

ГРИПЕН СЕЗОН 2012/2013 Г. – ВИРУСОЛОГИЧНИ И ЕПИДЕМИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ

Н. Корсун¹, А. Теодосиева¹, М. Йорданова¹, А. Курчатова² и М. Кожухарова²

¹Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“, Отдел „Вирусология“,

²Отдел „Епидемиология и надзор на заразните болести“,
Национален център по заразни и паразитни болести – София

INFLUENZA SEASON 2012-2013 – VIROLOGY AND EPIDEMIOLOGY ASPECTS SUMMARY

N. Korsun¹, A. Teodosieva¹, M. Yordanova¹, A. Kurchatova² and M. Kozhucharova²

¹National Reference Laboratory of Influenza and Acute Respiratory Disorders, Department of Virology,

²Department of Epidemiology and Surveillance of Contagious Diseases,
National Center of Contagious and Parasitic Diseases – Sofia

Резюме. Целта е да се анализират особеностите на грипен сезон 2012/2013 г. в България и да се определят антигенните и генетичните характеристики на циркулиращите грипни вируси. През периода 40 седм./2012 г. – 21 седм./2013 г. за грипни вируси бяха изследвани 1125 назофарингеални смива от пациенти с грипоподобни заболявания или ОРЗ от различни региони на страната. Доказването и типирането/субтипирането на грипни вируси бяха извършвани чрез метода *Real Time RT-PCR* със специфични праймери и сонди. За изолация на грипни вируси бяха използвани клетъчните култури MDCK и MDCK-SIAT1. Антигенното характеризиране на изолатите бе извършвано с метода РЗХА. Извършен беше скрининг чрез *Real Time RT-PCR* на 59 пандемични A(H1N1)pdm09 вируса за откриване на точковата мутация H275Y, отговорна за резистентност към *Oseltamivir*. От изследваните 1125 клинични проби грипни вируси бяха доказани в 329 (29%). Установена бе коциркуляция на вируси A(H1N1)pdm09 (59/329, 18%), A(H3N2) (21/329, 6%) и тип В (250/329, 76%), като последните бяха доминиращи през повечето седмици на сезона. Антигенното характеризиране на вирусни изолати A(H1N1)pdm09, A(H3N2) и В показа при повечето случаи антигенно сходство с актуалните за сезона ваксинални вируси. Не бе установена мутацията H275Y, водеща до резистентност към *Oseltamivir* при пандемичните вируси. Представени са също редица епидемиологични и клинични особености на грипната епидемия през изминалия сезон. Установени бяха някои особености в биологичните свойства, епидемиологията и клиничната активност на грипните вируси, отговорни за изминалата грипна епидемия в България, които имат значение за формиране на политика за профилактика и контрол на сезонния грип.

Ключови думи: грипни вируси, антигенен анализ

Адрес за кореспонденция: проф. д-р Нели Корсун, дмн, Национална референтна лаборатория „Грип и ОРЗ“, Отдел „Вирусология“, Национален център по заразни и паразитни болести, бул. „Тен. Столетов“ 44А, 1233 София, тел. +359 2 931 81 32, e-mail: nelj_korsun@abv.bg

Summary. The aim of the study was to analyse the special features of influenza season 2012/2013 in Bulgaria and to determine the antigenic and genetic characteristics of circulating influenza viruses. During the period week 40/2012–week 21/2013, 1125 nasopharyngeal swabs from patients with influenza-like illness or acute respiratory diseases from different regions of the country were tested for influenza viruses. Detection and typing/subtyping of influenza viruses were carried out by the method *Real Time RT-PCR* with specific primers and probes. The cell cultures MDCK and MDCK-SIAT1 were used for isolation of influenza viruses. Antigen characterization of isolates was performed by haemagglutination inhibition assay. A screening of 59 influenza A(H1N1)pdm09 viruses was carried out using *Real Time*

RT-PCR discrimination assay for detection of the H275Y oseltamivir resistance point mutation. Of 1125 tested clinical specimens 329 (29) were influenza virus positive. Co-circulation of A(H1N1)pdm09 (59/329, 18%), A(H3N2) (21/329, 6%) and B (250/329, 76%) viruses was established with dominance of the B viruses during the most weeks of period. Antigenic analysis of A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B isolates showed similarity to the recent vaccine strains. It was not proven the mutation H275Y, causing resistance to oseltamivir among the pandemic viruses. Some epidemiological and clinical features of influenza epidemic in the last season are also presented. There were some features in biological properties, epidemiology and clinical activity of influenza viruses responsible for the recent influenza epidemic in Bulgaria that are important to form the seasonal influenza prevention and control policy.

Key words: influenza viruses, antigenic analysis

Address for correspondence: Prof. Neli Korsun, MD DSci, National Reference Laboratory of Influenza and Acute Respiratory Disorders, Department of Virology, National Center of Contagious and Parasitic Diseases, 44A General Stoletov Blvd., Bg – 1233 Sofia, tel. +359 2 931 81 32, e-mail: neli_korsun@abv.bg

Инфекцията с грипни вируси всяка година предизвиква голям брой заболявания, които водят до рязко увеличаване на амбулаторните прегледи и хоспитализациите, и представлява значителна тежест за здравната система и обществото като цяло. По време на ежегодните грипни епидемии боледуват 5-20% от населението на Земята, което означава приблизително 600 млн. заболявания, от които тежкопротичащи са от 3 до 5 млн., а смъртните случаи варират от 250 000 до 500 000. След 1977 г., сезонният грип се причинява от грипни вируси от субтип А(Н1N1), А(Н3N2) и тип В (линии В/Victoria и В/Yamagata), които претърпяват постоянни антигенни и генетични промени. Наблюдават се също времеви и географски вариации в честота на разпространението им, в тяхната вирулентност, клинично протичане и в особеностите на епидемичния процес. Периодично, през 10-40 години, грипните вируси от тип А причиняват пандемии, като през XX в. човечеството е преживяло 4 грипни пандемии. Първата за XXI в. пандемия от 2009-2010 г. бе предизвикана от уникален четворен реасортантен вирус от подтип А(Н1N1), включващ сложна комбинация от гени на свински, птичи и човешки грипни вируси. Пандемичният грипен вирус А(Н1N1) pdm09 продължи да циркулира през следващите години, като напълно измести сезонните грипни вируси от същия субтип.

Обобщените данни на СЗО показват, че през сезон 2012/2013 г. от доказаните в европейския регион общо 95 628 грипни вируса, 63% са били от тип А и 37% – от тип В. Сред тип А вирусите пандемичните вируси са съставлявали 67%, а вирусите А(Н3N2) – 33% [6].

Целта на настоящото проучване е да се анализират особеностите на грипен сезон 2012/2013 г. в България и да се определят антигенните и генетичните характеристики на циркулиращите грипни вируси.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

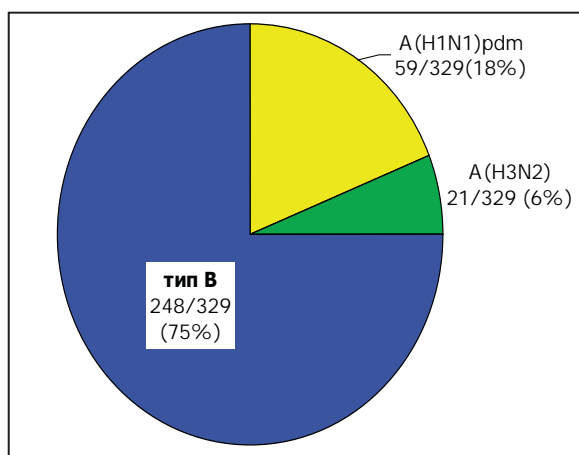
За грипни вируси бяха изследвани носогърлените смивове от 1125 пациенти от цялата страна с грипоподобни и остри респираторни заболявания (ОРЗ), заболели през периода 40 седмица/2012 г. – 21 седмица/2013 г. От тях 445 бяха амбулаторно лекувани пациенти, а 680 – хоспитализирани. Доказването и типирането/субтипирането на грипни вируси бе извършвано чрез препоръчвания от СЗО молекулярно-генетичен метод Real Time RT-PCR с праймери и сонди, получени от CDC, Atlanta, САЩ. Използван бе китът SuperScript III Platinum® One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen). Изолацията на грипни вируси беше извършвана в клетъчните култури MDCK и MDCK-SIAT. Антигенното характеризиране на изолатите бе провеждано чрез реакция на задръжка на хемаглутинацията (РЗХА) в НРЛ „Грип и ОРЗ“ и в Световния колабориращ център по грипа на СЗО в Лондон [4]. С помощта на метода Real Time RT-PCR бе извършен скрининг на вируси А(Н1N1)pdm09 с цел откриване на мутация H275Y, водеща до резистентност към невраминидазия инхибитор Oseltamivir (Tamiflu).

Данните за заболяемостта от грип и ОРЗ през епидемичния период (седмици 40-21) на сезон 2012/2013 г. бяха събрани и обработени чрез интернет базирана информационна система за сентинелен надзор (<http://grippe.gateway.bg/>). През периода в сентинелната извадка бяха включени 341 лечебни заведения за извънболнична помощ от 28-те областни града, които обслужват общо 381 418 души, разпределени в 5 възрастови групи: 0-4, 5-14, 15-29, 30-64 и над 65 г.

РЕЗУЛТАТИ

От изследваните общо 1125 клинични проби грипни вируси бяха доказани в 329 (29%). При ам-

булаторно лекуваните пациенти положителните проби бяха 76 (17%), а при хоспитализираните – 253 (37%). Установена бе коциркуляция на вируси A(H1N1)pdm09 (59/329, 18%), A(H3N2) (21/329, 6%) и тип В (248/329, 75%), като последните бяха доминиращи през повечето седмици на сезона (фиг. 1). При един пациент беше доказана смес от вируси A(H3N2) и В.



Фиг. 1. Грипни вируси, доказани в България през сезон 2012/2013 г.

Антигенното характеризиране на общо 24 грипни щамове, изолирани в клетъчни култури, имаше за цел да установи антигенното им сходство с ваксинални и референтни грипни вируси. Всички 9 вирусни изолата A(H1N1)pdm09 показаха антигенно родство с актуалния за сезона ваксинален вирус A/California/7/2009. Един от общо два изолата A(H3N2) беше антигенно близък с ваксиналния вирус A/Victoria/361/2011 от сезон 2012/2013 и с ваксиналния вирус A/Texas/50/2012, препоръчан за сезон 2013/2014 г. Другият изолат обаче бе антигенно различен – той показа 8 пъти редукция в титрите в сравнение с хомоложните титри на ваксиналните вируси A/Victoria/361/2011 и A/Texas/50/2012. Единадесет от общо 13 изолата от тип В реагираха слабо (над 4 пъти разлика с хомоложния титър) с антисеруми от порчета, получени срещу ваксиналния вирус B/Wisconsin/1/2010 (генетична група 3) от сезон 2012/2013 г., което насочва към антигенни различия. И 13-те изолата от тип В показаха добра реактивност с антисеруми, получени срещу вируси от генетична група 2 – B/Estonia/55669/2011, B/Hong Kong/3577/2012 и B/Massachusetts/02/2012. Всички тествани вирусни щамове от тип В се отнасяха към линия B/Yamagata и бяха по-близки в антигенно отношение с представителите на генетична група 2, към която се отнася препоръчаният за сезон 2013/2014 г. ваксинален щам B/Massachusetts/02/2012, отколкото с тези от гене-

тична група 3, към която се отнася ваксиналният щам B/Wisconsin/1/2010 от сезон 2012/2013 г. [3].

Анализът на доказаните 59 пандемични грипни вируса не показва наличие на мутацията H275Y, водеща до резистентност към Oseltamivir.

Епидемиологичният анализ на данните от сентинелния надзор показва, че през грипния сезон 2012-2013 г. вероятният брой заболявания от грип и ОРЗ в цялата страна е бил 1 922 280 (табл. 1) в съответствие със заболяемостта, регистрирана в сентинелната извадка – 100 685 заболявания от грип и ОРЗ при 381 418 души, или заболяемост 2639,75 на 10 000.

Таблица 1. Заболяемост от грип и ОРЗ по възрастови групи в България през грипен сезон 2012-2013 г. (40-21 седмица)

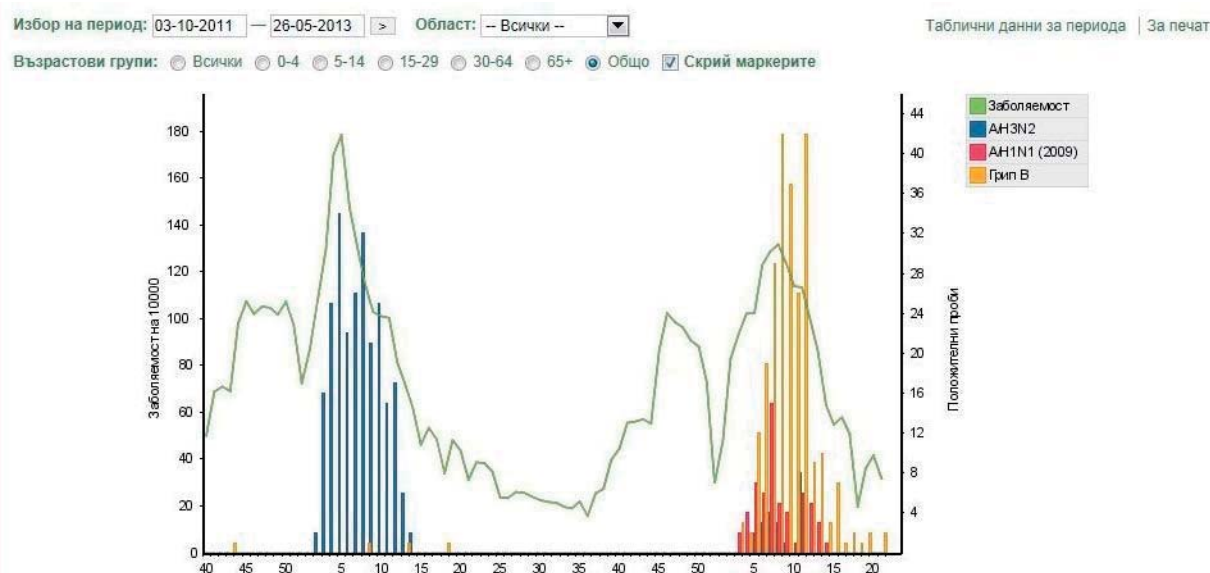
Възрастови групи (години)	Наблюдавано население от сентинелната извадка			Изчислен брой заболявания от грип и ОРЗ в цялата страна
	Средногодишен брой наблюдавани лица	Брой заболявания от грип и ОРЗ	Заболяемост на 10 000 население	
0-4	18 758	20 890	11 136,58	385 747
5-14	31 795	24 282	7637,05	491 374
15-29	77 486	24 046	3103,27	397 882
30-64	196 790	26 587	1351,03	488 404
65+	56 589	4880	862,36	120 306
Общо	381 418	100 685	2639,75	1 922 280

В сравнение с предходния сезон 2011/2012 г. епидемичният период през 2012/2013 г. продължи по-дълго и се характеризираше с по-ниска интензивност (фиг. 2 и табл. 2). Регистрираните заболявания и заболяемост са с по-ниски стойности в сравнение със сезон 2011/2012 г., когато те са съответно 115 810 и 3045,03.

На фиг. 2 са представени интегрираните данни от вирусологичния и епидемиологичния надзор на грипа и ОРЗ през сезон 2011/2012 г. и 2012/2013 г. През 46-а седмица на 2012 г. броят на заболелите от грип и ОРЗ нарасна и заболяемостта достигна до 102,43 на 10 000, след което се върна към обичайните си стойности. Повторно повишаване на заболяемостта започна през 4-а седмица на 2013 г., а максимална стойност (131,77 на 10 000) бе достигната през 8-а седмица. През епидемичния период на сезон 2012/2013 г. сред наблюдаваните 381 418 души бяха регистрирани общо 39 660 заболявания от грип и ОРЗ (заболяемост 1039,41 на 10 000). Тази стойност на заболяемостта, отнесена към населението на страната, дава възможност да се изчисли, че вероятният брой заболявания през периода сред цялото население е бил 756 904 (табл. 2).

Таблица 2. Брой заболели и заболяемост от грип и ОРЗ през епидемичните седмици на сезон 2012/2013 г.

Седмица №	Период	Брой случаи сред наблюдаваното население от сентинелната извадка	Заболеемост на 10 000	Изчислен брой случаи сред цялото население на страната
4	21.01-27.01	3899	102,19	74 412
5	28.01-03.02	3910	102,47	74 622
6	04.02-10.02	4691	122,94	89 527
7	11.02-17.02	4914	128,79	93 783
8	18.02-24.02	5028	131,77	95 958
9	25.02-03.03	4721	123,73	90 099
10	04.03-10.03	4348	113,95	82 981
11	11.03-17.03	4328	113,43	82 599
12	18.03-24.03	3821	100,14	72 923
ОБЩО		39 660	1 039,41	756 904



Фиг. 2. Интегрирани вирусологични и епидемиологични данни в България през сезон 2011/2012 г. и 2012/2013 г., от информационна система за събиране и анализиране на данни за заболяемостта от грип и ОРЗ в България, НЦЗПБ, МЗ

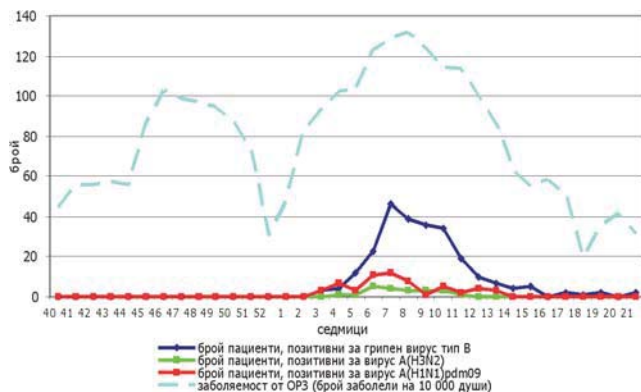
Динамиката на регистрираната заболяемост от грип и ОРЗ и броят на пробите, положителни за грипни вируси, показват много добро съответствие (фиг. 3) [8]. Първите грипни вируси бяха доказани през 3-а седмица на 2013 г. Най-голям бе броят на положителните проби през 7-а и 8-а седмица на 2013 г., когато заболяемостта достигна максимална стойност (131,77 на 10 000). Последните случаи на лабораторно доказана инфекция с грипни вируси бяха от 21-вата седмица на годината.

Разпределението по възраст на пациентите с доказани грипни вируси показва, че през сезон 2012/2013 г. най-много грипни заболявания бяха лабораторно потвърдени във възрастовата група

5-14 год. (49%), а най-малко – във възрастовата група 0-4 год. (23%) (фиг. 4). Средната възраст на пациентите, инфектирани в вируси А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и тип В, бе съответно 26,12 год., 31,15 год. и 22,1 год. През предходния сезон 2011/2012 г. най-често развиваха грипно заболяване децата от възрастовите групи 5-14 год. (60%) и 0-4 год. (59%), а най-рядко – хората на възраст от 30 до 64 год. – 35%. Средната възраст на пациентите, инфектирани с доминиращия тогава грипен вирус А(Н3N2), бе 17,8 год.

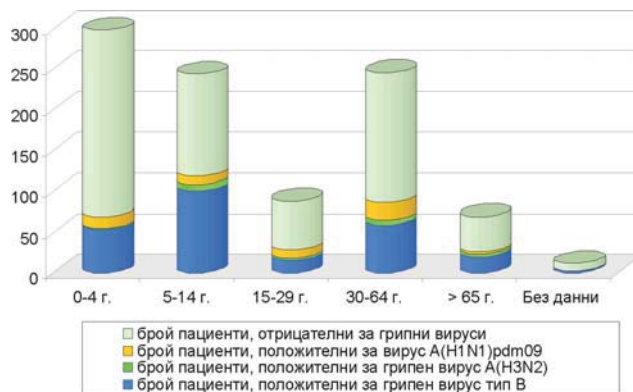
На фиг. 5 (а, б) са показани броят и процентът на амбулаторно лекуваните и хоспитализираните пациенти, инфектирани с вируси А(Н1N1)pdm09 и тип В през сезон 2012/2013

г. От фигурите се вижда, че сред хоспитализираните пациенти пандемичният грипен вирус A(H1N1)pdm09 бе доказван в по-висок процент при лица от младежка (15-29 год.) и

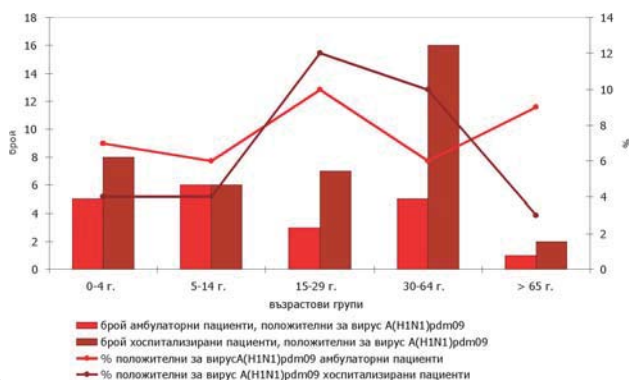


Фиг. 3. Динамика в доказване на грипни вируси и заболяемост от ОРЗ в България през периода 40-а седм./2012 – 21-ва седм./2013 г.

средна възраст (30-64 год.). Вирусите от тип В предизвикваха тежки заболявания, изискващи болнично лечение, най-често при деца на възраст 5-14 год.

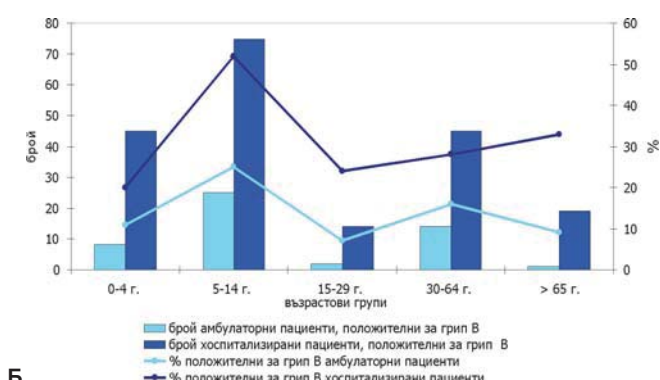


Фиг. 4. Възрастово разпределение на пациентите, инфектирани с грипни вируси през сезон 2012/2013



А

Фиг. 5. Амбулаторно лекувани и хоспитализирани пациенти през сезон 2012/2013 г., (А) инфектирани с грипен вирус A(H1N1)pdm09; (Б) инфектирани с грипни вируси тип В



Б

Анализирано бе участието на грипните вируси при случаи с усложнения – от страна на долните отдели на респираторния тракт (пневмония, бронхиолит, остър респираторен дистрес-синдром) и от страна на ЦНС (фебрилни гърчове, мозъчен оток, менингит, енцефалопатия, енцефалит). През сезон 2012/2013 г. при 23% (37/160) от изследваните случаи с инфекция на долния дихателен тракт бяха доказани грипни вируси, а при изследваните случаи със засягане на ЦНС грипна етиология се доказа при 28% (34/121). При два смъртни случая бяха лабораторно доказани грипни вируси – вирус A(H1N1)pdm09 (при жена на 66 год.) и вирус тип В (в трупен материал от бял дроб на мъж на 28 год.).

ОБСЪЖДАНЕ

В България грипния сезон 2012/2013 г. се характеризираше с редица особености в сравнение

с предходния сезон – 2011/2012 г. – по-голяма продължителност, по-ниска заболяемост, по-нисък процент на позитивните за грипни вируси изследвани болни (29% срещу 42%), различия в спектъра и съотношението между циркулиращите грипни вируси, силно доминиране на вируси тип В, различия във възрастовата структура и клиничните прояви. През сезон 2012/2013 г. бе установена коциркулация на А вируси от два субтипа – A(H1N1)pdm09 и A(H3N2), и на В-вируси, като последните бяха доминиращи през повечето седмици на сезона. За сравнение през сезон 2011/2012 г. абсолютно доминиращи бяха вирусите A(H3N2) (98,8%). Пандемичният вирус тогава не беше доказан при нито един пациент, а вируси тип В бяха идентифицирани само при 3-ма пациенти [1].

Една от отличителните характеристики на изминалия грипен сезон бе силното доминиране на

грипни вируси тип В, отнасящи се предимно към линия В/Yamagata. Подобно доминиране бе установено в редица други страни в Европа – Италия, Испания и Великобритания [6]. Засилена циркулация на вируси тип В у нас бе наблюдавана и през сезон 2010/2011 г., когато те съставляваха 42% от доказаните грипни вируси, но циркулиралите тогава В вируси се отнасяха към линия В/Victoria. През сезон 2011/2012 г. вирусите тип В бяха доказвани изключително рядко (само при 3-ма пациенти). Слабата циркулация на вирусите В/Yamagata у нас през предишните сезони вероятно е довела до натрупване на значителен контингент възприемчиво население. С доминирането на вирусите от тип В могат да се обяснят особеностите във възрастовата заболяемост и значителното засягане на възрастовата група 5-14 год., което е характерно за този тип вируси.

Изследваните грипни изолати (с изключение на 1 изолат А/Н3N2/ и 11 изолата от тип В) показваха антигенно сходство с щамове, влизащи в състава на препоръчаните през този сезон противогрипни ваксини. За сравнение през предходния сезон доказаните у нас грипни вируси А(Н3N2) се различаваха значително в антигенно отношение от ваксиналния щам А/Perth/16/2009 [2]. Тъй като повечето циркулиращи през сезон 2012/2013 г. в Северното полукълбо В-вируси се отнасяха към генетична група 2 от линия В/Yamagata, препоръчаният за следващия сезон ваксинален щам В/Massachusetts/02/2012 е от генетична група 2 [5].

Анализът на 59 клинични проби, положителни за вирус А(Н1N1)pdm09, не показва наличие на мутацията Н275Y, отговорна за резистентност към Oseltamivir. В европейския регион на СЗО от изследваните през сезона общо 743 вируса А(Н1N1)pdm09 само 13 (2%) са носители на тази мутация [6].

По отношение на клиничната тежест сезон 2012/2013 г. не се отличаваеше съществено от предишния – 2011/2012 г. При пациенти с усложнения от страна на долния отдел на респираторния тракт честотата на доказване на грипни вируси беше сходна (23 и 22%). При пациенти със засягане на ЦНС обаче честотата на доказване на грипни вируси през сезон 2012/2013 г. (28%) бе по-голяма в сравнение със сезон 2011/2012 г. (14%) [1].

В заключение, проведените от нас проучвания потвърждават необходимостта от постоянен мониторинг на циркулиращите грипни вируси и анализирание на епидемиологичните и клиничните особености, специфични за грипните епидемии. Данните, касаещи антигенните и генетичните характеристики на актуалните грипни вируси, тяхната чувствителност към антивирусни препарати, клиничната тежест на грипното заболяване, степента на засягане на различни възрастови групи, на клинически рискови групи, състоянието на колективния имунитет, тенденциите в разпространението на грипните вируси и др., имат важно значение при формиране на политика за профилактика и контрол на сезонния грип.

Библиография:

1. Корсун, Н., Р. Коцева, А. Теодосиева, А. Курчатова, П. Генова-Калу и М. Кожухарова. Особенности на грипните епидемии в България през първите два сезона от постпандемичния период. – Бълг. мед. журнал, **6**, 2012, № 2, 31-37.
2. E C D C . Surveillance report. Influenza virus characterisation. Influenza virus. Summary Europe, July 2012.
3. E C D C . Surveillance report. Influenza virus characterisation. Influenza virus. Summary Europe, April, 2013.
4. E C D C . Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011, 1-139.
5. W H O . Review of the 2012-2013 winter influenza season, northern hemisphere. Wkly Epid. Rec., **88**, 2013, No. 22, 225-232.
6. www.euroflu.org
7. www.who.int
8. <http://grippe.gateway.bg/>