Virologija humane gripe

Lutz Gürtler

Prevod: Marko Kovačević

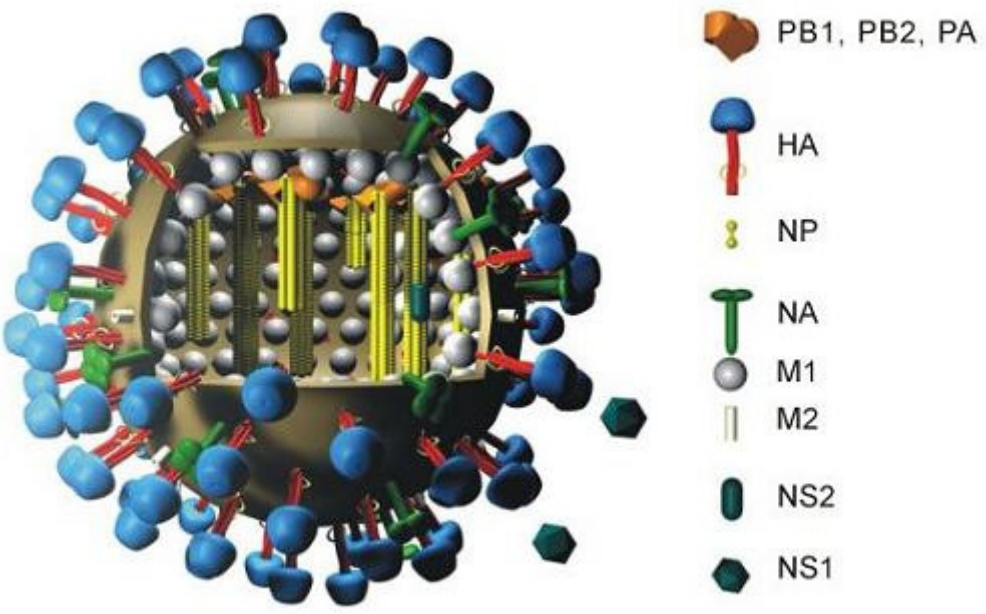
Virusi humane gripe so člani družine orthomyxovirus, ki ima rodove: virus gripe A, B in C, ter Thogovirus (pri klopih). Pri človeku imajo epidemiološki pomen edino virusi gripe A in B.

Glavne antigenske determinante virusov gripe A in B so transmembranski glikoproteini hemaglutinin (H ali HA) in nevraminidaza (N ali NA). Na osnovi antigenosti teh glikoproteinov, so virusi gripe A naprej razvrščeni v 16 H (od H1 do H16) in v 9 N (od N1 do N9) podtipov. Popolna nomenklatura izoliranih virusov gripe, zahteva hkratni pomen tipa virusa gripe (A ali B), species gostitelja (se izpusti, če je vir človek), geografski predel, serijsko številko, leto izolacije in na koncu v oklepaju H in N varianto na primer: A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1).

Virusi gripe se običajno prenašajo po zraku s kapljicami, nato kontaminirajo sluznico dihal. Sposobni so se prebiti skozi mucinski sloj, ki pokriva na zunanjost dihal, vstopiti v epitelne celice dihal kot tudi v druge vrste celic. Hitro se replicirajo: iz okuženih celicah se že po 6 urah začnejo širiti prvi virusi gripe. Del virusnih proteinov, kot je peptid za združitev in protein NS2, delujejo kot toksini, da bi pospešili produkcijo virusov gripe. Hitro razmnoževanje bakterij najpogosteje *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* in *Haemophilus influenzae*, se lahko začne že v zgodnji fazi replikacije virusa (za več podrobnosti glej poglavje Patogeneza).

Zgradba

Virusi gripe so oviti virusi z enoverižno RNA, pleomorfne oblike, povprečnega premera 120 nm. Štrleči hemaglutinin in nevraminidaza pokrivajo površje telesca virusa (Slika 1).



Slika 1. Zgradba virusa gripe A. Image copyright by Dr. Markus Eickmann, Institute for Virology, Marburg, Germany. Used with permission. - http://www.biografix.de

Genomi virusov gripe A in B se sestojijo iz 8 ločenih segmentov pokritih z nukleokapsidnim proteinom. Skupaj gradijo ribonukleoprotein (RNP) in vsaki iz segmentov kodira funkcionalno bistven protein:

1. Polimeraza B2 protein (PB2)
2. Polimeraza B1 protein (PB1)
3. Polimeraza A protein (PA)
4. Hemaglutinin (HA ali H)
5. Nukleokapsidni protein (NP)
6. Nevraminidaza (NA ali N)
7. Matrix protein (M): M1 sestavlja matrix in edino pri virusih gripe A M2 deluje kot črpalka ionskih kanalčkov, zmanjšuje ali vzdržuje pH endozoma
8. Ne-strukturni protein (NS); funkcija NS2 je še vedno hipotetična

Aktivna RNA-RNA polimeraza, ki je odgovorna za replikacijo in transkripcijo, je sestavljena iz PB2, PB1 in iz PA. Ima endonukleazno aktivnost in je spojena z RNP. Proteini NS1 in NS2 imajo regulatorno funkcijo, da v okuženi celici pospešijo sintezo virusnih sestavin (glej naprej).
Ovojnica virusa je dvoslojna lipidna membrana, ki izvira iz celice, v kateri je virus narejen in vsebuje štrleče nastavke, ki so sestavljeni iz HA in NA, kot tudi iz M2 proteina. Lipidni sloj pokriva matrix sestavljen iz M1 proteina.
Virus gripe C vsebuje samo 7 genomskih segmentov in na njegovi površini je samo eden glikoprotein. Ker je zelo slabo patogen za človeka o njem ne bomo govorili podrobneje.

Hemaglutinin

Hemaglutinin (HA ali H) je glikoprotein, ki vsebuje 2 ali 3 glikozilacijskih koncev in ima molekulsko težo približno 76.000. On premoščuje lipidno membrano tako, da se večji del, ki vsebuje najmanj 5 antigenskih domen, nahaja na zunanji površini. HA služi kot receptor za vezanje za sialično kislino (N-acetil-neuraminsko kislino) in sproži prediranje vsebine virusa s pomočjo združevanja membran. Hemaglutinin je glavni antigen virusa gripe. Obstajajo antigenski konci A, B (nosilec konca za povezovanje z receptorji), C, D in E. Antigenski konci se nahajajo na glavi molekule, podstavek molekule pa je v lipidnem sloju. Telo molekule HA, vsebuje stebrni del in fuziogeno domeno, ki je nujna za zlitje s celično membrano, kadar virus okuži novo celico. Pri nizkem pH je fuzijski peptid obrnjen v notranji položaj. HA oblikuje trimere, več trimer pa oblikuje fuzijsko poro.
Izrazite mutacije na antigenskih koncih znižajo ali pa inhibirajo vezavo nevtralizacijskih protiteles, na ta način se omogoči novem podtipu, da se širi v neimuni populaciji. Ta pojav je imenovan **antigenski drift- antigenski premik**. Mutacije, ki povzročijo antigenski premik, so molekularna pojasnitev za sezonske epidemije gripe tekom zimskega obdobja v conah z umerjeno klimo. Imunski odgovor na HA antigenske konce je produkcija nevtralizacijskih protiteles, kar je temelj za odpravljanje okužbe pri posamezniku, včasih pa je del navzkrižne imunosti, ki se jo ugotovi pri starejših osebah pri pojavu novega pandemičnega seva virusa.
Antigenski shift – antigenski preskok - je imenovan tudi s terminom reasortiranje genoma ali pa samo reasortiranje –prerazporejanje. Nastane, kadar se HA zamenja v virusu npr. pri sestavljanju virusnega mozaika se H1 zamenja s H5. To se lahko zgodi, če je celica okužena z dvema različnima virusoma gripe in se tekom procesa replikacije segmenti njihovih genomov zamenjajo.
Ta pojav prerazporejanja genoma pogosto srečamo pri vodnih pticah, posebej pri racah. Čeprav se pri pticah po okužbi redko pojavijo simptomi, lahko te ptice z blatom virus izločajo več mesecev.

Nevraminidaza

Enako, kot je HA, je tudi nevraminidaza (NA ali N) glikoprotein, ki je na površini virusa v obliki izbokline. Oblikuje tetramerne strukture, ki imajo povprečno molekulsko težo 220.000. Glavni delež molekule NA, je na zunanji strani celice, premošča lipidni sloj in je v citoplazmi le majhen delec molekule.

NA deluje kot encim, ki loči sialično kislino HA molekule, od ostalih NA molekul in od glikoproteinov in glikolipidov, ki so na površju celice. Služi tudi kot pomemben antigenski konec in poleg tega kaže, da je nujen za penetriranje virusa skozi sloj mucina v respiratornem epitelu.
Antigenski premik je možen tudi pri NA. Nevraminidaza nosi več rezidujev pomembnih aminokislin, ki če mutirajo lahko povzročijo rezistenčnost na inhibitorje nevraminidaze. Mutacije, ki so že bile ugotovljene so:

- R292K
- H274Y, R152K, E119V

Črke predstavljajo aminokisline (R, arginin; K, lizin; H, histidin; Y, tirozin; E, glutaminsko kislino; V, valin): prejšnja črka je prvotna aminokislina in poznejša črka je aminokislina, ki je nastala po mutaciji.
Kadar pride do zamenjave aminokisline arginin (R) in jo zamenja lizin (K) na poziciji 292 nevraminidazinega glikoproteina, lahko nastane popolna rezistenca. Mutacija R v K je povezana z zamenjavo le enega nukleotida AGA v AAA v N genu. Pozicija 292 je tako pomembna zaradi tega, ker lahko mutacija povzroči rezistenco, ne samo na snov oseltamivirja ampak tudi na zanamavir in na še drugi dve novi zdravili.

M2 protein
Kadar je virusni delec ujet v endozom, se poveča aktivnost M2 jonskih kanalčkov tako, da joni poplavijo virusni delec, s tem ustvarijo nizek pH. Rezultat tega je, da se povezava HA-M1 prekine, delec se odpre, translocira se fuzijski peptid znotraj HA in se HA zlije z notranjim slojem endozomske membrane. V citoplazmo celice se sprostijo ribonukleoproteini in se transportirajo v jedro celice. V jedru se kompleks razkosa in se začne sinteza virusne RNA. Aktivnost M2 proteina inhibira amantadin, rimantadin in njim sorodne snovi.

Morebitna funkcija NS1
Človeška messenger RNA ima na svojem 5' koncu ima del poly-A. NS1, ki ima molekulsko težo 26.000 in oblikuje dimer, ki ustavlja eksport mRNA molekul, ki vsebujejo poly-A. Torej daje prednost virusni RNA, ki se transportira v ribozome in se prevaja -dešifrira. NS1 morda ustavlja tudi spajanje pre-mRNA. Zraven tega, je NS1 verjetno zmožen preprečiti interferonski odgovor v celici okuženi z virusom, kar povzroča neovirano produkcijo virusa.

Morebitna funkcija NS2
NS2 je majhna molekula, ki ima molekulsko težo 11.000. V virusnem delcu ga mogoče ovira M1 protein. Izgleda, da je njegova funkcija, pospeševanje transporta na novo sintetiziranih RNP-jev iz jedra v citoplazmo, da bi se pospešila produkcija virusa.

Ciklus replikacije

Absorpcija virusa
Virus gripe se veže na površje celice, s pritrjevanjem zunanjih vršičkov HA na sialično kislino celičnih glikoproteinov in glikolipidov. Spojitev sialične kisline na predzadnjo galaktozo, bodisi alfa 2,3 (pri pticah) ali alfa 2,6 (pri človeku) določa specifičnost gostitelja. Karboksilati sialične kisline so prisotni v več vrstah celic v organizmu in je tudi velika možnost vezanja HA za različne tipe celic v organizmih, ki jih virus gripe lahko okuži.

Vstop virusa
Po pritrditvi virusa za celico, ga celica prejme s procesom endocitoze, posredovane s pomočjo receptorja prevlečenega s klatrinom. Kadar so v notranjosti se sprostijo molekule klatrina in se mehurček, ki vsebuje celoten virus, zlije z endozomi. Vsebina mehurčka se prebavi v fagozomu, v katerem se postopno zmanjšuje pH.

Razodevanje virusa

Kadar se doseže določeni nivo, zmanjševanje pH ustavi delovanje M2 proteina, ki sproži delno sprostitev fuzijskega peptida HA. To omogoči združitev HA z membrano mehurčka in se v citoplazmo sprostijo ribonukleoproteini (RNPi), kot je zgoraj opisano. Dotok ionov iz endosoma v virusni delec pripelje do ločevanja različnih virusnih proteinov; prekine se kopičenje M1-proteinov in se RNPi ne držijo več za M1-proteinski kompleks. Razodevanje virusa se konča znotraj 20-30 minut po pritrditvi virusa.

Sinteza virusne RNA in virusnih proteinov

RNPi se transportirajo v jedro. V jedru se polimerazni kompleks spoji z virusno RNA, s svojo endonukleazno dejavnostjo čisti virusno RNA in sočasno povzroča njeno elongacijo - raztegovanje. Produkcijo virusne RNA omejuje NP v korist mRNA. Obe se transportirata v citoplazmo.V citoplazmi se v ribosomih generirajo virusni proteini. Del virusne mRNA spojijo celični encimi tako, da se končni virusni proteini, kot so M1 in NS2, lahko sestavijo brez nadaljnjega cepljenja. Nekateri iz novonastalih virusnih proteinov se nato transportirajo v jedro, tam se vežejo na virusno RNA, da ustvarijo RNPe (ribonukleoproteine). Ostali, na novo nastali virusni proteini, se obdelujejo v endoplazmatskem retikulumu in v Golgijevem aparatu, kjer se izvaja glikolizacija. Ti spremenjeni proteini, se nato transportirajo v celično membrano, v kateri se zalepijo za lipidni dvosloj. Kadar na plazemski membrani dosežejo zadostno koncentracijo, se RNPi in M1 proteini združijo in se zgostijo, da ustvarijo virusni delec. Končno se delec iztisne iz membrane in se bo sprostil s pomočjo dejavnosti nevraminidaze.
Čas, ki poteče od vstopa do produkcije novega virusa, v povprečju znaša 6 ur.

Širjenje virusa in kužnost

Imunohistološke slike kažejo, da so žarišča celic, ki proizvajajo viruse, nakopičena v mukoznem sloju respiratornega trakta, v črevesju in celo v endotelialnih slojih miokarda in možganov. V nosnih sekretih so vsebovani milijoni virusnih delcev na ml tako, da 0.1 µl aerosolnih delcev, vsebuje več kot 100 virusnih delcev. Ena HID (infekcijska doza za človeka) virusa gripe je med 100 in 1.000 delcev. V zgodnjem obdobju okužbe za gripo, je možno ugotoviti, da je virus prisoten tudi v krvi in v drugih telesnih tekočinah.
Kužnost virusa gripe se ohrani v odvisnosti od temperature, pH in slanosti vode ter UV žarčenja. Na temperaturi 4°C, je razpolovna doba kužnosti v vodi, okrog 2 do 3 tedne. Zaradi ustroja lipidnega dvosloja zna biti, da je preživetje pod normalnimi okoliščinami v zunanjem okolju krajše.
Kužnost virusa gripe se lahko inaktivira s pomočjo razkužil, ki vsebujejo alkohol, klor in aldehide. Po dosedanjih spoznanjih, temperatura nad 70°C uniči kužnost virusa v nekaj sekundah.

Literatura

1. Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ. Textbook of Influenza. Blackwell Science, Oxford, 1998.
2. Lamb RA, Krug RM. Orthomyxoviridae: The viruses and their Replication. In: Fields Virology fourth edition, Knipe DM, Howley PM eds, Lippincott, Philadelphia 2001, pp 1487-1531
3. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields Virology fourth edition, Knipe DM, Howley PM eds, Lippincott, Philadelphia 2001, pp 1533-1579

Specialna referenca

4. Wetherall NT, Trivedi T, Zeller J, Hodges-Savola C, McKimm-Breschkin JL, Zambon M, Hayden FG. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. J Clin Microbiol 2003; 41: 742-750. Full text at http://jcm.asm.org/cgi/content/full/41/2/742?view=long&pmid=12574276