

DETEKCIJA INFLUENZA A VIRUSA KOD PACIJENATA SA RAZLIČITIM KLINIČKIM OBLICIMA BOLESTI

Vesna Milošević, Jelena Radovanov, Ivana Hrnjaković Cvjetković
Institut za javno zdravlje Vojvodine Novi Sad

Influenza A virusi najčešće izazivaju akutne respiratorne infekcije (ARI) koje spontano prolaze. Hronični zdravstveni problemi su povezani sa komplikacijama influence i razvojem teškog akutnog respiratornog oboljenja (severe acute respiratory illness - SARI) koje zahteva hospitalizaciju i/ili lečenje na odeljenjima intenzivne nege i terapije. U nekim slučajevima, SARI progredira u najteži oblik akutne plućne bolesti nazvan akutni respiratorni distress sindrom (ARDS). Cilj ovog istraživanja bilo je utvrđivanje prisustva sezonskih influenza A (H1N1) i A (H3N2) virusa i pandemijskog influenza A (H1N1) 2009 virusa kod pacijenata sa različitim kliničkim formama oboljenja, tokom zimske sezone 2010/2011, u Autonomnoj pokrajini Vojvodini, Srbija. Brisevi nosa i grla su uzeti od 87 pacijenata. Tridesetsedam pacijenata je imalo prethodno dijagnostikovano hronično oboljenje. Detekcija i podtipizacija influenza virusa specifičnim pojedinačnim real-time RT PCR testovima, preporučenim od strane Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), izvedena je u Nacionalnom influenza centru SZO u Institutu za javno zdravlje Vojvodine u Novom Sadu. Pandemijski influenza A (H1N1) 2009 virus je detektovan kod 54% (47/87) pacijenata. U ispitanim uzorcima nije dokazano prisustvo sezonskih influenza A (H1N1) i A (H3N2) virusa. Procenat influenza A (H1N1) 2009 pozitivnih slučajeva bio je sličan u grupi pacijenata sa i bez hroničnog oboljenja (24/37, 64.9% i 23/50, 46%). Broj SARI slučajeva (sa ili bez ARDS) kod pozitivnih pacijenata u grupi sa hroničnim oboljenjem bio je signifikantno veći u odnosu na grupu bez hronične bolesti (23/24, 95.8% nasuprot 5/23, 21.7%; $P < 0.001$). Kod 4 od 28 (14.3%) pacijenata sa SARI došlo je do razvoja ARDS, pri čemu je kod dvoje ishod bolesti bio fatalan. Najčešća hronična oboljenja kod pacijenata sa SARI bile su hronične respiratorne bolesti, maligniteti, dijabetes i imunološki poremećaji. Na području Autonomne pokrajine Vojvodine influenza A (H1N1) 2009 podtip je dominirao tokom zimske sezone 2010/2011. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da prisustvo hroničnog oboljenja povećava rizik od nastanka teškog oblika bolesti izazvane influenza A (H1N1) 2009 virusom.

Ključne reči: influenza A virusi, SARI, ARDS

DETECTION OF INFLUENZA A VIRUSES IN PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF INFLUENZA-LIKE ILLNESS

Influenza A viruses usually cause self-limited acute respiratory infections (ARI). Underlying medical conditions are associated with complications from influenza and developing severe acute respiratory illness (SARI) which demand hospitalization and/or treatment in intensive care unit. In some cases SARI progresses in most severe form of acute lung injury named acute respiratory distress syndrome (ARDS). The aim of this study was to determine the presence of seasonal influenza A (H1N1) and A (H3N2) viruses, and pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus in patients with different clinical forms of illness, during the 2010/2011 winter season in the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia. Nasal and throat swab samples were collected from 87 patients. Thirty-seven of them had preexisting chronic illness. Influenza detection and subtyping using specific singleplex real-time RT-PCR assays recommended by World Health Organization (WHO) was performed in WHO National Influenza Centre in Institute of Public Health of Vojvodina in Novi Sad. The pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus was detected in 54% (47/87) of recruited patients. In examined samples, no seasonal influenza A (H1N1) and A (H3N2) viruses were identified. The percent of A (H1N1) 2009 positive cases was similar in group with and without preexisting chronic illness (24/37, 64.9% and 23/50, 46%, respectively), but there was a significant difference in the number of SARI (with and without ARDS) cases between positive patients from those two groups (23/24, 95.8% and 5/23, 21.7%, respectively; $P < 0.001$). Four of 28 (14.3%) patients with SARI developed ARDS, two with fatal outcome. The most common underlying illnesses among SARI patients were respiratory

disorders, malignancies, diabetes and immunological disorders. In the Autonomous Province of Vojvodina influenza A (H1N1) 2009 subtype was the predominant influenza virus throughout the winter season 2010/2011. The results of this study confirmed that chronic medical conditions increase the risk of severe disease due to influenza A (H1N1) 2009 virus infection.

Key words: influenza A viruses, SARI, ARDS

UVOD

U mnogobrojnih podtipova influenza A virusa, trenutno, u ljudskoj populaciji cirkulišu tri: sezonski A (H1N1) i A (H3N2) podtipovi i pandemijski A (H1N1) 2009 podtip. Ovi virusi izazivaju grip (influenca), odnosno akutnu respiratornu infekciju (ARI) praćenu naglim skokom temperature, kašljem, bolom u grlu, kijavicom, bolovima u mišićima i zglobovima, glavoboljom. Influenca se najčešće javlja u vidu sezonskih epidemija i povremenih pandemija, koje imaju značajan uticaj na morbiditet i mortalitet širom sveta. Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), godišnjim epidemijama influence biva zahvaćeno 5-15% ljudske populacije [1]. Mada u najvećem broju slučajeva simptomi bolesti spontano prolaze u roku od nekoliko dana, SZO procenjuje da se kod 1-5 miliona obolelih javljaju komplikacije koje rezultiraju teškim oblicima bolesti, što za posledicu ima između 250 i 500 hiljada smrtnih ishoda godišnje, širom sveta. Pored uzrasta, trudnoće, gestosti, podhranjenosti i HIV infekcije, postojanje hroničnih zdravstvenih problema (komorbiditet) predstavlja važan faktor rizika za nastanak komplikacija i razvoj teškog akutnog respiratornog oboljenja (severe acute respiratory illness - SARI) koje, usled teškoća sa disanjem, zahteva hospitalizaciju i/ili lečenje na odeljenjima intenzivne nege i terapije [2]. U nekim slučajevima, SARI progredira u najteži oblik akutne plućne bolesti nazvan akutni respiratorni distress sindrom (ARDS). Cilj ovog istraživanja bilo je utvrđivanje prisustva A (H1N1), A (H3N2) i A (H1N1) 2009 podtipova influenza virusa kod pacijenata sa različitim kliničkim formama oboljenja, tokom zimske sezone 2010/2011, u Autonomnoj pokrajini Vojvodini, Srbija.

METODE RADA

Istraživanjem je bilo obuhvaćeno 87 pacijenata sa oboljenjem nalik-influenca, koji su bili upućeni u Centar za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine radi postavljanja laboratorijske dijagnoze. Od njihovi uzorci dostavljeni iz domova zdravlja i bolnica sa područja Vojvodine. Tridesetsedam pacijenata je imalo prethodno dijagnostikovanu hroničnu bolest. Uzorkovanje je vršeno tokom zimske sezone 2010/2011, tj. u period od januara do marta 2011. Od svakog pacijenta uzet je bris grla i bris nosa koji su, odmah nakon uzorkovanja, uronjeni u istu posudu sa virusnim transportnim medijumom. Transport do laboratorije Nacionalnog influenza centra SZO u Centru za virusologiju Instituta za javno zdravlje Vojvodine, vršen je u ručnom frižideru na temperaturi od +4° C. Dalja obrada i testiranje uzoraka metodom real-time lančane reakcije polimeraze kojoj je prethodila reverzna transkripcija (reverse transcription polymerase chain reaction - RT PCR) vršeni su istog dana, a rezultati su u roku od 72 časa od prijema. Uzorci su kratko vorteksovani, a zatim su brisevi iscedeni centrifugom o zidove posude i odbačeni. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 2000 x g, uzorci su dekantirani. Ekstrakcija virusne RNK vršena je iz alikvota zapremine 140 µl, komercijalnim kitom (Orbamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen inc, Valencia CA, USA) prema uputstvu proizvođača. Reakcija real-time RT PCR izvedena je uz upotrebu AgPath kita (Applied Biosystems, CA, USA). Za detekciju i podtipizaciju influenza A virusa upotrebljeni su specifični setovi prajmera i proba za real-time RT PCR, preporučeni od strane SZO, koje Centres for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta, GA) distribuira Nacionalnim influenza centrima. Amplifikacija i detekcija virusnih RNK vršena je u Applied Biosystems 7500 real-time PCR uređaju, prema uputstvu dostavljenom sa prajmerima i probama.

REZULTATI

Pandemijski influenza A (H1N1) 2009 virus dokazan je kod 54% (47/87) pacijenata sa simptomima gripa. U ispitanim uzorcima nije dokazano prisustvo sezonskih influenza A (H1N1) i A (H3N2) podtipova. Kod 59.6% (28/47) pozitivnih pacijenata, bolest je imala težak tok, pri čemu se kod njih 14.3% (4/28) razvio ARDS. Kod 2 od 4 (50%) pacijenta sa ARDS, bolest je imala fatalan ishod. Procenat influenza A (H1N1) 2009 pozitivnih slučajeva nije se bitno razlikovao u grupi pacijenata sa (24/37, 64.9%) i bez komorbiditeta (23/50, 46%) (slika 1). Međutim, zastupljenost pojedinih oblika bolesti bitno se razlikovala između ove dve grupe pacijenata. Broj SARI slučajeva (sa ili bez ARDS) kod pozitivnih pacijenata u grupi sa hroničnim oboljenjem bio je signifikantno veći u odnosu na grupu bez hronične bolesti (23/24, 95.8% nasuprot 5/23, 21.7%; $P < 0.001$) (slika 2). Čak 82.1% (23/28) pacijenata sa teškim oblikom bolesti (SARI sa i bez ARDS) kao i svi zabeleženi slučajevi ARDS javili su se kod pacijenata sa od ranije postojećim hroničnim zdravstvenim problemima. Među hronično obolelim pacijentima obuhvaćenim ovim istraživanjem, najčešći faktor rizika za razvoj težih oblika influenza bile su hronične respiratorne bolesti, maligne bolesti, dijabetes i hronični poremećaji imunog sistema (Tabela 1).

DISKUSIJA

U ovom istraživanju, infekcija pandemijskim influenza A (H1N1) 2009 virusom, real-time RT PCR metodom, potvrđena je kod 54% (47/87) analiziranih pacijenata. Slično ovim rezultatima, Petrović i sar. (2011) su prethodne sezone 2009/2010, u regionu Vojvodine, prisustvo ovog podtipa dokazali kod 50.8% (160/315) pacijenata sa simptomima influence obuhvaćenih sentinel nadzorom ili hospitalizovanih usled teškog oblika bolesti (SARI) praćenog pneumonijom ili ARDS. Podtipovi sezonske influence A (H1N1) i A (H3N2) nisu dokazani ni u jednom testiranom uzorku. Ovaj podatak je u skladu sa podacima SZO [3] prema kojim je pandemijski podtip A (H1N1) 2009 dominirao na području Evrope i Bliskog istoka u sezoni 2010/2011, dok je sezonski podtip A (H3N2) dokazan u vrlo malom broju slučajeva. Rezultati prezentovani u ovom radu pokazuju da je broj teških slučajeva influence kod pozitivnih pacijenata u grupi sa hroničnim oboljenjem, bio signifikantno veći u odnosu na grupu bez hronične bolesti (23/24, 95.8% nasuprot 5/23, 21.7%; $P < 0.001$). Ukoliko se posmatraju samo teški slučajevi gripa, vidi se da je komorbiditet bio prisutan kod njih 82.1% (23/28). Slično ovim rezultatima, analiza podataka koji su se odnosili na pacijente hospitalizovane u 24 države SAD po izbivanju pandemije A (H1N1) 2009 virusom, ukazala je na to da je većina obolelih, tj. 73% (198/272) imala već postojeće hronične zdravstvene probleme [4]. Nasuprot tome, u istraživanju sprovedenom od strane Petrović i sar. [2] svega 33.7% (536/1591) pacijenata sa SARI imalo je neki od faktora rizika za nastanak teškog oblika gripa. Najteži oblik influence ARDS, razvio se kod 14.3% (4/28) pacijenata sa SARI, pri čemu je kod dvoje ishod bolesti bio fatalan (2/4, 50%). U istraživanju sprovedenom od strane Petrović i sar. [2], koje je obuhvatilo 1591 pacijenta sa SARI hospitalizovanog tokom sezone 2009/2010, ARDS je registrovan u manjem procentu u odnosu na rezultate ovog ispitivanja, odnosno kod 3.9% (62/1591) obolela, ali je procenat smrtnih ishoda među pacijentima sa ARDS bio identičan (50%, 31/62).

Značaj pojedinih hroničnih bolesti kao faktora rizika od komplikacija influence, varira sezonski i regionalno. Njihovo utvrđivanje i praćenje je važno kako bi se blagovremeno preduzele sve moguće mere prevencije teških oblika bolesti kod rizičnih grupa (vakcinacija, izolacija hronično obolelih i sl.). U ovom istraživanju, najčešće zabeležena hronična oboljenja kod pacijenata sa SARI bile su respiratorne bolesti, maligniteti, dijabetes i imunološki poremećaji. Prema SZO [3] glavni faktori rizika za nastanak teških oblika bolesti u Evropi tokom sezone 2010/2011 bile su hronične respiratorne bolesti, dok su u SAD dominirale kardiovaskularne bolesti, zatim astma i druge respiratorne bolesti, kao i hronični poremećaji metabolizma. Prethodne sezone, odnosno u prvih mesecima nakon izbivanja pandemije A (H1N1) 2009 virusom, među pacijentima hospitalizovanim u 24 države SAD, najčešći hronični zdravstveni poremećaj bila je astma, nakon čega su sledili dijabetes, imunološki poremećaji i bolesti srca [4]. Astma je bila najčešće zabeležena hronična bolest i kod 631 pacijenta hospitalizovanog iste godine, u periodu april-septembar, širom Engleske, a pratila

... je kardiovaskularne bolesti i dijabetes [5]. S druge strane, tokom sezone 2009/2010, u Kini su među 3797 teško obolelih pacijenata češće registrovane neke druge hronične respiratorne bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes i hronična oboljenja bubrega, jetre, imunog sistema i neurološki poremećaji [6].

ZAKLJUČCI

Na području Autonomne pokrajine Vojvodine, Srbija, influenza A (H1N1) 2009 virus je dominirao tokom zimske sezone 2010/2011. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da prisustvo hroničnog oboljenja povećava rizik od nastanka teškog oblika bolesti izazvane influence A (H1N1) 2009 virusom.

LITERATURA

1. World Health Organization. Influenza Fact Sheet N°211 [internet]. 2003 [cited 2012 Apr 1]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
2. Petrović V, Šeguljev Z, Čosić G, Ristić M, Nedeljković J, Dragić N, Ukropina S. Overview of the winter wave of 2009 pandemic influenza A (H1N1)v in Vojvodina, Serbia. *Croat Med J.* 2011; 112:441-50.
3. World Health Organization. Review of the 2010-2011 winter influenza season. Northern Hemisphere. *Weekly epidemiological record.* 27 MAY 2011; 86(22):222-7. Available from: <http://www.who.int/wer/2011/wer8622.pdf>.
4. Simonsen L, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, i sar. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, april-june 2009. *N Engl J Med.* 2009; 361(20):1935-42.
5. Nguyen-Van-Tam JS, Openshaw PJM, Hashim A, Gadd EM, Lim WS, Semple MG, i sar. Risk factors for hospitalization and poor outcome with pandemic A/H1N1: United Kingdom first wave (2009-September 2009). *Thorax.* 2010; 65:645-51.
6. Du R, Feng Z, Uyeki TM, Liao Q, Zhou L, Feng L, i sar. Risk factors for severe illness with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *Clin Infect Dis.* 2011; 52(4):457-65.

Ovo je realizovan po projektu TR 31084 koji se finansira od strane Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije.