

Nové respirační viry: protiepidemická opatření (Emerging Respiratory Viruses: Challenges and Vaccine Strategies)

Laura Gillim-Ross, Kanta Subbarao (*Laboratory of Infectious Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institut of Health, Bethesda, Maryland 20892*)
Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2006, p. 614-636
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

V posledních 10 letech byla zjištěna řada nových virů, vyvolávajících u lidí respirační onemocnění, což vedlo k jejich lepšímu poznání a k vývoji opatření proti nim. Na identifikaci nových virů se podílí jak užívání nových, mnohem citlivějších detekčních metod v průkazu virů, již léta cirkulujících v lidské populaci, tak průkaz virů nově pronikajících mezi lidi.

Nové a nově identifikované respirační viry

SARS-CoV. V roce 2002 došly z jižní Číny zprávy o neobyčejně velké incidenci atypické pneumonie. Díky spolupráci laboratoří různých států byl jako původce této epidemie identifikován nový koronavirus, pojmenovaný jako „koronavirus vyvolávající těžký akutní respirační syndrom (SARS-CoV)“. Předpokládá se, že na lidi byl přenesen za zvířat. Epidemie trvala asi 3 měsíce, hlášeno bylo ze 29 států 8096 potvrzených případů se 774 úmrtími. Čtyři případy infekce SARS byly zjištěny v letech 2003-4 a v dubnu 2004 byly hlášeny dvě laboratorní nákazy SARS-CoV z Tajwanu a Singapuru. Další laboratorní infekce vznikla v Číně a měla za následek přenos na členy rodiny. Od té doby nebyl hlášen žádný další případ infekce SARS-CoV a její rezervoár nebyl dosud spolehlivě zjištěn.

Virus ptačí chřipky. Roku 1997 se objevila epidemie vyvolaná virem ptačí chřipky H5N1, při níž zemřel v Hongkongu tříletý chlapec. V této epidemii bylo potvrzeno celkem 18 onemocnění lidí, z nichž šest zemřelo. Zatím co viry ptačí chřipky se vyskytují endemicky v populacích divoce žijících vodních ptáků a ke sporadickým infekcím lidí docházelo jen po přímém styku s virem, tato epidemie byla prvním prokázaným případem vniknutí viru ptačí chřipky mezi lidi a jejich onemocnění. Později docházelo k opakování. V letech 1998-99 viry ptačí chřipky subtypu H9 infikovaly několik lidí v Hongkongu a v Číně a vyvolaly chřipce podobné, neletální onemocnění. Další případ neletální infekce člověka virem ptačí chřipky H9 byl hlášen roku 2003. Séroprevalence H9-protilátek u lidí v jižní Číně byla nejméně 2 %. V roce 2003 došlo v Nizozemí při epizocii viru ptačí chřipky H7 v chovech drůbeže také k onemocnění lidí. Prokázáno bylo 89 konjunktivitíd, 13 chřipce podobných onemocnění a jedno úmrtí. Další případy infekce virem ptačí chřipky H5 byly roku 2003 zjištěny v Asii. Viry H5N1 se rozšířily mezi drůbeží v Asii a Evropě a pokračuje šíření těchto virů do dalších oblastí světa. Až dosud bylo potvrzeno víc než 200 infekcí lidí těmito viry v deseti státech. Mortalita při nich přesáhla 50 %. Šíření virů ptačí chřipky H5N1 představuje trvalé ohrožení lidské populace a může být signálem nové pandemie chřipky.

Lidský metapneumovirus. Roku 2001 prokázali v Nizozemí prvé onemocnění člověka, vyvolané metapneumovirem. Od té doby byl tento virus, o němž se předpokládá, že je původcem až 10 % respiračních infekcí u dětí mladších pěti let, identifikován také v Austrálii, ve Spojeném Království a v Severní Americe. Vyšetření archivovaných sekretů dýchacích cest naznačilo, že metapneumovirus cirkuluje v lidské populaci nejméně 25 let.

Lidské koronaviry NL63 a HKU1. V roce 2004 byly u pacientů s onemocněním dýchacích cest zjištěny dva nové lidské koronaviry (HCoV). HCoV-NL63 byl pak prokázán u osob s typickými respiračními nemocemi v Evropě, Japonsku, Číně, Austrálii a v Severní Americe. HCoV-HKU1 byl izolován od pacientů s pneumonií. Lidské koronaviry, dříve označované jako HCoV-229E a HCoV-OC43, se mohou podílet až na 30 % respiračních nemocí lidí.

V této práci jsou uvedeny obecně platné zásady pro opatření vůči novým virovým onemocněním a pojednává se o vývoji vakcín proti SARS-CoV a virům ptačí chřipky. K prvním krokům patří:

1. Rozpoznání nového onemocnění či syndromu a vypracování jeho definice. Onemocnění vyvolávaná respiračními viry z různých čeledí mají podobné příznaky. Dnešní možnosti diagnostiky umožňují rychlé vyloučení běžných agens.
2. Určení původce bývá obtížnější pro omezený počet možných hostitelů, jeho tkáňový tropismus, i pro nemožnost jeho kultivace současně užívanými postupy. Uplatňuje se mezinárodní spolupráce specializovaných pracovišť.
3. Zjištění biologických vlastností nového viru je nezbytné pro volbu možné účinné léčby a preventivních opatření. Je třeba zjistit místa replikace viru v organismu, kinetiku replikace, brány vstupu do organismu i vylučování viru.
4. Stanovení diagnostických postupů a surveillance slouží k rychlému odhalení infikovaných osob a ke sledování šíření viru ve vnímavé populaci. Pomocí polymerázové řetězové reakce s využitím reverzní transkriptázy (RT-PCR) k průkazu infekce SARS-CoV může vést, za předpokladu odběru vhodného materiálu a manipulace s ním, k rychlému zjištění tohoto viru a ke včasnému zahájení protiepidemických opatření. Znalost cirkulace viru ve vnímavé populaci zvířat umožní rychlejší identifikaci případů infekce i u lidí a omezení dalšího šíření viru.
5. Terapeutická intervence spočívá u virových infekcí, proti nimž není ani vakcína, ani specifické antivirotikum, v užívání nesespecifických postupů s cílem zabránit těžkému průběhu infekce a úmrtí.
6. Nalezení ukazatelů imunity je žádoucí ještě před dostupností vakcinace. U většiny respiračních virů se na imunitě vůči nim podílí protilátky v séru a na sliznicích, je však důležité vědět, zda k ochraně je nutná i buněčná imunita. Účinné vakcíny stimulující T-buňky navozují také imunitní paměť. Hlavní úlohu při hledání ukazatelů imunity mají pokusy na modelových zvířatech.
7. Vývoj vakcín a antivirotik startuje hned po té, co jsou naplněny výše uvedené kroky. Ideální účinná vakcína má navodit a udržet signifikantní koncentraci specifických protilátek v séru a v bráně vstupu (tj. na sliznicích), stejně jako specifickou buněčnou imunitu T-buněk. Efekt vakcíny často závisí na biologických vlastnostech viru a na typu specifické imunitní odpovědi organismu. Nestačí jen, aby výroba vakcíny byla snadná a její distribuce a aplikace byla rychlá v každé ohrožené populaci. Při hrozící pandemii je pro její potlačení rozhodujícím činitelem rychlá dodávka vakcíny. Nelze však předpovědět jaká bude antigenní heterogenost cirkulujících virů, proto vakcína by měla zajistit vznik zkřížené imunity proti možným variantám viru.

SARS-CoV

Průběh epidemie v čase

V listopadu 2002 byla hlášena z provincie Guangdong v jižní Číně epidemie atypické pneumonie a koncem února 2003 se onemocnění rozšířilo do okolí i vzdálených oblastí, včetně Hongkongu, Tajwanu, Singapuru a Kanady. Dne 12. března 2003 vydala SZO zprávu upozorňující cestovatele a další osoby na příznaky SARS. Díky okamžité a koordinované spolupráci laboratoří a pracovníků ochrany veřejného zdraví z celého světa se podařilo identifikovat původce epidemie – nový koronavirus, SARS-CoV. Rychlé zjištění nemocných a jejich izolace, vyhledávání a karanténování kontaktů nemocných, skrínigové vyšetřování cestujících na přítomnost příznaků SARS, umožnilo již za 5 měsíců po varování SZO přerušit přenos nemoci mezi lidmi. V postižených oblastech však měla epidemie těžké ekonomické dopady. Smrtnost infekce SARS-CoV byla roku 2003 odhadnuta na 13,2 % u osob mladších 60. let a na téměř 50 % u šedesátiletých a starších osob. Ze 29 států ohlásili celkem 8.096 případů infekce SARS-CoV, majících za následek celkem 774 úmrtí.

Biologické vlastnosti viru

Koronaviry (čeleď *Nidovirales*, rod *Coronaviridae*) jsou RNA viry s obalem a s unikátním, komplikovaným mechanismem replikace. Podle antigenních a genetických kritérií je dělíme do tří skupin. Zatím co sekvenční analýza několika izolátů SARS-CoV zjistila u nich značné odlišnosti nukleotidů od ostatních známých lidských koronavirů (HCoV), fylogenetická analýza prokázala, že vzdáleně patří do 2. skupiny lidských koronavirů (spolu s HCoV OC43, s virem hepatitidy myši a s bovinním koronavirem). Koronaviry infikují široký okruh živočichů, včetně psů, koček, prasat, myši, netopýrů a lidí. Většina kmenů má však omezený okruh hostitelů. Koronaviry pronikají do cílových buněk endocytózou pomocí vazby glykoproteinu S (spike – hrot), vyčnívajících z povrchu virionu, na receptor buňky. Protein S je hlavní vazebnou bílkovinou viru, nezbytnou pro uchycení a fúzi. Interakce receptoru buňky s S-proteinem rozhoduje o výběru hostitele a tkáňovém tropismu viru. Sekvenční analýza kmenů izolovaných při malé epidemii z Guangzhou v letech 2003-4 ukázala na zoonotický původ SARS-CoV, protože genetický materiál viru izolovaného od nemocných lidí je geneticky bližší viru izolovanému od cibetek, než kmenům SARS-CoV izolovaným od jiných pacientů.

Pro vývoj vakcíny je ke zkoumání průběhu nákazy a ochrany před ní nezbytný výběr vhodného zvířecího modelu. Práce s různými, většinou nedostatkovými druhy opic, je složitá a nákladná, proto se užívají myši BALB/c. U mláďat je průběh infekce SARS-CoV téměř asymptomatický, ale v jejich plicích a nosních dutinách dosahuje replikovaný virus vysokých titrů a v jejich plicích i střevě lze prokázat RNK viru. Infikované dospělé myši onemocní za projevů úbytku na váze, zjevení srsti a povlaku na jazyku. Po 2-5 dnech od nákazy mají vysoký titr viru v plicích a játrech. Podobně probíhá infekce SARS-CoV u syrských křečků, frettek, jiných linií myšek, nebo u koček. K úhynu těchto modelových zvířat nedochází.

Ukazatelé imunity

U některých modelových zvířat vyvolává infekce SARS-CoV tvorbu neutralizačních protilátek, které je chrání před opakovanou čelendží tímto virem. Podání rekonvalescentního séra chrání vnímavé myši před nákazou. Byly identifikovány monoklonální protilátky neutralizující SARS-CoV vazbou na jeho S-protein. Poznatky i dalších ukazatelích imunity jsou neúplné, podobně jako o mechanismu, vedoucím k vymizení viru z organismu. Určitou roli má i vrozená imunita.

Vakcíny proti SARS-CoV

Většina dosud publikovaných prací o přípravě těchto vakcín se zabývá navozením humorální imunity, založené na přítomnosti specifických protilátek proti S-proteinu viru. Vyvinuto bylo již několik účinných vakcín proti zvířecím koronavirům. U koček které prožily infekci virem kočičí infekční peritonitidy, nebo dostaly specifické protilátky, či byly očkovány, však došlo po infekci tímto koronavirem k těžkému onemocnění. Příčina tohoto jevu není zcela jasná, zdá se však, že dochází k rychlejšímu proniknutí a šíření viru v organismu následkem vzniku imunokomplexu viru s protilátkami proti S-proteinu. U myši a křečků k tomu nedochází, ale je zřejmá nezbytnost dalšího výzkumu.

Inaktivované celovirionové vakcíny proti SARS-CoV jsou u modelových zvířat celkem imunogenní a efektivní, jedna z nich je ověřována u lidí v klinické studii. Výroba tohoto typu vakcíny však vyžaduje produkci velkých množství viru, což je spojeno požadavky na vysokou bezpečnost výrobního postupu a navíc případná neúplná inaktivace vakcinálního viru je dalším ohrožením zdraví.

Živé atenuované vakcíny nebyly při infekci SARS-CoV dosud ověřovány. Zatím co tento typ vakcín proti respiračním virům, konkrétně proti chřipkovým virům a adenovirům, byl již schválen pro očkování lidí, zjištění, že infikované osoby vylučují infekční SARS-CoV stolicí, vyvolává obavy z možného přenosu vakcinálního viru na neočkované osoby. Další riziko spočívá v případné rekombinaci vakcinálního viru s divokým typem SARS-CoV.

Subjednotkovou vakcínu připravenou z terminálního N-fragmentu S-proteinu SARS-CoV, exprimovaného baculovirem, byly v pokuse intranazálně očkovány myši. Mimo anti-S vznikly i vysoké titry neutralizačních protilátek. Vakcína poskytovala spolehlivou ochranu před následnou intranazální čelendží koronavirem SARS-CoV.

Vektorové vakcíny byly testovány několika skupinami badatelů v preklinických studiích. Geny pro proteiny SARS-CoV byly vloženy do jiných virů, sloužících k jejich přenosu. Použili chiméru viru parainfluenzy, rabického viru, viru vesikulární stomatitidy a adenoviru. Nadějně jsou práce s chimérou bovinního/humánního viru parainfluenzy 3, použité jako vektor strukturálních proteinů SARS-CoV, včetně proteinů S, N, M (matrixový) a E (obalový). Připravená živá, atenuovaná vakcína, stejně jako jiné vektorové vakcíny prokázala, že ke vzniku imunity stačí navození specifických neutralizačních protilátek proti S-proteinu koronaviru.

DNA vakcíny vykazují v pokusech na zvířatech, zejména na myších, výraznou imunitní odpověď. Chybí však zatím poznatky o účinnosti DNA vakcín u lidí. Jako neúčinnější imunizační postup u myši se ukázalo kombinované očkování, spočívající ve dvou dávkách DNA vakcíny, kódující S-protein a v následném podání inaktivované celovirionové vakcíny.

Současné poznatky o vakcínách proti SARS-CoV prokazují vznik specifických neutralizačních protilátek proti S-proteinu, což postačuje k ochraně před čelendží tímto virem. Ač se dosud SARS-CoV znovu neobjevil je možné, že sám, či příbuzný virus, znovu pronikne z nějakého neznámého rezervoáru mezi lidi. Vývoj vakcín může přispět k omezení šíření této infekce dříve, než způsobí škody v sociální a ekonomické oblasti.

Virus ptačí chřipky

Biologické vlastnosti chřipkových virů

Chřipkové viry patří do čeledi *Orthomyxoviridae*, zahrnující čtyři rody: *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, *Influenza C virus* a *Thogotovirus*. Chřipkové viry B a C infikují lidi, chřipkové viry A, kterými se dále zabýváme, infikují mimo lidí také různé ptáky, prasata a jiné savce. Viry chřipky A mají obal obklopující 8 segmentů jednovláknité RNK, kódující 11 proteinů. Obal viru obsahuje povrchové glykoproteiny hemaglutinin (HA) a neuraminidázu (NA), které jsou hlavními antigenními determinantami chřipkových virů. HA umožňuje vazbu viru na buňku tím, že se váže na její povrchové receptory, obsahující kyselinu sialovou. Proteázy štěpí polypeptid HA na dva dva peptidy (HA₁ a HA₂), což je nezbytnou podmínkou pro patogenitu viru. Dnes je známo 16 antigenních subtypů HA (H1 až H16). Všechny lze najít u vodního ptactva. Opakující se epidemie mezi lidmi však působí jen subtypy H1, H2 a H3. Neuraminidázu představuje enzym sialidáza, která štěpí molekuly kyseliny sialové v obalu buněk a je nutná pro výstup virionů z infikované buňky. Identifikováno bylo devět subtypů NA (N1 až N9). Viry chřipky lidí mají subtyp N1 a N2. Glykoproteiny HA a NA na povrchu chřipkových virů jsou pro vznik imunity proti nim nejdůležitější.

Antigenní složení chřipkových virů se časem postupně obměňuje (antigenní posun – drift) v důsledku hromadění drobných bodových mutací, vyvolávaných imunitou populace v níž viry cirkulují, nebo v důsledku chybného seřazení virové RNA polymerázy. Rychlé a mnohem větší šíření chřipkových virů může také vzniknout po proniknutí viru s novým HA mezi lidi. Taková změna nastává když zvířecí nebo ptačí virus chřipky je schopný přímo infikovat člověka, nebo je následkem současné infekce dvěma různými viry chřipky. Výměnou několika segmentů genů mezi nimi vznikne nové potomstvo, mající přeskupenou genovou výbavu. Antigenní posun má za následek vznik generace virů s novým HA, vůči němuž většina lidí není imunní. Má-li virus navíc schopnost snadného přenosu mezi lidmi může se stát původcem nové chřipkové pandemie. Ačkoliv rekombinace chřipkových virů není častá, u virů H7 bylo již zjištěno přeskupení jak HA, tak jiných segmentů virového genomu, snad i buněčné DNA.

Historie chřipkových pandemií

Přírodní rezervoár chřipkových virů typu A představují hlavně ptáci žijící na pobřežích a ve vodách jezer a moří, kteří mají významnou úlohu v ekologii těchto virů. U vodních ptáků bylo nalezeno všech 16 HA a 9 NA subtypů chřipkových virů. Ty jsou u nich původci zpravidla asymptomatické infekce, limitované na střevní trakt. Virus v exkretech vodních ptáků může ve vodě přežít i několik týdnů, což usnadňuje jeho přenos fekálně-orální cestou na ještě neinfikované ptáky. Při pravidelné migraci tažných ptáků dochází podél tras tahu k přenosu chřipkových virů jejich exkrety na další divoké i domácí ptactvo, včetně krůt a slepic. Viry chřipky typu A mohou být také vodními ptáky přeneseny na savce, včetně lidí, tuleňů, velryb, koňů, prasat a drůbeže. Ekologické studie naznačují, že všechny viry chřipky typu A nalézané u savců jsou odvozeny od virů ptačí chřipky. Ptačí i lidské kmeny se přednostně vážou na molekuly kyseliny sialové pomocí specifického postranního oligosacharidového řetězce s můstky $\alpha 2,3$ nebo $\alpha 2,6$. Předpokládá se, že specifčnost receptorů je významným činitelem pro spektrum hostitelů viru. To dokazuje i vzácnost úspěšné experimentální infekce lidí viry ptačí chřipky. Zprávy o nákaze lidí viry H5N1, H9N2 a H7N7 však svědčí o tom, že specifčnost receptorů není absolutní překážkou vzniku infekce lidí. Poslední výzkumy také našly v buňkách epitelu dýchacích cest lidí buňky nesoucí molekuly kyseliny sialové s můstky $\alpha 2,3$ a $\alpha 2,6$. Prasata jsou díky přítomnosti těchto molekul v epitelu trachey vnímavá k nákaze viry chřipky ptáků i lidí. Mohou se stát prostředím, v němž dochází k výměně některých segmentů genomu ptačích a lidských virů chřipky. Takové kmeny byly zjištěny u

praset v Japonsku, Evropě i USA, ale dosud nikdy nevyvolaly epidemii mezi lidmi. Kmeny viru chřipky praset způsobily sporadická onemocnění lidí, nikdy však epidemii.

Dřívější pandemie. V pásmu mírného klimatu dochází k epidemiím chřipky každý rok. Obvykle začínají v pozdní zimě a trvají 1-2 měsíce. Pandemie se v posledních staletích objevovaly nepravidelně v intervalech od 10 do 50 let a provázela je vyšší úmrtnost. V posledním století vznikly tři chřipkové pandemie. Roku 1918 tzv. Španělská chřipka, 1957 Asijská chřipka a 1968 Hongkongská chřipka. Nástup Španělské chřipky začal 1918, její rychlé šíření vedlo k téměř současným epidemiím v Severní Americe, Evropě a Africe. Byť většinou bylo onemocnění lehké, onemocnělo 25-40 % populace a u vysokého podílu nemocných vznikla těžká pneumonie. Na rozdíl od pozdějších chřipkových epidemií a pandemií, u nichž na excessu úmrtí se ze 36-49 % podílely osoby starší 65let, v pandemii španělské chřipky bylo mezi zemřelými 99 % osob mladších 65let. Nejtěžší průběh měla onemocnění osob ve věku 20-40 let. Původcem pandemie byl virus ptačí chřipky adaptovaný na lidi. Chřipkové viry H1N1 cirkulovaly mezi lidmi 39 let, až do objevení se nového pandemického viru, který měl na svém povrchu dva nové glykoproteiny H2 a N2. Vznikl výměnou genetického materiálu lidského kmene chřipky A H1N1 s virem ptačí chřipky H2N2. Nový lidský kmen H2N2 se následkem chybějící imunity lidstva vůči němu rychle šířil a v roce 1957 vyvolal pandemii. Nejvíce postiženy byly osoby ve věku 5-19 let. Další pandemický kmen chřipkového viru se objevil v červenci 1968 v Hongkongu. Vznikl přeskupením mezi cirkulujícím kmenem H2N2 a ptačím kmenem s H3, od kterého převzal segmenty genu HA a PB1. Nejvyšší nemocnost byla u osob ve věku 10-14 let, ale pandemie neprobíhala tak těžce jako předchozí pandemie. Bylo to díky tomu, že mnoho lidí již mělo protilátky proti N2. Viry H3N2 cirkulují mezi lidmi dodnes. Roku 1977 byl od nemocných opět izolován chřipkový virus blízkce příbuzný H1N1, nevyvolal však pandemii. V současnosti cirkulují mezi lidmi viry chřipky H1N1 i H3N2 a navíc i viry chřipky typu B

Znamé případy infekce lidí virem ptačí chřipky. Až donedávna se soudilo, že rozdíly specifických receptorů lidských a ptačích virů chřipky jsou bariérou, chránící lidi před infekcí viry ptačí chřipky. V posledních letech prokázáný přímý přenos virů ptačí chřipky H5N1, H7N7 a H9N2 od ptáků na lidi však ukazuje, že odlišný receptor zcela nevylučuje vznik infekce a že k přenosu na lidi není vždy nezbytný vhodný mezipřenositel.

- a) Ptačí chřipka H5N1 : V květnu 1997 byl izolován z tracheálního aspirátu tříletého chlapce, který zemřel v Hongkongu na respirační selhání, virus chřipky H5N1. Byl to první virus ptačí chřipky, který vyvolával těžká respirační onemocnění lidí. Další 17 nemocných s průkazem infekce virem chřipky H5N1 zjistili v době od listopadu 1997 do ledna 1998, šest z nich zemřelo. Na slepičích farmách v Hongkongu probíhaly epizootie vyvolané vysoce patogenním virem H5N1, provázené 75% úhynem nemocných slepic. Prokázalo se, že viry od lidí i slepic jsou si geneticky a antigenně velmi blízké, což naznačuje, že docházelo k přímému přenosu od ptáků na lidi. Interhumánní přenos byl málo pravděpodobný, většina nemocných přišla do styku s kuřaty na místních trzích s drůbeží. Tento vysoce patogenní virus vznikl přeskupením segmentů genu viru H5N1, cirkulujícího mezi husami, a viry H6N1 a H9N2, nalézány u kachen a křepek. Virus byl eradikován hromadnou likvidací infikované drůbeže, avšak jeho předpokládaní předci stále cirkulují v populaci ptáků. Roku 2001 vznikla na tržišti s živou drůbeží v Hongkongu další epizootie virem H5N1 příbuzného virům, které cirkulovaly mezi vodními ptáky před dvěma lety. V roce 2003 onemocněli při návštěvě příbuzných v provincii Fujian tři členové rodiny z Hongkongu, dva z nich zemřeli na respirační selhání. Viry H5N1 byly izolovány od zemřelého otce a od syna, který onemocnění přežil. Na přelomu let 2003-2004 byly

hlášeny velké epizoocie ptačí chřipky H5N1 v drůbežích chovech z Jižní Koreje, Japonska, Indonésie, Vietnamu, Thajska, Laosu, Kambodže a Číny. Od prosince 2003 do 6. června 2006 bylo z deseti států hlášeno 225 prokázaných případů se 128 úmrtími na infekci virem ptačí chřipky H5N1. Virus stále koluje v populacích ptáků a je nyní zjištěn ve 33 státech, včetně Chorvatska, Kazachstánu, Mongolska, Filipín, Rumunska, Japonska, Koreje, Laosu, Malajsie a Ruska. Při jeho prokázané nakažlivosti pro lidi vyvolává rychlé šíření těchto vysoce patogenních H5N1 virů obavy, že mohou způsobit pandemii.

- b) Virus ptačí chřipky H9N2. V březnu 1999 byl v Hongkongu izolován tento virus chřipky od dvou dětí (ve věku 1 a 4 roky), majících lehké, spontánně ustupující horečnaté onemocnění. Mezilidský přenos nebyl zjištěn, ale neutralizační protilátky vůči chřipkovým virům H9N2 byly detekovány v sérech dobrovolných dárců krve z Hongkongu. Roku 2003 byl od hospitalizovaného pětiletého chlapce s ARO opět zachycen virus H9N2. Dosud každý případ zjištěné infekce lidí virem chřipky H9N2 probíhal pod obrazem lehkého, benigního onemocnění. Velké rozšíření tohoto viru u drůbeže v Asii a jeho současná cirkulace s virem chřipky H3N2 u prasat v jihovýchodní Číně může vést přeskupením jejich genetického materiálu ke vzniku patogenních, potenciálně pandemických virů.
- c) Virus ptačí chřipky H7N7. Od počátku roku 1975 jsou hlášeny epizoocie u ptáků, vyvolávané vysoce patogenním virem ptačí chřipky H7N7. Byla hlášena sporadická onemocnění lidí tímto subtypem viru po jeho přenosu od ptáků a tuleňů. V únoru 2003 došlo v Holandsku k epizocii způsobené vysoce patogenním virem ptačí chřipky H7N7, která se rozšířila do chovů drůbeže v Německu a Belgii. Během následujících tří měsíců prokázali 89 případů infekce tímto virem u pracovníků, kteří škulali peří infikované drůbeže. Byly zjištěny případy přenosu viru do rodin těchto pracovníků. Z počtu 89 prokazatelně infikovaných mělo 78 konjunktivitidu, u pěti byla konjunktivitida provázena chřipce podobnou nemocí, dva měli chřipkovité potíže, u čtyř potíže neodpovídaly definici případu, jeden pacient – veterinář – zemřel. Sérologické vyšetření z nedávné doby prokázalo infekci virem ptačí chřipky H7N7 u 49 % osob, které přišly během epizoocie do styku s infikovanou drůbeží a u 64 % osob exponovaných H7-infikovaným osobám.

Patogeneze

Vysoce patogenní viry chřipky H5N1 se od svého objevení v roce 1997 stále vyvíjejí, mění sestavu svých antigenů i vnitřních genů, rozšiřují okruh svých hostitelů mezi ptáky a zvyšují svou patogenitu pro experimentálně infikované myši a fretky. Virulence chřipkových virů souvisí s několika jejich geny. U drůbeže je hlavním faktorem virulence protein hemaglutininu. U málo patogenních chřipkových virů se HA štěpí proteázami, které jsou přítomny jen ve střevním traktu ptáků a v respiračním traktu savců. Avšak vysoce patogenní viry H5 a H7 mají navíc několik aminokyselin v okolí místa rozštěpu HA, což umožňuje štěpení HA všude přítomnými proteázami z okruhu subtilisinu a průnik viru do tkání. Byly zjištěny i další změny. Např. specifická náhrada aminokyseliny v subjednotce PB2 polymerázy je spojena s rychlejší replikací viru a s letálním průběhem infekce myši; změna aminokyseliny v proteinu NS1 chřipkového viru H5N1 koreluje in vitro s resistencí viru na jeho inhibici interferony a tumor nekrotizujícím faktorem alfa.

Ukazatelé imunity vůči virům ptačí chřipky

Poměrně dobře jsou známí ukazatelé imunity vůči lidským virům chřipky. Rozhodující roli mají protilátky proti jejich povrchovému glykoproteinu HA. Titr hemaglutinaci

inhibujících (HI) protilátek 1 : 40 a vyšší je považován za průkaz ochrany. Studie s vakcínami proti lidským chřipkovým virům prokázaly jejich účinnost jen v situacích, kdy si HA vakcinálního kmene a epidemického kmene byly antigenně blízké.

Vakcíny proti viru ptačí chřipky

Jsou založeny na zkušenostech s vakcínami proti lidskému viru chřipky. Tato část se zabývá vývojem vakcín proti viru ptačí chřipky H9 a H7, protože tyto dva subtypy infikovaly také člověka.

Inaktivovaná vakcína proti lidskému viru chřipky obsahuje po 15 mkg hemaglutininu H1, H2 a viru chřipky B, aplikuje se nitrosvalově. Složení vakcíny je každý rok určeno podle výsledků celosvětové surveillace výskytu chřipkových virů, koordinované SZO. Vyrábí se jako celovirionová vakcína, která však u dětí vyvolává nežádoucí reakce a proto je málo využívána. Častěji se očkuje vakcínami, v nichž je lipidový obal viru rozštěpen detergentem a odstraněn (split-vakcíny), nebo subjednotkovými vakcínami, které obsahují jen purifikované antigeny hemaglutininu a neuraminidázy. Účinnost těchto tří typů inaktivovaných vakcín je v různých populačních skupinách odlišná. Zatím co jediná dávka každého typu stačí u osob majících dřívější zkušenost s daným kmenem viru k navození ochranné hladiny protilátek, pro ostatní osoby (tzv. imunologicky naivní) jsou nutné 2 dávky vakcíny. Celovirionové vakcíny jsou u imunologicky naivních osob mnohem imunogennější než split- nebo subjednotkové vakcíny, ale tato vyšší imunogenita je spojena s její vyšší reaktivitou u dětí.

Inaktivované H9N2 vakcíny byly testovány na modelových zvířatech i lidech. Byly zjištěny tři genetické linie virů H9 s prototypovými viry G1, G9 a Y439 (korejský). I když tyto viry nebyli původci smrtelného onemocnění lidí, byly viry linie G1 a G9 izolovány od osob s benigním respiračním onemocněním. V Číně cirkulují mezi drůbeží a jsou možnými původci onemocnění člověka. Nitrosvalová aplikace inaktivované monovalentní H9N2 celovirionové vakcíny, odvozené od A/HK/1073/99 (G1) s adjuvans nebo bez něj, byla v klinické studii dobře snášena a bezpečná. Pozoruhodné bylo, že polovina očkovaných, narozených před rokem 1968, měla bazální známky imunity na H9N2 viry, což napovídalo, že již měli preexistující, nebo zkříženou imunitu. K dosažení ochranného titru $\geq 1:40$ HI protilátek potřebovaly „naivní“ osoby (mladší 32let) dvě dávky vakcíny, kdežto pro osoby se stopami imunity k H9N2 (starší 32let) stačila jedna dávka. Podle těchto pozorování by během pandemie jedna dávka celovirionové vakcíny s adjuvans nechránila imunologicky naivní osoby a velký podíl mladších osob by nebyl chráněn. Vývoj vakcíny s virem H9N2 linie G9 je obtížnější, protože tato linie špatně roste na kuřecích embryích. Proto přeskupili některé segmenty jeho genomu s dobře rostoucím chřipkovým virem PR8 tak, že získali virus exprimující HA a NA od viru ptačí chřipky H9N2 linie G9, který má vnitřní proteiny viru PR8. Tato vakcína je nyní zkoušena v 1. etapě klinické studie.

Byla vyvinuta řada inaktivovaných, kandidátních vakcín proti virům ptačí chřipky H5N1. Pro jejich velkou patogenitu vyžaduje výroba těchto vakcín přísná bezpečnostní opatření. Proto použili jako náhradu nepatogenní viry a kmeny s přeskupenými segmenty genomu. Ukázalo se však, že vakcíny s těmito antigenně příbuznými „náhradními“ viry jsou málo imunogenní. Jsou-li však podány aspoň dvě dávky, nebo je-li přidáno adjuvans, mohou navodit tvorbu zkříženě reagujících protilátek

Živé atenuované vakcíny. Jejich vývoj byl usnadněn pomocí reverzního genetického systému k přípravě rekombinantních vakcinálních virů, které jsou bezpečné a díky plasmidové DNA mají žádoucí složení genomu. FluMist, trivalentní, živá, oslabená vakcína proti chřipce u lidí byla licencována v roce 2003. Obsahuje rekombinované kmeny

chřipkových virů adaptovaných na nižší teplotu, které mají povrchové antigeny očekávaného epidemického viru a šest genů proteinů jádra z dárcovského nepatogenního kmene A(Ann Arbor/6/60 *ca* (*cold-adapted*). Přítomnost několika mutací zvyšuje stabilitu atenuace viru a zmenšuje riziko případného zvratu avirulence po kontaktu s cirkulujícím, virulentním virem. V současnosti jsou vakcíny s živými, oslabenými a chladově adaptovanými viry ptačí chřipky testovány v preklinických studiích na zvířatech a připravují se studie u lidí.

Subjednotkové vakcíny proti virům ptačí chřipky. Byla sledována účinnost subjednotkové vakcíny s HA kmenu A/HK/156/97, který je představitelem vysoce virulentního H5N1 viru ptačí chřipky. K dosažení lepšího ochranného efektu obsahovala vakcína také adjuvans a lipid obsahující imunogen. Na dobrovolnících testovali bezpečnost a imunogenitu rekombinantní vakcíny s baculovirem, exprimujícím H5 zmíněného virulentního viru ptačí chřipky. Výsledky ukázaly, že tato vakcína je málo imunogenní.

DNA vakcíny jsou s ohledem na velké riziko práce s vysoce patogenními divokými H5N1 chřipkovými viry mnohem bezpečnější. V pokusech na myších zjistili, že aplikace těchto vakcín neposkytuje při čelendži letálním kmenem H5N1 viru ptačí chřipky potřebnou ochranu. V době pandemie ptačí chřipky může DNA vakcína, kódující HA, nebo jiné virové proteiny antigenně příbuzné pandemickému kmeni, částečně chránit před těžkým průběhem nebo úmrtím na tuto infekci.

Vývoj vakcín proti ptačí chřipce je při šíření viru H5N1 ptáky do dalších oblastí světa stále naléhavější. Svědčí o tom i rostoucí počet onemocnění ptačí chřipkou u lidí v Asii a v Evropě. Poslední zkušenosti s chřipkovými vakcínami ukazují, že přednost by měl mít vývoj celovirionových vakcín, inaktivovaných nebo živých. Ačkoliv DNA vakcíny jsou u zvířecích modelů výhodnější, jejich účinek u lidí je slabší.

Moderní postupy dnešní virologie často umožňují rychlejší identifikaci původce nemoci, odhalení jeho vlastností a podmínek patogenity. To vše je nutné k vypracování strategie vhodných epidemiologických opatření. Přesto doba od vývoje první kandidátní vakcíny až do licencování komerční vakcíny je v průměru stále ještě delší než 10 let. To je ovšem v případě hrozící pandemie velký problém. Výzkum a vývoj vakcín je nákladný, složitý proces, zahrnující preklinické a klinické testování jejich bezpečnosti a účinnosti. Přesto jsou vakcíny tím nejlepším řešením prevence celé řady infekcí.

231 citací, kopie u zpracovatele

Aktuální dodatek

V posledním roce se v Číně objevil nový kmen ptačí chřipky H5N1. Výzkumníci varují, že současné vakcíny nemusí před ním drůbež chránit a že nejspíše vyvolá v Asii třetí vlnu ptačí chřipky. Virus je značně rozšířen zvláště v chovech kachen a husí v šesti provinciích jižní Číny. Nový subtyp H5N1 dostal jméno „**virus Fujian**“ a byl nalezen v 95 % vzorků exkretů drůbeže, sebraných od dubna do června 2006. Zdá se, že zcela vytěsnil starší subtypy virů ptačí chřipky H5N1. Viry izolované v posledních měsících od pacientů v Číně patří také do okruhu viru Fujian, což dokazuje, že tento virus může infikovat i lidi. Byl zjištěn u nemocných v Hongkongu, Laosu a Malajsii. Séra obsahující neutralizační protilátky proti starším kmenům H5N1 měla minimální efekt na virus Fujian. Diskutuje se, zda tento nový virus nevznikl v důsledku masivního očkování drůbeže proti ptačí chřipce v jižní Číně. (Dennis Normile: New H5N1 Strain Emerges in Southern China. SCIENCE, 3. November 2006, s. 742)