

PTIČIJI GRIP A/H5N1

Milena Veselinović

Avijarna influenza A/H5N1 označena je od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) kao bolest koja predstavlja zdravstveni rizik za svetsku populaciju u celini i poseduje pandemijski potencijal. U periodu od 2003. do 12.10.2007. godine, SZO je laboratorijski potvrdila 331 slučaj (202 letalna ishoda) H5N1 infekcije kod ljudi. Interhumana transmisija nije dokazana. Smatra se da bi u potencijalnoj budućoj pandemiji ptičijeg gripa A/H5N1 dominantna bila klinička slika primarne virusne pneumonije. Komplikacije uključuju razvoj akutnog respiratornog distres sindroma, bubrežne i multiorganske insuficijencije. U laboratorijskim analizama karakteristična je limfopenija, sa promenom CD4+/CD8+ indeksa, trombocitopenija i "citokinska oluja". Materijal za laboratorijsku dijagnostiku uključuje: nazalni i faringealni bris, trahealni aspirat (ili bronhoalveolarni lavat) i serum (u akutnom i rekonvalescentnom stadijumu). Izolacija virusa u ćelijskoj kulturi predstavlja "zlatni standard" u dijagnostici avijarne influence. Identifikacija inficiranih ćelija vrši se indirektnom (IFA) ili direktnom imunofluorescencom (DFA), enzyme-linked imunoesejima (EIA) ili PCR metodama. Napredak u dijagnostici predstavlja MChip, microarray koji omogućava detekciju i subtipizaciju na nivou M genskog segmenta virusa. Savetodavni panel, sastavljen od strane SZO 2006. godine, formirao je vodiče za profilaksu i terapiju humane A/H5N1 infekcije. U terapiji ptičijeg gripa najviše obećava farmakološki tretman oseltamivrom. In vitro ispitivanja su potvrdila snažnu antivirusnu aktivnost oseltamivira protiv svih sojeva influence A i B. SZO je definisala antigene i genetske karakteristike virusa pogodnih za produkciju vakcine. Više od 40 kliničkih trajala završeno je ili je u toku. I pored ohrabrujućih rezultata, SZO naglašava zabrinutost usled neadekvatnih globalnih kapaciteta za produkciju vakcine. *Acta Medica Medianae 2007;46(3):44-51.*

Ključne reči: ptičiji grip A/H5N1

Medicinski fakultet u Nišu

Kontakt: Milena Veselinović
Medicinski fakultet
Bulevar dr Zorana Đinđića 82
18000 Niš, Srbija
E-mail: nico7711@hotmail.com

Uvod

U oblasti infektivnih oboljenja, ptičiji grip (avijarna influenza A/H5N1) predstavlja jednu od glavnih opasnosti po čovečanstvo u 21.veku. Virus ptičijeg gripa A/H5N1 poseduje niz osobina koje ga čine idealnim patogenom buduće pandemije: mogućnost inficiranja najvećeg broja životinskih vrsta u odnosu na sve ostale poznate sojeve virusa influence, visoka stopa smrtnosti (30-70%) kao i kontinuirana evolucija virusa u pravcu povećanja virulentnosti, sposobnosti za interhumanu transmisiju i rezistentnosti na raspoložive antivirusne terapijske agense. Avijarna influenza A/H5N1 označena je od strane Svetske zdravstvene organizacije (SZO) kao bolest koja predstavlja zdravstveni rizik za svetsku populaciju u celini i poseduje pandemijski potencijal. Stopa mortaliteta moguće pandemije humane influence, izazvane virusom ptič-

ijeg gripa A/H5N1, prema prognozama SZO, kreće se u intervalu od 10% do 35% svetske populacije (1,2).

Etiologija

Virus ptičijeg gripa A/H5N1 pripada porodici ortomyxoviridae, koju čine rodovi virusa influence A, B i C. U humanoj patologiji samo su virusi influence A i B od epidemiološkog značaja. Dalja subtipizacija infuluca A virusa vrši se na osnovu 2 transmembranska glikoproteina – hemaglutinina (HA ili H), sa 16 antigenih varijanti (H1-H16) i neuraminidaze (NA ili N), sa 9 antigenih mogućnosti (N1 –N9).

Virusi influence su sačinjeni od jednostruke RNA sa omotačem, prosečnog prečnika 120 nm. Genomi virusa influence A i B sačinjeni su od 8 posebnih segmenata prekrivenih nukleokapsidnim proteinom koji zajedno grade ribonukleoprotein (RNP) u kojem svaki segment kodira jedan funkcionalno važan protein: polimeraza B2 protein (PB2), polimeraza B1 protein (PB1), polimeraza A protein (PA), hemaglutinin (HA ili H), nukleokapsidni protein (NP), neuraminidaza (NA ili N), matriksni protein (M) i nestrukturni protein (NS). Matriksni protein M ima dve posebne komponente: M1, koji gradi matriks i M2,

koji samo kod virusa influence A ima ulogu jonske pumpe za smanjenje ili održavanje pH endozoma. Aktivna RNK polimeraza, koja je odgovorna za replikaciju i transkripciju, formira se iz PB2, PB1 i PA. Ona poseduje endonukleaznu aktivnost i vezana je za RNP. Proteini NS1 i NS2 imaju regulatornu funkciju i podstiču sintezu virusnih komponenti u zaraženoj ćeliji. Omotač virusa sadrži HA i NA, kao i M2 protein. Lipidni sloj prekriva matriks koji sačinjava M1 protein.

Hemaglutinin je glavni antigen virusa influence, a antigenska mesta su A, B (nosi mesto vezivanja receptora), C, D i E. HA služi kao receptor, vezujući se za sijalnu kiselinu (N-acetilneuraminsku kiselinu) i indukuje penetraciju unutrašnjeg dela virusne čestice, tako što fuzioniše sa membranom. Telo molekula HA sadrži region peteljke i fuziogeni domen koji je potreban za fuziju membrane kada virus inficira novu ćeliju. Pri niskoj vrednosti pH, fuzioni peptid se okreće ka unutrašnjosti ćelije.

Neuraminidaza je glikoprotein koji se takođe nalazi kao izbočina na površini virusa. Molekul NA prezentuje svoj glavni deo na spoljašnjoj površini ćelije, prolazi celom dubinom lipidnog sloja i ima mali 'rep' u citoplazmi. NA deluje kao enzim, otkida sijalnu kiselinu iz molekula HA iz drugih molekula NA, glikoproteina i glikolipida ćelijske površine. Takođe, ima ulogu kao važno antigensko mesto i uz to, izgleda da je neophodna za prodiranje virusa kroz mucinski sloj respiratornog epitela (3).

Karakteristika Orthomyxovirusa je da izrazito lako mutiraju, usled nedostatka postreplikacionih mehanizama reparacije. Nastale mutacije na antigenskim mestima smanjuju ili inhibišu vezivanje neutrališućih antitela i tako omogućavaju da se novi podtip širi u neimunoj populaciji. Ovaj fenomen naziva se antigenski drift ili antigenski otklon. Mutacije koje ga izazivaju su molekulska objašnjenja za sezonske epidemije influence tokom zime u umerenim klimatskim zonama. Imunom odgovoru na antigenska mesta HA sledi proizvodnja neutrališućih antitela, što je osnova za rezoluciju infekcije u obolelom pojedincu i ponekad predstavlja deo unakrsnog imuniteta koji se nalazi kod starijih osoba kad se pojavi nov pandemijski soj.

Antigenski šift ili antigenski pomak, takođe nazvan genomskim preraspoređivanjem, javlja se kad se izmeni HA u nekom virusu, što uzrokuje nastanak mozaičnog virusa. Ovo se može dogoditi kada je ćelija inficirana sa 2 različita virusa influence i kada se tokom replikacije izmene segmenti njihovih genoma. Kod virusa A/H5N1 do preraspoređivanja genoma dolazi prilikom prelaska sa živine na svinje koje su podložne infekciji i ptičijim i humanim sojevima, tako da omogućuju antigeni šift i nastanak novog subtipa virusa, patogenog i za humanu populaciju. Pored svinja, ovaj tip koinfekcije moguć je i kod mnogih vrsta živine ali je dominantni put za nastanak antigenog šifta virusa ptičijeg gripa prenos živina-svinje. Takođe, direktna transmisija avijarnih virusa na ljude, bez intermedijarnog domaćina, je moguća. Sve više je dokaza da i čovek može poslužiti kao "laboratorija" za genomsko preras-

poređivanje nekih cirkulišućih avijarnih sojeva i humanih sojeva sezonske influence i nastanak nove pandemijske influence A virusa.

Antigenski pomak može da se javi i kod NA. Ona nosi nekoliko važnih aminokiselinskih ostataka koji, ako mutiraju, mogu dovesti do rezistencije na inhibitore neuraminidaze. Zapažene su sledeće mutacije: R292K, H274Y, R152K, E119V (slova predstavljaju aminokiseline (R-arginin, K-lizin, H-histidin, Y-tirozin, E-glutaminska kiselina, V - valin). Kada aminokiselina arginin (R) zameni lizin (K) na poziciji 292 neuraminidaznog glikoproteina, može se javiti kompletna rezistencija. Pozicija 292 je veoma važna jer mutacija može izazvati rezistenciju na oseltamivir kao i na zanamavir i još dva nova prekursora aktivnih lekova (4).

Patogeneza

Virus influence vezuje se na površinu ćelije pričvršćivanjem spoljašnjeg vrha HA na sijalnu kiselinu glikoproteina i glikolipida ćelije. Veza sijalne kiseline sa prethodnom galaktozom, alfa 2,3 (kod ptica) ili alfa 2,6 (kod ljudi), određuje specifičnost prema domaćinu. Pošto ugljeni hidrati koji prezentuju sijalnu kiselinu postoje na nekoliko vrsta ćelija u organizmu, sposobnost vezivanja HA objašnjava zašto mogu biti inficirane razne vrste ćelija. Posle vezivanja, virus ulazi u ćeliju pomoću procesa endocitoze preko receptora obloženih klatrinom. U unutrašnjosti ćelije, molekuli klatrina se oslobađaju i vezikula koja sadrži ceo virus fuzioniše sa endozomima. Sadržaj vezikule obično podleže degradaciji uz stepenasto sniženje pH u fagozomu. Kada se dostigne određeni nivo, snižavanje pH prestaje usled dejstva M2 proteina koji indukuje delimično oslobađanje fuzionog peptida HA. Ovo omogućava fuziju HA sa membranom vezikule i oslobađanje ribonukleoproteina (RNP) u citoplazmu. Jonski priliv iz endozoma prema virusnoj čestici dovodi do razbijanja veza različitih virusnih proteina; prekida se agregacija M1 proteina i RNP više ne adheriraju za kompleks M1-protein. Oslobađanje virusa od omotača završeno je 20-30 minuta od vezivanja virusa za membranu. RNP se transportuju do jedra, gde se polimerazni kompleks vezuje za virusnu RNA, cepa je svojom endonukleaznom aktivnošću i istovremeno dovodi do izduživanja. Produkciju virusne RNA ograničava NP u korist mRNA. I jedna i druga transportuju se do citoplazme, gde se na ribosomu stvaraju virusni proteini. Deo virusne mRNA se upliće pod dejstvom ćelijskih enzima, tako da konačno mogu da se bez daljeg cepanja sintetišu virusni proteini kao što je M1 i NS2. Neki od nosintetisanih virusnih proteina transportuju se do jedra, gde se vezuju na virusnu RNA da bi stvorili RNP. Drugi nosintetisani virusni proteini obrađuju se u endoplazmatskom retikulumu i Goldžijevom aparatu, gde dolazi do glikozilacije. Ovi modifikovani proteini transportuju se do ćelijske membrane, gde se zabijaju u lipidni dvosloj. Kada dostignu dovoljno visoku koncentraciju na plazmatskoj membrani, RNP i M1 proteini se gomilaju i kondenzuju da bi stvorili

virusnu česticu. Konačno, čestica se istiskuje iz membrane i oslobađa se neuraminidaznom aktivnošću. Vreme od ulaska do nastanka novog virusa iznosi približno 6 sati. (5)

Imunohistohemijske slike pokazuju da su fokusi ćelija koje proizvode virus H5N1 dominantno grupisani u donjem respiratornom traktu-pneumocitima tip II, alveolarnim makrofagima i kuboidalnim epitelnim ćelijama, zatim u intestinalnoj mukozu i u slojevima endotela, miokarda i moždanog tkiva. Nazalnim sekretom rasipaju se milioni virusnih čestica po mililitru, tako da jedna čestica aerosola od 0,1 μ l sadrži više od 100 virusnih čestica. Jedinična HID (humana infektivna doza) virusa influence može biti između 100 i 1 000 čestica. U ranom toku infekcije, virus može da se nađe i u krvi i drugim telesnim tečnostima. (6)

Epidemiologija

Genom pandemijskih influenza virusa predstavlja kombinaciju gena humanih i ptičijih sojeva influence virusa. Sojevi A/H2N2 i A/H3N2, izazivači 2 od 3 pandemije gripa u 20. veku, primeri su za takav genom, dok je izuzetak virus Španskog gripa (A/H1N1), za koji se smatra da predstavlja rezultat antigenog šifta isključivo ptičijih sojeva influence virusa. Sve ptičije vrste podložne su infekciji avijarnim influenza virusima. Rezervoari predstavljaju migratorne divlje vodene vrste, dok su domaće ptičije vrste (živina) posebno podložne epidemijama visoko patogene influence sa fulminantnim tokom (HPAI), koje karakteriše H5 ili H7 antigena suptipizacija. U seoskim domaćinstvima, gde su uz ljude i živinu prisutne i svinje, koje su podložne infekciji i ptičijim i humanim sojevima i omogućuju antigeni šift, uslovi za nastanak novog subtipa virusa su ispunjeni. Kao mogući mehanizmi za nastanak novog pandemijskog soja navode se i antigeni šift kod živine između različitih avijarnih sojeva, direktna transmisija sa živine na čoveka, kao i mogućnost rekombinacije sezonskih humanih i cirkulišućih avijarnih sojeva influenza A virusa u slučajevima humane koinfekcije.

Vodeći put prenošenja je direktan i indirektan kontakt sa sekretima i ekskretima ptica i živine, a zatim i svinja, kontaminirana voda, hrana živinskog porekla, zagadjena oprema, odeća, obuća kao i vazdušni put.

Prvi dokumentovani slučajevi humane infekcije ptičijim gripom H5N1 registrovani su 1997. godine u Hong Kongu (18 obolelih i 6 letalnih ishoda), u toku epizootije izazvane istim sojem HPAI virusa. Usledilo je uništavanje celokupne populacije živine Hong Konga (oko 1.5 miliona ptica), za koje se smatra da je onemogućilo nastanak pandemije. U zemljama jugoistočne Azije, od 2003. godine do danas, virus ptičijeg gripa prisutan je u ptičijoj populaciji i nastavlja da izaziva epizootije. Preko 140 miliona ptica je uništeno u pokušaju da se spreči dalje širenje virusa. Standardne protivepidemijske mere uključuju kontrolu i zabranu izvoza prehrambenih proizvoda životinjskog porekla, stalni nadzor nad rizičnim područjima, kao i karantin i sveobuhvatnu

dezinfekciju zahvaćenih farmi. Infektivnost virusnih čestica influence održava se zavisno od temperature, PH i saliniteta vode i ultraljubičastog zračenja. Na 4°C, poluživot infektivnosti je 2-3 sedmice u vodi. Infektivnost čestica virusa influence lako se inaktivira dezinficijensima na bazi alkohola, hlora ili aldehida. Temperature preko 70°C uništavaju infektivnost za nekoliko sekundi.

Virus H5N1 se do danas putem ptica selica (smatra se dominantnim načinom širenja), kao i alternativnim putevima (slobodno kretanje domaće živine, ilegalna trgovina pticama) proširio sa Azijskog kontinenta na druge delove sveta, a posebno na Evropu i deo Afrike. U periodu od 2003. do 12.10.2007. godine, SZO je laboratorijski potvrdila 331 slučaj (202 letalna ishoda) H5N1 infekcije kod ljudi (Slika 3).

Prvi suspektne slučajevi interhumane transmisije registrovani su na Tajlandu (2004, transmisija obolelo dete-majka) i u Indoneziji (2006, transmisija unutar osmočlane porodice) (7,8,9). Prema SZO globalnom planu pripreme za moguću pandemiju, u toku je treća faza evolucije novog soja virusa, sa ograničenim i niskim nivoom interhumane transmisije registrovane u zemljama Jugoistočne Azije (Vijetnam, Indonezija), čiju epidemiološku sliku karakteriše najveći broj obolelih na globalnom nivou (10). Transplacentalna transmisija virusa A/H5N1 sa majke na fetus je dokazana (11).

Kliničke manifestacije

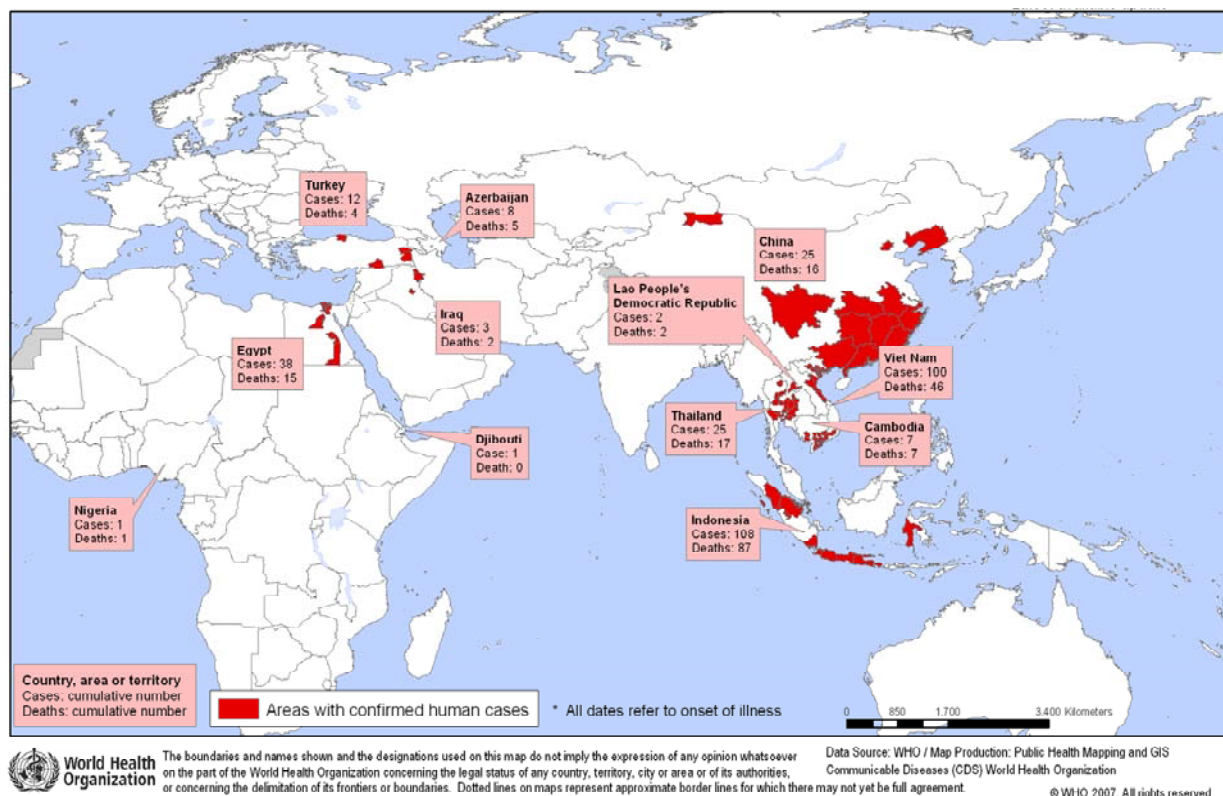
Ne može se sa sigurnošću tvrditi kakva će biti klinička prezentacija novog soja virusa ptičijeg gripa, koji će omogućiti interhumanu transmisiju i nastanak pandemije. Smatra se da bi u potencijalnoj budućoj pandemiji ptičijeg gripa A/H5N1 dominantna bila klinička slika primarne virusne pneumonije. Pretpostavka je zasnovana na analizi do sada registrovanih slučajeva humane infekcije.

Inkubacija je slične dužine kao kod humanog tipa gripa, trajanja od 2 do 4 dana. Kliničke manifestacije obuhvataju temperaturu preko 38°C, praćenu groznicom, dispnejom i suvim kašaljem, virusnu pneumoniju, praćenu sekundarnom bakterijskom infekcijom, kao i razvoj akutnog respiratornog distres sindroma (ARDS) različitog stepena. Gastrointestinalni simptomi, koji uključuju abdominalni bol, mučninu, povraćanje i dijareju, mogu pratiti navedene kliničke manifestacije, ali im u nekim slučajevima prethode. Konjuktivitis je retko prisutan, za razliku od kliničke slike klasične sezonske influence.

Komplikacije uključuju razvoj bubrežne i multiorganske insuficijencije.

Na radiološkom nalazu prisutne su ekstenzivne bilateralne infiltracije, lobarni kolaps i fokalne konsolidacije.

U laboratorijskim analizama karakteristična je limfopenija, sa promenom CD4+/CD8+ indeksa i trombocitopenija, u nekim slučajevima povišen nivo aminotransferaza i pojava diseminovane intravaskularne koagulacije. "Citokinska oluja", sa perzistentno visokim nivoom citokina i hemo-kina, takođe je karakteristika H5N1 influence (12,13).



Slika 1. Podaci SZO o potvrđenim slučajevima humane infekcije A/H5N1 virusom

U jednom slučaju oboljevanja (Vijetnam, 2004) karakterističan je bio razvoj fulminantnog virusnog encefalita i odsustvo respiratornih manifestacija, što ukazuje na moguću evoluciju ili već postojeću varijabilnost tkivnog tropizma virusa (14).

Dijagnostika

Dijagnoza ptičijeg gripa A/H5N1, zbog ozbiljnosti oboljenja i nespecifičnosti kliničke slike, ne može se zasnivati na pojavi prethodno opisanih kliničkih manifestacija. Uz pozitivne epidemiološke podatke, neophodno je izvršiti urgentnu laboratorijsku dijagnostiku, koja uključuje identifikaciju i tipizaciju virusa H5N1.

Za razliku od sezonske influence, pouzdaniju detekciju virusa (u slučaju rRT-PCR, viši nivo virusne RNK) omogućuju faringealni a ne nazalni uzorci. U toku epidemije u Vijetnamu, detekcija virusne RNK iz faringealnog brisa bila je moguća nakon 2 do 15 dana od početka bolesti, a nivo virusa izolovan iz ovih uzoraka bio je 10 puta viši u odnosu na uzorke bolesnika sa influencom A(H3N2) i A(H1N1).

Prema preporukama SZO, kod suspektnih bolesnika, neophodni materijal za laboratorijsku dijagnostiku uključuje, pored nazalnog i faringealnog brisa, trahealni aspirat (ili bronhoalveolarni lavat) i serum (u akutnom stadijumu - 7 dana od početka bolesti i rekoalescentnom stadijumu - 3 do 4 nedelje od početka infekcije, ako je moguće). Idealno je uzimanje materijala za laboratorijsku dijagnostiku pre početka same terapije, ali se farmakološki tretman ne sme odlagati radi uzimanja uzoraka. Kao sekundarni uzorci uzimaju se: plazma u EDTA (7 do 9 dana nakon početka infekcije), rektalni bris, likvor

(slučajevi sa suspektnim razvojem meningita), pleuralna tečnost i materijal dobijen autopsijom.

Izolacija virusa u ćelijskoj kulturi predstavlja "zlatni standard" u dijagnostici avijarne influence (15). Pozitivni rezultat dobijen ovom metodom omogućava definitivno postavljanje dijagnoze. Optimalno vreme za uzimanje uzorka za kulturu je u toku 3 dana od početka bolesti. Ćelijske linije pogodne za kultivaciju su MDCK (Madin-Darby canine kidney) i PRMK (primary rhesus monkey kidney). Ćelijske linije Vero, mink lung i MRC-5, takođe, omogućavaju izolaciju virusa, uz prisustvo tripsina u medijumu. Inhibicija hemaglutinacije (HI, HAI) omogućava H subtipizaciju virusa. Identifikacija inficiranih ćelija vrši se indirektnom (IFA) ili direktnom imunofluorescencom (DFA), enzyme-linked imunosejima (EIA) ili RT-PCR metodama. Za detekciju virusa u kulturi potrebno je od 5 (>90% pozitivnih uzoraka) do 7 dana (100% pozitivnih uzoraka) (16).

Direktne metode detekcije ne omogućavaju produkciju izolata i ne bi bile adekvatne za praćenje i definitivnu karakterizaciju pandemijskog virusa, ali zbog mogućnosti brze orijentacione dijagnoze, sigurnosti i stabilnosti, ove metode imaju ulogu u povećanju globalne pripremljenosti za pandemiju. RT-PCR omogućava rod-specifičnu identifikaciju virusa (matriksni protein M), kao i dalju H I N subtipizaciju. Senzitivnost RT-PCR u odnosu na ćelijsku kulturu kreće se u intervalu od 90 do 100% (17,18). Komercijalni testovi za brzu detekciju antigena pokazali su manju senzitivnost (40 do 80%) u detekciji virusa A/H5N1 u odnosu na rRT-PCR tehniku, zasnovanu na primerima komplementarnim H5 sekvencama avijarnog virusa (GenBank) (12,18). Razvoj influenza A/H5

RT-PCR seta i multiplex real-time RT-PCR eseja predstavlja korak dalje u razvoju specifičnih dijagnostičkih tehnika A/H5N1 virusa.

Novinu u dijagnostici avijarne influence predstavlja MChip, microarray koji omogućava detekciju i subtipizaciju na nivou M genskog segmenta H5N1 virusa. M gen, zbog svoje stabilnosti u odnosu na brzo mutirajuće H i N segmente, omogućava pouzdaniju dijagnostiku H5N1 infekcije. U toku preliminarnih testiranja na nizu ptičijih, mačijih i humanih izolata, nije bilo lažno pozitivnih rezultata (klinička specifičnost 100%) a tačna subtipizacija je izvršena u 21 od 24 slučaja (klinička senzitivnost 97%). Precizna, ekonomična i brza dijagnostika koju omogućava Mchip, predstavlja idealnu mogućnost u slučaju pandemije (19).

Prema zahtevima SZO, za postavljanje konačne dijagnoze avijarne influence A/H5N1 neophodna je potvrda referentnih laboratorija SZO i Svetske veterinarske organizacije (20).

Terapija

Dve grupe lekova su trenutno dostupne u prevenciji i terapiji influence infekcija: amantani, M2 inhibitori (amantadin i rimantadin) i novija klasa inhibitora neuraminidaze (zanamivir – Relenza i oseltamivir – Tamiflu (21).

Amantadin i rimantadin deluju na nivou oslobađanja virusa H5N1 od omotača i delotvorni su isključivo u influenci A infekcijama. Njihova upotreba povezana je sa brojnim toksičnim neželjenim efektima i brzom pojavom novih, rezistentnih sojeva virusa. Rezistentni sojevi su genetski stabilni, što omogućuje lak prenos, cirkulaciju u prirodnim rezervoarima (ptice) i dalju evoluciju virusa. Takođe, moguća je i produžena, latentna infekcija kod imunokompromitovanih bolesnika koji su na terapiji ovim preparatima. Prema iskustvima iz epidemija u zemljama Jugoslovenske Azije, potencijal za nastanak rezistencije onemogućava upotrebu amantadina u terapiji influence, tako da je on danas napušten kao terapijski agens u lečenju ptičijeg gripa (22). Treba naglasiti da ova klasa hemioterapeutika i dalje ima svoje mesto u profilaksi mogućih epidemija ili pandemije (21).

Inhibitori neuraminidaze deluju na nivou oslobađanja novih virusnih čestica iz primarno inficiranih ćelija i onemogućavaju širenje infekcije u respiratornom traktu. Proces replikacije virusa najintenzivniji je u periodu od 24 do 72 sata od početka infekcije, tako da je nepohodno što ranije primeniti ovu klasu lekova u terapiji. Nasuprot amantanima, ispoljavaju nisku toksičnost a proces nastanka rezistentnih sojeva je manje verovatan. Inhibitori neuraminidaze efikasni su kod svih NA antigenih varijanti influence virusa, što predstavlja ključnu prednost za njihovu primenu u toku moguće pandemije avijarne influence (21).

Savetodavni panel, sastavljen od strane SZO, u martu 2006. godine, formirao je vodiče za profilaksu i terapiju humane infekcije influence virusom A/H5N1 (Tabela 1). Preporuke se odnose na sporadične slučajeve humane infekcije ili male, porodične epidemije i nisu primenjive na

moguću pandemiju. U izradu vodiča bili su uključeni kliničari sa iskustvom u lečenju bolesnika inficiranih H5N1 virusom, eksperti u oblasti infektivnih oboljenja i influence, molekularni biolozi, epidemioolozi i drugi stručnjaci u oblasti javnog zdravlja. Posmatrani su rezultati sistematskih revija i randomiziranih trajala profilakse i terapije sezonskih influenza infekcija, studije slučaja H5N1 bolesnika, istraživanja vršena na životinjskim modelima, kao podaci dobijeni u *in vitro* studijama (23). Dalja međunarodna saradnja i formiranje baza podataka o kliničkom toku i terapiji dosadašnjih slučajeva ptičijeg gripa A/H5N1 su esencijalni za poboljšanje razumevanja bolesti i standardizaciju terapijskog pristupa i nege bolesnika (24).

U terapiji ptičijeg gripa A/H5N1, u toku moguće pandemije, najviše obećava farmakološki tretman oseltamivrom u prvih 48 sati od početka bolesti. Kasnija primena, usled razvoja rezistencije, nije praćena zadovoljavajućim terapijskim efektima (25). *In vitro* ispitivanja su potvrdila snažnu antivirusnu aktivnost oseltamivira protiv svih sojeva influence A i B, uključujući i ptičje sojeve H5N1 i H9N2 koji su izazvali slučajeve obolevanja kod ljudi u Hong Kongu. Revizija slučajeva H5N1 influence, koju je sprovela SZO, pokazala je da se oslobađanje virusa i zaraznost mogu smanjiti. Međutim, klinička korist od oseltamivira kod infekcija ptičijim gripom kod ljudi ostaje slabo definisana. Nedavna zapažanja pokazuju da kod nekih bolesnika sa infekcijom virusom H5N1, lečenje preporučeno dozom oseltamivira nekompletno zaustavlja replikaciju virusa, dajući priliku da se razvije rezistencija na lek (25). Modifikovani protokoli za primenu oseltamivira, koji uključuju duplo veće doze leka, produženo vreme primene i kombinovanu antivirusnu terapiju, uključivanjem amantadina i rimantadina (na područjima gde se smatra da H5N1 nije razvio rezistenciju), trenutno mogu biti primenjeni kod individualnih bolesnika, naročito u slučajevima sa razvojem pneumonije ili kod progresivnog toka bolesti (25). Još jedno otvoreno pitanje je kasno započeto lečenje u toku bolesti, kada postoje dokazi za replikaciju virusa. Postoje vrlo limitirani dokazi da kasno započinjanje lečenja smanjuje opterećenje virusom na nivo koji se ne može detektovati i možda doprinosi preživljavanju nekih obolelih (25). Ovi nalazi su u saglasnosti sa studijama na miševima kojima je inokulisan H5N1. Dok je petodnevni režim od 10 mg/kg/dan štiti 59% miševa, osmodnevni režimi pokazali su preživljavanje od 80% (26). U drugoj studiji, lečenje oseltamivrom poboljšalo je preživljavanje kod miševa sa 0% na 75%, čak i kada je terapija kasnila do 5 dana od infekcije virusom influence. Više doze oseltamivira kod ljudi mogu biti bezbedne. Podaci iz studija sa određivanjem maksimalnih i minimalnih doza pokazuju da se petodnevne kure od 150 mg dva puta dnevno u lečenju i šestonedeljne kure od 75 mg dva puta dnevno u profilaksi jednako dobro tolerišu kao i odobreni režimi doziranja (27,28).

Prema preporukama SZO, preparati kortikosteroida ne smeju se koristiti rutinski, ali mogu biti primenjeni kod bolesnika sa septičnim šokom

i suspektnom adrenalnom insuficijencijom. Prolongirana terapija ili primena visokih doza kortikosteroidnih preparata može dovesti do niza ozbiljnih neželjenih efekata, uključujući i razvoj oportunističkih infekcija. Primena antibiotika prema antibiogramu je preporučena kod suspektne bakterijske koinfekcije kod bolesnika sa razvijenom virusnom pneumonijom. Monitoring saturacije kiseonikom treba započeti što ranije po prijemu bolesnika i nastaviti kontinuirano u toku celog toka bolesti, sa primenom oksigene terapije radi korekcije hipoksije. Terapija ARDS zasnovana je

na EBM vodičima za terapiju ARDS kod septičnih bolesnika, uz neophodnu primenu protektivnih metoda mehaničke plućne ventilacije (29).

Antivirusna hemoprofilaksa se primenjuje u odnosu na nivo rizika od infekcije, prema kojem je potencijalno eksponirano stanovništvo podeljeno u grupe visokog, srednjeg i niskog rizika. U ovoj fazi evolucije virusa, sa malim grupama obolelih i ograničenim interhumanim prenosom, smatra se da za opštu populaciju, van rizičnih grupa, ne postoji rizik od ekspozicije (24).

Tabela 1. Preporuke SZO u prevenciji i terapiji ptičijeg gripa A/H5N1

Starosne grupe bolesnika	Terapija	Profilaksa
	5 dana	7-10 dana nakon poslednje poznate ekspozicije
Oseltamivir		
1-6	30 mg/2 x dnevno, ≤15kg 45 mg/2 x dnevno, 15-23kg 60 mg/2 x dnevno, 23-40 kg 75 mg/2 x dnevno, >40kg	Iste doze kao u Th / 1x dan
7-9	30 mg/2 x dnevno, ≤15kg 45 mg/2 x dnevno, 15-23kg 60 mg/2 x dnevno, >23-40 75 mg/2 x dnevno, >40kg	Iste doze kao u Th / 1x dan
10-12	30 mg/2 x dnevno, ≤15kg 45 mg/2 x dnevno, 15-23kg 60 mg/2 x dnevno, 23-40 kg 75 mg/2 x dnevno, >40kg	Iste doze kao u Th / 1x dan
13-64	75 mg/2 x dnevno	75 mg /dan
>64	75 mg/2 x dnevno	75 mg /dan
Zanamivir		
1-6	Nije odobren za upotrebu	1-4 godine: ne primenjuje se 5-6 godina: 10 mg (2 inhalacije)/1 x dan
7-9	10 mg (2 inhalacije)/2x dnevno	10 mg (2 inhalacije)/1 x dnevno
10-12	10 mg (2 inhalacije) /2x dnevno	10 mg (2 inhalacije)/1 x dnevno
13-64	10 mg (2 inhalacije) /2x dnevno	10 mg (2 inhalacije)/1 x dnevno
>64	10 mg (2 inhalacije) /2x dnevno	10 mg (2 inhalacije)/1 x dnevno
Amantadin		
1-6	5 mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze	5 mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze
7-9	5 mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze	5 mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze
10-12	100 mg/2 x dnevno	100 mg/2 x dnevno
13-64	100 mg/2 x dnevno	100 mg/2 x dnevno
>64	≤100 mg /dan	≤100 mg /dan
Rimantadin		
1-6	Nije odobren za upotrebu	5mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze
7-9	Nije odobren za upotrebu	5mg/kg/dan (max doza 150 mg) u 2 jednake dnevne doze
10-12	Nije odobren za upotrebu	100 mg/2 x dnevno
13-64	100 mg/2 x dnevno	100 mg/2 x dnevno
>64	100 mg /dan	100 mg /dan

Prema preporukama SZO, u populaciji sa povećanim rizikom od ekspozicije cirkulišućim A/H5N1 sojevima neophodna je primena sezonskih influenza vakcina, koja umanjuje mogućnost koinfekcije i na taj način smanjuje potencijal nastaje humanog cirkulišućeg influenza virusa i nastanka novih sojeva sa pandemijskim potencijalom. Preporučena je obavezna vakcinacija u zemljama u kojima je u toku ili se očekuje pojava epizootija HPAI H5N1 influence. Kao rizične grupe označene su osobe koje su profesionalno u kontaktu sa živinom, seosko stanovništvo potencijalno ugroženih oblasti, kao i zdravstveno osoblje koje može doći u kontakt sa obolelima u toku eventualne pandemije ili epidemije. Trenutna epidemiološka situacija ne zahteva masovnu imunizaciju stanovništva zahvaćenih i ugroženih regiona (30).

Usled velikog pandemijskog potencijala A/H5N1 virusa, SZO je kao jedan od prioriteta definisala razvoj delotvorne vakcine. Tri su glavne prepreke koje trenutno postoje u procesu nastanka efikasne vakcine koja bi bila dostupna za rutinsku primenu: (1) vremenski faktor- za dalja istraživanja, razvoj i definitivno dizajniranje vakcine za kliničku primenu potrebno je najverovatnije još nekoliko godina; (2) ograničen kapacitet laboratorija za proizvodnju vakcine- trenutno je moguća produkcija 500 miliona doza influenza vakcine u toku jedne godine; (3) dizajniranje efikasne vakcine verovatno će zahtevati dostupnost pandemijskog roda i biće moguće tek sa početkom pandemije a ne ranije.

Na osnovu analiza izolovanog humanog i animalnog materijala u regijama zahvaćenim u 2004/2005 H5N1 epidemiji u Aziji, SZO je definisala antigene i genetske karakteristike virusa pogodnih za produkciju vakcine i izdvojila sledeće sojeve virusa: A/Indonesia/5/2005, A/Bar headed goose/Qinghai/1A/2005, A/Anhui/1/2005, A/turkey/Turkey/1/2005 i A/Whooper swan/ Mongolia/ 244/2005. Takođe, u referentnim laboratorijama SZO dizajnirano je nekoliko rekombinantnih H5N1 sojeva za produkciju vakcine, uključujući i A/Vietnam/1194/04, A/Vietnam/1203/04 i A/Hongkong/213/03 soj virusa. Ovi sojevi dostupni su

nizu institucija i kompanija i u toku je kliničko testiranje nekoliko različitih varijanti vakcine (30).

U ispitivanju Sanofi Pasteur H5N1 vakcine, kod 54% ispitanika titar neutrališućih antitela bio je 1:40 ili iznad ove vrednosti (31). U aprilu 2007. godine FDA (Food and Drug Administration) odobrila je upotrebu ove vakcine u smislu uključivanja u strategijske rezerve Sjedinjenih Američkih Država i distribucije vakcine zdravstvenim ustanovama u slučaju potrebe.

U kliničkom trajalu GSK (GlaxoSmithKline) adjuvantne H5N1 vakcine sa inaktivisanim virusom izolovanim u toku epidemije u Vijetnamu 2004. godine, kod 80% dobrovoljaca nađen je dobar imuni odgovor (vrednost HI titra 1:40). Primenjene su dve doze vakcine sa najmanje 3.8 mcg antigena i adjuvantom.

Univerzalna vakcina, koja bi bila efikasna protiv svih tipova influenza, uključujući i pandemijske sojeve, predmet je intenzivnih istraživanja. Uspešno testiranje univerzalne vakcine na životinjama sprovedeno je od strane Acambis-a 2005. godine. Vakcina je fokusirana na M2 virusni protein, koji nije podložan mutacijama, za razliku hemaglutinina i neuraminidaze, koji su meta klasičnih influenza vakcina. Još jedna prednost ove vakcine je način produkcije tehnologijom bakterijske fermentacije, što je brža metoda u odnosu na tradicionalnu virusnu kultivaciju. Takođe, univerzalna formula vakcine omogućila bi njenu kontinuiranu proizvodnju, bez potrebe za sezonskim prilagođavanjem u odnosu na soj virusa (32).

Razvoj mogućih prototipova pandemijske influenza vakcine je u toku u 10 zemalja i uključuje 16 kompanija. Pet kompanija, takođe, radi na dizajniranju vakcina protiv drugih avijarnih virusa influenza (H9N2, H5N2 i H5N3). Više od 40 kliničkih trajala je završeno ili je u toku. I pored ohrabrujućih rezultata, SZO naglašava zabrinutost usled neadekvatnih globalnih kapaciteta za produkciju vakcine.

Vlada Srbije je 2006. godine usvojila Program za kontrolu, prevenciju, suzbijanje i iskorenjivanje ptičjeg gripa, koji utvrđuje postupke u slučaju pojave avijarne influenza A/H5N1 u regionu ili Srbiji (33).

Literatura

1. Webster RG, Govorkova EA. H5N1 influenza- continuing evolution and spread. *N Engl J Med* 2006;335:2174-7.
2. Webster RG, Walker EJ. "The world is teetering on the edge of a pandemic that could kill a large fraction of the human population". *American Scientist* 2003;91 (2): 122-3.
3. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. Philadelphia: Lippincott & Wilkins 2001; p. 1533-79.
4. Gong J, Xu W, Zhang J. Structure and functions of influenza virus neuraminidase. *Curr Med Chem* 2007;14:113-22.
5. Cinatl J Jr, Michaelis M, Doerr HW. The threat of avian influenza a (H5N1): part II: Clues to pathogenicity and pathology. *Med Microbiol Immunol* 2007;196(4): Epub ahead of print.
6. Uiprasertkul M, Puthavathana P, Sangsiriwut K, Pooruk P, Srisook K, Peiris M, et al. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1036-41.
7. Cinatl J Jr, Michaelis M, Doerr HW. The threat of avian influenza A (H5N1) Part I: epidemiologic concerns and virulence determinants. *Med Microbiol Immunol* 2007;196(4): Epub ahead of print.
8. Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2005;353:1374-85.
9. Chan PK. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis* 2002;34(2):S58-S64.
10. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/phase/en/

11. Gu J, Xie Z, Gao Z, Liu J, Korteweg C, Ye J, et al. H5N1 infection of the respiratory tract and beyond: a molecular pathology study. *Lancet* 2007; 370:1137-45
12. Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, et al. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998;351: 467-71.
13. Angelava NA, Angelava AV. Epidemiology, clinical picture, prevention and treatment of Avian influenza. *Georgian Med News* 2006;131:69-76.
14. De Jong MD, Simmons CP, Thanh TT, Hien VM, Smith GJ, Chau TN, et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat Med* 2006;12:1203-7.
15. Newton DW, Mellen CF, Baxter BD, et al. Practical and sensitive screening strategy for detection of influenza virus. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4353-6.
16. Herrmann B, Larsson C, Zwegyberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 2001;39(1):134-8.
17. Pachucki CT, Khurshid MA, Nawrocki J. Utility of reverse transcriptase PCR for rapid diagnosis of influenza a virus infection and detection of amantadine-resistant influenza a virus isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2796-8.
18. Senne DA, Pedersen JC, Suarez DL, Panigrahy B. Rapid diagnosis of avian influenza (AI) and assessment of pathogenicity of avian H5 and H7 subtypes by molecular methods. *Dev Biol* 2006; 126:171-7.
19. Harris Cheng M. Rapid bird flu detection. *Lancet* 2007; 7(1):13
20. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/
21. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005;353:1363-73.
22. Hayden GF. Antiviral Resistance in Influenza Viruses — Implications for Management and Pandemic Response. *N Engl J Med* 2006;354:785-8.
23. Schunemann HJ, Hill SR, Kakad M, Bellamy R, Uyeki TM, Hayden FG, Yazdanpanah Y, Beigel J, Chotpitayasunondh T, Del Mar C, Farrar J, Tran TH, Ozbay B, Sugaya N, Fukuda K, Shindo N, Stockman L, Vist GE, Croisier A, Nagjdaliyev A, Roth C, Thomson G, Zucker H, Oxman AD- WHO Rapid Advice Guideline Panel on Avian Influenza. WHO Rapid Advice Guidelines for pharmacological management of sporadic human infection with avian influenza A (H5N1) virus. *Lancet Infect Dis* 2007;7(1):21-31.
24. World Health Organization (May 2006) WHO Rapid Advice Guidelines on pharmacological management of humans infected with avian influenza A (H5N1) virus. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/pharmamanagement/en/index.html
25. de Jong MD, Tran TT, Truong HK, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* 2005;353:2667-72.
26. Yen HL, Monto AS, Webster RG, Govorkova EA. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 2005;192:665-72.
27. McCullers JA. Effect of antiviral treatment on the outcome of secondary bacterial pneumonia after influenza. *J Infect Dis* 2004;190:519-26.
28. Ward P, Small I, Smith J, Suter P, Dutkowski R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(1):1-21.
29. www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines
30. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/seasonal_vaccine/en/index.html
31. Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated subvirion influenza (H5N1) vaccine. *N Engl J Med* 2006;354:1343-51.
32. <http://www.acambis.com/default.asp?id=1944>
33. <http://www.minpolj.sr.gov.yu/article.php?sid=690>

AVIAN INFLUENZA A/H5N1

Milena Veselinovic

The World Health Organization (WHO) regards avian influenza A/H5N1 as a global public health threat with pandemic potential. Between 2003 and October 12, 2007, WHO registered 331 laboratory-confirmed cases (202 fatal) of human H5N1 infection. Human-to-human transmission has not been recorded yet. In the possible future, H5N1 pandemic, primary viral pneumonia would be the dominant clinical feature. Complications include the development of acute respiratory distress syndrome, renal and multiorgan failure. The characteristic laboratory findings are lymphopenia, with the alteration of CD4+/CD8+ index, thrombocytopenia and "cytokine storm". Specimens for laboratory diagnosis include pharyngeal swabs, nasal swabs, tracheal aspirate (or bronchoalveolar lavage) and serum (acute and convalescent). Virus isolation by cell culture is considered the "gold standard" of influenza diagnostics. Identification of infected cells is performed by direct or indirect immunofluorescence (DFA, IFA), enzyme-linked immunoassays (EIA) or PCR-based methods. Mchip, a microarray which enables the detection and subtyping based on M gene segment, is the recent breakthrough in H5N1 diagnostics. WHO Rapid Advice Guideline Panel on avian influenza, formed in 2006, defined the guidelines for chemoprophylaxis and therapy of human H5N1 infection. The most promising primary treatment is oseltamivir. Vigorous antiviral activity against all subtypes of both A and B influenza viruses has been confirmed by in vitro studies. WHO has identified the antigenic and genetic characteristics of the viruses suitable for the development of the vaccine. More than 40 clinical trials have already been carried out or are ongoing. In spite of the promising results, WHO is expressing concern regarding inadequate global capacity for the vaccine production. *Acta Medica Medianae* 2007;46(3): 44-51.

Key words: avian influenza A/H5N1