

Sainjargal Byambasuren<sup>1</sup>, Lidia B. Brydak<sup>2</sup>

## Diagnostyka laboratoryjna grypy

### Laboratory diagnosis of influenza

<sup>1</sup> „EASTMED” Medycyna Rodzinna, Akupunktura, Medycyna Estetyczna, Warszawa, Polska

<sup>2</sup> Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, Warszawa, Polska

Adres do korespondencji: Lidia B. Brydak, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel.: +48 691 352 979, e-mail: brydaklidia@gmail.com

#### Streszczenie

Grypa była i jest przyczyną licznych zachorowań, a w konsekwencji niejednokrotnie wielonarządowych powikłań pogrypowych, często nieodwracalnych komplikacji prowadzących do zgonu. To ostra choroba zakaźna wywoływana przez wirus grypy typu A, B, C należący do rodziny *Orthomyxoviridae*. Zakażenia wywoływane przez wirus grypy rejestrowane są w każdym sezonie epidemicznym. Infekcje grypowe należy rozpatrywać nie tylko w aspekcie zdrowotnym, ale również policzalnym, wymiernym aspekcie ekonomicznym. Grypa od wielu lat należy do podstawowych priorytetów zdrowia publicznego. Jednym z istotnych elementów zdrowia publicznego jest wirusologiczny i epidemiologiczny nadzór nad grypą, prowadzony w każdym sezonie epidemicznym. Nadzór wirusologiczny obejmuje laboratoryjne potwierdzenia zakażenia, natomiast nadzór epidemiologiczny to monitoring przypadków zachorowań i podejrzeń zachorowań na grypę. Diagnostyka laboratoryjna grypy polega na potwierdzeniu antygenu wirusa grypy w materiale pobranym od chorego, wyizolowaniu wirusa grypy oraz potwierdzeniu zakażenia wirusem grypy na podstawie wykrycia przyrostu poziomu przeciwciał w surowicy. Wyizolowanie krążących wirusów grypy w danym sezonie epidemicznym jest niezbędne do celu przygotowania szczepionki przeciwko grypie. Przeprowadzenie możliwie wcześniej prawidłowej diagnostyki wirusologicznej infekcji układu oddechowego, ze szczególnym uwzględnieniem grypy, ma bardzo duże znaczenie, zwłaszcza obecnie, zarówno pod względem leczniczym, jak i ekonomicznym. W niniejszym artykule przedstawione zostały aktualnie stosowane w Polsce metody diagnostyki grypy – zawarte w nim informacje mają pomóc lekarzom w podjęciu decyzji o zasadności laboratoryjnego potwierdzenia diagnozy w aspekcie możliwości leczenia w celu uniknięcia wielonarządowych powikłań pogrypowych.

**Słowa kluczowe:** grypa, badanie diagnostyczne, metody biologii molekularnej, metody serologiczne

#### Abstract

Influenza has always been and still is the cause of considerable morbidity and, consequently, frequent multiorgan complications, often irreversible and even fatal. It is an acute infectious disease caused by type A, B and C viruses, members of the family *Orthomyxoviridae*. Infections caused by the influenza virus are reported in every epidemic season. Influenza infections should be considered not only in the aspect of health, but also in the quantifiable, measurable economic aspect. For many years, influenza has been one of the basic priorities of public health. Virological and epidemiological surveillance of influenza, which is implemented in each epidemiological season, is one of the key elements of public health. Virological surveillance involves laboratory confirmation of infection, while epidemiological surveillance involves monitoring of actual and suspected cases of influenza. Laboratory diagnosis is performed to confirm influenza virus antigen in the material collected from the patient, isolate the virus and confirm viral infection based on increased serum antibody levels. Isolating influenza viruses that circulate in a given epidemiological season is necessary to prepare a vaccine against influenza. An early and correct virological diagnosis of respiratory infection, with particular reference to influenza, is currently of great importance in terms of both medical and economic aspects. The paper discusses influenza diagnostic methods currently used in Poland to help physicians in deciding whether laboratory confirmation of diagnosis is justified in the aspect of possible treatment to avoid influenza-induced multiple organ complications.

**Keywords:** influenza, diagnostic test, molecular biology methods, serological methods

**G**rypa jest ostrą chorobą zakaźną wywoływaną przez wirusy grypy typu A, B lub C należące do rodziny *Orthomyxoviridae*. W czasie bezpośredniego kontaktu z osobą zakażoną wirus jest przenoszony poprzez wdychanie mikroskopijnych wydzielin z dróg oddechowych chorego; wykazuje on najwyższą zakaźność w objawowym okresie infekcji<sup>(1)</sup>. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia rocznie z powodu grypy choruje na świecie 5–10% osób dorosłych i 20–30% dzieci. Jako ciężkie przypadki można zakwalifikować 3–5 mln zachorowań, w tej grupie około 250–635 tys. pacjentów umiera<sup>(2,3)</sup>. Należy mieć świadomość, że grypa jest chorobą sezonową, ale ze względu na prowadzoną rejestrację chorób zakaźnych i niezakaźnych oraz na finanse budżetu państwa dane te są podawane w skali roku. Kliniczny obraz odpowiadający grypie to nagle wystąpienie choroby, charakteryzujące się dużą zakaźnością. Po okresie inkubacji pojawiają się:

- **objawy ogólne** – złe samopoczucie, uczucie ogólnego rozbicia, dreszcze, przeczulica skóry, gorączka powyżej 38°C;
- **objawy ze strony układu oddechowego** – surowicza wydzielina z nosa, ból gardła, chrypka, bóle w klatce piersiowej, suchy, szczekający kaszel, prowokujący wymioty;
- **objawy ze strony innych układów** – bóle głowy, brak łaknienia, bóle mięśniowe, zawroty głowy, biegunka, bóle brzucha, nudności i wymioty. Sennaść lub ospałość występuje u około 50% dzieci poniżej 4. roku życia i tylko u 10% dzieci 5.–14. roku życia. Objawy żołądkowo-jelitowe, głównie nudności i wymioty, stwierdza się bardzo często u dzieci i rzadziej u dorosłych<sup>(4,5)</sup>. Kliniczny przebieg choroby wywołanej wirusem grypy zależy od właściwości wirusa, wieku pacjenta, stanu immunologicznego, palenia tytoniu, współistnienia chorób, np. serca, płuc, wydolności nerek, immunosupresji, ciąży, stanu odżywiania oraz przestrzegania podstawowych zasad higieny<sup>(5)</sup>. Wirus grypy występuje co sezon epidemiczny, charakteryzuje go: wysoka zakaźność, możliwość zakażenia i zgon bez względu na wiek pacjenta, stała mutacja, komplikacje pogrypowe, wymierne, policzalne skutki ekonomiczne, bezwzględna konieczność działań profilaktycznych<sup>(2,4–8)</sup>.

Z powodu podobieństwa obrazu klinicznego i przebiegu choroby do tzw. chorób grypopodobnych rozpoznanie grypy na podstawie objawów klinicznych możliwe jest tylko podczas epidemii. Wirusowe zakażenie układu oddechowego charakteryzuje się tym, że z jednej strony jeden i ten sam wirus może wywoływać różne objawy kliniczne, z drugiej ten sam zespół objawów może być wywołany przez różne wirusy. Dlatego należy liczyć się z tym, że materiał pobrany z górnych dróg oddechowych może być badany wielokierunkowo<sup>(8–10)</sup>. Od wielu lat dostępne są różnego rodzaju zestawy komercyjne, pozwalające wykryć – za pomocą metody biologii molekularnej – obecność np. 15 patogenów dróg oddechowych. Są wśród nich: wirus grypy typu A i B, RSV (*respiratory syncytial virus*) typu A i B, wirus paragrypy typu 1.–4., ludzki metapneumowirus (*human metapneumovirus*, hMPV), adenowirusy, rynowirusy, koronawirusy 229/NL63 i OC43/HKU1 i enterowirus<sup>(9,10)</sup>. Powyższe badanie, jak również innego

rodzaju badania wirusologiczne przy użyciu metod biologii molekularnej, np. rodzaj subtypu czy rodzaj linii wirusa grypy typu B, można wykonać w Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny (NIZP-PZH) w Warszawie. W zależności od rodzaju badania wynik otrzymujemy po kilku–kilkunastu godzinach<sup>(9,10)</sup>. Ma to bardzo duże znaczenie dla podjęcia leczenia, które powinno być wdrożone przy zastosowaniu leków antygrypowych nowej generacji do 36–48 godzin od wystąpienia pierwszych objawów choroby<sup>(5,8,11–15)</sup>.

Grypa nie jest chorobą patognomiczną – objawy grypopodobne może wywołać ponad 200 wirusów, w tym wirusy paragrypy, adenowirusy, rynowirusy, koronawirusy, wirus RS, wirusy *Coxsackie*, hMPV powodujące zachorowania w tym samym czasie co wirus grypy. Z tego powodu laboratoryjne potwierdzenie zakażenia wirusem grypy ma istotne znaczenie dla kontroli zachorowań na grype i stanowi ważny element zdrowia publicznego, oceny skuteczności szczepionek i leków przeciwgrypowych nowej generacji<sup>(8,12,15)</sup>. Chociaż objawy chorobowe grypy są dość charakterystyczne, to jednak nie mogą one być jedyną podstawą do ustalenia pewnego i pełnego rozpoznania, szczególnie w okresach międzyepidemicznych. Konieczne są zatem diagnostyczne badania laboratoryjne, w tym wirusologiczne i serologiczne, których przeprowadzenie ma szczególnie istotne znaczenie w przypadku pacjentów, u których układ immunologiczny nie działa jeszcze sprawnie – dotyczy to małych dzieci czy sytuacji, kiedy nie funkcjonuje on już idealnie, a więc przewlekle chorych, osób przyjmujących leki immunosupresyjne, ludzi starszych oraz pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka, u których wirusowe infekcje oddechowe mogą mieć poważniejszy przebieg i konsekwencje niż u osób potencjalnie zdrowych – mogą wiązać się z wysokim ryzykiem wystąpienia komplikacji<sup>(1,4,8,12)</sup>. Ważne jest więc, by odpowiednio szybko zidentyfikować czynnik etiologiczny, i na tej podstawie zdecydować, jak postępować, zważywszy na możliwość zastosowania leków antygrypowych nowej generacji – inhibitorów neuraminidazy<sup>(4,7,8,11,13)</sup>.

Diagnostyka laboratoryjna grypy polega na:

- potwierdzeniu obecności antygenu wirusa grypy w materiale pobranym od chorego;
- serologicznym potwierdzeniu zakażenia wirusem grypy na podstawie wykrycia przyrostu poziomu przeciwciał w surowicy pacjenta.

Obecność antygenu wirusa grypy możemy potwierdzić między innymi przy użyciu następujących metod:

- wykrycie RNA specyficznego dla wirusa grypy RT-PCR (różne metody biologii molekularnej);
- test immunofluorescencyjny (IF);
- test immunoenzymatyczny (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA);
- testy „przyłóżkowe” różnego typu;
- izolacja wirusa grypy:
  - w 11-dniowych zarodkach kurzych,
  - w hodowlach tkankowych, np. MDCK, MDCK-SIAT 1.

## DIAGNOSTYKA WIRUSOLOGICZNA

**Diagnostyka molekularna** należy do najdynamiczniej rozwijających się działów biologii i medycyny. Różnice między diagnostyką klasyczną a molekularną polegają przede wszystkim na zwiększeniu szybkości, specyficzności oraz czułości wykonywania badań, dlatego też diagnostyka molekularna jest coraz częściej stosowana w różnych dziedzinach nauk, w tym biotechnologii i medycynie<sup>(5,7,9,11)</sup>.

Od wielu lat największe zainteresowanie wśród metod diagnostyki wirusologicznej grypy wzbudzają różne techniki biologii molekularnej. Metody te, np. reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*, PCR), PCR z odwrotną transkryptazą (*reverse transcriptase PCR*, RT-PCR) i PCR w czasie rzeczywistym (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy DNA – *real-time PCR*, *quantitative PCR*, qPCR), pozwalają na wykrycie materiału genetycznego wirusa w badanej próbce, nawet jeśli w wyjściowym materiale pobranym od chorego jego ilość była niewielka. Ponadto materiał nie musi być świeżo pobrany, co ma duże znaczenie kliniczne w razie potrzeby przesłania badanego materiału do odległej placówki diagnostycznej. Należy podkreślić, że metody biologii molekularnej są niezbędne dla określenia typu wirusa grypy, jak również do sekwencjonowania szczepów jako kandydatów do sezonowego doboru optymalnego składu szczepionki przeciwko grypie<sup>(12,14,15)</sup>.

### Klasyczny PCR

Metoda ta pozwala na wykrycie i powielenie materiału genetycznego patogenów z wykorzystaniem łańcuchowej reakcji polimerazy. Po raz pierwszy PCR został zastosowany w 1983 roku przez amerykańskiego biochemika Kary'ego Mullisa, uhonorowanego Nagrodą Nobla w 1993 roku. Matrycą w PCR jest zawsze DNA, ale materiałem wyjściowym może być RNA. Większość wirusów oddechowych to wirusy o informacji genetycznej zapisanej w postaci sekwencji kwasu rybonukleinowego RNA. Identyfikacja wirusów RNA związana jest z przeprowadzeniem reakcji odwrotnej transkrypcji (*reverse transcriptase PCR*, RT-PCR), która polega na przepisaniu informacji genetycznej na komplementarną sekwencję DNA – cDNA z wykorzystaniem enzymu odwrotnej transkryptazy w reakcji jedno- lub dwuetapowej. Dwuetapowa reakcja RT-PCR polega na przepisaniu RNA na cDNA w jednej próbce, następnie w drugiej próbce przebiega amplifikacja określonych sekwencji. Dwuetapowa reakcja RT-PCR wykazuje lepszą czułość i wydajność niż reakcja jednoetapowa. Jednak zastosowanie *one-step PCR* przebiega szybciej, zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia próbki oraz zwiększa powtarzalność wyników<sup>(7,11,12)</sup>. Obecnie klasyczny PCR jest coraz częściej wypierany przez RT-PCR. Wykrywanie wirusa grypy typu A i B metodą RT-PCR w Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy w NIZP-PZH posiada akredytację Polskiego Centrum Akredytacji<sup>(9)</sup>.

## PCR w czasie rzeczywistym

Reakcja PCR składa się z czterech faz. Pierwszą z nich stanowi faza wstępna, polegająca na przyłączeniu starterów do komplementarnych sekwencji matrycy. Następnie w fazie wykładniczej następuje wykładniczy przyrost produktu. W kolejnej fazie – logarytmicznej – stopniowo zużywają się reagenty i dochodzi do zatrzymania reakcji w ostatniej fazie – *plateau*.

*Real-time PCR*, czyli PCR w czasie rzeczywistym, stanowi modyfikację klasycznej PCR. Ta nowelizacja polega na zastosowaniu odpowiednich barwników, sond oraz aparatury, która umożliwia monitorowanie przyrostu produktu w każdym kolejnym cyklu reakcji. Zasadniczą rolę odgrywa wartość cyklu progowego (Ct, *threshold cycle* lub Cp, *crossing point*), która wskazuje, ile razy została powielona matryca, tak że emitowana fluorescencja osiągnęła wartość progową (Ft, *fluorescence threshold*)<sup>(16)</sup>. Im wyższe stężenie matrycowego DNA, tym krzywa amplifikacji szybciej przekroczy wartość progową i osiągnie niższą wartość. Reakcja *real-time PCR* ma jednak swoje ograniczenia, które mogą zaburzyć dokładność pomiaru, począwszy od nieprawidłowej izolacji materiału klinicznego i jakości substratów reakcji, poprzez obecność inhibitorów reakcji, a na rodzaju analizatora czy błędach ludzkich skończywszy<sup>(17)</sup>. Niewątpliwie jednak *real-time PCR* uznawany jest za wzorcowy przykład ilościowej reakcji PCR.

Zastosowanie qPCR w wirusologii umożliwia przewidywanie stanu zakażenia, identyfikację etapów wirusowego zakażenia oraz monitorowanie skuteczności zastosowanej terapii przeciwwirusowej<sup>(1,7,12,13)</sup>.

Metoda *real-time PCR* jest coraz częściej stosowana w badaniach diagnostycznych z uwagi na szybkość uzyskania wyniku oraz jego powtarzalność, ponadto zachowany jest wysoki stopień czułości, nawet przy analizie próbek o niewielkiej objętości. Metoda *real-time PCR* znacznie skraca czas – z kilku godzin do kilkadziesiąt minut – uzyskania wyniku i postawienia diagnozy, co ma duże znaczenie w przypadku zakażenia grypą<sup>(5,9,14)</sup>.

W Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy w NIZP-PZH stosuje się metodę *real-time PCR* do wykrywania nie tylko wirusów grypy typu A i B, ale również subtypów grypy typu A i linii wirusów grypy typu B. Metody biologii molekularnej charakteryzują się wysoką czułością i specyficznością<sup>(5,9,12,18–20)</sup>. Obecność wirusa grypy można również stwierdzić w pojedynczych przypadkach nie tylko przyżyciowo, ale również na podstawie badań materiału sekcyjnego (śledziona, serce, płuca)<sup>(21)</sup>. Należy podkreślić, że dzięki zastosowaniu badań biologii molekularnej można było zidentyfikować strukturę wirusa grypy A/H1N1/, który spowodował pandemię w latach 1918–1919<sup>(21)</sup>.

Oprócz Zakładu Badania Wirusów Grypy, Krajowego Ośrodka w NIZP-PZH ([www.pzh.gov.pl](http://www.pzh.gov.pl), Krajowy Ośrodek ds. Grypy – [nic@pzh.gov.pl](mailto:nic@pzh.gov.pl)) w Polsce badania wirusologiczne potwierdzające infekcję grypową wykonywane są

w 16 wojewódzkich stacjach sanitarno-epidemiologicznych (WSSE), niektórych laboratoriach szpitalnych oraz prywatnych laboratoriach.

Obecnie różne metody biologii molekularnej stosowane w celu potwierdzenia zakażenia grypą ze względu na wysoką czułość, specyficzność oraz czas otrzymania wyniku potwierdzający zakażenie grypą, a tym samym możliwość podjęcia odpowiedniego leczenia, ograniczyły stosowanie diagnostycznych testów IF, jak również testów ELISA<sup>(5,7,11)</sup>.

### Testy immunofluorescencyjne

Do badań diagnostycznych używane były zarówno testy immunofluorescencji bezpośredniej (*direct immunofluorescence*, DIF), jak i pośredniej (*indirect immunofluorescence assay*, IFA). W metodzie DIF wykorzystuje się swoiste przeciwciała skoniugowane bezpośrednio z fluorochromem (fluoresceiną) i skierowane przeciwko określonym antygenom danego wirusa lub niewyznakowane przeciwciała, a następnie znakowane fluorochromem przeciwciała antyglobulinowe (metoda pośrednia)<sup>(5,7,11,12)</sup>.

IFA wykazuje wyższą czułość niż DIF. Opracowane zostały również testy komercyjne, np. testy IF dla tzw. zespołu oddechowego, pozwalające na pełne badanie siedmiu wirusów: wirusa grypy typu A i B, paragrypy typu 1, 2 i 3, adenowirusów, wirusa RS, a wynik otrzymywany był w ciągu kilku godzin.

Metoda immunofluorescencji wymaga jednak szybkiego dostarczenia doskonałej jakości materiału do laboratorium diagnostycznego w stanie niezamrożonym oraz przechowywania i transportowania w odpowiedniej temperaturze<sup>(5)</sup>. Badanie należy wykonać możliwie jak najszybciej, aby zapobiec uszkodzeniu komórek. Analiza i interpretacja wyników testów IF zależy w dużym stopniu od doświadczenia i kompetencji osoby badającej preparat. Badania te wykonują niektóre pracownie wirusologiczne WSSE.

### Testy ELISA

Testy ELISA to testy immunoenzymatyczne – wykrywają antygeny wirusowe, wykorzystują przeciwciała monoklonalne skoniugowane z enzymem. Antygen rozpoznawany jest bezpośrednio przez wyznakowane przeciwciała lub pośrednio poprzez dodanie swoistych niewyznakowanych przeciwciał, natomiast w drugiej kolejności wyznakowanych przeciwciał antyglobulinowych. Obecnie jest wiele komercyjnych testów ELISA, które nie stanowią trudności ani w obsłudze, ani w interpretacji wyniku<sup>(5,11)</sup>. Badania te wykonują tylko niektóre prywatne laboratoria.

### Szybkie testy diagnostyczne

Od kilku lat jako badania skriningowe są stosowane szybkie testy diagnostyczne, tzw. testy przyłóżkowe, np. testy AB FLU OIA, Directigen Flu A, Directigen Flu A+B, QuickVue

Influenza Test, Zstat Flu, pozwalające na bezpośrednią wizualną detekcję antygeny wirusa grypy A i B w ciągu około 15–30 minut. Testy te różnią się m.in. czułością i swoistością, czasem wykonywania. Należy je traktować jedynie jako wstępne testy skriningowe, które mogą być wykonane przez lekarza lub pielęgniarkę podczas wizyty pacjenta<sup>(5,10,22)</sup>. Wynik pozytywny takiego testu powinien być jednak potwierdzony przez inne badanie wirusologiczne, najczęściej przeprowadzane za pomocą różnych metod biologii molekularnej, np. *real-time PCR*<sup>(10,22)</sup>. Szybkie testy diagnostyczne w kierunku zakażenia grypą wykonują Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy, niektóre pracownie wirusologiczne w WSSE, niektóre laboratoria szpitalne, prywatne laboratoria oraz prywatne praktyki lekarskie.

### Izolacja wirusa grypy

Pomimo że w rutynowej diagnostyce – laboratoryjnej identyfikacji infekcji grypowej stosowane są metody biologii molekularnej, to dalej złotym standardem w diagnostyce wirusa grypy jest izolacja wirusa w 11-dniowych zarodkach kurzych (namnażanych w omocznii i/lub w owodni) oraz w hodowli tkankowej<sup>(5)</sup>. Jedynie w Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy izolacje wirusów grypy przeprowadzane są zarówno w 11-dniowych zarodkach kurzych, jak i w hodowli tkankowej MDCK (*Madin-Darby Canine Kidney*, tkanka nabłonkowa nerki psa)<sup>(5)</sup>. Obecnie niektóre pracownie wirusologiczne w WSSE przeprowadzają izolację wirusa grypy w hodowli tkankowej MDCK. Izolacja wirusa w zarodkach kurzych jest pracochłonna i w zależności od typu wirusa trwa do około 15 dni lub dłużej<sup>(5,9,12)</sup>.

Wyizolowanie wirusa wywołującego aktualnie grypę, jego identyfikacja i określenie podobieństwa antygenowego krążących szczepów w danym sezonie, jak również przeprowadzenie szczegółowych badań przy użyciu technik biologii molekularnej, w tym również sekwencjonowanie wirusa, są niezbędne w celu przygotowania szczepionki, czyli wytypowania szczepów kandydatów do antygenowego składu szczepionki, jak również ze względów epidemiologicznych<sup>(12,14,15)</sup>. Warto wiedzieć, że jakkolwiek od czasu pierwszego zezwolenia na podanie szczepionki przeciwko grypie minęło 76 lat, to dalej jej produkcja prowadzona jest w zarodkach kurzych<sup>(15)</sup>.

Należy podkreślić, że izolacja wirusa grypy od pacjenta jest bardzo cenną informacją o odmianie antygenowej, tj. typie wirusa czy subtypie wirusa krążącego w kraju i powodującego wzrost zachorowań, ale również ma bardzo duże znaczenie dla Międzynarodowego Programu Nadzoru nad Grypą (Global Influenza Surveillance and Response System, GISRS), w którym Polska uczestniczy od 1957 roku<sup>(9,12)</sup>. Należy dodać, że Światowa Organizacja Zdrowia w 1947 roku, na IV Międzynarodowym Kongresie Mikrobiologów w Kopenhadze, utworzyła światowy program nadzoru nad grypą. W obecnym kształcie bierze

w nim udział sześć międzynarodowych centrów referencyjnych – WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza – mieszczących się w Londynie, Atlancie, Memphis, Tokio, Pekinie oraz Melbourne.

Obecnie w GISRS uczestniczy 144 krajowych ośrodków ds. grypy w 114 krajach, jednakże liczba powoływanych krajowych ośrodków ds. grypy z roku na rok rośnie<sup>(14)</sup>. W Polsce w GISRS uczestniczy 16 WSSE, a funkcję koordynatora spełnia Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy<sup>(9)</sup>.

GISRS ma na celu nie tylko określenie zmian antygenowych krążących wirusów w sezonie epidemicznym, ale również ostrzeżenie o pojawieniu się nowych subtypów wirusa grypy typu A – możliwego sprawcy pandemii grypy w XXI wieku. Niekwestionowanym dowodem fundamentalnej roli GISRS była informacja z Krajowego Ośrodka ds. Grypy z Hongkongu przekazana 9 maja 1997 roku, kiedy to po raz pierwszy w historii grypy wirus ptasiej grypy A/H5N1/ złamał barierę gatunkową i stał się patogenny dla człowieka – krąży do dnia dzisiejszego<sup>(23)</sup>. Po szeroko zakrojonych badaniach przy użyciu różnych metod biologii molekularnej wyizolowany wirus został oznakowany jako wirus ptasiej grypy A/H5N1/HPAI (*highly pathogenic avian influenza*) – wysoce patogenny wirus ptasiej grypy. Uwzględniając międzynarodowy system oznakowania izolowanych wirusów grypy, wirus oznakowano jako: A/Hongkong/156/97(H5N1) HPAI, gdzie litera A oznacza typ wirusa, Hongkong – miejsce geograficzne izolacji, 156 – numer izolacji, 97 – rok izolacji (1997), H5 – antygenowy podtyp hemaglutyniny (H), N1 – antygenowy podtyp neuraminidazy (N).

Wyizolowane wirusy grypy w danym sezonie epidemicznym w każdym kraju po analizie antygenowej grypy wraz z pełną dokumentacją zgodną z wymogami Światowej Organizacji Zdrowia przesyłane są do jednego z sześciu ośrodków referencyjnych do dalszych badań, w tym jednego w Polsce, mieszczącego się w Zakładzie Badania Wirusów Grypy. Polski Krajowy Ośrodek ds. Grypy co sezon epidemiczny przesyła wyizolowane w kraju wirusy grypy do WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Francis Crick Institute (Londyn, Anglia).

### Pobieranie materiałów do badań

Obecność antygenów wirusa grypy w próbach klinicznych można potwierdzić, pobierając materiał za pomocą: wymazu z nosa i gardła, popłuczyn z nosogardzieli, wysięku z ucha środkowego, aspiratu odessanego z nosowej części gardła, popłuczyn z drzewa oskrzelowego, płynu mózgowo-rdzeniowego. Obecność wirusa grypy można również stwierdzić w pojedynczych przypadkach nie tylko przyżyciowo, ale również na podstawie badań materiału sekcyjnego (np. śledziona, serce, płuca)<sup>(9,21)</sup>.

Bez względu na wybór metody potwierdzającej infekcję grypową na prawidłowy wynik badania mają wpływ: umiejętność pobrania wymazu, czas, w jakim materiał zostanie

dostarczony do specjalistycznej placówki, warunki transportu, tj. temperatura, czas trwania objawów chorobowych w momencie wykonywania testu, informacje o stosowanych lekach, np. antygrypowych. W zależności od rodzaju badania istnieją procedury, które szczegółowo opisują tryb postępowania z próbką pobraną od pacjenta – są umieszczane na stronie internetowej danego laboratorium, tak jak to ma miejsce w przypadku badań wykonywanych w Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy w NIZP-PZH. Dla ułatwienia przedstawimy kolejność działań, jakie należy wykonać, aby zapoznać się z procedurą – od pobrania materiałów do cennika: wpisać: 1) [www.pzh.gov.pl](http://www.pzh.gov.pl); 2) Struktura; 3) Pion Zastępcy Dyrektora ds. Bezpieczeństwa Epidemiologicznego i Środowiskowego; 4) Zakład Badania Wirusów Grypy. Krajowy Ośrodek ds. Grypy; pliki pkt 6 – Zalecenia dotyczące pobierania, przechowywania i transportu materiałów klinicznych przeznaczonych do badań diagnostycznych w Laboratorium Zakładu Badania Wirusów Grypy; pkt 1 – Rodzaj materiału klinicznego w zależności od kierunku i metodyki badań wraz z ilustrującymi rycinami, jak pobierać materiał oraz fot. prawidłowego pobrania materiału; pliki pkt 7 – Formularz zlecenia wykonania badania diagnostycznego w Laboratorium Zakładu Badania Wirusów Grypy NIZP-PZH; Działalność – Usługowa, cennik – Część I. Usługi w zakresie opieki medycznej – wirusologiczne, molekularne i serologiczne badania diagnostyczne<sup>(9,10)</sup>.

Natomiast w przypadku szybkich testów należy zastosować się do wymogów producenta. Materiał w postaci wymazu lub popłuczyn z górnych dróg oddechowych należy pobrać nie później niż 48 godzin od chwili wystąpienia objawów klinicznych, wskazujących na infekcję wirusem grypy<sup>(10)</sup>.

### DIAGNOSTYKA SEROLOGICZNA

Poza badaniami wirusologicznymi możliwe jest też wykonanie badania serologicznego, które umożliwia serologiczne potwierdzenie zakażenia wirusem grypy na podstawie wykrycia przyrostu poziomu przeciwciał w surowicy pacjenta<sup>(5,7,24–26)</sup>. Z tego względu procedura ta wymaga równoległych badań w dwóch próbkach surowicy chorego, pobranych w ostrym i rekonwalescencyjnym okresie choroby lub ewentualnie w okresie rekonwalescencji, a następnie po kilku tygodniach (wówczas obserwuje się spadek poziomu przeciwciał).

Obecnie w kraju test zahamowania hemaglutynacji (OZHA) jest rutynowym testem stosowanym przez klinicystów, określającym poziom przeciwciał antyhemaglutyninowych po przebytej infekcji grypowej lub szczepieniu przeciwko grypie<sup>(25–29)</sup>. Test ten opiera się na zdolności przeciwciał przeciw hemaglutyninie do hamowania wywołanej przez wirus aglutynacji erytrocytów. Z kolei test zahamowania neuraminidazy (NI) używany jest głównie w badaniach naukowych do oceny immunologicznej skuteczności szczepień, w szczególności w grupach podwyższonego ryzyka, wraz z testem zahamowania hemaglutynacji<sup>(25–29)</sup>.

W Polsce zarówno test zahamowania hemaglutynacji, jak i test zahamowania neuraminidazy wykonywane są tylko w Zakładzie Badania Wirusów Grypy, Krajowym Ośrodku ds. Grypy w NIZP-PZH<sup>(10,25–30)</sup>.

Testy serologiczne do mierzenia odpowiedzi immunologicznej dla wirusa grypy przeprowadzane są z różnych przyczyn. Służą one do celów diagnostycznych, do oceny odporności po naturalnym zakażeniu lub powstałej po podaniu szczepionki przeciw grypie.

Testy do pomiaru odporności komórkowej nie są powszechnie stosowane w diagnostyce, ale przyczyniają się do rozszerzenia informacji o mechanizmach obronnych organizmu<sup>(7,12)</sup>.

Należy dodać, że stosowane były również inne testy serologiczne, takie jak: odczyn wiązania dopełniacza, metody szybkiej diagnostyki enzymatycznej (ELISA) czy pojedyncza radialna hemoliza (*single radial haemolysis*, SRH) – używana w niektórych ośrodkach badawczych do mierzenia przeciwciał skierowanych przeciw wirusowi grypy. Obecnie testy te używane są tylko w badaniach naukowych<sup>(7,11,15)</sup>. Są przydatne w badaniach epidemiologicznych, zaś w diagnostyce mogą jedynie potwierdzić rozpoznanie u chorego, który przeżył już ostry okres choroby. Rozpoznanie powinno być jednak potwierdzone wcześniej, zwłaszcza u ciężko chorych pacjentów. Konieczność badania par surowic w wyżej wymienionych testach nadaje diagnostyce charakter retrospektywny, a to ogranicza ich przydatność w licznych sytuacjach klinicznych.

## ZNACZENIE DIAGNOSTYKI

Przeprowadzanie diagnostyki wirusologicznej infekcji układu oddechowego ze szczególnym uwzględnieniem grypy ma wielorakie znaczenie, a mianowicie pozwala:

- uniknąć antybiotykoterapii bez wskazań – antybiotyki nie działają na wirusa grypy, używane są w przypadku nadkażeń bakteryjnych;
- podjąć właściwe leczenie przy pomocy dostępnych obecnie leków antygrypowych nowej generacji, czyli inhibitorów neuraminidazy (np. zanamiwir, oseltamiwir czy peramiwir) – wskazana jest duża ostrożność, aby zapobiec powstawaniu szczepów opornych na te inhibitory;
- podjąć stosowne środki w celu zapobieżenia szerzeniu się zakażenia (np. izolacja chorego, przestrzeganie podstawowych zasad higieny itp.);
- skrócić pobyt w szpitalu;
- zmniejszyć koszty leczenia powikłań pogrypowych;
- obalić mity związane ze szczepieniami, prowadzące do ich unikania.

Postawienie wczesnej, prawidłowej i pełnej diagnozy wirusologicznej infekcji układu oddechowego, ze szczególnym uwzględnieniem grypy, ma obecnie bardzo duże znaczenie nie tylko w aspekcie leczniczym i ekonomicznym<sup>(6,8)</sup>. Jest również istotne dla wykrycia nowego, niezidentyfikowanego patogenu, co potwierdziło się już wielokrotnie, np. w 1997, 1999, 2003 i 2004 roku<sup>(8,14)</sup>.

Na przełomie XX i XXI wieku miały miejsce zakażenia ludzi ptasimi wirusami grypy, które złamały barierę gatunkową i zakażyły człowieka. Wydarzenia te zwracają uwagę z jednej strony na poważne niebezpieczeństwo nadejścia nowej pandemii wirusa grypy, z drugiej zaś na konieczność wzmocnienia międzynarodowego nadzoru nad gripą, zwłaszcza monitoringu wirusologicznego przy zastosowaniu właściwej diagnostyki<sup>(8,12,14)</sup>.

Duża zmienność wirusa grypy powinna uzmysłwić nam rolę i znaczenie badań diagnostycznych oraz przekonać oponentów do bezwzględnej konieczności ich stosowania.

## Konflikt interesów

*Autorki nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpływać na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.*

## Źródło finansowania

*Współautor Brydak L.B. – praca częściowo wykonana w ramach projektu statutowego 4/EM, NIZP-PZH.*

## Piśmiennictwo

1. Murphy BR, Webster RG: Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM (eds.): *Virology*. 2<sup>nd</sup> ed., Raven Press, New York 1990: 1091–1152.
2. World Health Organization: Influenza (Seasonal). Available from: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) [cited: 21 June 2018].
3. World Health Organization: Influenza. Available from: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/> [cited: 21 June 2018].
4. Brydak LB: Grypa. In: Rokicka-Milewska R (ed.): *Nasze dziecko. Rozwój, pielęgnowanie i wychowanie*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007: 463–473.
5. Brydak LB: Kliniczna charakterystyka grypy i powikłania pogrypowe. In: Brydak LB: *Grypa. Pandemia grypy – mit czy realne zagrożenie?* Oficyna Wydawnicza RYTM, Warszawa 2008: 101–123.
6. Jefferson T, Demicheli V: Socioeconomics of influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.): *Textbook of Influenza*. Blackwell Science, Oxford 1998: 541–547.
7. Zambon M, Hays J, Webster S et al.: Diagnosis of influenza in the community: relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. *Arch Intern Med* 2001; 161: 2116–2122.
8. Brydak LB: Skutki zdrowotne i ekonomiczne zakażeń gripą w aspekcie zdrowia publicznego w Polsce. In: Nowakowska E (ed.): *Farmakoekonomika w zarządzaniu zasobami ochrony zdrowia*. Wolters Kluwer, Warszawa 2018: 274–283.
9. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny: Zakład Badania Wirusów Grypy. Krajowy Ośrodek ds. Grypy. Available from: <http://www.pzh.gov.pl/szkolenia-kursy-oraz-wykłady/struktura/pion-epidemiologii-i-mikrobiologii/zaklad-badania-wirusow-grypy-krajowy-osrodek-ds-grypy/> [cited: 21 June 2018].
10. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny: Działalność usługowa. Available from: <http://www.pzh.gov.pl/szkolenia-kursy-oraz-wykłady/struktura/pion-epidemiologii-i-mikrobiologii/zaklad-badania-wirusow-grypy-krajowy-osrodek-ds-grypy/dzialalnosc-uslugowa/> [cited: 21 June 2018].
11. Zambon M: Influenza surveillance and laboratory diagnosis. In: Webster RG, Monto AS, Braciale TJ et al. (eds.): *Textbook of Influenza*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Ltd., Oxford 2013: 231–249.

12. WHO Global Influenza Surveillance Network: Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. 2011. Available from: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/manual\\_diagnosis\\_surveillance\\_influenza/en/index.html](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/index.html) [cited: 14 June 2018].
13. Ison MG, Hay A: Antivirals: targets and use. In: Webster RG, Monto AS, Braciale TJ et al. (eds.): *Textbook of Influenza*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Ltd., Oxford 2013: 392–418.
14. Watson JM: Surveillance of influenza. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.): *Textbook of Influenza*. Blackwell Science, Oxford 1998: 207–216.
15. World Health Organization: WHO Global technical consultation: global standards and tools for influenza surveillance. 2011. Available from [http://www.who.int/influenza/resources/documents/technical\\_consultation/en/index.html](http://www.who.int/influenza/resources/documents/technical_consultation/en/index.html) [cited: 14 June 2018].
16. Radwan M, Jonszta D, Kosz-Vnenchak M: Metoda PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR) – wyzwania i perspektywy. *Diagnostyka Lab* 2008; 6: 10–17.
17. Rynans S, Walter de Walthoffen S, Dzieciatkowski T et al.: Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii. *Post Mikrobiol* 2015; 54: 75–82.
18. Hallmann-Szelińska E, Bednarska K, Korczyńska M et al.: Virological characteristics of the 2014/2015 influenza season based on molecular analysis of biological material derived from I-MOVE study. *Adv Exp Med Biol* 2016; 921: 81–85.
19. Cieślak K, Szymański K, Kowalczyk D et al.: Influenza and influenza-like viruses in children in the epidemic season 2015/2016 in Poland. *Adv Exp Med Biol* 2017; 968: 13–18.
20. Szymański K, Kowalczyk D, Cieślak K et al.: Regional diversification of influenza activity in Poland during the 2015/16 epidemic season. *Adv Exp Med Biol* 2017; 1020: 1–6.
21. Monto AS, Webster RG: Influenza pandemics: history and lessons learned. In: Webster RG, Monto AS, Braciale TJ et al. (eds.): *Textbook of Influenza*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Ltd., Oxford 2013: 20–34.
22. Nitsch-Osuch A, Stefanska I, Kuchar E et al.: Influence of rapid influenza test on clinical management of children younger than five with febrile respiratory tract infections. *Adv Exp Med Biol* 2013; 755: 237–241.
23. WHO/GIP, data in HQ as of 20 July 2018.
24. Webster RG, Hay AJ: The H5N1 influenza outbreak in Hong Kong: a test of pandemic preparedness. In: Nicholson KG, Webster RG, Hay AJ (eds.): *Textbook of Influenza*. Blackwell Science, Oxford 1998: 561–565.
25. Katz JM, Hancock K, Xu X: Serologic assays for influenza surveillance, diagnosis and vaccine evaluation. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 669–683.
26. Brydak LB: Profilaktyka i skutki ekonomiczne grypy. In: Brydak LB: *Grypa. Pandemia grypy – mit czy realne zagrożenie?* Oficyna Wydawnicza RYTM, Warszawa 2008: 283–420.
27. Kowalczyk D, Szymański K, Cieślak K et al.: Circulation of antibodies against influenza virus hemagglutinins in the 2014/2015 epidemic season in Poland. *Adv Exp Med Biol* 2017; 968: 35–40.
28. Mastalerz-Migas A, Steciwko A, Brydak LB: Immune response to influenza vaccine in hemodialysis patients with chronic renal failure. *Adv Exp Med Biol* 2013; 756: 285–290.
29. Mastalerz-Migas A, Bujnowska-Fedak M, Brydak LB: Immune efficacy of first and repeat trivalent influenza vaccine in healthy subjects and hemodialysis patients. *Adv Exp Med Biol* 2015; 836: 47–54.
30. Brydak-Godowska J, Turczyńska M, Przybyś M et al.: Ocular complications in influenza virus infection. *Ocular Immunol Inflamm* 2018 Feb 8: 1–6. DOI: 10.1080/09273948.2017.1423335.