

# Fylogenetická a molekulární analýza virů chřipky A/H1N1<sub>pdm</sub> izolovaných v epidemické sezoně 2012/2013 od pacientů hospitalizovaných s příznaky ILI

Nagy A.<sup>1,5</sup>, Jiřincová H.<sup>1</sup>, Havlíčková M.<sup>1</sup>, Džupová O.<sup>2,3</sup>, Herrmannová K.<sup>2,4</sup>, Trojánek M.<sup>2,4</sup>, Kynčl J.<sup>1,3</sup>, Blechová Z.<sup>2,4</sup>, Marešová V.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>2</sup>Klinika infekčních nemocí, Nemocnice Na Bulovce, Praha

<sup>3</sup>3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

<sup>4</sup>2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze

<sup>5</sup>Státní veterinární ústav, Praha

## SOUHRN

**Cíl práce:** Provést fylogenetickou a molekulární analýzu virů chřipky A/H1N1<sub>pdm</sub> izolovaných v epidemické sezoně 2012/2013 od pacientů hospitalizovaných s příznaky ILI (influenza-like illness).

**Materiál a metodiky:** Analyzovaný soubor představoval 34 kmenů viru pandemické chřipky A/H1N1<sub>pdm</sub> v epidemické sezoně 2012/2013 v ČR. Kmeny byly podrobeny parciálnímu nebo celogenomovému sekvenování. Jednotlivé genomové segmenty se porovnály na nukleotidové i aminokyselinové úrovni, určila se absolutní i procentní sekvenční identita a identifikovaly se fylogenetické vztahy. V posledním bodu se analyzovaly rozdíly v molekule H1 oproti aktuálnímu vakcinačnímu kmenu a identifikovala se genotypová struktura a přítomnost molekulárních markerů majících vztah k patogenitě a rezistenci na antivirotika.

**Výsledky:** Fylogenetická analýza molekuly H1 naznačila příslušnost všech 34 A/H1N1<sub>pdm</sub> izolátů reprezentujících sezonu 2012/2013 v ČR do H1 skupiny 6 s členěním do dvou H1 sublinií 6A a 6B. Mapování rozdílů do známých antigenních oblastí molekuly H1 ukázalo dvě stabilní změny oproti aktuálnímu vakcinačnímu kmenu, a to v antigenních oblastech Sb a Ca1.

Dále byly identifikovány sporadické mutace spadající do antigenní oblasti Ca2, Cb a Sb. Genotypizace odhalila ko-cirkulaci dvou příbuzných, ale jasně rozlišitelných genotypů A/H1N1<sub>pdm</sub>: Všechny izoláty se vyznačovaly citlivostí na oseltamivir. U jednoho kmene byly identifikovány dvě N1 subpopulace oseltamivir senzitivní a rezistentní v přibližně ekvimolárním poměru. **Závěr:** Všechny A/H1N1<sub>pdm</sub> izoláty reprezentující epidemickou sezonu 2012/2013 v ČR představovaly fenotypově jednotnou skupinu. Na nukleotidové úrovni byla divergence relativně výraznější s možností identifikace H1 sublinií i diskrétních genotypů. Molekuly H1 se vyznačovaly vysokou identitou s vakcinačním kmenem A/California/7/2009 (H1N1), což dokazovalo dostatečnou protektivitu aktuální vakcíny. Všechny kmeny se vyznačovaly citlivostí na oseltamivir, nicméně v některých případech docházelo k selekci oseltamivir-rezistentních N1 subpopulací.

## KLÍČOVÁ SLOVA

chřipka – H1N1 – fylogenetická analýza – genotyp – rezistence

## ABSTRACT

**Nagy A., Jiřincová H., Havlíčková M., Džupová O., Herrmannová K., Trojánek M., Kynčl J., Blechová Z., Marešová V.: Phylogenetic and molecular analysis of A/H1N1<sub>pdm</sub> influenza viruses isolated in the epidemic season 2012/2013 from hospitalised patients with symptoms of influenza-like illness**

**Aim:** To perform phylogenetic and molecular analysis of A/H1N1<sub>pdm</sub> influenza viruses isolated in the epidemic season 2012/2013 from hospitalised patients with symptoms of influenza-like illness (ILI).

**Material and methods:** The study set included 34 strains of the A/H1N1<sub>pdm</sub> influenza virus isolated in the Czech Republic in the epidemic season 2012/2013. The strains were analysed by partial or whole-genome sequencing. The genome segments were compared at the nucleotide and amino acid levels, absolute and percentage sequence identity were

determined, and phylogenetic relations were identified. The last steps were the comparison of the H1 molecule with that of the most recent vaccine strain and identification of the genotypic structure and molecular markers linked to the pathogenicity and antiviral resistance.

**Results:** Phylogenetic analysis of the H1 molecule suggested that all 34 A/H1N1<sub>pdm</sub> isolates from the 2012/2013 season in the Czech Republic should be assigned to H1 group 6 divided into sublineages 6A and 6B. The comparison of the known antigenic regions of the H1 molecule with those in the most recent vaccine strain revealed two stable changes in antigenic regions Sb and Ca1. Furthermore, sporadic mutations were identified in antigenic regions Ca2, Cb, and Sb. Genotyping revealed co-circulation of two related but clearly distinguishable genotypes of A/H1N1<sub>pdm</sub>. All isolates showed sensitivity to oseltamivir. One strain consisted of two N1 sub-populations, one oseltamivir sensitive and the other oseltamivir resistant, in nearly equimolar proportions.

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

**Conclusion:** All A/H1N1<sub>pdm</sub> isolates from the epidemic season 2012/2013 in the Czech Republic formed a phenotypically uniform group. At the nucleotide level, the divergence was relatively more pronounced and H1 sublineages and discrete genotypes were possible to identify. H1 molecules were highly identical to those of the vaccine strain A/California/7/2009 (H1N1) which showed that the current vaccine was protective enough. All

strains were sensitive to oseltamivir; however, the selection of oseltamivir resistant N1 subpopulations was observed.

**KEYWORDS**

**influenza - H1N1 - phylogenetic analysis - genotype - resistance**

*Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014, č. 2, s. 83-87*

**ÚVOD**

Chřipka představuje akutní febrilní virové onemocnění, jež atakuje především horní cesty dýchací - s maximem výskytu v zimních měsících roku. U většiny nemocných mívá infekce středně těžký průběh, obvykle postačí symptomatická léčba a po 5-7 dnech dochází k ústupu příznaků. Rekonvalescenci však může doprovázet únavový syndrom, často i několik týdnů. Nicméně, u části nemocných se chřipka může projevit jako závažná infekce, která se manifestuje postižením dolních cest dýchacích (primární chřipková pneumonie) a nezřídka i projevy mimoplicními. Závažnost průběhu je obtížně odhadnutelná, často se může těžká infekce objevit i u velmi mladého pacienta bez jakýchkoliv rizikových faktorů. Chřipková sezóna 2012/2013 se, na rozdíl od sezony 2011/2012, vyznačovala delším trváním i výskytem těžkých forem infekce [1]. Dominujícím subtypem byla chřipka A/H1N1<sub>pdm</sub>, subtyp A/H3N2 a typ B kócirovaly v menší míře ve druhé polovině epidemické vlny. Cílem naší studie byla charakteristika genetické variability virů chřipky subtypu A/H1N1<sub>pdm</sub>, u pacientů kteří byli hospitalizováni s příznaky ILI v sezoně 2012/2013.

**MATERIÁL A METODY**

Analýzovaný soubor představoval 34 kmenů viru pandemické chřipky A/H1N1<sub>pdm</sub>. Z uvedeného počtu bylo od 26 pacientů hospitalizovaných s příznaky ILI v Nemocnici na Bulovce v období od 1. 10. 2012 do 30. 4. 2013 získáno 28 kmenů (2 pacienti byli z důvodů prodloužené hospitalizace odebráni dvakrát), 6 kmenů pocházelo od pacientů indikovaných k vyšetření mimo Nemocnici na Bulovce v rámci standardní diagnostické činnosti NRL a z toho 2 kmeny byly získány post mortem od pacientů s perakutním průběhem chřipky vedoucím k exitu (tab. 1). Při příjmu byl u nemocných rutinně odebrán ster z nosohltanu a z obou nosních průduchů, který byl následně použit pro účely molekulární detekce a typizace a rovněž pro izolační pokus na tkáňových kulturách MDCK. Molekulární detekce a typizace byla provedena s využitím metody RT-qPCR (Center for Disease Control, Atlanta, USA). Kmeny A/H1N1<sub>pdm</sub> byly izolovány v buněčném systému MDCK SIAT-1[2]. Získané izoláty byly podrobeny parciálnímu nebo celogenovému sekvenování a fylogenetické analýze. Sekvenování proběhlo na přístroji GA 3130 (Life Technologies) za použití selektovaných oligonukleotidů z naší knihovny primerů pokrývajících všechny segmenty viru chřipky A (sekvence použitých primerů jsou dostupné na základě vyžádání). Editace, sestava a kvalitativní analýza sekvencí se uskutečnila pomocí programů SeqScape (Life Technologies) a BioEdit [3] a získané sekvence se následně srovnaly s využitím MAFFT analýzy [4]. Dále se stanovil stupeň sekvencí identity všech segmentů na nukleotidové i aminokyselinové úrovni ve formě tzv. „sequence difference count“ (SDC) matrice [3]. Fylogenetická analýza pro každý segment byla provedena s využitím Neighbour-Joining nebo Maximum Likelihood aplikací programu PHILIP [5] - obr. 1.

Dendrogramy se graficky upravily s využitím TreeExplorer aplikace programu MEGA 4 [6]. Reprezentativní sekvence byly zadané do databáze GenBank.

**VÝSLEDKY**

V naší studii bylo analyzováno 34 izolátů viru A/H1N1<sub>pdm</sub> pocházejících od 32 pacientů ve věku 4-78 let, průměr i medián věku byl 42 let. Důvodem přijetí k hospitalizaci byl závažnější obraz infekce se schváceností, dušností, protrahovaným kašlem a horečkou nebo komorbiditami. Třináct pacientů bylo léčeno oseltamivirem, šest pacientů bylo přijato na JIP a u patnácti pacientů došlo k rozvoji pneumonie a respiračního selhávání. Šest pacientů infekci podlehl, z toho ve dvou případech se jednalo o perakutní průběh infekce.

Fylogenetická analýza molekuly H1, provedena na základě reprezentativních sekvencí databáze GISAID [7] naznačila příslušnost všech 34 A/H1N1<sub>pdm</sub> izolátů reprezentujících sezónu 2012/2013 v ČR do H1 skupiny 6 [8]. Studium fylogenetických vztahů dále naznačilo, že v rámci skupiny 6 jsou naše kmeny separované do dvou jasně rozlišitelných sublinií. První sublinií, s označením 6A, tvořil jediný kmen s číslem 140, kdežto zbylých 33 kmenů bylo uniformně začleněných do druhé sublinie 6B. Pozorované fylogenetické vztahy H1 segmentů se na nukleotidové úrovni projeví relativně výrazně. Konstrukce SDC matrice ukázala rozdíly mezi subliniemi 6A a 6B ve 23-29 pozicích na 1635 nukleotidů (1,41-1,77%), zatímco v rámci sublinie 6B byl stupeň nukleotidové identity relativně vysoký: 0-11/1635 ( $\leq 0,67\%$ ). Na aminokyselinové úrovni byly rozdíly méně výrazné, a to 7-12/536 (1,31-2,24%) mezi subliniemi 6A a 6B a 0-7/536 ( $\leq 1,31\%$ ) v rámci sublinie B (tab. 2). Porovnání H1 segmentu studovaných kmenů s vakcinačním kmenem A/California/7/2009(H1N1) odhalilo 12/536 (2,24%) aminokyselinových rozdílů u sublinie 6A a 11-13/536 (2,05-2,43%) u sublinie 6B (tab. 2). Mapování rozdílů do známých antigenních oblastí ukázalo dvě stabilní změny oproti aktuálnímu vakcinačnímu kmenu, a to v antigenních oblastech (H3 číslování): Sb (S188T) a Ca1 (S206T). Mutace v těchto antigenních pozicích jsou obecně známé a byly uniformně přítomny u všech analyzovaných kmenů A/H1N1<sub>pdm</sub>. Vedle stabilních rozdílů se dále identifikovaly sporadické mutace spadající do antigenní oblasti Ca2 (6A a 2 kmeny sublinie 6B) a Sb a Cb (po jednom kmeni sublinie 6B). Stanovení sekvencí variability u zbývajících genomových segmentů ve formě fylogenetických vztahů a SDC matrice (neuvečeno) dále naznačilo, že se dichotomie analyzovaných A/H1N1<sub>pdm</sub> kmenů, pozorovaná na úrovni molekuly H1, zachovává. V rámci H1 sublinie 6B byla pozorována vysoká sekvencí identity s hodnotami nukleotidové a aminokyselinové variability v rozmezí 0,3-1,12%, respektive 0,40-1,37% s nejméně výraznějšími rozdíly u segmentů kódujících protein NS1 a N1. Naopak, A/H1N1<sub>pdm</sub> kmen 140 se od zbylých kmenů odlišoval ve všech segmentech relativně výrazně. Na úrovni

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

Tabulka 1. Základní charakteristika vyšetřovaných pacientů

Table 1. Patient characteristics

Číslo kmene	Ročník pacienta	Pohlaví	Intenzivní péče	Antivirotika	Důvod hospitalizace	Komplikace	Kód diagnózy	Výsledek
140/12	1980	F	ne	ne	schvácenost	0	R509	úzdava
183/12	1974	F	ne	ne	neuveveno	neuveveno	J209	neuveveno
184/12	1973	M	ne	ne	neuveveno	pneumonie	J189	neuveveno
185/13	1954	F	ne	ne	schvácenost	0	B348	úzdava
186/13	1935	F	ne	ne	polymorbidita, celkové zhoršení	0	B348	úzdava
187/13	1990	F	ne	ne	komorbidita	0	B349	úzdava
188/13	1969	M	ne	ne	schvácenost	0	R509	úzdava
189/13	1969	M	ne	ne	schvácenost	0	R509	úzdava
190/13	1988	M	ne	ne	schvácenost, neurosymptomy	0	J069	úzdava
191/13	1986	M	ne	ne	imunokompromis	0	B207	úzdava
192/13	1986	M	ne	ne	imunokompromis	0	B207	úzdava
193/13	1958	M	ne	ne	dušnost, neurosymptomy	encefalopatie	J111	úzdava
194/13	1969	F	ne	ne	doporučení praktického lékaře	0	J111	úzdava
195/13	1938	M	JIP	ANO	komorbidita	pneumonie, kardiální selhání	A419	úmrť
196/13	1968	M	ne	ne	neuveveno	respirační selhání	J960	úmrť
199/13	1940	F	ne	ANO	porucha vědomí	pneumonie, encefalopatie	J111	úzdava
201/13	1990	F	ne	ne	sociální důvody	0	B349	úzdava
202/13	1964	M	ne	ANO	schvácenost, vysoké CRP	pneumonie	J111	úzdava
203/13	1987	F	ne	ne	schvácenost, vysoké CRP	0	R509	úzdava
204/13	1968	M	ne	ANO	kolaps	0	J189	úzdava
206/13	1990	F	JIP	ANO	těžké neurologické postižení	respirační insuficience, edém mozku	J209	úmrť
207/13	1951	M	JIP	ANO	dušnost	pneumonie, respirační insuficience	J189	úzdava
208/13	1950	M	ne	ANO	dušnost	pneumonie, kardiální dekompenzace	R509	úzdava
209/13	2009	F	ne	ne	febrilní křeče	pneumonie, febrilní křeče	R509	úzdava
210/13	2007	M	ne	ne	hyperpyrexie	myositida	R509	úzdava
211/13	1973	M	JIP	ANO	schvácenost, dušnost	pneumonie, respirační insuficience	J189	úzdava
212/13	1959	M	JIP	ANO	dušnost	pneumonie	J100	úzdava
213/13	1965	M	JIP	ANO	imunokompromis, dušnost	pneumonie, respirační selhání	B207	úmrť
214/13	1960	M	ne	ANO	protrahovaný kašel	pneumonie	R509	úzdava
215/13	1973	M	ne	ne	neuveveno	respirační selhání	J111	úmrť
30/13	1982	F	ne	ANO	neuveveno	neuveveno	J189	neuveveno
31/13	1951	M	JIP	ANO	polymorbidita, dušnost	kardiální a respirační selhání	R509	úmrť
93/13	1993	M	ne	ne	schvácenost	0	B348	úzdava
94/12	1979	F	ne	ne	neuveveno	neuveveno	A419	neuveveno

JIP - jednotka intenzivní péče

nukleotidů a aminokyselin byly v porovnání se sublinií B rozdílů v rozmezí 1,13–2,42 % a 0,53–3,09 %, a to hlavně v proteinech N1, M2 a NS1 (viz tab. 2).

Analýza přítomnosti a distribuce molekulárních markerů majících vztah k patogenitě a rezistenci na antivirotika odhalila, že všechny kmene až na kmen 207 se vyznačují citlivostí na inhibitory neuraminidáz. U kmene 207 byly identifikovány dvě koexistující N1 varianty lišící se v pozici 275, která je nejvýznamnější v rezistenci na inhibitory neuraminidáz. To naznačuje, že u kmene 207 byly přítomny dvě N1 subpopulace, a to senzitivní H275 a rezistentní H275Y v přibližně ekvimolárním poměru. Další molekulární znaky byly shledány jako nevýznamné.

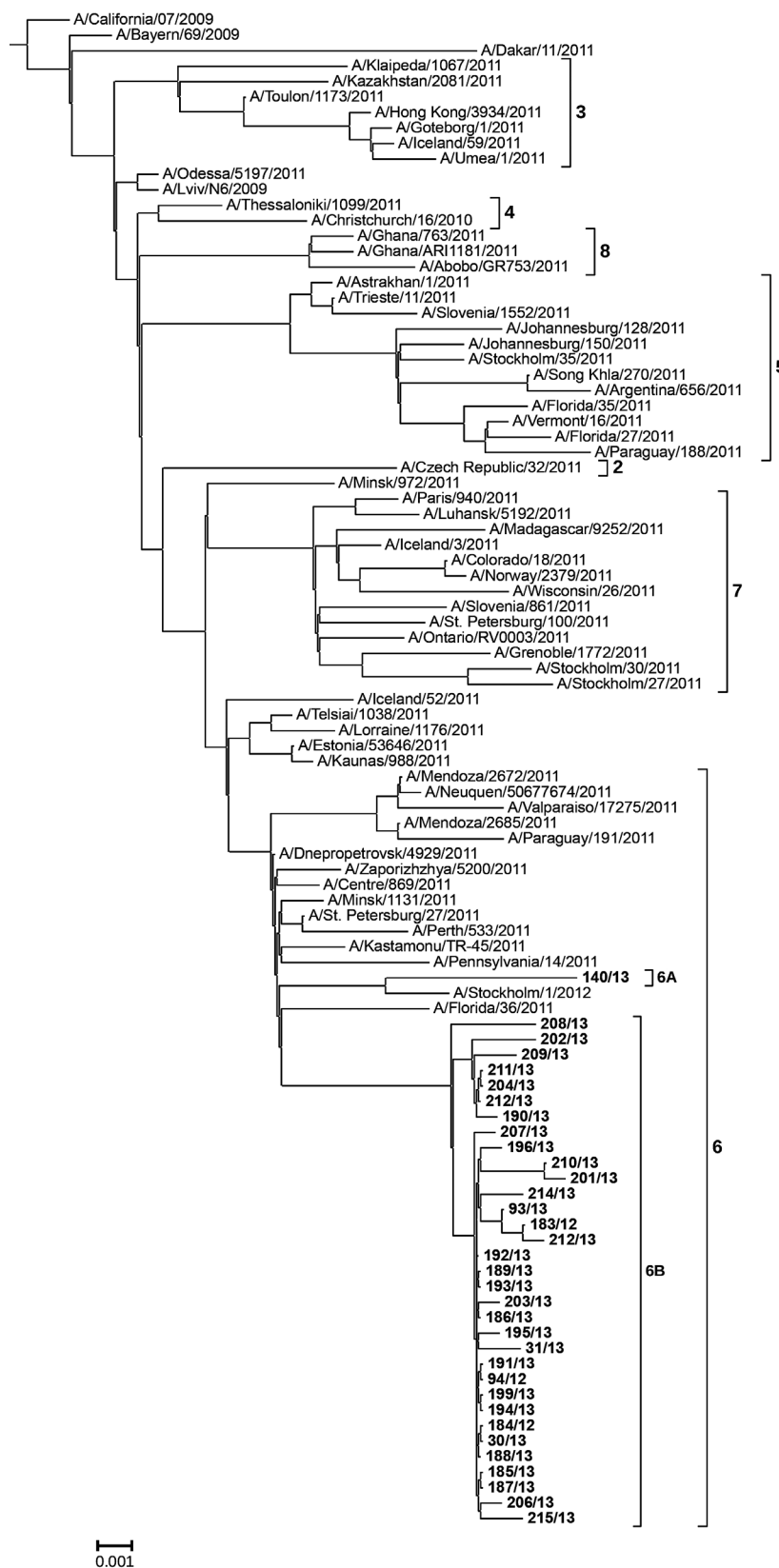
Vedle indikátorů rezistencí a patogenity se všechny analyzované kmene vyznačovaly uniformní přítomností typických A/H1N1<sub>pdm</sub> znaků, a to M2 mutace S31N a I43T a uzavřeným čtecím rámcem pro protein PB1F2. Mutace S31N v protonovém kanálu M2, indikující rezistenci na adamantanové blokátory, je charakteristickým znakem pandemické chřipky a kořeny této mutace sahají až k tzv. „Eurasian avian-like“ H1N1 vi-

rům jako jedním z prekursorů A/H1N1<sub>pdm</sub> [9]. Čtecí rámeček pro protein PB1-F2 je přerušen třemi stop kodony, proto se tento protein v analyzovaných kmenech neexprimuje. Dalším znakem pandemické chřipky je M2 mutace I43T. Ačkoliv není tato mutace spojována s patogenním fenotypem, představuje znak, kterým se A/H1N1<sub>pdm</sub> odlišuje od jiných subtypů a linií chřipky A jako sezonní H1N1, H5N1 apod. [9]. Z toho pohledu stojí za pozornost, že kmen 140 (jediný kmen H1 sublinie 6A) se v této pozici odlišuje, a to M2 aminokyselinovou mutací T43A.

## DISKUSE A ZÁVĚR

Výsledky našich analýz prokázaly, že A/H1N1<sub>pdm</sub> kmene reprezentující chřipkovou sezonu 2012/2013 v ČR tvořily antigenně jednotnou skupinu. Na základě klasifikace ECDC patřil hlavní povrchový antigen H1 do skupiny 6, která spolu se skupinami 5 a 7 tvořila nejčastěji detekované H1 varianty v Evropě v předcházející sezoně 2011/2012 [8]. V rámci skupiny 6 bylo možné mezi analyzovanými kmeny identifikovat dvě subli-

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY



nie. Aminokyselinové pozice ve všech epitopech molekuly H1 se vyznačovaly vysokou identitou s vakcinačním kmenem A/California/7/2009 (H1N1), což naznačuje dostatečnou protektivitu aktuální vakcíny. To dokazují i séra pacientů testovaná za stejné epidemické období (data neuvěděna).

Parciální nebo kompletní sekvenování jednotlivých genomových segmentů odhalilo, že se rozdíly mezi H1 subliniemi projeví na úrovni celého genomu, což umožnilo rozdělit A/H1N1<sub>pdm</sub> kmény do dvou příbuzných genotypů. První genotyp tvořil jediný kmen 140, zatímco všechny zbývající genomy spadaly do genotypu 2. Kmen 140 byl na nukleotidové úrovni jasně rozlišitelný, a to u všech segmentů s variabilitou 2–4krát vyšší, nežli byla pozorována v rámci genotypu 2. To indikuje odlišný evoluční původ. Kmen 140 byl izolován z výtěru dospělé pacientky již v polovině listopadu 2012, proto lze předpokládat i jistou odlišnost od A/H1N1<sub>pdm</sub> kmenů, které následně predominovaly v roce 2013. Pacientka neuváděla pozitivní cestovní anamnézu ani jiné epidemiologické souvislosti. Na aminokyselinové úrovni byly rozdíly mezi kmény méně výrazné. Z uvedeného plyne, že A/H1N1<sub>pdm</sub> kmény reprezentující chřipkovou sezonu 2012/2013 v ČR patří i fenotypově do jednotné skupiny.

Analýza přítomnosti a distribuce mutací podmiňujících rezistenci na antivirotika identifikovala, že všechny studované kmény si zachovaly citlivost na inhibitory neuraminidáz. Z tohoto pohledu byl nejzajímavější kmen 207, který se vyznačoval senzitivní i rezistentní variantou neuraminidázy N1. Kmen 207 byl získán od pacienta s bilaterální pneumonií, který byl indikován k virologickému vyšetření až pátý den léčby oseltamivirem, což mohlo vytvořit dostatečný prostor pro selekci rezistentní N1 subpopulace. Pacient se uzdravil.

Dopad a charakter chřipkových epidemií a průběh infekcí v dané epidemické sezoně není v mnoha ohledech předvídatelný a četné souvislosti doposud nejsou plně probádány. Průběh infekce chřipkovým virem může být u člověka velmi variabilní – od téměř asymptomatických průběhů až po kritické, život ohrožující stavy.

**Obr. 1.** Fylogenetická analýza molekuly hemagglutininu H1

Strom byl sestaven metodou Maximum Likelihood (100 replikací) na základě reprezentativních H1 sekvencí z roku 2011 získaných z databáze GISAID [7] a vztážen k vakcinačnímu kmenu A/California/7/2009(H1N1). Pro přehlednost jsou analyzované viry uvedeny pod kmenovým číslem a zvýrazněné tučně.

**Fig. 1.** Phylogenetic analysis of the hemagglutinin molecule H1  
The tree was generated using the maximum likelihood method (100 replications) on the basis of representative H1 sequences 2011 obtained from the GISAID database [7] and related to the vaccine strain A/California/7/2009(H1N1). Viruses are shown under strain numbers in bold.

## SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

**Tabulka 2.** Sekvenční rozdíly u analyzovaných kmenů viru chřipky A/H1N1<sub>pdm</sub> reprezentujících sezonu 2012–2013 v České republice na nukleotidové a aminokyselinové úrovni v absolutních a procentních hodnotách**Table 2.** Sequence differences in A/H1N1<sub>pdm</sub> influenza virus strains from the 2012/2013 season isolated in the Czech Republic at the nucleotide and amino acid levels expressed in absolute values and percentages

		Segment							
		PB2	PB1	PA	H1	NP	N1	MP	NS
6B	Variabilita (nt)	12/2181 (0,55%)	7/2309 (0,30%)	12/2141 (0,56%)	11/1635 (0,67%)	12/1570 (0,76%)	11/1412 (0,78%)	MP 5/973 (0,51%) M1 5/759 (0,66%) M2 1/293 (0,34%)	NS 6/754 (0,80%) NS1 4/660 (0,61%) NS2 4/357 (1,12%)
	Variabilita (amk)	3/722 (0,42%)	4/757 (0,53%)	4/699 (0,57%)	7/536 (1,31%)	2/504 (0,40%)	6/467 (1,29%)	M1 3/282 (1,06%) M2 1/97 (1,03%)	NS1 3/219 (1,37%) NS2 1/119 (0,84%)
6A	Variabilita (nt)	36/2181 (1,65%)	29/2309 (1,26%)	41/2141 (1,92%)	29/1635 (1,77%)	30/1570 (1,91%)	24/1412 (1,70%)	MP 11/973 (1,13%) M1 9/759 (1,19%) M2 4/293 (1,37%)	NS 14/754 (1,86%) NS1 16/660 (2,42%) NS2 5/357 (1,40%)
	Variabilita (amk)	10/722 (1,39%)	4/757 (0,53%)	10/699 (1,43%)	12/536 (2,24%)	3/504 (0,60%)	12/467 (2,57%)	M1 3/282 (1,06%) M2 3/97 (3,09%)	NS1 4/219 (1,83%) NS2 1/119 (0,84%)

Každý segment kóduje jeden protein segment PB1, MP a NS jsou bicistronické.

nt – nukleotidy, amk – aminokyseliny

Pro sublinii 6A jsou uvedeny maximální hodnoty sekvenční variability. Pro sublinii 6B jsou uvedeny maximální rozdíly vzhledem ke kmenům sublinie 6A.

Each RNA segment encodes one protein. PB1, MP, and NS segments are bicistronic.

nt-nucleotides, ama-amino acids. For sublineage 6A, the maximum sequence variability values are given. For sublineage 6B, the maximum differences from sublineage 6A are shown.

Vždy záleží na vzájemné interakci viru a jeho popřípadě specifických mutací s imunitním systémem hostitele. I z tohoto důvodu se izoláty de facto výrazně nelišily u nekomplikovaných a fatálních průběhů infekce. Introdukce nového subtypu A/H1N1<sub>pdm</sub> v roce 2009 s sebou přinesla prakticky úplně vytěsňující původní varianty A/H1N1 a v současnosti virus A/H1N1<sub>pdm</sub> ko-cirkuluje v lidské populaci spolu s A/H3N2. Oba subtypy vyvolávají sezónní epidemie se střídavou dominancí. Z tohoto pohledu je zajímavé, že H3N2 i H1N1<sub>pdm</sub> viry v lidské populaci evolují jako diskretní paralelní linie bez stabilního H3N2-H1N1<sub>pdm</sub> „intersubtype reassortment“. Nicméně, genetický reassortment A/H1N1<sub>pdm</sub> virů s prasečími viry chřipky A jsou popisovány neustále, a to i na evropském kontinentu [10]. Diverzifikace A/H1N1<sub>pdm</sub> kmenů jejich křížením s prasečími viry a zpětná introdukce nových variant do lidské populace proto představuje zvýšené zdravotní riziko. Kromě toho A/H1N1<sub>pdm</sub> má relativně vysokou afinitu k epiteliálním buňkám dolních cest dýchacích, což představuje jeden z důvodů těžších průběhů chřipky tak, jak byly registrovány během uplynulé sezony [1].

Vzhledem ke klinické i epidemiologické závažnosti chřipky i genetické nestabilitě chřipkových virů je sledování molekulárněbiologických vlastností tohoto mnohotvárného patogenu naprostou nezbytností.

## Literatura

- Kyncil J, Havlickova M, Nagy A, Jirincova H, Piskova I. Early and unexpected severe start of influenza epidemic in the Czech Republic during influenza season 2012–13. *Euro Surveill*, 2013;18(6):pii 20396.
- Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza [online]. Geneva: World Health Organization, 2011 [cit. 2012-12-18]. ISBN: 9789241548090. Dostupné na [www: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf)
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 1999;41:95–98.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*; 2002;30(14):3059–3066.

5. Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6. Distributed by the Author. Department of Genome Sciences [online]. Seattle: University of Washington, 2004 [cit. 2012-12-18]. Dostupné na [www: http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html](http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html).

6. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007;24(8):1596–1599.

7. EPIFLU™ database [online]. GISAID. The Global Initiative on Sharing All Influenza Data, 2011 [cit. 2014-12-18]. Dostupné na [www: http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#4efb5b](http://platform.gisaid.org/epi3/frontend#4efb5b).

8. Influenza virus characterisation. Summary Europe, February 2012. Technical document [online]. Stockholm: ECDC, 2012 [cit. 2012-12-18]. Dostupné na [www: http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1203\\_ted\\_cnrl\\_report\\_feb2011.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/1203_ted_cnrl_report_feb2011.pdf)

9. Deyde VM, Sheu TG, Trujillo AA, Okomo-Adhiambo M, Garten R, Klimov AI, Gubareva LV. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses by pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010;54(3):1102–1110.

10. Howard WA, Essen SC, Strugnell BW, Russell C, Barrass L, Reid SM, Brown IH. Reassortant pandemic (H1N1) 2009 virus in pigs, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 2011;17(6):1049–1052.

Tato práce vznikla za podpory grantu IGA MZ ČR 12493-3: Virologická a genetická charakteristika viru chřipky A ve vztahu ke klinické závažnosti infekce a projektu Ministerstva zdravotnictví ČR číslo 34/13/NAP. Děkujeme všem členům nemocničního i laboratorního personálu podílejícím se na odběru a zpracování vzorků. Děkujeme také všem přispívatelům do databázi GISAID a IVSD.

Do redakce došlo dne 20. 12. 2013.

Adresa pro korespondenci:

**RNDr. Alexander Nagy, Ph.D.**

Státní veterinární ústav Praha  
Sídlištní 136/24  
165 03 Praha 6  
e-mail: alexandernagy17@hotmail.com