

ДИАГНОСТИЧНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ ЗА ГРИП И ОСТРИ РЕСПИРАТОРНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ ПРЕЗ СЕЗОН 2008/2009 Г.

С. Павлова, Т. Хаджиолова и Р. Коцева

Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ”, Отдел „Вирусология”,
Национален център по заразни и паразитни болести

Резюме. Обобщени са резултатите от проведените диагностични изследвания на проби от пациенти с грипоподобна симптоматика, постъпили в лабораторията по „Грип и ОРЗ”, НЦЗПБ, през сезона 2008/2009 г. Всички проби (860 броя) са изследвани с цел изолация на грипни вируси. Комплексно с rRT-PCR за грипни вируси и RT-PCR за RSV и hMPV са изследвани 371 деца до 5-годишна възраст. Допълнително с rRT-PCR за грипни вируси са изследвани 311 сентинелни проби, получени чрез РИОКОЗ. На фона на слабо доказване на грипните вируси (33 детекции от 860 проби), относително висок е броят на положителните проби за RSV и hMPV. Разшифрована е смесената етиология на два взрива от Дом „Майка и дете”, с причинители RSV, AdV и hMPV.

Ключови думи: сезон 2008/2009, грипни вируси, вируси на ОРЗ, диагностика

S. Pavlova, T. Hadzhiolova and R. Kotseva. INFLUENZA AND ACUTE RESPIRATORY DISEASES DIAGNOSTIC INVESTIGATIONS DURING THE 2008/2009 SEASON

Summary. The summary of the diagnostic investigations performed in the Laboratory of Influenza and ARD, NCIPD, during the 2008/2009 season is presented. All of the samples (n = 860) were tested for influenza virus isolation on cell culture/chicken embryos. Molecular-biology tests: Real-time reverse transcription PCR (rRT-PCR) for influenza and RT-PCR for respiratory syncytial virus (RSV) and human metapneumonia virus (hMPV) were used for testing of 371 samples obtained from children up to five years of age. In addition, 311 sentinel samples from Regional Inspectorates were tested by rRT-PCR. Given the small number (33 of 860 samples) of the cases of the positive detection of influenza viruses, we found that the number of positive for RSV and hMPV samples was relatively high. The coinfection due to RSV, AdV and hMPV in two outbreaks in orphanages was deciphered.

Key words: the 2008/2009 season, flu viruses, acute respiratory diseases viruses, diagnosis

Острите респираторни заболявания (ОРЗ) са всеобщо разпространени както сред възрастните, така и сред децата и са водещ причинител на заболяемостта, хоспитализациите и смъртността в света. По-голяма част от респираторните инфекции имат вирусна етиология, сезонен характер (есенно-зимните и зимно-пролетните месеци на годината) и обикновено протичат взривообразно. Бактериите участват най-често като вторични причинители. Независимо от голямото разнообразие от вируси, причинители на ОРЗ (повече от 200), водещи етиологични причинители на заболявания на дихателната система са грипните вируси (тип А и В), респираторно-синцитиалният вирус (RSV), парагрипните вируси, аденовирусите (AdV), коронавирусите и др. В допълнение към известните досега вируси през последните години са идентифицирани и нови причинители на остри респираторни

заболявания, особено при деца – човешки метапневмовирус (hMPV-2001), нови корона-вируси (NL63-2003, HKU1-2005), бокавирус (hBOV-2005), нови полиомни вируси (KI 2007, WU-2007, MCPyV-2008) и др. [1, 2, 11]. Необходимо е да се подчертае и ролята на двата нови подтипа на грипните вируси с пандемичен потенциал – птичия грипен вирус, подтип А(H5N1) – 1997, и циркулиращия от края на април 2009 г. подтип А(H1N1)v [13, 17].

Важно е да се подчертае, че значителен брой респираторни вируси могат да причинят един клиничен синдром и обратно, един патоген може да има широк спектър от клинични заболявания [12]. Въз основа само на клиничните белези е трудно да се определи причинителят на заболяването, поради което доказването му е само по лабораторен път. Обикновено грипните вируси предизвикват заболявания с много тежка клинична

картина. Клинично тежко е и протичането на респираторни инфекции при малки деца (до 5-годишна възраст) с етиологични причинители RSV, парагрипни вируси, AdV.

Във връзка с диагностичния сървейланс на грипните вируси в Националната лаборатория „Грип и ОРЗ“ – Национален център по заразни и паразитни болести (НЦЗПБ), регулярно постъпват за диагностични изследвания през епидемичните за грипа сезони сентинелни и несентинелни проби (главно от хоспитализирани лица). Лабораторията от дълги години е поела ангажимент за уточняване етиологията на заболявания от ОРЗ и сред колективи в домове за деца, лишени от родителски грижи (ДМД). Ново направление при тези диагностични изследвания е детекцията на причинителите чрез приложение на новите молекулярно-биологични методи, паралелно с класическия метод на вирусна изолация.

Цел на изследването е да се обобщят резултатите от проведените диагностични изследвания за грип и ОРЗ, извършени в Националната референтна лаборатория по грип за последния епидемичен сезон (2008/2009). Представени са данни от диагностичните изследвания до края на месец април 2009 г. до появата на новия пандемичен грипен вирус А(Н1N1)v.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Използвани са носогърлени секрети от пациенти, взети в ранния стадий – до 5-ия ден от началото на заболяването. Материалите са получени в Лабораторията чрез организирано пробонабиране от РИОКОЗ, осъществявано във връзка със сървейланса на грипа, както и чрез събиране на материали от болнични заведения на територията на София. Носогърлените секрети на деца до 5-годишна възраст са изследвани комплексно за грипни вируси и вируси на ОРЗ – RSV, hMPV, AdV, докато останалите проби са изследвани само за сезонните грипни вируси.

За изолацията на грипните вируси са използвани два биологични модела (кокоши ем-

бриони и клетъчна култура MDCK), а за вирусите на ОРЗ – клетъчна линия HEP-2 [6].

Идентификацията на изолираните щамове на грипните вируси е извършвана по рутинна методика – реакция за задръжка на хемаглутинацията (РЗХА) [6].

Екстракцията на нуклеиновите киселини от носогърлените секрети и клетъчно-културните среди (при изследване за AdV) е извършвана с кит QIAamp®Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) съгласно инструкциите на производителя [6].

Real Time RT-PCR (rRT-PCR) за детекция на грипни вируси тип А и В е проведена с праймери и сонди от CDC, Atlanta, USA [5].

RT-PCR е изпълнен с праймери към N-гена на RSV и М-гена на hMPV [8, 10], а конвенционалният PCR за аденовируси AdV – с праймери към хексон антигена [3].

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Като част от световната диагностична мрежа на СЗО за сървейланс на грипа Националната референтна лаборатория “Грип и ОРЗ” поставя диагностичното доказване на грипа сред приоритетните си задачи. С приемането на България през 2007 г. за член на EISS (European Influenza Surveillance Scheme), преминала към настоящия момент в ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), данните от вирусологичния сървейланс на грипа се съобщават ежеседмично, с цел обобщаването им за европейския регион. Паралелно с вирусологичните данни за грипа от EISS и ECDC се акцентира и върху данните от проведените диагностични изследвания за RSV, което ни даде основание да включим изследванията за този вирус като рутинни в лабораторията. Тъй като разпространението на RSV е най-голямо сред деца до 5-годишна възраст, изследването бе проведено предимно в тази възрастова група. В отговор на желанието да разширим диагностичната дейност през последния сезон, споменатата таргетна група бе паралелно тествана за hMPV, а избрани случаи – и за AdV.

През сезона 2008/2009 г. в лабораторията за вирусологично изследване са постъпили 860 проби от пациенти с грипоподобна симптоматика (табл. 1). Всички проби са изследвани в клетъчни култури – MDCK и/или кокоши емриони, с цел изолация на грипни вируси. От посочените 860 проби 371 са на деца до 5-годишна възраст – изследвани комплексно с

rRT-PCR за грипни вируси и RT-PCR за RSV и hMPV. Допълнително, с rRT-PCR са изследвани 311 сентинелни проби, получени чрез РИОКОЗ. Всички проби на деца до 5 години са култивирани на клетъчна линия HEp-2 за изолане и на вируси на OP3. В изследваната таргетна група са включени и два взрива от Дом „Майка и дете” в София (табл. 2).

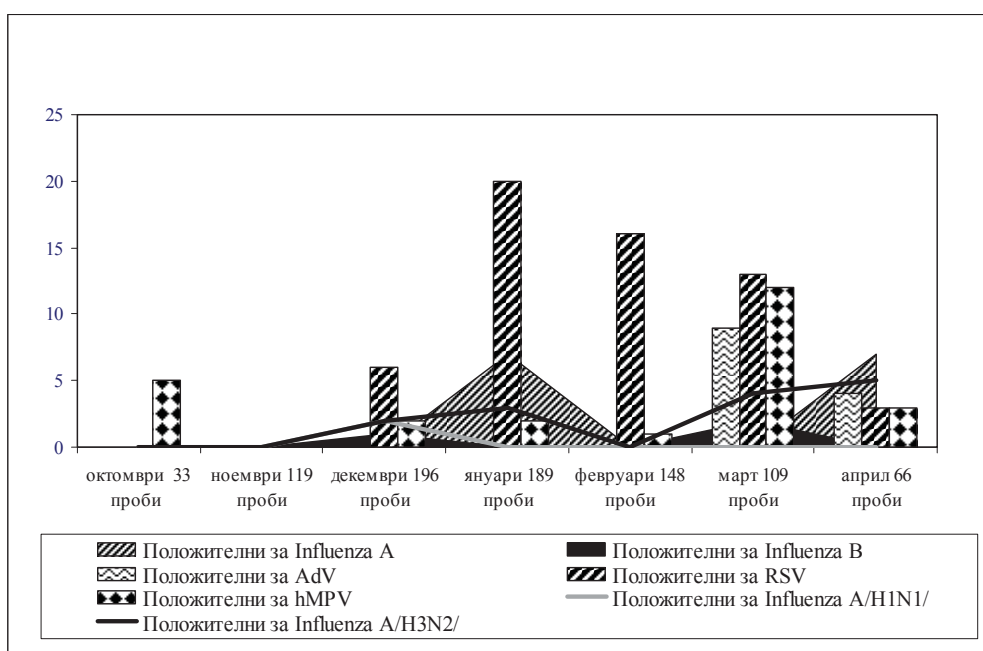
Таблица 1. Разпределение на постъпилите и изследвани в Лабораторията проби според приложените диагностични тестове

Постъпили за изследване проби (общ брой)	Изолация на вирусите (от общия брой)		Изследвани с PCR (от общия брой)	
	MDCK/KE	HEp-2	rRT-PCR за грипни вируси	RT-PCR за RSV и hMPV
860	860	371	682*	371

*В посочената бройка са включени 371 проби на деца до 5 год., които са изследвани комплексно за грипни вируси, RSV и hMPV

Таблица 2. Данни за вирусологични изследвания на деца до 5-годишна възраст – разпределение по здравни заведения

Здравно заведение	Брой	Положителни чрез rRT-PCR или RT-PCR за:			Брой изолирани вируси
		грипни вируси	RSV	hMPV	
Втора МБАЛ София	241	16 (6,6%)	47 (19,5%)	18 (7,4%)	2 RSV 3 AdV 5 A/H3N2/
РИОКОЗ	98	2 (2%)	4 (4%)	1 (1%)	0
ДМД	32	0	7 (21,8%)	6 (18,8%)	10 AdV
Общо	371	18 (4,9%)	58 (15,6%)	25 (6,7%)	



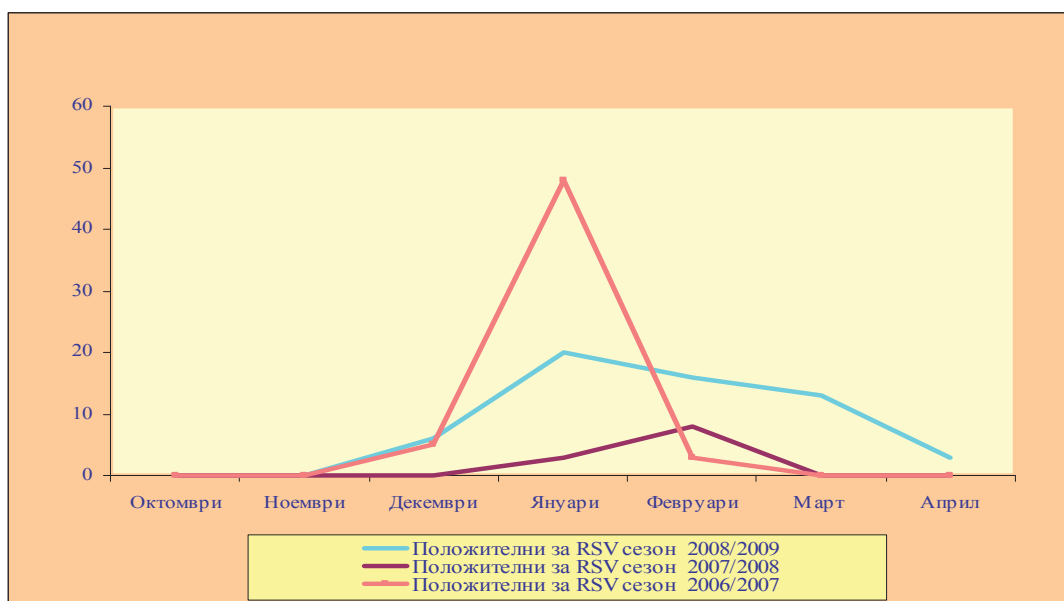
Фиг. 1. Брой детекции на вируси на грипа и ОРЗ, разпределени по месеци за сезона 2008/2009 г.

По данни на СЗО между месеците септември 2008 г. и януари 2009 г. повишена грипна активност е регистрирана в Африка, Америка, Азия, Европа и Океания. Като цяло активността на грипа през този сезон е слаба, сравнена с активността за същия период на предишната година. В Северното полукълбо са регистрирани регионални взривове (Япония, Тунис и някои европейски страни), през месеците декември и януари, с причинител грипен вирус подтип А(Н3N2). В повечето европейски страни за последния епидемичен сезон се наблюдава коциркуляция на подтиповете А(Н1N1), А(Н3N2) и тип В [16]. Разпространението на грипната вълна в Европа през последния сезон е с подчертана прогресия от запад към изток. През 22-ата седмица (22/2009) сезонната грипна активност в Европа приключва, като повечето вирусни детекции са направени между седмиците 48/2008 и 15/2009. През този сезон доминантният подтип на грипните вируси е А(Н3N2) с пик през 5-ата седмица, последван от втора, по-малка вълна от грипен вирус тип В през 11-ата седмица. В Европа от 31 234 вирусни детекции 83% са тип А, разпределени, както следва – 37% подтип Н3, 4,5% подтип Н1 и 41% А несубтипирани. Повечето от вирусните изолати А(Н3N2) са типирани като А/Brisbane/10/2007(Н3N2)-подобен [14].

На фиг. 1 е показано графично изображение на разпределението на положителните детекции в Лаборатория „Грип и ОРЗ“ за сезона 2008/2009 г. По лабораторни данни за последния епидемичен сезон в България коциркулират три подтипа на грипните вируси – А(Н1N1), А(Н3N2) и В, което съвпада с литературните данни за същия период от време [14, 15]. Разпространението на положителните за грип проби е двувълново, с два пика, първи – през месец януари, и последващ – в края на март и началото на април. Относително слабо е разпространението на грипните вируси през изследвания сезон. За посочения период са доказани общо 30 положителни проби за грип тип А и 3 – за тип В.

Положителните за грип А детекции са разпределени, както следва: 2 – А/Н1, 14 – А/Н3, и 14 – А положителни, но е невъзможно да бъдат субтипирани с наличните праймери. Получените данни корелират със сведенията за по-слабото разпространение на грипната вълна в Европа [14]. За посочения период в лабораторията на клетъчна култура MDCK и последващо култивиране на кокоши ембриони са изолирани 5 (0,6%) щамове на грипните вируси, идентифицирани по Р3ХА като А/Brisbane/10/2007(Н3N2)-подобни. Всички щамове са от проби на деца до 5 години, дали положителен резултат с Real Time RT-PCR (rRT-PCR). Считаме, че ниският процент на вирусна изолация се дължи на слабия грипен сезон (само 33 положителни детекции), трудното култивиране на грипните вируси на MDCK и вариация хемаглутинационен титър.

Разпределението на положителните за RSV проби за проследявания сезон също показва вълнообразен характер, с пик през месец януари и плавно затихване през месеците февруари, март и април. За последния сезон (2008/2009) доказването на RSV е в по-голям процент от това на грипните вируси (15,6% спрямо 4,8%). За периода само два щамове на RSV са изолирани на клетъчна линия HEp-2. Слабата изолируемост, получена на фона на високия брой положителни детекции (58) вероятно се дължи на биологичните особености на вируса, което предстои да се уточни. Във връзка със слабото разпространение на грипните вируси за този сезон, относително висок е процентът на вирусите на ОРЗ, представени от RSV, hMPV и AdV. Сравнително представяне на кривите на положителните за RSV проби през последните три последователни сезона е представено на фиг. 2. Прави впечатление, че на фона на по-голямото епидемично разпространение на RSV през сезона 2006/2007 г. следват два, в които доказването на вируса е по-слабо, което съвпада и с резултатите на други автори за двугодишен цикъл на възникване на епидемичното разпространение на вируса [7, 9].



Фиг. 2. Сравнение на броя на положителните за RSV проби през три последователни сезона

От данните, посочени в табл. 2, се вижда, че от комплексното изследване на пробите на деца до 5-годишна възраст най-често откриваният етиологичен агент, причинител на респираторни заболявания сред посочената възрастова група, е RSV – 58 положителни проби (15,6%), следван от hMPV с 25 (6,7%) и грипните вируси – 18 положителни (4,8%).

Високият процент на положителни за RSV сред хоспитализираните деца вероятно се дължи на качеството на тестваните проби – събиране, извършено от специалист от Лабораторията, бързото транспортиране и изследване на пробите (термолабилност на RSV), а не на последно място – избор на подходяща таргетна група – деца с усложнения и клинична картина на бронхиолит. Считаме, че ниският процент (4%) на доказване на RSV в сентинелни проби, получени чрез РИОКОЗ, се дължи на биологичните особености на вируса, неговата термолабилност и неустойчивост в околната среда.

От фиг. 1 се вижда, че разпространението на hMPV за сезона 2008/2009 г. е сравнително равномерно, с детекции през целия сезон и леко увеличение през месец март. Откриването на вируса в пробите на хоспитализи-

рани деца до 5 години потвърждава ролята му като често срещан етиологичен агент на заболявания на дихателната система в тази възрастова група, клинично неразличими от причинените от RSV [12]. Изследванията за hMPV се извършват в Лаборатория „Грип и ОРЗ“ от началото на 2007 г.

Висок е процентът на доказване на вируси на ОРЗ сред деца в домове за деца, лишени от родителски грижи (ДМД). Организацията и структурата на ДМД у нас, разпределението на децата във възрастови групи, режимът на тяхното отглеждане (затворени колективи и помещения на пребиваване), са предразполагащи фактори за честото им боледуване от ОРЗ, предимно с вирусна етиология, протичащи най-често взривообразно. Приемаме, че заболяванията в посочените домове са епидемични взривове, базирайки се на литературни данни за регистриране на повече от 3 случая на респираторни заболявания в затворен колектив, при 7-дневен период [4]. Стремяхме се да докажем, че етиологичният причинител на заболяванията да бъде установено за кратък срок, което да позволи на отговорните лица в домовете да вземат необходимите противоепидемични мерки за бързо ограничаване на разпрост-

ранението им. За последния епидемичен сезон в Лабораторията са разшифровани етиологичните причинители на два взрива сред деца от ДМД (табл. 3). Системно изследване за AdV на всички проби не бе проведено, насочено бяха тествани само проби, показали положителен цитопатичен ефект на клътчна линия Нер-2 и негативни за RSV и hMPV. Прилаганият в лабораторията метод за детекция на AdV ДНК с използваните груповоспецифични праймери се оказва особено подходящ след предварителното умножаване на вирусите на клетъчни култури, тъй като директно в изходни носогърлени секрети бе с ограничено приложение поради ниския добив на аденовирусна ДНК.

Първият разшифрован взрив е през месец януари, със смесена етиология – шест проби, положителни за RSV и една за hMPV. В един от случаите бе регистрирана смесена инфекция – бяха доказани и двата вируса, без това да даде отражение на клиничното протичане на заболяването. Взривът съвпада по време с повишеното разпространение на RSV (фиг. 1). Вторият взрив бе регистриран през месец март, засягайки първоначално седем, а след 22 дни още пет деца от една и съща група. Въпреки продължителния инкубационен период, смятаме, че се касае за взрив с продължение, тъй като и в двата случая се доказват едни и същи етиологични агенти – AdV и hMPV. При четири от децата се касае за смесена инфекция.

Таблица 3. Данни от проучване за етиологията на взривове от ОРЗ сред деца на възраст до 5 г. от ДМД

	Дата	Диагноза	Брой деца в група	Брой изследвани проби	Брой положителни	
					Метод за доказване	
					PCR	Изоляция
ДМД „Света Параскева”	08.01.2009г.	ОРЗ bronхит фебрилитет	38	20	7 RSV 2 hMPV	0
ДМД „Света София”	04.03.2009г.	ОРЗ, фебрилитет, ринофарингит	15	7	7 AdV 3 hMPV	10 AdV
	26.03.2009г.			5	3 AdV 1 hMPV	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Националната референтна лаборатория „Грип и ОРЗ”, НЦЗПБ, с всяка изминала година прави усилия за разширяване на спектъра от диагностицирани респираторни вируси чрез използването на техниката PCR. Лабораторната диагностика на респираторните инфекции трябва да е комплексна поради широкия спектър на вирусни патогени, които могат да дават едни и същи клинични симптоми. Емпиричното третиране на пациентите с клинична картина на ОРЗ, без да съществува ясна етиологична диагностика, има за резултат липса на подходящи здравни мерки за ограничаване на

заболяванията. Това касае също мерките за специфична профилактика. Особено показателно за последното е възникналата ситуация с пандемичното разпространение на новия подтип на грипните вируси А(Н1N1)v, където бързото лабораторно потвърждение е от съществено значение за навременната специфична терапия на болелите.

Библиография

1. Ebihara, T. et al. Detection of human coronavirus NL63 in young children with bronchiolitis. – J. Med. Virol., **75**, 2005, 463-465.
2. Eun Hwa Choi, et al. The Association of Newly Identified Respiratory Viruses with Lower Respiratory

- Tract Infections in Korean Children, 2000-2005. – Clin. Infect. Dis., **43**, 2006, 585-592.
3. Grondall, B. et al. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single tube multiplex reverse transcription-PCR: Feasibility study. – J. Clin. Microbiol., **37**, 1999, 1-7.
 4. Guidelines for the Prevention and Control of Upper and Lower Acute Respiratory Illnesses (including Influenza and Pneumonia) in Long Term Care Facilities Community Health Administration Maryland Department of Health & Mental Hygiene 1999-2002.
 5. Hadzhiolova T. et al. Application of Real Time RT-PCR for laboratory diagnosis of influenza in clinical samples. Second congress of Virology, 2008, 144-150.
 6. Kotseva, R. et al. Contemporary Methods For Influenza Viral Diagnosis, Laboratory Guidelines, 2007.
 7. Mlinaric-Galinovic, G. et al. The biennial cycle of respiratory syncytial virus outbreaks in Croatia. – Virol. J., **5**, 2008, 18-23.
 8. Tecu, C. et al. First detection of human metapneumovirus in children with respiratory infections in Romania. – Romanian Arch. of Microbiol. Immunol., **3**, 2007, 12-15.
 9. Terletskaia-Ladwig, E. et al. Defining the timing of respiratory syncytial virus (RSV) outbreaks: an epidemiological study. – BMC Inf. Dis., **5**, 2005, 20-26.
 10. Valdivia, A. et al. Analysis of respiratory syncytial virus in clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction restriction mapping. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, **92**, 1997, 389-393.
 11. Van den Hoogen, B. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. – Nat. Med., **7**, 2001, 719-724.
 12. Wolf, D. et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. – Pediatr. Infect. Dis. J., **25**, 2006, 320-324.
 13. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/ Avian influenza
 14. http://www.euroflu.org/cgi-files/bulletin_v2.cgi EuroFlu Weekly Electronic Bulletin
 15. <http://grippe.ncipd.org/> Influenza and Acute Respiratory Infections Information System
 16. <http://www.who.int/wer> Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009-2010 northern hemisphere influenza season. Weekly epidemiological record 2008, No. 9, 2008, 83, 77-88.
 17. http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090425/en/ Swine influenza

Постъпила – 26.06.2012 г.

✉ *Адрес за кореспонденция:*
 Доц. д-р Р. Коцева, дм
 Национален център по заразни и паразитни болести
 бул. „Столетов“ 44 А
 1233 София
 e-mail: kotseva@ncipd.org