

Ocena częstości występowania określonych typów wirusów oddechowych w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego

Evaluation of the incidence of identified types of respiratory viruses in a selected population of inhabitants of the kujavian-pomeranian voivodeship

Małgorzata Smogula^{1,2}, Joanna Malinowska², Marta Pawłowska¹, Jerzy Kasprzak²,
Marcin Ziuziakowski², Celestyna Miła-Kierzenkowska¹

¹Katedra Biologii i Biochemii Medycznej, Wydział Lekarski, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Oddział Diagnostyki Medycznej, Dział Laboratoryjny, Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy

Streszczenie

Wprowadzenie: Choroby układu oddechowego są powodowane przez różne czynniki między innymi wirusy oddechowe, na przykład wirus grypy i syncytialny wirus oddechowy (RSV). W Polsce prowadzony jest nadzór nad grypą i innymi wirusami oddechowymi w ramach programu SENTINEL i NON SENTINEL.

Cel badań: Określenie częstości występowania wybranych typów wirusów grypy i RSV metodą RT-PCR (*real-time reverse transcription polymerase chain reaction*) w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego w sezonie epidemicznym 2017/2018, tj. w okresie od 1 października 2017 do 30 kwietnia 2018.

Materiał i metody: Przebadano 201 próbek wymazów z nosa i gardła metodą real-time RT-PCR w kierunku wykrywania obecności materiału genetycznego RNA wirusa grypy i RSV. Badaną populację podzielono na 7 grup w zależności od wieku.

Wyniki. Próbkami dodatnimi stanowiły 48,26% przebadanych wymazów. W 95 (47,26%) próbkach stwierdzono obecność materiału genetycznego RNA wirusa grypy, a w 2 (1,00%) RSV. Najczęściej izolowano wirusa grypy typu B, u osób poniżej 25 lat zaobserwowano najwyższą częstość zakażeń.

Wnioski: Nadzór nad grypą w programie SENTINEL oraz NON SENTINEL odgrywa istotną rolę w ocenie sytuacji wirusologiczno-epidemiologicznej panującej na danym obszarze. Wyniki obejmują część populacji, stąd dane mogą być niedoszacowane. Konieczne jest kontynuowanie badań i obserwacja sytuacji wirusologiczno-epidemiologicznej w polskiej populacji.

Abstract

Introduction: Respiratory tract infections are caused by various factors including respiratory viruses, for example influenza virus and respiratory syncytial virus (RSV). Surveillance of influenza and other respiratory viruses is carried out as part of the SENTINEL and NON SENTINEL programs in Poland.

Aim of study: Determination of the frequency of selected types of influenza and RSV viruses using real-time reverse transcription polymerase chain reaction method (real-time RT-PCR) in a selected population of inhabitants of the kujavian-pomeranian voivodeship in the epidemic season 2017/2018, i.e. from 1 October 2017 to 30 April 2018.

Material and methods: 201 throat and nasal swabs were tested using real-time RT-PCR method for the detection of the presence of genetic material RNA of influenza virus and RSV. The study population was divided into 7 groups depending on age.

Results. Positive samples accounted for 48.26% of the swabs tested. The genetic material RNA of influenza virus was found in 95 (47.26) samples and RSV in 2 (1,00%) samples. Influenza B virus was most frequently isolated. The most prevalence of infections was observed in people under 25 years of age.

Conclusions: Surveillance of influenza in the SENTINEL and NON SENTINEL programs constitute an important role in assessing the virological and epidemiological situation prevailing in a given area. The results cover part of the population, hence the data may be underestimated. It is necessary to continue studies and observe the virological and epidemiological situation in the polish population.

Słowa kluczowe: wirus grypy, real-time RT-PCR, RSV

Key words: influenza virus, real-time RT-PCR, RSV

Wstęp

Infekcje dróg oddechowych są poważnym problemem medycznym na całym świecie i mogą prowadzić do wystąpienia ciężkich powikłań, a nawet zgonów wśród ludzi. Występujące epidemie są wynikiem łatwej drogi transmisji. Zakażenia układu oddechowego mogą być spowodowane m.in. wirusem grypy lub syncytialnym wirusem oddechowym (RSV). Grypa jest zakaźną chorobą układu oddechowego powodującą wysoką zachorowalność we wszystkich grupach wiekowych i znaczną śmiertelność wśród ludzi. Choroba ta wywoływana jest przez niektóre wirusy z rodziny *Orthomyxoviridae* [1]. Wyróżnia się 3 typy wirusów grypy wywołujących zakażenia wśród ludzi: A, B i C. Wirus grypy typu A zbudowany jest z białek powierzchniowych: hemaglutyniny (HA) i neuraminidazy (NA), co pozwala na identyfikację podtypów wirusa (18 typów hemaglutyniny i 11 typów neuraminidazy) [2, 3]. Z kolei RSV zalicza się do rodziny *Paramyxoviridae*. Odpowiada on za około 22% ostrych zakażeń dolnych dróg oddechowych u dzieci. Zakażenie pierwotne występuje z reguły u dzieci między 6. tygodniem a 2. rokiem życia [4]. Glikoproteiny znajdujące się na powierzchni wirusa mają szczególne znaczenie w patogenezie zakażenia. Białko G ma zdolność przyłączania się do komórek gospodarza, natomiast białko F (fuzyjne) pośredniczy w wejściu wirusa do wnętrza atakowanej komórki gospodarza, powodując powstawanie charakterystycznych struktur złożonych z dużych komórek zawierających wiele jąder. Zarówno białko F, jak i G wykazują silne właściwości antygenowe, a różnice w składzie ich antygenów, głównie białka G, są przyczyną wyróżnienia 2 typów syncytialnego wirusa oddechowego: A i B [5].

Wirusologiczny oraz epidemiologiczny nadzór nad grypą i innymi wirusami oddechowymi prowadzony jest przez Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) oraz Europejską Sieć Nadzoru nad Grypą (European Influenza Surveillance Network – EISN) pod nadzorem Europejskiego Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (European Centre for Disease Prevention and Control – ECDC). W ramach nadzoru wirusologicznego wykonywane są badania laboratoryjne. Z kolei nadzór epidemiologiczny w zakresie tzw. programu SENTINEL polega na rejestrowaniu liczby nowych przypadków zachorowań na grypę i wirusy grypopodobne w grupach wiekowych: 0-4, 5-9, 10-14, 15-25, 26-44, 45-64 i ≥ 65 lat. Polega on na tworzeniu raportów przez lekarzy pierwszego kontaktu należących do programu SENTINEL. Pozwala to na oszacowanie aktywności wirusów oddechowych i udostępnienie szczegółowych informacji epidemiologicznych i wirusologicznych. Nadzór prowadzony jest cotygodniowo przez cały sezon epidemiczny, który trwa od początku października bieżącego

roku do końca września kolejnego roku, tj. przez 52 tygodnie [6]. W Polsce w ramach programu SENTINEL dane dotyczące wirusa grypy i wirusów grypopodobnych są rejestrowane przez wytypowanych lekarzy medycyny rodzinnej, 16 Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych, do których spływają dane z Powiatowych Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych oraz Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego – Państwowym Zakładzie Higieny (NIZP-PZH) w Warszawie, który pełni rolę koordynatora. Program NON SENTINEL natomiast opiera się głównie na raportach dotyczących próbek ze szpitali oraz od lekarzy pierwszego kontaktu z publicznych lub niepublicznych zakładów opieki zdrowotnej, niebędących członkami sieci nadzoru nad grypą SENTINEL [6, 7]. Jedną z metod profilaktyki przed zachorowaniem na grypę są szczepienia. W sezonie epidemicznym 2017/2018 w Polsce dostępne były 2 rodzaje szczepionek:

VaxigripTetra – szczepionka inaktywowana II generacji, zawierająca jako antygeny rozszczepiony wirion wirusa grypy (Sanofi Pasteur S.A., Francja), przygotowana przygotowywana z inaktywowanych cząstek wirusa grypy (wirusy są rozbijane i oczyszczane w celu usunięcia białek pochodzenia nie wirusowego).

Influvac 2017/2018 – szczepionka inaktywowana, podjednostkowa III generacji zawierająca oczyszczone antygeny powierzchniowe wirusa grypy (BGP Products B.V., Holandia); w procesie wytwarzania stosowane są dodatkowe etapy oczyszczania; w efekcie produkt końcowy szczepionki zawiera głównie dwa oczyszczone antygeny hemaglutyninę (HA) i neuraminidazę (NA) o zachowanych właściwościach antygenowych.

W sezonie 2017/2018 w skład szczepionek przeciw grypie wchodziły trzy pierwsze lub wszystkie cztery wirusy grypy:

- A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09-like virus,
- A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus,
- B/Brisbane/60/2008-like virus,
- B/Phuket/3073/2013-like [8].

Materiał i metody

Do oceny częstości występowania wirusów oddechowych wykorzystano wyniki badań wirusologicznych wykonywanych w Oddziale Diagnostyki Medycznej Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy w sezonie epidemicznym 2017/2018, tj. od 1 października 2017 do 30 kwietnia 2018. W okresie tym przebadano łącznie 201 próbek.

Badaną grupę podzielono na 7 grup wiekowych:

- 0-4 lat (I): 13 próbek, co stanowiło 6,47% wszystkich próbek,
- 5-9 lat (II): 19 próbek, co stanowiło 9,45% wszystkich próbek,

Tabela I. Liczba i procent przebadanych próbek w kierunku wykrywania materiału genetycznego wirusów oddechowych z uwzględnieniem płci i wieku badanych w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego w sezonie epidemicznym 2017/2018.

	WIEK													
	0-4		5-9		10-14		15-25		26-44		45-64		≥ 65	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
liczba próbek	13	6,47	19	9,45	7	3,48	11	5,47	30	14,93	51	25,37	70	34,83
K	4	1,99	7	3,48	2	1,00	5	2,49	18	8,96	27	13,43	39	19,40
M	9	4,48	12	5,97	5	2,49	6	2,99	12	5,97	24	11,94	31	15,42

n – liczba przebadanych próbek, % – procent przebadanych próbek, K – kobiety, M – mężczyźni

- 10-14 lat (III): 7 próbek, co stanowiło 3,48% wszystkich próbek,
- 15-25 lat (IV): 11 próbek, co stanowiło 5,47% wszystkich próbek,
- 26-44 lat (V): 30 próbek, co stanowiło 14,93% wszystkich próbek,
- 45-64 lat (VI): 51 próbek, co stanowiło 25,37% wszystkich próbek,
- ≥ 65 lat (VII): 70 próbek, co stanowiło 34,83% wszystkich próbek.

Tabela I prezentuje liczbę badań z podziałem na płeć oraz grupy wiekowe. Stosunek kobiet do mężczyzn był zbliżony w każdym przedziale wiekowym. Najwięcej próbek pochodziło od osób powyżej 65 lat, natomiast najmniej liczna była grupa 10-14 lat.

Badania prowadzono u pacjentów leczonych ambulatoryjnie (SENTINEL) bądź hospitalizowanych i osób prywatnych (NON SENTINEL).

Materiał do badań stanowiły próbki wymazów pobieranych z gardła i nosa umieszczone w zbuforowanym roztworze soli fizjologicznej (PBS) lub soli fizjologicznej.

Diagnostykę laboratoryjną prowadzono metodą real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT-PCR) w kierunku wykrywania materiału genetycznego RNA wirusa z zastosowaniem dwóch systemów, ze względu na to, iż w zależności od zastosowanych sond, kontroli lub testów, można oznaczyć różne typy i podtypy wirusa grypy bądź RSV:

- system otwarty – Light Cycler 480 II firmy Roche:
 - wirus grypy typ A, podtyp A/H1N1/pdm09, podtyp A/H3N2/, typ B (LC 480 II – A, A/H1N1/pdm09, A/H3N2/, B),
 - wirus grypy typ A, podtyp A/H1N1/pdm09, typ B (LC 480 II – A, A/H1N1/pdm09, B)

oraz

- system zamknięty – GeneXpert firmy BIOMEDICA:
 - wirus grypy typ A, podtyp A/H1N1/pdm09, typ B (GX – A, A/H1N1/pdm09, B; test Flu, nr katalogowy: CE-GXFLU-CE-10),
 - wirus grypy typ A, typ B, RSV (GX – A, B, RSV; test Flu/RSV, nr katalogowy: CE-FLU/RSV-CE-10).

W systemie otwartym użyto następujące odczynniki: zestaw do manualnej izolacji (Roche, High Pure Viral RNA Kit – nr katalogowy 11858874001); zestaw do przygotowania mieszaniny reakcyjnej MasterMix (Roche, Light Cycler Multiplex RNA Virus Master – nr katalogowy 06754155001); kontrola wewnętrzna procesu (Roche, RNA Process Control Kit Trial Pack – nr katalogowy 07099622001); startery i kontrole dla poszczególnych typów oraz podtypów wirusa grypy (TIBMOLBIOL, ModularDx Kit Influenza A – nr katalogowy 07792182001; ModularDx Kit Influenza A H1 (H1N1sw) – nr katalogowy 07792204001; ModularDx Kit Inf A H3 – nr katalogowy 07548109001; ModularDx Kit Influenza B – nr katalogowy 07792212001).

Wpływ na wybór kierunku diagnostyki danej próbki, czyli wykrywania wybranych podtypów wirusa grypy bądź RSV, miało zlecenie lekarza kierującego na badanie i dostępność odczynników. Próbki pochodzące z programu SENTINEL badano przy zastosowaniu systemu otwartego ze względu na konieczność oznaczania podtypu A/H3N2/, natomiast próbki spoza tego programu, czyli głównie próbki pochodzące ze szpitali analizowano przy użyciu systemu zamkniętego, w którym proces diagnostyczny jest znacznie krótszy, a oprócz typów i podtypów wirusa grypy można

także wykonać badanie w kierunku wykrywania RSV, co ma duże znaczenie zwłaszcza w przypadku pacjentów pediatrycznych.

Na aparacie Light Cycler 480 II przeprowadzono 123 badania:

- LC 480 II – A, A/H1N1/pdm09, A/H3N2/, B – 104 badania (52%)
- LC 480 II – A, A/H1N1/pdm09, B – 19 badań (9%).

Z kolei na aparacie GeneXpert wykonano 78 badań:

- GX – A, A/H1N1/pdm09, B – test Flu – 24 badania (12%),
- GX – A, B, RSV test Flu/RSV – 54 badania (27%).

W systemie otwartym w pierwszym etapie badania z analizowanego materiału klinicznego izolowany jest kwas nukleinowy z wykorzystaniem zestawu do manualnej izolacji firmy Roche. Proces rozpoczyna się od przygotowania mieszaniny reakcyjnej (Working Solution) składającej się z Poly(A) – nośnika RNA (CAR) oraz buforu wiążącego RNA do nośnika (Binding Buffer). Następnie dodawana jest kontrola wewnętrzna, próbka od pacjenta i proteinaza. Po 10 minutach inkubacji w termocyklerze w temperaturze 72°C dodawany jest ponownie bufor wiążący (Binding Buffer). Reakcja wiązania zachodzi w ciągu kilku sekund. Następnie cała objętość próbki jest przenoszona na kolumnę (High Filter Tube) i wirowana 1 minutę przy 11.000 rpm obrotów. W kolejnym etapie dodawany jest inhibitor (Inhibitor Removal Buffer) w celu usunięcia zanieczyszczeń hamujących PCR. Próbka jest ponownie wirowana. Proces płukania poprzez dodanie buforu (Wash Buffer) ma na celu oczyszczenie RNA z różnych soli, białek lub innych zanieczyszczeń. Następnie próbka jest ponownie wirowana, a etap płukania jest powtarzany. Po odwirowaniu próbkę dosusza się poprzez krótkie odwirowanie (Short Spin) przy maksymalnych obrotach 13.000 rpm przez 2-3 sek. W ostatnim etapie związany kwas nukleinowy jest wmywany poprzez dodanie odpowiedniego buforu (Elution Buffer). Otrzymany izolat (eluat) zawiera badany materiał genetyczny do dalszej diagnostyki. Kolejny etap badań to jednostopniowa reakcja real-time RT-PCR w aparacie LightCycler 480 II. Najpierw dochodzi do odwrotnej transkrypcji wirusowego matrycowego RNA na cDNA przy udziale transkryptazy. Następnie otrzymane cDNA ulega replikacji przy udziale polimerazy zgodnie ze schematem:

- denaturacja wstępna – rozdzielenie dwuniciowego DNA pod wpływem wysokiej temperatury,
- przyłączanie starterów/sond (annealing)
- amplifikacja (elongacja) – każdy segment cDNA ulega powieleniu przy udziale polimerazy.

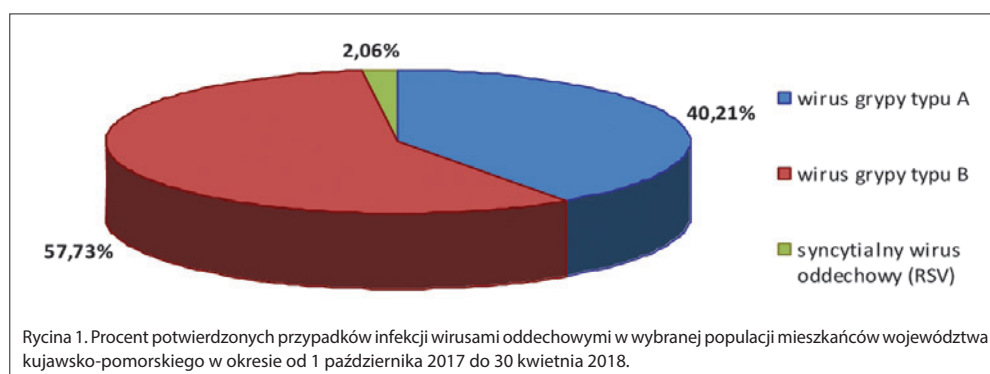
Reakcja przebiega zgodnie z profilem zaprogramowanym na urządzeniu przez producenta. Metoda real-time RT-PCR umożliwia wykrycie amplifikowanych fragmentów w czasie rzeczywistym. Aparat LightCycler 480 II mierzy emitowaną fluorescencję i przedstawia wynik w postaci wykresów. Analizowane są wszystkie uzyskane wyniki zgodnie z kanałami odczytu i porównywane zarówno do kontroli pozytywnej, jak i negatywnej.

Z kolei aparat GeneXpert automatyzuje i integruje etapy ekstrakcji, oczyszczania próbki oraz amplifikacji i wykrywania docelowych sekwencji kwasów nukleinowych za pomocą odwrotnej transkrypcji. Reakcja real-time RT-PCR przebiega w specjalnym teście jednorazowego użytku, zawierającym swoiste dla danego testu odczynniki. Bezpośrednio do niego dodawana jest próbka pacjenta. Po zakończeniu testu aparat podaje wyniki na podstawie po-

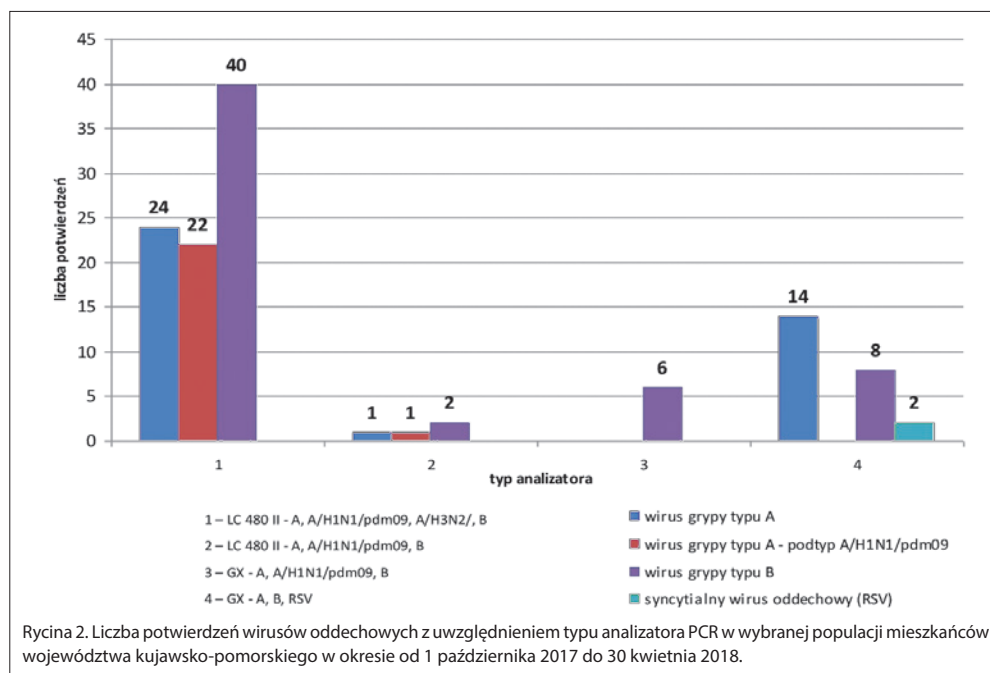
miaru fluorescencji i wbudowanego algorytmu obliczeniowego.

Wyniki

W przeprowadzonych badaniach, w których analizie poddano 201 wymazów z gardła i nosa, w 95 (47,26%) próbkach stwierdzono obecność materiału genetycznego RNA wirusa grypy, a w 2 (1,00%) RSV. Wykazano, że w sezonie epidemicznym 2017/2018, tj. od października 2017 r. do kwietnia 2018 r., dominował wirus grypy typu B, którego wykryto w 56 (57,73%) materiałach klinicznych. Wirus grypy typu A został wyizolowany od 39 (40,21%) pacjentów. W 23 próbkach stwierdzono obecność materiału genetycznego RNA dla podtypu wirusa grypy A/H1N1/pdm09, co stanowiło 58,97% próbek z dodatnim wynikiem na obecność wirusa grypy typu A. Z kolei podtyp A/H3N2/ nie pojawił się w żadnym z badanych przypadków. Procent potwierdzonych przypadków infekcji wirusami oddechowymi przedstawia ryc. 1.



Uwzględniając zastosowany system do wykrywania materiału genetycznego wirusów, najczęściej izolowanym wirusem w systemie otwartym był wirus grypy typu B – 42 (35,00%) przypadki (ryc. 2). Wirus grypy typu A został zidentyfikowany w 24 (20,83%) próbkach. Z kolei przy zastosowaniu aparatu GeneXpert wirusa grypy typu A wykryto w takiej samej liczbie materiałów do badania jak wirusa grypy typu B – 14 (11,67%).



Analiza wyników z podziałem na płeć wykazała, że 102 (50,75%) próbki pochodziły od kobiet, natomiast 99 (49,25%) od mężczyzn. Zachorowania na grypę i wirusy grypopodobne wystąpiły u obu płci ze zbliżoną częstością – 50 (49,02%) próbek dodatnich wśród kobiet i 47 (47,47%) – wśród mężczyzn. Liczba potwierdzeń wirusów oddechowych z podziałem na płeć została przedstawiona na ryc. 3. W grupie kobiet dominujące były zakażenia spowodowane wirusem grypy typu B – 34 przypadki, co obejmowało 33,33% wszystkich dodatnich oznaczeń u kobiet. Z kolei wśród mężczyzn z podobną częstością izolowano wirusa grypy typu A 25 – przypadków i typu B – 22 przypadki, co stanowiło odpowiednio 25,25% oraz 22,22% wszystkich potwierdzeń wirusów oddechowych u mężczyzn. Podtyp A/H1N1/pdm09 u kobiet wykryto w 10 próbkach, co obejmowało 29,41% próbek dodatnich w kierunku obecności wirusa grypy typu A, natomiast u mężczyzn podtyp ten zaobserwowano w 13 próbkach – 59,09% próbek

z wirusem grypy typu A. Wirus RSV pojawił się tylko u płci żeńskiej w 2 (1,96%) próbkach pochodzących od osób hospitalizowanych w wieku 0-4 lat oraz ≥ 65 lat.

Biorąc pod uwagę wiek badanych, materiał genetyczny RNA wirusa grypy typu A i podtyp A/H1N1/pdm09 najczęściej izolowano od osób należących do grup

wiekowych poniżej 25 lat (tab. II). Wirus grypy typu B dominował w grupie 5-9 lat.

W ramach programu SENTINEL przebadano 82 próbki, wśród których w 12 (14,63%) zidentyfikowano wirusa grypy typu A, podtyp A/H1N1/pdm09, a w 31 (37,80%) – wirusa grypy typu B. Pozostałe 119 próbek pochodziło głównie od pacjentów hospitalizowanych – 27 (22,69%) próbek dodatnich w kierunku wykrywania

materiału genetycznego RNA wirusa grypy typu A, w tym 11 z podtypem A/H1N1/pdm09 i 25 (21,01%) próbek dodatnich w kierunku wirusa grypy typu B.

Dyskusja

Z przeprowadzonej analizy wynika, że próbki dodatnie, w których wykryto wirusa grypy oraz RSV stanowiły 48,26%. Maita i in. 2018 otrzymali podobne wyniki na przełomie trzech sezonów epidemicznych [9]. W badaniach 111 pacjentów uzyskano 45,9% dodatnich wyników w kierunku grypy. Natomiast w okresie od października 2017 do lute-

Tabela II. Częstość występowania wirusa grypy i RSV w zależności od płci oraz wieku badanych w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego w sezonie epidemicznym 2017/2018.

PŁEĆ	WIRUS	WIEK													
		0-4		5-9		10-14		15-25		26-44		45-64		≥ 65	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
K	A	0	0,00	2	10,53	1	14,29	3	27,27	2	6,67	2	3,92	4	5,71
	A/H1N1/pdm09	0	0,00	2	10,53	0	0,00	2	18,18	2	6,67	1	1,96	3	4,29
	A/H3N2/	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	B	0	0,00	4	21,05	0	0,00	1	9,09	3	10,00	11	21,57	15	21,43
	RSV	1	7,69	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	1,43
M	A	4	30,77	5	26,32	1	14,29	1	9,09	1	3,33	6	11,76	7	10,00
	A/H1N1/pdm09	3	23,08	2	10,53	1	14,29	1	9,09	0	0,00	3	5,88	3	4,29
	A/H3N2/	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	B	1	7,69	4	21,05	2	28,57	1	9,09	2	6,67	4	7,84	8	11,43
	RSV	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
K, M	A	4	30,77	7	36,84	2	28,57	4	36,36	3	10,00	8	15,69	11	15,71
	A/H1N1/pdm09	3	23,08	4	21,05	1	14,29	3	27,27	2	6,67	4	7,84	6	8,57
	A/H3N2/	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	B	1	7,69	8	42,11	2	28,57	2	18,18	5	16,67	15	29,41	23	32,86
	RSV	1	7,69	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	1,43

n – liczba dodatnich oznaczeń w kierunku wykrywania materiału genetycznego RNA wirusa grypy i RSV, % – częstość występowania wirusów oddechowych w odniesieniu do liczby próbek przebadanych w danej grupie wiekowej, K – kobiety, M – mężczyźni, wirusy grypy – typu A, podtypu A/H1N1/pdm09, podtypu A/H3N2/, typu B; RSV – syncytialny wirus oddechowy

go 2018 w Stanach Zjednoczonych przebadano 666 493 próbek, z których 18,7% było dodatnich [10]. Zachorowania i podejrzenia zachorowań na grypę w Polsce (P) oraz województwie kujawsko-pomorskim (KP) od roku 2015 wykazują tendencję wzrostową i przedstawiają się następująco:

- 2015 r.: P-3843438, KP-252920,
- 2016 r.: P-4316823, KP-280272,
- 2017 r.: P-5043491, KP-294145 [11, 12, 13].

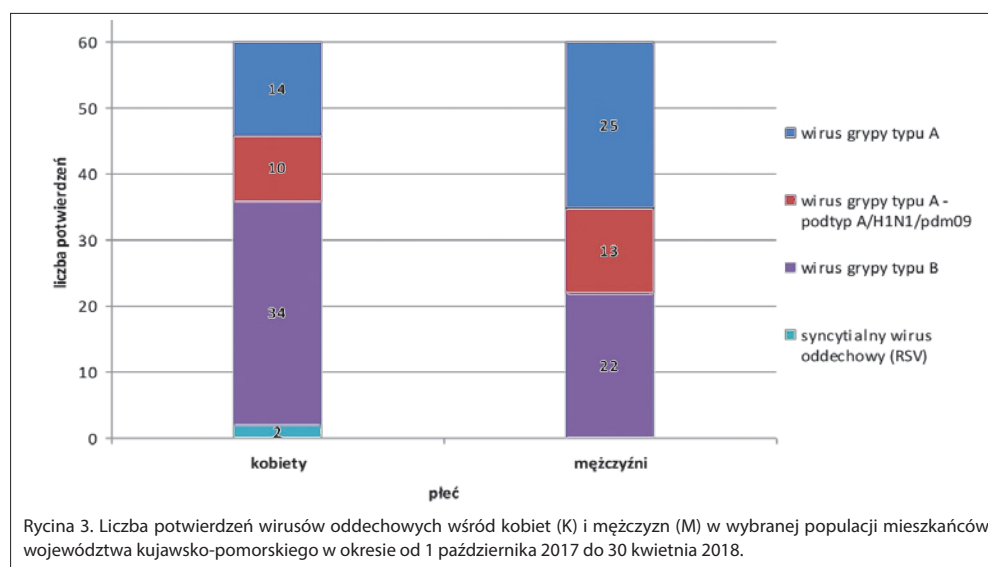
W 2017 roku liczba zachorowań na grypę potwierdzonych laboratoryjnie wyniosła w Polsce 2455, a w województwie kujawsko-pomorskim 101, co stanowiło 4,11% w skali kraju. W tym samym okresie najwyższa liczba zachorowań potwierdzonych laboratoryjnie wystąpiła w województwie zachodniopomorskim – 393 przypadki (16,01%), natomiast najniższa w województwie podlaskim – 17 przypadków (0,69%) [13].

W badaniach własnych najczęściej izolowano materiał genetyczny RNA wirusa grypy typu B. W kanadyjskich badaniach opartych na

programie SENTINEL prowadzonych w sezonach epidemicznych 2010/2011 – 2015/2016 wirus grypy typu B stanowił około jednej trzeciej wszystkich przypadków grypy (25-51% w zależności od sezonu) [14]. Zawłocka i in. 2016 prowadząc badania w sezonie epidemicznym 2012/2013 u dzieci hospitalizowanych wykryli u 35,4% wirusa grypy typu A, u 60% wirusa grypy typu B, a u 4,6% wirusa grypy typu A i B [15]. Z kolei w sezonie epidemicznym 2015/2016 w województwie śląskim zdecydowanie dominował wirus grypy typu A, co stanowiło 97% wszystkich próbek z wynikiem pozytywnym [16]. Laboratoria zdrowia publicznego na terenie USA także wykryły najwięcej przypadków wirusa grypy typu A – 84,1%, natomiast wirus grypy typu B stanowił jedyne 15,9% próbek dodatnich [10]. Wykryty typ wirusa ma znaczenie w postępie choroby. W przypadku zakażeń wirusem grypy typu B przebieg ten jest zwykle dużo łagodniejszy [17].

W badaniach prowadzonych przez Oddział Diagnostyki Medycznej WSSE w Bydgoszczy oznaczano 2 podtypy wirusa grypy typu

A: A/H1N1/pdm09 oraz A/H3N2/. Pierwszy z nich wystąpił w 23 przypadkach, natomiast podtyp A/H3N2/ nie został wyizolowany z żadnej próbki. Podobne wyniki uzyskano w 2012 roku w Nepalu, gdzie także dominował podtyp A/H1N1/pdm09 – 99% wyizolowanych z wirusem grypy typu A [18]. Budd i in. 2018 wskazują na zdecydowanie odmienną sytuację, gdyż w tych badaniach dominującym był podtyp A/H3N2/, który stanowił 89,9% oznaczeń, a podtyp A/H1N1/pdm09 – 10,1% [10].



Rycina 3. Liczba potwierdzeń wirusów oddechowych wśród kobiet (K) i mężczyzn (M) w wybranej populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego w okresie od 1 października 2017 do 30 kwietnia 2018.

Takie same wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych w latach 2014-2017 u pacjentów z podejrzeniem ostrej infekcji dróg oddechowych [19]. Korsun i in. 2018 również wykazali zdecydowaną dominację podtypu A/H3N2/ w badanych próbkach [20]. U pacjentów z ciężką, ostrą chorobą układu oddechowego (SARI) w Afryce najczęściej także występował podtyp A/H3N2/ – 38%, następnie podtyp A/H1N1/pdm09 – 18,8%. Wirus grypy typu A bez określonego podtypu stanowił 17,5%, a wirus grypy typu B – 25,7% [21]. Zakaźność grypy pandemicznej A/H1N1/pdm09 jest nieco większa. Wirus ten głębiej penetruje do układu oddechowego, przez co może prowadzić do wystąpienia cięższych przypadków wymagających hospitalizacji, a nawet zgonów [22]. W sezonie epidemicznym 2016/2017 w Europie, w tym także w Polsce, dominował podtyp wirusa grypy A/H3N2/, wywołujący zachorowania głównie wśród osób starszych, przeciwnie do sezonu 2015/2016, w którym dominującym wirusem był podtyp A/H1N1/pdm09, a 60% zachorowań na grypę potwierdzono w grupie osób w wieku 15-64 lata [8]. Brak podtypu A/H3N2/ w badaniach własnych może wynikać z faktu, że wirus ten, ze względu na dominację w poprzednim sezonie, został zawarty w szczepionce, co przyczyniło się do nabycia odporności wśród ludzi na ten podtyp wirusa.

W niniejszej pracy spośród wszystkich próbek dodatnich tylko 2 dotyczyły zakażenia wirusem RSV. W badaniach Reina i in. 2018 odnotowano 515 przypadków wirusa grypy typu A, 208 – wirusa grypy typu B i aż 992 przypadki RSV [19]. W latach 2011-2016 u hospitalizowanych pacjentów z SARI wirus grypy został wykryty w 23,3% próbek, natomiast syncytialny wirus oddechowy w 31,2% próbek [21]. W badaniach wymazów pochodzących od dzieci z powtarzającymi się infekcjami 12,6% z nich było dodatnich na obecność RSV [23]. Wirus ten jest najczęstszym patogenem wywołującym zapalenie oskrzelików i zapalenie płuc u dzieci do 2. roku życia [24].

Uwzględniając podział na płeć, w wymazach pacjentów WSSE w Bydgoszczy częściej izolowano wirusa grypy typu B u kobiet, natomiast u mężczyzn wirus grypy typu A i B wystąpił w podobnej liczbie próbek. W badaniach Wang i in. 2015 wirus grypy typu B wykryto w większej liczbie przypadków wśród mężczyzn (591 przypadków) niż kobiet (468 przypadków). Z kolei wirus grypy typu A pojawił się częściej u danej płci w zależności od podtypu: A/H3N2/ częściej u płci męskiej, A/H1N1/pdm09 – u płci żeńskiej [25]. W sezonie epidemicznym 2009/2010 oraz 2010/2011 w województwie kujawsko-pomorskim na grypę wywołaną wirusem A/H1N1/pdm09 zachorowały łącznie 84 kobiety i 86 mężczyzn, stąd nie wykazano związku między zapadalnością na grypę A/H1N1/pdm09 a płcią [26]. Płeć nie ma wpływu na obecność wirusów oddechowych. Zarówno kobiety, jak i mężczyźni są narażeni na zakażenie wirusem grypy i RSV.

Biorąc po uwagę wiek badanych, najczęściej wirus grypy pojawiał się u osób poniżej 25 roku życia. W badaniach prowadzonych w Wielkiej Brytanii badane osoby podzielono ze względu na wiek na 6 grup. Zarówno wśród dzieci, jak i osób dorosłych dominowały zakażenia wirusem grypy typu A i jego podtypami. Największa liczba dodatnich wyników wystąpiła w grupie 18-44 lat i 45-64 lat, natomiast najmniejsza u dzieci poniżej 2 lat. U osób powyżej

65 roku życia wirus grypy pojawiał się częściej niż u dzieci [27]. W sezonie 2012/2013 w Europie największą liczbę zachorowań zarejestrowano u dzieci w wieku 0-4 lat [28]. Dzieci poniżej 5 roku życia i osoby w podeszłym wieku są bardziej narażone na wystąpienie ciężkiego przebiegu grypy i rozwoju jej powikłań [1, 29]. W przeprowadzonych badaniach w grupach wiekowych: 5-9 lat i 10-14 lat wirus grypy typu A i B występował ze zbliżoną częstością. Podobne wyniki uzyskali Piralla i in. 2017 wśród pacjentów pediatrycznych w wieku od 3 miesięcy do 14 lat, identyfikując wirusa grypy typu A u 48,2 % badanych i wirusa grypy typu B u 51,8% osób [30]. Występowanie danego typu wirusa grypy nie zależy od wieku badanych osób.

Analizując trzy grupy wiekowe dzieci, wirus grypy najczęściej był izolowany od dzieci w wieku 5-9 lat (typ A – 7 przypadków; 36,84%, typ B – 8 przypadków; 42,11%). Jeden z przypadków RSV pojawił się w grupie obejmującej najmłodszych pacjentów – 0-4 lat. U dzieci z infekcją układu oddechowego pochodzących z Chin wirus grypy typu A (114 przypadków) pojawiał się równie często, jak wirus typu B (115 przypadków), a najwięcej zakażeń dotyczyło najstarszej grupy dzieci w wieku 4-14 lat (typ A – 70 przypadków, typ B – 102 przypadki). Zdecydowanie dominującym wirusem w tym badaniu był RSV, który z kolei najczęściej wystąpił w grupie dzieci 0-1 lat (183 przypadki), a następnie w grupie 2-3 lat (135 przypadków) i 4-14 lat (50 przypadków) [31]. Drugi przypadek RSV wystąpił w grupie powyżej 65 lat. Harvala i in. 2018 zaobserwowali wysoki odsetek zakażeń syncytialnym wirusem oddechowym w grupie poniżej 5 lat (60%) oraz częste występowanie tego wirusa u ludzi powyżej 65 roku życia [32]. Spośród 122 dzieci w wieku 1-28 miesiąca, hospitalizowanych w Oddziale Ogólnopediatrycznym SP Szpitala Klinicznego nr 1 w Zabrze [SUM] w Katowicach u 31 (25%) stwierdzono obecność zakażenia RSV [33]. RSV najczęściej powoduje zakażenia u dzieci, jednak może występować także u osób starszych, co najprawdopodobniej jest związane z obniżeniem odporności.

Ze względu na zbyt małą liczbę próbek dane mogą być niedoszacowane. Wpływ na wyniki ma również zastosowanie dwóch systemów do wykrywania materiału genetycznego RNA wirusa grypy i RSV. Oznaczanie podtypu A/H3N2/ umożliwia tylko aparat LightCycler 480 II, z kolei wykrycie RSV w badanej próbce jest możliwe przy użyciu aparatu GeneXpert.

Wnioski

1. W sezonie epidemicznym 2017/2018 w czasie od października 2017 r. do kwietnia 2018 r., w wybranej populacji województwa kujawsko-pomorskiego dominował wirus grypy typu B, w przypadku którego przebieg zakażenia jest zazwyczaj dużo łagodniejszy niż przy infekcji wirusem grypy typu A.
2. Materiał genetyczny RNA wirusa grypy izolowano najczęściej od osób poniżej 25 lat. Osoby te są bardziej narażone na zakażenie poprzez przebywanie w grupach (np. przedszkole, szkoła), niestosowanie odpowiednich zasad higieny, a wśród najmłodszych także poprzez osłabiony i w pełni nierozwinięty układ odpornościowy. Z kolei osoby w podeszłym wieku stanowią grupę wysokiego ryzyka ciężkiego przebiegu grypy i rozwoju jej powikłań.

3. Nadzór nad grypą w programie SENTINEL oraz NON SENTINEL odgrywa istotną rolę w ocenie sytuacji wirusologiczno-epidemiologicznej panującej na danym obszarze.
4. Wyniki mogą nie odzwierciedlać w pełni sytuacji całej populacji województwa kujawsko-pomorskiego, z uwagi na istnienie kilku laboratoriów na tym terenie, wykrywających materiał genetyczny wirusów oddechowych i braku dostępu do tych danych. Konieczna jest kontynuacja badań i obserwacja sytuacji wirusologiczno-epidemiologicznej dla populacji polskiej.

Piśmiennictwo:

1. Jackowska T, Zawłocka E, Czajkowska M. Czy grypa to łagodna infekcja? Opis przypadku. Profilaktyka grypy u dzieci w sezonie 2017-2018. *Post N Med.* 2017; XXX(09): 488-492.
2. Przybylski M. Ortomykowirusy. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A. *Mikrobiologia Lekarska.* Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa, 2015: 314.
3. Szewczyk B, Bieńkowska-Szewczyk K, Król E. Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol.* 2014; 61(3): 397-401.
4. Przybylski M. Paramykowirusy. W: Heczko PB, Wróblewska M, Pietrzyk A. *Mikrobiologia Lekarska.* Wyd. Lekarskie PZWL. Warszawa, 2015: 334.
5. Kenmoe S, Vernet MA, Mischak F, et al. Genetic diversity of human respiratory syncytial virus isolated among children with acute respiratory infections in Southern Cameroon during three consecutive epidemic seasons, 2011-2013. *Trop Med Health.* 2018; 3: 46-47.
6. Bednarska K, Hallmann-Szelińska E, Kondratiuk K, et al. Innowacje w nadzorze nad grypą w Polsce. *Probl Hig Epidemiol.* 2016; 97(2): 101-105.
7. Zakład Badań Wirusów Grypy, Krajowy Ośrodek ds. Grypy, NIZP-PZH, Wytyczne Zakładu Badań Wirusów Grypy. Krajowy Ośrodek ds. Grypy w NIZP-PZH odnośnie realizacji wirusologicznego i epidemiologicznego nadzoru nad grypą oraz nad innymi wirusami oddechowymi opartego na systemie *SENTINEL* od sezonu epidemicznego 2017/2018. Warszawa, 25.01.2018.
8. <http://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/grypa/>
9. Maita H, Kobayashi T, Osawa H, et al. Self-diagnosis of seasonal influenza in a rural primary care setting in Japan: A cross sectional observational study. *PLoS ONE* 13(5):e0197163, 2018: 1-9.
10. Budd AP, Wentworth DE, Blanton L, et al. Influenza Activity — United States, October 1, 2017–February 3, 2018. *MMWR Morb Mortal Wkl.* 2018; 67(6): 169-179.
11. Czarkowski MP, Cielebąk E, Staszewska-Jakubik E, et al. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2015 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi. Warszawa 2016.
12. Czarkowski MP, Cielebąk E, Staszewska-Jakubik E, et al. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2016 roku. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi. Warszawa 2017.
13. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce w 2017 roku – wstępne dane. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny – Zakład Epidemiologii, Główny Inspektorat Sanitarny – Departament Zapobiegania oraz Zwalczania Zakażeń i Chorób Zakaźnych u Ludzi. Warszawa 2018.
14. Skowronski DM, Chambers C, Gaston De Serres G, et al. Age-Related Differences in Influenza B Infection by Lineage in a Community-Based Sentinel System, 2010–2011 to 2015–2016, Canada. *J Infect Dis.* 2017; 216(6): 697-702.
15. Zawłocka E, Jackowska T. Grypa jako przyczyna hospitalizacji u dzieci w sezonie 2012/2013 – obserwacje własne. *Nowa Pediatria.* 2016: 98-104.
16. Cieślak-Tarkota R, Alberyńska M, Rozwadowska B, et al. Laboratoryjnie potwierdzone przypadki zachorowania na grypę w sezonie epidemicznym 2016/2017 w województwie śląskim. *Hygeia Public Health.* 2017; 52(4): 380-384.
17. Wierzbicka-Woś A, Tokarz-Deptuła B, Deptuła W. Układ odpornościowy a wirus grypy. *Postepy Hig Med Dosw.* 2015; 69: 214-220.
18. Upadhyay BP, Ghimire P, Tashiro M, et al. Characterization of Seasonal Influenza Virus Type and Subtypes Isolated from Influenza Like Illness Cases of 2012. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ).* 2017; 15(57): 57-60.
19. Reina J, Duenas J. Coinfecciones respiratorias entre los virus gripales y el virus respiratorio sincitial (2014-2017). *An Pediatr (Barc).* 2018: 1-2.
20. Korsun N, Angelova S, Trifonova I, Tzotcheva I, et al. Predominance of influenza A(H3N2) viruses during the 2016/2017 season in Bulgaria. *J Med Microbiol.* 2018; 67(2): 228-239.
21. Rabarison JH, Tempia S, Harimanana A, et al. Burden and Epidemiology of Influenza- and Respiratory Syncytial Virus-Associated Severe Acute Respiratory Illness Hospitalization in Madagascar, 2011-2016. *Influenza Other Respir Viruses* 2018, DOI: 10.1111/irv.12557, 1-31.
22. Przybyłowski T. Powikłania grypy. *Medycyna po Dyplomie.* 2011; 11(188): 85-91.
23. Okamoto M, Dapat CP, Sandagon AMD, et al. Molecular Characterization of Respiratory Syncytial Virus in Children with Repeated Infections with Subgroup B in the Philippines. *J Infect Dis.* 2018; 2: 1-22.
24. Kapusta K, Sopińska M, Kalicki B. Zakażenie RSV a nawrotowość obturacji dróg oddechowych u dzieci. *Pediatr Med Rodz.* 2016; 12(2): 118-125.
25. Wang XL, Yang L, Chan KH, et al. Age and Sex Differences in Rates of Influenza-Associated Hospitalizations in Hong Kong. *Am J Epidemiol.* 2015; 182(4): 335-344.
26. Kasprzak J, Domańska E, Błażejczyk E. Sytuacja epidemiologiczna grypy w województwie kujawsko-pomorskim w okresie od 1.07.2009 r. do 30.06.2011 r. *Hygeia Public Health.* 2012; 47(1): 109-112.
27. Pebody R, Warburton F, Ellis J, et al. End-of-season influenza vaccine effectiveness in adults and children, United Kingdom, 2016/17. *Euro Surveill.* 2017; 22(44): 1-13.
28. Zawłocka E, Chwiećko J, Jackowska T. Zachorowania na grypę u dzieci do 2. roku życia. *Nowa Pediatria.* 2016; 3: 105-112.
29. Ciebada M, Barylski M, Górka-Ciebada M. Zachorowania na grypę u osób w podeszłym wieku w świetle najnowszych danych epidemiologicznych i zaleceń terapeutycznych. *Geriatra.* 2010; 4: 191-198.
30. Piralla A, Lunghi G, Ruggiero L, et al. Molecular epidemiology of influenza B virus among hospitalized pediatric patients in Northern Italy during the 2015-16 season. *PLoS One.* 2017; 12(10): e0185893: 1-9.
31. Ge X, Guo Y, Chen J, et al. Epidemiology and Seasonality of Respiratory Viruses Detected from Children with Respiratory Tract Infections in Wuxi, East China. *Med Sci Monit.* 2018; 24: 1856-1862.
32. Harvala H, Carnahan A, Axelsson S, et al. Evaluation of the national laboratory-based surveillance system for respiratory syncytial virus in Sweden, 2015-2016. *J Clin Virol.* 2018; 10(104): 11-15.
33. Chrobak E, Edyta Machura E, Wrzask M. Przebieg zakażeń RSV u hospitalizowanych niemowląt i małych dzieci. *Przegląd Lekarski.* 2011; 68(1): 63-67.

Autor do korespondencji:

mgr Małgorzata Smogula

Oddział Diagnostyki Medycznej, Dział Laboratoryjny

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy

85-031 Bydgoszcz, ul. Kujawska 4

tel. +48 52 3761859

e-mail: malgorzata.smogula@gmail.com

Otrzymano: 19.06.2018

Akceptacja do druku: 17.07.2018

Nie zgłoszono sprzeczności interesów