

## Sledování rezistence chřipkových virů na oseltamivir – naše dosavadní zkušenosti

### Monitoring oseltamivir resistance in influenza viruses – experience gained to date

Ludmila Nováková

#### Souhrn

Sledování rezistence chřipkových virů k inhibitorům neuraminidázy patří k rutinní součásti surveillance chřipky. Během sezóny 2013/2014 bylo vyšetřeno celkem 23 (10 H1N1 a 13 H3N2) pozitivních virových izolátů, v sezóně 2014/2015 dalších 115 (13 H1N1, 82 H3N2 a 20 B) materiálů. Rezistence na antivirový preparát (Oseltamivir) byla vyšetřována kitem NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Pouze u jednoho vzorku z celého testovaného souboru byla tato rezistence zjištěna. Hodnota IC50 byla v průměru 100x větší než u ostatních měření a tento nálezn byl potvrzen sekvenací, kde byl zjištěn mutační gen H275Y.

*Monitoring resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors is a routine part of influenza surveillance. In the season 2013/2014, 23 positive virus isolates (10 H1N1 and 13 H3N2) were investigated and in the season 2014/2015, other 115 isolates (13 H1N1, 82 H3N2, and 20 B) were recovered. Resistance to the antiviral medication oseltamivir was tested by the NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Only one isolate of the set tested turned out to be oseltamivir resistant. It had a 100 fold higher IC50 value than other isolates and its resistance was confirmed by sequencing and detection of the H275Y mutation which confers resistance to oseltamivir.*

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2015; 24(8): 264–268.

**Klíčová slova:** chřipka A a B, oseltamivir, rezistence, mutace, surveillance

**Keywords:** Influenza A and B, oseltamivir, resistance, mutation, surveillance

#### ÚVOD

Neuraminidáza (NA) a hemagglutinin (HA) jsou základní membránové glykoproteiny chřipkového viru. Hemagglutinin zprostředkovává vstup viru do hostitelské buňky prostřednictvím vazby virové partikule na glykoproteiny obsahující kyselinu sialovou. Kromě toho je hemagglutinin hlavním antigenem, proti němuž jsou tvořeny obranné virus neutralizační protilátky, které brání nákaze antigenně shodným virem. Jeho název vyplývá ze schopnosti aglutinovat červené krvinky *in vitro*. Neuraminidáza (sialidáza) má enzymatickou aktivitu. Štěpí glykosidickou vazbu kyseliny sialové, čímž umožní virionům proniknout k buňkám. Kromě toho se neuraminidáza uplatňuje na konci replikačního cyklu, kdy enzymaticky zajišťuje uvolňování virionů z buňky a podporuje tak jejich další šíření [Webster *et al.* 1992; Gubareva *et al.* 2000; Lamb a Krug, 2001; McKimm-Breschkin, 2012]. Oba glykoproteiny jsou velmi proměnlivé a podmiňují rozlišování antigenních subtypů a variant. Do dnešní doby bylo identifikováno 18 různých typů hemagglutininu (H1 až H18) a 11 různých typů neuraminidázy (N1 až N11) [Li *et al.* 2012; Wu *et al.* 2014].

Při léčbě chřipky se využívají antivirové preparáty, které můžeme rozdělit do dvou stěžejních skupin:

– 1. generace: inhibitory M2 proteinu 1. generace – adamantany (amantadin a rimantadin)

– 2. generace: inhibitory neuraminidázy (oseltamivir, zanamivir, peramivir, lanimivir)

Adamantany fungují jako inhibitory proteinového kanálu M2 chřipky typu A a způsobují tak zastavení replikace viru. V praxi však byl problémem snadný vznik rezistence a navíc tyto preparáty nefungovaly na léčbu chřipky typu B. Virus chřipky typu B sice má BM2 protein podobný M2 proteinu, ten ale není citlivý na M2 inhibitory [Rosenberg a Casarotto, 2010]. Proto byly adamantany postupně zcela nahrazeny inhibitory neuraminidázy. Tato skupina léků odštěpuje v místě sialové vazby cukernou skupinu z glykokonjugátu na povrchu viru a dojde tak k přerušení replikace viru. Dále znemožňují výstup virů z infikované buňky a rozptýlení infikovaných částic na další buňky. Jsou účinné jak proti viru chřipky A, tak i viru chřipky B a navíc jsou velmi dobře tolerovány [Adabala *et al.* 2013]. Patří sem oseltamivir (Tamiflu), zanamivir (Relenza), peramivir (PeramiFlu) a laninamivir (Inavir) [Singh a Soliman, 2015]. V České republice je k dispozici především Tamiflu (perorální užití) a v omezené míře Relenza (inhalační aplikace). Peramivir a laninamivir zde nejsou registrovány. Peramivir se podává intravenózně a v současné době je povolen pouze v USA, Japonsku, Koreji a Číně [Takashita *et al.* 2013]. Laninamivir je k dispozici pouze v Japonsku [Shobugawa *et al.* 2012]. Velmi nadějným antivirovým preparátem další generace, který působí nejen na viry chřipky A, B a C, ale i na mnohé další RNA viry, je fanipiravir – orální pyrazinocarboxamid – jehož antivirový efekt je založen na inhibici RNA-dependentní RNA polymerázy. V současné době probíhá v Japonsku fáze III klinického testování. Velkou výhodou tohoto preparátu, jehož mecha-

nismus účinku je zcela odlišný od preparátů 1. i 2. generace, je možnost jeho použití i tam, kde inhibitory neuraminidázy selhávají. Bylo popsáno i jeho synergické působení v kombinaci s oseltamivirem [Li et al 2015].

Masivnější používání inhibitorů neuraminidázy s sebou přineslo nutnost průběžného monitoringu případné rezistence, podobně jako je tomu v problematice antibiotické. K dispozici jsou dva testovací přístupy: sekvenace neuraminidázových a hemaglutinačních genů (genotypové testování) a dále testy založené na měření enzymatické aktivity neuraminidázy (fenotypové testování). Sekvenace je relativně nová biochemická metoda, jejímž prostřednictvím se zjišťuje pořadí nukleových bází v sekvenci DNA nebo RNA. Jednodušší a zatím v praxi používanější metodou na měření citlivosti virů chřipky vůči inhibitorům NA jsou enzymatické testy. První test využívá fluorescenční substrát, kyselinu 20-(4-methylumbelliferyl)-a-D-N-acetylneuraminidázovou (MUN-ANA). Druhý možný přístup pracuje s chemiluminiscentním substrátem, kyselinou 20-(4NA-Star)-a-D-N-acetylneuraminidázovou (NA-Star) ([www.isirv.org](http://www.isirv.org)). Oba testy kalkulují tzv. hodnoty IC50, tj. koncentrace inhibitoru, při které za daných podmínek dochází k 50 % poklesu aktivity sledovaného enzymu [WHO, 2012]. Výhodné je zvolit oba přístupy zároveň v pořadí fenotypové testování – následně pak sekvenace. Hlavním důvodem je fakt, že nejsou známy všechny mutace vedoucí k rezistenci. Testy na citlivost inhibitorů NA nás mohou navést na nové změny v genomu a mohou rovněž poukázat i na částečně rezistentní vzorky, které na základě doposud známých sekvenčních změn vedoucích k rezistenci, nemusí být objeveny.

## MATERIÁL A METODY

Jednotlivé izoláty virů chřipky typu A i B byly postupně získány množením v MDCK buňkách během sezón 2013/2014 a 2014/2015. Pro naše účely jsme potřebovali viry chřipky, které měly hemaglutinačně inhibiční titer alespoň 1:8. Rezistence na antivirový preparát (v našem případě se jednalo o oseltamivir) byla vyšetřována kitem NA-Star Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), který se skládá z NA-Star Substrate (10mM koncentrace), NA-Star Assay Buffer (26 mM Morpholinoethanesulfonic acid, 4mM CaCl<sub>2</sub>), NA-Star Accelerator a 96 jamkových destiček. Postupovalo se podle protokolu, který je součástí kitu. Luminiscence byla změřena přístrojem INFINITE 200 PRO (TECAN) ovládaného pomocí počítače softwarem iControl. Naměřená data byla exportována do MS Excel. Pro výpočet IC50 byl použit software MyAssays Analysis Software Solutions, který je volně dostupný na internetu [<http://www.myassays.com/home.aspx>].

## VÝSLEDKY

Během sezóny 2013/2014 bylo vyšetřeno celkem 23 (10 H1N1 a 13 H3N2) pozitivních materiálů od různých pacientů. Zároveň s těmito materiály jsme na zkoušku vyšetřili 2 kmeny, A/Californie 7/2009 (H1N1) a A/Victoria 361/2011 (H3N2). V sezóně 2014/2015 jsme vyšetřili 115 (13

H1N1, 82 H3N2 a 20 B) izolátů. Jednotlivé vzorky byly testovány duplicitně. Data, která jsme získali, byla zprůměřovaná a následně vyhodnocena softwarem.

Pouze u jednoho vzorku (4094/13) se prokázalo, že pacient byl rezistentní na oseltamivir. Hodnota IC50 byla v průměru 100x větší než u ostatních vzorků (viz tabulka 1) a rovněž výsledná křivka se lišila od ostatních (**Obrázek 1**). Rezistence byla potvrzena sekvenací, kde byl objeven mutační gen H275Y.

Hodnoty IC50 pro jednotlivé vzorky jsou uvedené v **tabulce 1**.

## DISKUSE

Antivirová terapie chřipky s sebou samozřejmě přinesla i možnost rozvoje rezistence. Adamantany jsou v současné době zcela překonané, recentně cirkulující viry chřipky jsou ve více jak 99 % jsou nositeli mutace S31N a tedy jsou vůči nim víceméně zcela rezistentní.

V posledních letech se začínají objevovat i kmeny rezistentní na oseltamivir i zanamivir. Na počátku roku 2008 se norské úřady poprvé zmínily o vysoké míře odolnosti viru na oseltamivir. Během roku 2007 bylo v Norsku testováno 16 izolátů chřipky A(H1N1) a 12 (75 %) jich bylo rezistentních na oseltamivir. Během této sezóny byly rezistence identifikované i v dalších evropských zemích, a to s různou prevalencí (0–60 %). Nejvíce rezistentních kmenů bylo zachyceno ve Francii a Norsku [WHO, 2008]. Tato epizoda byla časově omezená a její příčiny nebylo možné blíže specifikovat. Aktuální data týkající se zejména rezistence na inhibitory neuraminidázy jsou pravidelně zveřejňována na stránkách ECDC i WHO. I když se zatím nejedná zdaleka o takové množství jako u skupiny adamantanů, minimum případů během jednotlivých sezón se vždy objeví [Sheu *et al.* 2008, Murtaugh *et al.* 2013, Takashita *et al.* 2014]. Počet rezistentních kmenů zatím osciluje v intervalu od 1 do 3 %. Rezistence na oseltamivir a zanamivir je způsobena mutacemi neuraminidázy, která se u jednotlivých (sub)typů chřipky liší. Například u chřipky A(H1N1) se jedná obvykle o H275Y, pro A(H3N2) je typická E119V a u chřipky typu B jde o R371K [Sheu *et al.* 2008]. Avšak ne všechny mutace jsou známé a z tohoto důvodu je nezbytné provádět oba typy testů – tedy fylogenetický screening a následnou sekvenaci tam, kde se screeningový výsledek vymyká předpokládaným hodnotám. Na našem pracovišti jsme za dvě vyšetřované sezóny zachytili pouze jeden případ, kdy byl vzorek zcela rezistentní na oseltamivir. Tento izolát byl získán od pacienta s hematologickou diagnózou, jež měla fatální průběh.

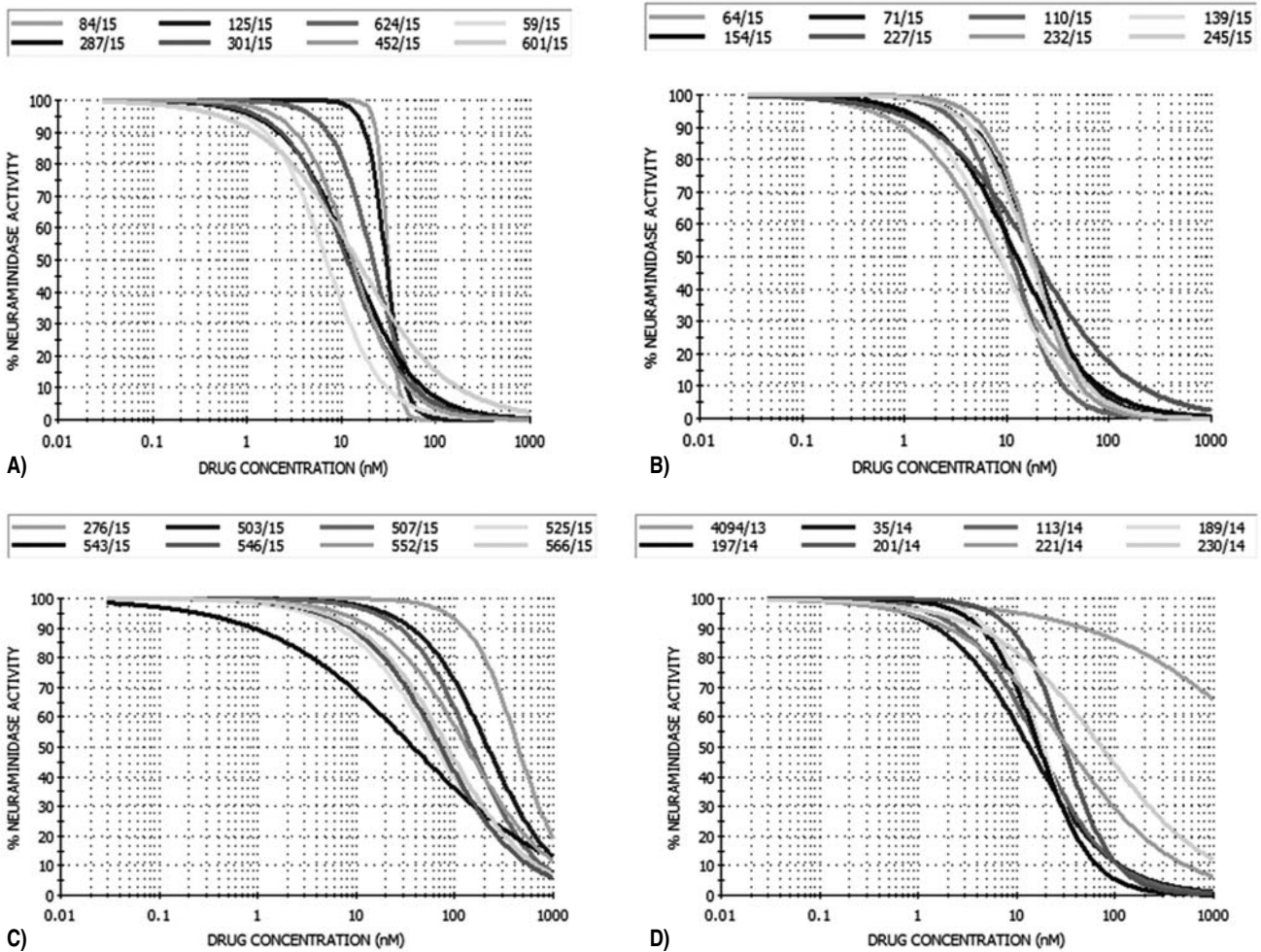
Indikace oseltamiviru je v ČR velmi střídmá a je téměř výlučně vázána na případy hospitalizovaných pacientů s těžším průběhem infekce. Tuto filosofii lze vnímat jako správnou, má však svá úskalí. Největší problém v těchto situacích je skutečnost, že antivirová léčba je zahajována relativně pozdě – často déle než 48 hodin od prvních příznaků. Rovněž nutnost perorálního podání preparátu je u mnohých pacientů složitě proveditelná. Dostupnost intravenózně aplikovaných forem (peramivir, i.v. zanamivir) by terapeutické možnosti nepochybně zlepšila.

Tabulka 1: HODNOTY IC 50 PRO MĚŘENÉ VZORKY – ukázka

H1N1		H3N2		H3N2		B	
	IC50		IC50		IC50		IC50
4094/13	3685,76	197/14	17,01	163/15	21,24	276/15	441,50
189/14	18,42	201/14	30,63	167/15	11,08	503/15	215,84
256/14	12,85	221/14	32,96	176/15	10,99	507/15	148,82
194/14	19,13	230/14	73,23	179/15	14,57	525/15	63,94
89/14	9,84	251/14	52,11	190/15	32,72	543/15	38,15
249/14	10,03	257/14	14,68	201/15	13,52	546/15	72,13
250/14	9,58	258/14	14,66	209/15	20,13	552/15	132,53
269/14	5,74	270/14	8,49	211/15	7,03	566/15	84,37
198/14	10,65	294/14	13,62	213/15	16,92	587/15	66,14
113/14	16,84	297/14	49,21	214/15	30,29	594/15	53,77
A/Californie	50,72	309/14	8,00	254/15	12,95	9/15	106,67
84/15	30,99	313/14	12,96	259/15	10,74	502/15	135,72
125/15	29,60	35/14	13,39	260/15	101,45	509/15	15,49
624/15	21,52	A/Victorie	55,09	272/15	12,44	613/15	81,46
59/15	6,96	64/15	8,47	273/15	22,50	632/15	110,72
287/15	12,77	71/15	18,39	298/15	21,51	664/15	72,30
301/15	11,62	110/15	11,27	299/15	13,32	716/15	75,67
452/15	13,05	139/15	8,76	300/15	18,98	751/15	80,98
601/15	14,68	154/15	12,52	308/15	22,44	752/15	107,00
633/15	14,79	227/15	18,37	309/15	24,88	758/15	111,34
673/15	16,25	232/15	17,87	328/15	23,80	760/15	139,97
676/15	7,78	245/15	17,04	340/15	19,54		
741/15	7,20	275/15	28,80	341/15	20,62		
807/15	16,01	195/15	8,61	401/15	6,47		
		223/15	22,26	412/15	16,34		
		625/14	11,55	415/15	22,20		
		627/14	15,24	445/15	9,43		
		660/14	11,85	471/15	17,36		
		689/14	16,83	513/15	12,03		
		27/15	8,04	523/15	27,55		
		32/15	8,23	581/15	10,21		
		55/15	6,04	619/15	7,69		
		65/15	6,87	626/15	15,84		
		78/15	11,16	662/15	11,89		
		88/15	6,90	684/15	10,88		
		95/15	6,78	704/15	21,11		
		99/15	10,67	756/15	12,62		
		94/15	7,06	767/15	12,64		
		100/15	10,59	785/15	15,59		
		101/15	8,02	817/15	15,74		
		103/15	11,10	820/15	26,95		
		105/15	7,37	840/15	21,00		
		155/15	13,23	857/15	20,85		
		162/15	18,07	854/15	9,91		

Obrázek 1: GRAF REZISTENCE NA ANTIVIROTIKA

A) Chřipka A(H1N1); B) Chřipka A(H3N2); C) Chřipka B; D) Rezistentní izolát 4094/13



## LITERATURA

- Adabala PJ, LeGresley EB, Bance N, Niikura M, Pinto BM. 2013. Exploitation of the catalytic site and 150 cavity for design of influenza A neuraminidase inhibitors. *The Journal of Organic Chemistry* 78(21): 10867-10877
- Gubareva LV, Kaiser L, Hayden FG. 2000. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet* 355: 827-835
- Lamb RA, Krug RM. 2001. In: Knipe, DM, Howley PM. (Eds.). *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*; in *Fields Virology*, fourth ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1487-1531
- Li Q, Sun X, Li Z, Liu Y, Vavricka CJ, Qi J, Gao GF. 2012. Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(46): 18897-18902
- Li TCM, Chan MCW, Lee N. 2015. Clinical implication of antiviral resistance in influenza. *Viruses*, 7(9), 4929-4944
- McKimm-Breschkin JL. 2012. Influenza neuraminidase inhibitors: antiviral action and mechanisms of resistance. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7(1): 25-36
- Murtaugh W, Mahaman L, Healey B, Peters H, Anderson B, Tran M, Ziese M, Carlos MP. 2013. Evaluation of three influenza neuraminidase inhibition assays for use in a public health laboratory setting during the 2011-2012 influenza season. *Public Health Reports* 128: 75-87
- Sheu TG, Deyde VM, Okomo-Adhiambo M, Garten RJ, Xu X, Bright RA, Butler EN, Wallis TR, Klimov AI, Gubareva LV. 2008. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(9): 3284-3292
- Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Kawashima T, Daput C, Daput IC, Kondo H, Suzuki Y, Saito K, Suzuki H. 2012. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors-oseltamivir, zanamivir, laninamivir and peramivir-for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010-2011 influenza season in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 18(6): 858-864
- Singh A, Soliman ME. 2015. Understanding the cross-resistance of oseltamivir to H1N1 and H5N1 influenza A neuraminidase mutations using multidimensional computational analyse. *Drug Design, Development and Therapy* 9: 4137-4154
- Takashita E, Ejima M, Itoh R, Miura M, Ohnishi A, Nishimura H, Odagiri T, Tashiro M. 2014. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Eurosurveillance* 19(1):20666
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56: 152-179

WHO, 2012. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility-Geneva, November 2011 and 2012. *Weekly epidemiological record* 87, 369-373

Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF. 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology* 22(4): 183-191

<http://www.isirv.org/site/index.php/methodology/nai-assay-ic50>  
[http://www.who.int/influenza/patient\\_care/antivirals/oseltamivir\\_faqs/en/](http://www.who.int/influenza/patient_care/antivirals/oseltamivir_faqs/en/)

*Mgr. Ludmila Nováková  
NRL pro chřipku a nechřipkovou  
virovou respirační onemocnění  
SZÚ - CEM*