Quarantavirus*, sa dve vrste: *Quarantavirus* i *Johnston Atoll virus* [12]. *Quarantavirus* je izolovan iz krpelja i ptica širom Afrike, Bliskog Istoka i delova Azije. Za postojanje ovog virusa, kao i za njegovu sposobnost inficiranja ljudi, odavno se zna, ali su tek nedavna, detaljna ispitivanja dovela do njegove klasifikacije. Virus je još sredinom prošlog veka, izolovan iz krvi dva deteta sa simptomima blagog febrilnog oboljenja u području Quarantavirus u Egiptu, a serološka ispitivanja vršena 60-tih godina prošlog veka, dokazala su prokuženost dela lokalne populacije. Za sada, nisu vršena istraživanja koja bi pokušala da utvrde zdravstveni značaj ovog virusa za ljude [13]. *Johnston Atoll virus* je, izolovan iz krpelja na području Australije, Novog Zelanda i ostrva u Pacifiku. Trenutno, nije poznato da li je ovaj virus patogen za ljude [13].

Prema uputstvu Svetske zdravstvene organizacije (SZO) za nomenklaturu influenza virusa, oni se obeležavaju nazivima u kojima se navodi tip, domaćin, mesto prve izolacije, soj (ukoliko postoji), godina izolacije i podtip. Na primer: A/swine/Iowa/15/1930(H1N1). U slučaju humanih virusa, ne navodi se domaćin, recimo: A/Novi Sad/2013(H1N1).

Karakteristike viriona influenza A virusa

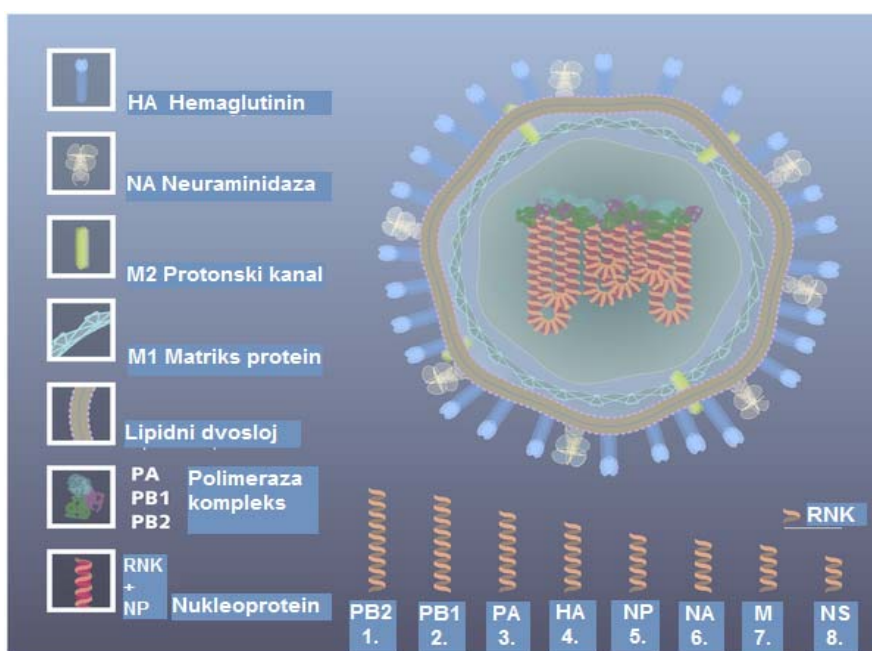
Morfološki, influenza A virusi su tipični predstavnici familije *Orthomyxoviridae* i odlikuje ih izrazit polimorfizam (Sl. 1). Dijametar sfernih i filamentoznih viriona iznosi oko 100 nm, pri čemu filamentozne forme mogu biti dugačke i do 20 µm [14]. Iako postoje laboratorijski sojevi kod kojih su prisutni samo sferni virioni, u izolatima dobijenim direktno iz inficiranih pacijenata,

preovlađuju filamentozne forme. Utvrđeno je da infekcija filamentoznim sojem može dovesti do produkcije viriona oba oblika, kao i da u nekim laboratorijskim uslovima sposobnost formiranja filamenata može biti izgubljena. Sastav viriona i infektivnost obe forme vrlo su slični, tako da funkcionalni značaj, kao ni uslovi koji dovode do favorizacije određenog oblika, za sada, nisu jasni [14].



Slika 1: Pleomorfizam viriona influenza virusa, krio-elektronska tomografija [15]

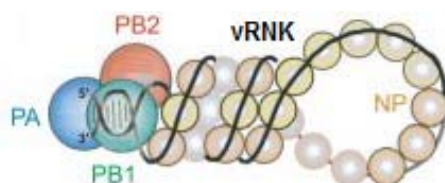
Bez obzira na morfologiju, virioni influenza virusa ima istu opštu građu (Sl. 2). Na površini viriona nalazi se dvostruka lipidna ovojnica koja sadrži tri integralna membranska glikoproteina: HA, NA i M2 protein. HA i NA su kratkim sekvencama sastavljenim od hidrofobnih aminokiselina uronjeni u lipidni dvosloj. Slobodni delovi molekula ovih glikoproteina pružaju se od ovojnice u vidu štapićastih formacija dužine 14-16 nm (HA) ili pečurkastih struktura dužine oko 10 nm (NA) [2]. Protein M2 formira transmembranske pore koje funkcionišu kao protonске pumpe. Ispod ovojnice, smešten je nukleokapsid, sačinjen od proteinskog matriksa (M1) koji okružuje ribonukleoproteinske (RNP) komplekse.



Slika 2: Shematski prikaz građe viriona influenza A virusa
(Adaptirano na osnovu: McHardy i Adams [16])

Genom influenza A virusa čini jednolančana, segmentirana, negativno-polarizovana RNK molekula. Pojedinačni segmenti genoma označeni su brojevima 1-8, počevši od najdužeg koji nosi oznaku 1, pa do najkraćeg obeleženog sa 8 (Sl. 2). Na 5' i 3' krajevima RNK svakog segmenta nalaze se nekodirajući regioni različitih dužina, pri čemu je 13 poslednjih nukleotida na 5' kraju i 12 terminalnih nukleotida na 3' kraju, identično kod svih segmenata i visoko konzervirano među podtipovima influence A [17]. Terminalne sekvence na 5' i 3' krajevima svakog segmenta odlikuje delimična komplementarnost što uslovljava njihovo povezivanje i formiranje dvolančane strukture [18]. Influenca virusi imaju nekoliko strategija kojim pokušavaju da prevaziđu ograničen kodirajući potencijal genoma čija veličina ne prelazi 13,5 kilobaza [19]. Kao prvo, nasuprot segmentima 1, 4, 5 i 6, koji nose informaciju za sintezu samo jednog proteina, ostali segmenti genoma kodiraju više različitih polipeptida (Tab. 2). Pojedini proteini se sintetišu samo u inficiranim ćelijama i ne predstavljaju sastavne delove viriona. Neki od ovih, dodatnih, nestrukturnih polipeptida nisu ekspresovani u svim sojevima influenza A virusa, te osam segmenata genoma kodira 11-16 različitih proteina. Pored toga, proteini influenza virusa su multifunkcionalni i uključeni u više, često vrlo različitih, procesa bitnih za uspešno umnožavanje virusa.

U virionima influenza A virusa, segmenti genomske RNK formiraju 8 RNP kompleksa, koji predstavljaju funkcionalne jedinice u procesima transkripcije i replikacije. Svaki RNP kompleks (Sl. 3) čini RNK lanac jednog segmenta, više kopija molekula nukleoproteina (NP) od kojih je svaki u asocijaciji sa 24 nukleotida i kompleks RNK-zavisne RNK polimeraze vezan za konzervirane sekvence na krajevima RNK lanca [2, 20]. RNP kompleksi imaju oblik dvostrukih heliksa, pri čemu zahvaljujući interakcijama NP, obrazuju strukturu poznatu kao „ukosnica“ [21, 22]. Polimeraza kompleksi predstavljaju heterotrimere sastavljene od: polimeraza baznog proteina 1 (PB1), polimeraza baznog proteina 2 (PB2) i polimeraza acidnog proteina (PA). Ovi proteini su kodirani sa prva 3 najveća segmenta genoma.



Slika 3: Shematski prikaz strukture ribonukleoproteinskog kompleksa influenza A virusa. Vidi se genomska RNK (vRNK) obmotana oko nukleoproteina (NP), kao i subjedinice polimeraza kompleksa (PB1, PB2 i PA), vezane za 3' i 5' kraj RNK [23]

Prvi segment nosi informaciju za sintezu PB2 koji igra ključnu ulogu u inicijaciji procesa transkripcije. Sadrži mesto preko kojeg ostvaruje vezu sa *cap* strukturama prekursora ćelijskih informacionih RNK (mRNK) koje će služiti kao transkripcioni prajmeri. Ovaj protein pokazuje

delimičnu homologiju aminokiselinske sekvence sa ćelijskim *cap*-vezujućim proteinima [17]. Uloga PB2 u replikaciji virusnog genoma nije sasvim jasna, ali je utvrđeno da je za aktivnost polimeraza kompleksa potrebno prisustvo sve tri subjedinice, te da inaktivacija bilo koje od njih dovodi do inhibicije i transkripcije i replikacije [17].

Tabela 2: Segmenti genoma influenza A virusa i polipeptidi kodirani tim segmentima [24, 25, 26]

Oznaka segmenta	Dužina segmenta (nt)	Oznaka polipeptida	Dužina polipeptida (ak)	Broj molekula po virionu	Neke funkcije polipeptida
1	2341	PB2	759	30-60	Vezivanje za <i>cap</i> strukture ćelijskih mRNA
2	2341	PB1	757	30-60	Polimerazna i endonukleazna aktivnost
		PB1-F2*	do 90		Faktor virulencije
		PB1-N40*	718	-	?
3	2233	PA	716	30-60	Odvajanje <i>cap</i> strukture ćelijskih mRNK
		PA-X	132-152	-	Faktor virulencije
		PA-N155*	561	-	?
		PA-N182*	534	-	?
4	1778	HA	566	500	Vezivanje za receptor, fuzija virusne ovojnice i membrane endozoma
5	1565	NP	498	1000	Strukturna organizacija ribonukleoproteinskih kompleksa
6	1413	NA	454	100	Oslobađanje zrelih viriona
		M1	252	3000	Daje formu virionu
7	1027	M2	97	20-60	Protonski kanal
		M42**		?	Alternativni protonski kanal
8	890	NS1	230	-	Faktor virulencije
		NEP/NS2	121	130-200	Intracelularni transport

nt – broj nukleotida; ak – broj aminokiselina; * - prisutan kod većine humanih influenza A virusa;

** - prisutan samo kod nekih humanih sojeva influenza A virusa

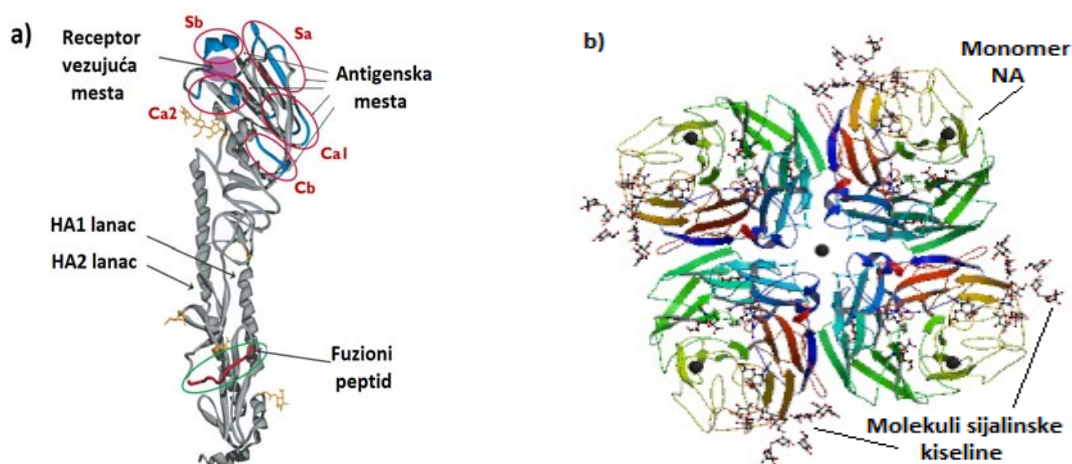
Drugi segment kodira sintezu tri proteina: PB1, PB1-F2 i PB1-N40. PB1 funkcioniše kao RNK-zavisna RNK polimeraza i endonukleaza, te je zadužen za elongaciju polinukleotidnog lanca. PB1 čini osnovu polimeraza kompleksa i na N-kraju poseduje rezidue preko kojih ostvaruje vezu sa PA, a na C-kraju sa PB2 [27]. Ovaj enzim pokazuje homologiju u pogledu aminokiselinske sekvence sa drugim nukleo-kiselinskim polimerazama i poseduje sva 4 segmenta konzervirana među svim RNK-zavisnim RNK polimerazama [17]. Kod većine influenza virusa 2. segment nosi informaciju za sintezu dva dodatna proteina: PB1-F2 i PB1-40. Protein PB1-F2 je detektovan u mitohondrijama ćelija inficiranih najvećim brojem influenza A sojeva i utvrđeno je da ima ulogu u inhibiciji ekspresije ćelijskih gena uključenih u antivirusni odgovor, kao i u apoptozi ćelija imunog sistema, te predstavlja značajan faktor

virulencije [2, 28, 29]. Pro-apoptozna funkcija PB1-F2, uslovljena je njegovom sposobnošću vezivanja za dva mitohondrijalna proteina što za posledicu ima povećanu permeabilnost membrane ovih organela [30]. Pored toga, deo PB1-F2 je lokalizovan i u jedru gde interaguje sa PB1 i stimuliše aktivnost polimeraza kompleksa [25]. U odnosu na PB1, odlikuje ga znatno veća varijabilnost kako u sekvenci, tako i u dužini polipeptidnih lanaca prisutnih kod različitih sojeva influenza A virusa, što se odražava na njegovu ćelijsku lokalizaciju, kao i funkciju. Utvrđeno je da kraća forma PB1-F2 (ispod 79 ak) smanjuje sposobnost mitohondrijalne lokalizacije, a time i indukcije apoptoze [25, 31]. PB1-N40 je najvećim delom lokalizovan u citoplazmi, ali njegova funkcija, za sada, nije razjašnjena [32]. Eksperimentalno je potvrđeno da ekspresija PB1-F2 i PB1-N40 nije od suštinskog značaja za umnožavanje influenza A virusa. Na primer, funkcionalan PB1-F2 nije pronađen kod virusa A(H1N1)pdm09 [25].

Treći segment kodira sintezu PA. Njegov N-domen poseduje RNK-endonukleaznu aktivnost, koja je od ključnog značaja za inicijaciju transkripcije [33]. Pored toga, dokazana je i proteazna funkcija PA, koja je najverovatnije bitna za oslobađanje RNP kompleksa od jedarnog matriksa, što je preduslov njihovog transporta u citoplazmu [17]. Postoji ograničena homologija sekvenci između PA i helikaza drugih RNK virusa, mada helikazna aktivnost PA nije dokazana [17]. Jagger i sar. [33] su nedavno dokazali da 3. segment kodira sintezu još jednog proteina nazvanog PA-X. Eksperimentalno su utvrdili da ekspresija PA-X nije preduslov virusne replikacije ali da ovaj protein učestvuje u inhibiciji translacije ćelijskih proteina. Zato se PA-X smatra pomoćnim proteinom koji doprinosi virulenciji virusa. Iako je verovatno univerzalno prisutan kod influenza A virusa, dužina PA-X varira zavisno od soja virusa, pri čemu nije poznato kako se to odražava na funkciju proteina. Nakon otkrića PA-X, ubrzo su detektovana još dva proteina koja predstavljaju N-terminalno skraćene verzije PA proteina, te su nazvani PA-N155 i PA-N182 [26]. Rezultati eksperimentalnih istraživanja pokazuju da su oni verovatno univerzalno prisutni kod influenza A virusa. Mutanti kod kojih ovi proteini nisu ekspresovani, umnožavaju se sporije u ćelijskim kulturama i pokazuju manju patogenost u miševima, što ukazuje na to da PA-N155 i PA-N182 imaju funkciju u replikaciji virusa [26].

HA je glikoprotein kodiran 4. segmentom i predstavlja integralni deo lipidne ovojnice. Najzastupljeniji je od svih membranskih proteina i njegove karakteristike stoje u osnovi mnogih specifičnosti virusa influence A. Ima ključnu ulogu u vezivanju za ćelijske receptore i fuziji virusne ovojnice sa ćelijskom membranom, na samom početku infekcije ćelije. Zrele molekule HA su homotrimeri, izgrađeni od tri HA1-HA2 polipeptida. Oni su raspoređeni po celoj površini virusne ovojnice, tako što su uronjeni u nju svojim štapićastim delovima od kojih se, prema spolja, pružaju globularne „glave“. Na molekulu svakog monomera razlikuju se tri dela: najveći, N-terminalni ektodomen orijentisan prema spolja, transmembranski deo od oko 27 aminokiselina i kratak citoplazmatski C-terminalni kraj od oko 11 rezidua [34]. Globularni

deo je sačinjen od HA1 subjedinice, a štapićasti deo molekula gradi HA2 i deo HA1 polipeptida [35]. Subjedinica HA2 sadrži visokokonzerviranu sekvencu nazvanu „fuzioni peptid“ (Sl. 4a), koju čini 20, većinom hidrofobnih, aminokiselina, uključenih u proces fuzije sa ćelijskom membranom, dok se mesto vezivanja za receptor nalazi u okviru HA1 molekula, distalno od membrane [28, 36]. Mesto odgovorno za vezivanje za receptor čine sekvence visoko konzervirane primarne i sekundarne strukture [37]. Zbog svoje uloge u prepoznavanju ćelijskih receptora, HA je ključna determinanta tkivnog tropizma virusa, od kojeg zavisi virulencija virusa i patogeneza bolesti. Pet antigenskih determinanti, smeštenih oko receptor vezujućeg mesta (Sl. 4a), pokriva najveći deo globularnog regiona molekula [35]. Antigenska mesta kod H3 podtipa označena su sa A, B, C, D i E, a kod H1 podtipa sa Ca1, Ca2, Cb, Sa i Sb [38]. HA je najvažniji antigen influenza virusa, te predstavlja glavnu metu neutrališućih antitela, odnosno humoralnog imunog odgovora domaćina. Klasifikacija influenza A virusa u 16 HA podtipova, zasnovana je na antigenskim razlikama HA. Na osnovu filogenije, 16 HA je svrstano u dve grupe. U grupi 1 se, između ostalih, nalaze i H1, H2 i H5 podtipovi, a u grupi 2 H3 podtip [39].



Slika 4: Struktura površinskih glikoproteina influenza A virusa

a) Monomer hemaglutinina influenza A (H1N1) virusa [28];

b) Tetramer neuraminidaze u kompleksu sa molekulima sijalinske kiseline. Polipeptidni lanci su predstavljeni spektrom boja (žuta, narandžasta, crvena, ljubičasta, plava i zelena), od N ka C kraju. (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1mwe>)

NP je kodiran 5. segmentom genoma i jedan je od proteina koji se u inficiranoj ćeliji stvara u najvećoj količini. Molekule NP influenza A virusa formiraju trimere oko kojih je obmotana RNK u RNP kompleksima. NP je multifunkcionalan protein sposoban za interakcije sa različitim virusnim makromolekulama poput RNK, PB1, PB2 i M1, kao i ćelijskim proteinima. Ta osobina stoji u osnovi različitih uloga NP, kao što je strukturna organizacija RNP

kompleksa, učestuje u transkripciji i replikaciji virusnog genoma, kao i u njegovom intracelularnom transportu i pakovanju [40]. Zbog dokazane pro-apoptozne funkcije [41] i sposobnosti inaktivacije antivirousnog ćelijskog enzima – od dvolančane RNK (dsRNK)-zavisne protein kinaze R (PKR) [42], NP predstavlja i važan faktor virulencije. Moguće je da je njegova najvažnija funkcija razdvajanje novo-stvorenih RNK od RNK matrica, s obzirom da virusni replikacioni kompleksi ne sadrže helikaze [43]. Poznata su mesta na molekulu NP koja ostvaruju vezu sa drugim monomerom NP, sRNK i polimerazom [44]. NP je tipski specifičan antigen i omogućuje klasifikaciju influenza virusa u tipove A, B ili C [2].

NA je još jedan membranski glikoprotein, kodiran 6. segmentom. To je homotetramer (Sl. 4b), pečurkastog oblika, pri čemu dužina „drške“ varira među sojevima virusa. Na svakom monomeru, distalno u odnosu na virusnu ovojnici, nalazi se C-terminalni ektodomen, na koji se nastavlja transmembranski deo od oko 30 aminokiselina, dok prvih 5 rezidua na N-kraju čine citoplazmatski kraj [34]. Ovaj virusni protein funkcioniše kao enzim koji katalizuje uklanjanje sijalinske kiseline sa ćelijskih glikoproteina i glikolipida, kao i oba virusna glikoproteina. Time se onemogućuje vezivanje novo-formiranih virusa za površinu inficirane ćelije i formiranje agregata putem interakcija HA i sijalinske kiseline. Umesto toga, virioni bivaju oslobođeni i spremni da inficiraju nove ćelije. Pored toga, rezultati nedavnih istraživanja ukazali su da NA igra važnu ulogu i u inicijaciji infekcije ćelije. Naime, NA degradira mukus respiratornog trakta, kidajući veze između sijalinske kiseline i rezidua šećera mukusa. Na taj način smanjuje se viskozitet mukusa, olakšava kontakt virusa sa ciljnim ćelijama i prodor virusa prisutnih u mukusu u donje delove respiratornog trakta [35, 45]. NA je antigenski varijabilan, što je osnova podele influenza A virusa na podtipove N1-N9. Postoje dve filogenetske grupe NA: prva u kojoj se nalaze N1, N4, N5, N8 i druga u koju su svrstani N2, N3, N6, N7, N9 [46].

Sedmi segment genoma nosi informaciju za sintezu 2 proteina označena kao M1 i M2, univerzalno prisutna kod svih influenza A virusa. Kod izvesnih sojeva, utvrđeno je prisustvo i M24 proteina koji može da kompenzuje nedostatak M2, a na osnovu detektovane mRNK pretpostavlja se postojanje još jednog proteina kodiranog ovim segmentom [25]. M1 je najzastupljeniji virusni protein u virionu influenza virusa [35]. To je strukturni matriks protein, čije molekule formiraju helikalnu mrežu ispod virusne ovojnice, te joj obezbeđuju potporu i formu. Na toj mreži se nalaze pravilno raspoređeni otvori, verovatno mesta insercije i interakcije sa citoplazmatskim krajevima HA i NA [14]. S druge strane, M1 interaguje sa RNP kompleksima formirajući nukleokapsid viriona. M1 učestvuje u transportu novoformiranih RNP kompleksa iz ćelijskog jedra i njihovoj inkorporaciji u nove virione, u toku replikacije virusa [47]. Molekul M1 proteina može biti podeljen na dva domena, pri čemu se sekvenca koja ima afinitet za vezivanje za RNP nalazi u delu koji ima C-kraj, a mesto preko kojeg se ostvaruje veza sa virusnim proteinom, koji služi u transferu RNP kompleksa iz nukleusa, smeštena je u

N-terminalnom delu [48]. Delovi molekula odgovorni za povezivanje sa HA i NA, još nisu određeni, pri čemu je moguće da se prostiru duž celog proteina [14].

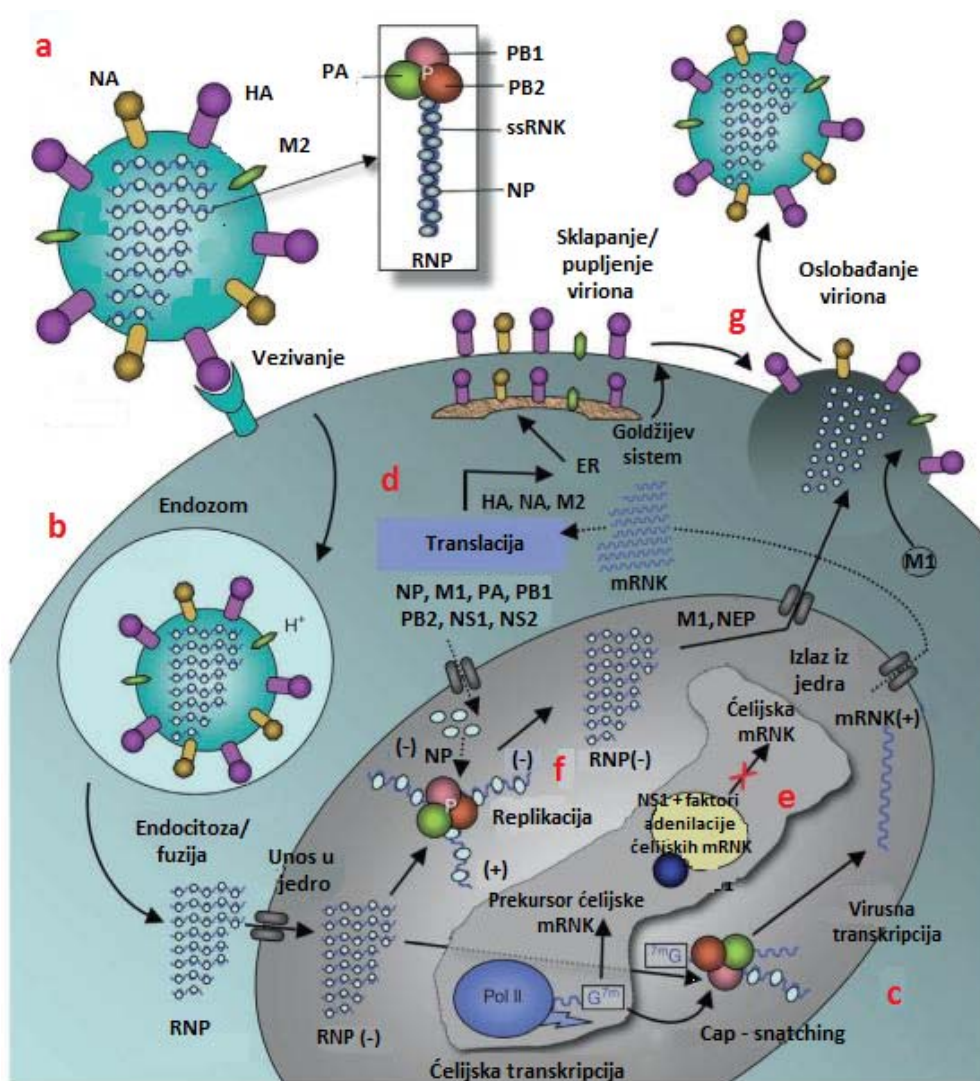
Protein M2 je homotetramer jednostavne strukture, koji ima ulogu proton-selektivnog jonskog kanala. Svaku poru kanala grade četiri heliksa sastavljena od po 97 aminokiselinskih rezidua [49]. Prvih 24 aminokiselina N-terminalnog kraja svakog heliksa formira ektodomen, orijentisan prema spolja, citoplazmatski domen čine 54 rezidue C-terminalnog kraja, dok se između njih nalazi transmembranski deo od 19 aminokiselina [34, 50]. Protonski kanal reaguje isključivo na promenu pH spoljašnje sredine, bez obzira na pH vrednost unutrašnjosti viriona. Acidifikacija spoljašnje sredine, odnosno niska pH vrednost ga aktivira, dok ga visoka pH vrednost zatvara. Protein M2 ima važnu ulogu kako u početnim, tako i u završnim fazama replikacije virusa. Nakon ulaska virusa u ćeliju endocitozom, aktivnost M2 dovodi do acidifikacije unutrašnjosti viriona, čime je omogućeno oslobađanje virusne RNK iz RNP kompleksa, što je preduslov za njenu replikaciju [49, 50]. Pred kraj virusnog ciklusa, M2 održava visoku vrednost pH trans-Goldžijeve mreže i tako sprečava prevremene konformacione promene HA [49, 50].

Osmi segment genoma nosi informaciju za sintezu dva proteina: nestrukturnog proteina 1 (NS1) i nuklearnog eksport proteina (NEP). NS1 je mali, multifunkcionalni polipeptid koji učestvuje u protein-RNK i protein-protein interakcijama. NS1 je dimer, pri čemu je jedan domen njegovog molekula u stanju da se veže za dsRNK, a drugi za različite ćelijske proteine. Sintetiše se u velikim količinama u inficiranoj ćeliji ali nije inkorporiran u virione [51]. Prvenstveno je lokalizovan u jedru ćelije, a u kasnijim fazama infekcije i u citoplazmi [52]. Njegova najvažnija uloga je inhibicija ključnih procesa koji stoje u osnovi antivirusnog odgovora inficirane ćelije, te pretstavlja još jedan značajan faktor virulencije. On ograničava produkciju interferona (IFN), kao i ćelijskih proteina sa antivirusnim dejstvom poput PKR [42, 52]. Zbog dokazane interakcije sa proteinom ćelijskog jedra odgovornim za izlazak mRNK iz njega i virusnim polimeraza kompleksom, NS1 ima ulogu i u izlasku virusne mRNK iz jedra i u regulaciju replikacije i translacije virusne RNK [52].

Za razliku od NS1 koji se stvara u ranim fazama infekcije, NEP se može naći u virionima tek u kasnijim fazama virusnog ciklusa. NEP je ranije nosio naziv nestrukturni protein 2, pošto se smatralo da nema ulogu strukturalnog proteina. Kasnije je potvrđeno njegovo prisustvo u virionima i dokazana je njegova uloga u transportu novoformiranih RNP iz jedra, te je preimenovan u NEP. Sekvenca odgovorna za transport iz jedra smeštena je između 12 i 21 aminokiselinske rezidue i smatra se da svoju funkciju obavlja interakcijom sa ćelijskim jedarnim eksport proteinom Crm1 [32]. Rezultati skorijih istraživanja ukazali su na još neke uloge ovog polipeptida. Tako je danas poznato da NEP učestvuje i u oslobađanju virusa iz inficirane ćelije, kao i u regulaciji količina pojedinih vrsta virusnih RNK, verovatno putem favorizovanja sinteze vRNK [32].

Replikacija influenza A virusa

Influenca virusi se razmnožavaju u jedru i citoplazmi inficirane ćelije (Sl. 5). U jedru se odvijaju procesi transkripcije i replikacije, a u citoplazmi sinteza virusnih proteina. Virioni se kompletiraju na membrani ćelije, od koje stiču omotač, a zatim iz nje izlaze pupljenjem.



Slika 5: Replikacioni ciklus influenza A virusa a) Vezivanje HA za ćelijske receptore; b) Endocitoza, oslobađanje RNP kompleksa i transport u jedro; c) Sinteza virusnih mRNK, 'cap snatching'; d) Transport virusnih mRNK u citoplazmu radi translacije proteina, obrada HA, M2 i NA u endoplazmatičnom retikulumu i glikolizacija u Goldži aparatu, transport do ćelijske membrane; e) NS1 protein suprimira sintezu ćelijskih mRNA; f) Sinteza genomskih RNK, formiranje RNP i njihov transport u citoplazmu, posredstvom M1–NEP kompleksa; g) Pakovanje RNP u nove virione, pupljenje (Adaptirano na osnovu: Das i sar. [53])

Prepoznavanje virusa i osetljive ćelije

Prvi korak u produktivnoj virusnoj infekciji predstavlja prepoznavanje ciljne, prijemčive ćelije. Vezivanje virusa za površinu ćelije domaćina predstavlja strogo specifičan proces. Nepostojanje odgovarajućih receptora na plazmalemi, ili njihova blokada, ćeliju čini neosetljivom na infekciju. Zato, prisustvo i distribucija adekvatnih receptora, određuju selektivnost virusa u pogledu vrste domaćina, kao i histološku selektivnost u okviru osetljivog domaćina. S druge strane, na sposobnost inficiranja različitih domaćina i tipova ćelija, utiču i odgovarajuće virusne determinante.

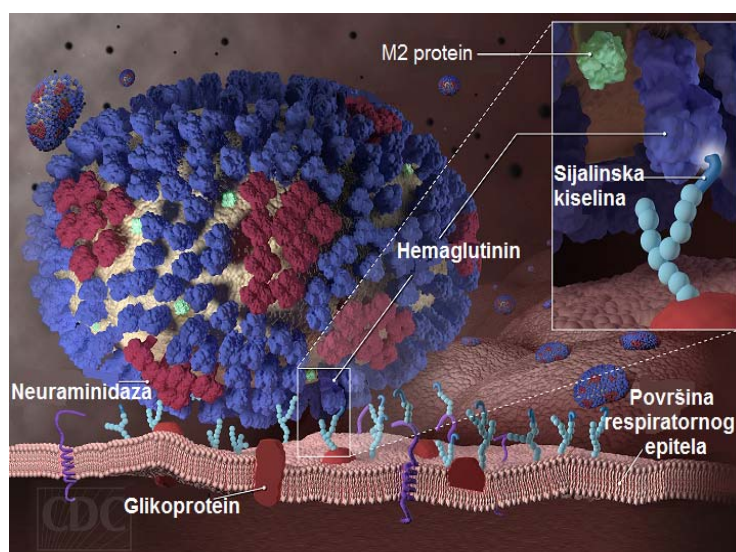
Influenca A virusi, kao receptore, koriste ćelijske proteine modifikovane sijalinskom (N-acetilneuraminskom) kiselinom (Sl. 6). Sijalinska kiselina je monosaharid sa devet ugljenikovih atoma i sastavni je deo raznih glikoproteina i glikolipida. Široko je rasprostranjena na površini ćelija mnogih tkiva kako sisara tako i ptica, što predstavlja faktor koji doprinosi inter-specijes transmisiji virusa [54]. Kod svih influenza A virusa, molekule HA se vezuju za ćelijske receptore na sličan način. Dolazi do višestrukih hidrofobnih interakcija i formiranja vodoničnih veza između visoko konzerviranih receptor – vezujućih sekvenci molekula HA i molekula sijalinske kiseline membranskih proteina [37, 55]. U okviru ćelijskih glikoproteina, ugljenik na položaju 2 sijalinske kiseline može ostvariti vezu sa ugljenikom galaktoze glikoproteina na položaju 3 (α 2,3 veza) ili 6 (α 2,6 veza). Humani sojevi virusa su predisponirani na upotrebu α 2,6 sijalinsko-galaktoznih veza koje dominiraju na ćelijama humanog respiratornog epitela [28]. Nasuprot tome, na ćelijama crevnog epitela ptica dominira α 2,3 tip receptora, na koji su adaptirani avijarni influenza A virusi.

Ključnu ulogu u prepoznavanju receptora imaju molekule HA, na kojima se nalaze receptor - vezujuća mesta. Receptor – vezujuća mesta su udubljenja, nalik džepu, smeštena na distalnim delovima sva tri monomera koji formiraju HA trimer. Humani i avijarni influenza virusi, razlikuju se po aminokiselinama prisutnim na odgovarajućim pozicijama u okviru ovih regiona. Tako se na položaju 226 i 228 kod ptičijih H3 podtipova nalaze glutamin i glicin, a kod humanih leucin i serin. Ove aminokiseline ne učestvuju direktno u vezivanju za receptor nego utiču na oblik udubljenja receptor-vezujućeg mesta i na taj način određuju preferenciju virusa prema humanom ili avijarnom tipu receptora [56]. Slično tome, na afinitet prema odgovarajućem receptoru, kod H1 podtipova utiču rezidue na položaju 186 i 225, pri čemu su kod avijarnih virusa na tim pozicijama prolin i glicin, a kod humanih serin i asparagin. Pored ovih, i druge rezidue imaju ulogu u prepoznavanju i vezivanju za ćelijske receptore, što ceo proces čini vrlo kompleksnim i specifičnim za odgovarajući podtip i soj influenza A virusa.

Ulazak virusa u ćeliju

Nakon vezivanja za receptore, influenza virusi ulaze u ćeliju procesom receptor-posredovane endocitoze. Endocitozni sistem ćelije čini kompleksna, dinamična

mreža endocitoznih odeljaka - endozoma. Influenca virusi koriste klaritin - zavisnu endocitozu, mada mehanizam kojim virus inicira ovaj proces, nije u potpunosti jasan. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da, vezujući se za površinu ćelije, virioni izazivaju aktivaciju receptora tirozin kinaze, što dovodi do pokretanja celularnog signalizacionog puta koji rezultira *de novo* stvaranjem klaritinom obloženih udubljenja od kojih se formiraju rani endozomi putem kojih virus prodire u ćeliju [14]. Pored klaritin-zavisne endocitoze, sferni virioni influenza A virusa, mogu da koriste i alternativne puteve ulaska, odnosno klaritin- i kaveolin- nezavisnu endocitozu, kao i makropinocitozu. Tip endocitoze je donekle ćelijski-zavisan, pošto je primećeno da različiti tipovi ćelija favorizuju različite načine ulaska. U osnovi ove pojave je nejednaka distribucija različitih tirozin kinaza, od kojih neke pokreću put klaritin-zavisne endocitoze, a druge makropinocitozu [14]. Filamentozni virioni, zbog svojih dimenzija, za prodor u ćeliju koriste samo proces makropinocitoze. Ovaj proces započinje stvaranjem ispupčenja ćelijske opne, koje obuhvata virion i uvlači ga u unutrašnjost. Virus se dalje transportuje nastalim makropinozomom, koji se na kraju spaja sa endozomalnim sistemom čija acidifikovanost izaziva fragmentaciju filamentoznih viriona na brojne sferne partikule [57].



Slika 6: Vezivanje influenza virusa za ćeliju respiratornog trakta
(Adaptirano na osnovu: Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta,
<http://www.cdc.gov/flu/images.htm>)

Nakon ulaska u ćeliju, influenza virusi se posredstvom ranih endozoma transportuju u kasne endozome. Na tom putu oni bivaju izloženi postepenoj acidifikaciji, počevši od pH 6 u unutrašnjosti ranih endozoma, pa do pH 5 kolika je reakcija sredine u kasnim endozomima. Niža pH vrednost indukuje konformacione promene molekula HA, tokom kojih dolazi do eksternalizacije HA2 fuzionog peptida. On se insertuje u membranu kasnih endozoma čime ona postaje povezana sa virusnom ovojnicom. Na taj način nastaje otvor kojim se virusni RNP kompleks oslobađa u citoplazmu [49, 50, 55]. Ovde je potrebno naglasiti da je za uspešnu

infekciju ćelije, neophodno prisustvo aktiviranog HA. Naime, HA se sintetiše kao prekursor HA0, koji dejstvom ćelijskih proteaza biva transformisan u HA1-HA2, odnosno aktivni kompleks dva polipeptida spojena disulfidnim mostom. Mesta koja predstavljaju metu enzima nalaze se u blizini hidrofobnog fuzionog peptida, a njihova kompozicija i struktura, diktira opseg proteaza koje su u stanju da aktiviraju HA. Virusne partikule čiji HA nije aktiviran, mogu ostvariti vezu sa receptorom i biti unete endocitozom u ćeliju, ali fuzija virusne ovojnice i opne endozoma ne može biti ostvarena [15]. Pored fuzije virusne i ovojnice endozoma, kisela sredina u unutrašnjosti endozoma izaziva i otvaranje M2 protonskog kanala virusnog omotača. On "pumpa" protone u unutrašnjost viriona, koja postaje acidifikovana što izaziva depolimerizaciju M1 i njegovu disocijaciju od RNP kompleksa [48]. Na ovaj način, RNP kompleksi bivaju oslobođeni u citosol, te mogu biti transportovani u jedro radi transkripcije i replikacije. Ustanovljeno je da histidin na 37. i triptofan na 41. poziciji molekula M2, imaju ulogu pH senzora i protonske kapije [58].

Transkripcija i translacija virusne RNK

Procesi replikacije i transkripcije kod influenza virusa nisu u potpunosti rasvetljeni. Osnovna shema njihovog odvijanja je poznata, ali još nisu utvrđeni svi faktori koji doprinose njihovom nesmetanom odigravanju i regulaciji. Osnovne funkcionalne jedinice i u replikaciji i u transkripciji su RNP kompleksi. Naime, pored RNK matrice, za njihovo odvijanje, neophodno je i prisustvo sve tri subjedinice polimeraze, kao i NP s obzirom na to da polimeraza ne može da koristi „golu“ virusnu RNK [17].

Poznato je da se replikacija i transkripcija genoma najvećeg broja RNK virusa, koji nemaju dezoksiribonukleotidnu fazu, odvija u citoplazmi inficirane ćelije. Influenca virusi pripadaju malobrojnoj grupi virusa sa RNK lancima negativnog polariteta, koji za umnožavanje svojih genoma, koriste pojedine elemente jedarnog mehanizma replikacije. Zato, nakon oslobađanja od M1, RNP kompleksi moraju biti transportovani iz citoplazme u jedro. Njihova veličina prevazilazi dimenzije koje dozvoljavaju pasivno difundovanje kroz pore jedarne membrane. Međutim, utvrđeno je da svi proteini koji ulaze u sastav RNP kompleksa, poseduju signale nuklearne, jedarne lokalizacije (SNL), koje prepoznaju komponente ćelijskog sistema koji služi unosu materija u jedro [55]. Danas je poznata lokalizacija SNL na molekulima svih proteina RNP kompleksa i dokazana je uloga tih sekvenci u njihovom transferu u jedro nakon *de novo* sinteze u citoplazmi, ali i dalje nije jasno koji od tih signala su odgovorni za transport RNP kompleksa koji u ćeliju stižu kao već postojeće komponente viriona [48]. Na molekulima NP, PB2 i PA otkrivena su dva SNL, a na molekulima PB1 jedan [48]. Ove sekvence posreduju u veoma brznoj translokaciji virusnih proteina u jedro putem direktnog povezivanja sa ćelijskim importinom α , a zatim importinom β , kao i naknadnom interakcijom sa nukleoporinima – strukturnim komponentama kompleksa jedarnih pora [20, 44,

47, 52]. Za razliku od PB2 koji se u jedro importuje u vidu pojedinačnih molekula, druge dve komponente polimeraza kompleksa, pre unosa u jedro, u citoplazmi formiraju PB1-PA heterodimere. Tek u jedru dolazi do povezivanja sve tri subjedinice u funkcionalne komplekse.

Pored komponenti RNP kompleksa, u jedro se transportuju još tri virusna proteina: M1, NEP i NS1 [48]. Naime, iako najveći deo M1 proteina ostaje u citoplazmi, jedan deo biva unet u jedro gde će igrati važnu ulogu u naknadnom iznošenju formiranih RNP kompleksa. U tom procesu funkciju ima i NEP, na kojem nisu pronađeni SNL i čije molekule, zahvaljujući maloj veličini, slobodno difunduju u nukleus. I na kraju, u jedro ulazi i NS1 protein koji, zavisno od soja influenza virusa, poseduje jednu ili dve signalne sekvence [52]. U jedru, ovaj protein ostvaruje više važnih funkcija, poput stimulacije sinteze virusnih mRNK i inhibicije ćelijske transkripcije.

Jedro je mesto sinteze svih virusnih RNK, pri čemu svaki od 8 segmenata genoma predstavlja nezavisnu funkcionalnu jedinicu tokom transkripcije i replikacije. Kompleks virusne RNK-zavisne RNK polimeraze koristi vRNK, kao šablon za sintezu dve vrste pozitivnih RNK lanaca. Prvo, u procesu transkripcije dolazi do stvaranja mRNK, koje će služiti kao matrice tokom procesa translacije. Nakon toga, dolazi do obrazovanja komplementarne kopije cele RNK (cRNK) koju će isti enzimski kompleks, naknadno transkribovati u više kopija negativnih RNK lanaca genoma novih virusa.

Transkripcija virusne RNK u mRNK, započinje vezivanjem polimeraze za 5' i 3' krajeve vRNK, što dovodi do konformacionih promena njenih subjedinica i njihove aktivacije. Virusna transkripcija predstavlja prajmer-zavisan proces, pri čemu ulogu inicijatora sinteze virusnih mRNK, igra 7-metil guanin struktura, nazvana *cap*. Ova struktura, prisutna na 5' kraju virusnih mRNK, nije kodirana virusnim genomom nego ima ćelijsko poreklo. Naime, na 5' kraju ćelijskih mRNK nalazi se *cap* struktura odgovorna za njihovo povezivanje sa ribozomima. U procesu poznatom kao „*cap*-snatching“, PB2 protein virusnog polimeraza kompleksa, prepoznaje i vezuje se za ćelijske *cap* fragmente, a endonukleazni domen PA cepa prekursor ćelijske mRNK 10-13 nukleotida uzvodno od 5' kraja i tako odvajaju *cap* sekvencu [53, 59]. Transkripcija virusne RNK u mRNK, započinje *cap* prajmerom, pri čemu se elongacija nastavlja sve dok polimeraza ne stigne do poliadenilacionog signala koji je predstavljen sekvencom od 5-7 uracila smeštenom odmah uz 5' kraj genomske RNK segmenata [47, 55]. Polimeraza ovu sekvencu transkribuje u niz adenina, tako da je poli-adenil rep na 3' kraju virusnih mRNK kodiran genomom, za razliku od ćelijskih mRNK kod kojih nastaje enzimskim dejstvom specifičnih poli(A) polimeraza [55]. Ovako nastale poliadenilovane i *cap*-ovane virusne mRNK služe kao šabloni u procesu sinteze virusnih proteina.

Kod influenza virusa, transkripcija počinje veoma rano, već nakon jednog sata od početka infekcije, a pik dostiže otprilike 2,5 sata posle prodora virusa u ćeliju [20]. Nakon ulaska u jedro, polimeraza iz RNP kompleksa, započinje transkripciju i stvaranje mRNK sa

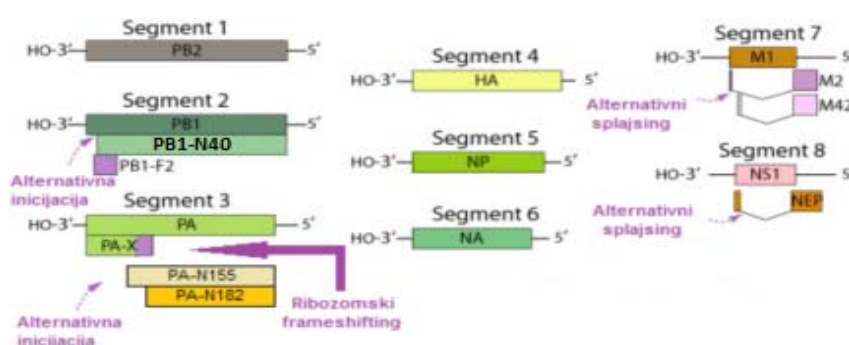
kjih će biti sintetisani rani virusni proteini i to komponente RNP kompleksa PB1, PB2, PA, NP, kao i NS1 protein. Novosintetisani molekuli polimeraze učestvuju u stvaranju mRNK koje kodiraju stvaranje kasnih virusnih proteina uključujući HA, NA, M1, M2 i NS2, kao i u kasnijoj replikaciji virusnog genoma. Iako sinteza virusnih mRNK dostiže maksimum veoma rano, još nedovoljno poznat regulatorni mehanizam, obezbeđuje nesmetano odvijanje translacije virusnih proteina rastućim intenzitetom tokom celog trajanja infekcije [20].

Transport virusnih mRNK iz jedra u citoplazmu nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da virusne mRNK interaguju sa istim setom proteina domaćina, koji su uključeni i u eksport ćelijskih mRNK. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da su različiti ćelijski faktori uključeni u transport pojedinih virusnih mRNK iz jedra. Tako je utvrđeno da transport mRNK NS1, HA, NA, M1, M2 i proteina RNP kompleksa zavisi od NXF1 proteina odgovornog za transfer ćelijskih mRNK iz jedra, pri čemu je u iznošenje mRNK M1, M2 i NS1 uključena i ćelijska helikaza UAP56 [20]. Svi faktori nuklearnog transfera mRNK, kao i njihove interakcije na molekularnom nivou, još nisu dovoljno jasni.

Kao što je već rečeno, pojedini segmenti genoma nose informaciju za sintezu više od jednog polipeptida (Sl. 7). Ekspresija tih dodatnih proteina, ostvaruje se različitim mehanizmima, uključujući splajsing, upotrebu alternativnih mesta inicijacije translacije u istom ili alternativnom, preklapajućem "okviru čitanja" (ORF-open reading frame), kao i ribozomski frameshifting [19]. Tako, mRNK 7. i 8. segmenta nastaju kao kopije celih segmenata i služe kao matrice za sintezu M1, odnosno NS1 proteina. Međutim, neke od ovih mRNK podležu posttranskripcionoj modifikaciji – splajsingu, i kao takve diktiraju stvaranje M2, odnosno NEP. Interesantno je da su kod nekih sojeva influenza virusa pronađene još dve dodatne mRNK koje nastaju splajsovanjem mRNK M1, označene kao mRNK₃ i mRNK₄. Protein mRNK₃, za sada, nije detektovan, mada se smatra da igra ulogu u regulaciji ekspresije proteina 7. segmenta [25]. Protein mRNK₄ je detektovan nedavno, nazvan je M42, a utvrđeno je da predstavlja varijantu M2 sa alternativnom lokalizacijom, ali istom funkcijom [25]. Virusni genom ne sadrži informaciju za sintezu faktora potrebnih za splajsing. Za njegovo odvijanje influenza virusi koriste ćelijske faktore koji prepoznaju konzervirane granice između introna i egzona [32]. Tako ćelijska kinaza CLK1 vrši aktivaciju ćelijskog SF2/ASF splajsing faktora koji igra ključnu ulogu u stvaranju M2 transkripata procesom splajsovanja M1 mRNK [20]. Nasuprot tome, ćelijski faktori odgovorni za posttranskripcionu modifikaciju mRNK 8. segmenta i stvaranje virusnog NEP, nisu poznati. Za razliku od splajsinga ćelijskih mRNK koji je veoma efikasan, kod virusnih mRNK on mora biti regulisan tako da omogućiti i nesmetanu produkciju transkripata sa intronima, koji će bez splajsinga biti direktno transportovani u citoplazmu.

Primarni transkripti 2. i 3. segmenta, nose informacije za stvaranje PB1, odnosno PA, ali poseduju i dodatne ORF. Alternativnim translacionim strategijama od mRNK segmenta 2 nastaju PB1-F2 i PB1-N40, a od mRNK trećeg segmenta PA-X. Na koji način virus reguliše

stvaranje više različitih proteina sa iste mRNK matrice, nije potpuno jasno. Smatra se da se ekspresija dodatnih proteina, kodiranih segmentom 2, može objasniti procesom nazvanim propustljivo-ribozomsko skeniranje (leaky ribosomal scanning) [25]. Naime, proces translacije započinje vezivanjem ribozoma za 5' kraj virusne mRNK, nakon čega dolazi do njihovog pomeranja nizvodno (skeniranja), sve do nailaska na AUG start kodon. Sekvenca koja okružuje AUG utiče na verovatnoću da dotičan start kodon bude prepoznat. Ukoliko AUG kodon nije okružen optimalnom sekvencom nukleotida, može biti preskočen od strane ribozoma, koji će nastaviti dalje skeniranje duž mRNK sve dok ne naiđe na sledeći start kodon. Na taj način, propustljivo-ribozomsko skeniranje omogućuje alternativnu translaciju mRNK promenom ORF. Tako, translacija PB1 započinje prvim AUG kodonom, a sinteza PB1-F2 i PB1-N40, 4. i 5. start kodonom [25]. PB1-F2 ORF ima dužinu do 90 nukleotida, ali se kod mnogih sojeva sinteza ovog proteina završava i ranije, na nekom od postojećih stop kodona. Time nastaju polipeptidi različite dužine što utiče na njihovu lokalizaciju i aktivnost. Translacija PB1-N40 započinje 5. start kodonom, koji je 40. kodon po redu u mRNK, te nastalom polipeptidu fali prvih 39 aminokiselina PB1 proteina.



Slika 7: Mehanizmi sinteze proteina influenza A virusa. Segmenti 1, 4, 5 i 6 produkuju jednu mRNK čijom translacijom nastaje po jedan protein (PB2, HA, NP i NA). Segment 2 stvara jedan primarni transkript (mRNK PB1), ali propustljivim ribozomskim skeniranjem nastaju još dva dodatna proteina (PB1-F2 i PB1-N40). Primarni transkript segmenta 3 kodira sintezu PA, PA-X nastaje ribozomskim frameshifting-om, a PA-N155 i PA-N182 upotrebom alternativnih start kodona na mRNK PA. Transkripcijom segmenata 7 i 8 nastaju mRNK M1 i mRNK NS1. Alternativnim splajsingom mRNK M1 nastaju mRNK M2 i mRNK M42, dok istim procesom od mRNK NS1 nastaje mRNK NEP.

(Adaptirano na osnovu: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6.html)

S druge strane, ekspresija PA-X posledica je procesa poznatog kao ribozomski frameshifting [33]. Sinteza ovog proteina započinje istim start kodonom kao i PA, ali u jednom momentu dolazi do preskakanja jednog nukleotida, što dovodi do promene šifre na osnovu koje se stvara ostatak polinukleotidnog lanca. Tako PA-X predstavlja fuzioni protein koji se sastoji od N-terminalnog endonukleaznog dela nastalog dekodiranjem PA ORF i C-terminalnog dela nastalog translacijom sa ORF pomerenom za jedno mesto unapred (+1 ribozomski frameshifting). Ovaj proces je verovatno stimulisan prisustvom retkog kodona koji

se, zbog male koncentracije adekvatne transportne RNK (tRNK), sporo dekodira, što rezultira pauzom i omogućuje da izvesni ribozomi pomere okvir čitanja za jedno mesto. Za razliku od PA-X, translacija nedavno identifikovanih PA-N155 i PA-N182, započinje 11. odnosno 13. AUG start kodonima u okviru mRNK PA [26].

Virusi ne poseduju sopstvenu kompleksnu translacionu mašineriju, nego za sintezu proteina koriste elemente ćelijskog mehanizma translacije. Iako su putevi sinteze ćelijskih i virusnih mRNK različiti, strukturno, među ovim mRNK nema razlike. I pored toga, u inficiranoj ćeliji dolazi do selektivne sinteze virusnih mRNK, a inhibicije inicijacije i elongacije ćelijskih mRNK, što za rezultat ima prekid ćelijske translacije. Ova supresija je kompleksna i rezultat je više procesa koji se odvijaju u nukleusu i citoplazmi inficirane ćelije. U jedru, u toku *cap*-snatching procesa ćelijske mRNK ostaju bez svojih *cap* struktura, a NS1 protein inhibira obradu 3'-kraja prekursora ćelijskih mRNAs. On se vezuje za odgovarajuće ćelijske proteine, koji učestvuju u adenilaciji 3' kraja mRNK, čime biva blokirana sinteza funkcionalnih mRNK i njihov transport iz jedra [55]. Za razliku od ćelijskih prekursora mRNA, virusne mRNA ne zahtevaju obradu 3'-kraja u jedru. Zato se virusne mRNA transportuju u citoplazmu, dok je sinteza ćelijskih mRNA najvećim delom blokirana. Pored toga, utvrđeno je da u citoplazmi dolazi i do delimične degradacije ćelijskih mRNK.

Iako su ovi procesi značajni, smatra se da prekid sinteze ćelijskih proteina prvenstveno nastaje kao posledica modifikacije translacione mašinerije ćelije, a ne izmene ćelijskih mRNK [60]. Eksperimentalno je dokazano da, i pored jednostavne građe i odsustva sekundarne strukture, visoko konzervirane sekvence na 5' kraju virusnih mRNK, predstavljaju virusne determinante koje učestvuju u promeni smera translacije u korist produkcije virusnih proteina. Smatra se da NS1 protein stimuliše virusnu translaciju vezujući se istovremeno za njih, kao i za odgovarajuće celularne faktore inicijacije translacije, poput eIF4F kompleksa i poli(A) vezujućeg proteina 1. Te interakcije za posledicu imaju povezivanje 5'-krajeva virusnih mRNK sa ribozomima i inteziviranje translacije, naročito kasnih virusnih proteina. Međutim, čak i u odsustvu NS1 proteina, dolazi do selektivne translacije virusnih proteina, što znači da je u čitav proces uključen još neki, za sada nepoznat, faktor [60].

U odnosu na virusnu transkripciju, još više nejasnoća vezano je za komponente i molekularni mehanizam replikacije RNK genoma [61]. Poznato je da je, za razliku od transkripcije, replikacija virusne RNK prajmer-nezavisan proces u kojem novoformirane RNK molekule ne poseduju *cap* niti poliadenil modifikacije na krajevima. Ona se odvija u dve faze. U prvoj fazi, genomska vRNK se replikuje u punoj dužini u cRNK. Komplementarna RNK se pakuje u RNP komplekse i služi kao matrica za sintezu novih vRNK, pri čemu je i dalje nepoznato zašto je količina stvorene vRNK znatno veća od količine sintetisane cRNK [47]. Moguće je da je to posledica strukturnih i funkcionanih razlika vRNK i cRNK replikacionih kompleksa. Utvrđeno je da različiti regioni polimeraze reaguju sa vRNK i cRNK, kao i da

sinteza vRNK započinje 3 nukleotida nizvodno od mesta inicijacije replikacije cRNK [27].

Replikacija virusnog genoma otpočinje vezivanjem novosintetisane polimeraze, transportovane iz citoplazme, za polimerazu vezanu za krajeve RNK matrice. Smatra se da ova interakcija omogućuje novosintetisanoj polimerazi pristup 3' kraju matrice i inicijaciju sinteze komplementarne RNK. U toku elongacije RNK lanca, nov kompleks polimeraze se vezuje za 5' kraj rastućeg ribonukleotidnog lanca i inicira vezivanje monomernih jedinica NP duž njega i njihovu polimerizaciju [22, 43, 62]. Molekule NP prepoznaju fosfodiastarsku osnovu RNK lanaca, nezavisno od nukleotidne sekvence [61]. Pored toga, samo monomeri NP su sposobni za vezivanje za RNK, te je neophodno da nakon njihove sinteze u citoplazmi, ne dođe do njihovog prevremenog udruživanja. Smatra se da fosforilacija serina stabilizuje monomere, a da de-fosforilacija predstavlja okidač njihove polimerizacije. Ovo predstavlja regulatorni mehanizam kojim virus kontroliše polimerizaciono stanje NP i sprečava njegovo nespecifično vezivanje za ćelijske RNK [43]. Tako se u inficiranoj ćeliji NP vezuje za vRNK i cRNK formirajući RNP, ali ne i za mRNK i ćelijske RNK, dok je u *in vitro* uslovima vezivanje nespecifično [22].

NP ne predstavlja samo stuktorni element RNP kompleksa, nego ima i važnu funkcionalnu ulogu u procesima replikacije i transkripcije. Odgovoran je za formiranje "ukosnica" strukture RNP, koja je preduslov sinteze kako mRNK, tako i vRNK i cRNK [63]. Pored toga, NP je neophodan za nesmetano odigravanje replikacije virusnog genoma, pošto sprečava terminaciju na poli-uracil sekvencama, čime se omogućuje sinteza kompletnog genomskog RNK lanca, a ne pojedinačnih segmenata [21, 64]. Moguće je da NP ima ulogu i u regulaciji procesa replikacije i transkripcije. Naime, vRNK virusa služi kao matrica u oba procesa, pri čemu još nije u potpunosti jasno koji mehanizam usklađuje odvijanje ova dva procesa. Predloženo je više modela koji objašnjavaju na koji način dolazi do prelaska sa cap-zavisne, na prajmer-nezavisnu sintezu RNK lanca. Tako postoje mišljenja da NP favorizuje sintezu cRNK/vRNK menjajući strukturu RNP, ili u direktnoj protein-protein interakciji sa polimerazom dovodi do njene modifikacije, tako da polimeraza favorizuje prajmer nezavisnu inicijaciju [63, 64]. Molekularne osnove ovih delovanja NP, nisu poznate. Drugi modeli sugerišu da se regulacija ostvaruje interkacijama pojedinačnih subjedinica polimeraze – PA i PB2, NEP ili pomoću izvesnih ćelijskih faktora [63]. Rezultati novijih istraživanja ukazuju i na moguću ulogu kratkih RNK sekvenci koje odgovaraju 5' krajevima pojedinačnih segmenata virusnog genoma. Do njihovog stvaranja dolazi u prisustvu virusnog NEP, pri čemu nagomilavanje ovih sekvenci stimuliše prelaz sa transkripcije na virusnu replikaciju [20, 65].

Nakon završetka replikacije RNK i formiranja RNP kompleksa, oni moraju biti izneti iz jedra kako bi bili ugrađeni u nove virione. Mehanizam tog procesa je nedovoljno razjašnjen. Smatra se da su u njega uključeni virusni proteini M1 i NEP, kao i odgovarajući ćelijski faktori.

Prema modelu predloženom od strane Paterson i Fodor [32], transport RNP kompleksa iz jedra zavisao je od ćelijskog β -importin proteina Crm1 koji, zajedeno sa svojim kofaktorom RanGTP, prepoznaje hidrofobne strukturno konzervirane sekvence nazvane nuklearne eksport sekvence (NES) na NEP. Međutim, utvrđeno je da i NP i M1 poseduju NES koje su uključene u transport RNP iz jedra na način nezavisan od Crm1, što znači da se iznošenje RNP iz jedra može obaviti i posredstvom nekih drugih ćelijskih faktora. Nakon izlaska iz jedra, RNP kompleksi se akumuliraju u pericentriolarnom reciklirajućem endozomalnom odeljku, zahvaljujući interakcijama sa Rab11 ćelijskim faktorom, a zatim se transportuju ka ćelijskoj periferiji duž mikrotubularne mreže [66]. Brojna pitanja vezana za transfer RNP kompleksa iz nukleusa još su otvorena. Na primer, za sada nije jasno koliki broj M1-NEP molekula se vezuje za RNP komplekse [48], kao ni u kom momentu RNP kompleksi poprimaju karakterističnu dvolančanu helikalnu sekundarnu strukturu [62].

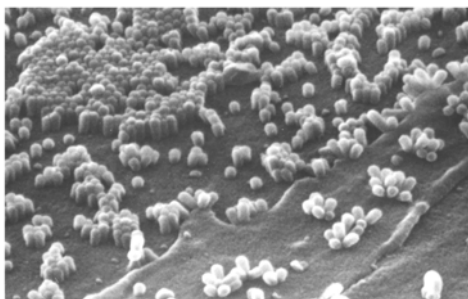
Formiranje i oslobađanje novih viriona

Formiranje i oslobađanje novostvorenih viriona je kompleksan proces, sastavljen od više faza koje se nastavljaju jedna na drugu i za čije odigravanje su potrebni odgovarajući fizički, strukturni i funkcionalni uslovi vezani kako za komponente virusa, tako i za samu ćeliju. To je jedan od najmanje istraženih procesa u virusnom ciklusu [15].

Kompletно formirani virioni influenza virusa ne mogu biti detektovani u unutrašnjosti inficirane ćelije. Njihovo sklapanje i oslobađanje procesom pupljenja (Sl. 8), odigrava se na ćelijskoj membrani, i to na delovima koje odlikuju posebne biohemijske i biofizičke osobine, poznatim kao "lipidni splavovi" (LR - lipid rafts). Naime, plazmalema ima mozaičnu strukturu, pri čemu LR predstavljaju oblasti različite veličine, bogate holesterolom i sfingolipidima, koje koncentrišu proteine, te predstavljaju njene funkcionalne delove [14]. U procesima formiranja i oslobađanja novih viriona, učestće uzimaju apikalni delovi membrane inficirane, polarizovane epitelne ćelije, mada mehanizam i faktori koji određuju odabir tog dela opne, nisu jasni [15].

Formiranje novih viriona je proces u kojem se komponente, pojedinačne ili u vidu sub-virusnih kompleksa, sintetisane u različitim delovima ćelije, transportuju do ćelijske mebrane gde obrazuju nove virusne partikule. Proteini koji ulaze u sastav lipidne ovojnice i matriksa sintetišu se u citoplazmi, na polizomima vezanim za endoplazmatični retikulum (ER). U ER i vakuolama Goldžijevog aparata, kojim se transportuju do površine ćelije, prolaze kroz posttranslacione modifikacije [28]. Tokom tih procesa, njihovi molekuli poprimaju odgovarajuće sekundarne i tercijerne strukture i enzimski se modifikuju dodavanjem različitih funkcionalnih grupa (fosfatne, acilne, glikozilne, itd.), što utiče na aktivnost, stabilnost i lokalizaciju polipeptida. Tako se u ER monomeri HA povezuju u heterotrimere, koji se dalje glikolizuju i aciluju tokom prenosa ćelijskim sekretornim putem. Svaka cisterna Goldži sistema transporta, poseduje dva dela [34]. U jednom, bogatom glicerofosfolipidima, vrše se obrade

sintetisanih proteina i u njoj su smešteni enzimi koji katalizuju ove modifikacije Drugi deo, bogat holesterolima i sfingolipidima, služi za iznos proteina iz vezikule.



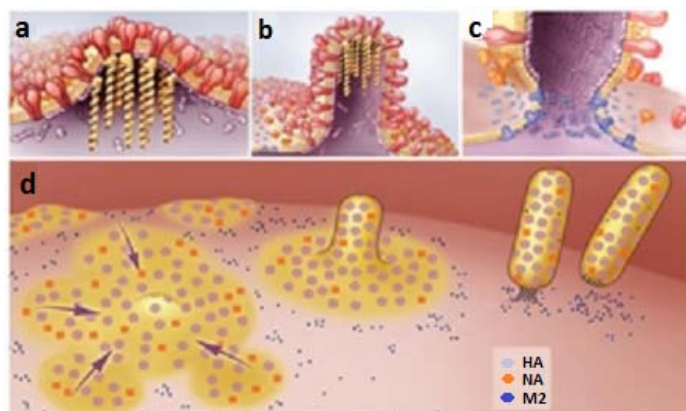
Slika 8: Pupljenje sferoidnih viriona influenza virusa na membrani inficirane ćelije; skenirajuća elektronska mikrofografija, uveličanje 40000x [15]

Svi membranski virusni proteini, za transport do ćelijske membrane, koriste ćelijski egzocitotni transportni put i poseduju determinante apikalnog transporta u svojim transmembranskim regionima [15]. S druge strane, način transportovanja M1 i RNP, nije poznat. Za sada, na M1 nije pronađen signal apikalnog transporta, nego se smatra da se ovaj protein, do ćelijske membrane, prenosi vezan za HA i NA. Kako je M1 odgovoran, uz druge faktore, za izlazak RNP iz jedra, pretpostavlja se da on posreduje i u njihovom daljem prenošenju do apikalnog dela ćelijske opne [15]. Upravo zahvaljujući sposobnosti interakcije sa raznim komponentama viriona, poput HA, NA, NEP i RNP kompleksima, protein M1 igra ključnu ulogu u njihovom povezivanju i sklapanju novih virusnih čestica. Pred kraj virusnog ciklusa, ćelija acidifikuje trans-Goldžijevu mrežu kojom se novo-sintetisani virusni proteini transportuju na ćelijsku površinu. Protinski M2 kanal se ponovo aktivira, odvodi protone, čime privremeno neutralizuje pH sredine unutar trans-Goldžijeve mreže i tako sprečava prevremene konformacione promene HA [49, 50].

Segmentiranost genoma influenza virusa predstavlja karakteristiku koja komplikuje sklapanje novih viriona. Naime, da bi virusna čestica bila infektivna, ona mora sadržati svih 8 segmenata genoma. Iako se ranije smatralo da je pakovanje RNP segmenata u nove virione nasumično, rezultati novijih istraživanja ukazuju da je to selektivan proces i da segmenti poseduju segment – specifične sekvence za pakovanje, koje obezbeđuju inkorporaciju kompletnog virusnog genoma [28, 62]. Ove sekvence su smeštene u okviru terminalnih 12-13 nukleotida na 3' i 5' krajevima vRNK, kao i u susednim netranslacionim regionima kroz koje se protežu diskontinuirano, zalazeći delom i u kodirajuće delove segmenata [67]. Pored toga, ustanovljeno je i da su na mestu pupljenja, segmenti genoma međusobno povezani u komplekse, te se verovatno u toj formi pakuju u nove virione [62]. Još jedan od preduslova za uspešno pakovanje RNK u RNP komplekse i njihovu naknadnu ugradnju u nove virione, jeste i očuvana „ukosnica“ struktura krajeva RNK. Pri tome, delimična komplementarnost 3' i 5'

krajeva uslovljava sličnu ali ne identičnu konformaciju tog regiona kod cRNK u odnosu na vRNK, što omogućuje njihovu diferencijaciju i ima za posledicu pakovanje samo vRNK, a sprečavanje nuklearnog eksporta cRNK [67]. Sekvence za pakovanje nemaju uticaj na pupljenje i oslobađanje viriona, pošto je utvrđeno da se među oslobođenim virionima mogu sresti i oni koji ne poseduju svih 8 RNP segmenata [15].

Tačne strukturne i biohemijske promene, kao ni fizičke sile, koje stoje u osnovi inicijacije pupljenja virusa, a ni precizna uloga pojedinih virusnih proteina u tom procesu, nisu poznati. Rezultati eksperimentalnih istraživanja ukazuju da, u područjima LR, dolazi do akumulacije HA i NA koji imaju sposobnost lokalne promene oblika ćelijske opne što inicira proces pupljenja (Sl. 9a). Vezujući se za citoplazmatske krajeve HA i NA, M1 dalje potpomaže rast pupoljka (Sl. 9b). Od ove faze zavisi veličina i morfologija virusne čestice, mada svi virusni i ćelijski faktori koji utiču na izduživanje viriona nisu poznati. Što se tiče virusnih determinanti morfologije, nedavna istraživanja su ukazala na presudnu ulogu M1 proteina. Identifikovane su aminokiselinske rezidue na molekulu M1 koje utiču na pojavu filamentoznih formi [68]. Pored toga, utvrđeno je da i prisustvo M2 proteina, kodiranog istim sedmim segmentom genoma, utiče na stvaranje filamentoznih oblika [57]. S druge strane, primećeno je da i drugi geni mogu uticati na oblik virusnih čestica, te da promene u HA i NA segmentima genoma dovode do pojave viriona nepravilnog oblika [68]. Rast virusnog pupoljka zavisi od sila koje vuku i guraju [15]. Sile koje vuku obezbeđuju membranski proteini, zajedno sa M1 koji vuče nukleokapsid u pupoljak. S druge strane ćelijski kortikalni aktin filamenti guraju RNP komplekse i M1 u rastuće čestice.



Slika 9: Model pupljenja influenza virusa. a) Inicijacija pupljenja izazvana akumulacijom HA (crveno) i NA (narandžasto) u LR delovima plazmaleme, M1 (ljubičasto) vezan za citoplazmatske krajeve HA i NA, za koji se vezuju RNP kompleksi (žuto); b) Elongacija viriona izazvana polimerizacijom M1; c) Prekid membrane izazvan insercijom M2 heliksa (plavo) u lipidni deo opne; d) Prikaz pupljenja virusa na kojem se vide HA i NA lokalizovani u područjima LR membrane, formiranje filamentoznih formi i prekid opne usled nagomilavanja M2 na mestu suženja membrane [14]

Za završetak pupljenja, odnosno zatvaranje pupoljaka, potrebno je približavanje i spajanje naspramnih delova ćelijske membrane i oslobađanje nastalih viriona (Sl. 9c i d). Ćelijski faktori uključeni u ovaj proces tek treba da budu otkriveni, ali se zna da je prisustvo M2 neophodno [14]. Naime, u inficiranoj ćeliji, M2 je lokalizovan na granici između LR i ostalih delova membrane koji okružuju mesto pupljenja viriona. Kako pupljenje napreduje i područje LR biva inkorporirano u sastav novog viriona, M2 biva lokalizovan u suženom delu kojim je nastali virion spojen sa opnom ćelije. U tom momentu, M2 izaziva uvrtnje plazmaleme što dovodi do njenog prekida i oslobađanja nove virusne čestice. Utvrđeno je da je zatvaranje pupoljaka veoma neefikasan proces, te da samo mali broj nastalih pupoljaka biva zatvoren. Moguće je da se ova pojava može objasniti činjenicom da je zatvaranje proces koji zavisi od energije, a da je na kraju infektivnog ciklusa količina dostupne energije ograničena [15].

Nakon završenog pupljenja, virioni ostaju pričvršćeni za ćelijsku membranu preko HA koji ostaju u vezi sa molekulima sijalinske kiseline, sve dok ne budu oslobođeni sijalidaznom aktivnošću NA. NA odcepljuje terminalne sijalinske rezidue sa ćelijskih membranskih glikoproteina i gangliozida, kao i sa virusne ovojnice, čime se sprečava agregacija virusnih partikula [28]. Od velikog broja zrelih pupoljaka, svega 10% biva konačno oslobođeno, mada razlozi za to nisu poznati.

Genetička i antigenska varijabilnost virusa influenza A

Influenca A viruse odlikuje izrazita genetička varijabilnost koja je osnov njihove brze evolucije i postojanja velikog broja antigeni različitih podtipova i sojeva. Ona je posledica dva procesa: mutacija gena i genskih rearanžmana.

RNK virusi se značajno razlikuju od svih drugih organizama po izuzetnoj stopi mutacija, koja je uslovljena, sa jedne strane ekstremno brzim umnožavanjem od oko 10^5 viriona po danu, a sa druge strane nepostojanjem mehanizama za proveru i reparaciju grešaka, tokom replikacije RNK katalizovane RNK-zavisnom RNK polimerazom [69]. Stopa mutacija kod RNK virusa je za oko 10^3 puta viša nego kod virusa i organizama koji sadrže dezoksiribonukleinsku kiselinu (DNK) [70]. Kod influenza virusa, ona iznosi od 1×10^{-3} do 8×10^{-3} nukleotidnih substitucija po mestu po godini, što dovodi do akumulacije velikog broja tačkastih mutacija tokom umnožavanja virusnih genoma [3]. Polimeraza pravi otprilike jednu grešku po replikovanom genomu, te se u svakoj inficiranoj ćeliji stvara heterogena populacija od oko 10 000 mutanata [71], tj. genetički različitih varijanti sa potencijalno korisnim fenotipom. Pod selektivnim pritiskom, uslovljenim prvenstveno imunim odgovorom domaćina, ali i antivirusnim lekovima i slično, varijante sa mutacijama koje, u datim uslovima, virusu daju prednost, bivaju favorizovane i postaju dominantne.

Generalno gledano, avijarni influenza virusi su visoko adaptirani na svoje prirodne domaćine, na šta ukazuje niska evolutivna stopa [35]. Nasuprot tome, humani podtipovi su izuzetno evolutivno dinamični. Svih osam segmenata genoma podložno je mutacijama ali su one naročito česte u regionima genoma koji kodiraju površinske glikoproteine i to prvenstveno HA, a u manjoj meri NA. Površinski glikoproteini predstavljaju glavne mete imunog sistema domaćina, te su izloženi najjačem selektivnom pritisku, usled kojeg dolazi do brze evolucije gena koji ih kodiraju [72]. Za očuvanje funkcije drugih virusnih proteina neophodna je visoka strukturna konzerviranost, usled čega je najveći broj mutanata osuđen na propast. Akumulacija tačkastih mutacija (substitucija, delecija i insercija) u okviru gena koji kodiraju površinske proteine, tokom vremena, može dovesti do antigenskog drifta. Ovaj termin se koristi za označavanje postepenih, kontinuiranih promena HA i NA, kojim nastaju nove varijante postojećeg virusa. Antitela prisutna u datoj populaciji, kao rezultat kontakta sa virusima koji su cirkulisali ranije, nisu u stanju da se dovoljno specifično vežu za izmenjene antigenske determinante i neutrališu virus. Na taj način, sposobnost izbegavanja imuniteta domaćina pruža selektivnu prednost drift varijanti virusa. Zbog toga se imuni sistem domaćina smatra ključnim faktorom selekcije mutanata sa aminokiselinskim substitucijama u okviru antigenskih determinanti HA i NA. Antigenski drift je preduslov nastanka sezonskih epidemija influence i njime se objašnjava mogućnost da jedna osoba, više puta tokom života, oboli od influence. Naime, nakon influenza virusne infekcije ostaje dugotrajan ali usko specifičan imunitet. Nakon izvesnog broja epidemijskih sezona, tokom kojih sve veći deo populacije stiče imunitet na cirkulišući soj, nova, izmenjena varijanta virusa biva selektovana iz postojeće kvazi-specijes populacije influenza virusa i zamenjuje staru [73]. Tako se evolucija virusa influence A kontinuirano odvija u okviru složene interakcije između virusa i domaćina.

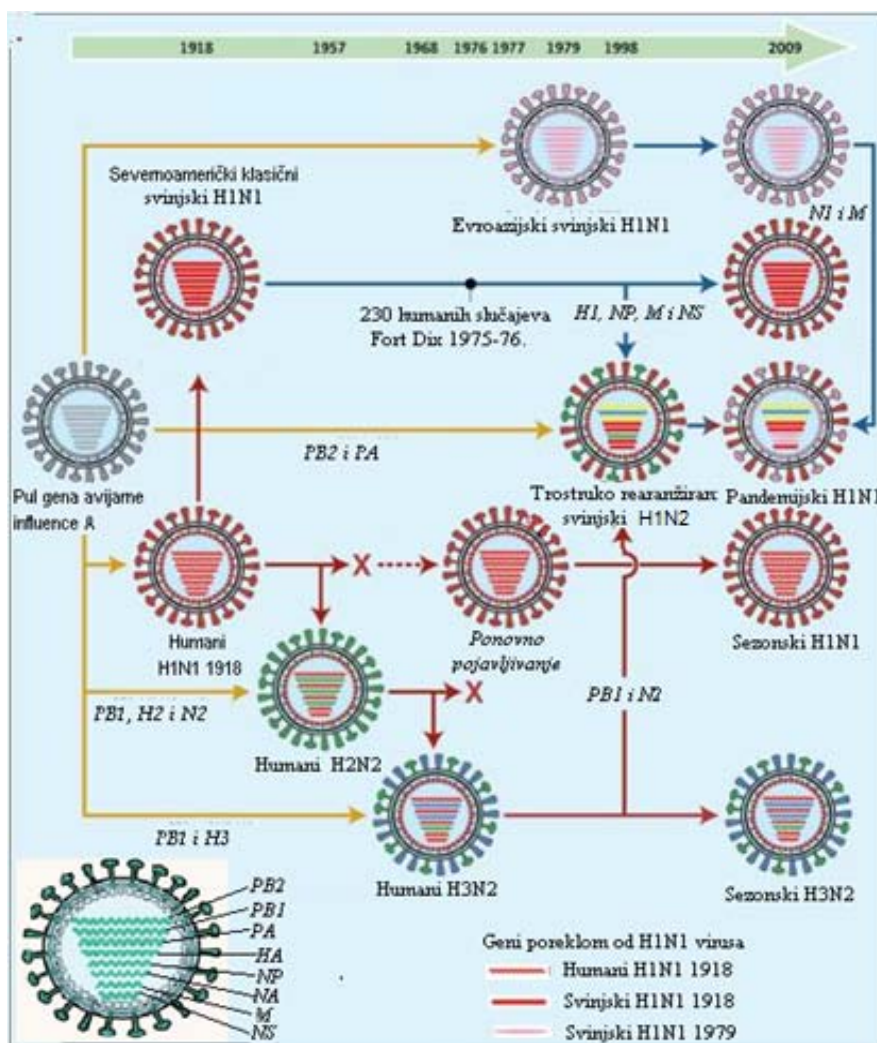
Većina mutacija koje nastaju kod influenza A virusa su neutralne, tzv. sinonimne mutacije, kod kojih i pored izmene baze u ribonukleotidnom lancu, nema promena u aminokiselinskoj sekvenci kodiranog proteina. Nasuprot tome, određene mutacije gena, nazvane nesinonimne, dovode do izmene aminokiseline u polipeptidnom lancu, što za posledicu može imati gubitak vijabilnosti virusa ili modifikaciju neke osobine. Detektovane su brojne aminokiselinske substitucije u okviru površinskih glikoproteina, ali i drugih virusnih proteina, koje utiču na virulenciju, specifičnosti prema domaćinu, osetljivosti prema antivirusnim lekovima, itd. Odnos nesinonimnih i sinonimnih substitucija, koristi se za procenu selektivnog pritiska na nivou proteina. Niska vrednost tog odnosa govori da je posmatrano mesto pod uticajem negativne selekcije, te da postoji tendencija da se na posmatranoj lokaciji zadrži ista aminokiselina, pošto bi promena imala negativan efekat. Vrednosti veće od 1 ukazuju na postojanje pozitivne selekcije, s obzirom na to da nesinonimne mutacije nude odgovarajuću prednost proteinu. Tako je istraživanje H1N1 izolata sakupljenih u periodu od 1918. do 2008. godine, ukazalo na snažan uticaj pozitivne selekcije na pozicijama 156 i

190 HA1 subjedinice, pri čemu je rezidua na 190 mestu jedna od ključnih determinanti receptor-vezujuće specifičnosti [74]. I u toku drugih ispitivanja, analize genoma su pokazale da su aminokiseline koje su pod uticajem pozitivne selekcije, odgovorne za vezivanje za receptore ili antitela [74]. Ovde je potrebno imati na umu da, iako sinonimne mutacije ne dovode do promene u aminokiselinskoj sekvenci, u pogledu svog efekta, one ne moraju uvek biti neutralne. Naime, mogu imati uticaj na stabilnost RNK, brzinu translacije, sekundarnu strukturu proteina, itd. [75].

Pored mutacija, jedan od osnovnih mehanizma nastanka genetičke varijabilnosti i evolucije virusa influence jeste i gensko rearanžiranje. Segmentiranost genoma osnovni je preduslov za odvijanje ovog procesa, te iako segmentiranost komplikuje proces sklapanja novih viriona, ona influenza virusima pruža nesumnjivu evolutivnu prednost. U toku genskog rearanžiranja dolazi do razmene genskih segmenata između virusa koji inficiraju istu ćeliju, pri čemu oni mogu pripadati istom ili različitim podtipovima. Ovo omogućuje veoma brz nastanak virusa sa novim genskim kombinacijama. Teorijski, genskim rearanžiranjem u koje su uključena dva virusa, mogu nastati 254 (2^8) različita 8-segmentna genoma [35]. Genomi novonastalih virusa predstavljaju kombinaciju segmenata koji vode poreklo od različitih viriona, te se ceo proces može smatrati rudimentiranim seksualnim mehanizmom [67].

U odnosu na mutacije koje se dešavaju kontinuirano, rearanžirani su znatno ređi ali mnogo drastičniji procesi. Posledica genskog rearanžiranja može biti i antigenski šift, odnosno pojava virusa sa HA ili kombinacijom HA i NA, koji nikada ili dugo vremena, nisu zabeleženi u ljudskoj populaciji. Ovo se ostvaruje u procesu rearanžiranja između humanih i animalnih influenza A virusa. Do rearanžiranja dolazi u ljudskom organizmu ili u prelaznom domaćinu, na primer svinji, inficiranoj istovremeno humanim i avijarnim virusom. Tako nastao humani virus, nosi HA i/ili NA proteine animalnog porekla koji su potpuno novi za ljudsku populaciju, te imunitet stvoren ranijim kontaktima sa virusima influence A ne pruža nikakvu zaštitu od njega. Posebnu opasnost predstavlja situacija u kojoj, na ljude adaptiran virus, stiče gene koji ga transformišu i visoko patogeni soj, ili ukoliko izrazito patogeni animalni soj procesom genskog rearanžiranja dobije gen koji omogućuje efikasnu transmisiju u humanoj populaciji. Rearanžirani su preduslov nastanka pandemija influence, odnosno epidemija globalnih razmera. Antigenski drift je osobina svih influenza virusa, A, B i C, ali je antigenski šift isključivo karakteristika influenza A virusa, te jedino oni imaju pandemijski potencijal [45].

Podtipovi H2N2 i H3N2 koji su izazvali pandemije influence 1957. odnosno 1968. godine, nastali su tako što je do tada cirkulišući virus antigenskim šiftom, stekao nove gene poreklom od neidentifikovanog avijarnog virusa (Sl. 10). Utvrđeno je da je H2N2 virus nastao tako što je, do tada cirkulišući H1N1 stekao tri nova gena: H2, N2 i PB1, dok je 1968. godine zamenom njegovih H2 i PB1 gena sa novim H3 i PB1 genima avijarnog porekla, nastao H3N2 [3].



Slika 10: Genetički odnosi između humanih i svinjskih influenza virusa u periodu 1918-2009. godine; Žute strelice – usvajanje gena iz avijarnog genskog pula influence A; Isprekidane crvene strelice – period u kojem virus nije cirkulisao; Crvene strelice – evolucija humanih influenza virusa; Plave strelice – evolucija svinjskih influenza virusa; Crveno-plava strelica - evolucija humanih influenza virusa svinjskog porekla (Adaptirano na osnovu: Morens i sar. [76])

Genetičke promene koje su dovele do pojave (H1N1)pdm09 virusa 2009. godine, još su kompleksnije. Sekvenciranje genoma je pokazalo da je ovaj virus nastao genskim rearanžmanima između dva nesrodna svinjska influenza virusa, pri čemu pojedini geni vode poreklo od svinjskih, ptičijih i humanih podtipova [77]. Osnovu ovog virusa čini trostruko-rearanžirani svinjski H1N2 virus, čiji je genom sačinjen od gena severnoameričkog klasičnog svinjskog virusa H1N1 (HA, NP, M i NS geni), humanog H3N2 virusa (PB1 i NA geni) i neidentifikovanog avijarnog virusa (PB2 i PA). Podtip H1N2 je prvi put otkriven 1997/1998. godine i od tada je stalno prisutan u populaciji svinja. Pandemija influence 2009. godine otpočela je nakon što je taj svinjski H1N2 virus genskim rearanžiranjem usvojio dva nova gena – NA i M, od evroazijskog ptičijem-nalik svinjskog H1N1 virusa [78]. Interesantno je da je

severnoamerički klasični svinjski H1N1 virus nastao tako što su ljudi, u toku velike pandemije koja je otpočela 1918. godine, virus gripa preneli na svinje. Od tada, pa sve do danas, on se održao među svinjama ostajući relativno antigenski stabilan, nasuprot humanom H1N1 virusu koji je cirkulišući od 1918.-1957. i ponovo od 1977. godine do pandemije 2009. godine, pretrpeo značajan antigenski drift. To je stvorilo veliku antigensku divergenciju ova dva virusa i uslovalo da svinje postanu rezervoar H1 virusa sa epidemijskim, odnosno pandemijskim potencijalom za ljudsku populaciju [79]. Tako je svinjski H1N1 virus, donirajući tri gena (HA, NP i NS) učestvovao u stvaranju za ljude patogenog (H1N1)pdm09 podtipa. Kao što vidimo, svi influenza A virusi koji su cirkulisali tokom 20. veka i koji su aktivni sada, direktni su potomci H1N1 virusa iz 1918. godine.

Za razliku od H2N2, H3N2 i (H1N1)pdm09, H1N1 virus koji je izazvao pandemiju 1918. godine, imao je sasvim drugačiji način nastanka. Sekvenciranje je pokazalo da je ceo genom ovog virusa bio potpuno nov za ljude. On nije bio potomak virusa koji je ranije cirkulisao u ljudskoj populaciji, a zatim genskim rearanžmanima stekao nove osobine, nego je potekao od nekog nepoznatog avijarnog pretka. Pretpostavlja se da je H1N1 podtip nastao adaptacijom svih osam segmenata avijarnog genoma na ljude, mada mehanizam ovog procesa nije jasan [77]. Nije poznato da li se adaptacija virusa odigrala naglo, direktno sa ptica na čoveka, da li je bio uključen i neki prelazni animalni domaćin ili se virus menjao postepeno tokom perioda pre pandemije.

Rezultati više studija pokazali su sposobnost trenutno cirkulišućih influenza virusa za genske rearanžmane sa drugim humanim i avijarnim influenza podtipovima. Tako je utvrđeno da HA H1N1 i NA H3N2 sezonskih humanih podtipova, kao i komponente polimeraza kompleksa nekih avijarnih podtipova, poboljšavaju replikacionu aktivnost (H1N1)pdm09 virusa [80]. Ovi podaci ukazuju na mogućnost da putem inter-podtipskih genskih rearanžmana pandemijski virus iz 2009. godine, poveća svoju virulenciju, izmeni antigenska svojstva ili postane rezistentan na neki antivirusni lek. Takođe, u više slučajeva utvrđene su koinfekcije H1N1 i H3N2 virusima. Iako, za sada, rearanžirani H3N1 nije registrovan, detektovan je H1N1 virus koji je posedovao gene internih proteina poreklom od H3N2 podtipa, kao i H1N2 virus koji je u suštini H3N2 sa HA poreklom od H1N1 virusa [81]. Generalno gledano, ovi podaci navode na zaključak da je evolucija trenutno aktivnih influenza A virusa krajnje nepredvidiva i da su u svakom trenutku otvorene različite mogućnosti, od nestanka odgovarajućeg podtipa, pa sve do nastanka novog podtipa koji će predstavljati ozbiljnu pretnju po zdravlje ljudi.

Kao što je rečeno, genska rearanžiranja se ne odigravaju samo između različitih podtipova virusa influence. Genetičkoj varijabilnosti influenza A virusa doprinose i intra-podtipska genska rearanžiranja tokom kojih virusi koji pripadaju različitim sojevima istog podtipa, razmenjuju varijante HA ili nekog drugog gena. Rezultati istraživanja sprovedenog od

strane Ghedin i sar. [82] ukazali su da u toku jedne sezone u odgovarajućem području cirkuliše više sojeva H3N2 i H1N1 podtipova, pri čemu su broj mešanih infekcija i učestalost genskih rearanžmana značajani. Kao što je rečeno, reprodukcija genoma influenza virusa nije naročito precizna i praćena je relativno čestim greškama. Rekombinacije omogućuju da se iz pula segmenata prisutnih u inficiranoj ćeliji, od kojih su neki pogrešno kopirani, sklope funkcionalni genomi, kao i da se u populaciji virusa prošire aleli koji pružaju određenu adaptivnu prednost, poput rezistencije na neki antivirusik [67]. Usled nastanka delimično antigenski izmenjenog virusa, ovi događaji takođe mogu dovesti do masovnih epidemija, poput onih zabeleženih godine 1947. i 1957. (H1N1), kao i 1997. i 2003. (H3N2) [76].

Klinički i patogeniski aspekti infekcija influenza A virusima

Humani influenza A virusi izazivaju visoko zarazno, akutno respiratorno oboljenje nazvano grip ili influenza. Influenca se prenosi direktnim kontaktom, inhalacijom kapljica respiratornih sekreta koje obolela osoba oslobađa tokom kihanja i kašljanja ili indirektnim kontaktom sa kontaminiranim površinama [83]. Inkubacioni period traje 1-4 dana, prosečno 2 dana. Osoba je infektivna 1 dan pre pojave prvih simptoma, pa sve do 5-10 dana nakon početka bolesti, mada infektivnost značajno opada nakon prvih 3-5 dana [84]. Kod male dece period infektivnosti može biti produžen na nekoliko dana pre, pa sve do više od 10 dana nakon pojave simptoma gripa. Imunokompromitovani pacijenti mogu ekskretovati virus nedeljama, pa i mesecima od početka infekcije.

Prema nekim podacima iz literature, od 33% [85] do 77% [86] infekcija influenza virusima prolazi asimptomatski. Simptomatske infekcije se najčešće manifestuju u vidu lakše akutne respiratorne infekcije koja spontano prolazi. Bolest naglo počinje pojavom visoke temperature i malaksalosti, a praćena je rinitisom, kašljem, glavoboljom, fotofobijom, bolovima u zglobovima i mišićima. Kod dece, često se javljaju i mučnina i povraćanje [84]. Zapaljenski proces uobičajeno zahvata organe gornjeg respiratornog trakta i traheje [87]. Kod većine obolelih, simptomi akutne infekcije spontano prolaze u roku od 3-7 dana, bez potrebe za primenom antivirusne terapije, mada slabost i umor mogu trajati nedeljama. Međutim, svake godine beleži se 3-5 miliona slučajeva teških oblika gripa, praćenih različitim komplikacijama [88]. Najčešće komplikacije gripe su: primarna influenza virusna pneumonija, sekundarna bakterijska pneumonija, pogoršanje postojeće hronične bolesti, sinuzitis, kao i otitis media koji se najčešće javlja u dečijem uzrastu [84]. Kao ozbiljna komplikacija, kod dece se može razviti i laringotraheitis (krup) [45, 87], kao i Rejev sindrom u slučaju duže terapije aspirinom [84]. Stopa letaliteta u slučaju Rejevog sindroma nastalog u sklopu influenza virusne infekcije, kreće se u granicama od 10-40% [45].

Influenca virusi inficiraju i umnožavaju se u epitelnim ćelijama respiratornog trakta čoveka, izazivajući nespecifične histološke promene [87]. Na početku akutne faze infekcije, u respiratornom epitelu dolazi do pojave multifokalne citonekroze, praćene deskvamacijom ćelija, tako da često ostaje očuvan samo bazalni sloj ćelija. Iste promene nastaju i u bronhiolama, ali je zbog jednostavnije građe epitela, njegovo istanjenje još izraženije. U nekim slučajevima, može doći do kompletnog gubitka epitelnog sloja, uz formiranje hijaline membrane na tim mestima. Epitel respiratornih organa je hiperemičan, edematozan, a u lumenu disajnih puteva prisutan je eksudat. Ispitivanja pokazuju da pojačana mitotička aktivnost i regeneracija oštećenog respiratornog epitela, počinje otprilike petog dana nakon pojave prvih simptoma bolesti. Za potpunu reparaciju virusom oštećenog epitela potrebno je do mesec dana [45].

Karakteristične promene do kojih dolazi u slučaju razvoja influenza virusne pneumonije su: tromboza malih krvnih sudova, pojava intersticijalnog edema i inflamatornog infiltrata, formiranje hijalinih membrana u alveolama, intraalveolarni edemi i/ili hemoragija, kao i difuzno oštećenje alveola i alveolarnih puteva uz nekrotizirajući bronhitis i bronhiolitis [87]. Oštećenje respiratornog epitela smanjuje njegovu otpornost prema bakterijskim uzročnicima [45]. Ukoliko se ne prevenira antibioticima, sekundarna bakterijska pneumonija gotovo uvek nastupa u kasnijim stadijumima virusne pneumonije i dodatno kompllikuje i pogoršava kliničku sliku. Najčešći uzročnici ovih pneumonija su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae*. Kod udruženih infekcija izazvanih virusom influence i bakterijom *S. aureus*, beleži se visoka stopa letaliteta, čak do 42% [45]. Ovo se objašnjava specifičnim sinergizmom između bakterija i virusa, pošto je dokazano da *S. aureus* sekretuje proteaze koje aktiviraju prekursor HA virusa i time stimulišu infekciju novih ćelija i širenje virusne infekcije. Sekundarna bakterijska pneumonija izazvana meticilin-rezistentnim *S. aureus*, danas je sve češća i uobičajeni je nalaz kod pedijatrijskih slučajeva influence sa smrtnim ishodom [89].

Kod infekcija visokopatogenim avijarnim H5N1 podtipom, bolest ima znatno agresivniji klinički tok, sa naglim pogoršanjem stanja, brzim širenjem u donje delove respiratornog trakta i visokim mortalitetom [90]. Inkubacioni period može biti duži u odnosu na infekcije izazvane humanim podtipovima i kreće se u opsegu od 2-17 dana. Početni simptomi su isti kao kod gripa uzrokovanim humanim podtipovima, pri čemu se kod nekih pacijenata kao rani simptomi javljaju i izražene gastrointestinalne smetnje (bol u stomaku, povraćanje i dijareja) i krvarenje iz nosa i desni [90]. Kod osoba inficiranih H5N1 virusom javlja se neobično visoka koncentracija hemokina i proinflamatornih citokina u serumu, što se smatra faktorom koji doprinosi težini simptoma, mada nije jasno koje virusne determinante uslovljavaju ovu pojavu [91]. Teška klinička slika javlja se i u retkim slučajevima infekcije ptičijim H7N9 podtipom. Interesantno je da kod infekcija nekim avijarnim H7 podtipovima dolazi do pojave

konjunktivitisa sa ili bez respiratornih simptoma bolesti. Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju da je tropizam ovih virusa prema konjunktivama posledica izmenjenog afiniteta za vezivanje za receptor i modifikovanog odgovora domaćina [76]. Interesantno je da su rezultati niza studija sprovedenih na autopsičnom materijalu, pokazali da ne postoje razlike u spektru patohistoloških promena tokom pandemija i sezonskih epidemija gripa [77].

Svake zime influenza virusima biva inficirano oko 5-10% odraslih i 20-30% dece širom sveta [88]. Grip pogađa sve uzrasne kategorije ali je prevalenca najveća među školskom decom [92, 93]. Deca mlađa od 2 godine, stariji od 65 godina, osobe sa hroničnim oboljenjima srca, pluća, bubrega, jetre, krvi, poremećajima metabolizma (na primer dijabetesom), kao i imunokompromitovani, predstavljaju rizične grupe za nastanak komplikacija [88]. Kod osoba sa hroničnim plućnim i kardiološkim oboljenjima, kao i dijabetes melitusom, u roku od nekoliko sati mogu se razviti hemoragični bronhitis i pneumonija. U najtežim slučajevima, nastaje fulminantna, fatalna virusna pneumonija koja se manifestuje dispneom, cijanozom, hemoptizom, edemom pluća, a smrt može nastupiti za manje od 48 časova od pojave prvih simptoma [77]. Smrt može biti uzrokovana i pogoršanjem od ranije postojećeg hroničnog oboljenja [88]. Iako je komorbiditet prisutan kod 50-80% hospitalizovanih, i u populaciji mladih, prethodno zdravih osoba, beleže se slučajevi teških influenza virusnih i sekundarnih bakterijskih pneumonija, koji zahtevaju smeštaj u jedinice intenzivne nege, i u nekim slučajevima se završavaju fatalno [84]. Trudnice i porodilje u periodu od 2 nedelje nakon porođaja, takođe predstavljaju rizičnu grupu za nastanak komplikacija gripa.

Iako se grip generalno ne smatra teškim oboljenjem u populaciji zdravih, odraslih osoba, epidemije influence mogu predstavljati značajan javno zdravstveni i ekonomski problem. One mogu uzrokovati veliki broj odsustvovanja sa posla, pad produktivnosti, kao i ozbiljne finansijske troškove vezane za povećan broj hospitalizacija, primenu antivirusne i druge terapije, kao i dijagnostiku [88].

Imuni odgovor na infekciju influenza A virusima

Prodor virusa u ćeliju je okidač aktivacije nespecifičnog imunog sistema, koji predstavlja prvu liniju odbrane domaćina. Za prepoznavanje virusa u ćeliji, odgovorni su receptori (PRR - pattern recognition receptors) koji vrše monitoring citosola na prisustvo hemijskih i strukturnih elemenata prisutnih u virusu, takozvanih patogen-markera (PAMP – pathogen-associated marker pattern). Te, za virus specifične molekularne strukture, predstavljaju signal za aktivaciju nespecifičnog imunog odgovor i sintezu IFN tipa 1, tj. IFN α/β , ključnih za antivirusni odgovor. Funkciju intraćelijskih receptora kod influenza virusne infekcije imaju RIG-I (retinoic acid inducible gene 1), TLR (toll-like receptors) i NLR (NOD-like receptors) [94]. Glavni aktivatori

ovih receptora su nukleinske kiseline virusa. Utvrđeno je da su vRNK, kao i produkti njene replikacije i transkripcije, snažni aktivatori imunog odgovora [11]. Ključnu ulogu senzora influenza virusne RNK ima citoplazmatska RNK helikaza poznata kao RIG-I, koja je odgovorna za aktivaciju transkripcionih faktora neophodnih za sintezu IFN [95]. Niz kaskadnih reakcija podstaknut RIG-I, smatra se najvažnijim antivirusnim signalizacionim putem, uključenim u eliminaciju virusa. Dokazano je da je za imunostimulatornu aktivnost RIG-I potrebno prisustvo RNK molekula koje poseduju 5'-trifosfatne krajeve i dvolančane sekvence. Sem nekoliko izuzetaka, eukariotske RNK ne poseduju fosforilisane krajeve, dok genomska RNK influenza virusa poseduje dvolančanu strukturu u blizini 5'-trifosfatnog kraja, te stoga predstavlja metu prepoznavanja RIG-I helikaze [18].

Interferoni α i β imaju snažno antivirusno dejstvo. Njihove molekule se vezuju za IFN α / β receptore ćelija što dovodi do ekspresije stotine antivirusnih gena, čiji je krajnji efekat sprečavanje daljeg umnožavanja virusa. Pored toga, aktivacija PRR, ima za posledicu i sintezu različitih proinflamatornih citokina i ko-stimulatornih molekula. Citokini stimulišu aktivaciju ćelija nespecifičnog imunog sistema, poput dendritičnih ćelija, makrofaga i ćelija ubica, a ko-stimulatorni molekuli koje stvaraju antigen-prezentujuće ćelije, iniciraju pokretanje adaptivnog imunog odgovora [96]. Alveolarni makrofagi su važne komponente nespecifičnog imunog sistema, koji su u stanju da fagocituju apoptotične inficirane ćelije i regulišu razvoj antigen-specifičnog T-ćelijskog imuniteta, kao i ćelije "prirodne ubice" koje prepoznaju i liziraju inficirane ćelije za koje su vezana antitela u procesu poznatom kao antitelo-zavisna ćelijska citotoksičnost [94]. Dendritične ćelije su locirane ispod respiratornog epitela, a iznad bazalne membrane. Njihovi izraštaji – dendriti, protežu se kroz tesne intercelularne spojeve epitelnih ćelija sve do lumena respiratornih puteva. One su u stanju da detektuju i neutrališu viruse ali su i same podložne infekciji. Kada virusi prodru u njih, dendritične ćelije migriraju limfnim sudovima do limfnih čvorova, gde prezentuju virusne antigene T ćelijama, čime se uključuju u procese specifičnog imunog odgovora.

Specifični, adaptivni imuni sistem predstavlja drugu liniju odbrane organizma u toku influenza virusne infekcije, a deli se na humoralni i celularni. Humoralni imuni odgovor se svodi na stvaranje specifičnih antitela na influenza virusne antigene od strane B limfocita. U toku influenza virusne infekcije nastaju tri klase antitela: IgA, IgM i IgG. Imunoglobulini IgA klase sintetišu se lokalno na sluzokoži, transportuju zajedno sa mukusom i ćelijama respiratornog epitela pružaju lokalnu zaštitu od infekcije. Pored njih, na nivou sluzokože, u manjoj meri se sekretuju i IgM antitela, a mogu se detektovati i IgG antitela poreklom iz transudata seruma [97]. U toku primarne infekcije, sve tri klase antitela se mogu dokazati u serumu u roku od 10-14 dana od pojave simptoma. Produkcija IgA i IgM antitela dostiže pik nakon 2 nedelje, a IgG antitela 4-6 nedelja nakon početka infekcije [97]. Imunoglobulini klase IgA i IgM ukazuju na nedavnu infekciju, dok IgG antitela perzistiraju duže, pružajući

dugotrajan, podtip-specifičan imunitet.

Najveći deo antitela stvara se na površinske virusne glikoproteine HA i NA, ali su detektovani i imunoglobulini protiv NP i M2. Anti-HA specifična antitela su u stanju da neutrališu virus, vezujući se za globularni deo HA molekula, čime je sprečeno vezivanje za receptore i prodor virusa u ćeliju. Pored toga, ova antitela olakšavaju fagocitozu virusnih partikula i odgovorna su za antitelo-zavisnu ćelijsku citotoksičnost [94]. Anti-NA antitela ne vrše direktno neutralizaciju virusa nego sprečavajući enzimsku aktivnost NA, ograničavaju oslobađanje virusa i inficiranje novih ćelija. Kao i anti-HA antitela i anti-NA antitela doprinose antitelo-zavisnoj ćelijskoj citotoksičnosti. Otpornost na ponovnu infekciju istim podtipom virusa uslovljena je prisustvom antitela protiv HA, dok su antitela protiv NA odgovorna za smanjenje težine bolesti i sposobnosti transfera na novog domaćina [45]. U toku infekcije influenza virusima, stvara se i mala količina antitela na M2 i NP za koje je takođe dokazan protektivni efekat u eksperimentalnim istraživanjima [94, 98].

Antitela stvorena u kontaktu sa odgovarajućim virusom mogu ukršteno reagovati i u izvesnoj meri olakšati kliničku sliku i skratiti period infektivnosti, u slučaju kontakta sa blisko srodnim virusom koji pripada drugom soju ali istom podtipu (homopodtipski imunitet). Utvrđeno je da anti-HA antitela koja se vezuju za receptor-vezujuće udubljenje na globularnom delu HA molekula, mogu neutralizovati antigenski različite varijante istog influenza podtipa [94]. Na animalnim modelima dokazan je i heteropodtipski imunitet, koji označava situaciju u kojoj antitela protiv jednog podtipa ukršteno reaguju sa drugim podtipom virusa. Heteropodtipski imunitet je prvenstveno zasnovan na ukrštenoj reaktivnosti specifičnih subpopulacija antitela usmerenih protiv visoko konzerviranih regiona površinskih proteina i naročito memorijskih citotoksičnih T ćelija specifičnih za visoko konzervirane regione unutrašnjih proteina virusa influenza [99]. Tako je utvrđeno da se tokom infekcije influenza virusima stvaraju, u malom titru, i antitela na štapićasti, antigenski stabilniji deo HA molekula i da ova antitela imaju širi neutralizirajući kapacitet [94]. Prisustvo antitela sa heteropodtipskim neutralizujućim efektom kod ljudi, dokazana su u retkim slučajevima nakon vakcinacije protiv sezonskih influenza virusa, ali njihov protektivni efekat nije bio potvrđen [100]. Međutim, istraživanja sprovedena nakon pandemije 2009. godine, utvrdila su postojanje ovih antitela kod nekih osoba inficiranih (H1N1)pdm09, kao i kod osoba koje su primile vakcinu protiv (H1N1)pdm09. Pored toga, serološke studije su pokazale da su osobe rođene pre 1970 godine, u toku pandemije 2009., bile delimično zaštićene postojanjem ukršteno-reagujućih antitela stvorenih u kontaktu sa H1N1 virusom koji je ranije cirkulisao [101]. Tako su Li i sar. [100] ustanovili da je nakon vakcinacije inaktivisanom vakcinom protiv virusa pandemijske influenza, došlo do produkcije antitela na štapićasti region HA sa širokim ukršteno-reagujućim neutralizacionim kapacitetom, kao i antitela na globularni HA region koja su pokazala širi opseg reagovanja nego što je to uobičajeno nakon vakcinacije protiv sezonskog gripa. Kao

moguće objašnjenje različitih efekata ovih vakcina, ponudili su model kompeticije između velikog pula memorijskih B limfocita koji prepoznaju dominantni, varijabilni region HA i znatno ređih B limfocita koji prepoznaju konzervirane, subdominantane epitope. U kontaktu sa sezonskim influenza virusima, koji se od godine do godine minimalno antigenski razlikuju, regrutuju se slične B memorijske ćelije koje prepoznaju dominantne, globularne epitope. U ovoj situaciji postoje znatno manje šanse za aktivaciju retkih B memorijski ćelija usmerenih na konzervirane epitope. Međutim, nakon infekcije ili imunizacije novim, pandemijskim virusom, sa znatno izmenjenim HA, raste verovatnoća aktivacije B ćelija koje prepoznaju konzervirane HA epitope.

Celularni imuni odgovor u toku influenza virusne infekcije podrazumeva aktivaciju CD4+ T, CD8+ T i regulatornih T ćelija, koje pokazuju različite antivirusne aktivnosti. Tako neke CD4+T ćelije pokazuju citolitičnu aktivnost prema inficiranim ćelijama, druge, nazvane T helper ćelije sintetišu različite citokine, a treće, zajedno sa regulatornim T ćelijama učestvuju u regulaciju imunog odgovora [94]. Glavna uloga CD8+ T ćelija je njihovo funkcionisanje kao citotoksičnih T limfocita. Virusna infekcija dovodi do njihove aktivacije u limfnom tkivu i migracije do mesta infekcije, gde su u stanju da prepoznaju i eliminišu inficirane ćelije [94]. U stanju su i da indukuju apoptozu i produkuju citokine. Nakon završetka infekcije, na samom mestu infekcije, kao i u limfnom tkivu i cirkulaciji može se detektovati populacija memorijskih citotoksičnih T limfocita. Oni se mogu aktivirati naknadnom infekcijom, a kako je njihovo dejstvo usmereno prema visoko konzerviranim proteinima NP, M1 i PA, u stanju su da ukršteno reaguju čak i sa virusima različitog podtipa [94]. Zahvaljujući tome, citotoksični T limfociti obezbeđuju heteropodtipski imunitet i u odsustu antitela sa sposobnošću ukrštene reakcije.

Tokom infekcije virusom influence, pored antitela na aktuelni podtip, javljaju se i antitela na podtip sa kojim je osoba bila u kontaktu prvi put u životu. Ovaj fenomen je nazvan „originalni antigenski greh“ i za njega su odgovorne B memorijske ćelije koje perzistiraju nakon prve infekcije, a bivaju stimulisane naknadnim kontaktom sa novim podtipom [2]. Titar antitela na virus koji je izazvao primarnu influenza virusnu infekciju može biti višestruko veći od titra antitela na aktuelni virus. Ovim fenomenom se objašnjava i činjenica da je tokom pandemije 2009. godine, među osobama rođenim pre 1957. godine, koje su u momentu pandemije bile starije od 52. godine života, zabeleženo znatno manje infekcija, a s tim u vezi i teških oblika influence, u odnosu na mlađu populaciju [102]. Miller i sar. [102] objašnjavaju da su osobe rođene u periodu 1918-1957. godine, prvi put u svom životu bile izložene influenza A(H1N1) podtipu, koji je u tom periodu jedini cirkulisao u ljudskoj populaciji. Antitela stvorena tada, zahvaljujući delimično ukršteno-neutrališućem karakteru, pružila su izvesnu zaštitu u toku pandemije 2009. godine. Iako je 1977. godine došlo do ponovne pojave A(H1N1) podtipa, on je cirkulisao u humanoj populaciji zajedno sa A(H3N2) podtipom, koji je najčešće bio

dominantan, te autori smatraju da je veći deo populacije prvi kontakt ostvario sa A(H3N2) podtipom. U skladu sa ovim stavovima su i rezultati brojnih seroarheoloških studija, koji su potvrdili da su ukršteno reagujuća, neutrališuća antitela protiv pandemijskog virusa, bila zastupljena kod 34% rođenih pre 1950. godine u SAD, 56% starijih od 90 godina u Finskoj, kao i preko 60% starijih od 85 godina u Italiji, Tajvanu, Novom Zelandu i Australiji [93].

Anti-influenca antitela IgG klase prolaze transplacentarnu barijeru, te su novorođena deca prirodno ili vakcinom imunizovanih majki, zaštićena od infekcije tokom prvih meseci života. Nakon približno 6 meseci života, ova antitela iščezavaju iz cirkulacije te deca postaju podložna influenci. Tokom života, u svakom kontaktu sa antigenski novim virusom imunitet protiv influenza virusa se razvija, menja i u zavisnosti od stepena antigenske sličnosti, pruža zaštitu u manjoj ili većoj meri. U starosti, efikasnost imunog sistema opada, populacije B limfocita se smanjuju, a opada i antigen-specifična aktivnost T limfocita, što sve zajedno uslovljava veću podložnost ove populacije komplikacijama influenza virusne infekcije [94].

Virulentnost influenza A virusa

Konačan ishod virusne infekcije rezultat je složenih interakcija virusa i domaćina. Tokom evolucije, organizmi su razvili imunološke mehanizme prepoznavanja i eliminacije patogena, od kojih su neki, kao što je rečeno, nespecifični, urođeni, a drugi specifično usmereni prema određenom mikroorganizmu, tj. adaptivni. Nasuprot tome, virusi poseduju brojne faktore virulencije, odnosno mehanizme koji omogućuju uspešnu infekciju i umnožavanje u ćeliji i pružaju sposobnost daljeg inficiranja drugih ćelija. Virulencija virusa može biti procenjena na osnovu dva parametra: težine kliničkih simptoma bolesti u inficiranom domaćinu i efikasnosti širenja virusa na novog domaćina [15]. Ove dve osobine ne moraju uvek biti paralelno ispoljene. Naime, moguća je infekcija visokotransmisibilnim influenza virusom niskog patogeniteta, poput A(H1N1)pdm09, dok neke izrazito virulentne podtipove, poput avijarnog H5N1, odlikuje slaba sposobnost transmisije među ljudima.

Virulencija, odnosno stepen patogenosti influenza virusa je multifaktorska karakteristika, koja varira u velikoj meri, zavisno od soja virusa i domaćina, uslovljavajući pojavu potpuno asimptomatskih pa sve do gotovo 100% fatalnih infekcije [33]. Sa stanovišta virusa, virulencija je multigeniski uslovljena, pri čemu joj virusni proteini doprinose na različite načine. Mogu modifikovati specifičnost virusa prema receptoru, olakšati ulazak u ćeliju, replikaciju, transkripciju, sklapanje i oslobađanje viriona i izmeniti efekat imunog odgovora domaćina. Ipak, i dalje nisu jasni svi genetički faktori odgovorni za osobinu transmisije virusa sa čoveka na čoveka, niti značaj i uticaj eventualnih dodatnih faktora vezanih za virus, domaćina ili sredinu, koji mogu modifikovati patogenost virusa [77].

Molekule HA virusa su odgovorne za specifično prepoznavanje i vezivanje za sijalinske receptore na ćelijskoj plazmali. Kao što je rečeno, avijarni podtipovi biraju receptore sa $\alpha 2,3$ vezom sijalinske kiseline i terminalne galaktoze, humani su prilagođeni $\alpha 2,6$ tipu veza, dok svinjski virusi mogu da koriste obe vrste [37]. Na ćelijama humanog respiratornog epitela $\alpha 2,3$ veza, inače tipična za crevni epitel ptica, zastupljena je znatno ređe od $\alpha 2,6$ veze [28]. Usled toga, avijarni podtipovi influence mogu inficirati ljude, iako manje efikasno u odnosu na humane viruse. Slaba infektivnost, ali izrazita patogenost nekih avijarnih sojeva, može donekle biti objašnjena neravnomernom distribucijom potrebnih receptora u disajnim putevima. Naime, iako je $\alpha 2,3$ veza retka u epitelu organa gornjeg respiratornog trakta, koji su najizloženi influenza virusima, ona je češća u bronhiolama i alveolama. Usled toga, do infekcije avijarnim podtipovima dolazi retko, ali kada do nje dođe i kada ptičiji virus stigne do pluća, zbog većeg broja adekvatnih sijalinskih receptora, dolazi do teških, progresivnih pneumonija [28].

U daljem toku virusne infekcije, HA posreduje u fuziji membrane ćelijskih endozoma i virusne ovojnice. Već je napomenuto da je za odigravanje ovog procesa neophodno aktiviranje prekursora HA0, dejstvom ćelijskih proteaza. Kod većine virusa, metu prepoznavanja enzima čini jedna rezidua arginina u molekulu HA. Nju prepoznaju ekstracelularne proteaze nalik tripsinu, a obrada molekula HA se vrši na ćelijskoj membrani tokom pupljenja ili na već oslobođenim virionima [56]. Ove enzime sekretuju ćelije respiratornog i intestinalnog trakta, što infekciju ograničava na ove organske sisteme [103]. Usled limitirane sposobnosti širenja u organizmu domaćina, ovi virusi se generalno smatraju manje patogenim. Nasuprot tome, kod visokopatogenih sojeva avijarnih podtipova, mesta prepoznavanja enzima su sastavljena od više aminokiselina. U ovom slučaju aktivaciju HA vrše široko rasprostranjene intracelularne proteaze trans – Goldžijevog sistema, tokom egzocitoznog transporta ka ćelijskoj membrani [56]. Ovi enzimi su ubikvitarni u ljudskom organizmu, što omogućuje širenje virusa po organizmu i nastanak sistemskih infekcija [30]. Smatra se da se na ovaj način može, bar delimično, objasniti visoka patogenost nekih H5 i H7 sojeva avijarnih virusa za koje su karakteristična poli-aminokiselinska mesta prepoznavanja proteaza [104]. Na taj način, i distribucija adekvatnih proteaza u domaćinu, predstavlja determinantu histološke selektivnosti, a posledično i patogenosti virusa. Interesantno je da jedan od najpatogenijih influenza A virusa, H1N1 virus iz 1918 godine, kao mesto delovanja proteaza na molekulu HA poseduje jednu reziduu arginina, što ukazuje na to koliko je virulencija influenza virusa kompleksna karakteristika [56].

Protein NS1 influenza A virusa, predstavlja moćno sredstvo virusa u borbi protiv imunog odgovora domaćina. On ometa prepoznavanje virusa od strane RIG-I, inhibira funkciju antivirusnih proteina, sprečava ekspresiju ćelijskih gena, pa tako i IFN gena, i ometa transport mRNK domaćina iz jedra u citoplazmu [11]. Smatra se da NS1 protein influenza A virusa

sprečava produkciju INF na pre-translacionom i/ili post-translacionom nivou [105]. Naime, vezujući se za RIG-I, NS1 sprečava aktivaciju RIG-I signalizacionog puta te sinteza IFN biva prekinuta. S druge strane, utvrđeno je da neki sojevi virusa, imaju dodatnu strategiju za blokiranje produkcije IFN putem sprečavanja post-translacione modifikacije ćelijskih mRNK i njihovog transporta iz jedra. Protein NS1 je u stanju i da direktno blokira funkciju dva citoplazmatska antivirusna proteina: dsRNK-zavisne serin/treonin PKR i 2'-5'-oligoadenilat sintetaze [29, 105]. Ovi proteini su ključni regulatori procesa virusne transkripcije i translacije, ali imaju i dodatne uloge u okviru nespecifičnog imunog odgovora, poput indukcije IFN- β i apoptičnog odgovora domaćina. Zbog stvaranja velike količine pozitivnih i negativnih RNK lanaca, u inficiranoj ćeliji dolazi do obrazovanja dsRNK. Enzim PKR biva aktiviran virusnim dsRNK i vrši fosforilaciju ćelijskih faktora translacije (eIF2 α) i transkripcije (IRF3). Ovim procesom inicijacioni faktor eIF2 α postaje inaktivisan, što inhibira sintezu virusnih proteina, dok IRF3 postaje aktivisan i stimuliše ekspresiju IFN β [42]. Vezujući se za PKR, NS1 efikasno blokira ovaj antivirusni put.

Interesantno je da sinteza IFN kod infekcije influenza B virusom počinje znatno ranije nego kod influenza A virusa, odnosno da ona ne zavisi od prethodne replikacije, transkripcije i sinteze proteina. Nasuprot tome, ekspresija IFN gena je zavisna od replikacije RNK i ekspresije proteina influenza A virusa. Ovo znači da influenza A virus, na početku infekcije, dok NS1 još nije ekspresovan u ćeliji, ostaje neotkriven zahvaljujući nekom dodatnom, NS1-nezavisnom mehanizmu [11]. Možda se u ovim razlikama između influenza A i B virusa, krije deo odgovora na pitanje, zašto su infekcije influenza B virusom, generalno, praćene blažim simptomima i manjim brojem komplikacija. Moguće je da osobina influenza B virusa, da indukuje imuni odgovor odmah po infekciji ćelije, omogućuje organizmu da se brže i lakše izbori sa njim, dok influenza A virus uspešno izbegavajući imuni odgovor na početku infekcije borbu domaćina čini znatno težom [11].

PB1-F2 je još jedan nestrukturani protein influenza A virusa uključen u borbu protiv antivirusnog odgovora ćelije. Određene mutacije PB1-F2 se smatraju faktorima virulencije kod virusa H1N1 iz 1918. godine, kao i kod nekih visokopatogenih H5N1 sojeva [29, 106]. Dokazano je da PB1-F2 povećava patogenost virusa zahvaljujući sposobnosti da inicira razaranje alveolarnih makrofaga. Naime, on predstavlja faktor koji senzibilizuje ćelije imunog sistema prema apoptičnim signalima usmerenim ka virusom inficiranim ćelijama [29]. Generalno gledano, apoptoza je kompleksan, multifaktorijalan mehanizam kojim domaćin pokušava da ograniči produkciju novih patogena. Međutim, apoptoza indukovana influenza A virusima, doprinosi virusnoj replikaciji, deseminaciji i uništavanju ćelija imunog sistema [41]. Pored toga, u inficiranim ćelijama respiratornog epitela identifikovana su dva seta gena, čija je regulacija zavisna od PB1-F2: geni koji kodiraju produkciju INF- β i geni uključeni u obradu i prezentaciju antigena [29]. Pored toga što efekat PB1-F2 zavisi od vrste ćelija, utvrđeno je da

različiti oblici samog proteina mogu uticati na stepen patogenosti virusa. Virulentni influenza A virusi koji su cirkulisali u humanoj populaciji tokom 1918., 1957. i 1968. godine, posedovali su molekule ovog polipeptida u punoj dužini od 87-90 aminokiselina. Kasniji, sezonski izolati ovih virusa, imali su razne varijante PB1-F2 u pogledu dužine, pri čemu su skraćene forme za posledicu imale smanjenje ili potpuni gubitak pro-apoptozne funkcije, kao i manju patogenost virusa. Pored toga, ovi virusi su, usled mutacija i gubitka dela proteinskog lanca, izgubili aminokiseline za koje je utvrđeno da predisponiraju domaćina prema letalnim bakterijskim super-infekcijama [107].

NP je još jedan virusni protein koji ometa sintezu IFN i ima pro-apoptotičnu funkciju, te predstavlja dodatni faktor virulencije koji doprinosi patogenezu influenza A virusa. NP utiče na apoptotični odgovor domaćina vezujući se za ćelijski protein – klasterin, čime ometa njegovu citoprotektivnu funkciju. Klasterin je ubikvitarno ekspresovan protein koji ima ulogu u ćelijskom ciklusu, inter-ćelijskoj adheziji, ćelijskoj signalizaciji, a kroz interakcije sa drugim faktorima, sprečava ćelijsku smrt [41].

I pored intenzivnog istraživanja na ovom polju i dalje su nejasni razlozi varijacija u virulenciji influenza A virusa kod različitih domaćina. Na primer, rekonstruisani H1N1 virus iz 1918. godine, kao i H5N1 podtip, visoko su virulentni za niz životinja (miševi, lasice, makaki majmuni), dok kod svinja uzrokuju infekcije praćene blagim simptomima [105]. Takođe, oba virusa odlikuje potpuno odsustvo patogenosti u zamorcima, uprkos intenzivnoj replikaciji u respiratornom traktu. Očigledno je da odlučujuću ulogu u ovoj pojavi imaju neki, za sada, neidentifikovani faktori domaćina.

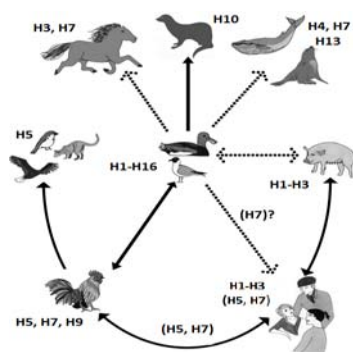
Specifičnost prema domaćinu influenza A virusa

Za razliku od mnogih virusa koje odlikuje vrlo uzan opseg prirodnih domaćina, influenza A virusi su specifični po tome što, u pogodnim uslovima, mogu “preskočiti” prirodnu biološku barijeru i adaptirati se na novog domaćina. Mogućnost prelaska na drugog domaćina zavisi od ekoloških faktora, kao i osobina domaćina i samog virusa. Smatra se da ulogu okidača za takve promene igraju izmenjeni ekološki uslovi, koji dovode do bližeg kontakta virusa i potencijalno novog domaćina.

Mada je odavno primećeno da je neposredno pre ili za vreme pojedinih pandemija, dolazilo i do masovnog oboljevanja nekih životinja (konja 1732 i 1775, svinja 1918. godine), povezanost ptica, sisara i čoveka kao mogućih domaćina influenza A virusa, dugo vremena nije bila uočena. Tridesetih godina 20. veka izolovani su i identifikovani virusi influence A svinja i ljudi. Prvi svinjski influenza A virus izolovao je Richard Shope 1931. godine pokušavajući da ustanovi etiologiju „svinjske influence“, a dve godine kasnije, Dochez i sar. su

dokazali virusnu etiologiju humane influence, uspevši da iskultivišu i pasažiraju virus u primarnoj kulturi embrionalnih ćelija pileta [3]. Tek 1955. godine influenza virus je prvi put detektovan kod ptica kao etiološki faktor ptičije kuge. Nakon toga, u godinama koje su sledile, otkriveni su i drugi avijarni influenza A virusi. Webster i sar. su 1967. godine prvi postavili hipotezu da su pandemijski influenza A virusi srodni ptičijim, a Slemons i sar. su 1974. godine prvi izolovali ove viruse iz kloake divljih pataka [77].

Danas se zna da su influenza A virusi u stanju da inficiraju razne toplokrvne životinje, odnosno sisare i ptice (Sl. 11). Prirodne domaćine ovim virusima predstavlja najmanje 105 različitih vrsta divljih ptica, prvenstveno predstavnici reda *Anseriformes* (patke, guske, labudovi, itd.) i *Charadriiformes* (galebovi, morske laste, itd.). Ovi nisko-patogeni, avijarni influenza virusi, asimptomatski se umnožavaju u crevima svojih domaćina, a kada se nađu u istom organizmu, što je čest slučaj, slobodno razmenjuju gene. Upravo zbog tih neprekidnih genskih rearanžmana, u populaciji divljih ptica postoji ogroman broj influenza A virusa sa genomima koje čine različite kombinacije gena. To je jedan neiscrpan genski pul koji predstavlja stalni izvor potencijalno novih gena za humane influenza A viruse. Brojne HA-NA kombinacije su funkcionalno ekvivalentne, te se održavaju zahvaljujući odsustvu selektivnog pritiska [106]. Domaća živina iz reda *Galiformes* (ćurke, kokoške, prepelice, itd.) ne predstavlja prirodni rezervoar influenza A virusa, ali je podložna infekciji adaptiranim sojevima koji vode poreklo od divljih ptica. S vremena na vreme, neki od H5 i H7 sojeva adaptiranih na domaće ptice, evoluiraju u visoko-patogeni soj, obično zahvaljujući mutaciji koja uzrokuje pojavu poli-aminokiselinskog mesta delovanja proteaza na HA [106].



Slika 11: Opseg mogućih domaćina influenza A virusa [108]

Influenca A virusi se redovno izoluju iz svinja i konja, a sporadično i iz drugih divljih i domaćih životinja, poput pasa, foka, kitova, lasica [35]. Rezultati filogenetskih istraživanja ukazuju da ovi virusi vode poreklo iz pula influenza A virusa prisutnog među divljim pticama. Ipak, za sada nije jasno da li i među sisarima postoji stalni domaćin ili se virus kontinuirano prenosi sa ptica na sisare, izaziva lokalne epidemije i nestaje do izbijanja nove zoonoze [106].

U retkim slučajevima, dokazan je i direktan transfer sa jedne na drugu vrstu sisara. Tako su zabeležene simptomatske infekcije pasa podtipom koji se inače sreće kod konja H3N8, a seroepidemiološke studije ukazuju na širenje ovog virusa u populaciji pasa širom SAD [35]. Rezultati eksperimentalnih istraživanja ukazuju da su humani podtipovi u stanju da inficiraju konje i pse, mada nije dokazano da do ovakvog prenosa virusa dolazi u prirodnim uslovima.

I pored intenzivnog istraživanja na ovom polju, i dalje nisu razjašnjeni mehanizmi odgovorni za promenu specifičnosti prema domaćinu. Molekularno-genetičke promene koje omogućuju da virus čiji je prirodni domaćin neka vrsta divljih ptica, postane patogen za domaću živinu, sisare ili čoveka, tek treba objasniti. Takođe, nisu jasni ni značaj i uloga virulencije/patogenosti virusa u evoluciji odnosa virus-domaćin, pošto je poznato da su se na ljude uspešno adaptirali nisko patogeni (1968 i 2009), umereno patogeni (1957), kao i visoko patogeni (1918) influenza A virusi. Moguće je da su genetičke osnove osobina kao što su patogenost, mogućnost adaptacije na novog domaćina i mogućnost širenja sa jednog na drugog domaćina iste vrste, potpuno odvojene, poligenske i uslovljene mutacijama koje se međusobno isključuju [106].

I pored svih nepoznanica, jasno je da je prilagođavanje animalnih influenza virusa na ljude kao i nastanak novog humanog podtipa genskim rearanžiranjem, kompleksan proces, koji se ne dešava često. Potrebno je da svih osam gena u genomu, i nakon slučajnih, nasumičnih mutacija i/ili rearanžmana i dalje funkcionišu kao skladna celina koja će obezbediti nesmetano umnožavanje virusa.

Tokom evolucije, influenza virusi su se prilagodili na upotrebu različitih tipova receptora, karakterističnih za različite domaćine. Usled toga, osnovni preduslovi za uspešno prilagođavanje animalnih podtipova na ljude, jesu adaptacija na upotrebu humanog $\alpha 2,6$ tipa receptora. Promena afiniteta HA prema receptoru, teško je premostiva barijera za animalne influenza A viruse. Genske promene koje uslovljavaju prilagođavanje sa avijarnog na humani receptor, nisu u potpunosti jasne, ali se čini da su izrazito kompleksne i verovatno različite od podtipa do podtipa [77]. Aminokiselinska sekvenca u okviru receptor-vezujućeg mesta na molekulu HA ptičijih influenza virusa je visoko konzervirana, dok su kod virusa adaptiranih na ljude detektovane mutacije koje utiču na sposobnost vezivanja za određeni tip receptora. Od ključnog značaja za promenu afiniteta prema receptoru kod H1 podtipa, su rezidue na položaju 190 i 225, a kod H2 i H3 podtipova aminokiseline na položaju 226 [106].

Na specifičnost prema receptoru ne utiče samo aminokiselinska sekvenca, nego i broj i pozicija oligosaharidnih grupa na ili oko receptor-vezujućeg mesta. Promena obrasca glikolizacije uobičajena je pojava nakon adaptacije na novog domaćina ili ćelijsku liniju [35]. Takođe, i druge modifikacije, poput sulfatacije, fukozilacije i dodatne sijalinizacije sijalinskih receptora utiču na specifičnost vezivanja HA [91]. Zahvaljujući tome, čak i neznatne promene sastava i strukture sekvenci koje okružuju receptor-vezujuća mesta, mogu dovesti do

nastanka soja sa izmenjenim receptor specifitetom, a prisustvo $\alpha 2,6$ tipa receptora samo po sebi, nije garancija uspešne replikacije humanog virusa u određenim ćelijama [109].

Uprkos raznovrsnosti gena koji kodiraju površinske proteine virusa influence (16 HA i 9 NA) u akvatičnim pticama, od početka 20. veka samo tri HA i dva NA gena i to u samo tri kombinacije (H1N1, H2N2 i H3N2), rearanžmanima su bila uključena u genome sojeva zaista dobro adaptiranih na ljude. Pri tome, pandemije 1957. i 1968. godine bile su izazvane virusima koji su rekombinacijama stekli nove avijarne gene ali su oba virusa i pre ovih genetičkih promena bila dobro prilagođena ljudima i dugo vremena cirkulisala u ljudskoj populaciji. Od ostalih gena koji kodiraju HA i NA, u ljudskoj populaciji dokazani su još H5, H6, H7, H9, H10, N3, N7, N9 i N10 i to u kombinacijama H5N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H6N1 i H10N8. Izuzev visokopatogenih sojeva H5N1 i H7N9 virusa, u pitanju su virusi koji većinom nisu izrazito virulentni, a sposobnost transmisije sa čoveka na čoveka im je vrlo ograničena. Interesantno je da je i nakon dugog niza godina tokom kojih je hiljade ljudi bilo izloženo H5N1 virusu, pronađeno samo nekoliko mutiranih sojeva sa povećanom sposobnošću vezivanja za humani receptor, ali ni jedan kod kojeg je došlo do potpunog prelaska sa avijarnog na humani tip receptora [104]. Moguće je da se H5 virusi, kao i neki drugi avijarni podtipovi, suočavaju sa nepremostivom biološkom barijerom, koja ih sprečava u efikasnom vezivanju za humane receptore [77]. Zato se avijarni influenza virusi beleže kao uzročnici sporadičnih, manjih epidemija izrazito lokalnog karaktera, i to, u najvećem broju slučajeva, među radnicima na živinarskim farmam. Za sada nije razjašnjeno da li je ovo posledica dugotrajnog, bliskog kontakta sa inficiranom životinjom ili je uslovljeno nekim faktorom domaćina koji povećava mogućnost infekcije ili utiče na transmisibilnost virusa [77].

Iako receptor-vezujuće mesto većine H5N1 izolata dobijenih iz ljudi odlikuje specifičnost prema $\alpha 2,3$ sijalinsko-glikozidnoj vezi, neki sojevi H5N1, H7N2, H7N3 i H9N2, pokazuju povećanu sposobnost vezivanja za humani $\alpha 2,6$ tip receptora. Pored toga, u toku pandemije 1918. godine, cirkulisale su varijante sa afinitetom prema humanom receptoru, kao i varijante sa mešanim afinitetom prema oba tipa receptora, pri čemu to nije imalo nikakav uticaj na kliničku sliku kod obolelih. Na osnovu ovih zapažanja, može se zaključiti da povećan afinitet za vezivanje za humani tip receptora, sam po sebi, nije dovoljan za potpuni prelazak avijarnih influenza virusa na ljude, niti je neophodan za uspešnu infekciju i izazivanje teške kliničke slike [106].

Respiratorni epitel svinje sadrži i $\alpha 2,3$ i $\alpha 2,6$ sijalinsko-glikozidne veze, što ćelije čini osetljivim i na avijarne i na humane viruse. Upravo zbog toga, svinje predstavljaju potencijalnog domaćina koji može biti inficiran i humanim i avijarnim sojevima influenza A virusa i u njima su pronađeni sojevi čiji genomi predstavljaju genetičke kombinaciju sojeva različitog porekla. Zato se svinje smatraju prelaznim domaćinima (tzv. „mixing vessel“) u kojima dolazi do rearanžiranja između avijarnih i humanih sojeva, koje za posledicu može

imati nastanak novog, pandemijskog soja. Međutim, intermedijerni domaćin nije neophodan za nastanak novog podtipa influenza virusa. U odgovarajućim okolnostima, do genskog rearanžiranja između humanih i avijarnih sojeva, može doći i direktno u ljudima. Naime, nisu nađeni dokazi koji bi povezali svinje sa nastankom sojeva humano-avijarnog porekla, koji su bili odgovorni za pandemije 1957. i 1968. godine. Što se tiče virusa koji je uzrokovao pandemiju 2009. godine, nije poznato u kojem domaćinu je došlo do genskog rearanžiranja, mada se pretpostavlja da je u pitanju bila svinja [106].

Drugi površinski glikoprotein, NA, takođe utiče na specifičnost prema domaćinu. Naime, za uspešnu replikaciju virusa neophodno je postojanje ravnoteže između receptor-vezujuće aktivnosti HA i enzimske degradacije receptora od strane NA. Zbog toga, promena afiniteta HA prema određenom receptoru, mora biti praćena i promenom specifičnosti NA prema supstratu [35].

Pored HA i NA, i drugi virusni proteini mogu uticati na opseg prirodnih domaćina i tropizam virusa influenzae. Virusna RNK polimeraza igra ključnu ulogu u replikaciji virusa, a njena redukovana aktivnost u ćelijama druge vrste, predstavlja jedan od faktora koji ograničava opseg mogućih domaćina. Poznato je da su transkripcioni i replikacioni sistemi virusa u tesnim, kompleksnim interakcijama sa brojnim ćelijskim faktorima. Zato, pri prelasku sa jedne vrste domaćina na drugu, polimeraza mora pretrpeti adaptivne promene koje će omogućiti nesmetane interakcije sa novim ćelijskim faktorima neophodnim za intracelularni transport, povezivanje elemenata polimeraza kompleksa, kao i regulaciju njegove katalitičke funkcije. Detektovano je više mutacija u delu genoma koji kodira subjedinice polimeraze, koje mogu modifikovati opseg prirodnih domaćina pojedinih sojeva influenza virusa. Na primer, dokazano je da mutacija koja uslovljava prisustvo lizina na položaju 627 [35, 103], kao i asparagina na položaju 701 i 271 [110] PB2, avijarnom virusu daje mogućnost efikasnog razmnožavanja u sisarima. Mehanizam kojim aminokiselinske substitucije utiču na mogućnost inficiranja novog domaćina, predmet su brojnih istraživanja. Trenutno dostupni podaci ukazuju da pozicija 627 u molekulu PB2, utiče na temperaturnu osetljivost replikativnog kompleksa virusa. Naime, humani influenza virusi se umnožavaju u organima gornjeg respiratornog trakta, na temperaturi od oko 33° C, dok su avijarni prilagođeni na temperaturu intestinalnog trakta ptica od oko 41° C. Avijarni mutanti sa lizinom na položaju 627, imaju mogućnost uspešne replikacije i na temperaturi gornjeg respiratornog trakta sisara, za razliku od divljih sojeva koji na tom mestu poseduju glutamin [83, 104].

Za uspešnu replikaciju virusa neophodno je odvijanje brojnih interakcija i između drugih virusnih proteina, poput M, NP i NEP i citoplazmatskih i jedarnih ćelijskih faktora. Kvalitet tih protein-protein interakcija, takođe može odrediti sposobnost umnožavanja virusa u određenom domaćinu [32].

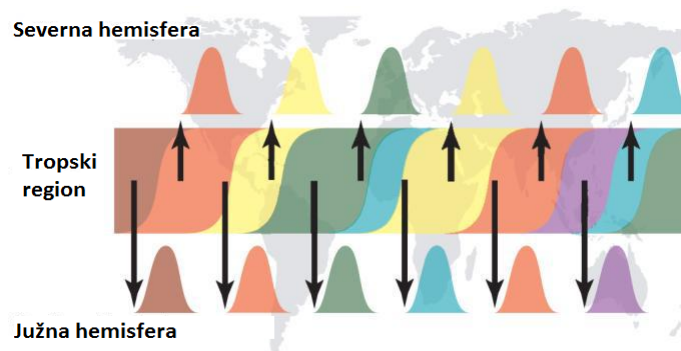
Epidemijski i pandemijski potencijal influence

Influenca A virusi su ubikvitarni. Oni su jedni od najčešćih etioloških faktora akutnih respiratornih infekcija i imaju značajan uticaj na morbiditet i mortalitet širom sveta. Influenca je oboljenje koje se najčešće javlja u vidu sezonskih epidemija u umerenim klimatskim regionima, infekcija prisutnih kontinuirano tokom cele godine u tropskim regionima i povremenih pandemija. Za sada, ne postoji način da se predvide tačno vreme izbijanja, obim i posledice epidemija i pandemija gripa, niti je moguće unapred znati podtip, varijantu, infektivnost i virulenciju virusa.

Iako u područjima sa umereno kontinentalnom klimom, početak i pik aktivnosti virusa variraju od godine do godine, epidemije gripa izbijaju tokom hladnih zimskih meseci, koje odlikuje niska vlažnost vazduha u zatvorenim prostorima u kojim borave ljudi i traju 8-10 nedelja [111, 112]. U umerenom klimatskom pojasu Severne hemisfere epidemije obično dostižu vrhunac između decembra i marta, a u istom klimatskom regionu Južne hemisfere u periodu maj-septembar. Nasuprot tome, u toplim, tropskim regionima, u kojima preko cele godine vlada visoka vlažnost vazduha, situacija je potpuno drugačija. Tropska područja odlikuje, manje-više, konstantna aktivnost influenza virusa tokom cele godine, pri čemu postoje regioni u kojima se godišnje epidemije podudaraju sa kišnom sezonom, kao i oni, poput Singapura i Hong-Konga, za koje je karakteristično prisustvo dve posebne sezone u toku jedne godine [112].

Filogenetske analize influenza A virusa, sprovedene na velikom broju uzoraka u toku dužeg vremenskog perioda, dovele su do postavke „source-sink“ modela kojim se objašnjava sezonska dinamika influence na globalnom nivou [113, 114]. Po ovom modelu, u tropskom pojasu se nalazi „izvor“ („source“) influenza A virusa, koji obezbeđuje kontinuiran, uglavnom jednosmeran, protok virusa u umerene regione Severne i Južne hemisfere (Sl. 12). U njima, oni izazivaju epidemije, a na kraju sezone nestaju, te populacije umerenih pojasa predstavljaju „slivnik“ („sink“) influenza A virusa. Ova teorija je postavljena nakon što su rezultati filogenetskih ispitivanja ukazali na vrlo malo direktnih filogenetskih veza između virusa iz sukcesivnih sezona na odgovarajućem lokalitetu umerenog pojasa, a što bi se očekivalo u slučaju lokalnog perzistiranja i evoluiranja virusa. Neki autori, kao najverovatniji epicentar aktivnosti influenza A virusa navode Južnu Kinu, dok drugi ukazuju da čitava Istočna i Jugoistočna Azija predstavlja izvor-populaciju, zahvaljujući konstantno prisutnim epidemijama koje se javljaju na velikom prostranstvu i vremenski se preklapaju [113, 114]. Tako pandemijski virusi iz 1957. i 1968. godine, kao i većina inter-pandemijskih varijanti, vode poreklo iz Jugoistočne Azije. Smatra se da nastanku pandemija baš u ovom regionu sveta

pogoduju brojnost populacije i gustina naseljenosti, kontinuirana aktivnost influence tokom cele godine, kao i način uzgoja životinja koji podrazumeva blizak kontakt ljudi, svinja i ptica [73]. U interpandemijskim periodima, karakteristike ovog regiona u pogledu stanovništva i aktivnosti virusa, doprinose nastanku novih antigenskih varijanti. U toj rezervoar populaciji, odnosno mreži povezanih populacija, kontinuirano se generiše i održava genetička i antigenska varijabilnost virusa, pošto je u njima (zahvaljujući konstantnoj aktivnosti influence i veličini populacije) antigenski drift znatno efikasniji u odnosu na sink-populacije [113]. Dugotrajan opstanak nekog soja zavisiće od antigenskih osobina, replikacionog kapaciteta, transmisibilnosti i ekoloških faktora. Nasuprot tome, u umerenim regionima, godišnji pikovi genetičke raznovrsnosti, dele periodi koji predstavljaju genetičko „usko grlo“ i javljaju se na kraju većine sezona influence [113].



Slika 12: „Source-sink“ model evolucije influenza A virusa

Strelicama je predstavljena kontinuirana transmisija genetički i antigenski različitih influenza A virusa (prestavljeno različitim bojama) iz „source“-populacije u tropima u „sink“-populacije umerenih regiona Severne i Južne hemisfere [113]

Uzroci sezonske oscilacije aktivnosti influenza virusa nisu sasvim jasni. Verovatno su posledica sezonske varijabilnosti više različitih faktora, poput verovatnoće kontakta između inficirane i zdrave osobe, mogućnosti virusa da opstane u spoljašnjoj sredini, kao i sezonskih varijacija imuniteta [112]. U hladnim zimskim mesecima umerenih regiona, kao i u toku kišne sezone u tropima, ljudi se više zadržavaju u zatvorenim prostorima te se tako stvaraju pogodni uslovi za širenje infekcije. Međutim, ovakvo objašnjenje nije univerzalno primenjivo. Recimo, u pustinjskim delovima jugozapada SAD, tokom toplih letnjih meseci ljudi više borave u zatvorenim prostorima, a ipak se epidemije javljaju zimi. Pored toga, na opstanak virusa u spoljašnjoj sredini tokom prelaska sa obolelog na zdravu osobu, utiču sredinski faktori, a prvenstveno vlažnost vazduha. Vijabilnost influenza virusa produžava se sa smanjenjem vlažnosti vazduha. Tako su neka istraživanja sprovedena u SAD, pokazala da period niske apsolutne vlažnosti vazduha prethodi epidemijama influence. Ipak, ovim mehanizmom je nemoguće objasniti situaciju u tropima, gde tokom cele godine vlada visoka vlažnost vazduha.

Neka ispitivanja su ukazala na mogućnost da je efekat vlažnosti vazduha na vijabilnost virusa bimodalna, odnosno da je opstanak najduži pri najnižim i najvišim vrednostima vlažnosti, a minimalan u uslovima umerene vlažnosti vazduha [112]. I na kraju, moguće je da na sezonsku varijabilnost influence utiču i sezonske oscilacije imuniteta. Tako zimi, inhalacija hladnog vazduha dovodi do vazokonstrikcije u sluzokoži respiratornog trakta, čime se smanjuje dotok leukocita i fagocitorna aktivnost, a time opada odbrambena sposobnost mukoze ovih organa. Sličan efekat ima i inhalacija suvog vazduha koja dovodi do gubitka vlažnosti sluzokože i redukcije mukocilijarne aktivnosti. Pored toga, u zimskom periodu u regionima sa umerenom klimom i u kišnoj sezoni u tropima, nivo solarne radijacije je najniži što može da uzrokuje deficit vitamina D koji stimuliše imuni sistem.

Karakteristike sezonskih epidemija influence variraju od sezone do sezone, zavisno od tipa, podtipa i soja virusa, kao i nivoa zaštitnih antitela u opštoj populaciji [88]. U principu, odlikuje ih naglo izbijanje i brzo širenje koje za posledicu ima veliki broj inficiranih i obolelih. Pored toga, uglavnom dolazi do porasta broja hospitalizacija, kao i smrtnih ishoda, u grupi starijih osoba, male dece i osoba sa hroničnim oboljenjima. U SAD, virus influence je odgovoran za otprilike 200 000 hospitalizacija i 36 000 smrtnih ishoda godišnje [106].

Morbiditet i mortalitet u toku pandemija influence mogu biti vrlo različiti. U toku jedne pandemijske godine može biti inficirano i do 50% populacije, dok je broj smrtnih ishoda u pandemijama tokom 20. veka, u SAD, varirao od oko 675 000 1918. godine, preko 70 000 1957. godine, pa do 34 000 1968. godine [106]. Pandemije influence se obično javljaju u 2-3 talasa, pri čemu se u svakom narednom virulencija virusa povećava [73].

Dugo vremena bilo je opšte prihvaćeno mišljenje po kojem antigenski šift uvek dovodi do masovnog oboljevanja sa velikim brojem smrtnih ishoda, a drift samo do umerenog porasta sezonskog mortaliteta. Međutim, na osnovu podataka sakupljenih tokom 20-tog veka, vidi se da je stopa mortaliteta u nekim sezonama, koje su na osnovu pomenutog genetičkog kriterijuma označene kao epidemijske, bila znatno viša u poređenju sa nekim pandemijama [76].

U ljudskoj populaciji su u nekoliko navrata zabeležene manje epidemije i pojedinačna oboljevanja izazvana animalnim influenza virusima. Tako je svinjski A(H1N1) bio uzročnik epidemije 1976. godine, među vojnicima u vojnoj bazi u New Jersey (SAD), kao i teške pneumonije kod farmera u Evropi 1986 [73]. U toku 2011. godine registrovane su i prve infekcije svinjskim H3N2v virusom, koji se radi razlikovanja od humanog podtipa obeležava sa „v“ (skraćénica od reći varijanta) [115]. Kontinuirano se beleže i oboljevanja izazvana avijarnim virusom H5N1, a detektovani su i slučajevi infekcije avijarnim podtipovima H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N8 [5, 6, 106]. Iako su se ovi animalni influenza virusi uspešno umnožavali u ljudima, ni u jednom slučaju nije došlo do nastanka pandemije. Na osnovu ovih saznanja može se zaključiti da ograničavajući faktor u nastanku pandemija nije

mogućnost replikacije u ljudima, nego sposobnost efikasne transmisije sa čoveka na čoveka [73]. Neke od faktora koji utiču na mogućnost uspešnog prenosa avijarnih virusa među ljudima navode de Jong i sar. [73]. Oni ukazuju da čak i ukoliko se u toku infekcije, u respiratornom traktu inficiranog čoveka, produkuje veliki broj virusnih partikula, neophodno je da one budu oslobođene u okolinu u okviru dovoljno malih čestica. To im pruža mogućnost relativno dugog održavanja u vazduhu čime se povećava šansa za inficiranje nove osobe. NA avijarnog influenza A virusa nije u stanju da efikasno razgradi sijalinsko-glikozidne veze mukoproteina u humanom respiratornom traktu, čime je onemogućeno formiranje dovoljno malih kapljica tokom kihanja i kašljanja. Pored toga, avijarni virusi se prvenstveno prenose fekalno-oralnim putem, putem vode, te zato nisu dovoljno otporni na uticaje spoljašnje sredine kojima su izloženi u vazduhu. Pored H1N1 virusa iz 1918. godine, jedini primer animalnog influenza A virusa, koji je zaista uspešno prešao na ljude, jeste virus koji je izazvao pandemiju 2009 godine. Ostaje nejasno zašto se to nije desilo i u nekim drugim slučajevima, poput slučaja zoonotije iz 1976, kada je čak dokazana i transmisija među ljudima [106].

Mada su pandemije influence u budućnosti nešto na šta se mora računati, za sada, ne postoji način da se predvidi koji podtip će ih uzrokovati. Na osnovu današnjih saznanja, čini se da pandemijski soj influenza A virusa može biti rezultat tri različita mehanizma [116]. Kao prvo, rearanžiranjem između humanog i animalnog influenza virusa može nastati virus sa novim HA i NA genima (H2N2 iz 1957) ili samo novim HA genom (H3N2 iz 1968). Pored toga, animalni influenza virus (iz ptica ili svinja) može direktno preći na ljude bez prethodnog rearanžiranja sa humanim podtipovima (H1N1 iz 1918. godine). I na kraju, animalni virus može preći sa jedne životinje na ljude, preko prelaznog domaćina (H1N1pdm09). Moguće je da će za neku narednu pandemiju biti odgovoran neki od avijarnih podtipova, poput H5N1 ili H7N9, koji su već dokazali sposobnost inficiranja ljudi i izazivanja oboljenja ili neki H2 podtip. Naime, postoje čvrsti dokazi o mogućnosti recirkulacije influenza virusa. Rezultati seroloških istraživanja pokazali su postojanje visokog titra specifičnih H3 antitela kod osoba koje su bile starije od 85 godina u momentu pandemije 1968. godine. Podaci dobijeni ovim seroarheološkim ispitivanjima navode na zaključak da je pandemija 1889-1891 godine bila uzrokovana H3N8 podtipom, koji je naknadno isčezao iz ljudske populacije, da bi se nakon 78 godina H3 ponovo pojavio [45, 117]. Raniji kontakt sa H3 hemaglutininom i imunitet stečen tom prilikom uslovio je značajno manju učestalost infekcija i manji mortalitet tokom pandemije 1968. godine, u uzrasnoj grupi rođenoj pre 1890 u odnosu na rođene nakon 1899, što dalje povezuje H3 podtip sa pandemijom 1889-91 [117]. Ovakvi ubedljivi podaci ne postoje u pogledu H1 i H2 podtipova, što ne znači da je recirkulacija u njihovom slučaju nemoguća. Pri tome, ponovno pojavljivanje H1 podtipa 1977. godine, ne smatra se prirodnim događajem. S obzirom na činjenicu da trenutno u humanoj populaciji cirkulišu H1 i H3 podtipovi, postoji opravdana opasnost od prirodne ili akcidentne pojave H2 podtipa. Naime, virusi koji nose H2

antigenski vrlo slični H2N2 iz 1957-58, i dalje cirkulišu među divljim pticama, a brojni sojevi se održavaju i u laboratorijama širom sveta. Treba imati na umu da veliki deo ljudske populacije, rođen nakon 1968. godine, nema zaštitni imunitet prema H2 podtipu.

Istorijat epidemija i pandemija influence

Na osnovu specifičnih karakteristika (simptoma oboljenja, eksplozivnom širenju, velikom broju obolelih, visokoj smrtnosti) epidemije i pandemije influence prepoznate su u brojnim zapisima počevši od antičkog perioda. Ipak, saznanja o prisustvu influence u periodu pre 18. veka zasnovana su na ne-naučnim dokumentima poput manastirskih hronika, dnevnih novina i zapisa pojedinaca lokalnog značaja. Podaci dobijeni iz tih arhivskih dokumenata često su nepotpuni i nedovoljno precizni. Oni predstavljaju samo fragmente, te ne pružaju kompletan uvid u globalno kretanje virusa influence u datom periodu. Tek tokom 18. veka javlja se prva medicinska literatura i tendencija da se, u skladu sa tadašnjim nivoom znanja iz oblasti medicine, sistematičnije beleže pojave raznih oboljenja, pa tako i influence [77].

Influenca u periodu do XVIII veka

Život ljudi u izolovanim naseljima i sporiji načini transporta, usloveli su da epidemije influence u ranijim periodima, uglavnom nemaju globalni karakter, odnosno ne prelaze granice kontinenata. Pretpostavlja se da je influenza virus najverovatnije bio uzročnik masovnih oboljevanja zabeleženih u Evropi 1173, 1293, kao i u više navrata tokom 14-tog (1323, 1357, 1386-1387) i 15-tog (1411, 1427, 1438, 1482) veka. Sredinom 14. veka, tačnije tokom epidemije 1357. godine, u Italiji, prvi put je upotrebljen termin *influenca* [77].

Prva pandemija influence proširila se iz Afrike i zahvatila celu Evropu tokom leta 1510. godine, dok je prvo globalno pandemijsko kretanje influenza virusa iz pravca Azije ka Evropi zabeleženo tokom 1557 i 1558. godine. Ova pandemija, kao i naknadna 1580. godine, bile su praćene teškim komplikacijama i visokom stopom mortaliteta [77]. Većina autora se slaže da je prva pandemija za koju se nedvosmisleno može tvrditi da je bila izazvana virusom influence bila upravo ona iz 1580. godine [72]. Širenje virusa je otpočelo u leto u Aziji i nastavilo se preko Male Azije do Evrope i Afrike. Nakon toga, narednih 150 godina beleže se uglavnom manje epidemije lokalnog karaktera, a od većih koje su zahvatile dobar deo Evrope treba spomenuti one 1610, 1658-1659 i 1675. Na osnovu oskudne dokumentacije, neki autori smatraju da je virus influence prvi put prenet na tlo američkog kontinenta tokom pandemije 1557-1558. godine, a sa velikom sigurnošću se može tvrditi da je epidemija 1617. godine, koja je izbila u Čileu, bila izazvana ovim virusom.

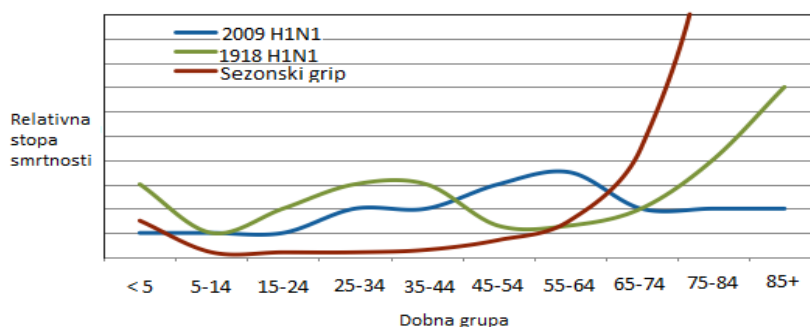
Influenca tokom XVIII i XIX veka

Kao što objašnjavaju Taubenberger i Morens [77], počevši od 18. veka, pandemije influence su znatno bolje dokumentovane. Prva je izbila u Rusiji 1729. godine i u roku od tri godine, u nekoliko talasa, zahvatila ceo svet. Nakon ove pandemije, pa sve do 1747. godine, nastupa period izuzetno intenzivne globalne aktivnosti virusa influence, pri čemu broj smrtnih slučajeva povezan sa oboljevanjem od gripa dostiže svoj maksimum 1742. i 1744. godine. Pandemija 1761. godine otpočela je u Americi i tokom 1762. godine zahvatila Evropu i druge delove sveta. To je prva pandemija influence koja je bila studiozno praćena i dokumentovana u naučnim časopisima. Pored toga, značajno su unapređena dotadašnja saznanja o kliničkim i patofiziološkim karakteristikama gripa. Za pandemije koje su trajale u periodu od 1780-1782., 1788-1790 i 1830-1831, zajedničko je da su otpočele u Jugoistočnoj Aziji, da je stopa morbiditeta bila izrazito visoka, ali da je broj smrtnih ishoda bio relativno mali. Intenzivna aktivnost virusa influence zabeležena je i tokom 1832-1833. kao i 1836.-1837. godine, mada postoje neslaganja u pogledu toga da li su u pitanju zasebne pandemije ili dva naknadna talasa jednog istog pandemijskog virusa iz 1830. godine. Pandemija koja je otpočela 1847. godine je, usled vrlo ograničene eksplozivnosti, blagih simptoma i niske stope mortaliteta, u velikoj meri bila nespecifična. Otpočela je u Evropi i tokom 50-tih godina 19. veka, veoma sporo se širila ka Zapadnoj Hemisferi. Velika pandemija „ruskog gripa“ 1889-1893. godine, imala je tipičan put širenja iz Azije ka zapadu i izuzetno brzo je zahvatila celu planetu. Ona se odigrala na samom početku razvoja virusologije kao nauke, te pravi uzročnik nije prepoznat, nego je pandemija pripisana *Bacillus-u influenzae* (danas *Haemophilus influenzae*). Na osnovu epidemioloških studija koje su sprovedene kasnije, a tokom kojih su serološkim metodama ispitani serumi rođenih pre i posle 1889. godine, zaključeno je da je najverovatniji uzročnik ove pandemije bio virus podtipa H3.

„Španski grip“ – pandemija 1918-1920. godine

Pandemija influence 1918-1920. godine, poznata kao „španski grip“ ili „španska groznica“, predstavlja najfatalniji pojedinačan događaj u ljudskoj istoriji. Tačno mesto izbijanja pandemije i smer širenja, teško je odrediti. Prvi slučajevi bolesti javili su se u martu 1918. godine, u SAD. Do juna, prvi talas epidemije je obišao čitav svet i mada je broj obolelih bio velik, broj umrlih je bio u skladu sa onim zabeleženim tokom ranijih pandemija. Međutim, drugi talas epidemije koji se javio u drugoj polovini 1918. i tokom 1919. godine, kao i treći talas koji je trajao od 1919-1920. godine, bili su uzrokovani znatno virulentnijim sojem virusa i doveli su do događaja nezapamćenih u dotadašnjoj istoriji. Stopa smrtnosti je naglo skočila sa, za influencu uobičajenih <0,1% na preko 2,5% [78]. U roku od nekoliko nedelja, širom Afrike je umrlo 15-20 miliona ljudi, u Indiji je broj žrtava bio 7 miliona, u Severnoj Americi 600 000, u Engleskoj 200 000. Procenjuje se da je 50% svetske populacije bilo inficirano, 25% je obolelo,

a da je broj umrlih bio između 40 i 50 miliona [72], a po nekim procenama i više od 50 miliona [77]. Po strukturi morbiditeta „španska groznica“ se nije razlikovala od ostalih pandemija influence, tokom kojih je takođe najveći broj obolelih bio u uzrasnoj grupi do 15. godine života. Specifičnost pandemije 1918-1920. godine bila je neuobičajena struktura mortaliteta. Naime, najveća smrtnost bila je među mladim, do tada zdravim ljudima, starosti od 20-40 godina. Kriva smrtnosti usled influence imala je oblik slova „W“, za razliku od tipičnog „U“ oblika karakterističnog za sezonski grip, koji ukazuje na povećanu smrtnost u najmlađim i najstarijim uzrastnim kategorijama (Sl. 13). Uobičajeno je da su komplikacije i letalan ishod influence najčešći kod starijih osoba, dok je 99% umrlih tokom „španskog gripa“ bilo mlađe od 65 godina [3]. Poređenja radi, udeo ove uzrastne grupe u ukupnom broju umrlih, u pandemijama gripa 1957. i 1968. godine, iznosila je 36%, odnosno 48% [3]. Znatno niža stopa smrtnosti od očekivane, kod osoba starijih od 65. godina, može biti posledica imuniteta stečenog tokom pandemije koja je otpočela 1847. godine. Mada je uzrok smrti kod mnogih bila virusna pneumonija, većina je umrla zbog komplikacija uzrokovanih bakterijskom superinfekcijom [78]. Mehanizam patogeneze udružene virusne i bakterijske infekcije, koji je doveo do tako velikog broja smrtnih ishoda još nije razjašnjen [77].



Slika 13: Relativne stope smrtnosti usled influence (računate u odnosu na prosečnu smrtnost usled influence za sve dobne grupe), u odgovarajućim dobnim grupama tokom sezonskog gripa i pandemija 1918. i 2009. godine (Risk Management Solution Inc., www.rms.com/publications/H1N1_2009_SpecialReport.pdf)

Potrebno je naglasiti da u vreme pandemije 1918. godine, virus influence još nije bio identifikovan, te je postojalo mišljenje da je za masovno oboljevanje odgovorna bakterija *Hemophilus influenzae*. Nakon izolacije humanog influenza virusa, 30-tih godina prošlog veka sprovedena su serološka ispitivanja ljudi koji su bili izloženi pandemijskom uzročniku 1918. godine, a čiji rezultati su retrospektivno povezali pandemiju sa influenza virusom [83]. Pored toga, delovi plućnog tkiva ljudi umrlih tokom pandemije 1918-1920. godine, poslužili su kao uzorci iz kojih su izolovani, amplifikovani i sekvencirani delovi genoma virusa. Rad na rekonstrukciji kompletne genomske sekvence otpočeo je 1995. godine i trajao je gotovo deceniju. Taubenberger i njegov tim su prvi uspeali da izoluju delove RNK genoma influenza

virusa iz formalinom fiksiranih, parafinisanih uzoraka pluća i na osnovu njih utvrde kodirajuću sekvencu svih 8 segmenata genoma [118]. Nedavni tehnološki napredak omogućio je razvoj reverzne genetike, odnosno tehnike stvaranja infektivnih virusa pomoću njihove cDNK. Primenom te tehnike, 2005. godine, u Centru za kontrolu i prevenciju bolesti u Atlanti, Tumpery i njegov tim, prvi put su stvorili influenza virus koji je sadržao svih 8 segmenata identičnih genomu pandemijskog H1N1 virusa iz 1918. godine [83]. Analize su pokazale da je uzročnik pandemije 1918-1920. godine bio vrlo sličan virusu koji je kasnije izolovao Shope [3, 72]. Danas se smatra da je influenza A virus koji je izazvao pandemiju 1918. godine, u isto vreme prešao na svinje, te su oba soja nastavila nezavisnu evoluciju u svojim domaćinima. Humani soj H1N1 je izazivao epidemije i endemične slučajeve influence sve do 1957. godine, kada je njegova cirkulacija u ljudskoj populaciji prestala.

Rezultati eksperimentalnih istraživanja ukazali su da su HA i NA najvažnije determinante izrazite virulencije pandemijskog virusa iz 1918. godine. Površinski glikoprotein HA pružio je mogućnost efikasnog vezivanja za humani tip sialinskog receptora, a neuobičajena osobina NA da aktivira prekursor HA0, uslovlila je pojavu fenotipa jedinstvenog za H1N1 iz 1918. godine, a to je mogućnost umnožavanja u MDCK kulturi ćelija u odsustvu proteaze tripsina [83]. Pored toga, smatra se da je i PB1-F2, prisutan u punoj dužini, a time i sposoban za indukciju ćelijske apoptoze, doprineo patogenosti ovog virusa. I na kraju, u okviru PB2 gena detektovana je mutacija koja je uslovlila mogućnost replikacije virusa na temperaturi respiratornih puteva sisara, što je značajno doprinelo sposobnosti inter-humane transmisije pandemijskog soja H1N1 [83]. Na osnovu rezultata istraživanja uticaja pojedinih gena H1N1 virusa iz 1918. godine na eksperimentalne životinje, zaključeno je da polimeraza kompleks i HA, predstavljaju ključne determinante virulencije, odgovorne za razvoj fatalnih pneumonija [118].

„Azijski grip“ – pandemija 1957-1958. godine

Pandemija „Azijskog gripa“ započela je u februaru 1957. godine na jugu Kine, odakle se, za osam meseci, proširila preko Singapura, Hong-Konga, Japana, SAD, sve do Velike Britanije. U aprilu je objavljeno da je za izbijanje pandemije odgovoran nov podtip H2N2, antigenski različit od dotadašnjeg H1N1. Ovo je prva pandemija influence koja se odigrala u eri moderne virusologije, pa je zato vrlo dobro proučena. Patogeneza i kliničke manifestacije bolesti tokom ove pandemije, bile su slične onim iz 1918, ali uz odsustvo neuobičajenih epidemioloških karakteristika [106]. Stopa mortaliteta nije bila tako visoka kao 1889. i 1918. godine. Procenjuje se da je tokom epidemije u SAD, umrlo oko 70 000 ljudi [78]. Podtip H2N2 je u potpunosti zamenio, do tada aktivni H1N1. Narednih godina izazivao je sezonske i sporadične epidemije, a zatim je 1968. godine potpuno iščezao.

„Hong-Kongški grip“ – pandemija 1968-1970. godine

Pandemija 1968-1969. godine započela je u junu, a bila je izazvana pojavom novog podtipa influence A H3N2. Od Hong-Konga se proširila sve do SAD, gde je zabeleženo skoro 40 000 žrtava [78]. Uopšteno gledano, ova pandemija je bila umerenog intenziteta. Taubenberger i Morens [3] navode da je na mnogim lokalitetima morbiditet čak bio manji nego u nekim prethodnim, ne-pandemijskim godinama. Smatra se da je razlog tome prisustvo iste neuraminidaze kao i kod H2N2 podtipa. Naime, veliki deo ljudske populacije bio je prokužen H2N2 virusom ranijih godina, te su tom prilikom stvorena antitela protiv NA antigena. Ta antitela nisu bila u stanju da preveniraju infekciju, ali su doprinela skraćanju trajanja bolesti i razvoju lakše kliničke slike kod obolelih [77]. Narednih godina, virus je postao endemičan i nastavio je da cirkuliše u ljudskoj populaciji sve do danas. Nasuprot blagoj pandemiji, sezonske epidemije izazvane varijantama ovog virusa, nastalim antigenskim driftom, često je odlikovao značajan morbiditet i mortalitet [106].

„Ruski grip“ – pandemija 1977-1978. godine

Nakon 20 godina odsustva, podtip H1N1 se ponovo pojavio 1977. godine i uzrokovao pandemiju slabijeg intenziteta. Ona je najverovatnije otpočela u Severnoj Kini i, za razliku od dve prethodne, sporo se širila. Logično, najveći broj obolelih bio je u uzrasnoj grupi do 20 godina. Ispitivanja su pokazala da je ovaj virus antigenski vrlo sličan H1N1 podtipu koji je bio aktivan u periodu 1947-1956. godine. Pored toga, izolati dobijeni tokom ove pandemije, antigenski su bili vrlo uniformni, što je ukazivalo na njihovo zajedničko poreklo. Mogućnost da influenza virus opstane u prirodi 20 godina, bez akumulacije genetičkih mutacija koje bi dovele do izmena antigenih svojstava, vrlo su male. Sve ovo navodi na mišljenje da je pandemija 1977. godine rezultat slučajnog oslobađanja laboratorijskog soja virusa izolovanog 50-tih godina [77, 78]. Novi podtip H1N1 nije zamenio do tada cirkulišući H3N2, nego su od tada u ljudskoj populaciji cirkulisala oba. Rekombinacija između ova dva virusa dovela je do pojave novog H1N2 podtipa, koji je, za sada, registrovan samo tokom sezone 2001-2002. [78, 104].

„Ptičiji grip“

Podtip ptičijeg influenza virusa H5N1 je prvi put detektovan u ljudskoj populaciji 1997. godine, kada je izazvao manju epidemiju tokom koje je kod 6 od 18 (33%) obolelih infekcija imala letalan ishod [78]. Ovo je bio prvi dokumentovani slučaj epidemije izazvane čisto avijarnim podtipom koji je direktno prešao na ljude. Nakon perioda u kojem su zabeleženi sporadični slučajevi izazvani ovim virusom, 2003. godine je izbila nova epidemija, sa 445 potvrđenih infekcija i stopom smrtnosti od skoro 60% [110]. Mada su u područjima epidemija preduzete intenzivne mere suzbijanja virusa, uništavanjem zaražene živine, virus je uspeo da se proširi po Jugoistočnoj Aziji, Evropi i Africi. U februaru 2007. virus se ponovo pojavio u Aziji

i proširio u Evropu i Ameriku, što je rezultiralo sa 274 humana slučaja i 167 smrtnih ishoda [35]. Pored značajnih posledica po ljudsko zdravlje, epidemije izazvane visokopatogenim H5N1, imaju vrlo ozbiljan uticaj i na zdravlje životinja i ekonomiju pogođenog regiona. Na primer, tokom 1997. godine u Hong Kongu, u cilju prevencije širenja epidemije, ubijeno je 1,4 miliona kokošaka i druge živine, a u Pensilvaniji ranih 1980-tih godina uništavanje čak 17 miliona različite živine donelo je štetu od nekih 60 miliona dolara [35].

Neumann i sar. [78], navode neke izuzetne karakteristike visoko patogenog H5N1 virusa, koje ga čine unikatnim među svim influenza A virusima. Kao prvo, letalan je ne samo za kokoške nego i za divlje patke koje predstavljaju njegov prirodni rezervoar, a izaziva fatalna oboljenja i kod brojnih sisara. Takođe, utvrđeno je da se godinama patogenost virusa kod lasica konstantno povećava, što ukazuje na akumulaciju mutacija koje povećavaju patogenost H5N1 virusa kod sisara. I na kraju, ono što najviše zabrinjava, virus se neprestano prenosi na ljude, izaziva teška respiratorna oboljenja sa visokom stopom smrtnosti, pri čemu je u nekim slučajevima zabeleženo širenje bolesti sa obolelog na članove njegove porodice. Jedina, po ljudsku populaciju, pozitivna osobina ovog podtipa je vrlo ograničena sposobnost transmisije sa čoveka na čoveka. Međutim, ukoliko znamo da su rearanžmani gena čest događaj kod H5N1 [78], kao i da u humanoj populaciji cirkulišu influenza A virusi koji se vrlo lako prenose među ljudima, jasno je da postoji šansa za stvaranje uslova u kojim bi se ovaj podtip genetski izmenio tako da mu širenje među ljudima ne bi predstavljalo problem.

Kao što je rečeno, pored H5N1, zabeležene su i infekcije ljudi drugim avijarnim podtipovima influenza A virusa, poput H7N3, H7N2, H7N7, H7N9, H9N2, H6N1 i H10N8 [5, 6]. Ovi virusi nisu jako virulentni niti se lako prenose sa čoveka na čoveka, pa su zato, uglavnom uzrokovali samo manje epidemije izrazito lokalnog karaktera. Soj H9N2 se od sredine 90-tih sreće među domaćom živinom, a kod ljudi je dokazan samo u par slučajeva [77]. Kako navode Morens i sar. [5] visoko i niskopaogeni avijarni influenza A virusi sa H7 podtipom HA su tokom prošle i ove dekade izazvali brojne epizootije koje su bile praćene humanim infekcijama. Tako je 2003. godine u Holandiji, među radnicima na živinarskoj farmi, izbila epidemija konjuktivitisa sa ili bez simptoma gripa, izazvana ptičijim H7N7. Zabeleženo je 450 slučajeva, od čega je kod 89 pacijenata infekcija laboratorijski dokazana. U toku epidemije jedna osoba je preminula, a u tri slučaja je utvrđena transmisija sa čoveka na čoveka. Virus H7N3, prvi put je dokazan 2004. godine, kod dva radnika obolela od konjuktivitisa u toku epidemije na živinarskoj farmi u Kanadi, a 2012. godine je registrovana epidemija izazvana ovim virusom u Meksiku. Infekcije H7N2 podtipom povezane su sa enzootičnom cirkulacijom ovog virusa na pijacama živine u Nju Jorku, dok je H7N9 poslednji u nizu H7 podtipova dokazanih kod ljudi. U Istočnoj Kini, od marta 2013. godine kada je virus prvi put detektovan kod ljudi, pa do sredine februara 2014. godine, potvrđena su 355 humana slučaja infekcije virusom H7N9 i 112 smrtnih ishoda [119]. Morens i sar. [5] napominju da, slično H5N1 podtipu,

H7N9 retko inficira ljude, ali kada do toga dođe bolest ima vrlo težak klinički tok i često fatalan kraj. U toku 2013. godine u Tajvanu je otkriven i prvi slučaj pneumonije izazvan ptičijim H6N1 podtipom, dok je u Kini iste godine dokazan prvi slučaj, a naredne godine još dva teška slučaja infekcije H10N8 virusom [6]. Oba podtipa uobičajeno inficiraju domaću živinu i svi slučajevi bolesti su povezani sa radom na farmama.

„Svinjski grip“ – pandemija 2009. godine

Prvi slučajevi gripa izazvani, prvobitno nazvanim, svinjskim H1N1 influenza virusom zabeleženi su sredinom februara 2009. godine, u Meksiku, a virus je identifikovan sredinom aprila. Epidemija se vrlo brzo širila, čak i u područja koja odlikuje vrlo ograničena aktivnost influence u to doba godine (Severna Zemljina hemisfera). Do sredine juna 2009. godine, u 74. zemlje sveta registrovano je ukupno 29 000 potvrđenih slučajeva, a do oktobra iste godine, u 191. zemlji laboratorijski je dokazano ukupno 375 000 infekcija izazvanih novim (H1N1)pdm09 virusom [104, 120]. U periodu od 11.06.2009. godine kada je SZO proglasila pandemiju, pa do njene odjave 10.08.2010. godine, A(H1N1)pdm09 je dominirao, u odnosu na druge influenza viruse. U post-pandemijskom periodu, nivo i obrazac transmisije novog virusa su se promenili i poprimili karakteristike tipične za sezonski grip. Prestala je masovna pojava van-sezonskog oboljevanja kako na Severnoj, tako i na Južnoj hemisferi. Zahvaljujući imunitetu stečenom tokom pandemije, kao i masovnoj vakcinaciji, broj infekcija uzrokovanih A(H1N1)pdm09 se smanjio, a u mnogim područjima zabeležena je i intenzivna aktivnost H3N2 podtipa, kao i influenza B virusa. Pandemijski A(H1N1)pdm2009 je u potpunosti zamenio, do tada cirkulišući, sezonski H1N1 podtip, koji se od tada više ne detektuje.

I pored velike infektivnosti, A(H1N1)pdm09 ne poseduje genske markere koji uslovljavaju izrazitu patogenost, tako da najveći broj infekcija prolazi sa blagim simptomima i ne zahteva hospitalizaciju [121]. Na primer, kod ovog virusa nisu zabeležene aminokiselinske substitucije povezane sa visokom virulencijom, poput onih na položajima 627 i 701 PB2, PB1-F2 nije ekspresovan u punoj dužini, a NS1 nema sposobnost vezivanja za faktor adenilacije ćelijskih mRNK [104].

Po svojim karakteristikama, pandemija 2009. godine se smatra umerenom, sa velikim brojem obolelih ali sa relativno malim brojem komplikacija i smrtnih ishoda. Na osnovu izveštaja iz 214 zemalja sveta, SZO je registrovala 18 632 slučaja infekcije novim, pandemijskim virusom influence sa smrtnim ishodom [122]. Kako se ovaj broj odnosi samo na laboratorijski potvrđene slučajeve, stvaran broj fatalnih slučajeva, značajno je veći. Naime, u mnogim slučajevima sa smrtnim ishodom, dijagnostički testovi na prisustvo virusa gripa nisu ni vršeni ili je virus bilo nemoguće detektovati u kasnijim fazama bolesti. Pored toga, kod osoba sa hroničnim zdravstvenim problemima često je kao uzrok smrti bila navedena komplikacija osnovnog oboljenja. Imajući ovo u vidu, vrše se pokušaji da se, upotrebom

odgovarajućih statističkih modela, dođe do realnije procene broja smrtnih slučajeva uzrokovanih (H1N1)pdm09 virusom. Tako su Dawood i sar. [123] došli do broja od 201 200 osoba sa oboljenjima respiratornog trakta i 83 300 sa kardiovaskularnim bolestima, kod kojih se infekcija (H1N1)pdm09 virusom završila fatalno. Rezultati studije Global Pandemic Mortality Project, finansirane od strane SZO, ukazali su da se broj, sa pandemijskom influencom povezanih smrtnih slučajeva, u periodu april-decembar 2009. godine, kretao u granicama od 123 000 do 203 000. I pored višestruko većih vrednosti u odnosu na zvanično registrovan broj fatalnih (H1N1)pdm09 infekcija, one su i dalje niže od broja smrtnih ishoda u prosečnoj pre-pandemijskoj sezoni koji se kreće u granicama od 148 000 do 249 000 [122]. U toku pandemije 2009. godine, broj fatalnih slučajeva bio je znatno veći u populaciji osoba mlađih od 65 godina, u poređenju sa sezonskom influencom (Sl. 13). Otprilike 80% umrlih tokom pandemije 2009. godine bilo je mlađe od 65 godina [122, 123].

Prevenција i lečenje influenza virusnih infekcija

Blagovremena prevencija i lečenje influenza virusnih infekcija, sprečavaju nastanak bolesti, ili redukuju težinu i trajanje simptoma bolesti, dužinu perioda infektivnosti, komplikacije, kao i potrebu za hospitalizacijom i upotrebom antibiotika.

Vakcina protiv influenza virusa

Najefikasniji način prevencije influence jeste vakcinacija. Vakcina protiv gripa se primenjuje već više od 60 godina [88]. Njena efikasnost u prevenciji influence, u grupi zdravih, odraslih osoba kreće se u rasponu od 70-90%, dok je kod starijih nešto manja [87]. Ipak, i u toj uzrasnoj grupi vakcina prevenira pojavu teških oblika bolesti i komplikacija u 60%, a smrtnih ishoda u 80% slučajeva [124].

Trenutno su u upotrebi dva tipa vakcine: jedna koja sadrži mrtav, inaktivisan virus i druga u kojoj se nalazi živ, atenuiran virus influence. Inaktivisana vakcina je u upotrebi dugi niz godina, dok je primena atenuirane vakcine odobrena 2002. godine u SAD, a 2011. godine u Evropi [125]. Obe vakcine su multivalentne, odnosno sastavljene od više sojeva influenza virusa koji aktivno cirkulišu u humanoј populaciji i predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje na globalnom nivou. Vakcine se proizvode pojedinačnim umnožavanjem odabranih vakcinalnih sojeva virusa u embrionisanim kokošijim jajima, nakon čega se tečnost iz alantoisne duplje prečišćava, a virus koncentriše zonalnim centrifugiranjem. Jedna vakcinalna doza sadrži po 15 µg svakog virusa, što je količina koja se obično dobije iz jednog inokulisanog jajeta [98].

Mrtva vakcina može sadržati cele virione formalinom ili β-propiolaktonom inaktivisanog virusa, prečišćene površinske glikoproteine ili degradirane komponente viriona [97]. Primena vakcine sa celim virionima povezana je sa češćom pojavom neželjenih nusfekata. Kod

20-30% vakcinisanih, na mestu aplikacije vakcine, javlja se bol, a kod 5% je prisutna povišena temperatura, glavobolja i bol u mišićima [2]. Neželjene nuspojave se javljaju znatno ređe nakon primene vakcina u kojima se nalaze samo delovi viriona. Zato se danas najčešće koristi, takozvana split vakcina, koja sadrži HA i NA oslobođene degradacijom lipidne ovojnice pomoću deterdženata. Nasuprot tome, živa vakcina sadrži kompletan, vijabilan virus, atenuiran adaptacijom na replikaciju na nižim temperaturama. Priprema se genskim rearanžiranjem svakog vakcinalnog virusnog soja i laboratorijskog soja adaptiranog na umnožavanje na hladnom. Time se dobija virus sa HA i NA vakcinalnog soja i 6 internih gena poreklom od laboratorijskog virusa [98]. Atenuirani laboratorijski virus, nastao je serijskim pasażama na 25° C, čime je stvoren mutirani soj koji se ne umnožava na višoj temperaturi, odnosno telesnoj temperaturi čoveka.

Primena obe vakcine stimuliše stvaranje neutrališućih antitela, koja će u slučaju infekcije influenza virusima prepoznati epitope na površini visoko varijabilnog globularnog dela HA, a u manjoj meri i antitela na NA [100]. Za razvoj maksimalnog titra antitela, obično su potrebne dve nedelje, a protektivni efekat traje otprilike 6 meseci. U odnosu na mrtvu vakcinu, živa vakcina izaziva znatno manju produkciju serumskih antitela ali značajno veću sintezu lokalnih sekretornih IgA antitela, kao i aktivaciju celularnog imunog odgovora. I pored ovih razlika, obe vakcine su podjednako efikasne u sprečavanju influence [97].

Kontinuirani antigenski drift influenza virusa čini proizvodnju vakcine pravim izazovom i uslovljava potrebu da se njen sastav procenjuje dva puta godišnje (po jednom za svaku hemisferu) i po potrebi prilagođava [111]. SZO je formirala Nacionalne influenza centre (NIC) širom sveta, koji u okviru Globalne mreže za nadzor nad influencom (GISRS - Global Influenza Surveillance and Response System), vrše monitoring influenza virusa u cilju otkrivanja antigenski izmenjenih sojeva. Izolati sakupljeni u NIC šalju se u jedan od šest Kolaborativnih centara za influencu od kojih su dva smeštena u SAD (Atlanta i Memfis), a po jedan u Kini (Peking), Japanu (Tokio), Velikoj Britaniji (London) i Australiji (Melburn). U ovim centrima se dalje vrši njihovo genotipsko i antigensko ispitivanje i utvrđuje se antigenska sličnost sa vakcinalnim sojevima. Četvorostruka promena titra u reakciji inhibicije hemaglutinacije, koju pokaže cirkulišući soj u prisustvu imunog seruma dobijenog pomoću vakcinalnog soja, smatra se značajnom i ukazuje na potrebu promene sastava vakcine [98]. Na osnovu rezultata ovih ispitivanja, SZO daje preporuku o sastavu vakcine za svaku predstojeću sezonu i to u februaru za Severnu hemisferu, a u septembru za Južnu hemisferu. Uobičajeno se vakcina sastoji od 2 soja influenza A virusa i 1 soja influenza B virusa. Međutim, u februaru 2012. godine SZO je dala preporuku o potrebi uključivanja oba trenutno aktivna soja influenza B virusa i potrebi proizvodnje kvadrivalentne vakcine [9]. Naime, trovalentna vakcina u kojoj je prisutan samo jedan soj influenza B virusa, ne pruža zaštitu od drugog soja, a predvideti koji će od njih dominirati u određenoj sezoni, pokazalo se nemogućim. Tako se u

periodu od 2001-2010. godine, u SAD, u 5 sezona vakcinalni soj influenza B virusa, nije podudaraao sa aktuelnim [9].

Ne postoji pouzdan način za predviđanje antigenskih promena influenza virusa. Zbog neočekivanog antigenskog drifta (ili šifta) vakcinalni sojevi i virusi koji cirkulišu u datom momentu mogu biti antigenski nepodudarni. Usled toga, antitela stvorena nakon vakcinacije, ne mogu efikasno da neutrališu aktuelni virus sa izmenjenim HA. Zato se trenutno ispituje mogućnost proizvodnje i primene vakcina koje bi indukovale stvaranje antitela šireg specifičeta, odnosno čije ciljne sekvence bi bili epitopi koji ne podležu antigenskom driftu, a zajednički su za veći broj različitih podtipova. To bi mogla biti antitela usmerena protiv štapićastog dela HA molekula, kao i M2 i NP proteina koje odlikuje visoka konzerviranost među influenza virusima [94]. Već je napomenuto da monovalentna vakcina protiv H1N1pdm09 stimuliše produkciju antitela na štapićasti deo HA molekula i da ova antitela pokazuju ukršteno-reagujući neutralizujući efekat i prema drugim podtipovima virusa, poput sezonskih H1N1 i H3N2, kao i protiv H5N1. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost razvoja univerzalne vakcine protiv gripa, kojom bi problemi vezani za antigenski drift bili prevaziđeni. Ipak, konzervirani regioni pokazuju slabu imunogenost kada se prezentuju imunom sistemu domaćina u prirodnoj formi, prisutni na površini vakcinalnih virusa ili u okviru komponenti vakcina [39]. Pored toga, antitela sa širokim neutralizujućim kapacitetom registrovana su samo kod nekih vakcinisanih osoba. Zbog toga, proizvodnja sigurne vakcine koja će stimulisati njihovu produkciju u velikoj količini, kod svih primalaca, ostaje izazov koji tek treba savladati [100]. Istražuju se i vakcine koje bi stimulisale ćelijski imunitet, odnosno stvaranje ukršteno-reagujućih citotoksičnih T limfocita. Za njihovu indukciju ciljni protein mora biti unet u citosol, te je potrebno razviti sistem koji će to efikasno i sigurno omogućiti, poput rekombinantnih virusnih vektora ili DNK vakcina [94].

Proizvodnja vakcine protiv gripa zavisi od dostupnosti ogromnog broja embrionisanih kokošijih jaja, čija proizvodnja zahteva dosta vremena [126]. Proizvodnja zasnovana na upotrebi ćelijskih kultura, kao sistema za uzgajanje vakcinalnih virusa, svakako je fleksibilnija, ali ujedno i skuplja. Zbog toga, proizvođači vakcina, ne smatraju finansijski opravdanim napuštanje tradicionalne, na jajima zasnovane tehnologije. Ipak, u izvesnim situacijama, pokazalo se neophodnim postojanje alternativnog načina proizvodnje vakcina protiv gripa [126]. Recimo, nakon pojave virulentnog H5N1 podtipa, ustanovljeno je da je zbog izrazite patogenosti za domaću živinu njegovo uzgajanje u embionisanim kokošijim jajima vrlo teško. Takođe, pandemije gripa predstavljaju dodatni izazov jer nameću potrebu za brzim reagovanjem, pri čemu ćelijske kulture omogućuju znatno bržu proizvodnju nove vakcine. Od 2001. godine, u upotrebi je nekoliko sigurnih i efikasnih vakcina, različitih proizvođača, pripremljenih pomoću kontinuiranih kultura ćelija bubrega afričkog zelenog majmuna (Vero) i bubrega psa (MDCK - Madin-Darby canine kidney) [126].

Imunitet stečen nakon vakcinacije traje nekoliko meseci, te SZO preporučuje sprovođenje godišnjih imunizacija, naročito u okviru rizičnih grupa, kao što su starije osobe, osobe sa hroničnim bolestima, trudnice, zdravstveni radnici, kao i deca u uzrastu od 6 meseci do 2 godine [88]. Dokazano je da antitela vakcinisanih majki, kao i majki koje su prirodno imunizovane, prelaze transplacentarnu barijeru i štite novorođenu decu do perioda od oko 6 meseci. Kod dece mlađe od 3 godine, vakcina je umereno imunogena, a za postizanje punog imuniteta kod dece uzrasta do 9 godina, koja se prvi put vakcinišu, daju se 2 doze u razmaku od 4 nedelje [9]. Vakcinalni virus, prisutan u živoj vakcini koja se proizvodi kao intranazalni sprej, i dalje ima ograničenu sposobnost replikacije. Iz predostrožosti, njena primena je dozvoljena samo kod zdravih osoba uzrasta 2-49 godina u SAD, 3-15 godina u Rusiji [116] i 2-17 godina u zemljama Evropske unije [125]. Mrtva, inaktivisana vakcina sadrži samo komponente mrtvog virusa, daje se intramuskularno, a mogu je primiti sve osobe starije od 6 meseci [116]. Kontraindikacije za vakcinaciju su: postojanje alergije na jaja (s obzirom na to da vakcina može sadržati izvesne proteine jaja), akutno febrilno stanje, kao i istorija Guillain-Barre sindroma 6 nedelja nakon prethodne vakcinacije [89]. Verovatnoća nastanka ovog sindroma, nakon vakcinacije protiv influence, vrlo je mala i iznosi svega 1 slučaj na 1000 000 vakcinisanih [98]. Kod osoba koje su već imale Guillain-Barre sindrom nakon vakcinacije, ta verovatnoća je veća. Ipak, ukoliko kod njih postoji i povećan rizik od nastanka teže kliničke slike, vakcinaciju treba ipak uzeti u obzir, naročito ukoliko se zna da je kod njih šansa za nastanak Guillain-Barre sindroma veća nakon infekcije influenza virusom, nego nakon vakcinacije. Iako nema dokaza o štetnim nuspojavama primene žive vakcine, iz predostrožnosti, ona se ne primenjuje kod imunokompromitovanih pacijenata, trudnica i osoba sa hroničnim bolestima srca i pluća [98].

Kao merilo imunogenosti vakcine protiv influence, tradicionalno se koristi titar antitela određen reakcijom inhibicije hemaglutinacije, pri čemu se vrednosti ≥ 40 smatraju protektivnim [94]. Međutim, u nekim slučajevima ove vrednosti nisu dovoljno dobar pokazatelj otpornosti. Naime, detekcija ovih antitela u serumu osoba inficiranih H5N1 je otežana, a rezultati istraživanja na imunizovanim životinjama ukazuju na to da imunitet na ovaj virus može postojati i u njihovom odsustvu u serumu [94]. Pored toga, pokušaji razvoja univerzalnijih vakcina, nameću potrebu za primenu drugih testova za utvrđivanje korelacije između otpornosti i prisustva antitela na konzervirane epitope van globularnog dela HA, kao i za procenu celularnog imunog odgovora indukovano vakcinom.

Lekovi u terapiji i profilaksi influence

Do danas, razvijene su dve grupe lekova koji su se koristili ili se i dalje koriste u terapiji i profilaksi influence: inhibitori M2 proteina i inhibitori neuraminidaze (NAI). Antivirusna terapija se preporučuje svim osobama za koje se sumnja ili kod kojih je potvrđena influenza

virusna infekcija, a čije stanje zahteva hospitalizaciju ili kod kojih postoji rizik ili je već došlo do razvoja teškog, komplikovanog oboljenja, bez obzira na vakcinalni status [127]. Primena antivirusika u profilaktične svrhe, preporučuje se nevakcinisanim osobama koje su pod visokim rizikom od oboljevanja od influence, poput zdravstvenih radnika koji bi bolest mogli preneti na svoje pacijente ili starih osoba u staračkim domovima kod kojih bi bolest mogla imati težak tok [128]. Lekovi nisu zamena za vakcinaciju, te ukoliko postoji potreba za njihovim preventivim davanjem, treba ih koristiti tokom 2 nedelje nakon vakcinacije, koliko je potrebno za stvaranje adekvatnog imunog odgovora, kao i u slučaju postojanja kontraindikacija za vakcinaciju [89].

Derivati adamantana, amantadin i rimantadin (registrovanih pod fabričkim nazivima Symmetrel®, odnosno Flumadine®) predstavljaju lekove čije je antivirusno dejstvo zasnovano na blokadi M2 protonskog kanala. Inhibirajući aktivnost jonskog kanala, oni sprečavaju normalno odvijanje procesa zavisnih od funkcionisanja M2. Tako je onemogućena fuzija virusnog omotača i membrane endozoma, kao i disocijacija ribonukleoproteina, čime je sprečen transport RNP kompleksa u jedro, a time i procesi replikacije i transkripcije. U istraživanjima sprovedenim pre 2000. godine, utvrđeno je da je preventivna upotreba amantadina imala protektivni efekat u 60% slučajeva, a da je njegova blagovremena primena u terapiji gripa, značajno skratila trajanje povišene temperature i same bolesti [2].

Mehanizam dejstva lekova iz grupe NAI, oseltamivira i zanamivira (registrovanih pod fabričkim nazivima Tamiflu® i Relenza®), zasnovano je na blokadi enzimske aktivnosti NA, što za posledicu ima agregaciju virusa na površini inficirane ćelije i nemogućnost oslobađanja novonastalih viriona [116]. Zanamivir se primenjuje u vidu oralnog inhalera, a oseltamivir su uzima u vidu kapsula ili rastvora, te se u jetri metaboliše u aktivni oblik leka oseltamivir-karboksilat [128]. Kada se koriste u cilju profilakse, oba leka su efikasna u preveniranju pojave simptoma bolesti. Ukoliko se primenjuju u terapiji, neohodno je sa primenom početi u roku od 48 časova od početka bolesti, kada će efekat lekova biti skraćenje trajanja bolesti, otprilike za jedan dan u odnosu na primenu placeba [116]. Upotreba oseltamivira je dozvoljena odraslima i deci starijoj od 1 godine, a zanamivira svim osobama starijim od 7 godina. Još ne postoji dovoljno podataka koji bi dokazali da je primena ovih lekova kod male dece (ispod dozvoljenih starosnih granica) u potpunosti bezbedna, mada preliminarna istraživanja ne ukazuju na moguće štetne efekte [89].

Oralna i inhalatorna primena NAI je komplikovana kod male dece, teško bolesnih pacijenata i pacijenata na respiratoru, što je uslovalo potrebu za razvojem novih antivirusika iz ove grupe, koji bi se davali na drugačiji način. Klinička ispitivanja su dokazala da su preparati zanamivira koji se mogu primeniti parenteralno i intravenozno efikasni u lečenju influence [124]. Pored toga, za vreme pandemije gripa 2009. godine, u SAD, počelo se i sa intravenoznom primenom novog NAI, peramivira. Rezultati studija sprovedenih u tom periodu

ukazali su da je nakon primene jedne doze ovog leka došlo do značajne redukcije trajanja bolesti, a da je višednevna terapija efikasno sprečila pojavu komplikacija kod visokorizičnih pedijatrijskih pacijenata inficiranih (H1N1)pdm09 virusom [129]. Za sada, intravenozna primena peramivira u terapiji influence, dozvoljena je u Japanu, Kini, Južnoj Koreji [130] i SAD [124].

Upotreba još jednog NAI - laninamivira nedavno je odobrena u Japanu, Kini i Južnoj Koreji [130]. Lek laninamivir sadrži lanamivir oktanoat, koji u plućima metaboliše u aktivni oblik - laninamivir. Uzima se inhalacijom poput zanamivira ali je efikasnost dokazana čak i posle uzimanja jedne doze, za razliku od zanamivira i oseltamivira, za koje je preporučena primena dve doze dnevno u trajanju od 5 dana. Efikasnost jedne doze laninamivir oktanoata, jednaka primeni 10 doza oseltamivira, dokazana je u kliničkoj studiji kod pacijenata inficiranih H1N1 i H3N2 virusima [131], kao i u inhibiciji oseltamivir-rezistentnih virusa, kako kod dece, tako i kod odraslih [132].

Iako je vakcina najefikasniji način redukovanja morbiditeta i mortaliteta uzrokovanih gripom, antivirusni lekovi takođe igraju važnu ulogu, a nekada predstavljaju jedino moguće sredstvo u kontroli ove bolesti. To je slučaj sa osobama kod kojih postoji kontraindikacija za vakcinaciju, u situacijama kada zbog antigenskog drifta vakcina ne pruža adekvatnu zaštitu, kao i nakon izbijanja pandemija tokom perioda potrebnog za proizvodnju nove vakcine.

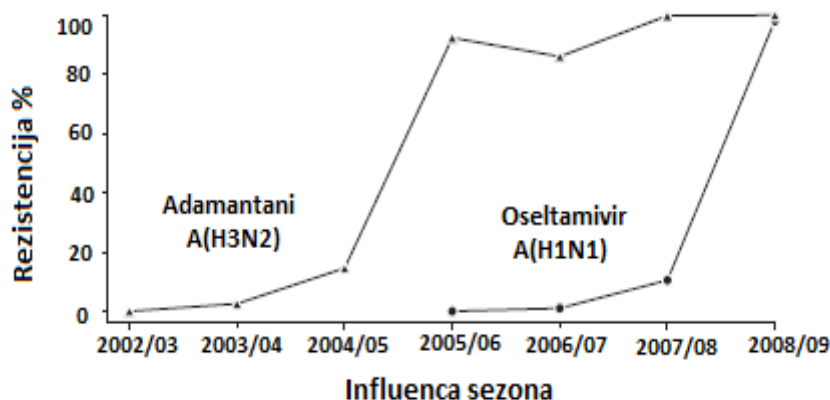
Rezistencija na antivirusne lekove

Adamantani su se uspešno koristili u lečenju influence još od 1966. godine [133]. Međutim, u periodu od 2002. do 2007. godine efikasnost ovih lekova opala je za dva reda veličine [50]. Rezistencija je nastala naglo i vrlo brzo se proširila među H1N1 i H3N2 podtipovima koji su tada cirkulisali (SI. 14). Tako je u sezoni 2003/2004 iznosila nešto više od 10%, da bi već 2005/2006 preko 90% analiziranih izolata bilo rezistentno na ovu grupu lekova [46, 84]. Danas su svi trenutno aktivni humani influenza virusi rezistentni na amantadin i rimantadin, te se ovi lekovi više ne preporučuju u terapiji i profilaksi influence. Rezistencija na adamantane je dobro opisana i poznato je da je uzrokovana mutacijom rezidua na položajima 26, 27, 30, 34, a najčešće 31 u transmembranskom delu M2 [2, 50]. Prema podacima SZO iz 2013. godine, preko 99% A(H3N2) i A(H1N1)pdm09 virusa sadrži M2 S31N mutaciju, koja označava zamenu serina asparaginom na poziciji 31 M2 molekula [134]. Pri tome, influenza A(H1N1)pdm09 virus je nastao kao rezultat višestrukih genskih rearanžmana tokom kojih je M gen stekao od evroazijskog soja svinjskog virusa koji je na amantadin rezistentan još od 1980-tih. Učestalost rezistencije na M2 inhibitore kod različitih filogenetskih klada A(H5N1) virusa varira od 0% pa do 100% [135].

U vreme nastanka rezistencije na adamantane, smatralo se da je takav scenario malo verovatan sa NAI. Ovi lekovi su osmišljeni tako da strukturno vrlo liče na molekul sijalinske

kiseline, te je vladalo mišljenje da bi svaka mutacija koja bi smanjila afinitet NA prema NAI, neminovno dovela i do gubitka vijabilnosti virusa. Rezultati do tada sprovedenih istraživanja, išli su u prilog takvim shvatanjima. Primena NAI u kliničkoj praksi, otpočela je 1999. godine, pri čemu kod izolata ispitanih pre toga, nije bilo primećeno postojanje prirodne rezistencije. Istraživanja sprovedena nakon početka primene ovih antivirusa, ukazivala su na to da je generisanje sojeva rezistentnih na NAI, u *in vitro* uslovima vrlo teško. Za razliku od rezistencije na adamantane koja nastaje vrlo brzo *in vitro*, kao i *in vivo* nakon njihove terapijske primene, pokušaji dobijanja virusa rezistentnih na NAI, u laboratorijskim uslovima, zahtevali su višestruke serijske pasaže u prisustvu leka pri čemu je rezistentne viruse odlikovala redukovana stabilnost proteina i/ili enzimska aktivnost [2]. Nakon terapijske primene oseltamivira, rezistencija je uočena kod otprilike 4% odraslih i oko 18% dece, dok je rezistencija na zanamivir primećena samo kod imunokompromitovanih pacijenata. U populaciji koja nije bila pod terapijom, rezistencija na NAI, bila je detektovana u manje od 1% slučajeva. Međutim, u sezoni 2007/2008 dolazi do dramatične promene, odnosno pojave i globalne cirkulacije A(H1N1) virusa rezistentnog na oseltamivir, ali sa očuvanom osetljivošću na zanamivir (Sl. 14). Nova osobina je bila posledica spontane mutacije koja je dovela do zamene histidina tirozinom na poziciji 275 NA (H275Y), pri čemu nije uticala na virulenciju i transmisibilnost virusa. Tako se rezistencija na oseltamivir za samo tri sezone povećala, sa 0,7% koliko je iznosila 2006/2007, preko 10,9% naredne sezone, do više od 99% tokom 2008/2009 [136].

Naredne godine, došlo je do pojave senzitivnog (H1N1)pdm09, koji je potpuno potisnuo sezonski, rezistentni A(H1N1). Za sada, mutacija H275Y je samo sporadično detektovana kod pandemijskog virusa. Prema podacima SZO, iz novembra 2013. godine, proporcija visoko rezistentnih (H1N1)pdm09 virusa kreće se od 0% u regionu Jugoistočne Azije, pa do 2,4% koliko iznosi u Japanu [134]. Kod H3N2 virusa, manje od 1% pokazuje izrazito smanjenu osetljivost na NAI.



Slika 14: Učestalost rezistencije na adamantane kod A(H3N2) izolata i na oseltamivir kod A(H1N1) [46]

Imajući u vidu ove iznenadne i nepredvidive promene osetljivosti na antivirusne, kao i vrlo ograničen broj lekova koji mogu biti upotrebljeni u borbi protiv influenza, praćenje nivoa rezistencije influenza virusa postalo je izuzetno važno. SZO je 2011. godine oformila Ekspertsku radnu grupu za nadzor nad antivirusnom osetljivošću influenza virusa. Ona predstavlja podršku GISRS, sa osnovnim ciljevima: praćenje i ocena metodologija koje se primenjuju u ispitivanju osetljivosti influenza virusa na antivirusne, davanje praktičnih saveta vezanih za strategiju nadzora u okviru GISRS, kao i uputstava za interpretaciju rezultata laboratorijskih testiranja rezistencije.

Rezistencija na NAI je specifična prema leku, kao i tipu i podtipu virusa. Danas je poznato više mutacija neuraminidaze koje dovode do rezistencije ili smanjene osetljivosti na oseltamivir (Tab. 3). Ipak, sam mehanizam rezistencije još nije u potpunosti razjašnjen i moguće je da toj osobini doprinose još neke, za sada, nepoznate, mutacije. Takođe, konformacija aktivnog mesta NA varira među različitim podtipovima, što se odražava na način vezivanja leka, kao i na potencijal za nastanak rezistencije [2, 46]. Vezivanje NA za oseltamivir podrazumeva konformacione promene bočnog lanca rezidue glutaminske kiseline na poziciji 276. Substitucija histidina znatno glomaznijom molekulom tirozina, na poziciji 275, dovodi do pomeranja karboksi grupe na položaju 276 u unutrašnjost vezujućeg mesta. Virusi koji pripadaju prvoj grupi NA (N1, N4, N5, N8), poseduju još jedan tirozin na poziciji 252. Kombinacija dva tirozina, na položajima 252 i 275, narušava konformaciju udubljenja za koje se vezuje oseltamivir i onemogućava njegovo vezivanje. Nasuprot tome, virusi druge NA grupe (N2, N3, N6, N7, N9), na poziciji 252 imaju znatno manji molekul treonina, te i u prisustvu mutacije H274Y (koja odgovara mutaciji H275Y kod N1 podtipova), i dalje imaju očuvanu strukturu udubljenja za koje može da se veže oseltamivir. Usled ovih razlika u strukturi, A(H1N1) podtip pokazuje veću sklonost ka razvoju rezistencije na oseltamivir u odnosu na A(H3N2) viruse [46].

Rezultati istraživanja ukazuju da se rezistencija sporije javlja kod primene NAI koji su strukturno sličniji prirodnom ligandu NA, odnosno sijalinskoj kiselini [132]. Zanamivir i laninamivir spadaju u tu grupu NAI. Vezivanje zanamivira za NA ne zahteva konformacione promene, te on zadržava inhibitornu aktivnost i na oseltamivir rezistentne sojeve sa mutacijom na 275 poziciji [46]. Rezistencija na zanamivir se registruje vrlo retko i to nakon terapijske primene kod imunokompromitovanih pacijenata.

Rezistencija na lekove se uglavnom javlja kao posledica selektivnog pritiska leka tokom njegove primene. Međutim, smatra se da je rezistencija na oseltamivir kod sezonskog A(H1N1) virusa, 2007 godine, nastala kao koincidencija adaptivne mutacije virusa koja se održala i u odsustvu selektivnog pritiska. Drugim rečima, mutacija H275Y, pružila je selektivnu prednost tadašnjem A(H1N1) virusu, nezavisno od efekta na osetljivost na oseltamivir. Naime, za efikasno umnožavanje influenza virusa od značaja je da aktivnost HA i NA budu

uravnotežene. Smatra se da je H275Y mutacija uslovlila smanjenje afiniteta NA prema supstratu, što je povratilo ranijim mutacijama poremećen balans u funkcionisanju HA i NA i povećalo adaptivnu vrednost mutanata [46]. Sve ovo pokazuje koliko lako virus influence može da stekne otpornost na antivirusne lekove, kao i to koliko je važno kontinuirano praćenje rezistencije i razvijanje novih lekova.

Tabela 3: Aminokiselinske substitucije u okviru molekula neuraminidaze povezane sa rezistencijom ili redukovanom osetljivošću na NAI (Adaptirano na osnovu: WHO, [134])

Substitucija	Redukovana osetljivost na inhibitor*		
	Oseltamivir	Zanamivir	Peramivir
Substitucije za koje se zna da izazivaju rezistenciju			
		<u>N1 NA</u>	
H275Y	221-2597	1-3	66-1095
Substitucije koje izazivaju redukovanu osetljivost in vitro, ali je klinički značaj nepoznat			
		<u>N1 NA</u>	
D199N	3	2	Nepoznato
I223R	28-45	10-12	Nepoznato
N295S	12-208	3-5	12
		<u>N2 NA</u>	
E119V	10-2057	1-3	1-3
R292K	> 10 000	3-20	14
N294S	300-1879	8	1

* Koliko puta je IC₅₀ veća u odnosu na divlji, senzitivni soj

Za ispitivanje rezistencije na NAI koriste se testovi koji rezistenciju detektuju na genotipskom ili fenotipskom nivou. Zbog postojanja više različitih mutacija koje uslovljavaju rezistenciju na NAI, molekularno-biološke metode otkrivanja rezistentnih mutanata na nivou genotipa, nisu pogodne za primenu u sklopu kontinuiranog skrininga rezistencije. Prema preporuci Grupe za antivirusne lekove, Međunarodnog udruženja za influencu i druge respiratorne viruse (ISIRV-AVG - International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases Antiviral Group), metod izbora za analizu rezistencije na NAI je fenotipsko testiranje, praćeno sekvenciranjem NA gena izolata sa redukovanom osetljivošću na NAI (<https://www.isirv.org/site/index.php/>). Za fenotipsko određivanje osetljivosti na NAI koriste se testovi enzimske inhibicije. Danas je u upotrebi više "in house" protokola i nekoliko komercijalnih testova zasnovanih na detekciji fluorescencije ili hemiluminiscencije koje se javljaju tokom enzimske reakcije i čiji je intenzitet proporcionalan nivou enzimske aktivnosti NA. Kao supstrat NA u fluorescentnim testovima, koristi se 20-(4-metilumbeliferil)-a-D-N-acetilneuraminska kiselina, a u testovima zasnovanim na hemiluminiscenciji 20-(4-NA-Star)-a-D-N-acetilneuraminska kiselina.

Enzimskim testovima se meri IC₅₀ vrednost, koja predstavlja koncentraciju NAI

potrebnu za inhibiciju 50% standardnog iznosa NA aktivnosti [134]. Standardna IC₅₀ vrednost je određena za svaki antivirus, podtip virusa i tip testa. Prema AVWG, ukoliko je IC₅₀ ispitivanog izolata <10 puta povećana u odnosu na IC₅₀ divljeg, osetljivog ili referentnog soja, u pitanju je izolat normalne osetljivosti, odnosno normalne inhibicije. Redukovanu inhibiciju pokazuju virusi za koje je IC₅₀ 10-100 puta veća od normalne vrednosti, a izrazito redukovanu inhibiciju oni kod kojih je IC₅₀ >100 puta [134]. S tim u vezi, iako ne postoji opšte prihvaćena definicija rezistencije, prema ISIRV, rezistencija se može definisati kao vrednost IC₅₀ koja je barem 10 puta veća od srednje vrednosti IC₅₀ sličnog virusa u datoj sezoni (www.isirv.org/site/index.php/).

U genotipske metode određivanja rezistencije na NAi spadaju sekvenciranje, pirosekvenciranje i diskriminacija alela metodom reverzne transkriptaze i lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (rRT-PCR - Real-time reverse transcription polymerase chain reaction). Ove metode su jednostavne, brze, osetljive i mogu se primeniti direktno na kliničkim uzorcima, ali je njihova interpretacija bez informacije o fenotipu, teška. Naime, odsustvo odgovarajuće mutacije za koju se zna da uslovljava rezistenciju, ne mora nužno značiti osetljivost na određeni lek. Pored toga, iako sekvenciranje omogućuje otkrivanje novih, nepoznatih markera rezistencije interpretacija značaja novootkrivene mutacije može biti izvedena samo uz poznavanje njene fenotipske manifestacije. Usled toga se testovi inhibicije enzimske aktivnosti NA, koriste za fenotipsko potvrđivanje rezistencije detektovane na genotipskom nivou i validaciju novih genskih markera rezistencije [136]. Potrebno je naglasiti da je za izvođenje pirosekvencioniranja i rRT-PCR, neophodna konstrukcija odgovarajućih prajmera, odnosno neophodno je prethodno znanje o mogućoj lokalizaciji mutacije.

Osetljivost fenotipskih testova je manja u odnosu na molekularne testove. Za značajan porast IC₅₀ potrebno je da u ispitivanom uzorku postoji barem 25% rezistentnih mutanata, dok se pirosekvenciranjem mogu detektovati mutanti zastupljeni u svega 5-10%, a rRT-PCR i u manje od 1%, mešovite populacije virusa [136]. Ipak, za sada, nije jasan klinički značaj različitih proporcija senzitivnih i rezistentnih virusnih populacija u odgovarajućem pacijentu

Molekularne metode, poput sekvenciranja i pirosekvenciranja M gena radi detekcije dobro definisanih genskih markera rezistencije, smatraju se metodama izbora za ispitivanje osetljivosti na adamantane. Međutim, zbog visokog procenta rezistencije na adamantane i obustave njihove primene, rutinski nadzor nad rezistencijom nad ovom grupom lekova se ne smatra prioritetom u radu NIC [135].

Tendencije u razvoju novih lekova

Nagla pojava rezistencije na oseltamivir i njeno brzo širenje kod sezonskog H1N1 virusa, kao i povremena detekcija sojeva (H1N1)pdm09 i H3N2 virusa rezistentnih na oseltamivir, ukazuju na urgentnu potrebu razvoja novih antivirusa [105]. Trenutno se

sprovode brojna istraživanja u cilju pronalaženja novih inhibitora NA i M2, ali se takođe ispituje i mogućnost kontrole replikacije influenza virusa delovanjem na druge ciljne molekule, poput HA, NS1, NP i komponenti polimeraza kompleksa. Krug i Aramini [128] daju primere nekih potencijalnih meta budućih anti-influenca lekova. Tako se ispituje mogućnost upotrebe udubljenja pored receptor-vezujućeg mesta na molekulu HA kod H1 i H5 podtipova, kao i hidrofobnog džepa koji se nalazi između monomera HA kod H3N2 podtipa. Takođe, istražuje se i upotreba određenih hemijskih supstanci koje inhibiraju virusnu replikaciju interagujući sa sekvencom odgovornom za oligomerizaciju i vezivanje za RNK na molekulu NP, zatim sa mestom odgovornim za vezivanje za dsRNK i ćelijski faktor poliadenilacije na molekulu NS1, kao i sa visoko konzerviranim sekvencama preko kojih se ostvaruje veza između PA i PB1, neophodna za formiranje funkcionalnih polimeraza kompleksa. Kao mete dejstva antivirusnih lekova, biraju se visokokonzervirane sekvence za koje se pretpostavlja da je razvoj rezistentnih mutanata manje verovatno, s obzirom na to da su mutacije u tim regionima povezane sa gubitkom vijabilnosti virusa.

Ispituje se i mogućnost terapijske i profilaktične primene neutrališućih antitela širokog specifičeta [56]. Ova antitela se vezuju za fuzioni peptid HA molekula i na taj način preveniraju njegovu osnovnu funkciju – fuziju virusne ovojnice i membrane endozoma, čime se infekcija ćelije domaćina zaustavlja na samom početku. Clementi i sar. [39] napominju da je tek nekoliko istraživačkih timova prijavilo detekciju antitela bezbednih za ljudsku primenu i sa snažnom heteropodtipskom neutralizujućom aktivnošću, koja omogućuje administraciju u malim dozama. Oni navode da su, za sada, u literaturi opisana samo dva humana antitela, označena kao F16v3 i PN-SIA28, koja su u stanju da izvrše neutralizaciju virusnih izolata obe filogenetske grupe HA.

Primena filogenetskih metoda u izučavanju influenza A virusa

Primena molekularno-bioloških metoda, koje omogućuju analizu nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci virusa, u velikoj meri menja i unapređuje saznanja o različitim svojstvima virusa, kao i procesima vezanim za njihov ciklus umnožavanja. Na primer, poređenje nukleotidnih sekvenci izolata sa različitim svojstvima, poput virulencije, tropizma i transmisibilnosti, omogućuje detekciju nukleotidnih sekvenci koji kontrolišu ekspresiju ovih osobina virusa, odnosno determinišu pojavu različitih fenotipova. Podaci o nukleotidnim sekvencama virusa imaju i praktičnu primenu i koriste se, na primer, u klasifikaciji novih i reklasifikaciji poznatih virusnih genotipova, u identifikaciji mutacija koje dovode do rezistencije na antivirusne lekove u cilju odabira optimalne antivirusne terapije, u detekciji antigenskog drifta usled kojeg je potrebno prilagoditi sastav vakcine, kao i u rekonstrukciji genealogije sojeva

iste vrste u cilju epidemiološkog povezivanja slučajeva infekcije tokom epidemije [137].

Pored toga, mogućnost detaljne analize i komparacije nukleotidnih sekvenci genoma različitih virusa, pruža uvid u poreklo, evolucione procese i filogenetske odnose među njima. Filogenija virusa se bavi utvrđivanjem evolucionih odnosa između virusa koji pripadaju istoj ili različitim vrstama. Polazi se od pretpostavke da blisko srodni virusi imaju slične nukleotidne sekvence, a da se tokom vremena kao posledica odgovarajućih genetičkih mehanizama akumuliraju promene, što za posledicu ima veće razlike u sekvenci evolutivno udaljenijih virusa.

Za rekonstrukciju evolucionih odnosa na osnovu podataka o sekvencama virusa i njihovo grafičko prikazivanje u vidu filogenetskih stabala, koriste se kompjuterski programi koji u tom procesu primenjuju različite metode. Da bi čitav postupak imao smisla, neophodno je porediti homologe genske sekvence, odnosno one koje imaju zajedničko poreklo. Ukoliko filogenetsko stablo ima koren, ono daje informaciju o predačko-potomačkim odnosima među ispitivanim sekvencama. Koren se određuje upotrebom sekvence virusa koji nije blisko srodan posmatranim virusima (outgroup) ili se uzima najstarija od posmatranih sekvenci. Ovaj drugi model ima smisla ukoliko je način evoluiranja takav da postoji kontinuirano formiranje novih, mlađih genoma od starijih koji bivaju zamenjeni, kao što je slučaj sa influenza virusima. Ukoliko ne postoji koren, na osnovu filogenetskog stabla ne može se doneti zaključak o evolucionom smeru. Na filogenetskom stablu razlikuju se još i nodusi, "grane" i "lišće". "Lišće", odnosno slobodni krajevi "grana" predstavljaju viruse čije su sekvence analizirane. Nodusi označavaju najbliže zajedničke pretke svim "granama", odnosno "listovima" koji od njih polaze. Horizontalne razdaljine od nodusa do kraja "grane" su određene brojem substitucija po mestu i mogu se konvertovati u vremensku skalu ukoliko je poznata stopa substitucija (broj substitucija po mestu u jedinici vremena) i ukoliko je relativno konstantna za sve sekvence. Drugim rečima, uz prihvatanje koncepta "molekularnog časovnika" prema kojem je stopa nukleotidnih substitucija konstantna tokom vremena, filogenetska stabla pružaju sliku o evoluciji posmatranih virusa tokom vremena uz mogućnost procene vremena divergencije dva virusa od zajedničkog pretka. S obzirom na to da se koncept "molekularnog časovnika" ne može smatrati biološki realnim, razvijene su metode datiranja koje uzimaju u obzir varijacije u substitucionim stopama među različitim linijama jednog filogenetskog stabla. Ukoliko su poznati još neki podaci o virusima čije sekvence se analiziraju, poput geografskog porekla, vremena uzorkovanja, domaćina, virulencije, načina transmisije, filogenetska stabla omogućuju procenu genetičke varijabilnosti u odnosu na te parametre.

Primena molekularnih filogenetskih metoda omogućila je: razumevanje porekla različitih humanih i animalnih podtipova influence A, otkriće čestih genskih rearanžmana naročito kod avijarnih i svinjskih podtipova, utvrđivanje visokih stopa nukleotidnih i aminokiselinskih substitucija kod humanih i pojedinih animalnih podtipova, praćenje korelacije

između evolucije na nivou genoma i antigenskih promena, kao i ispitivanje geografske i vremenske rasprostranjenosti određenih podtipova i sojeva influenza A virusa [137]. Evolucionu dinamiku influenza virusa oblikuju složene interakcije između čestih mutacija i rearanžmana, prirodne selekcije (povremenih genetičkih “uskih grla”), funkcionalnih interakcija među segmentima i globalne epidemiološke dinamike [113]. Postojanje 8 segmenata genoma uzrok je komplikovanih filogenetskih obrazaca influenza A virusa. Svaki od 8 segmenata ima svoju istoriju mutacija i rearanžmana. Površinski glikoprotein HA predstavlja glavnu metu imunološkog sistema domaćina, odnosno glavnog faktora selekcije, usled čega je gen koji ga kodira varijabilniji u odnosu na druge virusne gene. Zato se HA gen najčešće koristi kao marker u ispitivanju molekularne evolucije i epidemiologije influenza virusa [114].

Kolaborativni centar SZO za referentnost i istraživanje influence u Londonu (KCRIL), na osnovu detaljnih ispitivanja influenza virusnih izolata sakupljenih iz svih krajeva sveta, daje podelu humanih A(H1N1) i A(H3N2) virusa, na veći broj filogenetskih genogrupa, prema sekvenci HA gena (<http://www.nimr.mrc.ac.uk/who-influenza-centre/annual-and-interim-reports/>). Tako su humani influenza A(H1N1)pdm09 virusi, svrstani u 8 genogrupa, pri čemu prvu grupu čini A/California/7/2009. Predstavnici ostalih 7 genogrupa nose S203T nukleotidnu substituciju, kao i za svaku grupu specifične genetičke markere:

Genogrupa 2: N31D, S162N (uslovljava dodatno mesto glikolizacije) i A186T, na pr. A/Czech Republic/32/2011;

Genogrupa 3: A134T i S183P, često sa dodatnim substitucijama, na pr. A/Hong Kong/3934/2011;

Genogrupa 4: N125D, na pr. A/Christchurch/16/2010;

Genogrupa 5: D97N, R205K, I216V i V249L, na pr. A/Astrakhan/1/2011, ponekad sa dodatnim substitucijama;

Genogrupa 6: D97N i S185T, na pr. A/St Petersburg/27/2011, ponekad sa dodatnim substitucijama;

Genogrupa 7: S185T i A197T, često sa S143G, na pr. A/St Petersburg/100/2011, ponekad sa dodatnim substitucijama;

Genogrupa 8: A186T i V272A, na pr. A/Norway/2552/2012.

Prisustvo odgovarajućih nukleotidnih substitucija uslovljava grupisanje HA gena humanih influenza A(H3N2) virusa u 7 genetičkih grupa. U okviru Perth/16 genetičke klade razlikuju se:

Genogrupa 1: P162S, I260M, R261Q, na pr. A/Victoria/210/2009;

Genogrupa 2: N133D (uslovljava gubitak mesta glikolizacije), R142G, T212A i V213A, na pr. A/Norway/1330/2010;

Pripadnici Victoria/208 genetičke klade nose K62E, K144N (uslovljava dodatno mesto glikolizacije) i T212A nukleotidne substitucije, kao i substitucije tipične za pojedinačne genetičke grupe:

Genogrupa 3(A): N144D (uslovljava gubitak mesta glikolizacije), N145S, V223I i D487N, na pr. A/Stockholm/18/2011;

Genogrupa 3(B): N145S, A198S, V223I, N312S i D487N, na pr. A/England/259/2011;

Genogrupa 3(C): S45N (uslovljava novo mesto glikolizacije), T48I, A198S, V223I i N312S, na pr. A/Hong Kong/3969/2011, uz mogućnost dodatnih substitucija D53N ili N278K, nekad u kombinaciji sa Q33R ili L3I ili I522T;

Genogrupa 4: N312S, na pr. A/Serbia/71/2011;

Genogrupa 5: D53N, Y94H, I230V i E280A, na pr. A/Perth/10/2011;

Genogrupa 6: D53N, Y94H, S199A, I230V i E280A, na pr. e.g. A/Iowa/19/2010;

Genogrupa 7: S45N (uslovljava novo mesto glikolizacije), na pr. A/Alabama/04/2011.

Dijagnostika influenza virusnih infekcija

Pored influenza A i B virusa, oboljenja slična gripu mogu da izazovu i parainfluenca virusi, respiratorni sincicijalni virus, adenovirusi, bokavirusi, metapneumovirusi, kao i neki bakterijski uzročnici, poput mikoplazme pneumonije i hlamidije pneumonije [89]. Usled toga, dijagnoza influence ne može biti postavljena samo na osnovu kliničkih simptoma, nego je potrebna primena specifičnih dijagnostičkih testova. Dijagnostika influenza A virusnih infekcija može biti izvršena na direktan način, izolacijom virusa iz bolesničkog uzorka na ćelijskoj kulturi ili embrionisanim kokošijim jajima, kao i dokazivanjem antigena ili nukleinskih kiselina virusa u pogodnom uzorku. Pored toga, o etiološkom uzročniku gripa, zaključak se može doneti i indirektnim putem, primenom seroloških testova kojim se dokazuje prisustvo specifičnih anti-influenca virusnih antitela u serumu inficiranog. Virusološka dijagnostika u slučaju sumnje na influencu, ima smisla ukoliko će dobiti rezultat uticati na dalji tretman pacijenta, na primer ukoliko će od njega zavisiti odluka o primeni antivirusika i antibiotika, kao i odluka o daljem dijagnostičkom testiranju [89]. Pored toga, ona se sprovodi i u okviru epidemioloških istraživanja, radi sticanja saznanja o prisustvu i aktivnosti influenza virusa u određenoj populaciji, radi povezivanja određenih tipova i podtipova sa odgovarajućim kliničkim manifestacijama bolesti, kao i radi planiranja adekvatnih preventivnih i terapijskih mera i aktivnosti.

Odabir odgovarajućeg uzorka, kao i blagovremeno uzorkovanje, čuvanje i transport, od ključnog su značaja za pouzdanost rezultata virusološkog testiranja. Replikacija influenza A virusa dostiže pik 48 sati nakon početka infekcije, nakon čega polako opada do otprilike 5-10.

dana, a zatim prestaje širenje virusa respiratornim sekretima inficiranih osoba [84, 87]. U skladu sa tim, za dokazivanje virusa ili njegovih komponenti, neophodno je izvršiti uzorkovanje što ranije nakon pojave simptoma bolesti, idealno u prvih 3 dana [116]. Kod dece i imunokompromitovanih pacijenata, kod kojih se virus širi duže, uzorkovanje može biti izvršeno i nakon ovog perioda. Za dokazivanje virusa influenza, najčešće se koristi bris grla i nosa ili nazofaringealni bris [89]. Kod hospitalizovanih pacijenata kod kojih su zahvaćeni donji respiratorni organi, mogu se uzeti endotrahealni aspirat ili ispirak, kao i bronhoalveolarni lavat. U cilju retrospektivne serološke dijagnostike, analiziraju se parni serumi, prvi uzet u prvih 7 dana akutne faze bolesti, a drugi nakon 2-4 nedelje [116].

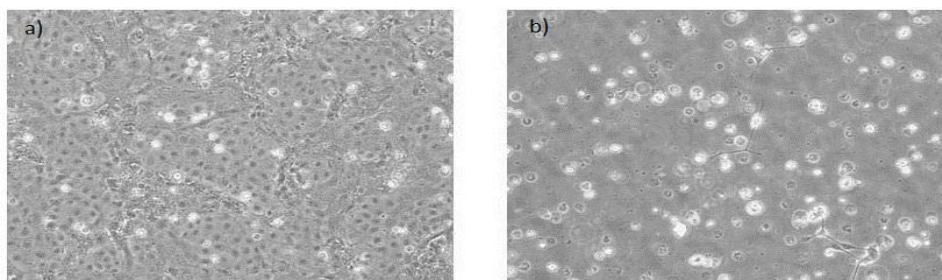
Izolacija influenza A virusa

Tradicionalni „zlatni standard“ virusološke dijagnostike jeste izolacija virusa iz pogodnog respiratornog uzorka i naknadna identifikacija izolata odgovarajućim testom [116]. Za izolaciju influenza A virusa koriste se embrionisana kokošija jaja i odgovarajuće ćelijske kulture.

Influenca virusi se uspešno umnožavaju u primarnim kulturama ćelija bubrega majmuna, kao i u kontinuiranim ćelijskim linijama, od kojih je najčešće u upotrebi MDCK ćelijska kultura (Sl. 15). Inokulisane ćelijske kulture inkubiraju se u hranljivoj podlozi sa malim sadržajem seruma koji može sadržati nespecifične inhibitore virusa, a u prisustvu tripsina koji aktivira HA [45]. Nakon većeg broja pasaža MDCK ćelije gube osetljivost na influenza viruse, te se za izolaciju ne koriste kulture pasažirane više od 25 puta [116]. Standardna procedura izolacije, zahteva 4-5 dana za dobijanje konačnog rezultata, a ukoliko su potrebne pasaže, proces se dodatno produžava. Kako citopatogeni efekat (CPE) koji virus izaziva umnožavajući se u ćelijama, nije specifičan, definitivno prisustvo influenza virusa mora biti potvrđeno nekim od testova pogodnim za identifikaciju influenza virusa, uključujući reakciju inhibicije hemaglutinacije (RIH), imunofluorescenciju, neutralizacioni test ili molekularno-biološke testove. U cilju brže dijagnostike, moguće je za izolaciju virusa na ćelijskim kulturama primeniti shell-vial metodu. To je metoda brze izolacije virusa na kulturi ćelija, koja se postiže centrifugiranjem inokulisane kulture ćelija na malom broju obrtaja. Taj postupak menja ćelijsku membranu tako što povećava osetljivost ćelija na odgovarajući virus, te je, nakon njega, potrebna znatno kraća inkubacija. U kombinaciji sa imunofluorescencijom, ova metoda pruža mogućnost otkrivanja virusnih proteina (antigena) pre pojave vidljivog citopatogenog efekta, što vreme potrebno za dobijanje konačnog rezultata skraćuje na 1-2 dana [136].

Umnožavanjem humanih influenza A virusa u kulturama ćelija sisara, poput MDCK kulture čije ćelije poseduju oba tipa sijalinskih receptora, i $\alpha 2,3$ i $\alpha 2,6$, virus ostaje strukturno i antigenski nepromenjen, prilagođen humanom $\alpha 2,6$ tipu receptora [138]. U poslednje vreme,

upotreba ćelijskih kultura u izolaciji influenza virusa, potisnula je korišćenje embrionisanih kokošijih jaja. Međutim, samo virusi gajeni u jajima mogu biti korišćeni kao semena u proizvodnji vakcina [116]. Iako su embrionisana kokošija jaja lako dostupna i jeftina, izolacija humanih influenza A virusa na njima, zahteva adaptaciju virusa na avijarni tip receptora. Usled toga, prvo se vrši inokulacija u u amnionsku duplju embrionisanog kokošijeg jajeta, čije ćelije poseduju sialiloligosaharide α 2,3 i α 2,6 tipa. Virus inficira ćelije amnionske membrane i umnožava se u njima. U toku tog procesa, dolazi do selekcije mutanata sa aminokiselinskim substitucijama u blizini receptor-vezujućih mesta molekula hemaglutinina, koje virus čine sposobnim za vezivanje za avijarni α 2,3 tip receptora. Novoformirani virioni se oslobađaju u amnionsku tečnost gde se mogu dokazati nakon 2-3 dana inkubacije. Nakon toga, moguće je vršiti dalje umnožavanje dobijenog virusa inokulacijom u alantois, pošto ćelije alantoisa poseduju samo α 2,3 tip receptora. Na taj način, umnožavanjem na jajima, humani influenza A virusi zadržavaju specifičnost prema α 2,6 tipu sialinskih receptora u toku pasaže kroz amnion, dok nakon pasaže kroz alantois menjaju receptor specifičnost u pravcu α 2,3 tipa [139].



Slika 15: MDCK kultura ćelija. a) Neinokulisane ćelije; b) Ćelije inokulisane influenza A(H1N1) virusom (American Type Culture Collection, <http://www.atcc.org/products/all/VR-1520.aspx#characteristics>)

Iako se, zbog dužine trajanja i manje osetljivosti u odnosu na metode molekularne detekcije virusa, izolacija virusa ne koristi u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici influence, ona i dalje ostaje nezamenjiva za antigensku karakterizaciju virusa, u ispitivanju osetljivosti na antivirusne, kao i u proizvodnji vakcine [136].

Dokazivanje antigena influenza A virusa

Postoji više metoda za identifikaciju influenza virusnih antigena direktno u respiratornim uzorcima ili nakon izolacije u pogodnom živom sistemu. One su zasnovane na specifičnoj reakciji poznatih, dijagnostičkih antitela i virusnih antigena prisutnih u ispitivanom uzorku, pri čemu se formirani kompleks detektuje na različite načine.

Tradicionalna metoda identifikacije tipa i podtipa dobijenih izolata influenza virusa je RIH. Reakciju inhibicije hemaglutinacije osmislio je Hirst 1942. godine, a dve godine kasnije modifikovao ju je Salk [116]. Ova metoda je zasnovana na osobini HA da vezuje crvena krvna zrnca kokoški, ćuraka, zamoraca i ljudi, dovodeći do njihove aglutinacije. Proces

hemaglutinacije može biti inhibiran pomoću referentnih seruma dobijenih pomoću homologog podtipa. Antitela iz tih dijagnostičkih seruma, specifično se vezuju za antigena mesta HA i blokiraju ih. Tako se tip, podtip i varijanta influenza virusa određuju na osnovu dijagnostičkog antiseruma koji je u stanju da inhibira RH. RIH je vrlo specifična, mada komplikovana za izvođenje. Prilikom svakog testiranja potrebno je ukloniti nespecifične inhibitore hemaglutinina prirodno prisutne u serumima i standardizovati referentne (kontrolne) antigene.

Metoda imunofluorescencije je zasnovana na upotrebi fluorohromima obeleženih, specifičnih anti-influenca antitela (direktna imunofluorescencija) ili specifičnih anti-influenca antitela i sekundarno obeleženih anti-humanih antitela (indirektna imunofluorescencija). Ova antitela se specifično vezuju za odgovarajuće antigene virusa prisutnih u preparatu pripremljenom od inficiranih ćelija respiratornog epitela ili ćelija inokulisane kulture. Dokaz formiranih kompleksa je fluorescencija vidljiva pod dejstvom ultravioletnih zraka. Iako je vreme potrebno za dobijanje konačnog rezultata kratko, osetljivost i specifičnost ove metode su manji u odnosu na izolaciju na ćelijskoj kulturi [89]. Očitavanje rezultata testa u velikoj meri zavisi od kvaliteta uzorka, koji mora da sadrži dovoljan broj inficiranih ćelija.

Kao skrining testovi upotrebljavaju se i brzi influenza dijagnostički testovi. To su imunoeseji koji omogućuju kvalitativnu detekciju NP ili M antigena influenza virusa, direktno u respiratornim uzorcima. Jednostavni su za izvođenje, ne zahtevaju upotrebu posebne opreme niti posebnu obučenosť. Specifični su i omogućuju detekciju virusa za vrlo kratko vreme od 10-30 minuta. Neki brzi testovi su osmišljeni tako da identifikuju virus influence bez mogućnosti određivanja tipa, dok drugi dozvoljavaju i tipizaciju. Izuzetno mali broj je u stanju da izvrši i subtizaciju influenza A virusa [136]. Mana ovih testova je njihova ograničena osetljivost usled čega negativan rezultat brzog testa ne isključuje infekciju influenza virusom, kod pacijenata sa kliničkom slikom tipičnom za influencu. U poređenju sa metodama molekularne detekcije virusa i izolacijom virusa na ćelijskim kulturama, osetljivost brzih testova kod dece je 70-90%, a kod odraslih <40-60% [89]. I pored ovih mana, zbog niske cene, jednostavnosti i brzine dobijanja rezultata, oni su u odgovarajućim situacijama vrlo korisni. U toku epidemije, kod pacijenata sa kliničkim znacima gripa, pozitivan rezultat brzog testa omogućuje postavljanje dijagnoze u roku kraćem od pola sata. Na taj način se, u toj grupi pacijenata eliminiše potreba za preduzimanjem daljih, uglavnom značajno skupljih, analiza. Interesantno je da je i prvi slučaj pandemijskog gripa 2009. godine u SAD, otkriven upravo brzim testom i da se sa primenom tih testova nastavilo sve dok nisu postali dostupni znatno osetljiviji molekularni testovi za detekciju novog virusa [136].

Dokazivanje nukleinskih kiselina influenza A virusa

Lančana reakcija polimeraze (PCR - polymerase chain reaction) omogućuje umnožavanje željene DNK sekvence, prisutne u maloj količini u uzorku i dobijanje velikog

broja kopija, u cilju njihove dalje genetske karakterizacije i ispitivanja. U ovom procesu enzim DNK-zavisna DNK polimeraza, katalizuje sintezu oligonukleotidnih lanaca komplementarnih ciljnoj DNK sekvenci (cDNK). Pored DNK polimeraze i DNK matrice, ključne komponente reakcije su i 4 tipa dezoksiribonukleozid trifosfata, kao i oligonukleotidni prajmeri koji definišu sekvencu koja će biti amplifikovana. PCR se obično sastoji od 35-45 ciklusa, pri čemu se u toku svakog ciklusa, u odgovarajućim temperaturnim uslovima, vrši denaturacija DNK, specifično vezivanje prajmera za željeni deo sekvence i polimerizacija nukleotida. Denaturacija DNK se vrši na temperaturi od 95°C, te se u PCR koristi termostabilna DNK polimeraza dobijena iz termofilnih bakterija, označena kao Taq polimeraza. U toku PCR reakcije, sekvence sintetisane u ranijim ciklusima predstavljaju matrice za sintezu novih sekvenci u narednim ciklusima. Na taj način, nakon svakog ciklusa broj amplifikovanih sekvenci eksponencionalno se uvećava. Kako je PCR katalisan DNK-zavisnom DNK polimerazom, kod RNK virusa amplifikaciji mora prethoditi reverzna transkripcija (RT-PCR), u toku koje se stvara cDNK, koja će predstavljati matricu za dalju amplifikaciju. RT-PCR predstavlja trenutno najspecifičniju i najosetljiviju metodu dokazivanja virusa influence. Vreme potrebno za dobijanje konačnog rezultata iznosi nekoliko časova, te je postavljanje laboratorijske dijagnoze moguće istog dana kada je izvršeno i uzorkovanje. Zbog tih karakteristika, ova metoda se danas smatra zlatnim standardom u dijagnostici influence [136]. RT-PCR pruža mogućnost dokazivanja tipa, podtipa, pa čak i soja influenza virusa direktno u adekvatnom respiratornom uzorku ili nakon izolacije na kulturi ćelija i jajima. Odabir prajmera specifičnih prema visoko konzerviranom delu genoma, poput M gena, omogućuje određivanje tipa influenza virusa, dok se za podtipizaciju biraju prajmeri usmereni prema varijabilnim regionima, obično prema HA genu. Izvođenje paralelne tipizacije i subtipizacije, izuzetno je značajno za otkrivanje novih influenza A virusa. Naime, situacija u kojoj je potvrđeno prisustvo influenza A virusa, ali ni sa jednim setom prajmera nije moguće odrediti podtip, ukazuje na mogućí nov podtip virusa.

U brzom dijagnostici gripa danas se sve više koristi rRT-PCR, koji predstavlja unapređenu verziju klasičnog RT-PCR. Ova metoda je izuzetno brza, osetljiva, reproducibilna i omogućuje istovremeno kvalitativno ili kvantitativno testiranje većeg broja uzoraka na prisustvo različitih influenza virusa. Za izvođenje reakcije koriste se uređaji koji istovremeno vrše i automatsko očitavanje rezultata. Danas su razvijeni testovi koji omogućuju odvijanje i reverzne transkripcije i amplifikacije u istom reakcionom bazenčiću ("One step RT-PCR"). Hemizam rRT-PCR, može biti različit, mada je uvek zasnovan na primeni fluorescentnih boja. Neki rRT-PCR testovi koriste SYBR® Green boju koja se vezuje za dsDNK i fluorescira pod svetlom određene talasne dužine. Pošto je meta SYBR® Green boje svaka dsDNK, ovi testovi imaju ograničenu specifičnost [116]. Usled toga, najveći broj testova koji se koriste u dijagnostici influence, zasnovan je upotrebi dvostruko obeleženih oligonukleotidnih proba,

poput TaqMan® proba [140]. Na jednom kraju oligonukleotidne probe nalazi se tzv. *reporter* fluorescentna boja, a na drugom kraju boja označena kao *quencher*. Sve dok su ove dve boje blisko locirane jedna drugoj, odnosno sve dok se nalaze na krajevima intaktne probe, ne dolazi do emisije fluorescencije, zahvaljujući transferu viška energije sa molekula jedne na molekule druge boje. Međutim, kada u toku polimerizacije DNK-zavisna DNK polimeraza, zahvaljujući svojoj 5' egzonukleaznoj aktivnosti, odvoji nukleotid sa molekulom *reporter* boje od ostatka probe, dolazi do emisije fluorescencije, koju beleži aparat. Real-time PCR pruža mogućnost praćenja porasta emisije fluorescencije, odnosno praćenja same amplifikacije u realnom vremenu. Naime u odgovarajućem momentu svakog ciklusa, vrši se očitavanje nivoa emitovane fluorescencije, pri čemu se ti podaci obrađuju i grafički prikazuju u vidu eksponencionalne, amplifikacione krive. Intenzitet emitovane fluorescencije proporcionalan je početnoj količini ciljne sekvence, što omogućuje kvantifikaciju. Probe se proizvode posebno za odgovarajuću ciljnu sekvencu, ograničenu parom oligonukleotidnih prajmera, što uslovljava njihovu visoku specifičnost. Kako se one ne vezuju za nespecifične delove genoma, fluorescencija će biti detektovana samo ukoliko dođe do amplifikacije ciljne sekvence.

U tehnike molekularne dijagnostike influenza spadaju i metode zasnovane na analizi nukleotidne sekvence influenza virusa. DNA microarray testovi sadrže imobilisane oligonukleotide, probe ili robotički nanete DNK, a mogu da se koriste za simultani skrining hiljade različitih nukleinskih sekvenci [140]. Sami ili u kombinaciji sa RT-PCR, ovim testovima se može vršiti tipizacija i podtipizacija influenza virusa. Pirosekvenciranje je tehnika sekvenciranja kraćih delova DNK, zasnovana na oslobađanju pirofosfata pri inkorporaciji nukleotida u rastući DNK lanac. U toku tog procesa oslobađa se svetlost čiji je intenzitet proporcionalan broju inkorporiranih nukleotida. Pirosekvenciranje, u kombinaciji sa RT-PCR pokazalo se pogodnim u genotipskom određivanju rezistencije na antivirusne lekove [140]. Za detekciju i podtipizaciju influenza virusa koriste se i testovi zasnovani na LAMP - loop-mediated isothermal amplification i NASBA - nucleic acid sequencing-based amplification tehnikama. To su specifične i brze tehnike, slične PCR amplifikaciji, ali se odigravaju pod izotermalnim uslovima.

Serološka dijagnostika influenza

Postoji čitav niz različitih seroloških testova za dokazivanje specifičnih anti-influenca virusnih antitela u serumu pacijenata. Kako je izvesna količina anti-influenca antitela uobičajeno prisutna u serumu, za serološku dijagnostiku je neophodno testirati parne serume uzete u razmaku od 2-3 nedelje i ustanoviti porast ili pad titra antitela. Ovo serološku dijagnostiku čini nepogodnom za brzu, rutinsku dijagnostiku akutnih infekcija. Međutim, podaci dobijeni serološkim metodama, mogu pomoći u retrospektivnom postavljanju dijagnoze kod pacijenata kod kojih ne postoji mogućnost direktnog dokazivanja uzročnika.

Takođe, ove metode se koriste i u sero-epidemiološkim studijama, za praćenje imunog statusa posmatrane populacije, nakon epidemije ili vakcinacije.

Reakcija vezivanja komplementa (RVK) se tradicionalno primenjavala za određivanje količine antitela u serumu obolelog. Za izvođenje reakcije najčešće se koristi nukleoproteinski (tzv. solubilni), tipski specifičan antigen dobijen obradom horioalantoisnih membrana inficiranih kokošijih jaja. Antigen se dodaje razređenjima parnih ispitivanih seruma, a za vizuelizaciju eventualno obrazovanih kompleksa antitelo-antigen, koristi se hemolitički sistem u prisustvu komplementa. U slučaju pozitivnog rezultata, eritrociti se sedimentiraju na dnu bazenčića ili epruvete, pošto je komplement vezan za kompleks antitelo-antigen. Odsustvo specifičnih antitela, odnosno negativan rezultat, označava pojava hemolize, koja je rezultat dejstva hemolizina na eritrocite u prisustvu slobodnog komplementa. Titar u RVK se određuje kao najveće razređenje seruma koje sprečava hemolizu, a na akutnu infekciju ukazuje četvorostruki ili veći porast titra između parnih seruma. Upotreba dijagnostičkog antigena pripremljenog od alantoisne tečnosti inficiranih jaja, omogućuje detekciju antitela na površinske antigene HA i NA, koji su specifični prema podtipu i varijanti virusa.

Pored toga što se RIH standardno koristi za identifikaciju izolata influenza virusa, ona može da se primeni i za detekciju anti-influenca virusnih antitela u serumu. Princip reakcije je isti u oba slučaja, jedino se u ovom slučaju ispitivani serum analiziraju pomoću seta referentnih, dijagnostičkih antigena. Zaključak o dijagnozi se donosi posredno, na osnovu dijagnostičkog antigena čija hemaglutinacija je inhibirana posmatranim serumom. Četvorostruki ili veći porast titra između uzorka uzetog u akutnoj fazi bolesti i nakon dve nedelje, dokaz je infekcije influenza virusom. RIH pruža mogućnost podtipizacije, kao i određivanja soja influenza A virusa.

Još jedan od seroloških testova koji se može primeniti u dijagnostici influence jeste i jednostruka radijalna hemoliza. Ova reakcija se izvodi tako što se eritrociti obloženi virusom influence, zajedno sa komplementom, suspenduju u rastopljeni agar, koji se zatim izliva u pogodne posude. U ohlađenom agaru se prave rupice u koje se dodaju razređenja ispitivanog seruma. Prisustvo antitela u serumu se detektuje pojavom hemolize oko mesta inokuluma, izazvane komplementom aktiviranim kompleksima antigen-antitelo formiranim na površini eritrocita. Koncentracija antitela u serumu proporcionalna je zoni hemolize. Povećanje zone hemolize od 50% u serumu uzetom u rekoalescenciji, ukazuje na akutnu infekciju. Ova metoda je preciznija i osetljivija metoda od RVK i RIH, ali su problemi vezani za pokušaj standardizacije ovog testa, ograničili njegovu široku primenu [2].

Neutralizacionim testom se vrši detekcija neutralizujućih antitela u serumu inficiranog na virusni HA. Klasični neutralizacioni test zasnovan je na inhibiciji citopatogenog efekta influenza virusa na ćelijskoj kulturi, pod uticajem specifičnih serumskih antitela. Iako je ovo najspecifičniji od svih seroloških testova, zbog komplikovanog i dugotrajnog izvođenja, nije u

širokoj upotrebi u rutinskoj dijagnostici [45]. Novija varijanta ovog testa podrazumeva upotrebu mikrotitar ploča u kombinaciji sa imunoenzimskim (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) testom i omogućuje detekciju virusom inficiranih ćelija u roku od dva dana [116]. U toku prvog dana testiranja, virus se meša sa ispitivanim serumom, inkubira se, a zatim se vrši inokulacija u kulturu ćelija. Sledećeg dana se ELISA testom dokazuje prisustvo NA influenza A virusa u fiksiranim ćelijama. Odsustvo inficiranih ćelija, predstavlja pozitivan rezultat testa, odnosno ukazuje na prisustvo virus-specifičnih antitela u ispitivanom serumu.

Danas se u savremenoj dijagnostici influence, najčešće primenjuju imunoenzimski ELISA testovi. Oni su jednostavni za izvođenje, brzi i omogućuju kvalitativnu i kvantitativnu detekciju pojedinačnih klasa antitela: IgA, IgM i IgG. Ispitivani serumi se dodaju u bazenčiće sa dnom obloženim influenza antigenom. U sledećoj fazi reakcije dodaje se konjugat koji sadrži anti-humana antitela obeležena enzimom. Ona će se vezati za kompleks antigen–antitelo, ukoliko je formiran u prvoj fazi reakcije. Nakon dodavanja odgovarajućeg supstrata, dolazi do enzimske reakcije koja će biti praćena stvaranjem obojenog produkta. Intenzitet boje, koji se određuje spektrofotometrijski, proporcionalan je količini prisutnih antitela.

MATERIJAL I METODE

Period istraživanja i odabir pacijenata

Istraživanje je bilo sprovedeno u toku četiri uzastopne sezone 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013 i 2013/2014, u periodu oktobar-maj, odnosno od 40. nedelje jedne godine do 20. nedelje naredne godine. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno ukupno 887 pacijenata sa teritorije Južnobačkog okruga: 88 u sezoni 2010/2011, 82 u sezoni 2011/2012, 378 u sezoni 2012/2013 i 339 u sezoni 2013/2014. Svi pacijenti su imali simptome gripa, pri čemu je 350 bilo sa simptomima koji su odgovarali definiciji slučaja SZO za obolenje nalik influenci (ILI - influenza-like illness), a koja podrazumeva akutnu respiratornu bolest, praćenu naglim skokom temperature preko 38° C i kašljem [141]. Preostalih 537 pacijenata imalo je simptome teške akutne respiratorne bolesti (SARI - severe acute respiratory illness). Prema SZO, SARI je svaki slučaj ILI sa otežanim disanjem, koji zahteva hospitalizaciju, a može biti pretstavljen pneumonijom, pogoršanjem od ranije postojećeg hroničnog obolenja, a u najtežim slučajevima akutnim respiratornim distres sindromom (ARDS), koji uključuje akutni plućni edem zbog oštećenja plućnog parenhima i plućnu infiltraciju praćenu teškom hipoksemijom i dispnejom [141]. Ispitivanja su izvedena u NIC Novi Sad, koji funkcioniše u Centru za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine, izuzev genetičke i antigenske karakterizacije, kao i ispitivanja osetljivosti na antivirusni oseltamivir odabranih virusa iz sezona 2012/2013 i 2013/2014, koje je izvršeno u KCRIL u Londonu.

Uzimanje i obrada uzoraka

Respiratorni uzorci pacijenata su uzimani i obrađivani u skladu sa preporukama SZO [116]. Uzorkovanje je vršeno upotrebom komercijalnog kita namenjenog uzimanju uzoraka za virusološka ispitivanja "Copan UTM-RT System" ("Copan", Italija). Polistirenski aplikatori, pomoću kojih su od svakog pacijenta sakupljeni brisevi grla i nosa, zajedno su uronjeni u univerzalni transportni medijum (UTM). UTM je predstavljao modifikovan Hankov balansirani soni rastvor obogaćen goveđim serum albuminom, cisteinom, želatinom, saharozom, glutaminskom kiselinom uz dodatak antibiotika i antimikotika. Transport uzoraka i čuvanje do obrade, vršeni su na temperaturi od 2-8°C, najduže do 72 časa od momenta uzorkovanja.

Obrada respiratornih uzoraka vršena je u zaštitnim kabinetima i uz preduzimanje zaštitnih mera predviđenih za rad u uslovima biološke opasnosti 2. stepena. Nakon vorteksovanja, vrhovi polistirenskih aplikatora očeđeni su pritiskom na unutrašnji zid posude sa UTM, a zatim su odbačeni. Za potrebe izvođenja rRT-PCR testa odvojeno je 200 µl uzorka, a preostala količina uzorka zamrznuta je na temperaturu od -76°C.

Dokazivanje influenza A virusa rRT-PCR testom

Dokazivanje i podtipizacija influenza A virusa izvedeni su rRT-PCR testom. Postupak se sastojao iz 3 faze: izolacije virusne nukleinske kiseline, izvođenja rRT-PCR testa i analize dobijenih rezultata.

Izolacija virusne RNK

Izolacija virusne RNK vršena je upotrebom komercijalnog kita "QIAamp Viral RNA Mini Kit", ("Qiagen GmbH", Nemačka), u skladu sa uputstvom proizvođača. Pre izolacije, u cilju uklanjanja krupnijih materija, uzorci su centrifugirani 10 minuta na brzini od 1500 x g. Za postupak izolacije RNK upotrebljeno je 140 µl supernatanta. U prvoj fazi izolacije, uzorci su lizirani pod izrazito denaturišućim uslovima, koji obezbeđuju inaktivaciju ribonukleaza i izolaciju intaktne virusne RNK. Zatim je dodavanjem 96% etanola, pH vrednost sredine podešena tako da su obezbeđeni optimalni uslovi za vezivanje RNK za silikatnu membranu spin-kolone. U naredna dva koraka, ispirani su proteini, nukleaze i druge materije koje bi mogle inhibitorno uticati na rRT-PCR reakciju, a zatim je RNK eluirana sa membrane.

Postupak izolacije virusne RNK

1. Uzorak je dodat u tubu sa 560 µl AVL pufera za lizu i 5,6 µl rastvorenog RNK nosača (RNA Carrier), koji obezbeđuje bolje vezivanje RNK za membranu i smanjuje mogućnost degradacije RNK.
2. Nakon kratkog vorteksovanja i centrifugiranja, vršena je inkubacija 10 minuta, na sobnoj temperaturi.
3. U lizirani uzorak dodato je 560 µl 96% etanola, a zatim je mešavina kratko vorteksovana i centrifugirana.
4. U spin-kolonu postavljenu u tubu od 2 ml, preneto je 630 µl mešavine, nakon čega je spin-kolona centrifugirana 1 minut na 6000 x g.
5. Spin-kolona je prebačena u novu tubu, a postupak iz tačke 4 je ponovljen sa preostalom količinom mešavine.
6. Spin-kolona je prebačena u novu tubu, dodato je 500 µl AW1 pufera za ispiranje i vršeno centrifugiranje 1 minut na 6000 x g.
7. Ispiranje je nastavljeno prebacivanjem spin-kolone u novu tubu, dodavanjem 500 µl AW2 pufera za ispiranje i centrifugiranjem 3 minuta na 14000 x g.
8. Spin-kolona je prebačena u novu tubu, posle čega je dodato 60 µl AVE pufera za eluciju.
9. Nakon inkubacije od 1 minuta na sobnoj temperaturi, virusna RNK je eluirana, centrifugiranjem 1 minut na 6000 x g.

Isti postupak izolacije primenjen je i na pozitivane i negativane materijale koji će biti upotrebljeni kao kontrole u rRT-PCR testu. Oni su dobijeni preko IRR (IRR - Influenza Reagent Resource, Influenza Division, WHO Collaborating Center for Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza), organizacije koja funkcioniše u okviru Centra za kontrolu i prevenciju bolesti iz Atlante (CDC), a koja se bavi distribucijom reagensa potrebnih za laboratorijsku dijagnostiku influence, laboratorijama koje funkcionišu u sklopu GISRS. Pozitivne kontrole predstavljale su suspenzije inaktivisanih, neinfektivnih influenza virusa, prethodno umnoženih u ćelijskim kulturama. Korištena je pozitivna kontrola koja predstavlja pul influenza A(H1N1), A(H3N2), A(H1N1)pdm09 i influenza B virusa, kao i pojedinačne pozitivne kontrole za H5N1 i H7N9 avijarne viruse. Kao negativna kontrola upotrebljen je respiratorni uzorak humanog porekla za koji je dokazano da ne sadrži nijedan influenza virus.

Izvođenje rRT-PCR testa

Nakon postupka izolacije virusne RNK iz respiratornih uzoraka, specifično dokazivanje influenza virusne RNK izvedeno je upotrebom setova prajmera i proba dobijenih preko IRR. Pojedinačni setovi su dizajnirani tako da omogućuju identifikaciju dela genoma univerzalno prisutnog kod svih influenza A ili influenza B virusa (fragment M gena) ili detekciju regiona genoma tipičnih za pojedine influenza A podtipove (fragmenti HA gena). Svaki set se sastojao od dva oligonukleotidna prajmera (forward i reverse) i dvostruko obeležene Taq Man® probe (Tab. 4). Na 5' kraju proba nalazila se FAM (6-karboksifluorescein) reporter boja, a na 3' kraju BHQ1 (black hole quencher 1) quencher boja.

Svi uzorci izolovane RNK, testirani su singlepleks reakcijama na prisustvo M gena influenza virusa A tipa, kao i prisustvo H1pdm09, H1, H3, H5 i H7 gena specifičnih za odgovarajuće influenza A podtipove. S obzirom na to da influenza A i B virusi uzrokuju identične simptome, svi uzorci su ispitani posebnom reakcijom na prisustvo M gena influenza B virusa. Imajući u vidu postojanje velikog broja genotipskih varijanti avijarnih influenza H5N1 virusa, a u skladu sa preporukom CDC-a, u cilju povećanja osetljivosti testa u pogledu detekcije ovih virusa, testiranje je izvršeno sa dva različita seta prajmera i proba (H5a i H5b). Istovremeno, svaki RNK izolat analiziran je posebnim setom prajmera i probe specifičnim za humani ribonukleaza P gen (RP). Ovaj gen kodira enzim uključen u transkripciju gena koji kodiraju tRNK, kao i u obradu prekursora tRNK. Univerzalno je prisutan u humanim ćelijama, te služi kao interna pozitivna kontrola prisustva humane nukleinske kiseline. Pozitivan rezultat sa ovim setom, ukazuje na dobar kvalitet uzorka i adekvatno izveden postupak izolacije RNK.

Tabela 4: Sekvence prajmera i proba ("Biosearch Technologies" <https://www.biosearchtech.com/products/valupanel-reagents>)

Prajmeri i probe	Sekvenca	Gen
Influenca A1		M
Forward	5'-GACCRATCCTGTACACCTCTGAC-3'	
Reverse	5'-AGGGCATTYGGACAAAKCGTCTA-3'	
Proba	5'FAM-TGCAGTCTCGCTCACTGGGCACG-BHQ1-3'	
Influenca B1		M
Forward	5'-TCCTCAACTCACTCTTCGAGCG-3'	
Reverse	5'-CGGTGCTCTTGACCAAATTGG-3'	
Proba	5'FAM-CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG-BHQ1-3'	
(H1N1)pdm09		HA
Forward	5'-GTGCTATAAACACCAGCCTYCCA-3'	
Reverse	5'-CGGGATATTCCTTAATCCTGTRGC-3'	
Proba	5'FAM-CAGAATATACA(T-BHQ1)CCRGTCACAATTGGARAA-Spacer C3-3'	
H11		HA
Forward	5'-AACTACTACTGGACTCTRCTKGAA-3'	
Reverse	5'-CCATTGGTGCATTTGAGKTGATG-3'	
Proba	5'FAM-TGAYCCAAAGCC(T-BHQ1)CTACTCAGTGCAGAAAGC-Spacer C3-3'	
H31		HA
Forward	5'-AAGCATTCCYAATGACAAACC-3'	
Reverse	5'-ATTGCRCCRAATATGCCTCTAGT-3'	
Proba	5'FAM-CAGGATCACATATGGGSCCTGTCCCAG-BHQ1-3'	
H5a1		HA
Forward	5'-TGGAAAGTRTAARAAACGGAACGT-3'	
Reverse	5'-YGCTAGGGARCTCGCCACTG-3'	
Proba	1:1 mešavina 5'FAM-TGACTACCCGCAG(T-BHQ1)ATTCAGAAGAAGCAAGACTAA-SpacerC3-3' & 5'FAM-CAACTATCCGCAG(T-BHQ1)ATTCAGAAGAAGCAAGATTAA-Spacer C3-3'	
H5b1		HA
Forward	5'-GGAATGYCCCAAATATGTGAAATCAA-3'	
Reverse	5'-CCACTCCCCTGCTCRTTGC-3'	
Proba	5'FAM-TACCCATACCAACCA(T-BHQ1)CTACCATTCCCTGCCAT-Spacer C3-3'	
H72		HA
Forward	5'-AGAAATGAAATGGCTCCTGTCAA-3'	
Reverse	5'-GGTTTTTCTTGATTTTTATAGCTTAG-3'	
Proba	5'FAM-AGATAATGCTGCATTCGCCGAGATG-BHQ1-3'	
RPG		
Forward	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'	
Reverse	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'	
Proba	5'FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ1-3'	

1-Prajmeri i probe dizajnirani od strane CDC iz Atlante (SAD)

2-Prajmeri i proba dizajnirana od strane KCRIL iz Pekinga (Kina)

Rekonstrukcija prajmera i proba, kao i izvođenje rRT-PCR testa, vršeno je prema uputstvu CDC, dostavljenom uz setove. Liofolizirani prajmeri i probe su rekonstruisani sa 500 µl sterilne, demineralizovane vode za molekularnu dijagnostiku i alikvotirani. Po jedan alikvot svakog prajmera i probe, čuvan je u frižideru, na temperaturi od 2-8° C, do 3 meseca i u tom periodu korišten za pripremu odgovarajućih reakcionih smeša za rRT-PCR test. Ostali alikvoti su zamrznuti na temperaturu od -20° C.

Za izvođenje rRT-PCR testova upotrebljen je komercijalni kit "Ambion AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit" ("Applied Biosystems", SAD). Za svaki set prajmera i proba, pripremljena je posebna reakciona smeša:

Reagens	Zapremina reagensa po reakciji
Voda za molekularnu dijagnostiku	5 µl
2x RT-PCR Buffer	12,5 µl
AgPath 25x RT-PCR Enzyme Mix	1 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
Probe	0,5 µl
Ukupna zapremina reakcione smeše	20 µl

U bazenčice reakcione ploče ili stripa, dispendovano je po 20 µl odgovarajuće reakcione smeše, a nakon toga je u dodato po 5 µl RNK izolovane iz jednog uzorka ili odgovarajuće pozitivne kontrole. Svaki test je sadržao i dve negativne kontrole. U jednu je dodato 5 µl RNK izolovane iz negativnog humanog uzorka i dodatnu negativnu kontrolu u koju je dodato je 5 µl vode (NTC - No template controle), te je ona služila za proveru eventualne kontaminacije pojedinačnih reakcionih smeša. Reakcione ploče ili stripovi su centrifugirani na brzini od 500 x g, 30 sekundi, a zatim preneti u aparat za rPCR.

Za izvođenje rRT-PCR testa upotrebljeni su aparati "Applied Biosystems" 7500 ili "Applied Biosystems" StepOne ("Applied Biosystems", SAD). Temperaturni profil reakcije, odnosno temperatura i vreme trajanja odgovarajućih faza reakcije, zadati su pomoću kompjuterskog programa "Applied Biosystems" Software v2.0.6:

Faza RT-PCR	Temperatura/vreme	
Reverzna transkripcija	50° C / 30 minuta	
Inaktivacija reverzne transkriptaze i aktivacija Taq polimeraze	95° C / 10 minuta	
PCR amplifikacija	} 45 ciklusa	
Denaturacija		95° C / 15 sekundi
Vezivanje prajmera i ekstenzija		55° C / 30 sekundi

Podaci o nivou emitovane fluorescencije, snimani su u toku PCR amplifikacije za vreme faze 55° C / 30 sekundi.

Interpretacija rezultata rRT-PCR testa

Rezultati rRT-PCR testa su automatski obrađeni kompjuterskim programom i prezentovani u vidu amplifikacionih kriva i Ct (treshold cycle) vrednosti. Amplifikacione krive predstavljaju grafički prikaz eksponencionalnog porasta nivoa fluorescencije u toku 45 ciklusa amplifikacije. Ct vrednosti označavaju ciklus u kojem je amplifikaciona kriva prešla treshold liniju, odnosno ciklus u kojem je nivo detektovane fluorescencije prešao nivo nespecifične fluorescencije, koja potiče od reakcione ploče i reagenasa.

Tumačenje rezultata rRT-PCR testa, vršeno je u skladu sa uputstvom CDC-a, dostavljenom uz setove prajmera i proba (Tab. 5). Uzorak je smatran pozitivnim na prisustvo određenog influenza virusa, ukoliko je Ct vrednost dobijena testiranjem sa odgovarajućim setom prajmera i proba, bila manja ili jednaka 40. Pri tome, u slučaju pozitivnog nalaza na neki od podtipova influence A, pozitivan rezultat je morao biti dobijen i na, kod influenza A virusa, univerzalno prisutan M gen. Rezultat rRT-PCR testa je označen kao negativan na određeni influenza virus, ukoliko u toku testiranja sa odgovarajućim setom prajmera i proba, nije dobijena amplifikaciona kriva ili ukoliko je dobijena Ct vrednost bila veća od 40. Rezultati rRT-PCR testa smatrani su validnim, ukoliko su rezultati svih kontrola bili odgovarajući:

- Kontrola prisustva RP je morala biti pozitivna za svaki pojedinačni uzorak, pri čemu je Ct vrednost morala biti manja ili jednaka 37.

- NTC kontrola nije smela da da pozitivan rezultat ni sa jednim setom prajmera i proba, čime je isključena mogućnost lažno pozitivnih rezultata usled kontaminacije reagenasa za rRT-PCR.

- Pozitivne kontrole su morale da daju pozitivan rezultat (Ct vrednost manja ili jednaka 40) sa odgovarajućim setovima prajmera i proba, čime je potvrđena specifičnost setova i funkcionisanje reagenasa.

- Kontrola sa negativnim humanim uzorkom je morala da bude pozitivna samo na prisustvo RP gena, čime je isključena mogućnost lažno pozitivnih rezultata usled kontaminacije reagenasa za ekstrakciju nukleinskih kiselina.

Tabela 5: Interpretacija rezultata rRT-PCR testa

InfA	H1	H3	H1pdm	H5	H7	Inf B	RP	Rezultat
-	-	-	-	-	-	-	+	Negativan
+	+	-	-	-	-	-	+	H1 pozitivan
+	-	+	-	-	-	-	+	H3 pozitivan
+	-	-	+	-	-	-	+	H1pdm pozitivan
+	-	-	-	+	-	-	+	H5 pozitivan
+	-	-	-	-	+	-	+	H7 pozitivan
-	-	-	-	-	-	+	+	Influenca B pozitivan
+	-	-	-	-	-	-	+	Influenca A pozitivan
-	-	-	-	-	-	-	-	Rezultat nije validan

Prema preporuci SZO, uzorci koji su bili pozitivni na M gen influenza A virusa, a negativni sa svim setovima prajmera i proba specifičnim za pojedinačne podtipove, retestirani su. Ukoliko je ponovo dobijen isti rezultat, uzorak je poslat u KCRIL u Londonu gde su izvršena detaljna antigenska i genetička ispitivanja virusa iz ovih uzoraka.

Antigenska karakterizacija influenza A virusa

Influenca A virusi čije je prisustvo dokazano rRT-PCR testom u toku sezona 2012/2013 i 2013/2014, podvrgnuti su RIH, radi određivanja antigenskog soja virusa, a u cilju ispitivanja antigenske podudarnosti virusnih izolata i referentnih, vakcinalnih virusa. Antigenskom ispitivanju podvrgnuti su svi virusi čija antigenska karakterizacija nije izvršena u KCRIL u Londonu. Analizirano je 57 influenza A(H1N1)pdm09 i 20 influenza A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013, kao i 26 influenza A(H1N1)pdm09 i 72 A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014. Četvorostruka razlika titra u RIH između ispitivanog virusnog izolata i referentnog virusa, ukazivala je na značajnu antigensku razliku, odnosno moguće prisustvo drift varijante virusa.

Pre izvođenja RIH, virusi su umnoženi u MDCK kontinuiranim ćelijskim linijama dobijenim od strane IRR, a zatim je ispitana sposobnost aglutinacije kokošijih i humanih eritrocita, kao i eritrocita zamorca, dobijenih izolata, pomoću RH. Umnožavanje MDCK ćelijskih kultura, inokulacija uzoraka pozitivnih na influenza A viruse, RH i RIH, vršeni su u skladu sa uputstvom SZO [116].

Umnožavanje MDCK ćelijskih kultura

MDCK ćelijske kulture su gajene u plastičnim flaskovima (25 cm²), na temperaturi od +37°C, u hranljivoj podlozi (Dulbesco's Modified Eagle's Medium, "Sigma", SAD), sa 10% fetalnog telećeg seruma (FTS, "Capricorn Scientific", Nemačka). Postupku umnožavanja podvrgnute su kulture koje su pokazale ravnomeran porast ćelija na otprilike 80% površine flaska.

Postupak umnožavanja MDCK ćelijskih kultura

1. Hranljiva podloga za umnožavanje ćelija je odlivena i svaka kultura je tretirana dva puta u trajanju po 1 minut sa 3 ml rastvora tripsina-EDTA (0,5 g tripsina i 0,2 g EDTA po litri Henksovog izbalansiranog sonog rastvora, "Sigma", SAD), zagrejanog na temperaturu od 37°C.
2. Rastvor tripsina-EDTA je odstranjen, a kulture su nalivene sa 1 ml svežeg rastvora i inkubirane na temperaturi od 37°C sve dok se većina ćelija nije odvojila od površine flaska.
3. Inaktivacija preostalog tripsina, izvršena je sa 1 ml FTS.
4. U svaki flask je dodato po 10 ml podloge za umnožavanje MDCK ćelija, nakon čegu su blagim pipetiranjem razbijene grupacije ćelija.

5. Ovako suspendovane ćelije su prebačene u 20 ml hranljive podloge za umnožavanje ćelija.

6. U 3 flaska razliveno je po 10 ml suspenzije ćelija, a zatim su flaskovi inkubirani na temperaturi od 37°C. Bilo je potrebno 2-3 dana da bi ćelije prekrile skoro celu površinu flaska i bile spremne za inokulaciju.

Inokulacija uzoraka u MDCK ćelijske kulture

Pozitivni uzorci su otopljeni sa temperature od -76°C. Za inokulaciju je odvojeno 200 µl supernatanta, a ostatak uzorka je zamrznut na temperaturu od -76°C.

Postupak inokulacije uzoraka

1. Podloga za umnožavanje ćelija je odlivena, a ćelije isprane sterilnim fosfatnim puferisanim rastvorom (PBS).

2. U svaki flask je inokulisano po 200 µl uzorka, a zatim je vršena adsorpcija 30 minuta na 37°C.

3. Nakon toga, nalivano je po 10 ml podloge za umnožavanje virusa, sa 2 µg/ml TPCK-tripsina ("Sigma", SAD). TPCK-tripsin je tripsin tretiran L-(tiozilamido-2-fenil) etil hlorometil ketonom, koji inaktivira funkciju enzimskog odvajanja tirozina, triptofana, fenilalanina i leucina, pri čemu funkcija enzimskog odvajanja arginina ostaje očuvana.

4. Inokulisane kulture ćelija su inkubirane u termostatu na +35°C i praćene svaki dan u toku nedelju dana, radi uočavanja CPE.

5. Kada je CPE bilo obuhvaćeno otprilike 75% ćelija, sadržaj flaska je centrifugiran 5 minuta na 1000 x g. Supernatant je sakupljen i dodato mu je 0,5% goveđeg serum albumina, frakcija V (7,5%).

6. Za izvođenje RH odvojeno je 50 µl, a ostatak izolata virusa je čuvan na temperaturi od +4°C.

Izvođenje reakcije hemaglutinacije

Ispitivanje sposobnosti hemaglutinacije izolata influenza A virusa, vršeno je u mikrotitar pločama na kojim su obeležene kolone bazenčića sa odgovarajućim razređenjem virusa (Sl. 16). Svaki virusni izolat je testiran RH tri puta, jednom uz upotrebu kokošijih eritrocita, drugi put korišćenjem humanih eritrocita nulte krvne grupe i treći put sa eritrocitima zamorca.

Postupak izvođenja RH

1. U sve bazenčiće ploče, počevši od razređenja 1/20, kao i u 2 bazenčića kontrole eritrocita (KEr) dodato je po 50 µl fiziološkog rastvora (FR), a zatim je u epruvetama je pripremljeno po 0,5 ml 1:10 razređenja svakog virusnog izolata sa FR.

2. U bazenčiće 1/10 i 1/20 odgovarajućeg reda, dodato je po 50 µl razređenog izolata, a zatim su pravljena razređenja od 1/20 do 1/2560, prenošenjem po 50 µl sadržaja iz jednog u susedni bazenčić. Iz poslednjeg bazenčića sa razređenjem 1/2560, odbačeno je 50 µl.

3. U sve bazenčice je dodato po 50 μ l 0,75% suspenzije kokošijih eritrocita ili 1% suspenzije humanih eritrocita nulte krvne grupe ili 1% suspenzije eritrocita zamorca.

4. Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 minuta ukoliko su dodati kokošiji eritrociti ili 60 minuta ukoliko su korišteni humani eritrociti i eritrociti zamorca, odnosno do taloženja eritrocira u bazenčićima KEr.

1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	KEr		

Slika 16: Shema obeležavanja mikrotitar ploča u reakciji virusne hemaglutinacije

Očitavanje rezultata RH

Očitavanje rezultata RH vršeno je posmatranjem dna bazenčića mikrotitar ploče. Kompletna aglutinacija eritrocita uočavala se kao uniformni sloj ćelija na dnu bazenčića, dok su u bazenčićima bez aglutinacije eritrociti bili sedimentirani u vidu "ribljeg oka". Kao titar RH uzeta je recipročna vrednost najvećeg razređenja ispitivanog virusa koje aglutinira eritrocite.

Izvođenje reakcije inhibicije hemaglutinacije

Identifikaciji antigenskog soja influenza A virusa pomoću RIH, podvrgnuti su svi virusni izolati koji su u RH dali titar ≥ 40 . Za identifikaciju su upotrebljeni referentni ovčiji imuni seruma dobijeni pomoću vakcinalnih sojeva virusa, homologih aktuelno cirkulišućim virusima, koje distribuira IRR. Referentni serumi su rekonstruisani sa 1 ml dejonizovane vode, alikvotirani (po 200 μ l) i čuvani na temperaturi od -20°C . Kao kontrole ove reakcije upotrebljeni su referentni antigeni dostavljeni zajedno sa serumima: A/California/07/2009(H1N1) i A/Victoria/361/2011(H3N2) za izolate iz sezone 2012/2013 i A/California/07/2009(H1N1) i A/Texas/50/2012(H3N2) za izolate iz sezone 2013/2014. Pre izvođenja same RIH, bilo je nophodno inaktivisati nespecifične inhibitore hemaglutinacije u referentnim serumima i odrediti optimalnu količinu referentnih virusa i izolata virusa potrebnih za RIH.

Inaktivacija nespecifičnih inhibitora hemaglutinacije

Nespecifični inhibitori hemaglutinacije u referentnim serumima, inaktivisani su tretiranjem sa RDE (receptor destroying enzym) i toplotom. Liofiliziran RDE je rekonstruisan sa 25 ml FR, alikvotiran i čuvan na temperaturi od -20°C . Inaktivacija je vršena dodavanjem RDE u odnosu 1:3 (40 μ l seruma i 120 μ l RDE) i inkubiranjem preko noći na temperaturi od 37°C . Sutradan je mešavina seruma i RDE-a inkubirana 30 minuta na temperaturi od 56°C ,

radi inaktivacije preostalog RDE-a. Nakon hlađenja do sobne temperature, mešavini je dodato 240 µl FR, čime je dobijeno konačno razređenje seruma od 1:10.

Titracija referentnih antigena i izolata virusa

Titracijom i retitracijom (povratnom titracijom) vršeno je određivanje optimalne količine virusa u RIH. Titracija virusa, odnosno određivanje hemaglutinacionog titra virusa vršeno je pomoću RH. Nakon toga, izvedena je povratna titracija u mikrotitar pločama (Sl. 17).

4	2	1	1/2	1/4	KEr	4	2	1	1/2	1/4

Slika 17: Shema obeležavanja mikrotitar ploča u izvođenju povratne titracije virusnih izolata i referentnih virusa

Za izvođenje RIH potrebno je da u zapremini od 50 µl bude prisutno 8 hemaglutinacionih jedinica (HAJ) virusa. Jedna HAJ je najmanja količina virusa koja još daje vidljivu aglutinaciju standardne količine eritrocita. Da bi se dobilo razređenje virusa koje sadrži potreban broj HAJ, titar dobijen u RH podeljen je sa 8, i ta vrednost je uzeta kao početni titar u retitraciji. Da bi se radni titar virusa preciznije odredio, pripremljeno je 8 različitih razređenja virusa sa FR. Za svako od ovih razređenja virusa izvršena je retitracija u duplikatu.

Retitracija referentnih antigena i izolata virusa

1. U svaki bazenčić mikrotitar ploče dodato je 50 µl FR, a zatim je u prve bazenčiće (4HAJ) oba reda dodato po 50 µl virusa odgovarajućeg razređenja.

2. Pravljeni su razređenja virusa prenošenjem po 50 µl iz jednog u drugi bazenčić, počevši od bazenčića 4HAJ do 1/4HAJ. Iz bazenčića 1/4HAJ, odbačeno je 50 µl.

3. U sve bazenčiće je dodato po 50 µl 0,5% kokošijih eritrocita ili 0,75% humanih eritrocita, zavisno od toga sa kojim eritrocitima je u RH dobijen bolji titar.

4. Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 minuta sa kokošijim ili 60 minuta sa humanim eritrocitima i eritrocitima zamorca, odnosno do potpunog taloženja eritrocita u KEr.

5. Kao optimalno radno razređenje virusa, koje će se koristiti u RIH, uzeto je ono koje je u retitraciji pokazalo kompletnu aglutinaciju u bazenčićima 4, 2, 1 i 1/2 HAJ, dok je u bazenčiću sa 1/4 HAJ aglutinacija bila slaba ili je nije bilo.

Postupak izvođenja reakcije inhibicije hemaglutinacije

U RIH, svaki ispitivani virusni izolat i referentni virus, testiran je sa referentnim imunim

serumom dobijenim pomoću homologog virusnog soja. Na mikrotitar ploči su obeležena razređenja referentnog seruma.

1. U sve bazenčice mikrotitar ploče (Sl. 18), od razređenja 1/20 do 1/1280, kao i u kontrole referentnih imunih seruma, dodato je po 25 µl FR. U bazenčice KEr dodato je po 50 µl FR.

2. U bazenčice 1/10 i 1/20 svake kolone, kao i u bazenčice kontrola, dodato je po 25 µl odgovarajućeg referentnog seruma. Zatim su pravljena razređenja prenošenjem po 25 µl sadržaja iz jednog u susjedni vazenčić, od 1/20 do 1/1280. Iz bazenčića 1/1280 odbačeno je 25 µl.

3. U sve bazenčice reda jednog izolata ili referentnog kontrolnog antigena, dodato je po 25 µl odgovarajućeg izolata, odnosno kontrolnog antigena, a zatim je vršena inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi.

4. U sve bazenčice na mikrotitar ploči dodato je po 50 µl 0,75% kokošijih ili 1% humanih eritrocita ili eritrocita zamorca, zavisno od toga sa kojim eritrocitima je u RH dobijen višji titar.

5. Ploče su inkubirane na sobnoj temperaturi 30 minuta ukoliko su upotrebljeni kokošiji ili 60 minuta ukoliko su dodati humani eritrociti, odnosno do potpunog taloženja eritrocita KEr.

	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	Kontrole referentnihseruma				
Izolat 1													Pozitivan serum
Izolat 2													
Izolat 3													Negativan serum
Izolat 4													
Izolat 5													
Izolat 6													
Izolat 7													
Ref. virus													KEr

Slika 18: Shema obeležavanja mikrotitar ploča u izvođenju reakcije inhibicije virusne hemaglutinacije

Očitavanje rezultata reakcije inhibicije hemaglutinacije

Očitavanje rezultata RIH izvršeno je posmatranjem bazenčića mikrotitar ploče. Kompletna aglutinacija eritrocira uočavala se kao uniformni sloj ćelija koji pokriva dno. U bazenčićima bez aglutinacije ćelije su se sedimentirale u vidu "ribljeg oka". Kao titar RIH uzeta je recipročna vrednost najvećeg razređenja referentnog seruma koje inhibira hemaglutinaciju ispitivanog virusnog izolata. Titar RIH svakog izolata poređen je sa titrom odgovarajućeg

referentnog antigena. Titar ispitivanog virusa više od četiri puta niži u odnosu na titar kontrolnog virusa, ukazao bi na prisustvo soja antigeni izmenjenog u tolikoj meri da antitela iz referentnog imunog seruma nisu u stanju da ga efikasno neutrališu i spreče hemaglutinaciju.

Ispitivanje osetljivosti influenza A virusa na oseltamivir

Ispitivanje osetljivosti influenza A virusnih izolata na antivirusik oseltamivir, vršeno je određivanjem inhibicije enzimske aktivnosti NA, pomoću "NA-XTDTM" ("Applied Biosystems", SAD) testa, u skladu sa uputstvom proizvođača. Ovaj test omogućuje detekciju poznatih i nepoznatih mutacija koje utiču na osetljivost influenza virusa na NAi, na fenotipskom nivou, putem praćenja efekta NAi na enzimsku aktivnost neuraminidaze. Testom se određuju IC50 vrednosti, koje predstavljaju koncentraciju oseltamivira potrebnu za inhibiciju 50% standardnog iznosa NA aktivnosti. Ukoliko je IC50 ispitivanog izolata <10 puta povećana u odnosu na IC50 divljeg, osetljivog ili referentnog soja, izolat je označen kao virus normalne osetljivosti na oseltamivir, odnosno normalne inhibicije. Vrednosti IC50 10-100 puta veća od normalne vrednosti, ukazivale su na virus sa redukovanom inhibicijom, a vrednosti IC50 >100 puta, na virus sa izrazito redukovanom inhibicijom oseltamivirom.

U toku izvođenja testa, kao referentni, kontrolni virusi upotrebljeni su influenza A virusi iz panela "CDC Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Reference Virus Panel, version 2.0", koje distribuiraju IRR. U sastavu panela nalazio se jedan par virusa influenza A(H1N1)pdm09 podtipa i jedan par virusa influenza A(H3N2) podtipa. Svaki par činio je jedan divlji soj virusa koji pokazuje normalnu osetljivost na oseltamivir i mutirani oseltamivir-rezistentni soj istog virusa, koji pokazuje redukovanu inhibiciju oseltamivirom (Tab. 6). Virus A/Texas/23/2012 na poziciji 275 NA umesto histidina, poseduje tirozin, što uslovljava visoko redukovanu inhibiciju oseltamivirom (IC50 je više od 100 puta veća u odnosu na IC50 divljeg, osetljivog soja A/California/12/2012). Kod virusa A/Texas/12/2007, glutaminska kiselina koja se nalazi na položaju 119 molekula NA divljeg soja, zamenjena je aminokiselinom valinom, što uzrokuje visoko redukovanu inhibiciju oseltamivirom (IC50 je više od 100 puta veća u odnosu na IC50 divljeg, osetljivog soja A/Washington/01/2007).

Radi pripreme dovoljne količine referentnih virusa, oni su umnoženi u MDCK ćelijskim kulturama, prema uputstvu CDC koje je distribuirano zajedeno sa panelom. Virusi su pasažirani ne više od 2 puta, s obzirom na to da aminokiselinske substitucije koje uzrokuju rezistenciju na NAi, mogu biti nestabilne tokom serijskog pasažiranja virusa, kao i zbog toga što pasažiranje može dovesti do selekcije varijanti sa izmenjenom osetljivošću na NAi. Ovo može usloviti pojavu mešane populacije osetljivih i rezistentnih virusa i rezultirati smanjenjem

IC50 vrednosti referentnog, rezistentnog soja.

Tabela 6: Referentni influenza A virusi i njihove IC50 vrednosti

Referentni virus	Podtip	Genotip	Srednja vrednost IC50 (IC50 mutanta/IC50 divljeg soja)
A/California/12/2012	A(H1N1)pdm09	Divlji tip (H275)	0,20 nM (1)
A/Texas/23/2012	A(H1N1)pdm09	Mutirani tip (H275Y)	174,91 nM (875)*
A/Washington/01/2007	A(H3N2)	Divlji tip (E119)	0,08 nM (1)
A/Texas/12/2007	A(H3N2)	Mutirani tip (E119V)	44,72 nM (559)*

*Vrednosti koje pokazuju koliko je puta redukovana inhibicija oseltamivrom u odnosu na vrednost divljeg soja koja je uzeta kao 1.

Priprema referentnih virusa

Postupak inokulacije svakog referentnog virusa u ćelijsku kulturu, vršen je posebno, u zaštitnim kabinetima i uz preduzimanje zaštitnih mera predviđenih za rad u uslovima biološke opasnosti 2. stepena.

1. Tuba sa 0,5 ml referentnog virusa, čuvana na temperaturi od -70°C, otopljena je stavljanjem u posudu sa ledom. Postupkom serijskog 10-ostrukog razređivanja, pripremljeno je po 1 ml 1:10 000 razređenja svakog referentnog virusa u podlozi za održavanje. Serijsko razređivanje vršeno je na sledeći način:

- 100 µl referentnog virusa + 900 µl podloge za održavanje = razređenje 1:10
- 100 µl razređenja 1:10 + 900 µl podloge za održavanje = razređenje 1:100
- 100 µl razređenja 1:100 + 900 µl podloge za održavanje = razređenje 1:1000
- 100 µl razređenja 1:1000 + 900 µl podloge za održavanje = razređenje 1:10 000

2. Za umnožavanje referentnih virusa upotrebijene su MDCK ćelijske kulture, gajene u flaskovima od 25 cm². Pre inokulacije, podloga za umnožavanje ćelija je uklonjena, kulture su isprane dva puta sterilnim puferisanim fosfatnim rastvorom (PBS), a zatim je u svaku dodato po 1 ml podloge za umnožavanje influenza virusa.

3. Svaka kultura je inokulisana sa 250 µl suspenzije virusa u razređenju 1:10000, nakon čega je vršena adsorpcija 1 sat, na sobnoj temperaturi.

4. U svaki flask, dodato je po 10 ml podloge za umnožavanje influenza A virusa, obogaćene sa 2 µg/ml TPCK-tretiranog tripsina za umnožavanje A(H1N1)pdm09 influenza virusa, odnosno sa 3 µg/ml TPCK-tretiranog tripsina za umnožavanje A(H3N2) para influenza virusa.

5. Inokulisane ćelijske kulture inkubirane su na temperaturi od 37°C. Radi uočavanja CPE, svakodnevno je vršeno posmatranje pomoću invertnog mikroskopa.

6. Kada je CPE bilo zahvaćeno oko 80% ćelija, sadržaj flaskova je centrifugiran 5

minuta na 1500 x g. Od supernatanta su pripremljeni alikvoti od 300 µl i zamrznuti na -70°C.

Određivanje radnog razređenja virusa

Određivanje optimalnog radnog razređenja virusa vršeno je merenjem enzimske aktivnosti NA u odsustvu oseltamivira, enzimskim hemiluminiscentnim testom "NA-XTDTM" ("Applied Biosystems", SAD) prema uputstvu proizvođača testa. Ovim postupkom se obezbeđuje veća pouzdanost i reproducibilnost rezultata testa.

Pre izvođenja testa, reagensi za izvođenje NA-XTDTM testa, su zagrejani na sobnoj temperaturi. Otopljen je po jedan alikvot ispitivanog virusa i odgovarajućih referentnih virusa. Alikvoti su razređeni u razmeri 1:10 sa puferom za pripremu uzoraka (NA Sample Prep Buffer), tako što je pomešano 30 µl pufera i 270 µl virusa. Pufer za pripremu uzoraka sadrži 10% Triton X-100 deterdženta, koji u koncentraciji od 1%, efikasno inaktiviše virus gripa i povećava aktivnost NA.

Postupak određivanja radnog razređenja virusa:

1. Pripremljena su dvostruka serijska razređenja virusa u reakcionoj ploči pomoću test pufera - NA-XTDTM Assay Buffer (Sl. 19). U bazenčiće 1 i 7 kolone, dodato je po 80 µl test pufera, a u ostale bazenčiće po 50 µl. Zatim je u bazenčiće 1 i 7 kolone dodato po 20 µl virusnog izolata ili referentnog virusa. Time je dobijeno početno razređenje ispitivanih virusa u test puferu od 1:5. Ovaj postupak smanjuje redukcionu uticaj Fenol-reda iz hranljive podloge, na intenzitet svetlosne emisije. Nakon toga, pravi su dvostruka serijska razređenja svakog virusa, prenošenjem po 50 µl iz jednog u naredni bazenčić, počevši od 1. pa sve do 5., odnosno od 7. do 11. bazenčića. Poslednjih 50 µl je odbačeno. Bazencići 6. i 12. kolone, u koje nisu dodati virusi, služili su kao kontrole testa. Ploče su inkubirane 20 minuta na temperaturi od 37°C.

	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	KT	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	KT
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Izolat 1						Izolat 9					
B	Izolat 2						Izolat 10					
C	Izolat 3						Izolat 11					
D	Izolat 4						Izolat 12					
E	Izolat 5						Izolat 13					
F	Izolat 6						Izolat 14					
G	Izolat 7						Osetljiv					
H	Izolat 8						Rezistentan					

Slika 19: Plan izvođenja postupka određivanja radnog razređenja virusa; KT-kontrola testa

2. U narednom koraku u svaki bazenčić dodato je po 25 µl 1:1000 radnog razređenja supstrata - NA-XTDTM Substrate. Radno razređenje supstrata u količini dovoljnoj za jednu

ploču pripremljeno je neposredno pred dodavanje, mešanjem 4 µl substrata i 4 ml test pufera. Nakon dodavanja, ploča je poklopljena i inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi.

3. U svaki bazenčić ploče dodato je po 60 µl akceleratora - NA-XTDTM Accelerator, nakon čega je vršeno merenje aktivnosti NA na luminometru ("LUmo", Autobio Labtec Instruments Co. Ltd., Kina). Kao optimalno razređenje virusa koje će biti upotrebljeno u izvođenju testa inhibicije enzimske aktivnosti NA, uzeto je ono kod kojeg se odnos dobijenog signala (usled NA aktivnosti) i pozadinskog signala, nalazi u granicama 10:1 do 40:1. Kao pozadinski signal uzima se vrednost očitana u bazenčiću kontrole testa.

Priprema radnog razređenja oseltamivira

U postupku testiranja upotrebljen je aktivan oblik oseltamivira, oseltamivir-karboksilat (OK), dobijen od strane farmaceutske kompanije "Hoffmann La Roche" Ltd (Švajcarska). Radni rastvor OK pripremljen je na sledeći način:

1. Prvo je pripremljen osnovni 25 mM rastvor OK, rastvaranjem 19,3 mg supstance u 2 ml redestilovane vode. Rastvor je alikvotiran po 50 µl, a alikvoti zamrznuti na temperaturu od -20°C.

2. Radni 500 µM rastvor OK pripremljen je kao 1:50 razređenje osnovnog 25 mM rastvora i redestilovane vode (50 µl osnovnog rastvora i 2450 µl redestilovane vode).

3. Radni rastvor OK upotrebljen je za pripremu serijskih razređenja u test puferu (TP), prema sledećoj shemi:

Razređenje		Koncentracija OK u testu
1 (1:25)	30 µl radno razređenje OK + 720 µl TP	6600 nM
2 (1:5)	100 µl razređenja 1 + 400 µl TP	1320 nM
3 (1:5)	100 µl razređenja 2 + 400 µl TP	264 nM
4 (1:5)	100 µl razređenja 3 + 400 µl TP	52,8 nM
5 (1:5)	100 µl razređenja 4 + 400 µl TP	10,56 nM
6 (1:5)	100 µl razređenja 5 + 400 µl TP	2,11 nM
7 (1:5)	100 µl razređenja 6 + 400 µl TP	0,422 nM
8 (1:5)	100 µl razređenja 7 + 400 µl TP	0,084 nM
9 (1:5)	100 µl razređenja 8 + 400 µl TP	9,917 nM
10 (1:5)	100 µl razređenja 9 + 400 µl TP	0,003 nM
11	400 µl TP	0,0 nM

Izvođenje testa inhibicije aktivnosti neuraminidaze

1. U bazenčiće kolona (1-10) test ploča (Sl. 20) dodato je po 25 µl odgovarajućeg razređenja OK.

2. U bazenčice kolona 11 i 12 dodato je po 25 μ l TP.
3. Razređeni virusni izolati ili referentni virusi, dodati su u zapremini od 25 μ l po bazenčiću u dva reda.
4. U bazenčice 12. kolone dodato je po 25 μ l negativne kontrole.
5. Ploča je poklopljena i inkubirana 20 minuta na temperaturi od 37° C.
6. U svaki bazenčić je dodato po 25 μ l supstrata.
7. Ploča je poklopljena i inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi.
8. U svaki bazenčić dodato je po 60 μ l NA-XTD akceleratora.
9. Očitavanje hemiluminiscencije vršeno je u roku od 2 časa od momenta dodavanja akceleratora, na luminometru ("LUmo", Autobio Labtec Instruments Co. Ltd., Kina).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	6600	1320	264	52,8	10,56	2,11	0,422	0,084	0,017	0,003	0	
A				v	i	r	u	s	1			
B												
C				v	i	r	u	s	2			
D												
E				v	i	r	u	s	3			
F												
G				v	i	r	u	s	4			
H												

Slika 20: Shema izvođenja testa inhibicije aktivnosti neuraminidaze pomoću oseltamivir karboksilata

Analiza rezultata testa

Za izračunavanje IC50 vrednosti, na osnovu vrednosti hemiluminiscencija dobijenih u testu, upotrebljen je program "NA Star NAI Results Excel IC50 Calculation Template", preporučen od strane SZO (http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/nai_phenotyping/en/). Program je razvijen od strane KCR II iz Londona i dobijen ljubaznošću dr Angie Lackenby.

Ispitivanje odabranih influenza A virusa u KCIIR u Londonu

U cilju detaljnije antigenske i genetičke karakterizacije, kao i ispitivanja osetljivosti influence A virusa na antivirusne lijekove, u KCR II u London, poslato su odabrani pozitivni uzorci iz sezone 2012/2013 uključujući: 5 uzoraka pozitivnih na A(H1N1)pdm09 i 2 uzorka pozitivna na A(H3N2) podtip, kao i 4 influenza A pozitivna uzorka za koje rRT PCR testom nije bilo moguće odrediti podtip virusa. Naredne sezone, 2013/2014, poslato je 6 uzoraka pozitivnih na A(H1N1)pdm09, 10 uzoraka pozitivnih na A(H3N2) i 2 influenza A pozitivna uzorka bez

određenog podtipa. Uzorci su odabrani tako da reprezentuju različite faze epidemije, kao i različite kliničke manifestacije influence. U KCRIL, svi uzorci su podvrgnuti izolaciji na MDCK ćelijskim kulturama, a izolati koji su u RH imali titrove ≥ 40 ispitani su RIH sa serijom referentnih imunih seruma, uz upotrebu eritrocita zamorca. HA i NA geni 2 A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013 i 4 iz sezone 2013/2014, kao i 2 A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013 i 7 iz sezone 2013/2014, sekvencirani su. Na osnovu sekvenci HA gena virusa iz naše sredine, referentnih virusa i virusa iz drugih geografskih područja, deponovanih u GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) bazi podataka, konstruisana su filogenetska stable za svaki podtip i sezonu. Filogenetska analiza bazirana na "Maximum likelihood" metodi izvršena je upotrebom programskog paketa "PAML" koji koristi "RAxML" algoritam za poravnavanje sekvenci [142]. Podaci dobijeni sekvenciranjem NA gena upotrebljeni su za uočavanje poznatih mutacija povezanih sa rezistencijom na NAI. Pored toga, svi izolati su ispitani na osetljivost prema oseltamiviru, testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze. Rezultati antigenskog ispitivanja, rezultati ispitivanja antivirusne rezistencije i filogenetska stabla, dostavljeni su NIC Novi Sad.

Statistička analiza rezultata istraživanja

Kategorijske varijable su predstavljene apsolutnim vrednostima i procentualnom zastupljenošću u grupama. Utvrđivanje značajnosti razlika u učestalosti ovih obeležja, unutar relevantnih grupa, vršeno je Fišerovim egzaktnim testom ili χ^2 testom. Vrednost $p < 0,05$ ukazivala je na statističku značajnost razlike.

Za utvrđivanje faktora rizika, odnosno prediktivnih faktora za nastanak teških oblika bolesti, upotrebljena je logistička regresiona analiza. Rezultati su predstavljeni kao stepeni verovatnoće (OR - odds ratios) uz 95% intervale poverenja (CI - confidence interval) i p-vrednosti. Varijable sa vrednošću $p < 0,05$ u univarijantnoj logističkoj analizi, uključene su u multivarijantni logistički regresioni model. Statistička značajnost određivana je na nivou $p < 0,05$. Statističke analize su izvedene pomoću statističkog softvera SPSS (verzija 21).

Sastav i način pripreme hranljivih podloga i rastvora

Hranljive podloge i rastvori, potrebni za izvođenje eksperimentalnog dela rada, pripremljeni su prema uputstvu SZO [116].

Priprema osnovne hranljive podloge:

Reagens	Količina	Koncentracija
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	13,4 g	
Radni rastvor penicilina/streptomicina	10 ml	100 U/ml / 100µg/ml
Goveđi albumin, frakcija V (7,5%)	25 ml	0,2%
Sterilna, redestilovana voda	do 1 l	

Priprema podloge za umnožavanje MDCK ćelija

Reagens	Količina	Koncentracija
Osnovna hranljiva podloga	450 ml	
Fetalni goveđi serum	50 ml	10%

Priprema podloge za umnožavanje influenza A virusa

Reagens	Količina	Koncentracija
Osnovna hranljiva podloga	500 ml	
Rastvor TPCK-tripsina (2 mg/ml)	0,5 ml	0,2 µg/ml

Nakon pripreme, pH podloga je podešen na 7,2-7,4 pomoću 1N NaOH, podloge su sterilisane filtracijom (dijametar pora filtra 0,2 µm) i čuvane na temperaturi od 2-8°C u periodu od 4 nedelje.

Priprema radnog rastvora penicilina (10000 U/ml) i streptomicina (10000 µg/ml)

Reagens	Količina	Koncentracija
Osnovna hranljiva podloga	100 ml	
Streptomicin	1 g	10000 µg/ml
Penicilin	0,603 g	10000 U/ml

Nakon pripreme, radni rastvor antibiotika je alikvotiran i čuvan na temperaturi od -20°C.

Priprema rastvora TPCK-tripsina (2 mg/ml)

Reagens	Količina	Koncentracija
Osnovna hranljiva podloga	10 ml	
TPCK-tripsin	20 mg	2 mg/ml

Priprema rastvora TPCK-tripsina (3 mg/ml)

Reagens	Količina	Koncentracija
Osnovna hranljiva podloga	6,7 ml	
TPCK-tripsin	20 mg	3 mg/ml

Rastvori TPCK-tripsina su sterilisani filtracijom (dijametar pora filtra 0,2 μ m), alikvotirani i zamrznuti na temperaturu od -20°C.

Priprema osnovnog rastvora PBS

Reagens	Količina
Dinatrijum hidrogen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	2,74 g
Natrijum dihidrogen fosfat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	0,79 g
Redestilovana voda	100 ml

Priprema radnog rastvora PBS

Reagens	Količina
PBS 25x	40 ml
Natrijum hlorid (NaCl)	8,5 g
Redestilovana voda	Do 1 l

Nakon pripreme radnog rastvora PBS, pH rastvora je podešen na vrednost 7,2 +/- 0,1 sa 1N NaOH, a zatim je izvršena sterilizacija autoklaviranjem (15 minuta na 121°C). Rastvori su čuvani na temperaturi od 2-8°C.

Priprema fiziološkog rastvora (0,9%)

Reagens	Količina
Natrijum hlorid (NaCl)	9,0 g
Redestilovana voda	1 l

Rastvor je sterilisan autoklaviranjem (15 minuta na 121° C) i čuvan na temperaturi od 2-8° C.

REZULTATI

Rezultati dokazivanja influenza A virusa u respiratornim uzorcima rRT PCR testom

Rezultati rRT PCR testiranja grupisani su tako da ukažu na sezonsku i uzrastnu distribuciju influenza virusa, kao i na njihovu zastupljenost u zavisnosti od kliničke manifestacije bolesti i prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja (HB/S). Posebno su pretstavljani rezultati ispitivanja faktora rizika za nastanak teških oblika bolesti.

Sezonska distribucija influenza A virusa

Rezultati rRT PCR testiranja uzoraka, koji ukazuju na zastupljenost tipova influenza virusa i podtipova influenza A virusa u toku četiri uzastopne sezone, dati su u tabeli 7. Od ukupno 887 testiranih uzoraka, influenza virusi su dokazani kod 411 (46,3%), pri čemu su influenza A virusi bili signifikantno češće detektovani (73%, 300/411) u odnosu na influenza B viruse (27%, 111/411, $p < 0,0001$). Među influenza A pozitivnim uzorcima, približno jednako su bili zastupljeni podtipovi A(H1N1)pdm09 (48%, 114/300) i A(H3N2) (52%, 156/300).

Tabela 7: Zastupljenost influenza virusa u uzorcima ispitanim u periodu 2010/2011-2013/2014

Sezona	Broj analiziranih uzoraka	Broj influenza pozitivnih (%)	Broj influenza A pozitivnih (%)	Broj influenza B pozitivnih (%)	p^1	Broj Influenca A(H1N1)pdm09 pozitivnih (%)	Broj influenza A(H3N2) pozitivnih (%)	p^2
2010/11	88	54 (61,4)	46 (85,2)	8 (14,8)	<0,0001	46 (100)	0	<0,0001
2011/12	82	52 (63,4)	50 (96,1)	2 (3,9)	<0,0001	0	50 (100)	<0,0001
2012/13	378	189 (50)	88 (46,6)	101(53,4)	>0,05	66 (75)	22 (25)	<0,0001
2013/14	339	116 (34,2)	116 (100)	0	<0,0001	32 (27,6)	84 (72,4)	<0,0001
Ukupno	887	411 (46,3%)	300 (73%)	111 (27%)	<0,0001	144 (48)	156 (52)	>0,05

¹p - statistička značajnost razlike u procentualnoj zastupljenosti influenza A i B pozitivnih uzoraka

²p - statistička značajnost razlike u procentualnoj zastupljenosti influenza A(H1N1)pdm09 i A(H3N2) pozitivnih uzoraka

Procenat pozitivnih uzoraka u prve dve sezone, nije se bitno razlikovao i iznosio je 61,4% (54/88) u sezoni 2010/2011 i 63,4% (52/82) u sezoni 2011/2012. U toku naredne sezone, 2012/2013, influenza virusi su detektovani u 50% (189/378) ispitanih uzoraka što je bilo signifikantno manje u odnosu na sezonu 2010/2011 ($p=0,0251$), kao i sezonu 2011/2012 ($p=0,054$). Sledeće sezone, 2013/2014, prisustvo influenza virusa dokazano je kod 34,2% (116/339) analiziranih uzoraka, što je bilo statistički značajno manje u poređenju sa svim

prethodnim sezonama ($p < 0,0001$).

U grupi pozitivnih pacijenata, influenza A virusi su dominirali u odnosu na influenza B viruse tokom sezona 2010/2011 (85,2%, 46/54 naspram 14,8% 8/54, $p < 0,0001$), 2011/2012 (96,1%, 50/52 naspram 3,9%, 2/52, $p < 0,0001$) i 2013/2014 u toku koje su jedino oni i dokazani (100%, 116/116 naspram 0%, $p < 0,0001$). Nasuprot tome, u sezoni 2012/2013 influenza A virusi bili su zastupljeni u manje od pola (46,6%, 88/189) pozitivnih uzoraka. To je bila jedina sezona u kojoj je procenat influenza B pozitivnih uzoraka (53,4%, 101/189) bio veći u odnosu na procenat influenza A pozitivnih, mada ta razlika nije bila statistički značajna.

Svi influenza A pozitivni slučajevi u toku 2010/2011 bili su izazvani A(H1N1)pdm09 podtipom (100%, 46/46), a u toku 2011/2012, A(H3N2) podtipom (100%, 50/50). U toku naredne dve sezone detektovna su oba influenza A podtipa. U sezoni 2012/2013, dominantan je bio A(H1N1)pdm09 podtip, detektovan u 75% (66/88), dok je prisustvo A(H3N2) podtipa otkriveno kod 25% (22/88, $p < 0,0001$) influenza A pozitivnih uzoraka. Kod 95,5% (84/88) pozitivnih uzoraka, podtip virusa je utvrđen u laboratoriji NIC Novi Sad, dok je kod 4,5% (4/88) uzorka podtip A(H1N1)pdm09 određen naknadno, u KCRIL u Londonu. Naredne sezone, 2013/2014, A(H3N2) podtip je dokazan kod 72,4% (84/116) pozitivnih uzoraka, što je bilo signifikantno više u odnosu na A(H1N1)pdm09 podtip čije prisustvo je potvrđeno kod 27,6% (32/116, $p < 0,0001$) pozitivnih. Podtipizacija je bila uspešna kod 98,3% (114/116) detektovanih virusa, dok je kod 1,7% (2/116) virusa određen A(H3N2) podtip u KCRIL u Londonu. U periodu obuhvaćenom ovim istraživanjem, prisustvo influenza A(H1N1) podtipa, kao i avijarnih H5 i H7 podtipova, nije dokazano ni u jednom analiziranom uzorku.

Uzrastna distribucija influenza A virusa

Procenat pozitivnih pacijenata i zastupljenost influenza A podtipova, u pojedinim uzrastnim grupama, varirali su od sezone do sezone (Tab. 8). U uzrastnoj grupi dece od 5-14 godina, u svim sezonama zabeležen je najveći procenat pozitivnih, izuzev u sezoni 2012/2013, kada je procentualno najviše pozitivnih bilo u uzrastnoj grupi 15-29 godina. Zbirni rezultati za sve sezone, takođe ukazuju da su influenza A virusne infekcije bile najčešće kod dece starosti 5-14 godina (48,2%, 77/160). Procenat pozitivnih slučajeva u toj uzrastnoj grupi bio je signifikantno viši u odnosu na procenat pozitivnih u uzrastnim grupama 0-4 godina (20,2%, 18/89, $p < 0,0001$), 30-64 godina (32,7%, 127/389, $p = 0,0009$) i ≥ 65 godina (25%, 31/124, $p < 0,0001$).

Influenca A(H3N2) podtip dominirao je kod dece uzrasta ≤ 14 godina, dok je u starijim uzrastnim grupama preovladavao A(H1N1)pdm09 podtip. Podtip A(H3N2) je detektovan kod 72,2% (13/18) dece uzrasta do 4 godine i kod 75,3% (58/77) dece uzrasta 5-14 godina, što je bilo signifikantno više u odnosu na A(H1N1)pdm09 podtip koji je registrovan kod 27,8% (5/18, $p = 0,0381$) pacijenata uzrasta 0-4 godine i 24,7% (19/160, $p < 0,0001$) pacijenata uzrasta 5-14

godina. Nasuprot tome, procenat A(H1N1)pdm09 pozitivnih, u odnosu na procenat A(H3N2) pozitivnih, bio je statistički značajno viši u uzrastnoj grupi 15-29 godina (66%, 31/47 naspram 34%, 16/47, $p=0,0400$) i 30-64 godina (55,9%, 71/127, naspram 44,1%, 56/127, $p=0,0215$). Iako je i kod najstarijih pacijenata, uzrasta ≥ 65 godina češće registrovan A(H1N1)pdm09 podtip (58,1%, 18/31), u poređenju sa A(H3N2) podtipom (41,9%, 13/31), ta razlika nije bila signifikantna.

Tabela 8: Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od uzrasta pacijenata

Uzrastna grupa	Broj analiziranih	Broj influenza A pozitivnih (%)	Broj A(H1N1)pdm09 pozitivnih (%)	Broj A(H3N2) pozitivnih (%)	p
Sezona 2010/2011					
0-4	1	0 (0)	0 (0)	0	-
5-14	10	6 (60)	6 (100)	0	0,0022
15-29	24	9 (37,5)	9 (100)	0	<0,0001
30-64	47	29 (61,7)	29 (100)	0	<0,0001
≥ 65	6	2 (33,3)	2 (100)	0	0,3333
Sezona 2011/2012					
0-4	9	7 (77,8)	0	7 (100)	0,0006
5-14	33	26 (78,8)	0	26 (100)	<0,0001
15-29	11	4 (36,4)	0	4 (100)	0,0296
30-64	23	13 (56,5)	0	13 (100)	<0,0001
≥ 65	6	0 (0)	0	0	-
Sezona 2012/2013					
0-4	29	5 (17,2)	3 (60)	2 (40)	>0,05
5-14	64	14 (21,8)	7 (50)	7 (50)	>0,05
15-29	41	18 (43,9)	16 (88,9)	2 (11,1)	<0,0001
30-64	180	39 (21,7)	28 (71,8)	11 (28,2)	0,0002
≥ 65	64	12 (18,8)	12 (100)	0	<0,0001
Sezona 2013/2014					
0-4	50	6 (12)	2 (33,3)	4 (66,7)	>0,05
5-14	53	31 (58,5)	6 (19,3)	25 (80,6)	0,0009
15-29	49	16 (32,6)	6 (37,5)	10 (62,5)	>0,05
30-64	139	46 (33,1)	14 (30,4)	32 (69,6)	0,0114
≥ 65	48	17 (35,4)	4 (23,5)	13 (76,5)	>0,05
Ukupno					
0-4	89	18 (20,2)	5 (27,8)	13 (72,2)	0,0381
5-14	160	77 (48,2)	19 (24,7)	58 (75,3)	<0,0001
15-29	125	47 (37,6)	31 (66)	16 (34)	0,04
30-64	389	127 (32,7)	71 (55,9)	56 (44,1)	0,0215
≥ 65	124	31 (25)	18 (58,1)	13 (41,9)	>0,05

Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničkih manifestacija influence

Zastupljenost influenza A virusa u odnosu na težinu kliničke slike obolenja i sezoni virusološkog nadzora, pretstavljani su u tabeli 9. U sezoni 2010/2011, razlike u procentu pozitivnih među pacijentima sa različitim kliničkim manifestacijama nisu bile signifikantne. Nasuprot tome, procenat pozitivnih ILI slučajeva bio je značajno viši u odnosu na SARI i ARDS slučajeve u sezonama 2011/2012 (74,6%, 47/63 naspram 12,5%, 1/8, $p=0,0012$ i 18,2%, 2/11, $p=0,0006$) i 2013/2014 (44,1%, 60/136 naspram 28,3%, 49/173, $p=0,0057$ i 14,8%, 4/27, $p=0,0046$). U sezoni 2012/2013, procenat pozitivnih ARDS slučajeva (3,2%, 1/31) bio je značajno niži u odnosu na ILI slučajeve (28,2%, 31/110, $p=0,0028$) i SARI slučajeve (22,3%, 52/233, $p=0,0085$). Sumirani rezultati za sve četiri godine virusološkog nadzora ukazuju da su influenza virusi značajno češće dokazani kod pacijenata sa ILI (43,7%, 153/350) u odnosu na pacijente sa SARI (28,1%, 126/449, $p<0,0001$) i ARDS (15,4%, 12/78, $p<0,0001$). Pored toga, procenat pozitivnih SARI slučajeva bio je signifikantno veći od procenta pozitivnih ARDS slučajeva ($p=0,0178$). Prisustvo influenza A virusa je potvrđeno kod 9 od 10 (90%) slučajeva sa smrtnim ishodom i to kod 2 u sezoni 2010/2011, 4 u sezoni 2012/2013 i 3 u sezoni 2013/2014.

U poslednje dve sezone virusološkog nadzora, u toku kojih su detektovana oba podtipa influenza A virusa, njihova zastupljenost u grupama pozitivnih pacijenata sa različitim manifestacijama bolesti, varirala je. U toku sezone 2012/2013, oba podtipa su bila približno isto zastupljena kod pacijenata sa ILI, ali je u grupi pacijenata sa SARI, A(H1N1)pdm09 dominirao (84,6%, 44/52) u odnosu na A(H3N2) podtip (15,4%, 8/52, $p=0,0005$). Pored toga, svi slučajevi ARDS (5/5, 100%) bili su izazvani A(H1N1)pdm09 podtipom. Naredne sezone, 2013/2014, A(H3N2) podtip je, u poređenju sa A(H1N1)pdm09 podtipom, signifikantno više bio zastupljen i kod pacijenata sa ILI (75%, 45/60 naspram 25%, 15/60, $p=0,0001$), kao i kod pacijenata sa SARI (75,5%, 37/49 naspram 24,5%, 12/49, $p=0,0005$). Kod 4 pacijenta sa ARDS, oba podtipa bila su podjednako prisutna.

Zbirni rezultati ukazuju da je influenza A(H1N1)pdm09 podtip dokazan značajno češće kod SARI slučajeva (63,5%, 80/126) u odnosu na A(H3N2) podtip (36,5%, 46/126, $p<0,0001$). Pored toga, 66,7% (8/12) pozitivnih ARDS slučajeva bilo je uzrokovano A(H1N1)pdm09 podtipom, a svega 33,3% (4/12) A(H3N2) podtipom, mada ta razlika nije bila statistički značajna. Takođe, svih 9 fatalnih slučajeva kod kojih je dokazano prisustvo virusa influence, bili su izazvani A(H1N1)pdm09 podtipom. Nasuprot tome podtip A(H3N2) je značajno češće bio prisutan kod pacijenata sa ILI (69,3%, 106/153) u odnosu na A(H1N1)pdm09 (30,7%, 47/153, $p<0,0001$).

Tabela 9: Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničke manifestacije influence

Kliničke manifestacije bolesti	Broj analiziranih	Broj influenza A pozitivnih (%)	Broj A(H1N1)pdm09 pozitivnih (%)	Broj A(H3N2) pozitivnih (%)	p
Sezona 2010/2011					
ILI	41	15 (36,6)	15 (100)	0	<0,0001
SARI	35	16 (45,7)	24 (100)	0	<0,0001
ARDS	9	5 (55,5)	5 (100)	0	>0,05
Fatalni ishod	3	2 (66,7)	2 (100)	0	>0,05
Sezona 2011/2012					
ILI	63	47 (74,6)	0	47 (100)	<0,0001
SARI	8	1 (12,5)	0	1(100)	>0,05
ARDS	11	2 (18,2)	0	2 (100)	>0,05
Fatalni ishod	0	0	0	0	-
Sezona 2012/2013					
ILI	110	31 (28,2)	17 (54,8)	14 (45,2)	>0,05
SARI	233	52 (22,3)	44 (84,6)	8 (15,4)	<0,0001
ARDS	31	1 (3,2)	5 (100)	0	>0,05
Fatalni ishod	4	4 (100)	4 (100)	0	>0,05
Sezona 2013/2014					
ILI	136	60 (44,1)	15 (25)	45 (75)	0,0001
SARI	173	49 (28,3)	12 (24,5)	37 (75,5)	0,0005
ARDS	27	4 (14,8)	2 (50)	2 (50)	>0,05
Fatalni ishod	3	3 (100)	3 (100)	0	>0,05
Ukupno					
ILI	350	153 (43,7)	47 (30,7)	106 (69,3)	<0,0001
SARI	449	126 (28,1)	80 (63,5)	46 (36,5)	<0,0001
ARDS	78	12 (15,4)	8 (66,7)	4 (33,3)	>0,05
Fatalni ishod	10	9 (90)	9 (100)	0	0,0039

ILI – influenza-like illness (obolenje nalik influenci); SARI – Severe acute respiratory illness (teška akutna respiratorna bolest); ARDS - akutni respiratorni distress sindrom

Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja

Jedno ili više HB/S, registrovano je kod 316 (35,6%) od 887 analiziranih pacijenata, odnosno kod 122 (40,7%) od 300 influenza pozitivnih. Podaci vezani za zastupljenost influenza A virusa i odgovarajućih podtipova virusa u zavisnosti od prisustva i vrste HB/S, predstavljeni su u tabeli 10. Procenat influenza A pozitivnih slučajeva nije se bitno razlikovao u grupi pacijenata sa HB/S (38,6%, 122/316) i bez HB/S (31,2%, 178/571). Značajno veći procenat pozitivnih zabeležen je kod pacijenata sa jednom HB/S (45,8%, 87/190) u odnosu na one sa više njih (27,8%, 35/126, p=0,0081). U grupama pacijenata sa pojedinačnim HB/S, najveći procenat influenza A pozitivnih, zabeležen je kod gojaznih pacijenata (53,3%, 8/15) i

gravidnih žena (52,9%, 9/17), a najniži kod pacijenata sa hroničnim respiratornim bolestima (28,9%, 20/69).

U grupi pozitivnih pacijenata bez HB/S, A(H3N2) podtip je bio značajno više prisutan (66,3%, 118/178) u odnosu na A(H1N1)pdm09 podtip (33,7%, 60/178, $p < 0,0001$). Nasuprot tome, A(H1N1)pdm09 je bio signifikantno više zastupljen kod pozitivnih pacijenata sa HB/S (68,8%, 84/122) i to kako u grupi pacijenata sa jednim (66,7%, 58/87) tako i u grupi pacijenata sa više faktora rizika (74,3%, 26/35), u odnosu na A(H3N2) podtip (31,2%, 38/122, $p < 0,0001$; 33,3%, 29/87, $p = 0,0025$; 25,7%, 9/35, $p = 0,0060$, respektivno). Takođe, A(H1N1)pdm09 podtip je procentualno više bio prisutan u svim grupama sa pojedinačnim HB/S, mada je statistička značajnost utvrđena samo kod pacijenata sa malignitetima (81,8%, 18/22, naspram 18,2%, 4/22, $p = 0,0043$) i hroničnim bolestima bubrega ili jetre (76%, 19/25 naspram 24%, 6/25, $p = 0,0146$).

Tabela 10: Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja

	Broj influenca A negativnih (%)	Broj influenca A pozitivnih (%)	Broj influenza A(H1N1)pdm09 pozitivnih (%)	Broj Influenca A(H3N2) pozitivnih (%)	p
Hronična bolest ili stanje					
Bez HB/S	393 (68,8)	178 (31,2)	60 (33,7)	118 (66,3)	<0,0001
Sa HB/S	194 (61,4)	122 (38,6)	84 (68,8)	38 (31,2)	<0,0001
Jedna HB/S	103 (57,2)	87 (45,8)	58 (66,7)	29 (33,3)	0,0025
Više HB/S	91 (72,2)	35 (27,8)	26 (74,3)	9 (25,7)	0,0060
Najčešće hronične bolesti ili stanja					
Hronične KVS bolesti	52 (53)	46 (46,9)	30 (65,2)	16 (34,8)	>0,05
Hronične respiratorne bolesti	49 (71)	20 (28,9)	11 (55)	9 (45)	>0,05
Dijabetes	32 (69,6)	14 (30,4)	11 (78,6)	3 (21,4)	>0,05
Malignitet	36 (62)	22 (37,9)	18 (81,8)	4 (18,2)	0,0043
Imunodefijencija	43 (55,2)	35 (44,8)	23 (65,7)	12 (34,3)	>0,05
Hronična bolest bubrega/jetre	46 (64,8)	25 (35,2)	19 (76)	6 (24)	0,0146
Gojaznost	7 (46,7)	8 (53,3)	5 (62,5)	3 (37,5)	>0,05
Trudnoća	8 (47)	9 (52,9)	5 (55,6)	4 (44,4)	>0,05

HB/S – hronična bolest ili stanje, za pacijente sa više HB/S računato je svaka pojedinačna HB/S; KVS - kardiovaskularne bolesti; Gojaznost – indeks telesne mase ≥ 30

Faktori rizika za nastanak teških oblika influence

U tabeli 11, prikazana je uzrastna distribucija, zastupljenost 2 podtipa virusa i HB/S u grupama pacijenata sa lakšim i težim kliničkim slikama influence. Procenat infekcija koje su prošle bez komplikacija (51%, 153/300) i procenat svih komplikovanih slučajeva zajedno (49%, 147/300) bio je približno isti. Influenca virusna infekcija signifikantno češće se

manifestovala u vidu ILI kod dece uzrasta 0-4 godine (88,9%, 16/18) i 5-14 godina (93,5%, 72/77), nego u vidu težih oblika bolesti, koje su registrovane kod 11,1% (2/18, $p=0,0013$) dece uzrasta 0-4 godina i kod 6,5% (5/77, $p<0,0001$) dece starosti 5-14 godina. Deca uzrasta ≤ 14 godina činila su 57,5% (88/153) svih ILI slučajeva. Kod odraslih uzrasta 15-29 godina, nije se bitno razlikovala zastupljenost lakših oblika bolesti i komplikovanih oblika infekcije. Teški slučajevi bolesti značajno su dominirali u uzrastnoj grupi 30-64 godina (67,7%, 86/127, naspram 32,3%, 41/127 lakših slučajeva bolesti, $p<0,0001$) i ≥ 65 godina (87,1%, 27/31, naspram 12,9%, 4/31 slučajeva ILI, $p<0,0001$). Najzastupljeniji među teškim slučajevima bili su pacijenti uzrasta 30-64 godina (58,5%, 86/147). Kod 3% (9/300) influenza A pozitivnih pacijenata, odnosno kod 6,1% (9/147) teških slučajeva obolenja, bolest se završila fatalno. Smrtnim ishodom okončalo se 3,7% (1/27) teških infekcija u uzrastnoj grupi 15-29 godina, 7% (6/86) u uzrastnoj grupi 30-64 godine i 7,4% (2/27) u najstarijoj uzrastnoj grupi ≥ 65 godina starosti. Od 9 umrlih pacijenata, 6 (66,7%) je pripadalo uzrastnoj grupi 30-64 godine.

U grupi pacijenata sa A(H1N1)pdm09 infekcijama, 67,4% (97/144) je imalo teški oblik bolesti, dok se kod preostalih 32,6% (47/144) pacijenata bolest manifestovala kao ILI. Nasuprot tome kod pacijenata sa A(H3N2) infekcijama, 68% (106/156) je imalo lakši oblik, a 32% (50/156, $p<0,0001$) teži oblik influence. Pored toga, 9,3% (9/97) komplikovanih slučajeva influence izazvane A(H1N1)pdm09 podtipom završilo se smrću, dok fatalni ishodi nisu zabeleženi kod pacijenata sa A(H3N2) infekcijama.

U grupi pacijenata bez HB/S, dominirali su lakši slučajevi oboljenja (78,1%, 139/176), naspram teških slučajeva (21,9%, 39/176, $p<0,0001$). U grupi pozitivnih pacijenata sa HB/S, zabeleženo je značajno više komplikovanih slučajeva (88,5%, 108/122) u odnosu na slučajeve ILI (11,5%, 14/122, $p<0,0001$). Procenat teških slučajeva influence bio je signifikantno viši u poređenju sa procentom ILI slučajeva, kako u grupi pacijenata sa jednom HB/S (85%, 74/87 naspram 15%, 13/87, $p<0,0001$), tako i kod pacijenata sa više HB/S (97,1%, 34/35 naspram 2,9%, 1/35, $p<0,0001$). Nije utvrđena značajna razlika u proporciji teških oblika infekcije između pacijenata sa jednom (85%, 74/87) ili više (97%, 34/35) HB/S. U grupi pacijenata sa HB/S veći procenat komplikovanih slučajeva imao je fatalan kraj (7,4%, 8/108) u odnosu na grupu pacijenata bez HB/S, (2,6%, 1/39), ali ta razlika nije bila statistički značajna. Međutim, čak 88,9% (8/9) pacijenata koji su umrli, imalo je neku od HB/S, a samo 11,1% (1/9, $p=0,0391$) je bilo bez HB/S. Procenat komplikovanih slučajeva oboljenja u odnosu na ILI, bio je signifikantno veći kod svih grupa pacijenata sa pojedinim HB/S.

Od 8 umrlih pacijenata sa registrovanom HB/S, četvero je imalo po jedan komorbiditet i to hroničnu kardiovaskularnu bolest, dijabetes, malignitet ili imunodeficijenciju. Preostali su imali po dve HB/S u kombinacijama: gojaznost i hronično oboljenje srca, malignitet i hronično oboljenje srca, malignitet i imunodeficijencija, gojaznost i hronična respiratorna bolest.

Tabela 11: Faktori rizika za nastanak teških oblika influence

Faktor rizika	Broj influenza A pozitivnih	Broj slučajeva ILI (%)	Broj slučajeva SARI /ARDS/ Fatalni ishod (%)	Broj slučajeva sa fatalnim ishodom (%)	p
Uzrastna grupa					
0-4	18	16 (88,9)	2 (11,1)	0	0,0013
5-14	77	72 (93,5)	5 (6,5)	0	<0,0001
15-29	47	20 (42,5)	27 (57,5)	1 (3,7)	>0,05
30-64	127	41 (32,3)	86 (67,7)	6 (7)	<0,0001
≥ 65	31	4 (12,9)	27 (87,1)	2 (7,4)	<0,0001
Ukupno	300	153 (51)	147 (49)	9 (6,1)	>0,05
Influenca A podtip					
(H1N1pdm09)	144	47 (32,6)	97 (67,4)	9 (9,3)	<0,0001
H3N2	156	106 (68)	50 (32)	0	<0,0001
Hronična bolest ili stanje					
Bez HB/S	178	139 (78,1)	39 (21,9)	1 (2,6)	<0,0001
Sa HB/S	122	14 (11,5)	108 (88,5)	8 (7,4)	<0,0001
Jedna HB/S	87	13 (15)	74 (85)	4 (5,4)	<0,0001
Više HB/S	35	1 (2,9)	34 (97,1)	4 (11,7)	<0,0001
Najčešće hronične bolesti ili stanja					
Hronične KVS bolesti	44	11 (25)	33 (75)	3 (9,1)	0,0013
Hronične respiratorne bolesti	20	2 (10)	18 (90)	1 (5,5)	0,0004
Dijabetes	13	0	13 (100)	1 (8)	0,0002
Malignitet	22	0	22 (100)	3 (13,6)	<0,0001
Imunodeficijencija	35	1(2,8)	34 (97,2)	2 (5,9)	<0,0001
Hronična bolest bubrega/jetre	23	0	23 (100)	0	<0,0001
Gojaznost	8	0	8 (100)	2 (25)	0,0078
Trudnoća	9	1 (11,1)	8 (88,9)	0	0,0391

ILI –influenza-like illness (obolenje nalik influenci); SARI – Severe acute respiratory illness (teška akutna respiratorna bolest); ARDS - akutni respiratorni distress sindrom; HB/S – hronična bolest ili stanje; KVS - kardiovaskularne bolesti; Gojaznost – indeks telesne mase ≥ 30 ; p - statistička značajnost razlike u procentualnoj zastupljenosti slučajeva ILI i teških slučajeva influence (SARI/ARDS/Fatalni ishod)

Rezultati logističke regresione analize

Logističkom regresionom analizom ispitana je zavisnost nastanka teških, komplikovanih oblika infekcije od uzrasta pacijenta, podtipa influenza virusa, kao i prisustva i vrste HB/S (Tab. 12). Među pacijentima sa dijabetesom, malignitetima, hroničnim bolestima bubrega i jetre i gojaznim pacijentima, nisu zabeleženi slučajevi ILI, usled čega te hronične bolesti/stanja nisu unete u regresionu analizu. Prema rezultatima univarijantne regresione analize, u odnosu na decu uzrasta ≤ 14 godina, pripadnost starijim uzrastnim grupama nosila je 27,1 (95% CI 11,8-61,7, $p < 0,0001$) puta veću verovatnoću od nastanka teških oblika

infekcije. Pored toga, teški oblici bolesti su povezani i sa infekcijama A(H1N1)pdm09 podtipom, koje su nosile 4,4 (95% CI 2,7-7,1, $p < 0,0001$) puta veću šansu od komplikacija gripa u odnosu na infekcije A(H3N2) podtipom. Takođe, postojanje HB/S povećavalo je rizik od nastanka teških formi bolesti za čak 27,5 (95% CI 14,2-53,2, $p < 0,0001$) puta. Analizom pojedinačnih HB/S, signifikantna asocijacija je ustanovljena između teških oblika influence i prisustva hroničnih kardiovaskularnih bolesti (OR 3,9, 95% CI 1,9-8,0, $p < 0,0001$), hroničnih respiratornih obolenja (OR 10,5, 95% CI 2,4-46,2, $p = 0,002$), hroničnih imunodeficijencija (OR 45,7, 95% CI 6,2-339,1, $p < 0,0001$) i trudnoće (OR 8,7, 95% CI 1,1-70,8, $p = 0,042$). Iako su pacijenti sa više HB/S imali veći rizik od nastanka komplikacija u odnosu na pacijente kod kojih je zabeležena samo jedna HB/S, taj rizik nije bio statistički signifikantan (OR 5,9, 95% CI 0,7-47,5, $p = 0,091$).

Tabela 12: Rezultati logističke regresione analize

Varijabla	Univarijantna regresiona analiza			Multivarijantna regresiona analiza		
	OR	95% CI	p	OR	95% CI	p
Uzrast						
≥ 15	27,1	11,9-61,7	<0,0001	10,4	3,9-27,2	<0,0001
Influenca A podtip						
A(H1N1)pdm09	4,4	2,7-7,1	<0,0001	0,5	0,2-0,9	0,0220
Hronične bolesti ili stanja						
Sa HB/S	27,5	14,2-53,2	<0,0001	34,1	6,3-184,1	<0,0001
Više HB/S	5,9	0,7-47,5	0,0910	-	-	-
Hronične KVS bolesti	3,9	1,9-8,0	<0,0001	0,1	0,02-0,6	0,0120
Hronične respiratorne bolesti	10,5	2,4-46,3	0,0020	0,8	0,2-4,5	0,7960
Imunodeficijencija	45,7	6,2-339,1	<0,0001	4,5	0,5-42,8	0,1880
Trudnoća	8,7	1,1-70,8	0,0420	0,4	0,02-5,0	0,4390

OR - Odd ratio - stepen verovatnoće; CI - Confidence interval - interval pozdanosti; HB/S – hronična bolest ili stanje; KVS - kardiovaskularne bolesti

Varijable povezane sa razvojem komplikacija gripa u univarijantnoj analizi uključene su u multivarijantni logistički regresioni model u kojem su samo pripadnost uzrastnim grupama starijim ≥ 15 godina, infekcija A(H1N1)pdm09 podtipom, postojanje faktora rizika i hronične kardiovaskularne bolesti zadržale statističku značajnost. Multivarijantna analiza je pokazala da je između ovih varijabli, najveći rizik od nastanka teških formi bolesti nosilo prisustvo HB/S (OR 34,1, 95% CI 6,3-184,1, $p < 0,0001$), a zatim pripadnost uzrastnoj grupi ≥ 15 godina (OR 10,4, 95% CI 3,9-27,2, $p < 0,0001$). Rizik od nastanka komplikacija influence u slučaju infekcije A(H1N1)pdm09 podtipom (OR 0,5, 95% CI 0,2-0,9, $p = 0,0220$) i prisustva hronične kardiovaskularne bolesti (OR 0,1, 95% CI 0,02-0,6, $p = 0,0120$), bio je niži, ali i dalje statistički značajan.

Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK ćelijskim kulturama i ispitivanja sposobnosti hemaglutinacije

Rezultati pokušaja izolacije influenza A virusa iz respiratornih uzoraka, predstavljeni su u tabeli 13. Influenca A virusi su uspešno izolovani iz 34,3% (70/204) uzoraka koji su bili pozitivni u rRT-PCR testu, u sezonama 2012/2013 i 2013/2014. Procenat uspešnih izolacija u KCRIL u Londonu iznosio je 72,4% (21/29), a u NIC Novi Sad 28% (49/175), što je bila statistički značajna razlika ($p < 0,0001$). Nije uočena signifikantna razlika u procentu uspešnih izolacija između dva influenza A podtipa, kako ukupno gledano, tako ni u okviru dva centra.

Tabela 13: Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK kulturama ćelija i rezultati reakcije hemaglutinacije

Podtip influenza A virusa	Broj virusa podvrgnut izolaciji	Broj virusa koji je dao CPE (%)	Broj virusa koji je u RH imao titar ≥ 40		
			Kokošiji eritrociti	Humani eritrociti	Eritrociti zamorca
A(H1N1)pdm09					
NIC Novi Sad	83	25 (30,1)	2 (8)	4 (16)	14 (56)
KCRIL London	15	9 (60)	NR	NR	9 (100)
Ukupno	98	34 (34,7)			23 (67,6)
A(H3N2)					
NIC Novi Sad	92	24 (26,1)	0	2 (8,3)	15 (62,5)
KCRIL London	14	12 (85,7)	NR	NR	12 (100)
Ukupno	106	36 (33,9)			27 (84,4)
Ukupno					
NIC Novi Sad	175	49 (28)	2 (4,1)	6 (12,2)	29 (59,2)
KCRIL London	29	21 (72,4)	NR	NR	21 (100)
Ukupno	204	70 (34,3)			50 (71,4)

CPE – Citopatogeni efekat; RH – Reakcija hemaglutinacije; NR – Nije rađeno ispitivanje, NIC – Nacionalni influenza centar, KCRIL – Kolaborativni centar za referentnost i istraživanje influence

U NIC Novi Sad, u RH sa eritrocitima zamorca, zadovoljavajuće titrove dalo je 56% (14/25) izolata A(H1N1)pdm09 podtipa, sa humanim eritrocitima 16% (4/25, $p=0,0072$), a sa eritrocitima kokoške svega 8% (2/25, $p=0,0006$). Slično tome, 62,5% (15/24) izolata A(H3N2) podtipa aglutiniralo je eritrocite zamorca u titru ≥ 40 , 8,3% (2/24, $p=0,0002$) humane eritrocite, dok virusi ovog podtipa nisu vršili aglutinaciju kokošijih eritrocita. U KCRIL u Londonu, u RH upotrebljeni su samo eritrociti zamorca, sa kojima su uspešno reagovali svi ispitani influenza A virusi. Sumirani rezultati oba Centra zajedno, ukazuju da su dobri hemaglutinacioni titrovi sa eritrocitima zamorca dobijeni kod 71,4% (50/70) influenza A virusnih izolata, i to kod približno

isto virusa A(H1N1)pdm09 podtipa (67,6%, 23/34) i virusa A(H3N2) podtipa (84,4%, 27/36).

Uspešnost izolacije zavisila je od Ct vrednosti uzorka dobijene u prethodno izvedenom rRT-PCR testu, koja je pokazatelj količine virusa prisutnog u datom uzorku (Tab. 14). U grupi uzoraka sa Ct vrednostima <30, uspešno je izolovano 80,5% (62/77) influenza A virusa, uključujući 76,9% (30/39) virusa A(H1N1)pdm09 podtipa i 84,2% (32/38) virusa H3N2 podtipa. Među uzorcima sa Ct vrednostima 30-34, uspešnost izolacije influenza A virusa, bila je značajno manja, svega 8,7% (8/92) i to 9,3% (4/43) kod virusa A(H1N1)pdm09 podtipa i 8,2% (4/49) kod virusa A(H3N2) podtipa. Iz 35 uzoraka sa Ct vrednostima preko 34, koje su ukazivale na najmanju količinu prisutnog virusa, nije uspešno izolovan ni jedan influenza virus.

Tabela 14: Rezultati izolacije influenza A virusa na MDCK kulturama ćelija u zavisnosti od Ct vrednosti dobijene u rRT PCR testu

Podtip influenza A virusa	Broj izolovanih virusa / broj virusa podvrgnut izolaciji (%)			p
	NIC Novi Sad	KCRIL London	Ukupno	
A(H1N1)pdm09				
Ct vrednost <30	22/30 (73,3)	8/9 (88,9)	30/39 (76,9)	>0,05
Ct vrednost 30-34	3/41 (7,3)	1/2 (50)	4/43 (9,3)	>0,05
Ct vrednost >34	0/12 (0)	0/4 (0)	0/16 (0)	>0,05
A(H3N2)				
Ct vrednost <30	22/28 (78,6)	10/10 (100)	32/38 (84,2)	>0,05
Ct vrednost 30-34	2/47 (4,2)	2/2 (100)	4/49 (8,2)	>0,0051
Ct vrednost >34	0/17 (0)	0/2 (0)	0/19 (0)	>0,05
Ukupno				
Ct vrednost <30	44/58 (75,8)	18/19 (94,7)	62/77 (80,5)	>0,05
Ct vrednost 30-34	5/88 (5,7)	3/4 (75)	8/92 (8,7)	0,0017
Ct vrednost >34	0/29 (0)	0/6 (0)	0/35 (0)	>0,05

Ct – Threshold cycle; NIC – Nacionalni influenza centar; KCRIL – Kolaborativni centar za referentnost i istraživanje influence

Od 175 uzoraka podvrgnutih izolaciji influenza A virusa u NIC Novi Sad, 33,1% (58/175) je u prethodno izvedenom rRT-PCR testu imalo Ct vrednost <30, 50,3% (88/175) je imalo Ct vrednost 30-34, a 16,6% (29/175) Ct vrednost >34. Od 29 uzoraka testiranih u KCRIL u Londonu, 65,5% (19/29) je imalo Ct vrednost <30, 13,8% (4/29) Ct vrednost 30-34, a 20,7% (6/29) Ct vrednost >34. Ukoliko se uporede rezultati dobijeni u NIC Novi Sad i KCRIL u Londonu, statistički značajna razlika u procentu uspešnih izolacija influenza A virusa, dobijena je samo u grupi uzoraka sa Ct vrednostima 30-34, i to ukupno gledano (5,7%, 5/88, naspram 75%, 3/4, p=0,0017), kao i u grupi A(H3N2) pozitivnih uzoraka (4,2%, 2/47, naspram 100%, 2/2, p=0,0051).

Rezultati antigenske i genetičke karakterizacije influenza A virusa

Influenca virusi A(H1N1)pdm09 podtipa

U cilju antigenske karakterizacije, ukupno 9 izolata A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013, kao i 5 izolata iz sezone 2013/2014, koji su u RH dali zadovoljavajuće titrove (≥ 40), testirani su pomoću RIH (Tab. 15). Svi ispitani virusi su pokazali dobru reaktivnost sa antiserumom dobijenim pomoću vakcinalnog virusa A/California/7/2009. Dobijeni titrovi bili su u opsegu četverostruke razlike u odnosu na titar dobijen pomoću referentnog, vakcinalnog virusa.

Tabela 15: Rezultati antigenske karakterizacije izolata influenza A(H1N1)pdm09 virusa

Virusi iz sezone 2012/2013	Titar u RIH sa imunim serumom A/California/7/09	Virusi iz sezone 2013/2014	Titar u RIH sa imunim serumom A/California/7/09
<i>Referentni virus</i>		<i>Referentni virus</i>	
A/California/7/2009	1280	A/California/7/2009	1280
<i>Testirani virusi</i>		<i>Testirani virusi</i>	
A/Serbia/NS-236/2013	640	A/Serbia/NS-741/2013	640
A/Serbia/NS-238/2013	1280	A/Serbia/NS-752/2013	320
A/Serbia/NS-278/2013	640	A/Serbia/NS-757/2013	640
A/Serbia/NS-298/2013	320	A/Serbia/NS-775/2013	640
A/Serbia/NS-302/2013	640	A/Serbia/NS-793/2013	640
A/Serbia/NS-321/2013	640		
A/Serbia/NS-328/2013	1280		
A/Serbia/NS-342/2013	640		
A/Serbia/NS-369/2013	320		

RIH – reakcija inhibicije hemaglutinacije

Rezultati antigenskog ispitivanja 5 A(H1N1)pdm09 izolata iz sezone 2012/2013 pomoću RIH, sprovedenog u KCRIL u Londonu, predstavljeni su u tabeli 16. Ispitani virusi su reagovali dobro sa antiserumom dobijenim pomoću vakcinalnog virusa A/California/7/2009, kao i sa većinom drugih referentnih antiseruma. Dobijeni titrovi su bili u okviru četverostruke razlike u odnosu na titar dobijen sa homologim antigenom. Izuzetak je bio antiserum dobijen pomoću A/Christchurch/16/2010 sa kojim su samo dva ispitana virusa dala zadovoljavajuće titrove i antiserum dobijen sa A/St. Petersburg/27/2011, sa kojim su dobro reagovala samo 3

testirana virusa.

U tabeli 17 dati su rezultati antigenskog ispitivanja 4 A(H1N1)pdm09 izolata iz sezone 2013/2014, sprovedenog u KCRIL u Londonu. I ovi izolati dali su dobre rezultate u RIH kako sa antiserumom protiv vakcinalnog A/California/7/2009 virusa, tako i sa većinom ostalih referentnih imunih seruma. Jedini izuzetak je ponovo bio referentni imuni serum protiv virusa A/Christchurch/16/2010 sa kojim je samo jedan virus dao četverostruko niži, a tri ostala virusa 8 puta niže titrove u odnosu na homologni virus.

Tabela 16: Rezultati antigenske karakterizacije influenza A (H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013, izvedene u KCRII u Londonu

Virusi	Genogrupa	Datum uzorkovanja	Živi sistem	Titar u reakciji inhibicije hemaglutinacije sa eritrocitima zamorca								
				Imuni serum								
				A/Cal 7/09	A/Bayern 69/09	A/Lviv N6/09	A/Chch 16/2010	A/HK 3934/11	A/Astrak 1/11	A/St. P 27/11	A/St. P 100/11	A/HK 5659/12
<i>Referentni virusi</i>												
A/California/7/2009		09.04.2009.	EKJ	1280	1280	1280	640	1280	640	640	1280	640
A/Bayern/69/2009		01.07.2009.	MDCK	160	320	160	80	40	80	80	80	40
A/Lviv/N6/2009		27.10.2009.	MDCK	640	1280	640	320	160	160	160	160	320
A/Christchurch/16/2010	4	12.07.2010.	EKJ	1280	1280	2560	5120	2560	2560	1280	5120	2560
A/Hong Kong/3934/2011	3	29.03.2011.	MDCK	640	160	640	640	1280	640	640	1280	1280
A/Astrakhan/1/2011	5	28.02.2011.	MDCK	1280	640	1280	1280	2560	1280	1280	2560	5120
A/St. Petersburg/27/2011	6	14.02.2011.	EKJ	2560	2560	2560	1280	2560	2560	5120	5120	5120
A/St. Petersburg/100/2011	7	14.03.2011.	EKJ	1280	640	1280	1280	2560	2560	2560	5120	2560
A/Hong Kong/5659/2012	6	21.05.2012.	MDCK	1280	640	2560	1280	2560	1280	1280	5120	2560
<i>Testirani virusi</i>												
A/Serbia/NS-212/2013		18.01.2013.	MDCK	640	640	1280	1280	2560	1280	1280	2560	2560
A/Serbia/NS-223/2013	7	24.01.2013.	MDCK	320	320	320	<u>640</u>	640	640	<u>640</u>	1280	1280
A/Serbia/NS-226/2013		25.01.2013.	MDCK	1280	640	1280	1280	2560	1280	1280	5120	2560
A/Serbia/NS-237/2013	6C	15.02.2013.	MDCK	320	160	640	<u>640</u>	1280	640	<u>640</u>	2560	1280
A/Serbia/NS-442/2013		18.03.2013.	MDCK	640	640	1280	<u>640</u>	1280	1280	1280	2560	2560

MDCK - Madin Darby Canine Kidney ćelijska kultura; EKJ - embrionisana kokošija jaja; podvučeni su titrovi čija je vrednost više od 4 puta niža od vrednosti titra dobijenog sa homologim antigenom

Tabela 17: Rezultati antigenske karakterizacije influenza A (H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014, izvedene u KCRII u Londonu

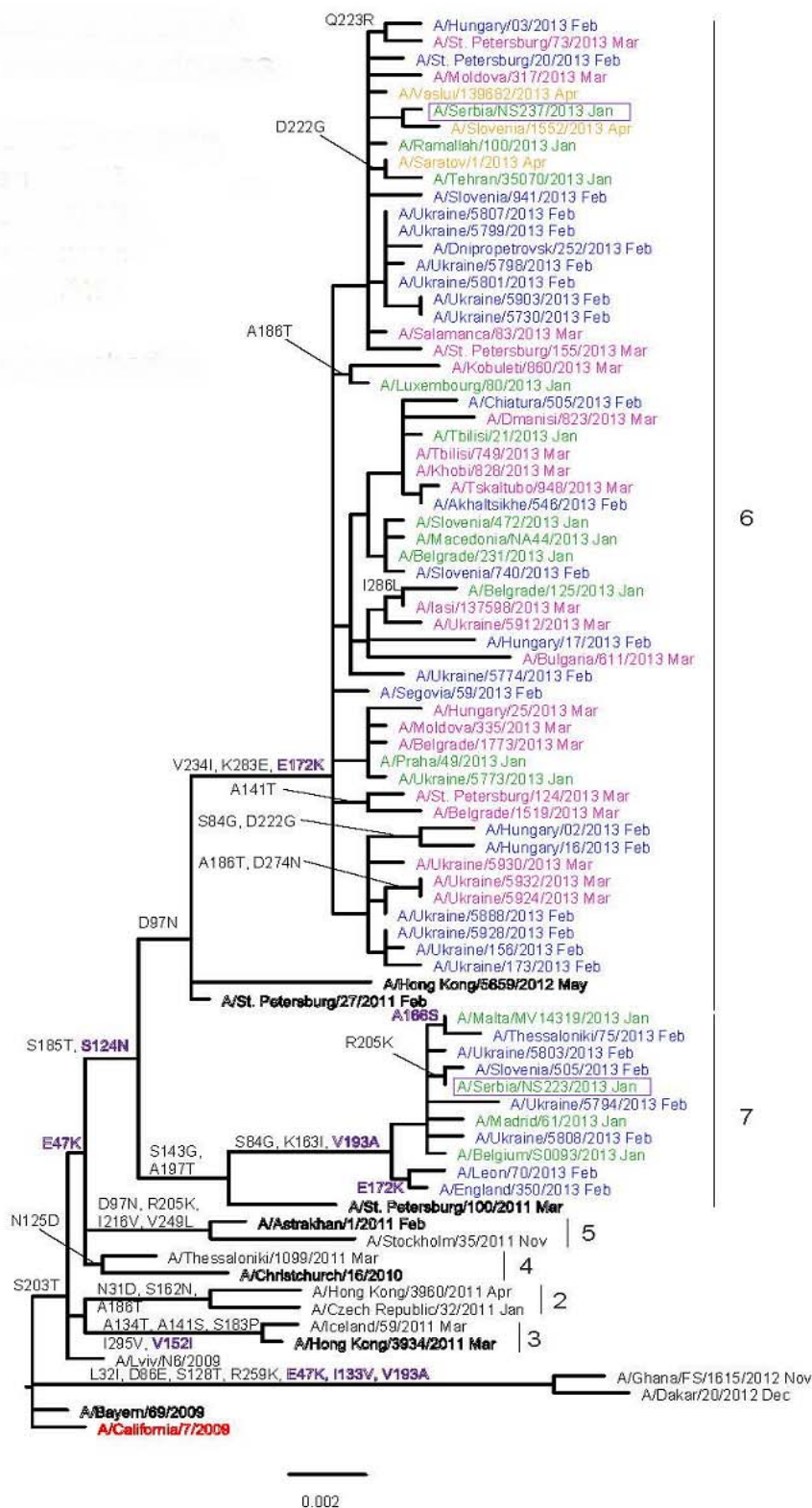
Virusi	Genogrupa	Datum uzorkovanja	Živi sistem	Titar u reakciji inhibicije hemaglutinacije sa eritrocitima zamorca									
				Imuni serumi									
				A/Cal 7/09	A/Bayern 69/09	A/Lviv N6/09	A/Chch 16/2010	A/HK 3934/11	A/Astrak 1/11	A/St. P 27/11	A/St. P 100/11	A/HK 5659/12	A/Sth Afr 3626/13
Referentni virusi													
A/California/7/2009		09.04.2009.	EKJ	640	640	640	160	160	320	320	320	320	320
A/Bayern/69/2009		01.07.2009.	MDCK	160	320	160	40	40	40	40	80	80	80
A/Lviv/N6/2009		27.10.2009.	MDCK	320	1280	640	160	80	80	160	320	640	160
A/Christchurch/16/2010	4	12.07.2010.	EKJ	1280	1280	1280	5120	640	1280	2560	2560	5120	1280
A/Hong Kong/3934/2011	3	29.03.2011.	MDCK	320	160	640	320	640	640	640	1280	1280	640
A/Astrakhan/1/2011	5	28.02.2011.	MDCK	640	320	320	320	640	640	640	1280	2560	640
A/St. Petersburg/27/2011	6	14.02.2011.	EKJ	640	640	640	640	640	1280	1280	2560	2560	1280
A/St. Petersburg/100/2011	7	14.03.2011.	EKJ	640	640	1280	640	640	1280	1280	1280	2560	1280
A/Hong Kong/5659/2012	6A	21.05.2012.	MDCK	320	160	640	640	640	1280	1280	2560	5120	640
A/South Africa/3626/2013	6B	06.06.2013.	EKJ	640	320	640	640	640	640	640	1280	1280	1280
Testirani virusi													
A/Serbia/NS-601/2014	6B	08.01.2014.	MDCK	1280	640	1280	1280	1280	2560	2560	5120	5120	2560
A/Serbia/NS-703/2014	6B	28.02.2014.	MDCK	1280	640	1280	<u>640</u>	2560	2560	2560	5120	2560	2560
A/Serbia/NS-735/2014	6B	06.03.2014.	MDCK	640	320	640	<u>640</u>	1280	1280	1280	2560	2560	1280
A/Serbia/NS-772/2014	6B	18.03.2014.	MDCK	1280	640	1280	<u>640</u>	1280	2560	2560	5120	2560	2560

MDCK - Madin Darby Canine Kidney ćelijska kultura; EKJ - embrionisana kokošija jaja; podvučeni su titrovi čija je vrednost više od 4 puta niža od vrednosti titra dobijenog sa homologim antigenom

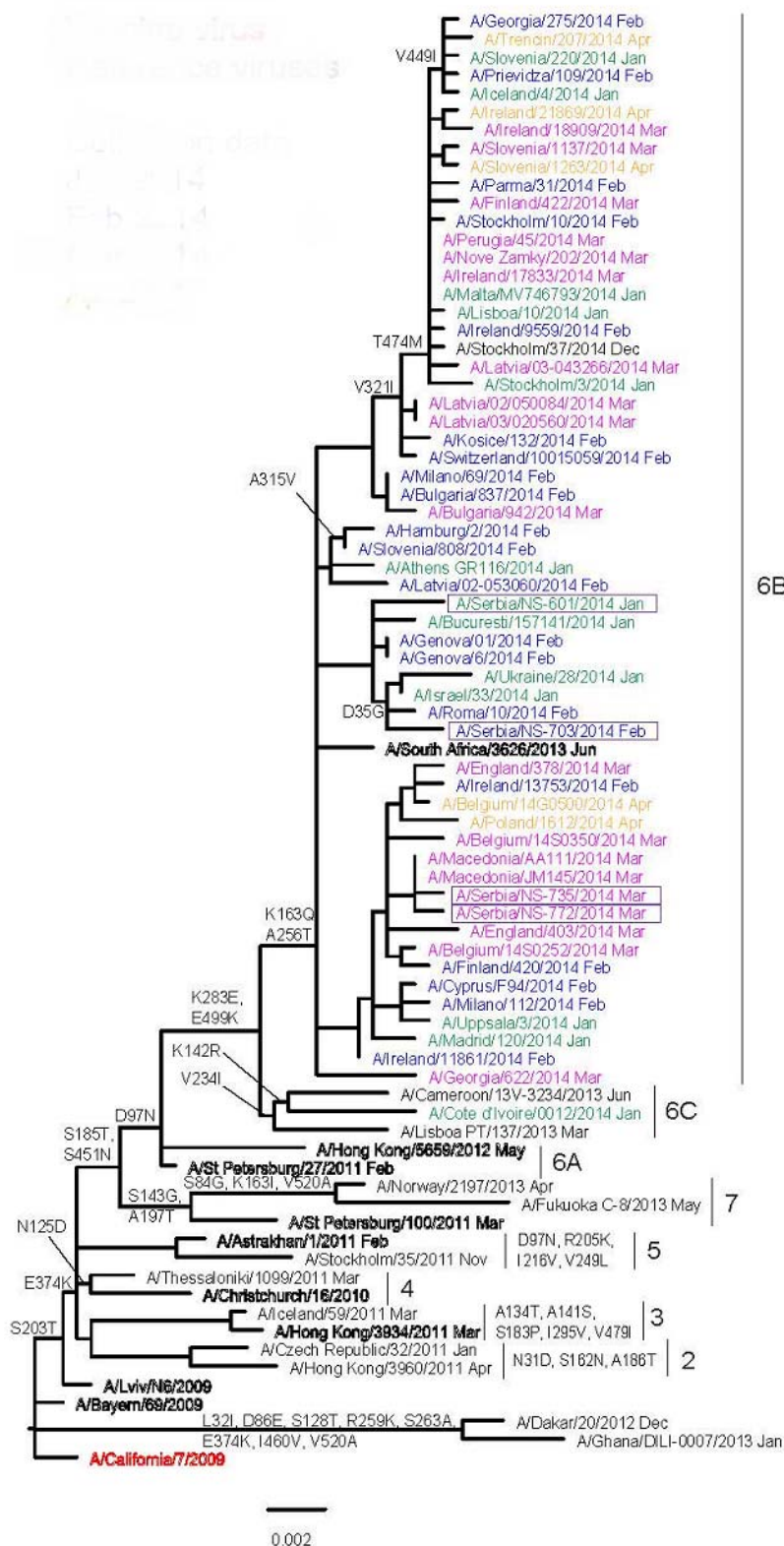
U KCRIL u Londonu, sekvencirani su HA geni dva reprezentativna izolata A(H1N1)pdm09 podtipa iz sezone 2012/2013, a filogenetsko stablo je prikazano na slici 21. Virusi A/Serbia/NS237/2013 i A/Serbia/NS223/2013 pripadali su različitim genetičkim grupama. Oba su bila nosioci mutacija S185T i S203T u HA1, kao i E47K i S124N u HA2 lancu HA molekula, po čemu su se razlikovala od referentnog, vakcinalnog virusa A/California/7/2009, pripadnika prve genetičke grupe. Pored toga, mutacija D97N svrstala je virus A/Serbia/NS237/2013 u 6. genetičku grupu, a mutacije V234I i K283E u HA1, kao i E172K u HA2 molekulu u podgrupu 6C. Ovaj virus je filogenetski bio najrodniji izolatu poreklom iz Slovenije, kao i brojnim virusima koji su u istom periodu cirkulisali u Rusiji i zemljama Istočne Evrope, poput Mađarske, Rumunije, Moldavije, Ukrajine. Na osnovu prisustva mutacija S143G, A197T, S84G i K163I u HA1 molekulu i V193A u HA2 molekulu, virus A/Serbia/NS223/2013 svrstan je u 7. genetičku grupu, zajedno sa izolatima iz Ukrajine, Grčke, Malte, Španije i Belgije. Mutacija R205K činila ga je najrodnijim sa izolatima iz Slovenije kod kojeg je zabeležena ista aminokiselinska substitucija.

Filogenetsko stablo četiri A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014, A/Serbia/NS601/2014, A/Serbia/NS703/2014, A/Serbia/NS735/2014 i A/Serbia/NS772/2014, formirano na osnovu sekvence HA gena, prikazano je na slici 22. Sva četiri virusa pripadala su 6. genetičkoj grupi i podgrupi B, koju odlikuje prisutnost mutacija K163Q i A256T u HA1 molekulu. Virusi A/Serbia/NS735/2014 i A/Serbia/NS772/2014 su bili blisko srodni međusobno, kao i sa izolatima iz Makedonije. Virus A/Serbia/NS601/2014 je bio filogenetski najrodniji izolatima poreklom iz Italije i Rumunije. Prisustvo D35G mutacije u H1 lancu HA molekula bilo je karakteristika manje grupe virusa koju su činili izolat A/Serbia/NS703/2014 i izolati iz Ukrajine, Italije i Izraela.

Nukleotidne sekvence HA gena A(H1N1)pdm09 virusa deponovane su u GISAID bazi podataka: EPI_ISL_144064 (A/Serbia/NS223/2013), EPI_ISL_144065 (A/Serbia/NS237/2013), EPI_ISL_163075 (A/Serbia/NS601/2014), EPI_ISL_163076 (A/Serbia/NS703/2014), EPI_ISL_163077 (A/Serbia/NS735/2014) i EPI_ISL_163078 (A/Serbia/NS772/2014)



Slika 21. Filogenetsko stablo influenza A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013 na osnovu HA gena Crveno - vakcinalni virus; Crno boldovano - referentni virusi; Zeleno - virusi dokazani u januaru 2013. godine; Plavo - virusi dokazani u februaru 2013. godine; Pink - virusi dokazani u martu 2013. godine; Žuto - virusi dokazani u aprilu 2013. godine



Slika 22. Filogenetsko stablo influenca A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014 na osnovu HA gena Crveno - vakcinalni virus; Crno boldovano - referentni virusi; Zeleno - virusi dokazani u januaru 2014. godine; Plavo - virusi dokazani u februaru 2014. godine; Pink - virusi dokazani u martu 2014. godine; Žuto - virusi dokazani u aprilu 2014. godine

Influenca virusi A(H3N2) podtipa

U cilju antigenske karakterizacije, ukupno 5 izolata A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013, i 10 izolata iz sezone 2013/2014, koji su u RIH dali zadovoljavajuće titrove, testirani su pomoću RIH (Tab. 18). Ispitani virusi iz sezone 2012/2013, pokazali su niske titrove reaktivnosti sa antiserumom dobijenim pomoću referentnog A/Victoria/361/2011 virusa umnoženog na jajima, koji je bio u sastavu vakcine za sezonu 2012/2013. Samo 1 izolat je imao titar četverostruko niži od referentnog virusa, dok su ostali izolati imali više od 4 puta niže titrove. Svi izolati iz sezone 2013/2014 imali su više od 4 puta niže titrove sa antiserumom dobijenim sa referentnim A/Texas/50/2012 virusom umnoženim na embrionisanim kokošijim jajima, u odnosu na homologni virus.

Tabela 18: Rezultati antigenske karakterizacije izolata influenza A(H3N2) virusa

Virusi iz sezone 2012/2013	Titar u RIH sa imunim serumom A/Victoria/361/2011	Virusi iz sezone 2013/2014	Titar u RIH sa imunim serumom A/Texas/50/2012
Referentni virus		Referentni virus	
A/Victoria/361/2011	640	A/Texas/50/2012	640
Testirani virusi		Testirani virusi	
A/Serbia/NS-202/2013	80	A/Serbia/NS-654/2014	80
A/Serbia/NS-254/2013	40	A/Serbia/NS-698/2014	80
A/Serbia/NS-269/2013	80	A/Serbia/NS-710/2014	40
A/Serbia/NS-405/2013	80	A/Serbia/NS-714/2014	80
A/Serbia/NS-447/2013	160	A/Serbia/NS-771/2014	80
		A/Serbia/NS-839/2014	40
		A/Serbia/NS-841/2014	40
		A/Serbia/NS-844/2014	80
		A/Serbia/NS-878/2014	80
		A/Serbia/NS-989/2014	80

RIH – reakcija inhibicije hemaglutinacije

Rezultati antigenskog ispitivanja sprovedenog u KCRIL u Londonu (Tab. 19), ukazali su da su oba testirana virusa, pokazala dobru reaktivnost sa imunim serumima dobijenim pomoću referentnih virusa umnoženih u ćelijskim kulturama, poput A/Alabama/5/2010, A/Stockholm/18/2011, A/Berlin/93/2011, A/Athens/112/2012, kao i u kulturi ćelija umnoženom virusu A/Victoria/361/2011. Svi dobijeni titrovi bili su u opsegu dvostruke razlike u odnosu na titrove dobijene sa homolognim virusima. Nasuprot tome, sa imunim serumima dobijenim pomoću virusa umnoženih u embrionisanim kokošijim jajima, među kojima je bio i A/Victoria/361/2011 vakcinalni virus, oba ispitana virusa su imala 8 ili više puta niže RIH titrove, u poređenju sa titrovima homolognih virusa. Od svih imunih seruma pripremljenih

pomoću, na jajima umnoženih virusa, najvišji titrovi su dobijeni sa antiserumiima A/Texas/50/2012 i A/Hawaii/22/2012.

Izolati A(H3N2) podtipa iz sezone 2013/2014, ispitani u KCRIL u Londonu, takođe su pokazali dobru reaktivnost sa imunim serumima dobijenim pomoću virusa umnoženih na ćelijskim kulturama (Tab. 20). Svih 10 izolata dalo je u RIH sa imunim serumima protiv A/Victoria/361/2011, A/Samara/73/2013 i A/Stockholm/06/2014, titrove koji su bili u dvostrukom opsegu u odnosu na titrove homologih virusa. Znatno lošiji rezultati postignuti su sa imunim serumima protiv virusa umnoženih na embrionisanim kokošijim jajima. Samo 2 virusa su u RIH sa imunim serumom dobijenim pomoću referentnog A/Texas/50/2012 virusa koji je bio u sastavu vakcine za sezonu 2013/2014, dala titrove četverostruko niže od titra homologog virusa, dok su svi ostali izolati imali 8 ili više puta niže titrove. Slično tome, referentni antiserum dobijen pomoću A/Hong Kong/146/2013 virusa, reagovao je dobro sa samo 2 ispitana virusa, a antiserum protiv NIB-85 rearanžiranog virusa koji poseduje HA i NA gene virusa A/Almaty/2958/2013, dao je zadovoljavajuće titrove sa samo 3 testirana virusa. Bolji rezultati dobijeni su sa antiserumom pripremljenim pomoću virusa A/Serbia/NS-210/2013, sa kojim je 6 virusa dalo titrove u okviru četverostruke razlike u odnosu na homologni virus. Od svih imunih seruma dobijenih pomoću virusa umnoženih na jajima, najbolji rezultati u RIH postignuti su sa imunim serumom protiv A/Stockholm/1/2013, sa kojim je 5 izolata dalo titrove koji su bili u okviru dvostruke razlike, a 4 virusa titrove četverostruko niže od titra homologog virusa.

Tabela 19: Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013, izvedene u KCRII u Londonu

Virusi	Genogrupa	Datum uzorkovanja	Živi sistem	Titar u reakciji inhibicije hemaglutinacije sa eritrocitima zamorca										
				Imuni serum										
				A/Perth 16/09	A/Vic 208/09	A/Ala 5/10	A/Stock 18/10	A/Iowa 19/10	A/Vic 361/11	A/Berlin 93/11	A/Vic 361/11	A/Athens 112/12	A/Texas 50/12	A/Hawaii 22/12
<i>Referentni virusi</i>														
A/Perth/16/2009		04.07.2009.	EKJ	1280	80	160	160	160	160	320	320	320	320	160
A/Victoria/208/2009		02.06.2009.	EKJ	1280	2560	640	2560	2560	2560	5120	1280	2560	5120	5120
A/Alabama/5/2010	5	13.07.2010.	MDCK	160	40	80	160	160	160	320	320	640	640	160
A/Stockholm/18/2011	3A	28.03.2011.	MDCK	160	80	80	160	80	160	640	320	320	640	320
A/Iowa/19/2010	6	30.12.2010.	EKJ	640	640	320	320	640	640	2560	1280	1280	1280	640
A/Victoria/361/2011	3C	24.10.2011.	EKJ	1280	640	320	160	640	2560	1280	640	320	1280	1280
A/Berlin/93/2011	3C	07.12.2011.	MDCK	80	80	80	160	160	160	640	320	640	1280	320
A/Victoria/361/2011	3C	24.10.2011.	MDCK	160	160	80	320	160	160	640	320	640	640	320
A/Athens/112/2012	3B	01.02.2012.	MDCK	80	160	160	320	160	160	640	320	640	640	320
A/Texas/50/2012	3C	15.04.2012.	EKJ	640	1280	320	1280	1280	640	2560	640	1280	5120	2560
A/Hawaii/22/2012	3C	09.07.2012.	EKJ	320	640	320	640	1280	640	1280	640	1280	5120	2560
<i>Testirani virusi</i>														
A/Serbia/NS-200/2013	3C	18.01.2013.	MDCK	<u>80</u>	<u><40</u>	80	160	<u>80</u>	80	1280	320	640	<u>640</u>	<u>320</u>
A/Serbia/NS-210/2013	3C	24.02.2013.	MDCK	<u>80</u>	<u><40</u>	80	160	<u>80</u>	80	640	160	320	<u>160</u>	<u>160</u>

MDCK - Madin Darby Canine Kidney ćelijska kultura; EKJ - embrionisana kokošija jaja; podvučeni su titrovi čija je vrednost više od 4 puta niža od vrednosti titra dobijenog sa homologim antigenom

Tabela 20: Rezultati antigenske karakterizacije influenza A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014, izvedene u KCRII u Londonu

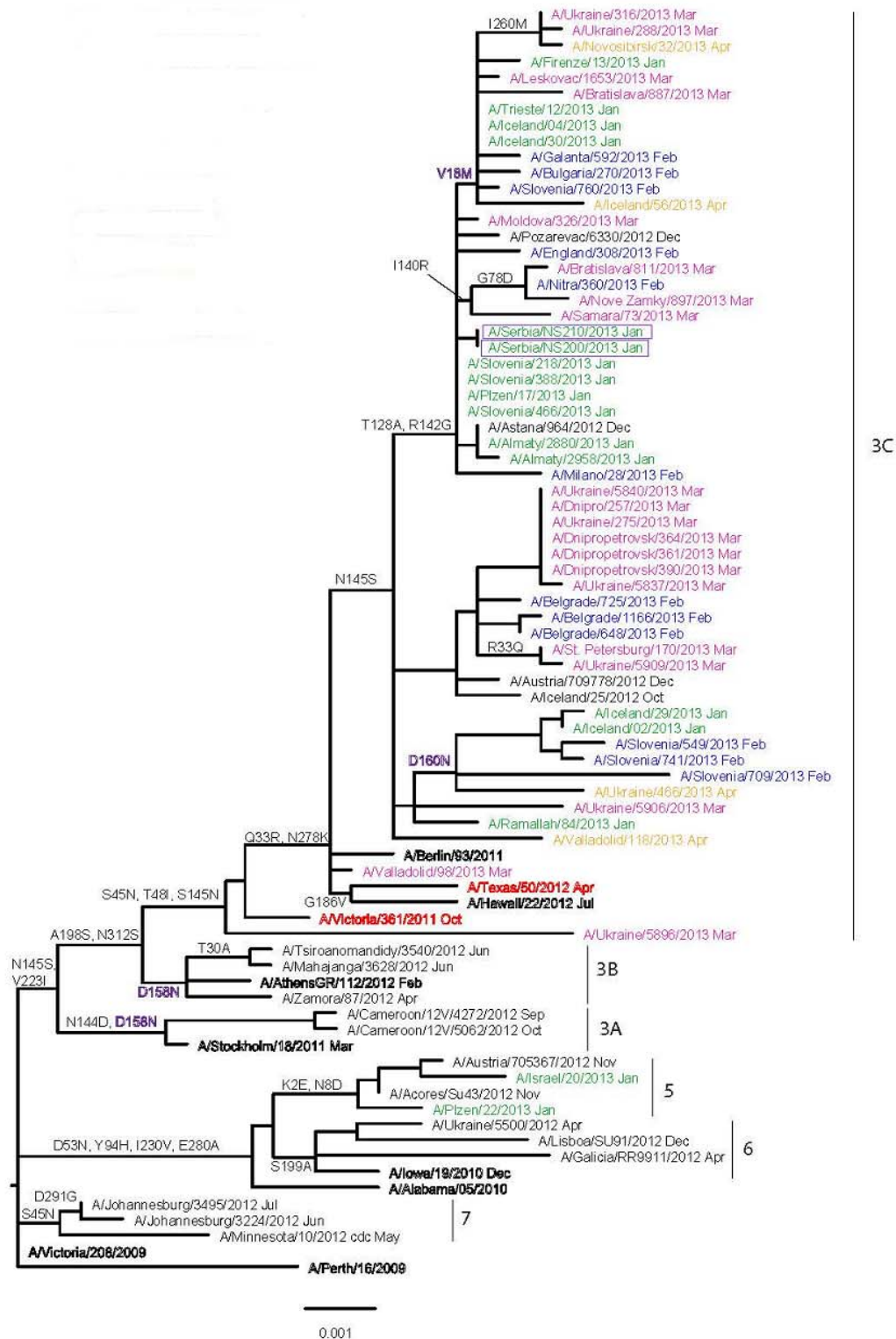
Virusi	Genogrupa	Datum uzorkovanja	Živi sistem	Titar u reakciji inhibicije hemaglutinacije sa eritrocitima zamorca									
				Imuni serumi									
				A/Perth 16/09	A/Vic 361/11	A/Texas 50/12	A/Samara 73/13	A/Serbia NS/210/13	A/HK 146/13	NIB-85 F45/13	A/Sth Afr 4655/13	A/Stock 1/13	A/Stock 6/14
<i>Referentni virusi</i>													
A/Perth/16/2009		04.07.2009.	EKJ	640	160	160	160	160	160	160	40	80	40
A/Victoria/361/2011	3C.1	24.10.2011.	MDCK	80	320	320	640	320	320	320	80	160	320
A/Texas/50/2012	3C.1	15.04.2012.	EKJ	320	1280	1280	1280	1280	1280	1280	80	160	320
A/Samara/73/2013	3C.3	12.03.2013.	MDCK	80	320	320	640	640	640	640	80	160	640
A/Serbia/NS-210/2013	3C.3	18.01.2013.	EKJ	320	1280	1280	1280	1280	1280	1280	80	160	320
A/Hong Kong/146/2013	3C.2	11.01.2013.	EKJ	320	640	640	1280	640	2560	640	80	160	160
NIB-85 (A/Almaty/2958/2013)	3C.3	27.01.2013.	EKJ	640	1280	1280	1280	1280	2560	1280	160	320	320
A/SouthAfrika/4655/2013	3C.3	25.06.2013.	EKJ	80	80	160	320	160	320	160	320	160	80
A/Stockholm/1/2013	3C.2	13.01.2013.	EKJ	40	80	160	320	160	320	160	320	320	160
A/Stockholm/6/2014	3C.3a	06.02.2014.	MDCK	<	40	40	160	160	80	160	40	80	320
<i>Testirani virusi</i>													
A/Serbia/NS-613/2014	3C.3	15.01.2014.	MDCK	<	160	80	320	160	160	160	40	80	320
A/Serbia/NS-619/2014	3C.3	17.01.2014.	MDCK	<	160	160	320	320	320	160	80	80	320
A/Serbia/NS-630/2014		21.01.2014.	MDCK	<	320	160	640	320	320	320	80	160	640
A/Serbia/NS-666/2014	3C.3	11.02.2014.	MDCK	<	160	80	160	160	160	160	40	40	160
A/Serbia/NS-669/2014	3C.3	13.02.2014.	MDCK	<	160	80	320	160	160	160	40	80	320
A/Serbia/NS-670/2014		13.02.2014.	MDCK	40	320	320	640	640	640	320	160	160	640
A/Serbia/NS-682/2014	3C.3	21.02.2014.	MDCK	<	160	80	320	160	160	160	40	80	160
A/Serbia/NS-707/2014	3C.3	28.02.2014.	MDCK	80	160	320	640	640	640	320	80	160	640
A/Serbia/NS-738/2014		07.03.2014.	MDCK	80	160	160	640	320	160	160	80	160	640
A/Serbia/NS-783/2014	3C.3	20.03.2014.	MDCK	80	160	160	640	320	160	160	80	160	640

MDCK - Madin Darby Canine Kidney ćelijska kultura; EKJ - embrionisana kokošija jaja; podvučeni su titrovi čija je vrednost više od 4 puta niža od vrednosti titra dobijenog sa homologim antigenom; < titar manji od 40

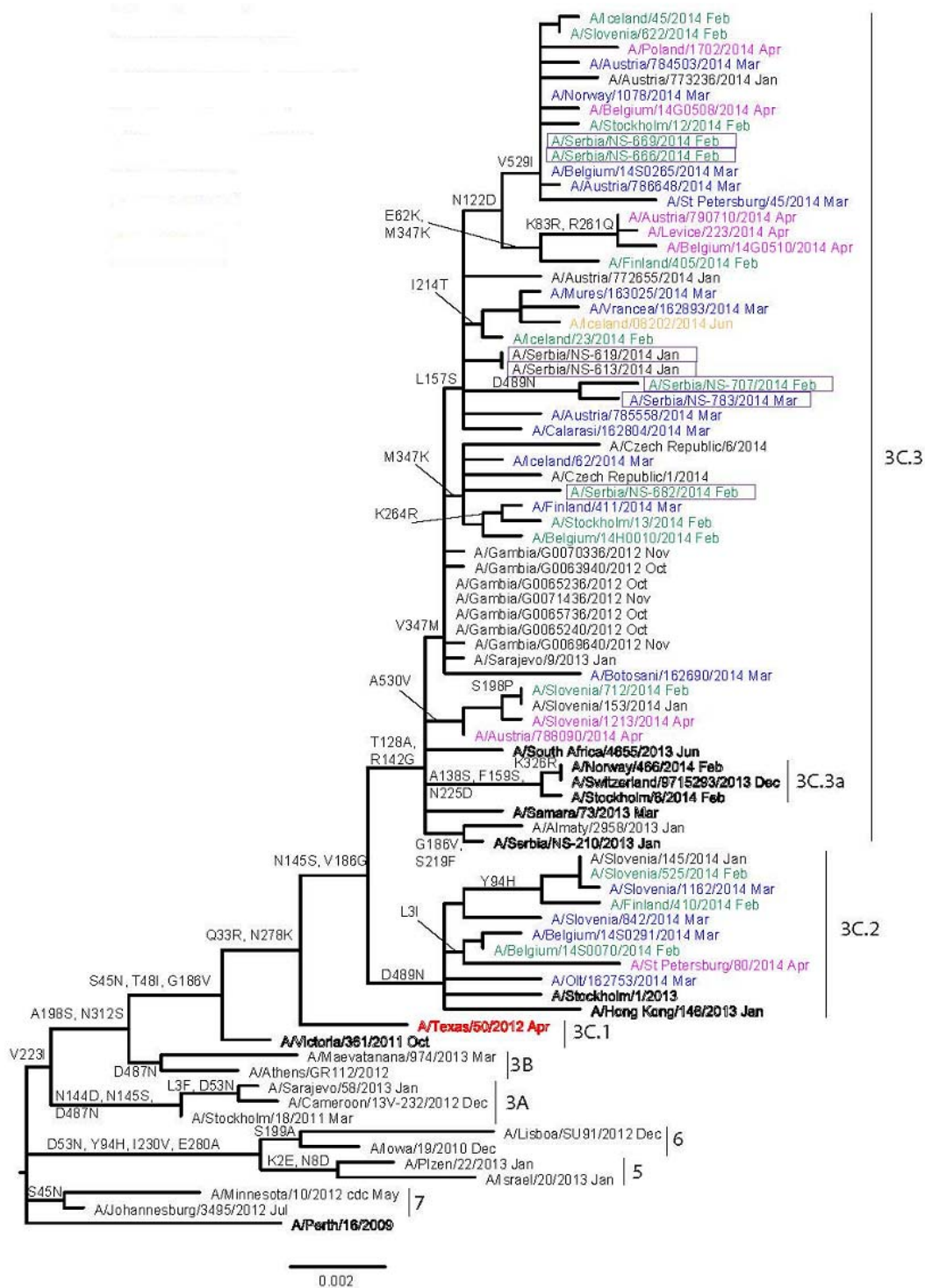
Filogenetska analiza zasnovana na sekvencama HA gena virusa A/Serbia/NS-200/2013 i A/Serbia/NS-210/2013, sprovedena u KCRIL U Londonu, ukazala je da su oba virusa blisko srodna međusobno, kao i sa virusima poreklom iz Slovenije i Češke (Sl. 23). Prisustvo mutacija u HA1 molekulu na položajima V223I, A198S, N312S, S45N i T48I svrstalo je ove viruse u genetičku grupu 3C, a dodatne mutacije Q33R, N278K, N145S, T128A i R142G u genetičku podgrupu 3C.3.

Sekvenciranje HA gena 7 virusa iz sezone 2013/2014, A/Serbia/NS-613/2014, A/Serbia/NS-619/2014, A/Serbia/NS-666/2014, A/Serbia/NS-669/2014, A/Serbia/NS-682/2014, A/Serbia/NS-707/2014 i A/Serbia/NS-783/2014, pokazalo je da svi izolati iz naše sredine nose genske markere karakteristične za genetičku grupu 3C (V223I, A198S, N312S, S45N i T48I u HA1 molekulu), podgrupu 3C.3 (Q33R, N278K, N145S, T128A i R142G u HA1 molekulu) (Sl. 24). Pored toga, virusi iz naše sredine, zajedno sa najvećim brojem ispitanih izolata iz drugih područja, posedovali su i mutaciju V347M. U okviru ove grupe virusa izdvojile su se dodatne podgrupe definisane dvema mutacijama: mutacijom M347K koja je bila odlika izolata A/Serbia/NS682/2014, kao i pojedinih izolata iz Češke, Islanda, Finske, Švedske i mutacijom L157S koju su posedovali ostali izolati iz naše sredine. Među njima, dva blisko srodna virusa A/Serbia/NS-707/2014 i A/Serbia/NS-783/2014, nosili su i mutaciju D489N, dok su virusi A/Serbia/NS-666/2014 i A/Serbia/NS-669/2014, uz izolate poreklom iz Švedske, Belgije, Austrije, Norveške, Poljske, Slovenije, Islanda i Rusije, činili grupu virusa nosilaca mutacija N122O i V529I.

Nukleotidne sekvence HA gena A(H1N1)pdm09 virusa deponovane su u GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) bazi podataka: EPI_ISL_143558 (A/Serbia/NS-200/2013), EPI_ISL_143559 (A/Serbia/NS-210/2013), EPI_ISL_163113 (A/Serbia/NS-613/2014), EPI_ISL_163114 (A/Serbia/NS-619/2014), EPI_ISL_163115 (A/Serbia/NS-666/2014), EPI_ISL_163116 (A/Serbia/NS-669/2014), EPI_ISL_163117 (A/Serbia/NS-682/2014), EPI_ISL_163118 (A/Serbia/NS-707/2014) i EPI_ISL_164250 (A/Serbia/NS-783/2014).



Slika 23. Filogenetsko stablo influenca A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013 na osnovu HA gena
 Crveno - vakcinalni virus; Crno boldovano - referentni virusi; Zeleno - virusi dokazani u januaru 2013.
 godine; Plavo - virusi dokazani u februaru 2013. godine; Pink - virusi dokazani u martu 2013. godine;
 Žuto - virusi dokazani u aprilu 2013. godine



Slika 24. Filogenetsko stablo influenca A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014 na osnovu HA gena Crveno - vakcinalni virus; Crno boldovano - referentni virusi; Zeleno - virusi dokazani u januaru 2014. godine; Plavo - virusi dokazani u februaru 2014. godine; Pink - virusi dokazani u martu 2014. godine; Žuto - virusi dokazani u aprilu 2014. godine

Rezultati ispitivanja osetljivosti influenza A virusa na oseltamivir

Ispitivanju osetljivosti na oseltamivir podvrgnuto je 14 virusnih izolata A(H1N1)pdm09 podtipa i 14 virusnih izolata A(H3N2) podtipa, izolovanih iz uzoraka pacijenata sa različitim kliničkim manifestacijama bolesti (Sl. 21). Svi ispitani virusi bili su osetljivi na antivirusni oseltamivir.

Tabela 21. Karakteristike pacijenata iz čijih uzoraka su izolovani influenza A virusi podvrgnuti ispitivanju osetljivosti na oseltamivir

Oznaka izolata	Klinička manifestacija bolesti	Imunodeficijencija	Osetljivost izolata na oseltamivir
A(H1N1)pdm09			
A/Srbia/NS-236/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-238/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-278/2013	SARI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-298/2013	Fatalni ishod	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-302/2013	Fatalni ishod	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-321/2013	SARI	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-328/2013	SARI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-342/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-369/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-371/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-741/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-757/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-775/2014	SARI	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-833/2014	SARI	+	Osetljiv
A(H3N2)			
A/Srbia/NS-202/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-254/2013	SARI	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-269/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-405/2013	SARI	+	Osetljiv
A/Srbia/NS-447/2013	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-654/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-698/2014	SARI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-710/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-714/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-771/2014	SARI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-839/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-841/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-844/2014	ILI	-	Osetljiv
A/Srbia/NS-878/2014	SARI	-	Osetljiv

ILI – Influenza-like illness (obolenje nalik influenci); SARI – Severe acute respiratory illness (teška akutna respiratorna bolest); ARDS - akutni respiratorni distress sindrom; + Kod pacijenta registrovana imunodeficijencija; - Pacijent bez zabeležene imunodeficijencije

Dobijene IC₅₀ vrednosti kod izolata A(H1N1)pdm09 podtipa kretale su se u granicama od 0,07-0,33 nM oseltamivira, a kod izolata A(H3N2) podtipa u granicama od 0,09-0,17 nM

oseltamivira. Odnosi IC₅₀ vrednosti ispitanih virusa i IC₅₀ vrednosti referentnih virusa osetljivih na oseltamivir, bili su opsegu 0,3-1,65 kod virusa A(H1N1)pdm09 podtipa i 0,67-1,89 kod virusa A(H3N2) podtipa. Kako ni jedna od dobijenih vrednosti odnosa nije bila veća od 10, može se zaključiti da sve testirane viruse odlikuje normalna inhibicija oseltamivirom.

Tabela 22. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oseltamivir testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze u NIC Novi Sad

Oznaka virusa	Srednja vrednost IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ virusa/ IC ₅₀ osetljivog referentnog virusa	Osetljivost na oseltamivir
Referentni virusi A(H1N1)pdm09 podtipa			
A/California/12/2012 - osetljiv	0,20	1	NI
A/Texas/23/2012 - rezistentan	32,6	163	VRI
Izolovani virusi A(H1N1)pdm09 podtipa			
A/Srbia/NS-236/2013	0,07	0,35	NI
A/Srbia/NS-238/2013	0,06	0,3	NI
A/Srbia/NS-278/2013	0,10	0,5	NI
A/Srbia/NS-298/2013	0,06	0,3	NI
A/Srbia/NS-302/2013	0,33	1,65	NI
A/Srbia/NS-321/2013	0,07	0,35	NI
A/Srbia/NS-328/2013	0,11	0,55	NI
A/Srbia/NS-342/2013	0,08	0,4	NI
A/Srbia/NS-369/2013	0,06	0,3	NI
A/Srbia/NS-371/2013	0,07	0,35	NI
A/Srbia/NS-741/2014	0,10	0,5	NI
A/Srbia/NS-757/2014	0,12	0,6	NI
A/Srbia/NS-775/2014	0,20	1	NI
A/Srbia/NS-833/2014	0,07	0,35	NI
Referentni virusi A(H3N2) podtipa			
A/Washington/01/2007 - osetljiv	0,09	1	NI
A/Texas/12/2007 - rezistentan	22,78	253,1	VRI
Izolovani virusi A(H3N2) podtipa			
A/Srbia/NS-202/2013	0,09	1	NI
A/Srbia/NS-254/2013	0,06	0,67	NI
A/Srbia/NS-269/2013	0,17	1,89	NI
A/Srbia/NS-405/2013	0,11	1,2	NI
A/Srbia/NS-447/2013	0,07	0,78	NI
A/Srbia/NS-654/2014	0,16	1,78	NI
A/Srbia/NS-698/2014	0,13	1,44	NI
A/Srbia/NS-710/2014	0,15	1,67	NI
A/Srbia/NS-714/2014	0,17	1,89	NI
A/Srbia/NS-771/2014	0,16	1,78	NI
A/Srbia/NS-839/2014	0,14	1,55	NI
A/Srbia/NS-841/2014	0,10	1,11	NI
A/Srbia/NS-844/2014	0,16	1,78	NI
A/Srbia/NS-878/2014	0,12	1,33	NI

NI - Normalna inhibicija oseltamivirom; VRI - Visoko redukovana inhibicija oseltamivirom

Svi virusi sekvencirani u KCRIL u Londonu, ispitani su i fenotipski na osetljivost prema oseltamiviru (Tab. 23). Šest virusa A(H1N1)pdm09 podtipa, pokazali su normalnu inhibiciju NAI. Sekvenciranje NA gena nije otkrilo prisustvo mutacija povezanih sa smanjenom osetljivošću prema NAI (H275Y, D199N, I223R, N295S).

Od 9 ispitanih virusa A(H3N2) podtipa, svi sem jednog virusa pokazali su normalnu osetljivost na inhibitore neuraminidaze. Virus A/Serbia/NS-613/2014 izolovan u januaru 2014. godine iz respiratornog uzorka nehospitalizovanog pacijenta sa lakšim oblikom influenza virusne infekcije, koji nije bio tretiran antivirusicima, pokazao je 8 puta redukovanu osetljivost na oseltamivir. Iako je ova vrednost manja od granične vrednosti za viruse sa redukovanom inhibicijom NAi, odnosno manja od 10, sekvenciranje NA gena ovog virusa pokazalo je da je on nosilac mutacije Q391H, koja se povezuje sa rezistencijom na NAi. Mutacije E119V, R292K, N294S, nisu zabeležene u NA genima nijednog od ispitanih izolata.

Tabela 23. Rezultati ispitivanja osetljivosti na oseltamivir testom inhibicije enzimske aktivnosti neuraminidaze u KCRIL u Londonu

Oznaka izolata	Klinička manifestacija bolesti	Imunodeficijencija	IC ₅₀ virusa/ IC ₅₀ osetljivog referentnog virusa
A(H1N1)pdm09			
A/Srbia/NS-223/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-237/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-601/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-703/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-735/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-772/2013	SARI	-	<5
A(H3N2)			
A/Srbia/NS-200/2013	SARI	-	<5
A/Srbia/NS-210/2013	SARI	-	<5
A/Srbia/NS-613/2013	ILI	-	8
A/Srbia/NS-619/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-666/2013	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-669/2014	SARI	-	<5
A/Srbia/NS-682/2014	ILI	-	<5
A/Srbia/NS-707/2014	SARI	+	<5
A/Srbia/NS-783/2014	SARI	+	<5

ILI – Influenza-like illness (obolenje nalik influenci); SARI – Severe acute respiratory illness (teška akutna respiratorna bolest); ARDS - akutni respiratorni distress sindrom

DISKUSIJA

Sezonska distribucija influenza virusa

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju stav da je nemoguće, sa sigurnošću, predvideti zastupljenost influenza virusa kod pacijenata obolelih od akutnih respiratornih infekcija nalik gripu, kao ni tip i podtip influenza virusa koji će u odgovarajućoj sezoni dominirati. Procenat influenza pozitivnih uzoraka u sezoni 2013/2014 (34,2%) bio je signifikantno niži u odnosu na sve prethodne sezone, a u toku sezone 2012/2013 (50%) bio je signifikantno niži u odnosu na sezone 2010/2011(61.4%) i 2011/2012 (63.4%). Ovi podaci ukazuju na to da su u toku poslednje dve sezone virusološkog nadzora u našoj sredini, pored influenza virusa, bili vrlo aktivni i drugi uzročnici respiratornih infekcija sa kliničkom slikom nalik influenci.

U toku prve dve sezone obuhvaćene ovim ispitivanjem, influenza A virusi su dominirali dok je cirkulacija influenza B virusa bila na niskom nivou. Tokom sezone 2010/2011 i 2011/2012, influenza A tipovi su bili odgovorni za 85,2%, odnosno 96,1% influenza virusnih infekcija. Samo 14,8% infekcija u toku prve, i 3.9% infekcija u toku druge sezone, bile su uzrokovane influenza B virusima. Tokom sezone 2010/2011, slična situacija je zabeležena i u drugim evropskim zemljama, kao i u Severnoj i Južnoj Americi i najvećem delu Afrike i Severne Azije [143], ali je tokom 2011/2012 aktivnost influenza B tipa porasla u Africi, Istočnoj i Južnoj Aziji i Kanadi [144]. Tako je u Kanadi do kraja sezone više od pola potvrđenih slučajeva gripa bilo uzrokovano ovim virusom. Tokom sledeće sezone, 2012/2013, nastavljen je porast aktivnosti influenza B virusa. Prema podacima KCRIL u Londonu, ukupan procenat influenza B pozitivnih uzoraka na području Evrope iznosio je 30% (9029/30133) što je signifikantno više u odnosu na 9,7% (4407/45236) zabeleženih prethodne sezone [145]. U pojedinim zemljama, poput Engleske, Škotske, Španije, Francuske i Švajcarske, influenza B virusi su dominirali ili su oba tipa influence bila podjednako zastupljena. U skladu sa tim, i u našoj sredini, influenza B virusi su dokazani u nešto više od polovine laboratorijski potvrđenih slučajeva gripa (53,4%), dok su influenza A tipovi detektovani u nešto manjem procentu (46,6%). Sledeće sezone 2013/2014, dolazi do ponovne, drastične promene u zastupljenosti influenza tipova u Evropi. Prema podacima Evropskog Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (ECDC - European Centre for Disease Control and Prevention), u svega 2% influenza pozitivnih uzoraka iz primarne zdravstvene zaštite i 3% pozitivnih uzoraka hospitalizovanih pacijenata, bili su prisutni influenza B virusi [146]. U našoj pokrajini nije detektovan ni jedan slučaj influenza B virusne infekcije. Ista situacija bila je i u mnogim zemljama u okruženju, poput Rumunije, Bugarske, Makedonije, Grčke, Mađarske [147]. Generalno gledano, niska aktivnost influenza B virusa zabeležena je pored Evrope i u Americi, Africi i Okeaniji, dok je u Aziji zastupljenost ovog virusa varirala od zemlje do zemlje.

Godinu dana nakon pandemije 2009. godine, jedini influenza A podtip dokazan u našoj sredini, bio je A(H1N1)pdm09. U istom periodu, i u drugim delovima Evrope, preovladavao je ovaj virus, dok je influenza A(H3N2) podtip bio redak [143]. Ipak, za razliku od perioda pandemije 2009. godine, kada je A(H1N1)pdm09 apsolutno dominirao širom sveta, u sezoni 2010/2011, u mnogim regionima on je cirkulisao zajedno sa drugim influenza virusima. Na primer, u Severnoj Americi je zabeležena intenzivna aktivnost influenza A(H3N2), kao i influenza B virusa. U Aziji, odnosno Kini i Mongoliji, početak sezone se odlikovao velikim brojem infekcija izazvanih A(H3N2) podtipom, što je predstavljalo produžetak njegove intenzivne aktivnosti zabeležene tokom leta u južnoj Kini. Kasnije, zastupljenost A(H1N1)pdm09 podtipa je značajno porasla, te je on postao najčešće detektovan influenza A podtip.

U toku naredne sezone 2011/2012, frekvencija pojedinih influenza A podtipova varirala je u različitim delovima sveta. Prema rezultatima ovog istraživanja, jedini podtip dokazan u našoj sredini, bio je A(H3N2). U različitim evropskim državama, u istom vremenskom periodu, dominirali su različiti influenza virusi, ali je sveukupno gledano, A(H3N2) najčešće registrovan [144]. Slična situacija bila je i u Centralnoj Aziji, Južnoj Americi i Africi. U Severnoj Americi, distribucija influenza A podtipova je varirala, od Meksika u kojem je gotovo isključivo bio prisutan pandemijski podtip, do SAD u kojima je najaktivniji bio A(H3N2) virus [144].

U ovom istraživanju, najzastupljeniji influenza A virus, tokom sezone 2012/2013, bio je A(H1N1)pdm09, koji je detektovan u 75% influenza A pozitivnih uzoraka. Prisustvo A(H3N2) podtipa, otkriveno je kod 25% pozitivnih uzoraka. Slična distribucija influenza A podtipova uočena je i u nekim zemljama Evrope, Severne Afrike, Azije, Centralne i Južne Amerike, dok je u drugim, kao i u najvećem delu Severne Amerike dominantan podtip bio A(H3N2) [143].

Sezonu 2013/2014 odlikovala je izrazita aktivnost influenza A(H3N2) podtipa koji je bio odgovoran za 72,4% laboratorijski potvrđenih slučajeva gripa u Vojvodini. Podtip A(H1N1)pdm09 bio je prisutan kod 27,6% influenza A pozitivnih uzoraka. Prema podacima SZO, u toku ove sezone, na području Evrope, cirkulisala su oba influenza A podtipa, pri čemu je A(H1N1)pdm09 dominirao u Severnoj Evropi, a A(H3N2) u zemljama Istočne Evrope, kao i u Nemačkoj, Irskoj, Luksemburgu i Španiji [147]. U zemljama Severne Amerike kao i Severne Azije, najčešće detektovan podtip bio je A(H1N1)pdm09, dok je u Severnoj Africi i Bliskom Istoku dominantan podtip varirao od zemlje do zemlje.

Lokalna, intersezonska varijabilnost tipova i podtipova influenza virusa, zabeležena tokom ovog istraživanja, može biti objašnjena intersezonskom varijabilnošću tipski i podtipski specifičnog imuniteta na nivou posmatrane populacije. Može se pretpostaviti da je za vreme pandemije 2009. godine, kao i tokom prve dve sezone nadzora obuhvaćene ovim istraživanjem (2010/2011 i 2011/2012), značajan deo populacije u našoj sredini došao u kontakt sa influenza A virusima i stekao imunitet. Dobar kolektivni imunitet prema influenza A

virusnim infekcijama, uslovio je značajno veći broj influenza B virusnih infekcija, naredne sezone 2012/2013, u odnosu na prethodne dve. Sledeća sezona, 2013/2014, odlikovala se ponovnom dominacijom influenza A virusa, koja je verovatno bila rezultat visoke prokuženosti influenza B virusima do koje je došlo prethodne sezone. Na sličan način se, tokom 4 uzastopne sezone, menjao i dominantan influenza A podtip, pri čemu je H1N1pdm09 preovladavao tokom sezona 2010/2011 i 2012/2013, a H3N2 podtip u sezonama 2011/2012 i 2013/2014.

Influenca virusi konstantno menjaju svoje površinske glikoproteine, odgovorne za vezivanje za receptore i antigenske karakteristike virusa. Ovaj proces može dovesti do nastanka virusa sa izmenjenim specifitetom prema domaćinu ili tkivu, modifikovanom virulencijom ili osetljivošću na antivirusne. Zbog ovih mogućih ishoda, karakterizacija ne-tipiziranih, potencijalno novih influenza virusa je od velikog značaja. U ovom radu, podtipizacija nije bila uspešna kod 4,5% influenza A pozitivnih uzoraka tokom sezone 2012/2013 i kod 1,7% tokom sezone 2013/2014. Nakon detaljnog ispitivanja sprovedenog u KCRIL u Londonu, zaključeno je da virusi prisutni u ovim uzorcima ne predstavljaju mutirane, antigenski izmenjene sojeve, nego je nemogućnost podtipizacije bila posledica male količine virusa prisutne u ispitivanim uzorcima.

Jedna od najuočljivijih posledica pandemije 2009. godine, jeste potpuno potiskivanje sezonskog A(H1N1) podtipa od strane pandemijskog A(H1N1)pdm09 virusa. Nasuprot tome, A(H1N1)pdm09 virus nije uticao na cirkulaciju A(H3N2) podtipa. I u prošlosti, pojava novog podtipa influenza A virusa u humanoj populaciji, vodila je iščezavanju podtipa koji je do tada uzrokovao sezonske epidemije gripa. Pandemija 1957. godine je označila nastanak novog A(H2N2), a nestanak A(H1N1) virusa, dok je nakon pojave A(H3N2) virusa 1968. godine, iz ljudske populacije iščezao A(H2N2) podtip. Situacija se promenila 1977. godine, kada je nakon ponovnog pojavljivanja A(H1N1) podtipa, on nastavio da cirkuliše zajedno sa A(H3N2) virusom, sve do pandemije 2009. godine. Razlozi zamene postojećeg virusa gripa, novim, pandemijskim, nisu u potpunosti jasni. Smatra se da je za ovu pojavu delimično odgovoran heteropodtipski imunitet – kratkotrajni imunitet stvoren u kontaktu sa jednim podtipom koji pruža delimičnu otpornost i prema drugim podtipovima [99]. Prema ovoj teoriji, tokom pandemije, značajan deo globalne populacije biva inficiran novim virusom i time postaje prolazno imun na infekciju ranije cirkulišućim podtipom. Nedovoljan broj osoba podložnih infekciji sezonskim sojem virusa, dovodi do njegovog iščezavanja [148]. Ovo mišljenje je potvrđeno rezultatima istraživanja koja su pokazala da je kod većine osoba prirodno ili veštački imunizovanih protiv pandemijskog A(H1N1)pdm09 podtipa, došlo i do stvaranja antitela sa ukršteno-reagujućim neutralizacionim efektom prema A/Brisbane/59/07(H1N1) virusu, odnosno došlo je do istovremenog razvoja protektivnog imuniteta i prema pandemijskom i prema sezonskom H1N1 virusu [100]. Heteropodtipski imunitet je uslovljen

ukrštenom neutrališućom aktivnošću posebnih subpopulacija antitela specifičnih za visoko konzervirane regione površinskih proteina i naročito aktivnošću memorijskih citotoksičnih T limfocita usmerenih protiv visoko konzerviranih delova internih proteina [99]. Carter i Sanford [75] se slažu da heterotipski imunitet predstavlja vrlo važan faktor restrikcije diverziteta influenza virusa, ali smatraju da nije dovoljan za objašnjenje iščezavanja influenza podtipova. U svom istraživanju oni su izvršili analizu sekvence preko 4100 genoma H1N1 virusa, iz perioda od 1918-2012. godine. Na osnovu dobijenih rezultata zaključili su da, iako na određenim mestima u genomu ovih virusa uobičajeno dolazi do nastanka specifičnih adaptivnih mutacija, tokom vremena se duž celog genoma akumulira znatno više štetnih mutacija. Oni su ustanovili da se tokom cele istorije humane linije H1N1 virusa odvijala kontinuirana i brza akumulacija mutacija, uključujući stabilan porast broja nesinonimnih aminokiselinskih substitucija. Bilo bi za očekivati da prirodna selekcija eliminiše veliki broj štetnih mutacija, međutim, visoka stopa mutacija, genski rearanžmani, genetička uska grla i mutacije sa malim fenotipskim efektom, mogu efikasno da smanje njen uticaj. Kako autori dalje navode, od 1918. godine, pa do momenta nestanka 2009. godine, genom H1N1 podtipa je divergirao od prvobitnog genoma za oko 1900 mutacija, što čini preko 15% genoma. Godišnje je dolazilo do fiksacije 14-16 mutacija, što je dovelo do izmene oko 7% aminokiselina. Ovim procesom kontinuirane genetičke atenuacije, autori objašnjavaju evidentan, konstantan i sistematičan pad mortaliteta usled H1N1 infekcija, počevši od pandemije 1918. godine pa do danas, kao i iščezavanje H1N1 podtipa 1957. i 2009. godine. Oni smatraju da je hipoteza genetičke atenuacije univerzalno primeniva na sve influenza A podtipove, koji nakon pandemijske pojave slede svaki svoj put prirodne atenuacije usled akumulacije mutacija, što tokom vremena dovodi do postepenog smanjenja mortaliteta izazvanog njima i na kraju do iščezavanja virusa. Relativno konstantna stopa akumulacije mutacija detektovana je čak i u toku samo jedne sezone kod A(H1N1)pdm09 virusa, kod kojeg je u periodu 2009/2010. godine mutiralo oko 0,3% nukleotida. Inače, padu mortaliteta usled H1N1 infekcija, doprineo je i značajan napredak medicine u periodu od 1918. godine do danas, a naročito primena antibiotika u lečenju sekundarnih bakterijskih pneumonija. Međutim, atenuacija H1N1 podtipa je počela i pre ere široke primene antibiotika, a ekponencionalni pad mortaliteta je konstantan tokom vremena, uprkos povremenim, skokovitim unapređenjima medicinskog tretmana pacijenata obolelih od gripa.

Avijarni podtipovi influenza virusa, nosioci HA podtipova H5 i H7, nisu dokazani u ovom istraživanju. Međutim, stalni epidemiološki i virusološki monitoring ovih virusa, od izuzetnog je značaja. Naime, infekcije avijarnim influenza virusima se beleže kontinuirano, što se može videti i na osnovu izveštaja SZO objavljenog početkom 2014. godine [6]. Prema podacima iz izveštaja, u periodu od septembra 2013. godine do februara 2014. godine, infekcija A(H5N1) virusom laboratorijski je potvrđena kod 15 pacijenata, od kojih je 9 (60%) preminulo. Ovim se

ukupan broj obolelih od influence uzrokovane A(H5N1) podtipom, od kada je 2003. godine zabeležen prvi slučaj, popeo na 652, a broj smrtnih ishoda na 387 (60%). Najveći broj humanih A(H5N1) infekcija detektovan je u zemljama Jugoistočne Azije, dok su sporadični importovani slučajevi zabeleženi širom sveta. U periodu od septembra 2013. do februara 2014. godine, u Jugoistočnoj Aziji, prvenstveno u Kini, registrovano je i 220 obolelih od avijarne influence izazvane A(H7N9) podtipom. Od februara 2013. godine kada je laboratorijski dokazana prva infekcija A(H7N9) podtipom, prisustvo ovog virusa utvrđeno je kod ukupno 355 obolelih od kojih je 112 (31,5%) umrlo od posledica bolesti. Iako su humane infekcije avijarnim influenza virusima u najvećem broju slučajeva ograničene na zemlje Jugoistočne Azije, savremeni način života koji podrazumeva intenzivan i brz međunarodni transport ljudi, pruža mogućnost njihovog prenošenja i u druge delove sveta. Iako, za sada, ovi virusi imaju vrlo ograničenu sposobnost transmisije među ljudima, izuzetno visoka stopa smrtnosti ukazuje na ogomnu opasnost koju bi ovi virusu mogli predstavljati ukoliko bi adekvatnim mutacijama prevazišli ovaj nedostatak.

Uzrastna distribucija influenza A virusa

Imunitet protiv virusa influence raste i menja se tokom života, sa svakim novim kontaktom sa virusom, što starije osobe čini najotpornijim delom populacije, a mlađe osobe najpodložnijim infekciji. Podaci dobijeni u istraživanjima pandemija gripa, ukazali su da između uzrastne distribucije morbiditeta tokom pandemija i sezonskih epidemija influence nema bitnih razlika [92]. Odsustvo ili veoma ograničen prethodno stečen imunitet prema influenci, kao i faktori koji olakšavaju transmisiju influenza virusa (boravak u zatvorenim uslovima i sekrecija većih količina virusa u dužem vremenskom periodu u odnosu na odrasle), čine decu školskog uzrasta najpodložnijom obolevanju od gripa, usled čega populacija dece igra ključnu ulogu u širenju influence na ostale članove zajednice [149, 150, 151]. Ovaj stav potvrđuju i podaci dobijeni u našem istraživanju. Najveći procenat pozitivnih dokazan je kod dece uzrasta 5-14 godina (48,2%), pri čemu je u starijim uzrastnim grupama procenat pozitivnih opadao od 37,6% u grupi 15-29 godina, preko 32,7% u grupi 30-64 godina, do 25% kod starijih od 65 godina. Kod dece uzrasta 0-4 godine, procenat pozitivnih bio je najniži i iznosio je 20,2%. Pariani i sar. [151] su, tokom istraživanja sprovedenog u sezoni 2011/2012 u Italiji, takođe zabeležili najveći procenat pozitivnih u uzrasnoj grupi 5-14 godina (63,4%). Njihovi podaci govore o značaju koji deca školskog uzrasta imaju u širenju influence, kao i da su kod dece mlađeg uzrasta češće infekcije izazvane nekim drugim respiratornim uzročnicima. Prema važećem Pravilniku o imunizaciji i načinu zaštite lekovima Republike Srbije (http://www.paragraf.rs/propisi/pravilnik_o_imunizaciji_i_nacinu_zastite_lekovima.html),

vakcinacija protiv gripa predviđena je samo za decu stariju od 6 meseci sa izvesnim hroničnim zdravstvenim problemima. Međutim, uvođenje programa masovne vakcinacije školske dece u Japanu [153], Majamiju i Sietlu [154], Floridi [155] i Velikoj Britaniji [156], pokazalo se korisnim za vakcinisanu decu, a indirektno i za druge subpopulacije. Iako SZO trenutno preporučuje vakcinaciju protiv gripa za decu uzrasta 6 meseci do 5 godina, ovi podaci ukazuju da bi trebalo razmotriti proširenje ove preporuke na svu zdravu decu školskog uzrasta.

U toku ovog istraživanja, ustanovljena je značajna razlika u uzrastnoj distribuciji između dva influenza podtipa. Influenca A(H3N2) podtip dominirao je kod dece uzrasta do 0-4 godine (72,2%) i 5-14 godina (75,3%), dok je u starijim uzrastnim grupama preovladavao A(H1N1)pdm09 podtip (66% u uzrastnoj grupi 15-29 godina; 55,9% u uzrastnoj grupi 30-64 godina; 58,1% kod starijih od 65 godina). Može se pretpostaviti da su ovi rezultati posledica činjenice da je veliki broj dece predškolskog, a naročito školskog uzrasta bio u kontaktu sa A(H1N1)pdm09 podtipom u toku pandemije 2009. godine, kao i u sezoni 2010/2011 u kojoj je ovaj podtip apsolutno dominirao. Ovaj stav potvrđuju i rezultati seroepidemioloških studija, koji ukazuju na najveći porast prevalencije antitela protiv A(H1N1)pdm09 podtipa, nakon pandemije 2009. godine, upravo u ovim uzrastnim grupama [93]. Dobar kolektivni imunitet dece uzrasta do 15 godina prema A(H1N1)pdm09 podtipu, uslovio je veću otpornost ove kategorije prema pandemijskom virusu ali i veću osetljivost prema A(H3N2) virusu u narednim postpandemijskim sezonama. Porast prevalencije A(H1N1)pdm09 infekcija u populaciji odraslih, uz postepen rast imuniteta protiv A(H1N1)pdm09 virusa u populaciji mladih, zabeležen je i u toku drugih istraživanja sprovedenih u periodu nakon pandemije 2009. godine [157,158]. Ista situacija, odnosno pomak prevalencije infekcija izazvanih pandemijskim virusom, ka starijim uzrastnim grupama u sezonama nakon pandemije, uočen je i nakon pandemija 1918., 1957. i 1968. godine [157].

Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od kliničke manifestacije influence

Rezultati ovog rada ukazuju da, iako je procenat influenza A pozitivnih u grupama pacijenata sa različitim kliničkim manifestacijama bolesti varirao od sezone do sezone, ukupno gledano influenza virusi su značajno češće dokazani kod pacijenata sa lakšim oblikom bolesti (43,7%) u odnosu na pacijenate sa SARI (28,1%) i ARDS (15,4%). Moguće je da manji procenat influenza pozitivnih u grupama pacijenata sa SARI i ARDS ukazuje da su većinu ovih teških respiratornih infekcija uzrokovali neki drugi virusni ili bakterijski agensi. Pored toga, ovakav rezultat može biti posledica i različitog vremena uzorkovanja koje je uslovilo različitu količinu virusa prisutnih u uzorcima podvrgnutim ispitivanju. Naime, pacijenti

sa ILI medicinsku pomoć uglavnom traže u prvim danima od početka infekcije, kada su influenza virusi prisutni u velikom broju u nosu i grlu. Za razvoj komplikacija influence potrebno je dodatnih nekoliko dana u toku kojih se virus spušta u donje respiratorne organe i/ili nastupa sekundarna bakterijska infekcija, pri čemu se količina influenza virusa u gornjim respiratornim organima smanjuje. Moguće je da je izvestan broj SARI i ARDS slučajeva koji je u ovom radu bio negativan na prisustvo influenza virusa, takođe bio influenza virusne etiologije, ali je uzorkovanje izvršeno kasno, te u uzorcima brisa nosa i grla nije bilo ili nije bilo dovoljno virusnih partikula za uspešnu detekciju.

Zastupljenost dva podtipa influenza virusa u grupama pacijenata sa različitim manifestacijama bolesti, varirala je od sezone do sezone, ukazujući da oba virusa imaju potencijal za izazivanje kako lakših tako i teških, komplikovanih slučajeva influence. Zbirni rezultati su ukazali da je A(H1N1)pdm09 podtip dokazan u svim slučajevima sa fatalnim ishodom, kao i da je značajno češće bio uzročnik SARI slučajeva (63,5%), i češći uzročnik ARDS slučajeva (66,7%), dok je A(H3N2) podtip dominirao među slučajevima ILI (69,3%).

Podaci iz literature govore da je zastupljenost teških slučajeva gripa i smrtnih ishoda povezanih sa influencom, podložan velikim sezonskim varijacijama, pri čemu na njega veliki uticaj imaju osobine preovlađujućeg influenza podtipa, starostna struktura posmatrane populacije, procenat vakcinisanih u posmatranoj populaciji i to naročito u grupama pod rizikom od nastanka komplikacija gripa, adekvatnosti same vakcine u datoj sezoni, itd. Prema istraživanju sprovedenom od strane Thomson i sar. [159], u periodu od 1990-1999. godine, u SAD, broj smrtnih slučajeva nastalih kao posledica gripa izazvanog influenza A(H1N1) podtipom, varirao je od 0-14727, a influenza A(H3N2) podtipom od 6033-70701 godišnje. Takođe, u istom radu vršeno je i poređenje broja fatalnih slučajeva gripa u periodu od sredine 70-tih godina pa do kraja prošlog veka i zabeleženo značajno povećanje. Autori smatraju da je za to, barem delom, odgovorana promena u starosnoj strukturi, odnosno starenje populacije SAD, s obzirom na to da se u datom periodu udvostručio broj osoba starijih od 85 godina. Pored toga, pojava antigenski nove, drift varijante virusa, takođe može da dovede do povećanog broja infekcija, teških slučajeva i smrtnih ishoda influence u određenoj sezoni. Rezultati epidemioloških ispitivanja ukazuju da se sezone u kojima dominira A(H3N2) podtip, odlikuju značajnim porastom mortaliteta, što se delimično može objasniti i sklonošću ovog podtipa ka češćim antigenskim promenama u odnosu na A(H1N1) podtip [160]. Tako Johnson i sar. [161] navode da je pojava drift varijanti A(H3N2) virusa u sezonama 1995/1996 (A/Wuhan/359/95), 1997/1998 (A/Sydney/5/97) i 2003/2004 (A/Fujian/411/02), bila praćena značajnim skokom mortaliteta kod dece obolele od gripa uzrasta 0-4 godine.

Zastupljenost influenza A virusa u zavisnosti od prisustva i vrste hronične bolesti ili stanja

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da prisustvo zabeleženih HB/S, nije predstavljalo faktor koji utiče na povećanu sklonost ka oboljevanju od influence. Procenat influenza A pozitivnih slučajeva nije se bitno razlikovao u grupi pacijenata sa HB/S (38,6%) i bez njih (31,2%). Značajno manji procenat obolelih u grupi pacijenata sa više HB/S (27,8%) u odnosu na grupu pacijenata sa jednim HB/S (45,8%), verovatno se može objasniti time da su pacijenti sa višestrukim hroničnim bolestima pod pojačanim zdravstvenim nadzorom, te da su kao grupa pod posebnim rizikom od komplikacija bili zaštićeni adekvatnim preventivnim merama.

U grupi pozitivnih pacijenata bez HB/S, A(H3N2) podtip je bio značajno više prisutan (66,3%), dok je A(H1N1)pdm09 dominirao kod pozitivnih pacijenata sa HB/S i to generalno (68,8%), kao i u svim pojedinačnim grupama. Povezanost A(H1N1)pdm09 podtipa sa zabeleženim HB/S, verovatno je posledica, uzrastne distribucije influenza podtipova zabeležene u datom periodu, odnosno veće zastupljenosti A(H1N1)pdm09 podtipa u starijim uzrastnim grupama u kojima se znatno češće registruju navedene hronične bolesti.

Faktori rizika za nastanak teških oblika infekcije

Klinička manifestacija, tok bolesti i konačan ishod influence zavise od složenih interakcija između faktora virulencije virusa, fiziološkog i imunološkog stanja domaćina, kao i čitavog niza dodatnih, sredinskih faktora koji utiču na dostupnost adekvatne zdravstvene zaštite, kao i ponašanje obolelog. U ovom istraživanju, među pacijentima sa laboratorijski potvrđenom infekcijom influenza A virusima, približno su podjednako bile zastupljene akutne respiratorne infekcije bez komplikacija (51%) i teške influenza virusne infekcije (49%). Ovaj rezultat je verovatno odraz strukture uzorka obuvaćenog ovim istraživanjem. Od 887 analiziranih uzoraka, 537 je bilo poreklom od hospitalizovanih pacijenata sa teškim akutnim respiratornim stanjima. Preostalih 350 uzoraka uzeto je od pacijenata sa lakšom kliničkom slikom, koji su medicinsku pomoć potražili u domovima zdravlja. Može se pretpostaviti da su ovi pacijenti predstavljali samo jedan mali deo od ukupnog broja osoba inficiranih virusom influence, kod kojih se bolest manifestovala u lakšem obliku, zbog čega se oni u ogromnoj većini nisu javili lekaru. Usled toga, udeo pozitivnih pacijenata sa lakšim i težim oblicima infekcije u ispitanom uzorku najverovatnije nije odgovarao stanju u opštoj populaciji, odnosno procenat pozitivnih slučajeva ILI u opštoj populaciji verovatno je bio daleko veći u odnosu na procenat komplikovanih slučajeva.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju da se influenza virusna infekcija najčešće

manifestovala kao ILI kod dece uzrasta 0-4 godine (88,9%) i 5-14 godina (93,5%). Ukupno 57,5% svih ILI slučajeva činila su deca uzrasta ≤ 14 godina. Komplikovane forme bolesti su dominirale kod pacijenata, uzrasta 30-64 godina (67,7%) i preko 65 godina (87,1%), pri čemu je 58,5% svih pacijenata sa teškim manifestacijama bolesti i 66,7% umrlih pacijenata pripadalo uzrastnoj grupi 30-64 godina. Ovi rezultati govore da, iako su deca uzrasta 5-14 godina bila najizloženija oboljevanju od influence, najveći broj infekcija je imao lakši klinički tok, dok je kod najstarijih osoba obuhvaćenih ovim istraživanjem, situacija bila obrnuta. Ovo je uobičajena situacija koja se može objasniti za uzrast-specifičnim karakteristikama imunog odgovora, koje utiču na sklonost ka oboljevanju od influence i klinički tok bolesti. Nedostatak heteropodtipskog imuniteta, uz ranije navedene faktore koji olakšavaju transmisiju virusa, čine decu veoma podložnim influenza virusnim infekcijama. Međutim, veoma efikasni mehanizmi urođenog i adaptivnog imunog odgovora, u većini slučajeva, štite ih od teških oblika bolesti [94, 162]. Nasuprot tome, starije osobe su u većoj meri zaštićene ukršteno-protektivnim antitelima stečenim u toku ranijih kontakta sa virusima influence, te su manje podložne infekcijama. Ipak, taj relativno dobar imunitet oslabljen je prisustvom hroničnih bolesti čija zastupljenost raste sa godinama života, što starije osobe, ukoliko dođe do infekcije, čini veoma podložnim različitim komplikacijama gripa [163]. Naime, hronične bolesti same i oslabljen imunitet uzrokovan njima mogu dovesti do progresije influence u teže forme i obrnuto, influenza može dovesti do pogoršanja hroničnog stanja pacijenta [164]. Pored toga, većoj sklonosti ka komplikacijama doprinosi i "starenje" imunog sistema, proces karakterističan za stariju životnu dob, u kojem dolazi do postepenog smanjenja funkcionalnosti kako urođenog tako i adaptivnog imunog sistema, a uključuje smanjivanje broja B limfocita, snižavanje antigen-specifičnosti T limfocita, povećanje nivoa inflamatornih citokina, itd. [94, 165]. Potrebno je naglasiti da je poređenje rezultata različitih istraživanja uzrastne distribucije komplikacija influence teško, zbog razlika u formiranju dobnih grupa, definisanju teškog slučaja influence, kao i određivanju kriterijuma za hospitalizaciju. Na primer, sumirajući rezultate virusološkog nadzora sprovedenog na početku sezone 2013/2014 u 11 evropskih zemalja, Adlhock i sar. [166] su, kao i u ovom radu, takođe zabeležili najveći broj ILI slučajeva kod dece uzrasta do 14 godina, ali su prema rezultatima njihovog ispitivanja, u jedinice intenzivne nege usled teških komplikacija gripa najčešće smeštani odrasli uzrasta 40-64 godine. Zhang i sar. [163] su ispitivali uzrastnu distribuciju teških slučajeva influence u sezoni 2009/2010 u Hong Kongu i utvrdili da je najveći procenat pripadao uzrastnoj kategoriji 51-60 godina. Prema preporuci SZO, pored trudnica, osoba sa hroničnim obolenjima i zdravstvenih radnika, deca uzrasta 6 meseci do 5 godina i odrasli starosti preko 65 godina predstavljaju grupe pod rizikom od komplikacija influence za koje se preporučuje sezonska vakcinacija [88]. Preporuke američkog CDC su u skladu sa stavom SZO u pogledu vakcinacije najmlađih, ali je, nakon pandemije 2009. godine, uzrastna granica kod odraslih

spuštena, te se savetuje da sve osobe starosti ≥ 50 godina treba da imaju prioritet kod vakcinacije protiv gripa [167]. U toku ovog istraživanja nije dokazano da su deca uzrasta 0-4 godine bila pod povećanim rizikom od komplikacija influence, što može biti rezultat malog broja dece ovog uzrasta uključenog u istraživanje. S druge strane, visoka zastupljenost komplikacija kod obolelih osoba uzrasta 30-64 godine, u skladu je sa rezultatima gore navedenih autora i ukazuje da je potrebno preispitati uzrastnu granicu koja deli populaciju odraslih na deo bez povećanog i deo sa povećanim rizikom od komplikacija. Ovi rezultati takođe naglašavaju važnost sprovođenja kontinuiranog virusološkog nadzora nad slučajevima ILI i SARI/ARDS izazvanih influenza virusima, koji će omogućiti bolje i preciznije definisanje rizičnih grupa.

Rezultati više istraživanja sprovedenih u periodu posle pandemije 2009. godine, ukazali su na značajan porast broja hospitalizacija i smrtnih slučajeva povezanih sa infekcijom influenza A(H1N1)pdm09 podtipom [158, 166]. U skladu sa tim i u ovom istraživanju, influenza A(H1N1)pdm09 podtip je češće od A(H3N2) podtipa, bio odgovoran za komplikovane slučajeve infekcije. Bio je prisutan kod 63,5% SARI, 66,7% ARDS i kod svih fatalnih slučajeva, odnosno kod 67,4% svih teških slučajeva influence, dok je A(H3N2) podtip dokazan kod 68% slučajeva ILI. Podaci u literaturi koji se odnose na razlike u kliničkoj manifestaciji influence izazvane A(H3N2) i A(H1N1)pdm09 podtipovima, veoma su oskudni. Prema podacima sakupljenim u toku pandemije 2009. godine, infekcije izazvane A(H1N1)pdm09 podtipom nisu se bitno razlikovale od infekcija izazvanih sezonskim influenza virusima u pogledu simptoma i težine obolenja [104,123]. Kod većine pacijenata bolest je imala blagu formu, dok su se komplikacije razvile samo kod manjeg broja obolelih. Pored toga, utvrđeno je da novi, pandemijski virus ne poseduje genetičke markere karakteristične za visoko patogene sojeve influenza virusa, poput poliaminokiselinskog mesta enzimskog cepanja prekursora HA i D222G mutacije HA gena koja uslovljava promenu receptor specifičnosti i olakšava vezivanje za receptore prisutne u donjim delovima respiratornog trakta [168, 169] ili N665S aminokiselinske substitucije u PB1-F2 proteinu koja uzrokuje povećanu sekreciju proinflamatornih citokina kod visoko virulentnih sojeva H5N1 i (H1N1)1918 virusa [170]. Samo mali procenat (<1,8%) sojeva A(H1N1)pdm09 virusa koji trenutno cirkulišu sadrži D222G mutaciju, mada je njena prevalenca kod teških i fatalnih slučajeva influence značajno veća [171]. S obzirom na odsustvo poznatih faktora virulencije, kao i na odsustvo dokaza o antigenskom driftu A(H1N1)pdm09 virusa, povezanost ovog podtipa sa teškim oblicima influence, verovatno se može objasniti uzrastnom distribucijom influenza A podtipova. Naime, infekcije A(H1N1)pdm09 podtipom dominirale su u starijim uzrastnim kategorijama koje su sklonije komplikacijama influence.

Iako prisustvo hroničnih bolesti i stanja nije uticalo na povećano oboljevanje od gripa, predstavljalo je faktor rizika za nastanak teških oblika infekcije. Signifikantno više slučajeva

teških slučajeva bolesti utvrđeno je kod pozitivnih pacijenata sa HB/S (88,5%) i to kako u grupi pacijenata sa jednom HB/S (85%), tako i sa više njih (97,1%). Takođe, čak 88,9% pacijenata koji su umrli, imalo je neku od HB/S. Nasuprot tome, kod obolelih bez HB/S dominirale su infekcije lakšeg oblika (78,1%). Ovi rezultati su u saglasnosti sa podacima iz literature prema kojima hronične bolesti srca, pluća, bubrega, dijabetes, maligniteti, bolesti koje dovode do imunosupresije, kao i hronična stanja poput gojaznosti i trudnoće, generalno predstavljaju faktore rizika za nastanak komplikacija gripa [88]. U ovom radu, svaki komorbiditet registrovan kod influenza A pozitivnih pacijenata predstavljao je rizik od nastanka komplikacija influence. Naime, ukoliko se posmatraju grupe pacijenata sa pojedinačnim faktorima rizika, može se zaključiti da se procenat teških oblika bolesti kretao u granicama od 75% kod pacijenata sa hroničnim kardiovaskularnim bolestima, do 100% kod osoba sa malignitetom i imunodeficijencijama. Zastupljenost pojedinih komorbiditeta kod teško obolelih influenza pozitivnih pacijenata, vrlo varira u različitim istraživanjima. Na primer, prema podacima ECDC koji se odnose na Evropu, u sezoni 2010/2011, od 3642 teška slučaja influence koja su zahtevala hospitalizaciju, 62% je imalo barem jednu HB/S, pri čemu su hronična oboljenja respiratornog trakta dominirala [172]. Naredne sezone, 2011/2012, od 560 hospitalizovanih pacijenata, čak 80,7% je posedovalo neku HB/S, a najčešće zabeležene su bile hronična respiratorna i kardiovaskularna oboljenja, kao i dijabetes [173]. Takođe, u svom radu, Rothberg i sar. [174] prezentuju sumirane podatke vezane za pandemiju 2009. godine sa područja SAD, Meksika, Španije, Kanade, Australije i Novog Zelanda. Oni ukazuju da je od 1047 pacijenata primljenih u jedinice intenzivne nege, svega trećina imala neki komorbiditet, pri čemu su neke od najčešćih bile: gojaznost (30%), hronične respiratorne bolesti (31%), dijabetes (16%), imunosupresivne bolesti (16%) i trudnoća (8%). Međutim, od 19% umrlih, čak tri četvrtine je imalo neku hroničnu bolest ili stanje.

Iako je u ovom radu ustanovljeno da je 88,9% influenza pozitivnih trudnica imalo tešku kliničku sliku, usled malog broja trudnica obuhvaćenih ovim istraživanjem, to nije bilo statistički značajno. Rezultati većine istraživanja ukazuju da trudnoća predstavlja važan faktor rizika za nastanak teških oblika influence. Tako Liu i sar. [175] napominju da je u odnosu na opštu populaciju, verovatnoća nastanka komplikacija influenza virusne infekcije kod trudnica je 4-5 puta veća. Prema podacima CDC, u toku prvih 8 meseci pandemije 2009. godine, u SAD, 35,5% (280/788) slučajeva infekcije trudnica A(H1N1)pdm09 virusom, imalo je težak tok, a čak 20% (56/280) fatalan kraj [176]. Iako je udeo trudnica u opštoj populaciji oko 1%, one su činile čak 5% od ukupnog broja umrlih od posledica gripa 2009. godine. Visoka prevalenca komplikacija gripa kod trudnica, zabeležena je i u Francuskoj, mada je smrtnost bila manja u odnosu na SAD i u periodu od 01.08. - 31.12.2009. iznosila je 0,9% (3/315) [177]. Posebna sklonost ka razvoju teških oblika gripa u populaciji gravidnih žena, uočena je i tokom prethodnih pandemija influence. Prema podacima nekih istraživanja, u toku pandemije 1918.

godine, smrtnost usled influence u ovoj grupi, kretala se od 27-45%, dok je za vreme pandemije 1957. godine, influenza bila vodeći uzrok smrti, odgovoran za 20% fatalnih slučajeva u trudnoći [178]. Povećan rizik od nastanka komplikovanih slučajeva gripa, nije ograničen samo na pandemijske sezone, nego je prisutan i u interpandemijskim periodima. Praćenjem više od 4300 gravidnih žena, tokom 19 uzastopnih interpandemijskih sezona, Neuzil i sar. [179] su uočili signifikantno veći rizik od nastanka kardiopulmonarnih komplikacija u odnosu na opštu populaciju.

Povećan rizik od komplikacija gripa u toku trudnoće, povezuje se sa odgovarajućim fiziološkim promenama karakterističnim za ovo stanje. Promene u okviru kardiovaskularnog sistema (ubrzana rada srca, povećan udarni volumen srca, povećana potrošnja kiseonika, smanjen kapacitet pluća), kao i modifikacija imunološkog sistema, mogu trudnice učiniti osetljivijim prema izvesnim zaraznim bolestima, uključujući i influencu [178]. Danas se na trudnoću više ne gleda kao na period koji karakteriše imunosupresija, koja uslovljava povećanu osetljivost prema različitim infektivnim bolestima. Iako se u mnogim ranijim studijama mogu naći podaci o faktorima koji indukuju imunosupresiju u trudnoći, poput progesterona, danas prevlađuje mišljenje da je takav koncept u potpunoj suprotnosti sa evolucionim i medicinskim aspektima trudnoće. Sa stanovišta evolucije, trudnoća predstavlja najvažniji period konzervacije vrste, koji ne bi smeo da bude ugrožen generalno smanjenom otpornošću prema infekcijama [179]. Činjenica je da se u toku trudnoće, u perifernoj krvi, smanjuje ukupan broj, kao i aktivnost različitih imunoloških ćelija, poput CD4+ i CD8+ T limfocita, ćelija prirodnih ubica i B limfocita. Međutim, Pazos i sar. [180], ukazuju da, počevši od 20. nedelje gestacije, istovremeno dolazi i do porasta broja fagocita, uključujući monocite, dendritične ćelije i neutrofilne granulocite, kao i do povećanja koncentracije izvesnih serumskih polipeptida sa antimikrobnim dejstvom. Takođe, kako Mor i Cardenas [180] navode, danas je poznato da na mestu implantacije blastocista u endometrijum, dolazi do akumulacije brojnih imunoloških ćelija, poput makrofaga, ćelija prirodnih ubica i regulatornih T ćelija, čije je prisustvo neophodno za normalno odvijanje početnih faza trudnoće. Imuni sistem na nivou placentae nije suprimiran, već naprotiv, aktivan, funkcionalan i pažljivo kontrolisan. Isti autori ukazuju da se na osnovu rezultata novijih istraživanja može zaključiti da placenta i fetus nisu imunološki neaktivni, nego se mogu smatrati aktivnim imunološkim organima, koji modifikuju imuni odgovor majke. Na taj način imunitet majke u toku trudnoće je modifikovan tako da, s jedne strane, obezbedi imunološku toleranciju fetusa, a s druge, da omogući aktivnu odbranu od infektivnih agenasa. Imunitet u trudnoći je izuzetno kompleksan i predstavlja kombinaciju signala i odgovora imunog sistema majke i fetalno-placentarnog imunog sistema, te kao takav može usloviti različitu reakciju, pa i veću osetljivost, na neke mikroorganizme i uticati na ishod trudnoće [179]. Generalno gledano, u toku trudnoće dolazi do disbalansa između T-helper 1 i T-helper 2 celularnog imunološkog odgovora. Smatra se da dominacija T-helper 2 ćelija u

toku trudnoće rezultira izmenom u produkciji citokina i predstavlja faktor koji doprinosi povećanoj osetljivosti prema virusu influence [182]. S druge strane, rezultati brojnih ispitivanja ukazali su da virusne infekcije poput gripa, koje povećavaju aktivnost T-helper tip 1 ćelija stimulišući produkciju velike količine proinflamatornih citokina ($TNF\alpha$, $INF\gamma$, IL-12 i IL-6), dovode do oštećenja placente i prekida trudnoće [182, 183].

Viremija i transplacentarna transmisija influenza virusa detektovane su vrlo retko, a dokazi o direktnom teratogenom dejstvu ovih virusa nisu zabeleženi. Smatra se da najveću opasnost po novorođenčete predstavlja mogućnost prenosa influence respiratornim putem, sa majke kod koje su se simptomi influence javili u periodu od 2 dana pre porođaja do 7 dana nakon njega [184]. Ipak, neka istraživanja povezuju influenza virusnu infekciju trudnica ne samo sa povećanim rizikom od spontanih prekida trudnoće i prevremenih porođaja, nego i sa povećanim rizikom od nastanka oštećenja centralnog nervnog sistema (CNS) ploda [178, 180]. Smatra se da je poremećaj u razvoju CNS-a posledica visoke telesne temperatura, koja se često javlja kao prateći simptom gripa. Rezultati istraživanja ukazuju da se smanjenje rizika od nastanka oštećenja CNS-a ploda, može postići upotrebom antipiretika, odnosno skraćanjem trajanja hipertermije kod obolelih trudnica [178].

Iako u ovom radu nije dobijena signifikantna razlika u zastupljenosti teških i lakših oblika influenza virusne infekcije kod trudnica, podatak da je od 9 influenza pozitivnih gravidnih žena, 8 imalo SARI ili ARDS, ne može biti zanemaren. On potvrđuje stav da trudnice predstavljaju posebno osetljiv deo populacije usled čega su prevencija nastanka bolesti putem vakcinacije, kao i adekvatna i blagovremena terapija u slučaju obolevanja, od izuzetnog značaja kako za zdravlje buduće majke, tako i za pravilan razvoj i zdravlje deteta. Istraživanje koje bi obuhvatilo veći broj žena generativne dobi, gravidnih i negravidnih, u toku kojeg bi se pratio efekat influenza virusnih infekcija na zdravlje žena, tok trudnoće i zdravlje novorođenčeta, dalo bi realnu sliku o značaju ovih infekcija za ovaj deo populacije, u našoj sredini.

Prepoznavanje gojaznosti kao novog faktora rizika za nastanak teških oblika bolesti i smrti od influence predstavljalo je jednu od zanimljivih karakteristika pandemije 2009. godine. Ubrzo nakon početka epidemije, primećeno je da je gojaznost bila jedan od najčešće registrovanih komorbideta kod pacijenata primljenih u jedinice intenzivne nege, širom sveta [182]. Povezanost gojaznosti sa dijabetesom je odavno poznata, a nedavna epidemiološka istraživanja je povezuju i sa astmom, pri čemu obe bolesti predstavljaju faktore rizika za razvoj komplikovanih A(H1N1)pdm09 infekcija. Međutim, mnoga istraživanja su ukazala da osobe sa indeksom telesne mase (ITM) ≥ 30 (gojazni) i/ili ≥ 40 (ekstremno gojazni) imaju povećan rizik od nastanka teških oblika bolesti, čak i u odsustvu drugih hroničnih medicinskih oboljenja [185, 186]. Gojaznost je povezana sa fiziološkim promenama sličnim onim koje nastaju u trudnoći, poput smanjene respiratorne funkcije usled manjeg plućnog volumena i ubrzane ventilacije.

Pored toga, gojaznost se može smatrati i imunokompromitovanim stanjem, iako tačan mehanizam odgovoran za izmenjen imunološki odgovor, nije jasan [182]. Rezultati eksperimentalnih istraživanja sprovedenih na animalnim modelima, povezuju gojaznost sa smanjenom produkcijom antivirusnih citokina, smanjenom aktivacijom i citotoksičnošću ćelija prirodnih ubica, redukcijom broja dendritičnih ćelija i redukcijom funkcije makrofaga. Dokazano je i smanjenje broja i aktivnosti T limfocita, naročito CD8+ populacije, kako kod životinja tako i kod ljudi. Karlsson i sar. [182] smatraju da jedan od mogućih razloga za ove promene može biti preterana ekspresija adipokina. Naime, belo adipozno tkivo ne služi samo kao depo masnoća u telu, nego funkcioniše i kao endokrini organ koji vrši sekreciju brojnih faktora koji utiču na više metaboličkih puteva. Mnogi od ovih adipokina imaju uticaj na urođeni i adaptivni imuni odgovor. Nave i sar. [187] navode da hronično povećan nivo adipokina dovodi do značajnog smanjenja imunokompetencije kod gojaznih osoba ali da su neophodna dalja istraživanja koja će u potpunosti objasniti specifičnosti međusobnog uticaja adipocita i imunoloških ćelija.

Rezultati ovog rada potvrđuju da gojazne osobe obolele od influence predstavljaju populaciju pod povećanim rizikom od nastupanja komplikovanih formi oboljenja. Teški oblici bolesti registrovani su kod svih pacijenata iz ove grupe, a smrtni ishod bolesti, kod 25% pozitivnih gojaznih osoba. Mali broj gojaznih osoba uključenih u ovo istraživanje svakako predstavlja ograničavajući faktor ovog rada. Međutim, činjenica da se kod svih influenza pozitivnih osoba sa povećanim ITM, bolest manifestovala kao SARI ili ARDS, pri čemu se kod dva pacijenta završila smrću, ukazuje da bi istraživanje kliničkog toka i ishoda influenza virusne infekcije, kao i zastupljenosti pojedinih podtipova influenza virusa, sprovedeno na većem uzorku gojaznih pacijenata, bilo opravdano.

Neophodno je spomenuti da su nedavno Albright i sar. [188] dokazali i postojanje genetičke predispozicije ka razvoju teških oblika influence, nezavisne od karakteristika virusa, kao i od od-ranije postojećeg imuniteta i uzrasta domaćina. Smatra se da se ta predispozicija svodi na genetički uslovljenu neadekvatnu imunološku reakciju na infekciju influenza virusima, u toku koje dolazi do preterane sinteze inflamatornih citokina, odnosno do takozvane citokinske "oluje" [189]. Ovakav patološki imuni odgovor može u većoj meri doprineti pogoršanju kliničke slike, nego nesposobnost imunog sistema da kontroliše virusnu replikacije. Porodična istorija teških slučajeva influence može biti korisna informacija u donošenju odluke o potrebi za vakcinacijom i ranom terapijom [188]. Genetički determinisan neadekvatan imuni odgovor mogao bi biti faktor koji je doprineo razvoju komplikovanih slučajeva influence kod 21,9% prethodno zdravih osoba, kod kojih nisu registrovane HB/S.

Rezultati logističke regresione analize potvrdili su da su ključni predikcioni faktori za nastanak teških formi bolesti u ovom istraživanju bili prisustvo HB/S i uzrast ≥ 15 godina, a ne influenza A(H1N1)pdm09 podtip. Naime, pacijenti sa HB/S imali su čak 34,1 puta veći rizik od

nastanka komplikacija, a pacijenti uzrasta ≥ 15 godina 10,4 puta, dok su pacijenti inficirani A(H1N1)pdm09 podtipom imali, svega 0,5 puta veću šansu za razvoj teških oblika infekcije u odnosu na inficirane A(H3N2) podtipom. Ovi rezultati ukazuju da su osobe sa HB/S, najosetljivija grupa u pogledu nastanka komplikovanih formi gripa, koja zahteva posebnu pažnju u pogledu preduzimanja mera prevencije gripa, što se naročito odnosi na redovnu vakcinaciju, kao i u pogledu terapije, odnosno blagovremene primene antivirusika u slučaju obolevanja. Takođe, rezultati logističke regresione analize još jednom su potvrdili stav da su deca uzrasta do 15 godina, uprkos najčešćem obolevanju od gripa, najmanje sklona komplikacijama. Neznatno veći rizik razvoja komplikacija influence imali su i oboleli od hroničnih kardiovaskularnih obolenja, pri čemu bi tek istraživanje koje bi obuhvatilo veći uzorak pacijenata sa različitim hroničnim bolestima i stanjima, moglo dati pravi uvid u značaj pojedinih HB/S kao predikcionih faktora teških oblika influence.

Izolacija influenza A virusa na ćelijskim kulturama

Od sredine 60-tih godina prošlog veka upotreba ćelijskih kultura počela je da potiskuje upotrebu embrionisanih kokošijih jaja u izolaciji influenza virusa, pri čemu se MDCK ćelijska kultura pokazala kao najpogodnija i najosetljivija i danas se smatra standardnom ćelijskom kulturom za izolaciju influenza virusa [190]. Zahvaljujući prisustvu $\alpha 2,3$ i $\alpha 2,6$ tipa receptora, izolacija humanih influenza virusa na MDCK ćelijskim kulturama ne zahteva postepenu adaptaciju pasažiranjem. Usled toga, šansa za nastanak mutacija je manja, te su izolati dobijeni na MDCK ćelijama genetički i antigenski sličniji originalnim virusima iz uzoraka [191]. Ipak, treba imati na umu da je zastupljenost $\alpha 2,6$ humanog tipa receptora na MDCK ćelijama relativno mala, te da te ćelije ne reprezentuju na idealan način epitel gornjih respiratornih organa čoveka. Uspešnost umnožavanja virusa u ćelijskoj kulturi u velikoj meri zavisi od broja vijabilnih viriona, od broja adekvatnih receptora prisutnih na ćelijama, kao i od afiniteta HA ispitivanog virusa prema prisutnim receptorima [189].

U ovom radu ukupno je izolovano 34,3% (70/204) Influenca A virusa čije je prisustvo prethodno bilo dokazano rRT-PCR testom. Pri tome, uspešnost izolacije u NIC Novi Sad (28%, 49/175) bila je značajno niža u odnosu na KCR II u Londonu (72,4%, 21/29, $p < 0,0001$), ali se nije bitno razlikovala između virusa A(H1N1)pdm09 podtipa i A(H3N2) podtipa generalno gledano, kao ni u okviru svakog Centra pojedinačno. U podacima iz literature sreću se različiti procenti uspešnih izolacija influenza A virusa iz uzoraka pozitivnih u rRT-PCR testu. Na primer, procenat influenza A virusa koji su dali jasan CPE na MDCK ćelijskim kulturama, u radu Vontas i sar. [192] iznosio je 76% (387/510), dok su u toku 2010. godine u KCR II u Melburnu, influenza A virusi uspešno izolovani iz 48,8% (187/383) uzoraka pozitivnih u rRT

PCR [193]. Pored toga, slično kao i u našem radu, i u istraživanjima dugih autora ne beleže se bitne razlike u procentima uspešnih izolacija između dva influenza podtipa. Tako je u radu Oh i sar. [190] uspešno izolovano 48,7% (19/39) A(H1N1) i 52,8% A(H3N2) virusa, a u KCRII u Melburnu, 51,3% (136/265) A(H1N1)pdm09 i 43,2% (51/118) A(H3N2) virusa [193]. Rezultati dobijeni u ovom ispitivanju, kao i rezultati drugih autora, potvrđuju veću osetljivost rRT-PCR testa koji je u stanju da specifično detektuje nukleinske kiseline virusa i u odsustvu dovoljnog broja vijabilnih viriona, koji bi svojim umnožavanjem dali vidljiv CPE u ćelijskim kulturama. Niži procenat uspešnih izolacija dobijen u NIC Novi Sad, u odnosu na KCRII u Londonu, kao i u odnosu na rezultate drugih istraživanja, verovatno je posledica toga da u toku našeg istraživanja, u postupku izolacije, nisu vršene serijske pasaže uzoraka koji su nakon pokušaja primo-izolacije bili negativni. Serijske pasaže omogućuju da virus prisutan u malom broju, bude umnožen u količini dovoljnoj za izazivanje vidljivog CPE.

Rezultati ispitivanja uspešnosti izolacije u zavisnosti od Ct vrednosti dobijene u rRT-PCR testu, koja je pokazatelj količine virusa prisutne u uzorku, ukazali su da je uspešnost izolacije opadala sa povećanjem Ct vrednosti, odnosno sa smanjenjem količine virusa u uzorcima. Najveći procenat uspešnih izolacija dobijen je u grupi uzoraka sa Ct vrednostima <30 (80,5%, 62/77), pri čemu je kod A(H1N1)pdm09 pozitivnih uzoraka iznosio 76,9% (30/39) a u grupi A(H3N2) pozitivnih 84,2% (32/38). Kod uzoraka sa Ct vrednostima 30-34, virusi su uspešno izolovani u svega 8,7% (8/92) slučajeva i to iz 9,3% (4/43) A(H1N1)pdm09 i 8,2% (4/49) A(H3N2) pozitivnih uzoraka. Influenca A virusi nisu izolovani ni iz jednog uzorka sa Ct vrednostima >34. Prema podacima KCRII iz Melburna, procenat uspešnih izolacija virusa influenza na kulturi ćelija, u 2010. godini, iz uzorka sa Ct vrednostima <30, iznosio je 53,6% (45/84) za A(H3N2) podtip i 62,3% (126/202) za A(H1N1)pdm09 podtip [193]. Kod uzoraka sa Ct vrednostima 30-34, procenat uspešnih izolacija drastično je opao na čak 12,5% (3/24) za A(H3N2) podtip i 15,9% (9/56) za A(H1N1)pdm09 podtip. Ukoliko sada uporedimo uspešnost izolacije između NIC Novi Sad i KCRII u Londonu, možemo zaključiti da u grupi uzoraka sa Ct vrednostima <30 i >34, nema signifikantnih razlika. Jedina značajna razlika uočena je kod uzoraka sa Ct vrednostima 30-34, kod kojih je uspešnost izolacije u NIC Novi Sad iznosila 5,7% (5/88), a u KCRII u Londonu 75% (3/4, $p=0,0017$), kao i kod A(H3N2) pozitivnih uzoraka sa Ct vrednostima 30-34, iz kojih je u NIC Novi Sad izolovano 4,2% (2/47), a u KCRII u Londonu 100% (2/2, $p=0,0051$) virusa. Uzimajući u obzir ove nalaze, može se zaključiti da je niži procenat uspešnih izolacija influenza A virusa u NIC Novi Sad, u odnosu na KCRII u Londonu, barem delom, bio posledica različite zastupljenosti uzoraka sa određenim Ct vrednostima. Naime, među uzorcima ispitanim u NIC Novi Sad, dominirali uzorci sa manjim sadržajem virusa, pošto je 66,9% uzoraka imalo Ct vrednosti >30. Nasuprot tome, najveći broj uzoraka ispitanih u KCRII u Londonu (65,5%), imao je Ct vrednosti <30, što je, zajedno sa serijskim pasažiranjem, doprinelo generalno boljim rezultatima izolacije postignutim u KCRII u

Londonu.

Pored malog broja vijabilnih viriona u uzorku, problemi u postupku izolacije influenza virusa u živim sistemima mogu biti vezani i za promenu njihove receptor specifičnosti. Ona se javlja kao posledica kontinuiranog antigenskog drifta, pri čemu je korelacija između promene antigenosti i promene receptor specifičnosti uslovljena prostornom bliskošću antigenih mesta i receptor vezujućih mesta na molekulu HA. Ovu pojavu objašnjavaju Lin i sar. [194], ukazujući da se od pandemije 1968. godine kada se A(H3N2) podtip prvi put pojavio u ljudskoj populaciji, beleži konstantan pad afiniteta ovog podtipa prema ptičijem tipu receptora, a od 1999. godine i prema humanom tipu receptora. Pokazalo se da je ova redukcija afiniteta prema oba tipa ćelijskih receptora bila u korelaciji sa slabom replikacijom A(H3N2) podtipa kako u pilećim embrionima, tako i u raznim ćelijskim kulturama, koja je uočena u periodu od 2001 do 2010. godine. Rezultati više ispitivanja pokazali su da u eksperimentalnim uslovima, nakon serijskih pasaža, influenza virusi mogu ponovo da steknu sposobnost umnožavanja u embrionisanim kokošijim jajima, što je bilo praćeno aminokiselinskim substitucijama na položajima 183, 186 i 226 HA molekula, kao i 119 i 136 NA molekula [139]. Pri tome, nisu sve mutacije bile prisutne kod svih ispitivanih virusa, te je izveden zaključak da influenza A virusi poseduju više alternativnih načina za prevazilaženje redukovane sposobnosti umnožavanja u pilećim embrionima. Interesantno je da i pored smanjenja afiniteta prema humanom $\alpha 2,6$ tipu receptora, influenza A(H3N2) virusi nastavljaju da cirkulišu u ljudskoj populaciji, pri čemu su u nekim sezonama, poput 2011/2012 i 2013/2014 bili dominantno prisutni. Ovo još jednom potvrđuje da je infektivnost virusa složena, više-faktorijalna osobina, te da je virus u stanju da prevaziđe smanjeni afinitet prema humanom tipu receptora, nekim drugim mehanizmima.

Takođe, poznato je da se najveći broj A(H1N1)pdm09 virusa, izuzev A/Brisbane/10/2010-like sojeva, teško umnožava u živim sistemima [195]. Identifikovane su rezidue na molekulima HA i NA, odgovorne za promene sposobnosti umnožavanja u embrionisanim jajima i/ili kulturama ćelija, ali tačan mehanizam njihovog dejstva nije jasan. Wang i sar. [195] navode da odgovarajuće aminokiselinske substitucije na položajima 125, 127, 186, 209 i 222 molekula HA, kao i na položajima 222, 241 i 369 molekula NA, omogućuju povećanu ili smanjenu sposobnost umnožavanja u jajima ili kulturama, ali i da je od značaja i optimalan funkcionalni balans između NA i HA. Kao i u slučaju A(H3N2) podtipa, dokazano je da afinitet prema određenom tipu receptora, važan ali ne i jedini faktor koji utiče na uspešnost umnožavanja virusa u pilećim embrionima i ćelijskim kulturama. Naime, za mutaciju na položaju 222 HA molekula ustanovljeno je da povećava afinitet virusa prema avijarnom $\alpha 2,3$ tipu receptora, ali pozitivan efekat na sposobnost umnožavanja u jajima imaju i mutacije rezidua 125, 127 i 209 HA molekula detektovane u virusima koji se prvenstveno vezuju za humani $\alpha 2,6$ tip receptora.

Izmena receptor specifičnosti, odnosno izmena sposobnosti umnožavanja influenza

virusa u živim sistemima, od najvećeg je značaja za mogućnost antigenske karakterizacije virusa i produkcije vakcina. Naime, virusi sa slabijim afinitetom prema ćelijskim receptorima su pod povećanim negativnim selektivnim pritiskom tokom gajenja u ćelijskim kulturama ili umnožavanja u embrionisanim kokošijim jajima [194]. Zato odabir sojeva influenza virusa koji će biti uključeni u vakcinu, ne zavisi samo od stručnih virusološko-epidemioloških podataka nego i od sposobnosti odgovarajućeg virusa da se adekvatno umnožava, prvenstveno u embrionisanim kokošijim jajima na kojima se proizvode najveće količine vakcine protiv gripa. Nakon izbijanja pandemije 2009. godine, proizvodnja vakcine protiv A(H1N1)pdm09 virusa bila je otežana upravo zbog sporog umnožavanja novog virusa u jajima [195]. Takođe, iako je SZO procenila da će dominantan virus u sezoni 2003/2004 biti A/Fujian/411/2002/H3N2, nemogućnost njegovog umnožavanja u embrionisanim jajima sprečila je njegovo uključivanje u sastav vakcine, što je za posledicu imalo znatno veći broj obolelih, naročito među decom [139].

Ispitivanje sposobnosti hemaglutinacije influenza A virusa

Sposobnost hemaglutinacije influenza virusa uslovljena je prisustvom sijalinskih oligosaharidnih receptora na površini eritrocita, pri čemu se eritrociti različitih animalnih vrsta razlikuju po prisustvu i zastupljenosti $\alpha 2,6$ i $\alpha 2,3$ veza, kao i po sastavu oligosaharida u okviru površinskih glikoproteina i glikolipida. Kako Makkoch i sar. [196] navode, na eritrocitima čoveka, ćurke i svinje dominira $\alpha 2,6$, a na eritrocitima guske i kokoške $\alpha 2,3$ tip receptora, pri čemu eritrociti čoveka i kokoške poseduju pretežno N-acetil sijalinsku kiselinu, a eritrociti konja i krave N-glikolil sijalinsku kiselinu. Odabir najosetljivijih eritrocita za ispitivani virus, od ključnog je značaja za mogućnost izvođenja i tumačenja rezultata RIH, odnosno za postupak antigenske karakterizacije influenza virusa. Međutim, rezultati brojnih ispitivanja su ukazali da sposobnost aglutinacije odgovarajućih eritrocita od strane influenza A virusa, može da se menja i da pri tome može ali ne mora biti u korelaciji sa promenom receptor-specifičnosti virusa.

U RH izolati A(H1N1)pdm09 podtipa dobijeni u ovom istraživanju, pokazali su najbolje rezultate sa eritrocitima zamorca koje je aglutiniralo 56% (14/25) ispitanih virusa. Sa humanim eritrocitima je reagovalo samo 16% (4/25), a sa kokošijim eritrocitima 8% (2/25) ispitanih virusnih izolata.. Virusi A(H1N1)pdm09 podtipa koji su, uprkos izraženom CPE, davali niske hemaglutinacione titrove, detektovani su širom sveta u sezonama 2012/2013 i 2013/2014. Prema rezultatima KCRII u Londonu, u toku sezone 2012/2013 svega 52,7% (78/148), a u toku sezone 2013/2014 samo 44,9% (48/107) virusa ovog podtipa, dalo je zadovoljavajući titar za izvođenje RIH [145, 197, 198, 199].

Promena specifičnosti prema eritrocitima influenza A virusa, predmet je brojnih istraživanja. Makkoch i sar. [196] su istraživali sposobnost izolata A(H1N1)pdm09 virusa iz 2009 i 2010. godine da vrše aglutinaciju 6 različitih vrsta eritrocita. U njihovom istraživanju, najbolji rezultati, odnosno najviši titrovi virusa dobijeni su pomoću eritrocita guske, a zatim ćurke i humanih eritrocita nulte krvne grupe, dok su kokošiji eritrociti davali znatno niže titrove. I u radu Wiriyarat i sar. [200], u reakciji hemaglutinacije A(H1N1)pdm09 virusa, kao najosetljiviji, pokazali su se eritrociti guske. Eritrociti zamorca su takođe davali dobre rezultate, sa humanim eritrocitima su dobijeni niži titrovi, a ispitivani virusi uopšte nisu aglutinirali kokošije eritrocite. Problem sa niskim titrovima u RH, uprkos jasnom CPE dobijenom umnožavanjem influenza A(H1N1)pdm09 virusa u kulturi ćelija, imali su i Obuchi i sar. [200]. Oni su uočili da je u toku sezone 2010/2011 značajno porastao procenat virusa koji su davali niske hemaglutinacione titrove, u odnosu na sezonu 2009/2010. Naime, 69% (61/88) izolata iz sezone 2009/2010 je u RH sa eritrocitima zamorca pokazalo zadovoljavajuće titrove, dok je naredne sezone čak 79% (95/121) pokazalo titrove nedovoljne za dalje podvrgavanje RIH. Slični rezultati dobijeni su i sa eritrocitima guske i ćurke, dok su kokošiji eritrociti pokazali najlošije rezultate. Nakon sekvenciranja HA i NA gena, zaključili su da je presudnu ulogu verovatno imala substitucija alanina treoninom na položaju 197 HA gena, koja je na indirektan način, menjajući orijentaciju helikasa koji učestvuje u interakcijama sa receptorom, smanjila sposobnost vezivanja za eritrocite.

Slično virusima A(H1N1)pdm09 podtipa i virusi A(H3N2) podtipa izolovani u ovom istraživanju, najbolje rezultate u RH dali su sa eritrocitima zamorca. Ukupno 62,5% (15/24) aglutiniralo je eritrocite zamorca u titru ≥ 40 . Sa humanim eritrocitima reagovalo je zadovoljavajuće svega 8,3% (2/24) izolata, a ispitani virusi nisu aglutinirali eritrocite kokoške. Slično našim rezultatima, u sezoni 2012/2013, u KCRII U Londonu, 66,3% izolovanih A(H3N2) virusa, u RH sa eritrocitima zamorca davalo je titrove dovoljne za izvođenje RIH [145, 196], a u sezoni 2013/2014, zadovoljavajući titrovi dobijeni su kod 67,4% (130/193) izolata ovog podtipa [198, 199].

U toku 90-tih godina prošlog veka primećeno je da A(H3N2) izolati umnoženi na MDCK i Vero ćelijskim kulturama, gube sposobnost aglutinacije kokošijih eritrocita, pri čemu su od 2003. godine detektovani retki sojevi koji su ponovo stekli ovu sposobnost [109, 202]. Kumari i sar. [109] su pokušali da otkriju molekularne osnove ove promene, međutim nisu uspjeli da detektuju aminokiselinske substitucije koje su bile univerzalno prisutne kod ispitivanih virusa. Pored toga, ustanovili su da mutacije koje su bile povezane sa gubitkom sposobnosti aglutinacije 90-tih godina, nisu odgovorne za ponovno sticanje ove sposobnosti, niti je ova pojava bila posledica promenjene receptor specifičnosti u pravcu α -2,3 tipa. Takođe, u radu Louisirirochanakul i sar. [203], ustanovljeno je da izolati A(H3N2) iz 2003. i 2004. godine, za razliku od izolata dobijenih ranijih godina, nisu aglutinirali eritrocite kokoške, ali su zato

zadovoljavajući titrovi virusa dobijeni sa eritrocitima čoveka i zamorca, a u manjoj meri i guske. Gulati i sar. [204] su vršili ispitivanje sposobnosti vezivanja influenza virusa A(H3N2) podtipa izolovanih u periodu od 1968-2012 za više od 160 različitih sijalizovanih glikana. Uočili su sezonske varijacije u receptor specifičnosti, pri čemu su brojni izolati u periodu od 1983-1986. i 1997-2008. godine, pokazivali smanjeni afinitet ili su potpuno izgubili sposobnost vezivanja za humane eritrocite.

Smatra se da varijacije u pogledu specifičnosti prema odgovarajućim eritrocitima, predstavljaju još jednu posledicu kontinuiranog antigenskog drifta influenza A virusa. Kao što je već rečeno, virusi sa izmenjenim antigenskim svojstvima, mogu istovremeno imati i različit afinitet prema odgovarajućem tipu receptora, što se može odraziti na sposobnost umnožavanja u određenom živom sistemu, ali i dovesti do izmenjene sposobnost vezivanja i aglutinacije odgovarajućih eritrocita. Kako se na respiratornom traktu čoveka nalazi čitav niz različitih sijalinskih struktura, promena u receptor specifičnosti ne mora nužno, na drastičan način, uticati na infektivnost virusa. Tako u ljudskoj populaciji mogu cirkulisati influenza virusi sa donekle različitim afinitetima prema receptorima, odnosno različitim sposobnostima vezivanja za odgovarajuće eritrocite [205].

Antigenske i filogenetske osobine influenza A(H1N1)pdm09 virusa

Svi A(H1N1)pdm09 virusi iz sezone 2012/2013, testirani u laboratoriji Centra za virusologiju, kao i 5 izolata iz sezone 2012/2013, analiziranih u KCRIL u Londonu, pokazali su u RIH dobru reaktivnost sa antiserumom dobijenim pomoću vakcinalnog virusa A/California/7/2009. Ovo je bilo u skladu sa rezultatima dobijenim za najveći broj (93%, 315/339) virusa testiranih u KCRIL u Londonu u sezoni 2012/2013 [145, 197]. Samo 7% (24/339) analiziranih virusa su antigenski bili izmenjeni u tolikoj meri da je titar u RIH dobijen sa antiserumom protiv virusa A/California/7/2009 bio četverostruko ili više niži u odnosu na titar homologog virusa. Naredne sezone, 2013/2014 situacija je bila slična. Svi izolati testirani u laboratoriji Centra za virusologiju i 3 izolata analizirana u KCRIL u Londonu, reagovali su dobro sa antiserumom pripremljenim pomoću virusa A/California/07/2009. Prema izveštajima KCRIL iz Londona, 97,4% (336/345) ispitanih izolata u sezoni 2013/2014, bilo je antigenski slično vakcinalnom virusu, svega 2,3% (8/345) je imalo četverostruko niži, a 0,3% (1/345) osam puta niži titar od titra dobijenog pomoću vakcinalnog soja [198, 199]. Može se zaključiti da u toku sezona 2012/2013 i 2013/2014, nije došlo do značajnijeg antigenskog drifta kod influenza virusa A(H1N1)pdm09 podtipa, usled čega su svi testirani virusi antigenski bili slični pandemijskom soju iz 2009. godine. Prema preporukama SZO, A(H1N1)pdm09 komponenta

vakcine je nepromenjena još od sezone 2010/2011, pri čemu je i za sezonu 2014/2015, kao vakcinalni influenza virus predložen soj A/California/07/2009 (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_15_north/en/).

U KCRII u Londonu, ispitana je reaktivnost 5 reprezentativnih izolata iz sezone 2012/2013 i 3 izolata iz sezone 2013/2014 i sa drugim referentnim serumima. Ispitani virusi su reagovali dobro sa većinom antiseruma, odnosno dobijeni titrovi su bili u okviru četvorostruke razlike u odnosu na titar dobijen sa homologim antigenom. Izuzetak je bio antiserum dobijen pomoću virusa A/Christchurch/16/2010 sa kojim su samo dva ispitana virusa iz sezone 2012/2013 i jedan iz sezone 2013/2014 dala zadovoljavajuće titrove, kao i antiserum dobijen sa A/St. Petersburg/27/2011, sa kojim su dobro reagovala samo 3 testirana virusa iz sezone 2012/2013. Kako je navedeno u izveštajima KCRII iz Londona, većina virusa A(H1N1)pdm09 podtipa iz sezona 2012/2013 i 2013/2014, nije dala dobre rezultate sa antiserumom dobijenim pomoću virusa A/Christchurch/16/2010 [145, 197, 198, 199].

Rezultati sekvenciranja HA gena dva reprezentativna izolata A(H1N1)pdm09 podtipa, ukazali su da su u toku sezone 2012/2013, u našoj sredini, cirkulisali virusi koji su pripadali dvema različitim genetičkim grupama. Virus A/Serbia/NS237/2013, pripadao je genetičkoj grupi 6 podgrupi C, a virus A/Serbia/NS223/2013 genetičkoj grupi 7. Ovaj rezultat ukazuje na to da je u toku sezone 2012/2013, influenza A(H1N1)pdm09 virus unet u našu sredinu najmanje u dva navrata. Na osnovu HA gena A(H1N1)pdm09 virusi mogu biti klasifikovani u 8 genogrupa, pri čemu A/California/7/2009 čini genetičku grupu 1. Prema podacima KCRII iz Londona, u toku sezone 2012/2013, najveći broj virusa A(H1N1)pdm09 podtipa, pripadao je upravo genetičkim grupama 6 i 7. Sekvenciranje HA gena izolata iz naredne sezone, 2013/2014, pokazalo je da testirani virusi, A/Serbia/NS601/2014, A/Serbia/NS703/2014, A/Serbia/NS735/2014 i A/Serbia/NS735/2014 pripadaju genogrupi 6 podgrupi B. Svi izolati A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2013/2014, ispitani u KCRII u Londonu pripadali su genogrupi 6, podgrupama B ili C [197, 198].

Slaba reaktivnost testiranih virusa (iz genogrupe 6B, 6C i 7) sa antiserumom dobijenim pomoću A/Christchurch/16/2010 virusa koji pripada genogrupi 4, mogla bi se delimično objasniti time da ispitani virusi i homologe A/Christchurch/16/2010 virus, pripadaju filogenetski različitim grupama. Međutim, virusi iz sezone 2012/2013 dali su loše rezultate i sa antiserumom dobijenim pomoću A/St.Petersburg/27/2011 koji pripada 6. genogrupi, a zadovoljavajuće sa antiserumima dobijenim pomoću virusa koji pripadaju genetičkim grupama 1, 3, 5, 6 i 7. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da genske mutacije koje definišu pripadanje virusa određenoj genogrupi, mogu ali ne moraju uvek biti praćene i značajnim antigenskim razlikama.

Antigenske i filogenetske osobine influenza A(H3N2) virusa

Izolati influenza virusa A(H3N2) podtipa iz sezone 2012/2013, slabo su reagovali u RIH sa imunim serumom dobijenim pomoću A/Victoria/361/2011 virusa umnoženog na jajima, koji je bio u sastavu vakcine za sezonu 2012/2013. Od 5 ispitanih izolata samo 1 je imao četverostruko niži titar u odnosu na referentni virus, dok je kod preostalih izolata taj titar bio više od 4 puta niži. Ovaj nalaz je bio u skladu sa rezultatima antigenog ispitivanja virusa A/Serbia/NS-200/2013 i A/Serbia/NS-210/2013, sprovedenog u KCRIL u Londonu. Pored toga, oba testirana virusa pokazala su generalno lošu reaktivnost sa imunim serumima dobijenim pomoću referentnih virusa umnoženih u embrionisanim kokošijim jajima. Među svim imunim serumima pripremljenim pomoću, u jajima umnoženih virusa, najbolji rezultat je ostvaren sa imunim serumom dobijenim pomoću A/Texas/50/2012. Iako su dobijeni titrovi bili znatno ispod optimalnih, ipak su ti rezultati bili bolji od rezultata dobijenih sa drugim antiserumima pripremljenim pomoću virusa umnoženih na jajima, a naročito u odnosu na antiserum dobijen pomoću, na jajima umnoženog, vakcinalnog A/Victoria/361/2011. Prema podacima KCRIL u Londonu, iste antigenske karakteristike primećene su kod najvećeg broja A(H3N2) virusa izolovanih tokom prve polovine 2013. godine [197]. Tako je svega 5% ispitanih virusa reagovalo sa antiserumom pripremljenim pomoću, na jajima umnoženog, vakcinalnog virusa A/Victoria/361/2011, sa titrom koji je bio u opsegu četverostruke razlike u odnosu na titar homologog virusa. Bolja reaktivnost zabeležena je sa antiserumom dobijenim pomoću, na jajima umnoženog virusa A/Texas/50/2012, pri čemu je 45% ispitanih virusa imalo titrove četverostruko niže, a svega 7,5% dvostruko niže u odnosu na titar homologog virusa. Rezultati ovih istraživanja doveli su do promene preporuke SZO u pogledu vakcinalnog A(H3N2) soja za sezonu 2013/2014. Naime, iako je u februaru 2013. godine SZO preporučila da A(H3N2) komponenta vakcine ostane nepromenjena u odnosu na prethodnu sezonu i da bude predstavljena virusom A/Victoria/361/2011, u julu je izvršena korekcija. Utvrđeno je da je u vakcinalnom laboratorijskom soju virusa A/Victoria/361/2011 došlo do antigenske promene, kao posledice mutacije nastale tokom laboratorijskog pasažiranja virusa na jajima. Zaključeno je da aktuelnom A(H3N2) virusu više antigeni odgovara soj A/Texas/50/2012, te da će zamena vakcinalnog virusa imati za posledicu veću efikasnost vakcine u sezoni 2013/2014 (<http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/>).

Problemi vezani za antigensku karakterizaciju izolata A(H3N2) podtipa, nastavili su se i naredne sezone 2013/2014. Svi virusi testirani u ovom radu, dali su titrove više od 4 puta niže u odnosu na referentni vakcinalni A/Texas/50/2012 virus. Takođe, od 10 izolata ispitanih u KCRIL u Londonu, dva (A/Serbia/NS-670/2014 i A/Serbia/NS-707/2014) su dala četverostruko niže titrove u odnosu na homologi A/Texas/50/2012 virus, dok je preostalih 8 izolata dalo

titrove koji su bili 8 ili više puta niži od titra homologog virusa. Prema podacima KCRIL iz Londona, 87,4% (494/565) izolata ovog podtipa, u RIH sa antiserumom dobijenim pomoću, u jajima umnoženog A/Texas/50/2012 virusa, dalo je titrove koji su bili 8 puta niži od titra referentnog, homologog virusa, 12% (68/565) titrove 4 puta niže, a svega 0,5% (3/565) izolata je dobro reagovalo i imalo dvostruko niži titar [198, 199]. Od svih seruma dobijenih pomoću virusa umnoženih na jajima, najbolji rezultat u RIH postignut je sa serumom protiv virusa A/Stockholm/1/2013, a slabiji sa ostalim, poput A/Hong Kong/146/13, A/Serbia/NS-210/13 i A/Almaty/2958/2013. Prema podacima KCRIL iz Londona [199], iako je antiserum dobijen pomoću virusa A/Stockholm/1/2013, davao niske titrove sa homologim virusom, u RIH je uspešno reagovao sa preko 80% testiranih A(H3N2) virusa iz sezone 2013/2014. Antiserumi protiv virusa A/HongKong/146/13, A/Serbia/NS-210/13 i A/Almaty/2958/2013, reagovali su u četvorostrukom opsegu sa samo 22%, 35% i 33% ispitanih izolata, respektivno.

Rezultati RIH sa panelom referentnih imunih seruma, sprovedene u KCRIL u Londonu, ukazali su da su A(H3N2) izolati iz sezona 2012/2013 i 2013/2014, iz naše sredine, znatno bolje reagovali sa antiserumima dobijenim pomoću virusa umnoženih na ćelijskim kulturama, u odnosu na imune serume protiv virusa umnoženih na jajima. Svi dobijeni titrovi bili su okviru dvostruke razlike u odnosu na titrove homologih virusa. Rezultati ispitivanja izolata iz naše sredine bili su u saglasnosti sa rezultatima analize većine A(H3N2) virusa koji su cirkulisali tokom sezona 2012/2013 i 2013/2014, analiziranih u KCRIL u Londonu. Na primer, u toku sezone 2012/2013, dobri rezultati su dobijeni kod 95% testiranih virusa sa antiserumom protiv vakcinalnog virusa A/Victoria/361/2011 umnoženog u MDCK kulturama ćelija, kao i kod čak 99% virusa sa antiserumom dobijenim pomoću A/Athens/112/2012 [197]. Takođe, svi izolati iz naše sredine, kao i 80-95% svih A(H3N2) izolata iz sezone 2013/2014, ispitanih u KCRIL u Londonu, reagovali su dobro sa antiserumima dobijenim pomoću u ćelijskim kulturama umnoženih virusa A/Victoria/361/2011, A/Samara/73/2013 i A/Stockholm/6/2014 [199].

Interesantno je da je u toku sezone 2013/2014, u KCRIL u Londonu ispitano i 45 virusa za koje je utvrđeno da su u RIH loše reagovali sa imunim serumima protiv virusa umnoženih na ćelijskim kulturama, kao što su A/Victoria/361/2011 i A/Samara/73/2013 [199]. Detaljnom analizom, zaključeno je da ovi virusi predstavljaju antigenski i genetički posebne podgrupe 3C grupe, pri čemu je 37 svrstano u 3C.2a, a 8 u 3C.3a. U RIH sa antiserumima dobijenim pomoću virusa iz 3C.3a genetičke podgrupe, poput A/Stockholm/6/2014 i A/Norway/466/2014, dobijeni su bolji rezultati. Pored toga, ovi antiserumi su uspešno reagovali i sa preko 90% ostalih A(H3N2) izolata koji nisu pripadali novim podgrupama. Iako je u februaru 2014. godine, SZO preporučila da A(H3N2) komponenta vakcine za sezonu 2014/2015, za Severnu hemisferu, bude predstavljena virusom A/Texas/50/2012, kao rezultat antigenskih i genetičkih ispitivanja aktuelnih izolata, u septembru 2014. godine izvršena je korekcija. Predloženo je da u sastav vakcine za sezonu 2015 za Južnu hemisferu uđe virus iz 3C.3a genetičke grupe

A/Switzerland/9715293/2013, pri čemu A/Norway/466/2014 i A/Stockholm/6/2014 predstavljaju A/Switzerland/9715293/2013-like viruse (http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_south/en/).

Rezultati antigenskog ispitivanja influenza virusa A(H3N2), ukazuju na to koliko je proizvodnja vakcine protiv influence težak i kompleksan proces. S jedne strane, problem predstavlja pojava i širenje antigeniski izmenjene, drift varijante virusa, protiv kojeg vakcinalna antitela pokazuju manju efikasnost. Na primer, u sezoni 2011/2012, kao posledica antigenskog drifta, većina u to vreme aktuelnih A(H3N2) virusa pokazivala je redukovanu reaktivnost sa antiserumom dobijenim pomoću vakcinalnog virusa A/Perth/16/2009, a A(H3N2) komponenta vakcine je imala umerenu ili slabu efektivnost u vakcinisanoj populaciji [151]. Influenca viruse A(H3N2) podtipa odlikuje češći antigeniski drift, odnosno brža smena antigeniski novih varijanti virusa, u odnosu na A(H1N1) podtip za koji je karakteristična ko-cirkulacija antigeniski različitih varijati, mada uzrok slabijeg selektivnog pritiska na A(H1N1) viruse u odnosu na A(H3N2) viruse, za sada nije razjašnjen [206, 207].

Pored antigenskog drifta, problem mogu predstavljati i mutacije virusa koje nastaju u toku laboratorijskih pasaža u živim sistemima. Ovaj problem su ispitali i objasnili Skowronski i sar. [208] nakon što je utvrđeno da je efektivnost A(H3N2) komponente vakcine u toku sezone 2012/2013 bila ispod 50%, uprkos tome što je najveći broj A(H3N2) izolata antigeniski bio nepromenjen u odnosu na prototip vakcinalnog virusa A/Victoria/361/2011. Naime, usled teškoća sa umnožavanjem A(H3N2) virusa u embrionisanim kokošijim jajima, izolacije virusa u NIC i KCRII širom sveta u najvećem broju slučajeva vrše se na ćelijskim kulturama. Da bi neki od tih virusa mogao biti upotrebljen za proizvodnju vakcine, neophodno je da bude prilagođen efikasnom umnožavanju u embrionisanim kokošijim jajima. To se uglavnom postiže konstrukcijom rearanžiranog soja koji poseduje HA i NA gene prototip soja, dok ostatak genoma pripada laboratorijskom soju virusa prilagođenom umnožavanju u jajima. Kako autori dalje navode, rano obezbeđivanje proizvođača vakcina, na jaja dobro adaptiranom verzijom prototip virusa preporučenog od strane SZO, od ključnog je značaja za pravovremenu proizvodnju vakcine. Međutim, Skowronski i sar. [208] su pokazali da u toku adaptacije rearanžiranog vakcinalnog soja na umnožavanje u embrionisanim jajima, mogu nastati mutacije koje će usloviti izmenu svega par aminokiselina u blizini receptor-vezujućeg mesta, što za posledicu može imati drastičnu izmenu antigenosti, imunogenosti i efikasnosti vakcine. Naime, u rearanžiranom virusu umnoženom na jajima, detektovane su 3 aminokiselinske substitucije locirane u blizini receptor-vezujućeg mesta i to H156Q i G186V u okviru antigenih mesta B i S219Y u okviru antigenog mesta D. Po prisustvu ovih mutacija vakcinalni virus se razlikovao od homologog virusa A/Victoria/361/2011 umnoženog na ćelijskoj kulturi i svih ispitanih A(H3N2) izolata iz sezone 2012/2013. Usled toga, kako autori zaključuju, potrebno je pratiti i porediti u realnom vremenu kao i retrospektivno, antigenske

karakteristike cirkulišućih A(H3N2) virusa i vakcinalnih virusa i to kako originalnih sojeva umnoženih na ćelijskim kulturama, prototip sojeva umnoženih na embrionisanim jajima, tako i rearanžiranih sojeva koji se umnožavaju u embrionisanim jajima u procesu proizvodnje vakcine protiv gripa.

Poseban problem predstavljaju mutacije virusa koje nastaju u toku pasaže u ćelijskim kulturama, koje uzrokuju teškoće u interpretaciji antigenskih odnosa ispitivanih virusa. Naime, kako Lin i sar. [205] navode, još od 2005. godine, kod A(H3N2) izolata dobijenih na MDCK kulturama ćelija, uočavaju se slabi rezultati u RIH sa imunim serumima pripremljenim pomoću virusa umnoženih na jajima, čak i u slučaju homologih referentnih virusa. Oni su ustanovili da niski titrovi u RIH nisu bili uslovljeni izmenom u molekulu HA, nego selekcijom mutanata u MDCK ćelijama, koji umesto aspartata na položaju 151 molekula NA, imaju glicin, asparagin ili alanin. Kao posledica ovih substitucija NA je stekao sposobnost vezivanja za receptore, pri čemu je funkcija raskidanja veza između receptora i molekula HA ostala očuvana. Na taj način su mutirani virusi bili u stanju da vrše NA-zavisnu hemaglutinaciju. Smatra se da je selekciji mutanata sa sposobnošću NA-zavisnog receptor vezivanja doprineo izuzetno nizak aviditet HA ovih virusa prema receptorima [209].

Iako se RIH koristi već više od 60 godina, evolutivne promene koje za posledicu imaju teškoće u umnožavanju influenza virusa u živim sistemima, izmenjene sposobnosti aglutinacije eritrocita ili pojavu NA-zavisnog receptor vezivanja, u nekim slučajevima potpuno onemogućuju primenu RIH u antigenskoj karakterizaciji influenza virusa. Mada je njegovo izvođenje znatno zahtevnije, neutralizacioni test može biti korisna zamena za RIH u antigenskim analizama influenza virusa, barem u slučaju virusa čija je sposobnost umnožavanja u ćelijskim kulturama očuvana [209].

Analiza sekvence HA gena A(H3N2) virusa iz sezona 2012/2013 i 2013/2014, ukazala je da su u toku obe sezone, u našoj sredini cirkulisali virusi koji su pripadali istoj genetičkoj kladi A/Victoria/208/2009, grupi 3C i podgrupi 3C.3. Filogenetski najrodniji virusima iz naše sredine, u sezoni 2012/2013 bili su virusi poreklom iz Slovenije i Češke, a u sezoni 2013/2014 virusi iz Kazahstana, Španije i Južne Afrike. Prema podacima KCRIL iz Londona, A(H3N2) virusi koji pripadaju drugoj genetičkoj kladi, A/Perth/16/2009 više ne cirkulišu u ljudskoj populaciji, dok su među najčešće dokazanim virusima iz klade A/Victoria/208/2009, u sezonama 2012/2013 i 2013/2014, bili upravo oni iz genogrupe 3C [197, 199]. Pored toga, interesantno je da su virusi pripadnici novih genetičkih podgrupa 3C.3a i 3C.2a, detektovani prvi put 2014. godine, imali vrlo različito geografsko poreklo. Virusni svrstani u 3C.3a podgrupu poticali su iz Australije, Tasmanije, Hong Konga, Rusije, Kameruna, SAD, Norveške, Finske, a jedan od virusa je u London poslat iz naše zemlje od strane NIC u Beogradu. Manje zastupljeni virusi, pripadnici novonastale genetičke podgrupe 3C.2a, poticali su iz Hong Konga, Australije, SAD i Rusije. Za razliku od virusa iz ovih podgrupa, koji su zahvaljujući

specifičnim mutacijama postali i antigenski izmenjeni, u toku 2014. godine, u okviru 3C.3 podgrupe, izdvojila se i genetička podgrupa 3C.3b, čiji malobrojni pripadnici ne predstavljaju antigenski nove, drift varijante. Rezultati ovih filogenetskih analiza pokazuju da se virusi nosioci istih genskih markera mogu u kratkom vremenskom periodu raširiti u geografski vrlo udaljene regione, i ukazuju na izuzetan potencijal širenja influenza virusa i postojanje stalne opasnosti od brzog širenja izrazito virulentnih sojeva koji bi mogli nastati u budućnosti .

Osetljivost influenza A virusa na oseltamivir

Rana primena anti-influenca virusnih lekova može u velikoj meri da utiče na klinički tok bolesti i da spreči nastanak ozbiljnih komplikacija. U terapiji influence trenutno se koristi nekoliko antivirusa koji pripadaju grupi NAi. Počevši od sezone 1999/2000, oseltamivir i zanamivir se koriste širom sveta, dok je upotreba laninamivira, za sada odobrena u Japanu, a peramivira u Japanu, Kini i Republici Koreji [130], a od kraja 2014. godine i u SAD [124]. S obzirom na to da je preko 99% influenza virusa A(H3N2) i A(H1N1)pdm09 podtipa rezistentno na stariju grupu antiinfluenca antivirusa, adamantane, njihova primena u terapiji influence se više ne preporučuje [134]. Usled toga, ispitivanje rezistencije influenza virusa na antivirusne, prvenstveno se svodi na ispitivanje njihove osetljivosti na NAi, dok se analiza osetljivosti na adamantane ne smatra prioritetom.

Veći broj eksperata zaposlenih u evropskim NIC SZO i laboratorijama ustanova koje se bave javnim zdravljem ili se nalaze u okviru univerzitetskih klinika, okupljenih u radnu grupu pod koordinacijom ECDC i Regionalne kancelarije SZO za Evropu, sastavili su uputstvo za laboratorije na području Evrope, koje se bave testiranjem osetljivosti influenza virusa na antivirusne [210]. U skladu sa tim uputstvom, testiranje antivirusne rezistencije influenza virusa važno je iz nekoliko razloga: 1) u cilju praćenja pojave virusa sa redukovanom ili visoko redukovanom inhibicijom odgovarajućim antivirusom kod hospitalizovanih pacijenata, čime se proverava adekvatnost primenjenog antivirusa i po potrebi se vrši njegova zamena drugim; 2) radi utvrđivanja učestalosti virusa sa redukovanom ili visoko redukovanom inhibicijom određenim antivirusom u populaciji, na osnovu koje se donosi odluka o tome koji antivirus predstavlja prvi izbor u lečenju obolelih; 3) zbog identifikacije virusa sa redukovanom ili visoko redukovanom inhibicijom odgovarajućim antivirusom koji se uspešno umnožavaju i prenose te mogu postati dominantni među virusima koji cirkulišu u datom momentu. Isto uputstvo daje preporuke i o tome koji pacijenti treba da budu obuhvaćeni ovim ispitivanjem. Pošto se zna da se rezistencija na antivirusne uglavnom detektuje kod pacijenata kod kojih se influenza virusne partikule ekskretuju produženo, uprkos primeni

antivirusne terapije, preporučeno je da se testiranju osetljivosti influenza virusa na antivirolike podvrgnu: 1) pacijenti u čijim respiratornim uzorcima se detektuju influenza virusi i nakon 5 dana od početka primene terapije, a to su prvenstveno imunokompromitovani i teško oboleli pacijenti kod kojih se klinička slika pogoršava; 2) pacijenti kod kojih se bolest manifestovala nakon ili u toku primene antivirusne hemoprofilakse; 3) pacijenti oboleli nakon kontakta sa osobama koje su bile tretirane antivirusicima a obolele su; 4) pacijenti oboleli nakon kontakta sa pacijentima za koje se zna da su inficirani virusom sa redukovanom ili visoko redukovanom inhibicijom odgovarajućim antivirusikom; 5) pacijenti preminuli usled komplikacija influence, uprkos primeni antivirusika. Pored toga, uzimajući u obzir da se rezistencija oba influenza podtipa na antivirolike iz grupe adamantana, kao i rezistencija sezonskog A(H1N1) virusa na oseltamivir, javile u odsustvu selektivnog pritiska odgovarajućeg leka, eksperti iz radne grupe smatraju da bi bilo poželjno testirati i reprezentativni uzorak uzet iz opšte populacije, odnosno od nehospitalizovanih pacijenata koji ne primaju antivirusnu terapiju.

Prema našim saznanjima, ne postoje podaci o osetljivosti influenza virusa na NAI u našoj zemlji. U toku našeg istraživanja, izvršeno je ispitivanje osetljivosti odabranih influenza A virusa iz sezone 2012/2013 i 2013/2014 na oseltamivir, te je po prvi put dobijen uvid u ovu važnu osobinu influenza virusa koji su bili aktivni u datom periodu u našoj sredini. Ispitivanjem je bilo obuhvaćeno po 14 influenza virusa oba podtipa. U grupi A(H1N1)pdm09 virusa, ispitivanjem su bili obuhvaćeni virusi izolovani iz uzoraka 7 pacijenata sa teškim slučajevima influence od kojih su dva pacijenta preminula, a kod 5 je kao od ranije postojeća hronična bolest registrovana imunodeficijencija. Preostalih 7 virusa izolovano je iz uzoraka pacijenata sa lakšim oblikom gripa. U grupi A(H3N2) virusa, 5 je bilo izolovano iz uzoraka pacijenata sa komplikovanom formom obolenja, među kojim je dvoje bilo i imunodeficitarno, dok je preostalih 9 virusa izolovano iz uzoraka pacijenata koji su imali lakši oblik influence. Poznato je da su imunokompromitovani pacijenti pod najvećim rizikom od razvoja rezistencije na oseltamivir tokom terapije ovim lekom. Jasno je koliko takve infekcije mogu biti opasne za same imunokompromitovane pacijente, naročito imajući u vidu veoma mali izbor alternativne terapije. Pored toga, kod takvih pacijenata rezistentni virus može perzistirati nedeljama, te na taj način oni mogu predstavljati rezervoar njegovog širenja na druge pacijente. Pacijenti sa teškom kliničkom slikom i oni kod kojih se bolest završila fatalno, uključeni su u istraživanje imajući u vidu da se najveći broj rezistentnih sojeva beleži upravo kod takvih pacijenata koji zahtevaju primenu dugotrajnije antivirusne terapije. Svi influenza virusi ispitani u ovom radu pokazali su normalnu osetljivost na oseltamivir. Jedan od A(H3N2) virusa poslatih u KCR II u Londonu, detektovan u sezoni 2013/2014, kod nehospitalizovanog pacijenta sa lakšim oblikom influenza virusne infekcije, pokazao je 8 puta veću rezistenciju inhibicije oseltamivirom u odnosu na referentni, osetljiv virus. Iako ga ova vrednost nije svrstavala u grupu virusa sa redukovanom inhibicijom oseltamivirom, sekvenciranje NA gena ovog virusa

pokazalo je prisustvo mutacije Q391H, koja se povezuje sa rezistencijom na NAI. Ovaj podatak još jednom potvrđuje, neophodnost skrininga na antivirusnu rezistenciju reprezentativnog broja virusa izolovanih iz pacijenata sa lakšim oblikom bolesti koji nisu tretirani antiviruscima.

U toku sezona 2012/2013 i 2013/2014, u KCRIL u Londonu, ustanovljena je mala procentualna zastupljenost influenza A virusa rezistentnih na oseltamivir [145, 197]. U sezoni 2012/2013, mutacija H275Y je detektovana kod dva (0,3%, 2/594) A(H1N1)pdm09 virusa sa visoko redukovanom inhibicijom oseltamivirom, izolovana u Austriji i Rusiji. U istom periodu nije otkriven nijedan (0/477) rezistentan A(H3N2) izolat. Sledeće sezone, 2013/2014, detektovano je 1,1%% (5/468) rezistentnih izolata A(H1N1)pdm09 podtipa. Tri izolata iz Španije, Francuske i Mađarske nosila su mutaciju H275Y, koja je uslovlila visoko redukovanu inhibiciju oseltamivirom, a jedan iz Belgije mutaciju I223R koja je bila odgovorna za redukovanu inhibiciju oseltamivirom. Pored toga, jedan virus poreklom sa Kipra, nosio je mutaciju S247N i pokazao 7 puta nižu inhibiciju oseltamivirom u odnosu na referentni virus, što je vrednost ispod granične vrednosti (<10) potrebne za svrstavanje u grupu sa redukovanom inhibicijom. U istom periodu, 0,7% (5/730) influenza A(H3N2) virusa, pokazalo je redukovanu inhibiciju rezistencije oseltamivirom, pri čemu su se IC₅₀ vrednosti kretale u opsegu 10-26 [198]. Najčešće detektovana mutacija kod ovih virusa bila je S331R, mada su kod nekih izolata bile prisutne i dodatne mutacije: S331R i V215I kod izolata iz Italije, S331R, I194V i E381G kod izolata iz Švedske, S331R i D339N kod izolata iz Španije, S331R kod izolata iz Ukrajine i N329K kod izolata iz Norveške. Pored toga, izolat A(H3N2) podtipa iz naše sredine, nosilac mutacije Q391H, kao i jedan izolat poreklom iz Engleske, nosilac mutacije E119V, pokazali su 8, odnosno 7 puta nižu inhibiciju oseltamivirom [199].

ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ovog istraživanja izvedeni su sledeći zaključci:

1. Prisustvo influenza virusa dokazano je kod 46,3% (411/887) testiranih uzoraka.
2. Influenca A virusi su bili signifikantno češće detektovani (73%) u odnosu na influenza B viruse (27%, $p < 0,0001$) i dominirali tokom sezona 2010/2011 (85,2%, $p < 0,0001$), 2011/2012 (96,1%, $p < 0,0001$) i 2013/2014 (100%, $p < 0,0001$). U sezoni 2012/2013, nije zabeležena značajna razlika u zastupljenosti influenza B virusa (53,4%) i influenza A virusa (46,6%).
3. Među influenza A pozitivnim uzorcima, približno jednako su bili zastupljeni podtipovi A(H1N1)pdm09 (48%) i A(H3N2) (52%).
4. Influenca A(H1N1)pdm09 podtip je dominirao u sezoni 2010/2011 (100%, $p < 0,0001$) i 2012/2013 (75%, $p < 0,0001$), dok je influenza A(H3N2) podtip bio značajno zastupljeniji u sezoni 2011/2012 (100%, $p < 0,0001$) i 2013/2014 (72,4%, $p < 0,0001$).
5. Signifikantno veći procenat influenza A pozitivnih slučajeva zabeležen je u uzrastnoj grupi dece starosti 5-14 godina (48,2%) u odnosu na druge uzrastne grupe.
6. Influenca A(H3N2) podtip dominirao je kod dece uzrasta 0-4 godine (72,2%, $p = 0,0381$) i 5-14 godina (75,3%, $p < 0,0001$), dok je A(H1N1)pdm09 podtip signifikantno češće je dokazan kod pacijenata u uzrastnoj grupi 15-29 godina (66%, $p = 0,04$) i 30-64 godina (55,9%, $p = 0,0215$).
7. Influenca A virusi su značajno češće dokazani kod pacijenata sa ILI (43,7%) u odnosu na pacijente sa SARI (28,1%, $p < 0,0001$) i ARDS (15,4%, $p < 0,0001$). Influenca A(H1N1)pdm09 podtip dokazan je značajno češće kod fatalnih slučajeva (100%, $p = 0,0039$) i SARI slučajeva (63,5%, $p < 0,0001$), dok je A(H3N2) podtip dominirao kod pacijenata sa ILI (69,3%, $p < 0,0001$).
8. Procenat influenza A pozitivnih slučajeva nije se bitno razlikovao u grupi pacijenata sa HB/S (38,6%) i bez njih (31,2%). Influenca A(H1N1)pdm09 podtip je bio značajno zastupljeniji u grupi pacijenata sa HB/S (68,8%, $p < 0,0001$), a A(H3N2) podtip kod pacijenata bez registrovanih HB/S (66,3%, $p < 0,0001$).
9. Teški slučajevi bolesti dominirali su u uzrastnoj grupi 30-64 godina (67,7%, $p < 0,0001$) i ≥ 65 godina (87,1%, $p < 0,0001$), kod pacijenata sa A(H1N1)pdm09 infekcijama, (67,4%, $p < 0,0001$) i kod pacijenata sa HB/S (88,5%, $p < 0,0001$).
10. Smrtnim ishodom okončalo se 3% svih influenza A pozitivnih infekcija i 6,1% teških slučajeva obolenja. Najveći broj umrlih je pripadao uzrastnoj grupi 30-64 godine (66,7%) i imao neku od zabeleženih HB/S (88,9%).
11. Pacijenti sa HB/S imali su 34,1 puta, a pacijenti uzrasta ≥ 15 godina 10,4 puta veći rizik za razvoj teških oblika infekcije. Infekcije A(H1N1)pdm09 podtipom nosile su 0,5 puta veću šansu od komplikacija gripa, a hronične kardiovaskularne bolesti 0,1 puta.

12. Uspešnost izolacije influenza A virusa u MDCK ćelijskim kulturama, iznosila je 28% i nije se bitno razlikovala između virusa A(H1N1)pdm09 (30,1%) i A(H3N2) (26,1%) podtipa. Najveći procenat uspešnih izolacija dobijen je u grupi uzoraka sa Ct vrednostima <30 (75,8%).
13. U reakciji hemaglutinacije, 56% influenza A(H1N1)pdm09 virusnih izolata dalo je titrove ≥ 40 sa eritrocitima zamorca, 16% sa humanim eritrocitima, a samo 8% sa kokošijim. Izolati A(H3N2) podtipa nisu aglutinirali eritrocite kokoške, dok je 62,5% dalo dobre rezultate sa eritrocitima zamorca, a svega 8,3% sa eritrocitima humanog porekla.
14. Svih 23 analiziranih izolata A(H1N1)pdm09 podtipa, iz sezona 2012/2013 i 2013/2014, antigenski su bili slični vakcinalnom A/California/7/2009 virusu.
15. Samo 1 od 7 ispitanih izolata A(H3N2) podtipa iz sezone 2012/2013 antigenski je bio sličan vakcinalnom A/Victoria/361/2011 virusu, a samo 2 od 20 iz sezone 2013/2014, vakcinalnom virusu A/Texas/50/2012.
16. Filogenetskim ispitivanjima izolata A(H1N1)pdm09 podtipa iz sezone 2012/2013, otkriveno je da su, na osnovu sekvence HA gena, ovi virusi pripadali dvema različitim genetičkim grupama, 6C i 7, pri čemu su najveću genetičku sličnost pokazali sa izolatima iz Slovenije. Izolati iz sezone 2013/2014, pripadali su genetičkoj grupi 6B i pokazali najveću filogenetsku srodnost sa virusima iz Makedonije, Italije, Rumunije, Ukrajine i Izraela.
17. Izolati influenza A(H3N2) podtipa iz sezona 2012/2013 su, prema sekvenci HA gena, pripadali 3C.3 genetičkoj grupi i bili blisko srodni međusobno, kao i sa virusima poreklom iz Slovenije i Češke. Izolati iz sezone 2013/2014 nosili su genetičke markere koji su ih takođe svrstavali u 3C.3 genogrupu, a prisustvo pojedinih dodatnih mutacija ukazivalo je na njihovu filogenetsku srodnost sa virusima iz drugih evropskih zemalja uključujući Češku, Island, Finsku, Švedsku, Belgiju, Austriju, Norvešku, Poljsku i Sloveniju.
18. Svi ispitani izolati influenza A virusa pokazali su normalnu osetljivost prema oseltamiviru. Sekvenciranjem NA gena reprezentativnih izolata nije otkriveno prisustvo mutacija H275Y, D199N, I223R, N295S kod A(H1N1)pdm09 virusa niti E119V, R292K, N294S mutacija kod A(H3N2) virusa, povezanih sa rezistencijom na inhibitore neuraminidaze.
19. Virus A/Serbia/NS-613/2014, pokazao je 8 puta redukovanu osetljivost na oseltamivir i bio je nosilac retke mutacije Q391H u NA genu, povezane sa rezistencijom na inhibitore neuraminidaze.
20. Na osnovu svih dobijenih rezultata i imajući u vidu brzu evoluciju i izrazitu promenljivost influenza A virusa, jasno je da je kontinuirani virusološko-epidemiološki nadzor nad influenza A virusima opravdan i neophodan za dalje unapređenje preventivnih i terapijskih mera protiv gripa.

LITERATURA

1. Kawaoka, Y., Palese, P. (2005) Family Orthomyxoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L., (eds.) *Virus taxonomy: Eighth report of the International committee on taxonomy of viruses*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 681–693.
2. Zambon, M., Potter, C.W. (2009) Influenza. In: Zuckerman, A.J., Banatvala, J.E., Griffiths, P.D., Schoub, B.D., Mortimer, P., (eds.) *Principles and practice of clinical virology*, 6th ed., John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 373-408.
3. Taubenberger, J.K., Morens, D.M. (2010) Influenza: The once and the future pandemic. *Public Health Reports*, 125:16-26.
4. Cheung, T.K.W., Poon, L.L.M. (2007) Biology of influenza A virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1102:1-25.
5. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., Fauci, A.S. (2013) H7N9 avian influenza virus and the perpetual challenge of potential human pandemicity. *mBio*, 4(4):e00445-13. doi:10.1128/mBio.00445-13.
6. WHO (2014). Human cases of influenza at the human–animal interface, 2013. *The Weekly Epidemiological Record*, 89:309-320.
7. Tong, S., Li Y, Rivailier P, Conrardy C, Alvarez Castillo DA, Chen LM et al. (2012) A distinct lineage of influenza A virus from bats. *PNAS*, 109(11):4269-4274.
8. Tong, S., Zhu, X., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Bourgeois, M. et al. (2013) New World bats harbor diverse influenza A viruses. *PLOS Pathogens*, 9(10):e1003657.
9. Domachowske, J.B., Pankow-Culot, H., Bautista, M., Feng, Y., Claeys, C., Peeters, M. et al. (2013) A randomized trial of candidate inactivated quadrivalent influenza vaccine versus trivalent influenza vaccines in children aged 3-17 years. *The Journal of Infectious Diseases*, 207:1878-87.
10. Wang, R., Taubenberger, J.K. (2010) Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(5):517-527.
11. Osterlund, P., Strengell, M., Sarin, L.P., Poranen, M.M., Fagerlund, R., Melen, K., Julkunen, I. (2012) Incoming influenza A virus evades early host recognition, while influenza B virus induces interferon expression directly upon entry. *Journal of Virology*, 86(20):11183-11193.
12. Adams, M.J., King, A.M., Carstens, E.B. (2013) Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 158(9):2023-2030.
13. Presti, R.M., Zhao, G., Beatty, W.L., Mihindukulasuriya, K.A., Travassos de Rosa, A.P.A., Popov, V.L., et. al. (2009) Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel

- members of the family *Orthomyxoviridae*, *Journal of Virology*, 83(22):11599.
14. Rossman, J.S., Lamb, R.A. (2011) Influenza virus assembly and budding. *Virology*, 411(2):229-236.
 15. Nayak, D.P., Balogun, R.A., Yamada, H., Zhou, Z.H., Barman, S. (2009) Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research*, 143:147-161.
 16. McHardy, A.C., Adams, B. (2009) The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLOS Pathogens*, 5(10): e1000566.
 17. Elton, D., Digard, P., Tiley, L., Ortin, J. (2006) Structure and function of the influenza virus RNP. In: Kawaoka Y., (ed.) *Influenza virology, current topics*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 1-36.
 18. Schmidt, A., Rothenfusser, S., Hopfner, K.P. (2012) Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *European Journal of Cell Biology*, 91(1):78-85.
 19. Yewdell, J.W., Ince, W.L. (2012) Frameshifting to PA-X influenza. *Science*, 337(6091):164-165.
 20. Santos, A., Chacon, J., Rosas-Acosta, G. (2013) Influenza A virus multiplication and the cellular SUMOylation system. In: Rosas Acosta G., (ed.) *Viral Replication*. In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/viral-replication/influenza-a-virus-multiplication-and-the-cellular-sumoylation-system>
 21. Portela, A., Digard, P. (2002) The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of General Virology*, 83:723-734.
 22. Ye, Q., Guu, T.S.Y., Mata, D.A., Kuo, R.L., Smith, B., Krug, R.M., Tao, Y.J. (2013) Biochemical and structural evidence in support of a coherent model for the formation of the double-helical influenza A virus ribonucleoprotein. *mBio*, 4(1):e00467-12.
 23. Ruigrok, R.W.H., Crepin, T., Hart, D.J., Cusack, S. (2010) Towards an atomic resolution understanding of the influenza virus replication machinery. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(1):104-113.
 24. Lamb, R.A., Krug, R.M. (2001) *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication*. In: Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman B., Straus, S.E., (eds.) *Fields Virology*, 4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1487–1531.
 25. Wise, H.M., Barbezange, C., Jagger, B.W., Dalton, R.M., Gog, J.R., Curran, M.D., et al. (2011) Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. *Nucleic Acids Research*, 39(17):7775-7790.
 26. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R., Kawaoka, Y. (2013) Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *Journal of Virology*, 87(59):2455-2462.
 27. Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., Ortin, J. (2011) The influenza RNA synthesis

- machine. Advances in its structure and function. *RNA Biology*, 8(2):207-215.
28. Bouvier, N.M., Palese, P. (2008) The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26(4suppl):D49-D53.
 29. Le Goffic, R., Bouguyon, E., Chevalier, C., Vidic, J., Da Costa, B., Leymarie, O., et al. (2010) Influenza A virus protein PB1-F2 exacerbates IFN- β expression of human respiratory epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 185(8):4812-4823.
 30. Basler, C.F., Aguilar, P.V. (2008) Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A virus. *Antiviral Research*, 79(3):166-178.
 31. Chen, C.J., Chen, G.W., Wang, C.H., Huang, C.H., Wang, Y.C., Shih, S.R. (2010) Differential localization and function of PB1-F2 derived from different strains of influenza A virus. *Journal of Virology*, 84(19):10051-10062.
 32. Paterson, D., Fodor, E. (2012) Emerging roles for the influenza A virus nuclear export protein (NEP). *PLOS Pathogens*, 8(12): e1003019.
 33. Jagger, B.W., Wise, H.M., Kash, J.C., Walters, K.A., Wills, N.M., Xiao, Y.L., et al. (2012) An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337(6091):199-204.
 34. Veit, M., Thaa, B. (2011) Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Advances in Virology*, Article ID 370606.
 35. Landolt, A., Olsen, C.W. (2007) Up to new tricks – a review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal Health Research Reviews*, 8(1):1-21.
 36. Skehel, J.J., Wiley, D.C. (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, 69:531-569.
 37. Gamblin, S. J., Skehel, J. J. (2010). Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37): 28403–28409.
 38. Stray, S.J. Pittman, L.B. (2012) Subtype- and antigenic site-specific differences in biophysical influences on evolution of influenza virus hemagglutinin. *Virology Journal*, 9(91), Available from: www.virologyj.com/content/9/1/91
 39. Clementi, N., Criscuolo, E., Castelli, M., Clementi, M. (2012) Broad-range neutralizing anti-influenza A human monoclonal antibodies: new perspectives in therapy and prophylaxis. *New Microbiologica*, 35:399-406.
 40. Tao, Y.J., Ye, Q. (2010) Influenza A virus nucleoprotein. In: Wang, Q., Tao, Y.J., (eds.) *Influenza Molecular Virology*. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 53-68.
 41. Tripathi, S., Batra, J., Cao, W., Sharma, K., Patel, J.R., Ranjan, P., et al. (2013) Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin. *Cell Death and Disease*, 4:e562.

42. Sharma, K., Tripathi, S., Ranjan, P., Kumar, P., Garten, R., Deyde, V., et al. (2011) Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. *PLOS ONE*, 6(6):e20215.
43. Chenavas, S., Estrozi, L.F., Slama-Schwok, A., Delmas, B., Di Primo, C., Baudin, F., et al. (2013) Monomeric nucleoprotein of influenza A virus. *PLOS Pathogens*, 9(3): e1003275.
44. Marklund, J.K., Ye, Q., Dong, J., Tao, Y.J., Krug, R.M. (2012) Sequence in the influenza A virus nucleoprotein required for viral polymerase binding and RNA synthesis. *Journal of Virology*, 86(13):7292-7297.
45. Butel, J.S. (2013) Virology. In: Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., (eds.) Jawetz, Melnick, Adelberg's Medical Microbiology, 26th ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, pp. 407-669.
46. Weinstock, D.M., Zuccotti, G. (2009) The evolution of influenza resistance and treatment. *JAMA*, 301(10):1066-1069.
47. Nagata, K., Kawaguchi, A., Naito, T. (2008) Host factors for viral replication and transcription of the influenza virus genome. *Reviews in Medical Virology*, (18):247-260.
48. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R.W.H., Baudin, F. (2007) Nuclear transport of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Research*, 124:12-21.
49. Chou, J.J., Schnell, J.R. (2010) Structure and mechanism of the M2 channel. In: Wang, Q., Tao, Y.J., (eds.) Influenza: Molecular Virology. Caister Academic Press, Norfolk, pp.109-124.
50. Cady, S.D., Luo, W., Hu, F., Hong, M. (2009) Structure and function of the influenza A M2 proton channel. *Biochemistry*, 48:7356-7364.
51. Zhao, C., Kuo, R.L., Krug, R.M. (2010) The NS1 protein of Influenza A virus. In: Wang, Q., Tao, Y.J., (eds.) Influenza: Molecular Virology. Caister Academic Press, Norfolk, pp.1-14.
52. Hale, B.G., Randall, R.E., Ortin, J., Jackson, D. (2008) The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *Journal of General Virology*, 89(19):2359-2376.
53. Das, K., Aramini, J.M., Ma, L.C., Krug, R.M., Arnold, E. (2010) Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17:530-538.
54. Steinhauer, D.A. (2010) Influenza A virus haemagglutinin glycoproteins. In: Wang, Q., Tao, Y.J., (eds.) Influenza: Molecular Virology. Caister Academic Press, Norfolk, pp.69-108.
55. Samji, T. (2009) Influenza A: Understanding the viral life cycle. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 82:152-159.
56. Rumschlag-Booms, E., Rong, L. (2013) Influenza A virus entry: Implications in virulence and future therapeutics. *Advances in Virology*, vol. 2013, Article ID 121924.
57. Rossman, J.S., Leser, G.P., Lamb, R.A. (2012) Filamentous influenza virus enters cells via macropinocytosis. *Journal of Virology*, 86(20):10950-10960.

58. Krug, R.M., Aramini, J.M. (2009) Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(6):269-277.
59. Dalton, R.M., Mullin, A.E., Amorim, M.J., Medcalf, E., Tiley, L.S., Digard, P. (2006) Temperature sensitive influenza A virus genome replication results from low thermal stability of polymerase-cRNA complexes. *Virology Journal*, 3(58):1-16.
60. Yanguez, E., Nieto, A. (2011) So similar, yet so different: Selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Research*, 156:1-12.
61. Kawaguchi, A., Momose, F., Nagata, K. (2011) Replication-coupled and host factor-mediated encapsidation of the influenza virus genome by viral nucleoprotein. *Journal of Virology*, 85(13):6197-6204.
62. Zhang, W., Tao, Y.J. (2013) Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Letters*, 587:1206-1214.
63. Schull, M.A., Rice, C.M. (2010) A big role for small RNAs in influenza virus replication. *PNAS*, 107(25):11153-11154.
64. Newcomb, L.L., Kuo, R.L., Ye, Q., Jiang, Y., Tao, Y.J., Krug, R.M. (2009) Interaction of the influenza A virus nucleocapsid protein with the viral RNA polymerase potentiates unprimed viral RNA replication. *Journal of Virology*, 83(1):29-36.
65. Perez, J.T., Varble, A., Sachidanandam, R., Zlatev, I., Manoharan, M., Garcia-Sastre, A., tenOever, B.R. (2010) Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *PNAS*, 107(25):11525–11530.
66. Amorim, M.J., Bruce, E.A., Read, E.K.C., Foeglein, A., Mahen, R., Stuart, A.D., Digard, P. (2011) A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. *Journal of Virology*, 85(9):4143-4156.
67. Hutchinson, E.C., von Kirchbach, J.C., Gog, J.R., Digard, P. (2010) Genome packaging in influenza A virus. *Journal of General Virology*, 91:313-328.
68. Elleman, C.J., Barclay, W.S. (2004) The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology*, 321:144-153.
69. Tsimring, L.S., Levine, H. (1996) RNA virus evolution via a fitness-space model. *Physical review letters*, 76(23):4440-4443.
70. Domingo, E. (1997) Rapid evolution of viral RNA genomes. *The Journal of Nutrition*, 127(5):958-961.
71. Boivin, S., Cusack, S., Ruigrok, R. W. H., Hart, D. J. (2010). Influenza A virus polymerase: Structural insights into replication and host adaptation mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(37):28411–28417.
72. Potter, C.W. (2001) A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology*, 91:572-579.
73. de 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.
74. Li, W., Shi, W., Qiao, H., Ho, S.Y.W., Luo, A., Zhang, Y., Zhu, C. (2011) Positive selection on hemagglutinin and neuraminidase genes of H1N1 influenza viruses. *Virology Journal*, 8:183.
 75. Carter, R.W., Sanford, J.C. (2012) A new look at an old virus: patterns of mutation accumulation in the human H1N1 influenza virus since 1918. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 9:42, Available from: <http://www.tbiomed.com/content/9/1/42>
 76. Morens, D.M., Taubenberger, J.K., Fauci, A.S. (2009) The persistent legacy of the 1918 influenza virus. *The New England Journal of Medicine*, 361(3):225-229.
 77. Taubenberger, J.K., Morens, D.M. (2009) Pandemic influenza – including risk assessment of H5N1. *Scientific and Technical Review*, 28(1):187-202.
 78. Neuman, G., Noda, T., Kawaoka, Y. (2009) Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249):931-939.
 79. Garten, R.J., Davis, C.T., Russell, C.A., Shu, B., Lindstrom, S., Balish, A. et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of the early isolates of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*, 325(5937):197-201.
 80. Stincarelli, M., Arvia, R., De Marco, M.A., Clausi, V., Corcioli, F., Cotti, C. et al. (2013) Reassortment ability of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus with circulating human and avian influenza viruses: Public health risk implications. *Virus Research*, 175:151-154.
 81. Holmes, E.C., Ghedin, E., Miller, N., Taylor, J., Bao, Y., George, K., et al. (2005) Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PloS Biology*, 3(9): e300
 82. Ghedin, E., Fitch, A., Boyne, A., Griesemer, S., De Passe, J., Bera, J. et al. (2009) Mixed infection and the genesis of influenza virus diversity. *Journal of Virology*, 83(17):8832-8841.
 83. Tumpey, T.M., Belser, J.A. (2009) Resurrected pandemic influenza viruses. *Annual Review of Microbiology*, 63:79-98.
 84. CDC. (2011) Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza: Recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(RR01);1-24.
 85. Carrat, F., Vergu, E., Ferguson, N.M., Lemaître, M., Cauchemez, S., Leach, S., Valleron, A.J. (2008) Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *American Journal of Epidemiology*, 167(7):775-785.
 86. Hayward, A.C., Fragaszy, E.B., Bermingham, A., Wang, L., Copas, A., Edmunds, W.J., et al. (2014) Comparative community burden and severity of seasonal and pandemic influenza: results of the Flu Watch cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2(6):445 - 454.

87. Taubenberger, J.K., Morens, D.M. (2008) The pathology of influenza virus infections. *Annual Review of Pathology*, 3:499-522.
88. WHO. (2014) Influenza fact sheet 211. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en
89. Harper, S.A., Bradley JS, Englund JA, File TM, Gravenstein S, Hayden FG. et al. (2009) Seasonal influenza in adults and children – diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management: Clinical practice guidelines of the Infectious diseases society of America. *Clinical infectious diseases*, 48:1003-1032.
90. WHO. (2011) Avian influenza fact sheet. Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en
91. Ramos, I., Fernandez-Sesma, A. (2012) Cell receptors for influenza A viruses and the innate immune response. *Frontiers in Microbiology*, 3:1-6.
92. Lamaitre, M., Carrat, F. (2010) Comparative age distribution of influenza morbidity and mortality during seasonal influenza epidemics and the 2009 H1N1 pandemic. *BMC Infectious diseases*, 10(162), Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/162>
93. Broberg, E., Nicoll, A., Amato-Gauci, A. (2011) Seroprevalence to influenza A(H1N1) 2009 virus - Where are we? *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8):1205-1212.
94. Kreijtz, J.H.C.M., Fouchier, R.A.M., Rimmelzwaan, G.F. (2011) Immune responses to influenza virus infection. *Virus Research*, 162:19-30.
95. Takeuchi, O., Akira, S. (2008) MDA5/RIG-I and virus recognition. *Current Opinion in Immunology*, 20(1):17-22.
96. Braciale, T. J., Sun, J., Kim, T. S. (2012). Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 295–305.
97. Cox, R.J., Brokstad, K.A., Ogra, P. (2004) Influenza virus: immunity and vaccination strategies. Comparison of the immune response to inactivated and live, attenuated influenza vaccines. *Scandinavian Journal of Immunology*, 59.1-15.
98. Tosh, P.K., Jacobson, R.M., Poland, G.A. (2010) Influenza vaccines: From surveillance through production of protection. *Mayo Clinic Proceedings*, 85(3):257-273.
99. Grebe, K.M., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (2008) Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? *Microbes and Infections*, 10, 1024-1029.
100. Li, G.M., Chiu, C., Wrammert, J., McCausland, M., Andrews, S.F., Zheng, N.Y., et al. (2012) Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23):9047-9052.
101. Baumgarth, N., Carroll, M.C., Gonzalez, S. (2013) Antibody-mediated immunity. In: Webster, R.G., Monto, A.S., Braciale, T.J., Lamb, R.A. (eds.) *Textbook of influenza* 2nd ed.

- John Wiley and Sons, Chichester, pp. 283-309.
102. Miller, M., Viboud, C., Simonsen, L., Olson, D.R., Russell, C. (2009) Mortality and morbidity burden associated with A/H1N1pdm influenza virus. *PLOS Currents*, 1:RRN1013.
 103. Neumann, G., Kawaoka, Y. (2006) Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerging Infectious Diseases*, 12(6):881-886.
 104. Tscherne, D.M., Garcia-Sastre, A. (2011) Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1):6-13.
 105. Hale, B.G., Albrecht, R.A., Garcia-Sastre, A. (2010) Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiology*, 5:23, doi:10.2217/fmb.09.108
 106. Taubenberger, J.K., Kash, J.C. (2010) Influenza virus evolution, host adaptation and pandemic formation. *Cell Host Microbe*, 7(6):440-451.
 107. Huber, V.C. (2012) Can surveillance of the influenza virus PB1-F2 gene be used to predict the severity of secondary bacterial infections? *Virulence*, 3(6):523-524.
 108. Wahlgren, J. (2011) Influenza A viruses: an ecology review. *Infection Ecology and Immunology*, 1:6004. doi: 10.3402/iee.v1i0.6004
 109. Kumari, K., Gulati, S., Smith, D.F., Gulati, U., Cummings, R.D., Air, G.M. (2007) Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Virology Journal*, 4:42 doi:10.1186/1743-422X-4-42.
 110. Bussey, K.A., Boussem, T.L., Desmet, E.A., Kim, B., Takimoto, T. (2010) PB2 residue 271 plays a key role in enhanced polymerase activity of influenza A viruses in mammalian host cells. *Journal of Virology*, 84(9):4395-4406.
 111. Van-Tam, J., Sellwood, C. (2009) Introduction to pandemic influenza. CABI Publishing, Wallingford, pp.217.
 112. Tamerius, J., Nelson, M.I., Zhou, S.Z., Viboud, C., Miller, M.A., Alonso, W.J. (2011) Global Influenza seasonality: reconciling patterns across temperate and tropical regions. *Environmental Health Perspectives*, 119(4):439-445.
 113. Rambaut, A., Pybus, O.G., Nelson, M.I., Viboud, C., Taubenberger, J.K. Holmes, E.C. (2008) The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. *Nature*, 453(7195):615-619.
 114. Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V. et al. (2008) The global circulation of seasonal influenza A(H3N2) viruses. *Science*, 320:340-346.
 115. CDC. (2015) influenza A(H3N2) variant virus. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-cases.htm>
 116. WHO (2011a) Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. WHO Press, Geneva, pp. 139.
 117. Dowdle, W.R. (2006) Influenza pandemic periodicity, virus recycling, and the art of

- risk assessment. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1):34-39.
118. Watanabe, T., Kawaoka, Y. (2011) Pathogenesis of the 1918 pandemic influenza virus. *PLOS Pathogens*, 7(1):e1001218.
119. WHO (2014). Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. *Weekly Epidemiological Record*, 89, 93–104.
120. Patel, M., Dennis, A., Flutter, C., Khan, Z. (2010) Pandemic (H1N1) 2009 influenza. *British Journal of Anaesthesia*, 104(2):128-142.
121. Bashir Aamir, U., Badar, N., Mehmood, M.R., Nisar, N., Suleman, R.M., Shaukat, S., et al. (2012) Molecular epidemiology of influenza A(H1N1)pdm09 viruses from Pakistan in 2009–2010. *PLOS ONE*, 7(8):e41866.
122. Simonsen, L., Spreewenbergh, P., Lustig, R., Taylor, R.J., Fleming, D.M., Kroneman, M., et al. (2013) Global mortality estimates for the 2009 influenza pandemic from the GLaMOR project: A Modeling Study. *PLOS Medicine*, 10(11):e1001558.
123. Dawood, F. S., Iuliano, A.D., Reed, C., Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. (2012) Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modeling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(9):687-695.
124. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2015) Influenza: Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. Available from: <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/flu.html#vaccine>
125. ECDC – European Centre for Disease prevention and Control. (2012) Influenza vaccination. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/seasonal_influenza/vaccines/pages/influenza_vaccination.aspx
126. Ng, S.K. (2012) Current cell-based influenza vaccine production technology as pandemic contingency. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 8(2):267-271.
127. CDC - Centers for Disease Control and Prevention. (2015a) Influenza Antiviral Medications: Summary for Clinicians. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/antivirals/summary-clinicians.htm>
128. Krug, R.M., Aramini, J.M. (2009) Emerging antiviral targets for influenza A virus. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(6):269-277.
129. Sugaya, N., Kohno, S., Ishibashi, T., Wajima, T., Takahashi, T. (2012) Efficacy, safety, and pharmacokinetics of intravenous peramivir in children with 2009 pandemic H1N1 influenza A virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1):369-377.
130. Meijer, A., Rebelo-de-Andrade, H., Correia, V., Besselaar, T., Drager-Dayal, R., Fry, A., et al. (2014) Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013. *Antiviral Research*, 110:31-41.

131. Watanabe, A., Chang, S.C., Kim, M.J., Chu, D.W., Ohashi, Y. (2010) Long-acting neuraminidase inhibitor laninamivir octanoate versus oseltamivir for the treatment of influenza: A double-blind, randomized, noninferiority clinical trial. *Clinical Infectious Diseases*, 51(10):1167-1175.
132. Vavricka, C.J., Li, Q., Wu, Y., Qi, J., Wang, M., Liu, Y. et al. (2011) Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLOS Pathogens*, 7(10):e1002249.
133. Operario, D. J., Moser, M. J., St. George, K. (2010). Highly sensitive and quantitative detection of the H274Y oseltamivir resistance mutation in seasonal A/H1N1 influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10):3517–3524.
134. WHO. (2013) Meeting of the WHO expert working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility, Geneva, July 2013. *Weekly Epidemiological Record*, 44-45(88):477-488.
135. WHO. (2012) Laboratory methodologies for testing the antiviral susceptibility of influenza viruses. Available from: www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/antiviral_susceptibility/en/index.html
136. Kumar, S., Henrickson, K.J. (2012) Update on influenza diagnostics: lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2):344.
137. Lam, T.T.Y., Hon, C.C., Tang, J.W. (2010) Use of phylogenetics in the molecular epidemiology and evolutionary studies of viral infections. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 47(1):5-49.
138. Gambaryan, A.S., Robertson, J.S., Matrosovich, M.N. (1999) Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology*, 258:232-239.
139. Widjaja, L., Ilyushina, N., Webster, R.G., Webby, R.J. (2006) Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. *Virology*, 350:137-145.
140. Wang, R., Taubenberger, J. K. (2010). Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(5), 517–527.
141. WHO (2013) Global epidemiological surveillance standards for influenza. WHO Press, Geneva.
142. Yang, Z. (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8):1586-1591.
143. WHO (2011). Review of the 2010–2011 winter influenza season, northern hemisphere. *Weekly Epidemiological Record*, 86, 221–232.
144. WHO (2012). Review of the 2011–2012 winter influenza season, northern hemisphere. *Weekly Epidemiological Record*, 87, 233–240.

145. WHO CCRRI (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute for Medical Research, London, UK) (2013) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2013/14. Available from: http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/Interim_Report_February_2013.pdf
146. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2014) Seasonal influenza 2013–2014 in the EU/EEA countries. ECDC, Stockholm, p.13.
147. WHO (2014). Review of the 2013–2014 winter influenza season, northern hemisphere. *The Weekly Epidemiological Record*, 89:245–256.
148. Blyth, C.C., McPhie, K.A., Ratnamohan, V.M., Catton, M., Druce, J.D., Smith, et al. (2010) The impact of the pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus on seasonal influenza A viruses in the southern hemisphere, 2009. *Eurosurveillance*, 15(31):pii=19631.
149. Grijalva, C.G., Zhu, Y., Simonsen, L., Mitchel, E., Griffin, M.R. (2010) The population impact of a large school-based influenza vaccination campaign. *PLoS ONE*, 5(11):e15097.
150. Fiore, A.E., Epperson, S., Perrotta, D., Bernstein, H., Neuzil, K. (2012) Expanding the recommendations for annual influenza vaccination to school-age children in the United States. *Pediatrics*, 129(2):S54-S62.
151. Piedra, P.A. (2013) Why vaccinate school-aged children against influenza? *Contemporary pediatrics*, Available from: <http://contemporarypediatrics.modernmedicine.com/contemporary-pediatrics/news/why-vaccinate-school-aged-children-against-influenza?page=full>
152. Pariani, E., Amendola, A., Ebranati, E., Ranghiero, A., Lai, A., Anselmi, G., et al. (2013) Genetic drift influenza A(H3N2) virus hemagglutinin (HA) variants originated during the last pandemic turn out to be predominant in the 2011-2012 season in Northern Italy. *Infection Genetics and Evolution*, 13:252-260.
153. Reichert, T.A., Sugaya, N., Fedson, D.S., Glezen, W.P., Simonsen, L., et al. (2001) The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza. *New England Journal of Medicine*, 344:889–896.
154. Taylor, C., Marathe, A., Beckman, R. (2010) Same influenza vaccination strategies but different outcomes across US cities? *International Journal of Infectious Diseases*, 14(9):e792-e795.
155. Tran, C.H., Sugimoto, J.D., Pulliam, J.R.C., Ryan, K.A., Myers, P.D., Castleman, J.B., et al. (2014) School-located influenza vaccination reduces community risk for influenza and influenza-like illness emergency care visits. *PLOS ONE*, 9(12):e114479.
156. Pebody, R.G., Green, H.K., Andrews, N., Zhao, H., Boddington, N., Bawa, Z., et al. (2014) Uptake and impact of a new live attenuated influenza vaccine programme in

- England: early results of a pilot in primary school-age children, 2013/14 influenza season. *Eurosurveillance*, 19(22):pii=20823.
157. Broor, S., Sullender, W., Fowler, K., Gupta, V., Widdowson, M.A., Krishnan, A., Lal, R.B. (2012) Demographic shift of influenza A(H1N1)pdm09 during and after pandemic, Rural India. *Emerging Infectious Diseases*, 18(9):1472-1475.
158. Davila, J., Chowell, G., Borja-Aburto, V.H., Viboud, C., Grajales Muniz, C., Miller, M. (2014) Substantial morbidity and mortality associated with pandemic A/H1N1 influenza in Mexico, winter 2013-2014: Gradual age shift and severity. *PLOS Currents Outbreaks*, doi: 10.1371/currents.outbreaks.a855a92f19db1d90 ca955f5e908d6631
159. Thomson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J., Fukuda, K. (2003) Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, 289:179-186.
160. Reichert, T.A., Simonsen, L., Sharma, A., Pardo, S.A., Fedson, D.S., Miller, M.A. (2004) Influenza and the Winter Increase in Mortality in the United States, 1959–1999. *American Journal of Epidemiology*, 160(5):492-502.
161. Johnson, B.F., Wilson, L.E., Ellis, J., Elliot, A.J., Barclay, W.S., Pebody, R.G., et al. (2009) Fatal cases of influenza A in childhood. *PLOS ONE*, 4(10): e7671.
162. Mathews, J.D., McBride, E.S., McVernon, J., Pallaghy, P.K., McCaw, J.M. (2010) Prior immunity helps to explain wave-like behaviour of pandemic influenza in 1918-9. *BMC Infectious Diseases*, 10:128, Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/128>
163. Zhang, A.J.X., To, K.K.W., Tse, H., Chan, K.H., Guo, K.Y., Li, C., et al. (2011) High incidence of severe influenza among individuals over 50 years of age. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(11):1918-1924.
164. Garnacho-Montero, J., Gutiérrez-Pizarraya, A., Márquez, J. A., Zaragoza, R., Granada, R., Ruiz-Santana, S., Rello, J., Rodríguez, A. and The Spanish Society of Intensive Care Medicine and Coronary Units Working Group (2013), Epidemiology, clinical features, and prognosis of elderly adults with severe forms of influenza A (H1N1). *Journal of the American Geriatrics Society*, 61: 350–356.
165. Lambert, N. D., Ovsyannikova, I. G., Pankratz, V. S., Jacobson, R. M., Poland, G. A. (2012). Understanding the immune response to seasonal influenza vaccination in older adults: a systems biology approach. *Expert Review of Vaccines*, 11(8):985–994.
166. Adlhoch, C., Broberg, E., Beauté, J., Snacken, R., Bancroft, E., Zucs, P., Penttinen, P. (2014) Influenza season 2013/14 has started in Europe with influenza A(H1N1)pdm09 virus being the most prevalent subtype. *Eurosurveillance*, 2014;19(4):pii=20686.
167. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). (2014) Summary recommendations: Prevention and control of influenza with vaccines: Recommendations

- of the Advisory Committee on Immunization Practices - (ACIP) - United States, 2013-14. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/2013-summary-recommendations.htm>
168. McCullers, J.A., Hyden, F.G. (2012) Fatal influenza B virus infections: Time to reexamine influenza research priorities. *Journal of Infectious Diseases*, 205(6):870-2.
 169. Cheng, V. C. C., To, K. K. W., Tse, H., Hung, I. F. N., & Yuen, K.-Y. (2012). Two years after pandemic influenza A/2009/H1N1: What have we learned? *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2):223–263.
 170. Fukuyama, S., Kawaoka, Y. (2011) The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Current Opinion in Immunology*, 23(4):481–486.
 171. Fullen, D., Lambkin-Williams, R. (2014) Risk factors associated with severe clinical outcomes of pandemic H1N1 infection. *Journal of Human Virology & Retrovirology*, 1(3):00016.
 172. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2011) Influenza surveillance in Europe 2010-2011. ECDC, Stockholm, p.20.
 173. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2012) Influenza surveillance in Europe 2011-2012. ECDC, Stockholm, p.20.
 174. Rothberg, M.B., Haessler, S.D. (2010) Complications of seasonal and pandemic influenza. *Critical Care Medicine*, 38(4):e91-e97.
 175. Liu, S.L., Wang, J., Yang, X.H., Chen, J., Huang, R.J., Ruan, B. et al. (2013) Pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus in pregnancy. *Reviews in Medical Virology*, 23:3-14.
 176. Siston, A.M., Rasmussen, S.A., Honein, M.A., Fry, A.M., Seib, K., Callaghan, W.M. et al. (2010) Pandemic 2009 influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *The Journal of the American Medical Association*, 303(15):1517-1525.
 177. Dubar, G., Azria, E., Tesnière, A., Dupont, H., Le Ray, C., Baugnon, T., et al. (2010) French experience of 2009 A/H1N1 influenza in pregnant women. *PLOS ONE*, 5(10):e13112–e13119.
 178. Rasmussen, S.A., Jamieson, D.J., Bresee, J.S. (2008) Pandemic influenza and pregnant women. *Emerging Infectious Diseases*, 14(1):95-100.
 179. Neuzil, K.M., Reed, G.W., Mitchel, E.F., Simonsen, L., Griffin, M.R. (1998) Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalization in pregnant women. *American Journal of Epidemiology*, 148(11):1094-1102.
 180. Mor, G., Cardenas, I. (2010) The immune system in pregnancy: A unique complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6):425-433.
 181. Pazos, M., Sperling, R.S., Moran, T.M., Kraus, T.A. (2012) The influence of pregnancy on systemic immunity. *Immunologic Research*, 54(1):254-261.
 182. Karlsson, E.A., Marcelin, G., Webby, R.J., Schultz-Cherry, S. (2012) Review on the

- impact of pregnancy and obesity on influenza virus infection. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(6):449-460.
183. Koga, K., Cardenas, I., Aldo, P., Abrahams, V.M., Peng, B., Fill, S., Romero, R., Mor, G. (2009) Activation of TLR3 in the trophoblast is associated with preterm delivery. *American Journal of Reproductive Immunology*, 61:196–212.
184. Uchide, N., Ohyama, K., Bessho, T., Takeichi, M., Toyoda, H. (2012) Possible roles of proinflammatory and chemoattractive cytokines produced by human fetal membrane cells in the pathology of adverse pregnancy outcomes associated with influenza virus infection. *Mediators of Inflammation*, Article ID 270670.
185. Morgan, O.W., Bramley, A., Fowlkes, A., Freedman, D.S., Taylor, T.H., Gargiullo, P., et al. (2011) Morbid obesity as a risk factor for hospitalization and death due to 2009 pandemic influenza A(H1N1) disease. *PLOS ONE*, 5(3):e9694.
186. Kwong, J.C., Campitelli, M.A., Rosella, L.C. (2011) Obesity and respiratory hospitalizations during influenza seasons in Ontario, Canada: A cohort study. *Clinical Infectious Diseases*, 53(5):413-421.
187. Nave, H., Beutel, G., Kielstein, J.T. (2011) Obesity-related immunodeficiency in patients with pandemic influenza H1N1. *The Lancet Infectious*, 11:14-15.
188. Albright, F.S., Orlando, P., Pavia, A.T., Jackson, G.G., Albright, C. (2008) Evidence for a heritable predisposition to death due to influenza. *Journal of Infectious Diseases*, 197(1):18-24.
189. Davidson, S., Crotta, S., McCabe, T.M., Wack, A. (2014) Pathogenic potential of interferon α B in acute influenza infection. *Nature Communications*, 5:3864.
190. Oh, D.Y., Barr, I.G., Mosse, J.A., Laurie, K.L. (2008) MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(7):2189–2194.
191. Donis, R.O., Chen, M.C., Todd Davis, C.T., Foust A., Hossain M.J., Johnson, A., et al. (2014) Performance characteristics of qualified cell lines for isolation and propagation of influenza viruses for vaccine manufacturing. *Vaccine*, 32(6583-6590).
192. Vontas, A., Plakokefalos, E., Krikelis, V., Manouras, A. (2015) Comparative analysis of real time RT-PCR and virus isolation for detection and subtyping of A(H1N1)pdm09 influenza virus. *The Internet Journal of Microbiology*, 13(1):10.5580/IJMB.34912.
193. Barr, I. (2010) GISN development; Higher efficiency: A view from a CC on strengths, weaknesses & actions. Available from: http://www.flu.mn/mgl/images/stories/Sudalgaa_shinjilgee/GISN2010/3.1.1.Barr_ViewWHOCC.pdf
194. Lin, Y.P., Xionga, X., Whartona, S.A., Martinc, S.R., Coombsa, P.J., Vachieria, S.G., et al. (2012) Evolution of the receptor binding properties of the influenza A(H3N2) hemagglutinin. *PNAS*, 109(52):21474-21479.

195. Wang, W., Lu, J., Cotter, C.R., Wen, K., Jin, H., Chen, Z. (2013) Identification of critical residues in the hemagglutinin and neuraminidase of influenza virus H1N1pdm for vaccine virus replication in embrionated chicken eggs. *Journal of Virology*, 87(8):4642-4649.
196. Makkoch, J., Prachayangprecha, S., Payungporn, S., Chieochansin, T., Songserm, T., Amonsin, A., Poovorawan, Y. (2012) Erythrocyte binding preference of human pandemic influenza virus A and its effect on antibody response detection. *Annals of Laboratory Medicine*, 32:276-282.
197. WHO CCRRI (WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute for Medical Research, London, UK) (2013) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2014. Available from: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Sep2013final.pdf>
198. WHO CCRRI - WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute for Medical Research, London, UK. (2014) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Northern Hemisphere 2014/15. Available from: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-report-Feb2014-web.pdf>
199. WHO CCRRI - WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, National Institute for Medical Research, London, UK. (2014) Report prepared for the WHO annual consultation on the composition of influenza vaccine for the Southern Hemisphere 2015. Available from: <http://www.nimr.mrc.ac.uk/documents/about/NIMR-VCM-report-Sep-14-web.pdf>
200. Wiriyarat, W., Lerdsamran, H., Pooruk, P., Webster, R.G., Louisirirotchanakul, S., Ratanakorn, P., et. al. (2010) Erythrocyte binding preference of 16 subtypes of low pathogenic avian influenza and 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses. *Veterinary Microbiology*, 146:346–349.
201. Obuchi, M., Yokoyama, M., Horimoto, E., Obara, M., Iwai, M., Sato, H., et al. (2011) Low hemagglutinin-titer strains of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus circulated in Toyama Prefecture, Japan, during the 2009–2011 influenza seasons. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 64:448-450.
202. Mochalova, L., Gambaryan, A., Romanova, J., Tuzikov, A., Chinarev, A., Katinger, D., et al. (2003) Receptor-binding properties of modern human influenza viruses primarily isolated in Vero and MDCK cells and chicken embryonated eggs. *Virology*, 313(2):473-480.
203. Louisirirotchanakul, S., Lerdsamran, H., Wiriyarat, W., Sangsiriwut, K., Chaichoune, K., Pooruk, P., et. al. (2007) Erythrocyte binding preference of avian influenza H5N1 viruses. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(7): 2284–2286.

-
204. Gulati, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Couch, R.B., Griesemer, S.B., George, K.S., et al. (2013) Human H3N2 influenza viruses isolated from 1968 to 2012 show varying preference for receptor substructures with no apparent consequences for disease or spread. *PLOS ONE*, 8(6):e66325.
205. Lin, Y.P., Gregory, V., Collins, P., Kloess, J., Wharton, S., Cattle, N., et al. (2010) Neuraminidase receptor binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment. *Journal of Virology*, 84(13):6769-6781.
206. Hay, A. J., Gregory, V., Douglas, A. R., Lin, Y. P. (2001). The evolution of human influenza viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 356(1416):1861–1870.
207. Bhatt, S., Holmes, E.C., Pybus, O.G. (2011) The genomic rate of molecular adaptation of the human influenza A virus. *Molecular Biology and Evolution*, 28(9):2443–2245.
208. Skowronski, D.M., Janjua, N.Z., De Serres, G., Sabaiduc, S., Eshaghi, A., Dickinson, J.A., et al. (2014) Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses. *PLOS ONE*, 9(3):e92153.
209. Lin, Y., Gu, Y., Wharton, S. A., Whittaker, L., Gregory, V., Li, X., et al. (2015). Optimisation of a micro-neutralisation assay and its application in antigenic characterisation of influenza viruses. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 9(6):331–340.
210. Pozo, F., Lina, B., de Andrade, H.R., Enouf, V., Kossovakis, A., Broberg, E., et al. (2013) Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *Journal of Clinical Virology*, 57:5-12.

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Jelena Radovanov
Mentori: MN	dr Vesna Milošević, redovni profesor Medicinskog fakulteta u Novom Sadu dr Ivica Tamaš, naučni saradnik Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Zastupljenost i karakterizacija influenza A virusa izolovanih iz respiratornih uzoraka pacijenata sa teritorije Južnobačkog okruga
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Autonomna Pokrajina Vojvodina
Godina: GO	2016
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Prirodno-matematički fakultet Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: FO	poglavlja 7 / stranica 177 / slika 24 / tabela 23 / referenci 210
Naučna oblast: NO	Biologija

Naučna disciplina: ND	Mikrobiologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	influenca A virusi, influenza, kultura ćelija, reakcija inhibicije hemaglutinacije, antivirusna rezistencija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>U radu je ispitana zastupljenost influenza A virusa, njihova antigenska i genetička svojstva i osetljivost na antivirusni lek oseltamivir.</p> <p>Ispitivanje je sprovedeno u toku četiri uzastopne sezone, od 2010/2011 do 2013/2014 i obuhvatilo je 887 briseva nosa i grla pacijenata sa simptomima gripa, sa teritorije Južnobačkog okruga. Svi uzorci su testirani na prisustvo influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H1N1), A(H5) i A(H7) i influenza B virusa, real-time RT PCR testom. Pozitivni uzorci iz sezone 2012/2013 i 2013/2014, podvrgnuti su izolaciji na MDCK ćelijskim kulturama, a zatim je izvršeno ispitivanje sposobnosti dobijenih izolata da aglutiniraju eritrocite kokoške, čoveka i zamorca u reakciji virusne hemaglutinacije. Antigenska svojstva izolata sa hemaglutinacionim titrom ≥ 40, ispitana su reakcijom inhibicije hemaglutinacije. Genetičkoj karakterizaciji, sekvenciranjem hemaglutinin i neuraminidaza gena, podvrgnuti su reprezentativni izolati iz sezone 2012/2013 i 2013/2014. Za ispitivanje osetljivosti odabranih izolata virusa na oseltamivir upotrebljen je hemiluminiscentni test inhibicije aktivnosti neuraminidaze.</p> <p>Ukupno 46,3% (411/887) uzoraka bilo je influenza pozitivno, od čega je 73% (300/411) bilo influenza A pozitivno, a 27% (111/411) influenza B pozitivno ($p < 0,0001$). Influenca A(H1N1)pdm09 podtip je detektovan u 48% (144/300), a A(H3N2) podtip u 52% (156/300) influenza A pozitivnih uzoraka. Najveći procenat influenza A pozitivnih zabeležen je u uzrastnoj grupi 5-14 godina (48,2%, 77/160) i kod pacijenata sa lakšim kliničkim manifestacijama gripa (43,7%, 153/350).</p> <p>Influenca A(H1N1)pdm09 podtip preovladavao je u uzrastnoj grupi 15-29 godina (66%, 31/47, $p = 0,0400$) i 30-64 godina (55,9%, 71/127, $p = 0,0215$), kao i kod pacijenata sa teškom akutnom respiratornom bolešću (63,5%, 80/126, $p < 0,0001$), fatalnih slučajeva (100%, 9/9, $p = 0,0039$) i pacijenata sa hroničnim bolestima i stanjima (68,8%, 84/122, $p < 0,0001$).</p> <p>Influenca A(H3N2) podtip dominirao je kod dece uzrasta do 4 godine (72,2%, 13/18, $p = 0,0381$) i 5-14 godina (75,3%, 58/77, $p < 0,0001$), kod pacijenata sa lakšim oblikom bolesti (69,3%, 106/153, $p < 0,0001$) i</p>

bez hroničnih bolesti ili stanja (66,3%, 118/178, $p < 0,0001$).

Najznačajniji predikcioni faktori komplikacija influence bili su: prisustvo hroničnih bolesti ili stanja i uzrast ≥ 15 godina. Prisustvo hroničnih bolesti ili stanja nosilo je 34 puta, a uzrast ≤ 15 godina 10 puta veći rizik od nastanka teških oblika bolesti.

Izolacija influenza virusa na MDCK ćelijskim kulturama, bila je uspešna u 34,3% (70/204) slučajeva, pri čemu je u grupi uzoraka sa real-time RT-PCR Ct vrednostima < 30 ona iznosila 80,5% (62/77), kod uzoraka sa Ct vrednostima 30-34 svega 8,7% (8/92), a izolacija iz uzoraka sa Ct vrednostima > 34 nije bila moguća. U reakciji hemaglutinacije, najbolji rezultati su postignuti sa eritrocitima zamorca, koje je u titru ≥ 40 aglutiniralo 56% (14/25) A(H1N1)pdm09 virusa i 62,5% (15/24) A(H3N2) virusa. Sa humanim eritrocitima dobar titar dalo je 16% (4/25) influenza A(H1N1)pdm09 i 8,3% (2/24) A(H3N2) virusa, a sa kokošijim eritrocitima 8% (2/25) A(H1N1)pdm09 virusa i nijedan virus A(H3N2) podtipa.

Rezultati antigenske karakterizacije pokazali su da je svih 23 influenza virusa A(H1N1)pdm09 podtipa, iz sezone 2012/2013 i 2013/2014, antigenski bilo slično referentnom, vakcinalnom virusu A/California/7/2009. Nasuprot tome, samo 1 od 7 ispitanih A(H3N2) virusa iz sezone 2012/2013, antigenski je bio sličan vakcinalnom virusu A/Victoria/361/2011, a samo 2 od 20 iz sezone 2013/2014 antigenski je bilo slično vakcinalnom A/Texas/50/2012 virusu.

Filogenetska analiza hemaglutinin gena influenza A(H1N1)pdm09 virusa iz sezone 2012/2013, pokazala je da su u našoj sredini, bili prisutni virusi iz dve različite genogrupe, 6C i 7, dok su naredne sezone svi analizirani virusi pripadali genogrubi 6B. Virusi iz naše sredine bili su filogenetski srodni A(H1N1)pdm09 virusima iz drugih evropskih zemalja. Svi ispitani A(H3N2) virusi iz sezone 2012/2013 i 2013/2014, pripadali su genetičkoj grupi 3C.3. Filogenetski su bili srodni sa virusima iz drugih geografskih regiona Evrope.

Svih 20 izolata influenza A(H1N1)pdm09 podtipa i 23 A(H3N2) podtipa pokazali su normalnu inhibiciju aktivnosti neuraminidaze pod dejstvom oseltamivira. Sekvenciranje neuraminidaza gena jednog A(H3N2) virusa, koji je imao 8 puta redukovanu inhibiciju aktivnosti neuraminidaze oseltamivirom, ukazalo je na prisustvo retke mutacije Q391H, povezane sa rezistencijom na inhibitore neuraminidaze.

Rezultati ovog rada ukazali su na značaj influenza A virusa kao etioloških uzročnika akutnih respiratornih obolenja u našoj sredini, naročito za osobe sa hroničnim bolestima koje su pod povećanim rizikom od razvoja teških oblika gripa. U ovom istraživanju stečena su i saznanja koja imaju praktičnu primenu u postupku antigenske karakterizacije influenza A

	<p>virusa, koja je jedna od ključnih faza u procesu pripreme vakcine protiv gripa. Značajna antigenska razlika A(H3N2) virusa koji su cirkulisali u sezonama 2012/2013 i 2013/2014 u odnosu na viruse koji su bili u sastavu vakcina u datim sezonama, ukazala je na neophodnost unapređenja proizvodnje vakcine protiv gripa. Dobijeni su i prvi podaci o rezistenciji na antivirusni oseltamivir, kao i o filogenetskim odnosima i genetičkim grupama virusa koji su cirkulisali u našoj sredini.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP</p>	<p>25.06.2015.</p>
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije: KO</p>	<p>predsjednik: dr Vesna Milošević, redovni profesor, Medicinski fakultet, Novi Sad, mentor</p> <p>član: dr Ivica Tamaš, naučni saradnik, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, mentor</p> <p>član: dr Dragan Radnović, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad</p> <p>član: dr Ivana Hrnjaković Cvjetković, vanredni profesor, Medicinski fakultet Novi Sad</p> <p>član: dr Petar Knežević, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad</p>

University of Novi Sad

Faculty of Sciences

Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph. D. thesis
Author: AU	Jelena Radovanov
Mentor: MN	Vesna Milošević, PhD, full professor, Medical Faculty, Novi Sad Ivica Tamaš, PhD, research associate, Faculty of Sciences, Novi Sad
Title: TI	Representation and characterization of influenza A viruses isolated from respiratory samples from patients from South Backa district
Language of text: LT	Serbian (Roman)
Language of abstract: LA	Serbian (Roman) / English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Autonomous Province of Vojvodina
Publication year: PY	2016
Publisher: PU	Author reprint
Publication place: PP	Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, Trg Dositeja Obradovića 2
Physical description: PD	7 chapters / 177 pages / 24 figures / 23 tables / 210 references
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Microbiology

Subject, Key words SKW	influenza A virus, influenza, cell culture, hemagglutination inhibition test, antiviral resistance
UC	
Holding data: HD	Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Novi Sad
Note: N	none
Abstract: AB	<p>In this study we investigated the representation, antigenic and genetic properties, and sensitivity to antiviral drug oseltamivir of influenza A viruses. The study was conducted during 4 consecutive seasons 2010/2011 - 2013/2014, and included 887 nasal and throat swabs taken from patients with influenza-like symptoms from South Backa district. All samples were tested for influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2), A(H1N1), A(H5), A(H7) and influenza B viruses, by real-time RT-PCR. Isolation on MDCK cell culture was performed with positive samples from seasons 2012/2013 and 2013/2014, and virus isolates were tested for ability to agglutinate guinea pig, chicken and human red blood cells in reaction of virus hemagglutination. Antigenic properties of isolates with hemagglutination titre ≥ 40, were investigated using reaction of hemagglutination inhibition. Genetic characterization was performed by sequencing of neuraminidase and hemagglutination genes of representative isolates from seasons 2012/2013 and 2013/2014. Testing for sensitivity to oseltamivir was done with chemiluminescent neuraminidase inhibition assay.</p> <p>Total of 46,3% (411/887) of samples were influenza positive, out of which 73% (300/411) were influenza A positive and 27% (111/411, $p < 0,0001$) were influenza B positive. Influenza A(H1N1)pdm09 subtype was detected in 48% (144/300), and A(H3N2) subtype in 52% (156/300) of influenza A positive samples. The highest proportion of influenza A positive samples was found in age group 5-14 years (48,2%, 77/160) and among patients with uncomplicated influenza (43,7%, 153/350).</p> <p>Influenza A(H1N1)pdm09 subtype predominated in age group 15-29 years (66%, 31/47, $p = 0,0400$) and 30-64 years (55,9%, 71/127, $p = 0,0215$), in patients with severe acute respiratory illness (63,5%, 80/126, $p < 0,0001$), in fatal cases (100%, 9/9, $p = 0,0039$), and among patients with underlying chronic diseases and conditions (68,8%, 84/122, $p < 0,0001$).</p> <p>Influenza A(H3N2) subtype predominated in age group ≤ 4 years (72,2%, 13/18, $p = 0,0381$) and 5-14 years (75,3%, 58/77, $p < 0,0001$), in patients with mild form of influenza (69,3%, 106/153, $p < 0,0001$), and in group of patients without chronic diseases and conditions (66,3%, 60/478, $p < 0,0001$).</p> <p>The most significant risk factors for severe influenza</p>

were: the presence of underlying diseases and conditions and age ≥ 15 years. Patients with chronic illnesses and conditions had 34 times higher and patients ≥ 15 years of age 10 times higher risk from severe influenza.

Isolation rate of influenza A viruses in MDCK cell cultures was 34,3% (70/204). For samples with real time RT-PCR Ct values < 30 isolation rate was 80,5% (62/77), for samples with Ct values 30-34 it was 8,7% (8/92), while isolation of viruses from samples with Ct values > 34 was not successful. In the reaction of virus hemagglutination, the best results were achieved with guinea pig red blood cells which agglutinated in titre ≥ 40 , 56% (14/25) of influenza A(H1N1)pdm09 viruses and 62,5% (15/24) of A(H3N2) viruses. With human erythrocytes, good titre gave 16% (4/25) of influenza A(H1N1)pdm09 and 8,3% (2/24) of A(H3N2) viruses and with chicken erythrocytes 8% (2/25) A(H1N1)pdm09 viruses and none of the A(H3N2) viruses.

Results of the antigenic characterization of 23 influenza A(H1N1)pdm09 viruses, showed that they were antigenically similar to referent, vaccine virus A/California/7/2009. On the contrary, only 1 out of 7 influenza A(H3N2) viruses from season 2012/2013, was antigenically similar to A/Victoria/361/2011 vaccine virus, and only 2 out of 20 from season 2013/2014 were antigenically similar to A/Texas/50/2012 vaccine virus.

Filogenetic analysis of hemagglutinin genes indicated co-circulation of 2 distinct genetic groups, 6C and 7, of A(H1N1)pdm09 viruses during the season 2012/2013, while during the season 2013/2014 all tested viruses were from genetic group 6B. Influenza A(H1N1)pdm09 viruses from our region, were closely related to viruses from other European countries. All influenza A(H3N2) viruses from season 2012/2013 and 2013/2014 belonged to genetic clade 3C.3 and were closely related to viruses from different European countries.

Total of 20 A(H1N1)pdm09 isolates and 23 A(H3N2) isolates were tested for sensitivity to oseltamivir, and all of them showed normal inhibition of neuraminidase activity with oseltamivir. Sequencing of neuraminidase gene of one A(H3N2) virus with 8-fold reduced inhibition by oseltamivir, revealed rare mutation Q391H associated with antiviral resistance.

Results of this study indicate the significance of influenza A viruses as etiological factors of acute respiratory diseases in our area, especially for persons with chronic medical conditions who are at higher risk for severe influenza. Data gathered during the process of virus isolation and investigation of hemagglutination abilities of isolated viruses, have practical application in antigenic testing of influenza A viruses which is one of the key points of process of anti-flu vaccine production. Significant antigenic difference between influenza A(H3N2) viruses from seasons 2012/2013 and 2013/2014 and vaccine viruses, emphasis the importance of vaccine

	production improvement. During this study, the first data about antiviral resistance , filogenetic relationships and genetic groups of influenza viruses from our region, were obtained.
Accepted on Senate on: AS	25.06.2015.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>president: Vesna Milošević, PhD, full profesor, Medical Faculty, Novi Sad, mentor</p> <p>member: Ivica Tamaš, PhD, research associate, Faculty of Sciences, Novi Sad, mentor</p> <p>member: Dragan Radnović, PhD, full professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</p> <p>member: Ivana Hrnjaković Cvjetković, PhD, associate professor, Medical Faculty Novi Sad</p> <p>member: Petar Knežević, PhD, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad</p>



BIOGRAFIJA

Jelena Radovanov je rođena 03.06.1972. godine u Novom Sadu.

Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, Odsek za biologiju, smer diplomirani biolog upisala je školske 1991/1992 godine. Osnovne studije je završila sa prosečnom ocenom 9,79 i 1998. godine odbranila diplomski rad pod nazivom: "Alozimska varijabilnost populacije vrste *Aedes vexans* (Meigen, 1830) (Diptera: Culicidae)", sa ocenom 10.

Od 1999. godine je zaposlena u Institutu za javno zdravlje Vojvodine, u Centru za virusologiju. U okviru Centra radi na izolaciji virusa na ćelijskim kulturama i embrionisanim kokošijim jajima, dokazivanju virusnih antigena metodama direktne i indirektno imunofluorescencije, serološkoj dijagnostici virusnih obolenja, molekularnoj dijagnostici virusnih infekcija real-time PCR testovima i dokazivanju virusa u uzorcima životne sredine. Od 2003. godine uključena je i u rad Nacionalnog influenza centra Svetske zdravstvene organizacije gde radi na izolaciji influenza virusa u živim sistemima i njihovoj identifikaciji klasičnom metodom inhibicije hemaglutinacije, kao i molekularnim real-time RT PCR testovima.

Školske 2001/2002. godine upisala je poslediplomske studije iz oblasti Mikrobiologija, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Magistarsku tezu pod nazivom: "Dokazivanje enterovirusa u kliničkim uzorcima "shell vial" tehnikom i metodom indirektno imunofluorescencije", odbranila je 30.07.2009. godine.

Autor je i koautor 57 naučnih radova štampanih u časopisima domaćeg i međunarodnog značaja ili saopštenih na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja. Bila je uključena u više projekata i programskih zadataka uključujući:

2005-2007 godine - "Razvoj metoda za ranu detekciju virusa encefalitisa Zapadnog Nila u ugroženim regionima Srbije", Projekat u okviru Programa istraživanja u oblasti tehnološkog razvoja, Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije;

2009-2010 godine - "Monitoring invanzivnih i vektorskih vrsta insekata i transmisivnih bolesti", Projekat finansiran od strane Fonda za sufinansiranje naučnoistraživačkih programa i projekata i aktivnosti na jačanju svesti o potrebi zaštite životne sredine Gradske uprave za zaštitu životne sredine grada Novog Sada;

2011-2015 godine - "Istraživanje klimatskih promena i njihovog uticaja na životnu sredinu. Praćenje uticaja, adaptacija i ublažavanje", Projekat u okviru Programa sufinansiranja integralnih i interdisciplinarnih istraživanja Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije;

2011-2015 godine - "Sentinelni nadzor nad obolenjima sličnim gripu i akutnim respiratornim infekcijama", Programski zadatak posebnog programa iz oblasti javnog zdravlja za teritoriju Vojvodine, Pokrajinskog sekretarijata za zdravstvo, socijalnu politiku i demografiju;

2011-2015 godine - "Posvećeni nadzor nad teškom akutnom respiratornom bolešću", Programski zadatak posebnog programa iz oblasti javnog zdravlja za teritoriju Vojvodine, Pokrajinskog sekretarijata za zdravstvo, socijalnu politiku i demografiju.