

Laboratoryjnie potwierdzone przypadki zachorowania na gripę w sezonie epidemicznym 2016/2017 w województwie śląskim

Laboratory confirmed cases of influenza in epidemic season 2016/2017 in Silesian province

RENATA CIEŚLIK-TARKOTA^{1,2/}, MARTA ALBERTYŃSKA^{1,3/}, BEATA ROZWADOWSKA^{1,3/}, ALEKSANDRA SŁODKI^{3/}, JAN SŁODKI^{3/}, URSZULA MENDERA-BOŻEK^{1/}, ZBIGNIEW LORENC^{4/}

^{1/} Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

^{2/} Wydział Nauk o Zdrowiu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

^{3/} Zakład Badań Strukturalnych Skóry, Katedra Kosmetologii, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

^{4/} Katedra i Kliniczny Oddział Chirurgii Ogólnej Kolorektalnej i Urazów Wielonarządowych, WSS Nr 5 w Sosnowcu

Wprowadzenie. Grypa jest ostrą wirusową chorobą układu oddechowego, wywoływaną przez wirusy RNA z rodziny *Orthomyxoviridae*. Na podstawie różnicy w budowie antygenowej wirionu wyróżnia się 3 typy wirusa: A, B i C. Zmiany antygenowe w RNA wirusa związane są z przesunięciem oraz skokiem antygenowym i powodują występowanie sezonowych epidemii lub pandemii zachorowań na gripę.

Cel. Analiza wyników badań wykrywania obecności materiału genetycznego wirusów grypy u pacjentów z terenu woj. śląskiego w sezonie epidemicznym 2016/2017.

Materiały i metody. Materiał stanowiły próbki pobrane od pacjentów z podejrzeniem grypy, hospitalizowanych na terenie woj. śląskiego oraz od pacjentów ambulatoryjnych jednej z przychodni z terenu woj. śląskiego. Przebadano 407 próbek, w tym 366 wymazów z nosogardzieli, 32 popłuczyny i 9 aspiratów z drzewa oskrzelowego. Badania wykonano metodą real time RT-PCR w kierunku wykrywania obecności materiału genetycznego wirusów grypy typu A, podtypu A/H1N1/pdm09, podtypu A/H3N2 oraz typu B.

Wyniki. W przebadanym materiale potwierdzono 187 przypadków zachorowania na gripę (46% wszystkich przebadanych próbek). W większości próbek wykryto wirusa grypy typu A – 182 wyniki, co stanowiło ponad 97% wszystkich próbek z wynikiem pozytywnym. W części próbek subtypowanie wykazało obecność wirusa podtypu A/H3N2. Nie stwierdzono podtypu A/H1N1/pdm09. RNA wirusa grypy typu B wykryto w 5 próbkach.

Wnioski. Przeprowadzone badania wykazały obecność różnych typów wirusa grypy. Procentowy udział poszczególnych typów/podtypów w analizowanym sezonie epidemicznym różnił się od wyników badań z ubiegłych sezonów 2014/2015 oraz 2015/2016, co potwierdza zmienność sezonową wirusów grypy.

Słowa kluczowe: grypa, wirus grypy, real time RT-PCR, sezonowość

Introduction. Influenza is an acute viral disease of the respiratory system, caused by the RNA viruses from the *Orthomyxoviridae* family. Based on the difference in antigenic construction 3 types of virus can be distinguished: A, B and C. Antigenic changes in the RNA of the virus are associated with the occurrence of antigenic drift and antigenic shift, causing seasonal epidemics or pandemics of the flu.

Aim. To analyze the results of the investigation of the presence of genetic material of influenza viruses in patients from the Silesian province in the epidemic season of 2016/2017.

Material & method. The material constituted of samples taken from patients suspected of flu, hospitalized in the Silesian province, and from patients of one of the clinics from the Silesian province. 407 samples were examined, out of which 366 were swabs from the nasopharynx, 32 BAL and 9 aspirates from the bronchial tree. The research was conducted by real time RT-PCR in order to detect the presence of genetic material of flu viruses type A, subtype A/H1N1/pdm09, subtype A/H3N2 and type B.

Results. The tested material confirmed 187 cases of the flu (46% of all tested samples). In most samples the type A influenza virus was detected – 182 results, what constituted more than 97% of all samples with a positive result. Subtyping of a few samples revealed the presence of the A/H3N2 virus subtype. The A/H1N1/pdm09 subtype has not been detected. The RNA of type B influenza was detected in 5 samples.

Conclusion. The study showed the presence of different types of influenza viruses. The percentage share of the various types/subtypes in the analyzed epidemic season was different from the results from 2014/2015 and 2015/2016 seasons, what confirms the seasonal variability of influenza viruses.

Key words: flu, influenza virus, real time RT-PCR, seasonality

Wprowadzenie

Grypa to ostra wirusowa choroba górnych i dolnych dróg oddechowych. Czynnikiem etiologicznym jest wirus z rodziny *Orthomyxoviridae*. Wirus grypy po raz pierwszy został opisany w 1931 r. przez amerykańskiego badacza Richarda E. Shope [1]. Podział wirusów grypy na 3 typy – A, B i C, związany jest z budową wirionu i oparty jest o różnice w budowie antygenów – białka M1 i nukleoproteiny NP. Antygeny te, razem z pojedynczą nicią kwasu rybonukleinowego RNA oraz kompleksem polimeraz PA, PB1 i PB2, stanowią rdzeń wirionu. W zewnętrznej otoczce lipidowej wirionu zakotwiczone są antygeny powierzchniowe wirusa – białko błonowe M2 i dwie glikoproteiny: hemaglutynina HA i neuraminidaza NA. W zależności od rodzaju występujących HA i NA, grypę typu A dzielimy na podtypy [2]. U ludzi najczęściej występuje hemaglutynina H1-H3 oraz neuraminidaza N1 i N2. Kształt wirionu jest sferyczny, o średnicy od 80 do 120 nm [3]. Materiał genetyczny wirusa stanowi pojedyncza nić kwasu rybonukleinowego RNA, podzielonego na 7 lub 8 segmentów. RNA podlega zmianom antygenowym, skutkiem czego pojawia się różnorodność podtypów HA i NA. Mechanizm tych zmian polega na przesunięciu antygenowym (*antigenic drift*) oraz skoku antygenowym (*antigenic shift*). Przesunięcie antygenowe związane jest z mutacjami punktowymi w postaci delekcji, insercji oraz podstawień. Mutacje te odpowiedzialne są za wystąpienie sezonowych epidemii grypy. Skok antygenowy, inaczej reasortacja genetyczna, to wymiana całych segmentów materiału genetycznego wirusa między jego różnymi wariantami, które zakaziły tę samą komórkę. Ten rodzaj zmian genetycznych wiąże się z pojawieniem się pandemii choroby i występuje tylko w przypadku wirusa grypy typu A [4]. W czerwcu 2009 r. WHO ogłosiła stan pandemii, z powodu szerzącego się zakażenia nowym wariantem wirusa A/H1N1/pdm09. Wykazano, że wariant ten zawiera geny wirusów występujących u ludzi, ptaków oraz świń [5]. Wszystkie trzy typy wirusa atakują organizm ludzki [6].

Rozprzestrzenianie grypy odbywa się drogą kropelkową – poprzez katar, kaszel lub kontakt bezpośredni. Okres inkubacji wynosi od 1 do 3 dni. Objawy pojawiają się nagle, występuje gwałtowny wzrost temperatury, z towarzyszącym uczuciem zmęczenia, bólem mięśni. Występują objawy związane z układem oddechowym, w postaci kataru, bólu gardła, kaszlu i duszności. W przebiegu grypy możliwe jest wystąpienie groźnych powikłań, jak np. wtórne zakażenia bakteryjne, zapalenia dolnych dróg oddechowych, zapalenia serca i osierdzia [7].

Objawy kliniczne nie pozwalają jednoznacznie potwierdzić zachorowania na grypę. W celu określenia

czynnika etiologicznego konieczne jest wykonanie odpowiedniej diagnostyki. Materiałem do badań mogą być wymazy z nosogardzieli, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL), aspirat, a także – w przypadku wystąpienia powikłań – płyn mózgowo-rdzeniowy, płyn osierdziowy, materiał z biopsji zmienionych chorobowo tkanek i narządów. Próbkę do badań powinny być pobrane do 3 dni od wystąpienia objawów i przechowywane w temperaturze +4°C do 24-48 godzin. Dłuższe przechowywanie wymaga zamrożenia materiału do badań w temperaturze -70°C [8, 9].

Obecnie podstawową metodą w diagnostyce grypy, zalecaną przez *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), jest molekularna technika *real time* RT-PCR, polegająca na wykrywaniu materiału genetycznego wirusa z zastosowaniem łańcuchowej reakcji polimeryzacji. Metoda jest czuła, wysoce swoista i szybka [10, 11].

Do metod bezpośrednich wykrywania wirusa zalicza się również izolację patogenu w hodowli tkankowej lub na zarodkach kurzych, testy immunoenzymatyczne, immunofluorescencyjne i immunochromatograficzne. Izolacja wirusa jest uważana za złoty standard w diagnostyce, natomiast ze względu na długi czas wykonania i wysokie koszty, nie jest stosowana rutynowo. Serologiczne metody wykrywania antygeny wirusowego cechuje mniejsza swoistość w porównaniu do metod molekularnych [10, 11].

Do diagnostyki grypy stosuje się również pośrednią metodę serologiczną – wykrywanie przeciwciał przeciwko wirusowi grypy w surowicy krwi pacjenta. Badanie należy wykonać dla pary surowic, w ostrej fazie – do 7 dni od wystąpienia objawów oraz w okresie rekonwalescencji – ok. 2 do 4 tygodni od pojawienia się choroby [8, 9].

Cel

Analiza wyników badań wykrywania obecności materiału genetycznego wirusów grypy u pacjentów z terenu woj. śląskiego w sezonie epidemicznym 2016/2017. Pod uwagę wzięto typ i podtyp wirusów, z uwzględnieniem poszczególnych tygodni analizowanego sezonu epidemicznego.

Materiały i metody

Badaniom poddano wszystkie próbki dostarczone do Laboratorium Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Katowicach w terminie od 1 października 2016 r. do 30 września 2017 r. (sezon epidemiczny grypy 2016/2017). Próbkę do badań pochodziły od pacjentów z podejrzeniem grypy, hospitalizowanych na terenie woj. śląskiego oraz od pacjentów ambulatoryjnych jednej z przychodni z terenu woj. śląskiego.

Pobranie próbek, transport i przechowywanie wykonano zgodnie z wytycznymi Krajowego Ośrodka ds. Grypy w NIZP-PZH w Warszawie [8].

W badaniach uwzględniono wykrywanie materiału genetycznego wirusa grypy typu A i B, a także podtypu A/H1N1/pdm09 (odpowiedzialnego za wystąpienie pandemii grypy w 2009 r., obecnie krążącego w populacji jako wirus grypy sezonowej) oraz podtypu A/H3N2.

Izolacja materiału genetycznego

Izolację RNA wirusów grypy z próbek wykonano przy użyciu kolumnkowego zestawu do izolacji materiału genetycznego GeneProof PathogenFree RNA Isolation Kit (GeneProof, Brno, Czechy), zgodnie z instrukcją producenta zestawu.

Wykrywanie RNA metodą real time RT-PCR

Do detekcji materiału genetycznego użyto komercyjnych zestawów *real time* RT-PCR: FTD FLU do wykrywania wirusów grypy typu A, B oraz podtypu A/H1N1/pdm09 (Fast-Track Diagnostics, Luksemburg), PowerChek Pandemic H1N1/H3N2 Real-time PCR Kit do wykrywania podtypów A/H1N1/pdm09 oraz A/H3N2 (Kogenebiotech, Seul, Korea). Reakcje amplifikacji przeprowadzono w aparacie LightCycler 480 II firmy Roche. Wszystkie odczynniki posiadały certyfikaty do diagnostyki *in vitro* i zostały użyte zgodnie z wytycznymi producentów.

Wyniki

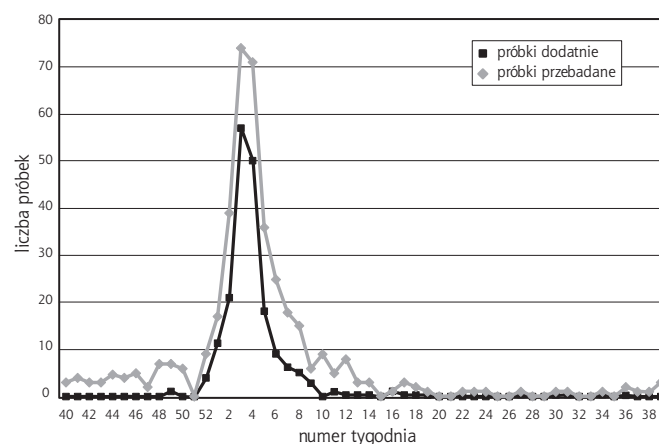
Przebadano łącznie 407 próbek, z czego 366 stanowiły wymazy z nosogardzieli, 32 – BAL, a 9 próbek – aspiraty z drzewa oskrzelowego. Wszystkie próbki przebadano w kierunku wykrycia materiału genetycznego wirusów grypy typu A, B oraz podtypu A/H1N1/pdm09. Wśród próbek z wynikiem pozytywnym, nie stwierdzono obecności podtypu A/H1N1/pdm09. Wyniki dodatnie uzyskano w 187 próbkach, co stanowiło 46% przebadanego materiału. RNA wirusa grypy typu B wykryto w 5 próbkach (prawie 3% wyników dodatnich).

Materiał genetyczny wirusa grypy typu A wykryto w 182 próbkach (97% wszystkich próbek z wynikiem pozytywnym). 50 próbek (27%) z dodatnim wynikiem w kierunku wykrycia obecności materiału genetycznego wirusa grypy typu A poddano dalszej analizie i przebadano pod kątem oznaczenia podtypu A/H3N2 – 100% wyników wskazało na obecność tego podtypu.

Wyniki dodatnie uzyskano w każdym z badanych materiałów – w 48% wymazów z nosogardzieli, 28% z BAL oraz w 33% aspiratów z drzewa oskrzelowego.

Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono w badanym materiale koinfekcji różnymi typami i podtypami wirusów grypy.

Wyniki dodatnie pogrupowano wg kolejnych tygodni całego sezonu epidemicznego – od 1 października 2016 r. do 30 września 2017 r., tj. od 40 tygodnia 2016 r. do 39 tygodnia 2017 r. Zaobserwowano wyraźny wzrost liczby zgłaszanych przypadków z podejrzeniem grypy, jak i przypadków z potwierdzonym rozpoznaniem grypy między 1 a 6 tygodniem 2017 r. Szczyt zachorowań przypadł na 3-4 tydzień 2017 r.



Ryc. 1. próbki przebadane i z wynikiem dodatnim w sezonie epidemicznym grypy 2016/2017 – wg tygodni

Fig. 1. Samples tested and positive in epidemic season of influenza 2016/2017 – by weeks

(ryc. 1).

Dyskusja

Sezonowe epidemie grypy spowodowane są występowaniem w populacji wirusów typu A i B. Wirusy na skutek drobnych zmian antygenowych, wywołanych mutacjami punktowymi, w danym sezonie epidemicznym krążą w populacji w różnych proporcjach. Rejestracja zachorowań i podejrzeń zachorowań na grypę i choroby wywołane przez wirusy grypopodobne w Polsce odbywa się na podstawie zgłoszeń zbiorczych dokonywanych w trybie tygodniowym przez placówki lecznicze do Państwowych Powiatowych Inspektorów Sanitarnych. Dane te są podsumowywane przez Wojewódzką Stację Sanitarno-Epidemiologiczną i następnie przesyłane do Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny. W okresie ostatnich 8 lat zaobserwowano prawie 3-krotny wzrost zachorowań na grypę i przypadki grypopodobne w woj. śląskim, od ok. 100 tys. przypadków rocznie (101 979 – 2009 r.; 100 255 – 2011 r. i 104 732 – 2012 r.) poprzez ponad 221 tys. przypadków rocznie (221 067 – 2013 r. i 221 825 – 2014 r.) do ponad 280 tys. przypadków rocznie (286 144 – 2015 r. i 287 108 –

2016 r.), poza 2010 r., kiedy odnotowano niespełna tylko 41 862 przypadki zachorowań na grypę lub grypopodobne. Największą zapadalność odnotowano w 2016 r. – 6 290,2 na 100 tys. mieszkańców woj. śląskiego. Wraz ze wzrostem liczby podejrzeń zachorowań na grypę i przypadki grypopodobne, zwiększała się liczba próbek wysyłanych do laboratorium WSSE w Katowicach, celem potwierdzenia, jak i określenia czynnika etiologicznego. Szczyt zachorowań wystąpił w 3-4 tygodniu 2017 r. (II połowa stycznia). Jest to zgodne z danymi opublikowanymi przez *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), wg których szczyt zachorowań przypadał między 52 tygodniem 2016 r. a 5 tygodniem 2017 r. [12].

Dane epidemiologiczne oraz wyniki naszych badań potwierdziły zwiększoną zachorowalność na grypę w analizowanym sezonie 2016/2017 w stosunku do poprzednich sezonów. W analogicznym okresie 2014/2015 na terenie woj. śląskiego stwierdzono ponad 27% wyników dodatnich, natomiast w sezonie 2015/2016 – prawie 40% [13, 14].

W badanym materiale początkowo większość wyników dodatnich stanowiło potwierdzenie zakażenia wirusem typu A, przy czym wykluczono wariant A/H1N1/pdm09. Dalsza analiza molekularna próbek, w których stwierdzono obecność wirusa grypy typu A, wykazała obecność podtypu A/H3N2 we wszystkich próbkach poddanych subtypowaniu. Pozwala to stwierdzić, że wirus A/H3N2 na terenie woj. śląskiego był dominujący w analizowanym okresie, w przeciwieństwie do sezonu 2015/2016, gdzie stwierdzono w większości obecność podtypu A/H1N1/pdm09 (70% wyników dodatnich) oraz wirusa grypy typu B (30% wyników dodatnich) [14]. Podobne wyniki przedstawia raport ECDC, wskazując wirusa grypy

A/H3N2 jako dominujący podtyp dla sezonu 2016/2017 [12]. Na podstawie badań stwierdzono, że podtyp A/H3N2 był również dominującym szczepem w Polsce w sezonie epidemicznym 2013/2014 [15]. Czarkowski i wsp. na podstawie wyników uzyskanych w programie SENTINEL oraz poza programem wykazali, że szczep A/H3N2 w sezonach 2011/2012 i 2012/2013 nie był dominującym podtypem wśród wirusów grypy krążących w populacji. W sezonie 2011/2012 potwierdzono obecność A/H3N2 w 5 próbkach z 2066 przebadanych w tym okresie, natomiast w 2012/2013 badania wykazały obecność A/H3N2 już w 206 próbkach, co stanowiło prawie 3% przebadanych próbek [16]. Badania wirusologiczne i analizy wyników wykonane w 2010 r. w NIZP-PZH wykazały obecność wirusa grypy w 59,3% przebadanych próbek, z czego większość stanowił pandemiczny podtyp A/H1N1/pdm09, natomiast obecności szczepu A/H3N2 w analizowanych próbkach nie stwierdzono [17].

Wnioski

Przeprowadzone badania w sezonie epidemicznym grypy 2016/2017 wykazały obecność różnych typów wirusów grypy. Dominującym podtypem był A/H3N2. Procentowy udział poszczególnych typów/podtypów różnił się od wyników badań z ubiegłych sezonów 2014/2015 oraz 2015/2016, co potwierdza zmienność sezonową wirusów grypy.

Źródło finansowania: Praca nie jest finansowana z żadnego źródła.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Piśmiennictwo / References

1. Małafiej E. Grypa – wciąż powracający problem zdrowotny. *Służ Zdr* 2001, 71-72: 1-6.
2. Brydak LB. Grypa – problem stary jak świat. *Hygeia Public Health* 2012, 47(1): 1-7.
3. Machała MK, Brydak LB. Grypa w różnych aspektach. Część I – Budowa, replikacja i zmienność wirusów grypy oraz przebieg kliniczny choroby, odpowiedź immunologiczna i diagnostyka laboratoryjna. *Pol Merk Lek* 2006, 21(123): 270-276.
4. CDC. How the Flu Virus Can Change: “Drift” and “Shift”. <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm> (23.10.2017).
5. Smith GJD, Vijaykrishna D, Bahl J, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 2009, 459: 1122-1125.
6. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull WHO* 1980, 58(4): 585-591.
7. Kuszewski K. Grypa. [w:] *Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka*. Magdzik W, Naruszewicz-Lesiuk D, Zieliński A (red). *α-medica*, Bielsko-Biała 2004: 120-124.
8. Zalecenia dotyczące pobierania, przechowywania i transportu materiałów klinicznych przeznaczonych do badań diagnostycznych w Pracowni Diagnostycznej Laboratorium Zakładu Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy. NIZP-PZH, Warszawa 2013.
9. Brydak LB, Romanowska M, Radzikowski A, Steciwko AF. *Polskie Standardy Profilaktyki i Leczenia Grypy. Rekomendacje Krajowego Ośrodka ds. Grypy PZH oraz Polskiego Towarzystwa Medycyny Rodzinnej*, Warszawa 2007.
10. Center for Disease Control and Prevention (CDC), <https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/labrolesprocedures.htm> (24.10.2017).

11. Stefańska I, Romanowska M, Brydak LB. Metody wykrywania wybranych wirusów wywołujących zakażenia układu oddechowego. *Postępy Hig Med Dośw* 2012, 66: 452-460.
12. ECDC. Epidemiological update: Review of influenza season 2016-2017 in the EU/EEA. <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-review-influenza-season-2016-2017-eueea> (23.10.2017).
13. Albrertyńska M, Rozwadowska B, Hudzik G i wsp. Potwierdzone laboratoryjnie przypadki zachorowania na grypę w sezonie epidemicznym 2014/2015 w woj. śląskim. [w:] *Zdrowie publiczne nadrzędnym zadaniem Państwowej Inspekcji Sanitarnej Województwa Śląskiego*. Mendera-Bożek U, Wodzisławska-Czapla D (red). PTH Oddział Śląski, WSSE, Katowice 2015: 40-46.
14. Chajda A, Rozwadowska B, Albrertyńska M i wsp. Przypadki zachorowania na grypę w sezonie epidemicznym 2015/2016 w woj. śląskim potwierdzone metodą real time RT-PCR. [w:] *Varia Państwowej Inspekcji Sanitarnej Województwa Śląskiego*. Hudzik G, Wodzisławska-Czapla D (red). PTH Oddział Śląski, WSSE Katowice 2016: 22-28.
15. Kondratiuk K, Czarkowski MP, Hallmann-Szelińska E i wsp. Grypa w Polsce w 2013 roku oraz w sezonie 2013/2014. *Prz Epidemiol* 2016, 70(3): 407-419.
16. Czarkowski MP, Hallmann-Szelińska E, Staszewska E, et al. Influenza in Poland in 2011-2012 and in 2011/2012 and 2012/2013 epidemic seasons. *Prz Epidemiol* 2014, 68(3): 455-463.
17. Wóźniak-Kosek A, Czarkowski MP, Staszewska E i wsp. Grypa w Polsce w 2010 roku. *Prz Epidemiol* 2012, 66(4): 599-604.