

Raport końcowy za lata 2017 - 2020

z realizacji zadania 3 pkt 2.1. podpunkt 6c. Identyfikacja oraz charakterystyka biologicznych czynników chorobotwórczych w zakresie ich cech genotypowych i fenotypowych, w tym ich lekooporność – Charakterystyka szczepów wirusa zapalenia wątroby typu A (HAV) występujących w Polsce

w ramach umowy nr 6/4/2/NPZ/2018/1094/119



Warszawa, grudzień 2020 r.

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

WSTĘP

Wirus zapalenia wątroby typu A (HAV) przenosi się poprzez spożycie skażonej żywności i wody lub poprzez bezpośredni kontakt z osobą zakażoną. HAV jest jednym z najczęstszych zakażeń przenoszonych przez żywność. Do rozprzestrzeniania się zakażenia dochodzi przede wszystkim wówczas, gdy osoba wrażliwa (niezaszczepiona) spożyje pokarm lub wodę zanieczyszczoną odchodami osoby zakażonej. W rodzinach do zakażenia dochodzi m.in. w sytuacji, gdy osoba zakażona przygotowuje posiłki dla członków gospodarstwa domowego. Ogniska zakażenia przenoszone przez wodę, choć rzadkie, są zwykle związane z zanieczyszczoną ściekami lub nieodpowiednio oczyszczoną wodą. W krajach, w których ryzyko zakażenia poprzez żywność lub wodę jest niskie, dochodzi do epidemii wśród mężczyzn uprawiających seks z mężczyznami (MSM) i osób wstrzykujących narkotyki (PWID).

Ryzyko nabycia zakażenia obejmuje [1]:

- złe warunki sanitarne i higieniczne
- brak bezpiecznej wody
- zamieszkanie w gospodarstwie domowym z osobą zakażoną
- bycie partnerem seksualnym osoby z ostrym zapaleniem wątroby typu A
- używanie narkotyków
- seks między mężczyznami
- podróżowanie do obszarów o wysokiej endemiczności bez uprzedniego zaszczepienia.

Wirusowe zapalenie wątroby typu A (WZW A) jest chorobą, która może mieć zarówno łagodny, jak i ciężki przebieg. Objawy kliniczne wirusowego zapalenia wątroby typu A mogą obejmować: gorączkę, złe samopoczucie, utratę apetytu, biegunkę, nudności, dyskomfort w jamie brzusznej, ból stawów, ból gardła, ból brzucha, wymioty, świąd skóry, ciemnomocz, odbarwiony kał i żółtaczkę (zażółcenie skóry i białek oczu). Okres inkubacji WZW typu A wynosi zwykle 14 - 28 dni. Przebieg choroby jest uzależniony od wieku osoby chorej. Dorośli częściej niż dzieci mają oznaki i objawy choroby. Ciężka postać choroby i zgony są częstsze w starszych grupach wiekowych. Dzieci poniżej 6 roku życia zwykle nie odczuwają zauważalnych objawów zakażenia, a tylko u 10% z nich rozwija się żółtaczka. U starszych dzieci i dorosłych zakażenie zwykle manifestuje się cięższymi objawami, przy czym żółtaczka występuje w ponad 70% przypadków. Większość osób po przebyciu zakażenia HAV powraca do pełni zdrowia,

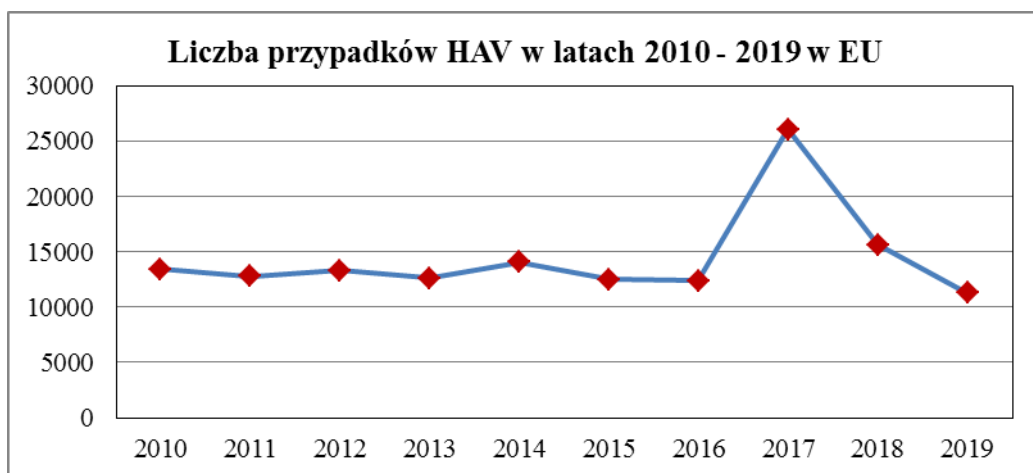
Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

nabywając odporność na całe życie, jednak niewielki odsetek osób zakażonych tym wirusem umiera na skutek rozwinięcia się piorunującej postaci zapalenia wątroby. WHO szacuje, że w 2016 roku WZW typu A było odpowiedzialne za około 7 134 zgony (co stanowi 0,5% wszystkich przypadków śmiertelnych z powodu wirusowego zapalenia wątroby) [1].

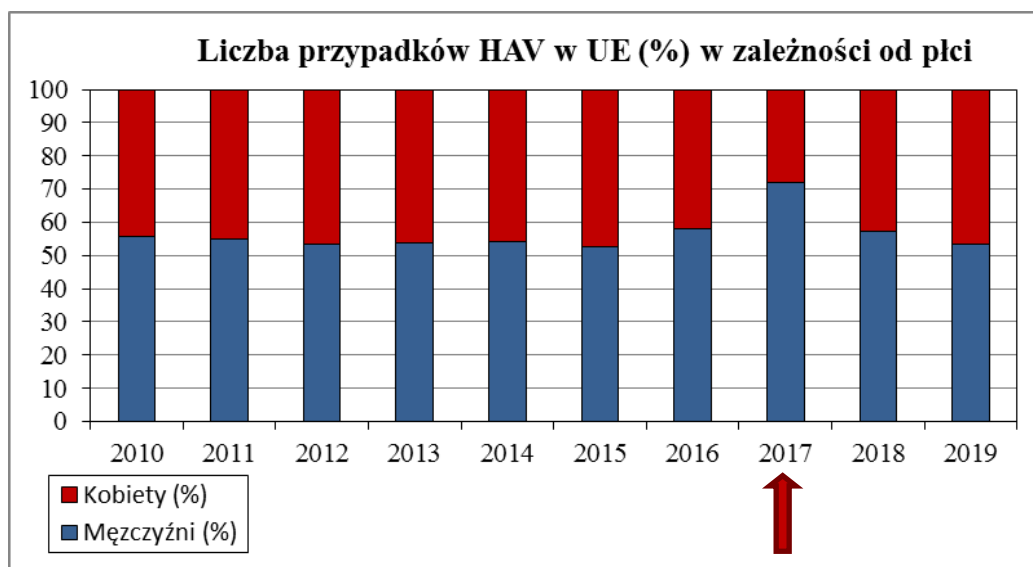
W przypadku wirusowego zapalenia wątroby typu A nie ma swoistej terapii (nie istnieje preparat, który przyspiesza usunięcie wirusa z organizmu osoby chorej). Powrót do zdrowia po zakażeniu może przebiegać powoli i zająć nawet kilka tygodni lub miesięcy. Hospitalizacja nie jest konieczna w przypadku braku ostrej niewydolności wątroby. Terapia opiera się na utrzymaniu komfortu i odpowiedniej równowagi żywieniowej (dieta lekko strawna), w tym na uzupełnianiu utraconych płynów w wyniku wymiotów i biegunki. WZW typu A zazwyczaj ustępuje samoistnie po około 6 miesiącach.

Wirusowe zapalenie wątroby typu A występuje na całym świecie, najczęściej w formie epidemii, z tendencją do cyklicznych nawrotów. Epidemie WZW typu A związane ze skażoną żywnością lub wodą mogą wybuchać gwałtownie, przykładem czego była epidemia w Szanghaju w 1988 roku, która dotknęła około 300 000 osób [2]. Epidemie wywołane tym wirusem mogą dotyczyć społeczności przez miesiące, poprzez ciągłą transmisję zakażenia z osoby na osobę i obecność wirusa w środowisku. HAV, jak inne wirusy bezosłonkowe, charakteryzuje się wysokim poziomem stabilności w środowisku, jak i opornością na inaktywację przez temperaturę, pH i promieniowanie ultrafioletowe, co prowadzi do możliwości przetrwania w środowisku przez długi czas. Wirus zapalenia wątroby typu A znajduje się na liście kandydatów (CCL – Contaminant Candidate List) Agencji Ochrony Środowiska (EPA - Environmental Protection Agency), która identyfikuje pojawiające się zanieczyszczenia, o których wiadomo, że występują w wodach publicznych i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia publicznego [3]. HAV może wykazywać oporność na procesy produkcji rutynowo stosowane do inaktywacji i / lub zwalczania patogenów bakteryjnych w żywności.

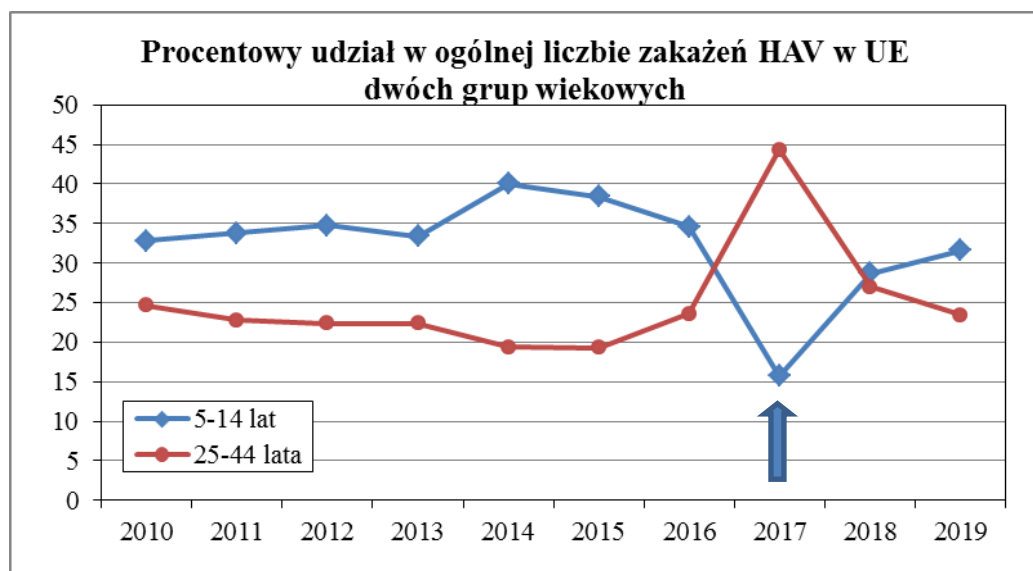
Sytuacja epidemiologiczna związana z zakażeniami HAV w krajach UE [7] w latach 2010-2019 została przedstawiona na Wykresie 1. Na Wykresie 2 pokazano jaki udział procentowy w zakażeniu miały kobiety i mężczyźni w poszczególnych latach. Największa liczba zakażeń HAV była wykrywana na przestrzeni tych lat w grupach wiekowych 5-14 lat oraz 25-44 lata (Wykres 3), a najmniejsza w grupie wiekowej 65+, w której zakażenia utrzymywały się na stałym poziomie 3-5%.



Wykres 1



Wykres 2



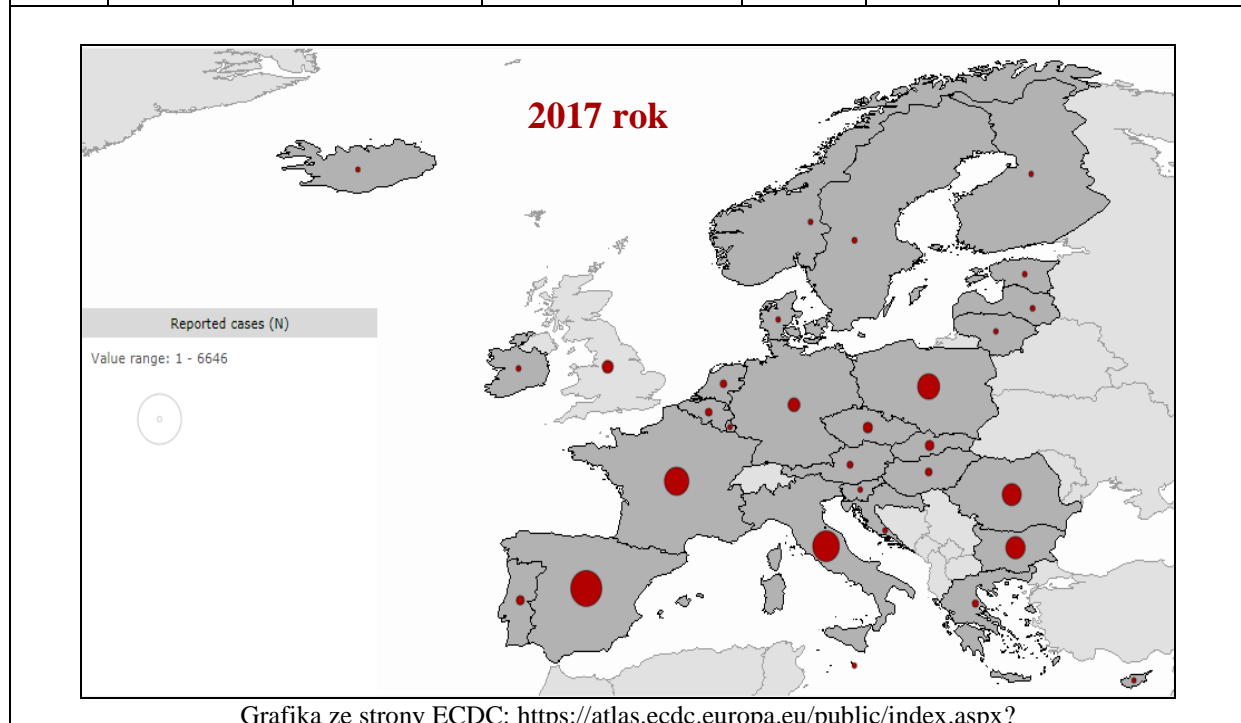
Wykres 3

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

W połowie 2016 roku w Europie pojawiło się ognisko wirusowego zapalenia wątroby typu A [4, 5, 6], w którym zachorowania dotyczyły głównie mężczyzn mających kontakty seksualne z mężczyznami (ang. MSM - men who have sex with men), a liczba zgłaszanych przypadków rosła sukcesywnie do 2017 roku. Porównanie liczby zgłoszonych przypadków zakażenia HAV, hospitalizacji, liczby zgonów z powodu tego zakażenia i innych podstawowych danych dotyczących skali zakażenia HAV w krajach Unii Europejskiej w latach 2016 - 2019 przedstawiono w Tabeli 1. Uwagę zwraca % przypadków nabycia zakażenia, będących rezultatem odbytych podróży.

Tabela 1. Zakażenia HAV w UE w latach 2016-2019 [7]

ROK	Liczba zgłoszonych przypadków	Zapadalność (na 100 000 mieszkańców)	Liczba hospitalizowanych przypadków (%)	Liczba zgonów	% śmiertelności	% przypadków związanych z podróżą
2016	12388	2,43	6079 (82%)	7	0,1	17,7
2017	26091	5,10	8462 (74,8%)	19	0,2	12,5
2018	15645	3,05	3340 (61,1%)	14	0,2	13,8
2019	11296	2,22	5828 (82%)	13	0,2	14,5



Badania molekularne wykazały, że we wspomnianym wyżej europejskim ognisku dominuje genotyp IA, zaś w jego obrębie szczepy: VRD 521 2016 , RIVM-HAV16-090 oraz V16 -25801 [4].

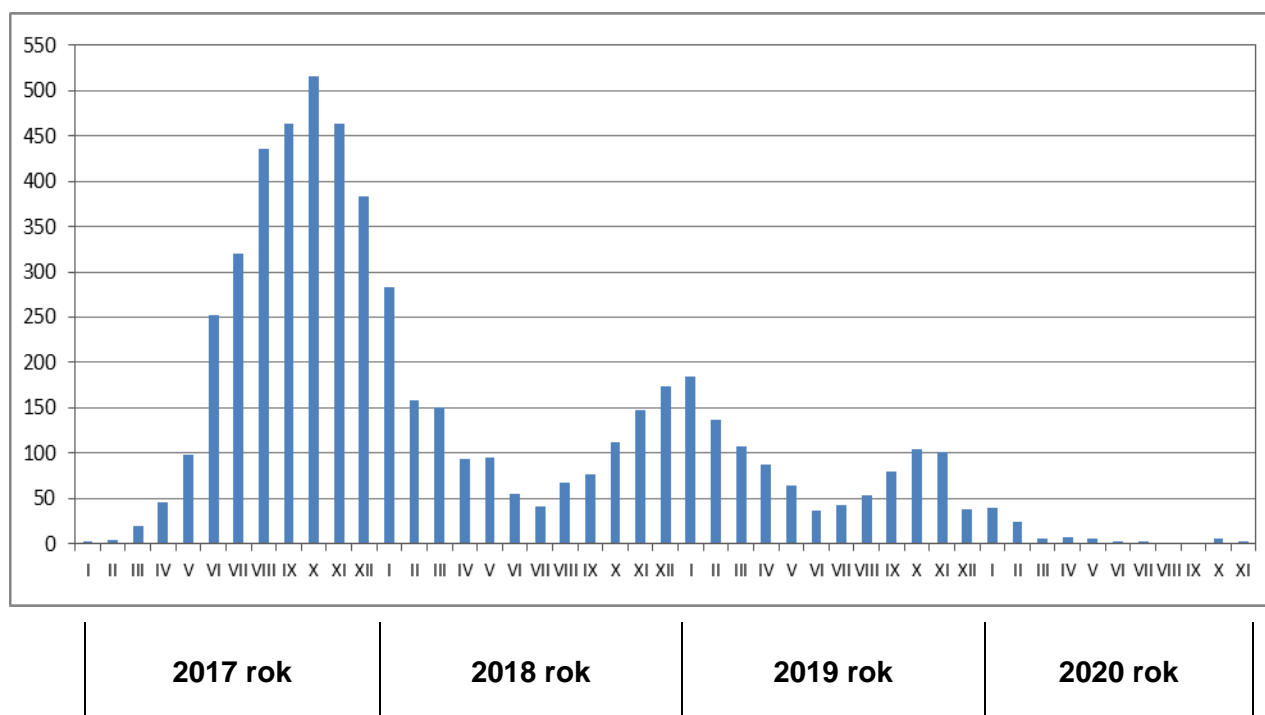
W Polsce wzrost zachorowań na wirusowe zapalenie wątroby typu A obserwowano od marca 2017 roku. W całym roku odnotowano 3006 przypadków zachorowań na WZW A, zapadalność wynosiła 7,82 na 100 000 mieszkańców, co stanowiło prawie 100-krotnie więcej zachorowań niż miało to miejsce w analogicznych okresach w latach 2014-2016 (np. w 2016 roku odnotowano 35 zachorowań; zapadalność 0,09). Liczba osób hospitalizowanych wynosiła 2581, co stanowiło 85,9% zgłoszonych przypadków zachorowań. Według danych pochodzących z meldunków epidemiologicznych Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru NIZP-PZH [8] oraz Departamentu Przeciwepidemicznego i Ochrony Sanitarnej Granic GIS [9], w 2017 na WZW typu A zachorowało 2334 mężczyzn (1981 przypadków odnotowano w miastach i 353 na wsi) i 672 kobiety (519 w miastach i 153 na wsi). Zachorowania dotyczyły głównie osób z przedziału wiekowego 20-44 lata. Największą liczbę zachorowań odnotowano w województwach: mazowieckim (692), śląskim (546), wielkopolskim (486), małopolskim (260) i łódzkim (206).

W 2018 roku odnotowano o połowę mniej przypadków (1455) zachorowań na WZW A niż w roku poprzedzającym, zapadalność wynosiła 3,79 na 100 000 mieszkańców. Liczba osób hospitalizowanych wynosiła 1315, co stanowiło 90,4% zgłoszonych przypadków zachorowań. W 2018 proporcja zachorowań wśród mężczyzn i kobiet znacznie się wyrównała w porównaniu do roku 2017 i wynosiła 847 zachorowań wśród mężczyzn (650 w miastach i 197 na wsi) i 608 zachorowań wśród kobiet (475 w miastach i 133 na wsi). Największą liczbę przypadków WZW typu A odnotowano wśród osób z przedziału wiekowego 25-39 lat. Największą liczbę zachorowań odnotowano w województwach: śląskim (809), mazowieckim (134) i kujawsko-pomorskim (103). Rozkład sezonowy w roku 2017 i 2018 był różny. W 2017 roku liczba zachorowań systematycznie rosła od kwietnia do września, a następnie zanotowano równomierny spadek zgłaszanych przypadków aż do lutego 2018 roku. Między marcem a sierpniem 2018 roku liczba zachorowań utrzymywała się na tym samym poziomie, a następnie dwukrotnie wzrosła w miesiącach wrzesień – listopad. W 2019 roku zanotowano 1066 przypadków zachorowań na WZW typu A (zapadalność wynosiła 2,78) i była to liczba niższa o 26,7% niż w 2018 roku. Największą liczbę zakażeń zanotowano w województwach dolnośląskim (296), śląskim (282) i mazowieckim (104), a najniższą w podlaskim (4), podkarpackim (10) i warmińsko-mazurskim

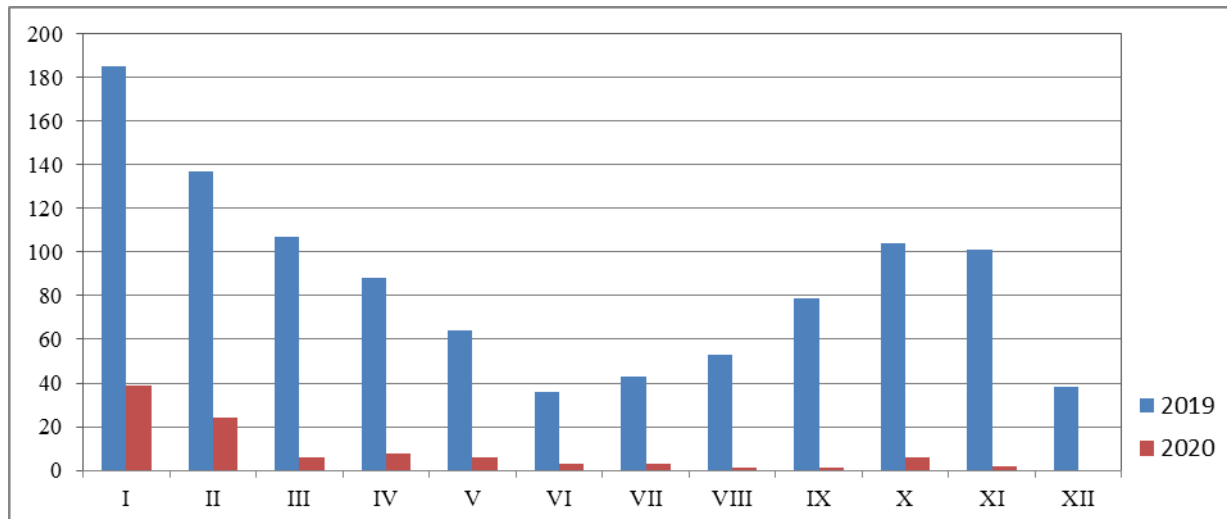
(12). W pozostałych województwach liczba zakażeń wahała się od 16 (w świętokrzyskim) do 74 (w łódzkim). W 2020 roku od 01.01 do 15.11 zgłoszono 99 przypadków zachorowań na WZW typu A, co stanowi ok. 9% przypadków zanotowanych w roku poprzednim. Może to świadczyć o wyciszeniu epidemii HAV lub, co jest bardziej prawdopodobne, zdominowaniu przez panującą epidemię COVID-19 i skupieniu przede wszystkim na raportach związanych z zakażeniami SARS-CoV 2.

Na podstawie dostępnych informacji o zachorowaniach na wybrane choroby zakaźne, zakażenia i zatrucia w Polsce w latach 2017 – 2020 [8, 9], przedstawiono liczbę zachorowań w poszczególnych miesiącach tych lat (wykres 4). Porównanie liczby przypadków zachorowań w poszczególnych miesiącach roku 2019 oraz 2020 przedstawiono na wykresie 5.

Wykres 4. Liczba zgłoszonych zachorowań na WZW typu A w poszczególnych miesiącach lat 2017-2020.



Wykres 5. Liczba zgłoszonych zachorowań na WZW typu A w poszczególnych miesiącach 2020 roku w porównaniu z rokiem 2019.



ZAŁOŻENIA PROJEKTU:

Badanie miało na celu przeprowadzenie molekularnej analizy (genotypowania) szczepów wirusa zapalenia wątroby typu A (HAV) pochodzących z okresu 2017-2020 od chorych z różnych regionów Polski, u których w badaniu serologicznym stwierdzono obecność przeciwciał w klasie IgM dla HAV.

Molekularna charakterystyka szczepów HAV została przeprowadzona na podstawie:

- 1) Potwierdzenia obecności materiału genetycznego HAV metodą RT-PCR w przesłanych do analizy próbkach surowic.
- 2) Amplifikacji fragmentu genomu HAV z regionu VP1/P2A oraz określenia sekwencji nukleotydowej. Badania prowadzone były w oparciu o wystandaryzowany protokół genotypowania opracowany przez Laboratorium Referencyjne ds. diagnostyki wirusa Hepatitis A (Dutch National Institute of Public Health and the Environment, RIVM).
- 3) Analizy filogenetycznej wyników sekwencjonowania.

OPIS ZGROMADZONYCH MATERIAŁÓW OD OSÓB ZAKAŻONYCH HAV

W ramach realizacji zadania 3 w 2017 roku nawiązano kontakt z Wojewódzkimi i Powiatowymi Stacjami Sanitarno-Epidemiologicznymi oraz z lekarzami i szpitalami na terenie Polski (przede wszystkim szpitali zakaźnych lub oddziałów zakaźnych). Do w/w jednostek wysłane zostały pisma, opisujące aktualną sytuację epidemiologiczną w kraju. Stacje Sanitarno-Epidemiologiczne

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

otrzymały instrukcję dotyczącą pobierania, przesyłania i przechowywania materiału do badań molekularnych od osób z WZW typu A. Materiałem do badań molekularnych w kierunku identyfikacji i genotypowania HAV były próbki pobrane od pacjentów, u których stwierdzono obecność przeciwciał w klasie IgM dla tego wirusa. W początkowej fazie projektu (2017 rok) do badań przesyłane były 2 rodzaje materiałów: surowica (objętość min. 200 µl) pobrana do 6 tygodni od ekspozycji na wirusa oraz próbka kału (wielkości orzecha) pobrana do 5 tygodni od ekspozycji na wirusa. Ponieważ nie było możliwe pozyskanie kompletu materiałów od wszystkich pacjentów, w dalszej fazie programu skupiono się tylko na badaniu próbek surowicy. Dla porównania przeprowadzone zostały badania PCR oraz sekwencjonowanie i genotypowanie par materiałów surowica-kał od wybranej grupy pacjentów, które wykazały całkowitą zgodność wyników. Badanie PCR przeprowadzono w grupie 17 pacjentów, a w przypadku 11 pacjentów przeprowadzono sekwencjonowanie i genotypowanie uzyskanego materiału genetycznego w PCR z surowicy i kału. Uzyskane wyniki we wszystkich przypadkach par materiałów były zgodne (Tabela 2). Pobrane materiały przechowywano w temperaturze -20°C lub -70°C.

Tabela 2. Wyniki dla par materiałów surowica + kał pochodzących od jednego pacjenta

Kod izolatu	Miasto hospitalizacji	Materiał	Wynik PCR	Genotyp	Kod izolatu	Miasto hospitalizacji	Materiał	Wynik PCR	Genotyp
HAV5	Warszawa	kał	POS	IA	HAV28	Warszawa	kał	POS	IA
HAV6		surowica	POS	IA	HAV29		surowica	POS	IA
HAV7	Warszawa	kał	POS	IIIA	HAV30	Warszawa	kał	POS	IA
HAV8		surowica	POS	IIIA	HAV31		surowica	POS	IA
HAV9	Warszawa	kał	POS	IA	HAV32	Szczecin	kał	POS	nb
HAV10		surowica	POS	IA	HAV33		surowica	POS	IA
HAV11	Poznań	kał	POS	IA	HAV34	Szczecin	kał	POS	nb
HAV12		surowica	POS	IA	HAV35		surowica	POS	IA
HAV18	Warszawa	kał	POS	IA	HAV36	Warszawa	kał	POS	nb
HAV19		surowica	POS	IA	HAV37		surowica	POS	IA
HAV20	Poznań	kał	POS	IA	HAV38	Warszawa	kał	POS	nb
HAV21		surowica	POS	IA	HAV39		surowica	POS	IA
HAV22	Poznań	kał	POS	IA	HAV40	Warszawa	kał	POS	nb
HAV23		surowica	POS	IA	HAV41		surowica	POS	IA
HAV24	Poznań	kał	POS	IA	HAV42	Warszawa	kał	POS	nb
HAV25		surowica	POS	IA	HAV43		surowica	POS	IA
HAV26	Poznań	kał	POS	IA	nb – nie badano				
HAV27		surowica	POS	IA					

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

Próbki zgromadzone w Zakładzie Wirusologii w latach 2017-2018 pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w Poznaniu, Warszawie, Wrocławiu, Gdańsku, Szczecinie, Katowicach i Bydgoszczy. Otrzymane w 2019 roku próbki od pacjentów były przesłane przez Wojewódzkie i Powiatowe Stacje Sanitarно-Epidemiologiczne z Opola (5), Siedlec (3), Krosna (9), Łęcznej (2), Lublina (8), Jasła (1), Łańcuta (5), Białegostoku (2), Tomaszowa Lubelskiego (2), Krakowa (4), Bydgoszczy (7), Łukowa (4), Elbląga (1) i Warszawy (2). Próbki pochodziły zarówno od chorych w 2019 roku, jak i z wcześniejszego okresu. Próbki otrzymane w 2020 roku (9) pochodziły ze Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej w Bydgoszczy. W przypadku pacjentów, których próbki przesyłano do badań starano się pozyskać następujące dane:

1. Podstawowe dane epidemiologiczne tj.: wiek, płeć, miejsce zamieszkania (miasto/wieś);
2. Historia wyjazdów (jeśli podróżował w ostatnim czasie);
3. Data pobrania próbki;
4. Data wystąpienia pierwszych objawów;
5. Wartości ALT/AST;
6. Wynik serologii: anty-HAV IgM.

Nie wszystkie dane udało się uzyskać, problemy były przede wszystkim z wynikami dotyczącymi poziomu ALT/AST oraz z uzyskaniem informacji na temat podróży (te informacje uzyskano tylko dla niewielkiej grupy pacjentów).

W ramach projektu w latach 2017 – 2020 przebadano: w **2017 roku** – 100 surowic; w **2018 roku** – 130 surowic; w **2019 roku** – 55 surowic; w **2020 roku** – 125 surowic. Łącznie przebadano 410 próbek surowic. W 2020 roku retestowano również próbki dla których we wcześniejszej fazie badań (w 2019 i 2020 roku) uzyskano wynik ujemny. Informacje na temat miejsc pochodzenia próbek znajdują się w Tabeli 3. W grupie badanej były 72 kobiety, 240 mężczyzn oraz 98 próbek dla których nie uzyskano tych danych. Dane dotyczące płci oraz wieku badanych osób zakażonych HAV przedstawiono w Tabeli 4. W przypadku 48 osób uzyskano twierdzącą odpowiedź na pytanie dotyczące podróży zagranicznej w okresie bezpośrednio poprzedzającym chorobę, a wskazany cel podróży to Anglia, Austria, Słowacja, Chiny, Chorwacja, Cypr, Czechy, Dania, Dubaj, Egipt, Hawaje, Hiszpania, Kambodża, Kazachstan, Kenia, Somalia, Korea Południowa, Litwa, Meksyk, Niemcy (głównie Berlin), Nowa Zelandia, Norwegia, Portugalia, Rumunia, Tajlandia, Turcja, USA, Włochy, Wyspy Zielonego Przylądka. Przecząco odpowiedziało 207 osób, w przypadku 155 osób nie uzyskano żadnej odpowiedzi.

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

Tabela 3. Miejsca z których pochodziły badane próbki surowic, zebrane w latach 2017-2020

Rok badania	Liczba próbek	Miasto, z którego otrzymano próbkę (Szpital, SANEPID)	Miejsca zamieszkania pacjentów
2017	63	Warszawa	Warszawa, Piaseczno, Kielce, Kreczki, Zielonka, Lipówki, Pruszków, Jesionka, Tłuszcz, Błędów
	18	Szczecin	Szczecin, Stargard Szczeciński, Pniewo, Węgrzyno
	10	Poznań	Poznań, Krotoszyn
	6	Wrocław	Wrocław
	3	Gdańsk	Gdańsk
2018	66	Warszawa	Warszawa, Rudzienko, Piaseczno, Tarczyn, Święcice, Sulejówek, Poznań, Lublin, Wymysłów, Okuniew, Pruszków, Zduńska Wola, Legionowo, Kartuzy, Żyrardów, Zakręt, Miętne
	47	Poznań	Poznań, Pecna, Strzyżew, Swarzędz, Suchy Las, Leszno, Krzyż Wielkopolski, Gniezno, Warszawa, Staniew, Głuponie, Luboń, Opalenica, Wonieść, Granowo
	10	Gdańsk	Gdańsk
	7	Bydgoszcz	Bydgoszcz, Mierucin, Dąbrowa Chełmińska, Rypin
2019	9	Krosno	Krosno, Zarszyn, Kopytowa, Lubatówka, Podniebyle
	8	Lublin	Ulan-Majorat, Dominów, Kępa, Jakubowice Końskie, Wola Wiemiecka, Jawidz
	7	Bydgoszcz	Inowrocław, Wierzchucin Królewski, Grudziądz, Bydgoszcz, Białe Błota, Toruń
	5	Opole	Opole, Pawłowice, Głogówek
	5	Łańcut	Brak danych
	4	Łuków	Kock, Adamów, Radzyń Podlaski
	4	Kraków	Brak danych
	3	Siedlce	Żelków, Stara Dąbrowka
	2	Łęczna	Milejów
	2	Białystok	Wizna, Zaręby
	2	Tomaszów Lub.	Janówka, Tomaszów Lubelski
	2	Warszawa	Pułtusk
	1	Jasło	Jasło
1	Elbląg	Pasłęk	
2020	73	Poznań	Brak danych
	27	Katowice	Jastrzębie Zdrój, Świętochłowice, Sosnowiec, Katowice, Ruda Śląska, Będzin, Jaworzno, Gliwice, Zabrze, Wojtkowice
	25	Bydgoszcz	Toruń, Chełmża, Bydgoszcz, Inowrocław, Sikorowo, Serock
SUMA	410		

Tabela 4. Charakterystyka próbek pod kątem wieku oraz płci badanych osób

Parametr	Kobiety	Mężczyźni	Brak danych
Liczba próbek ogółem	72	240	98
Zakres wieku (lata)	1 - 87	1 - 70	-----
Średnia wieku (mediana)	29,07 (27)	32,74 (33)	-----
Liczba próbek w grupach wiekowych:			
1-10 lat	11	11	-----
11-19 lat	10	6	-----
20-29 lat	20	63	-----
30-39 lat	17	106	-----
40-59 lat	10	48	-----
60 lat i więcej	4	6	-----

ETAPY PRZEPROWADZONEJ ANALIZY MOLEKULARNEJ

W ramach realizacji działania 3.2 przeprowadzono badania molekularne, obejmujące:

1. Izolację materiału genetycznego wirusa zapalenia wątroby typu A z pozyskanych próbek klinicznych (surowica). Izolację RNA wirusa przeprowadzono przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji (QIAamp Viral RNA Mini Kit - Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta. Do dalszych analiz izolaty RNA (60µl) przechowywano w zamrożeniu, w temp. < -20°C.
2. Identyfikację wyizolowanego z surowicy materiału genetycznego metodą RT-PCR. Badania prowadzone były zgodnie z protokołem opracowanym przez Laboratorium Referencyjne ds. diagnostyki wirusa Hepatitis A (Dutch National Institute of Public Health and the Environment, RIVM) – amplifikacja fragmentu genomu WZW A z regionu VP1/P2A.
3. Określenie sekwencji nukleotydowej amplifikowanego fragmentu w próbkach dla których uzyskano wynik dodatni reakcji RT-PCR. Badania prowadzone były w oparciu o wystandardyzowany protokół genotypowania opracowany przez Laboratorium Referencyjne ds. diagnostyki wirusa Hepatitis A (Dutch National Institute of Public Health and the Environment, RIVM).
4. Ustalenie genotypu badanego szczepu na podstawie sekwencji nukleotydów, przy zastosowaniu programu Geneious i/lub CLC Main Workbench 7.0.

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

5. Analizę filogenetyczną wyników sekwencjonowania dla próbek zbadanych w poszczególnych latach trwania projektu.
6. Końcową (zbiorczą) analizę filogenetyczną dla wybranych (spełniających określone kryteria) próbek pozyskanych w całym okresie trwania projektu (2017-2020). Do końcowej analizy filogenetycznej wyselekcjonowano ok. 250 próbek (izolatów). Przy wyborze próbek kierowano się: „pochodzeniem” geograficznym próbek (miejsce hospitalizowania/miejsce zamieszkania); wiekiem pacjentów; obecnością danych dotyczących wyjazdów za granicę w okresie poprzedzającym zachorowanie, określonym genotypem szczepu HAV; dostępnością danych dotyczących okresu jaki upłynął od pojawienia się objawów choroby a pobraniem surowicy do badania oraz jakością materiału otrzymanego w procesie sekwencjonowania, który pozwalał na określenie genotypu HAV.

WYNIKI

W ramach projektu w latach 2017 – 2020 przebadano łącznie 410 próbek surowic. Wyniki uzyskane w reakcji RT-PCR dla tych próbek przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki uzyskane w reakcji RT-PCR w badanych surowicach zebranych w latach 2017-2020.

Rok badania	Liczba zbadanych próbek	Liczba próbek dodatnich ¹	Liczba próbek ujemnych
2017	100	100	0
2018	130	130	0
2019	55	48	7
2020	125	110	15
2017-2020	410	388	22

1 – wynik dodatni oznacza potwierdzenie obecności RNA HAV w surowicy (PCR HAV+)

Wynik dodatni (PCR HAV+ w surowicy) uzyskano w przypadku 64/72 kobiet w wieku od 1 roku do 70 lat (średnia wieku 27,1 lat; mediana 25,5 lat), w tym w grupie do 10 roku życia było 10 próbek dodatnich, od 11 do 18 roku życia 8, a najliczniejszą grupę stanowiły próbki z przedziału wiekowego od 19 do 40 lat (36 próbek). W grupie powyżej 60 lat zanotowano 1 wynik dodatni.

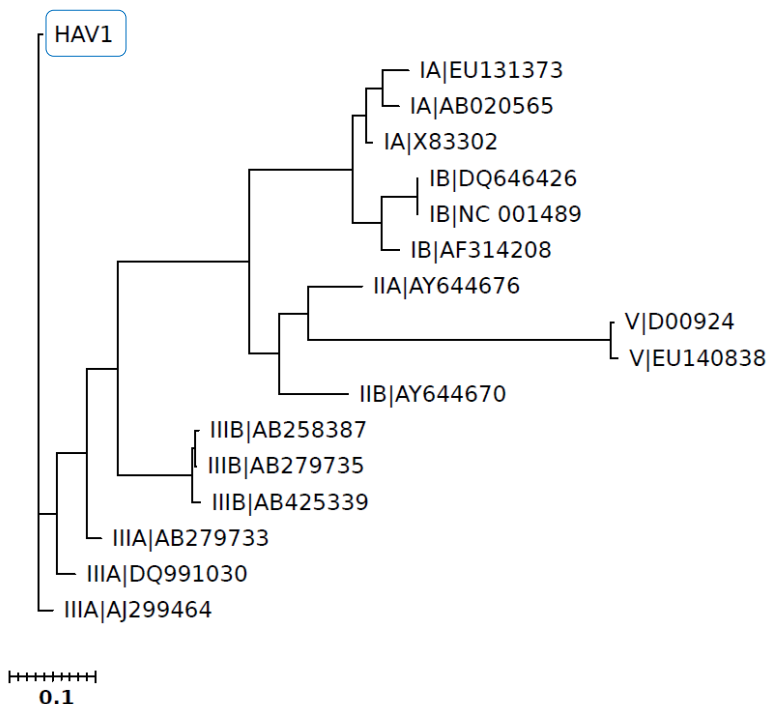
Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

W grupie mężczyzn wynik dodatni uzyskano w 229 z 240 przypadków. Zakres wieku mężczyzn u których stwierdzono dodatni wynik PCR HAV wynosił od 1 roku do 64 lat, w tym do 10 roku życia było tylko 7 dodatnich próbek, w grupie od 11 do 18 roku życia – 3 próbki, a najliczniejsza grupa z dodatnimi wynikami (178 próbek) była w wieku od 19 do 40 lat włącznie. W grupie powyżej 60 lat zanotowano 3 wyniki dodatnie. Wśród 98 próbek, dla których nie uzyskano informacji na temat płci i wieku były 3 próbki ujemne (PCR HAV-) i 95 próbek dodatnich (PCR HAV+).

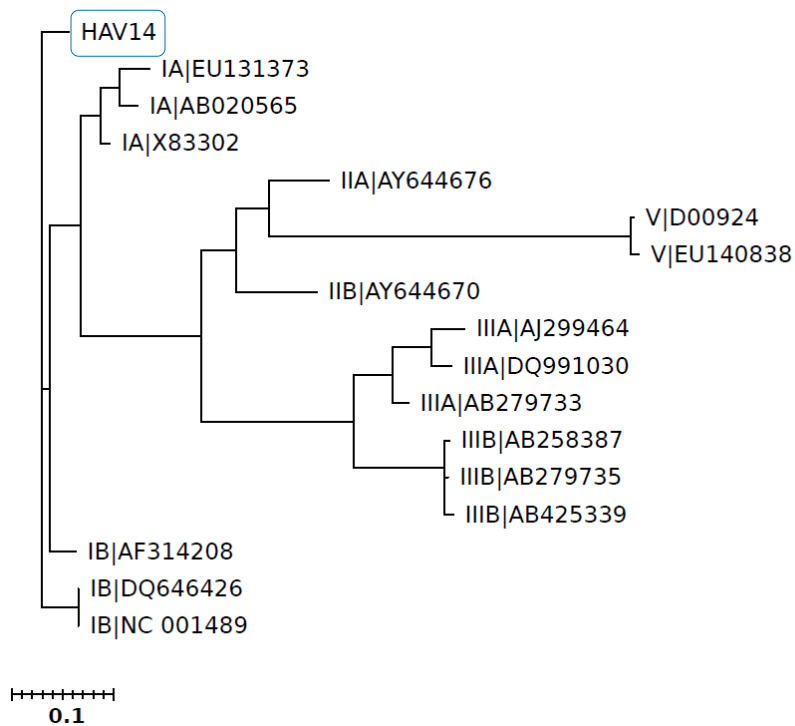
Wśród 388 osób, u których uzyskano dodatni wynik PCR HAV, 46 osób dało twierdzącą odpowiedź na pytanie dotyczące podróży zagranicznej w okresie bezpośrednio poprzedzającym chorobę, a wskazany cel podróży to Anglia, Austria, Słowacja, Chiny, Chorwacja, Cypr, Czechy, Dania, Dubaj, Egipt, Hawaje, Hiszpania, Kambodża, Kazachstan, Kenia, Somalia, Korea Południowa, Litwa, Meksyk, Niemcy (głównie Berlin), Nowa Zelandia, Norwegia, Portugalia, Rumunia, Tajlandia, Turcja, USA, Włochy, Wyspy Zielonego Przylądka. Przecząco odpowiedziało 188 osób, a 154 osoby nie udzieliły ani twierdzącej, ani przeczącej odpowiedzi.

Wśród wszystkich 100 przebadanych w 2017 roku próbek pacjentów stwierdzono na podstawie wyników sekwencjonowania u dwóch pacjentów wykryto genotyp IIIA HAV, u dwóch genotyp IB a u pozostałych 96 pacjentów ustalono zakażenie genotypem IA. Pacjenci, u których wykryto genotyp IIIA, to kobieta w wieku 29 lat, która zadeklarowała wyjazd za granicę przed zachorowaniem i mężczyzna w wieku 27 lat, który nie wyjeżdżał w ostatnim czasie z Polski. Pacjenci, u których wykryto genotyp IB, to kobieta w wieku 39 lat, która przed zachorowaniem podróżowała na Wyspy Zielonego Przylądka, drugi pacjent to mężczyzna w wieku 44 lat, który przed zachorowaniem podróżował w rejonie Kenii i Somalii. Dane uzyskane w 2017 roku wskazywały, że zachorowania na WZW typu A dotyczą przede wszystkim grupy młodych mężczyzn, a najczęściej pojawiającym się dotychczas w Polsce genotypem HAV był genotyp IA. Wykorzystując szeroki wachlarz sekwencji referencyjnych (dla genotypów IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB) stworzono drzewa filogenetyczne dla jednego izolatu z określonym genotypem IIIA, jednego z genotypem IB i dwóch przykładowych izolatów dla których stwierdzono genotyp IA (Rys.1-3).

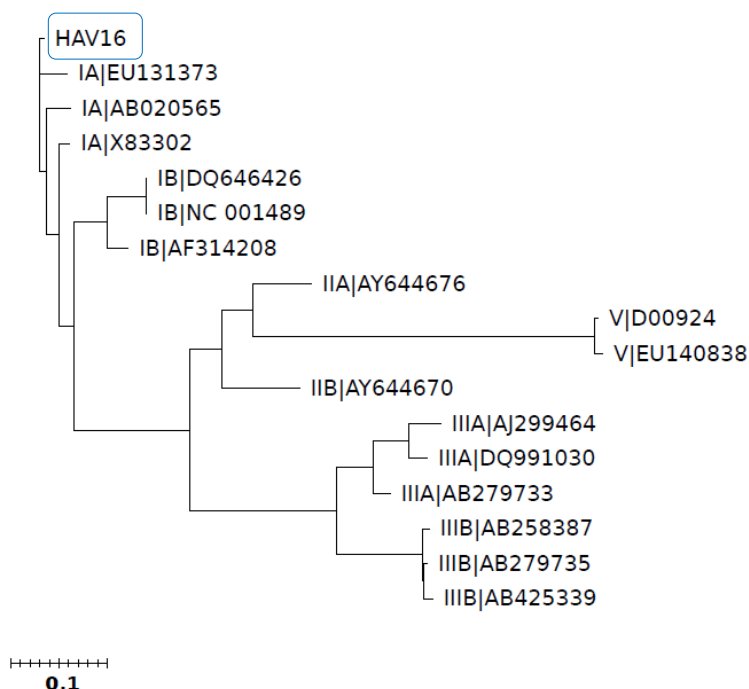
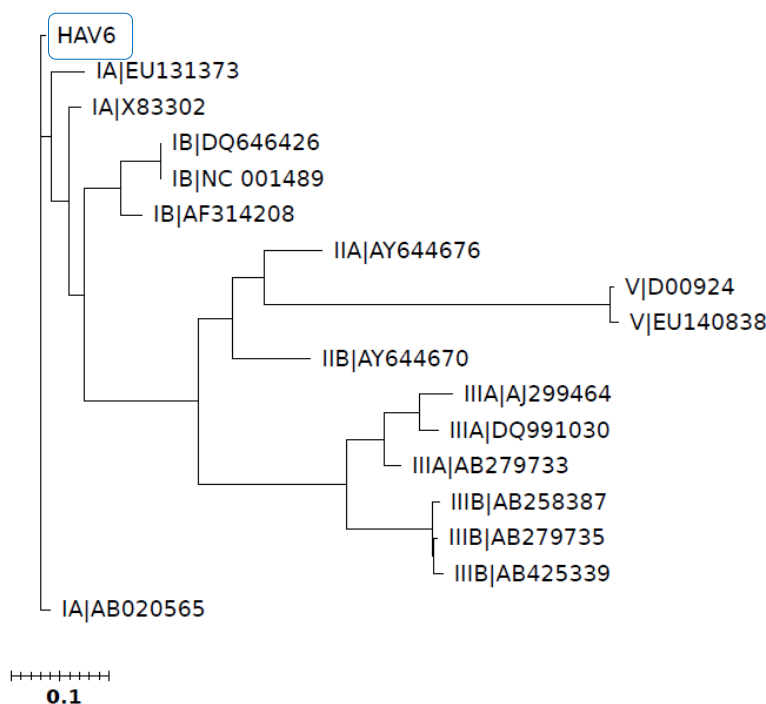
Rys. 1. Drzewo filogenetyczne sekwencji fragmentu regionu VP1/P2A HAV izolowanej z materiału od pacjentki hospitalizowanej w Poznaniu, u której stwierdzono zakażenie genotypem IIIA.



Rys. 2. Drzewo filogenetyczne sekwencji fragmentu regionu VP1/P2A HAV izolowanej z materiału od pacjentki hospitalizowanej w Szczecinie, u której stwierdzono zakażenie genotypem IB.



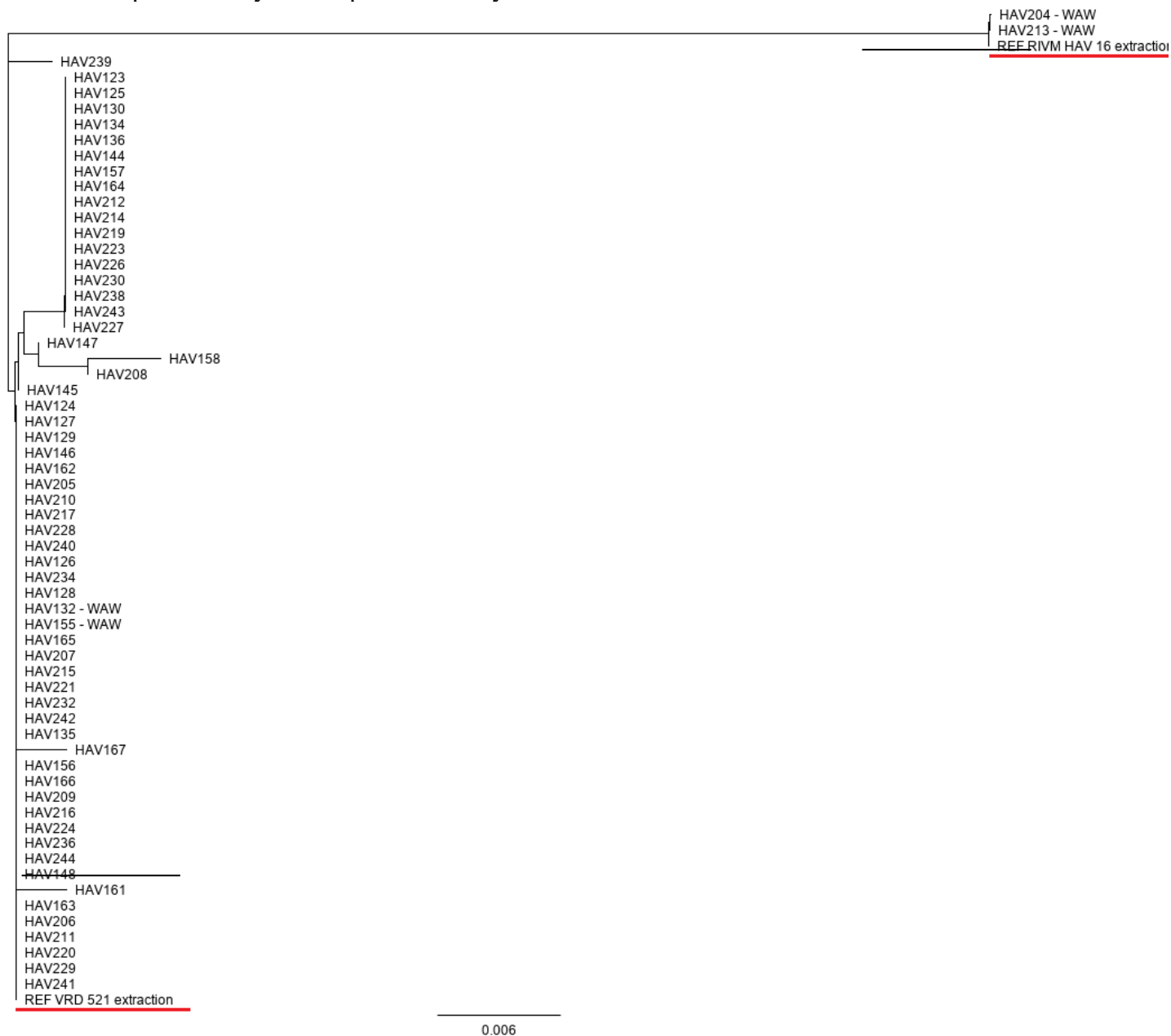
Rys. 3. Drzewo filogenetyczne sekwencji fragmentu regionu VP1/P2A HAV izolowanej z materiału od dwóch pacjentów u których stwierdzono zakażenie genotypem IA – mężczyzny w wieku 34 lat hospitalizowanego w styczniu 2017 roku w Warszawie (HAV6) oraz mężczyzny w wieku 38 lat hospitalizowanego w styczniu 2017 roku w Szczecinie, mającego w wywiadzie podróż do Berlina przed wystąpieniem objawów choroby.



W 2018 roku we wszystkich przebadanych 130 próbkach surowic stwierdzono obecność RNA HAV. Próbki surowic pochodziły od pacjentów hospitalizowanych w Poznaniu, Warszawie, Gdańsku i Bydgoszczy. Sekwencjonowanie wykazało, że wszystkie zbadane izolaty należały do genotypu IA dominującego w tym okresie w Europie.

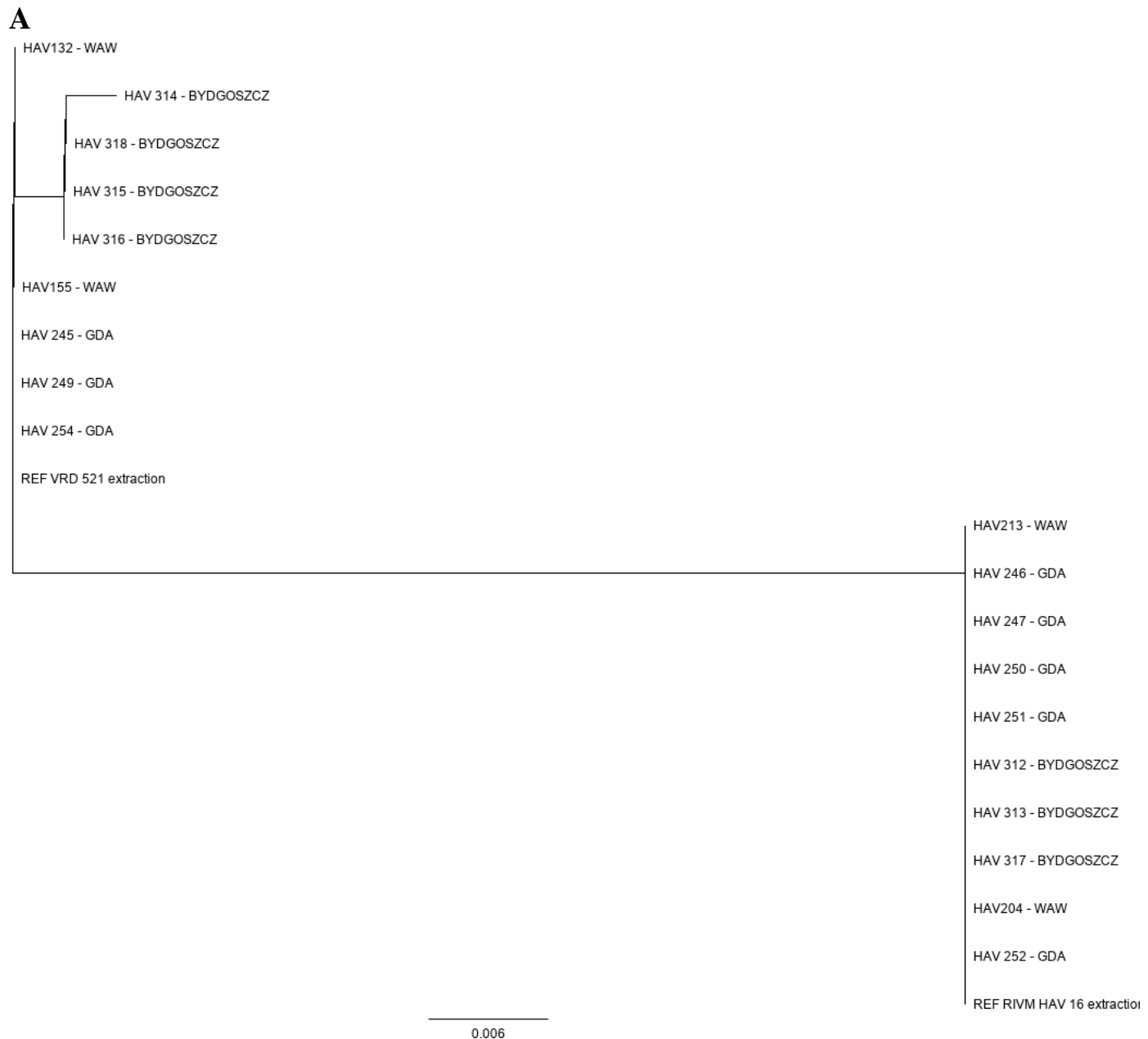
W raporcie jako jeden z przykładów zaprezentowano drzewo filogenetyczne izolatów HAV uzyskanych od pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Zakaźnym w Warszawie, pochodzących od pacjentów mieszkających w różnych lokalizacjach w obrębie województwa mazowieckiego oraz pojedynczych izolatów od pacjentów z innych województw hospitalizowanych w Warszawie (Rys. 4). Na Rys.5 przedstawiono analizę filogenetyczną izolatów z Gdańska i Bydgoszczy oraz Poznania od pacjentów badanych w 2018 roku, do których dołączono pojedyncze sekwencje izolatów reprezentujące poszczególne grupy (clusters) drzewa filogenetycznego uzyskanego dla sekwencji HAV pochodzących od pacjentów Szpitala Zakaźnego w Warszawie. Na podstawie uzyskanych drzew filogenetycznych, stwierdzono, że wśród przebadanych w 2018 roku próbek najliczniejszą grupę stanowią izolaty o bardzo podobnej i/lub identycznej z występującą u szczepu referencyjnego VRD_521_2016 sekwencji fragmentu regionu VP1/P2A genomu HAV. Mniej liczne izolaty wykazywały wysoki stopień podobieństwa do szczepu referencyjnego RIVM-HAV16-090. Szczepy HAV VRD_521_2016 oraz RIVM-HAV16-090 (dominujące w ognisku europejskim w latach 2017-2018), należą do genotypu IA obecnego w innych krajach europejskich co wspiera hipotezę mówiącą, że Polska w latach 2017-2018 także była objęta trwającym w Europie ogniskiem HAV.

Rys. 4. Drzewo filogenetyczne sekwencji izolowanych z materiału od pacjentów hospitalizowanych w Szpitalu Zakaźnym w Warszawie

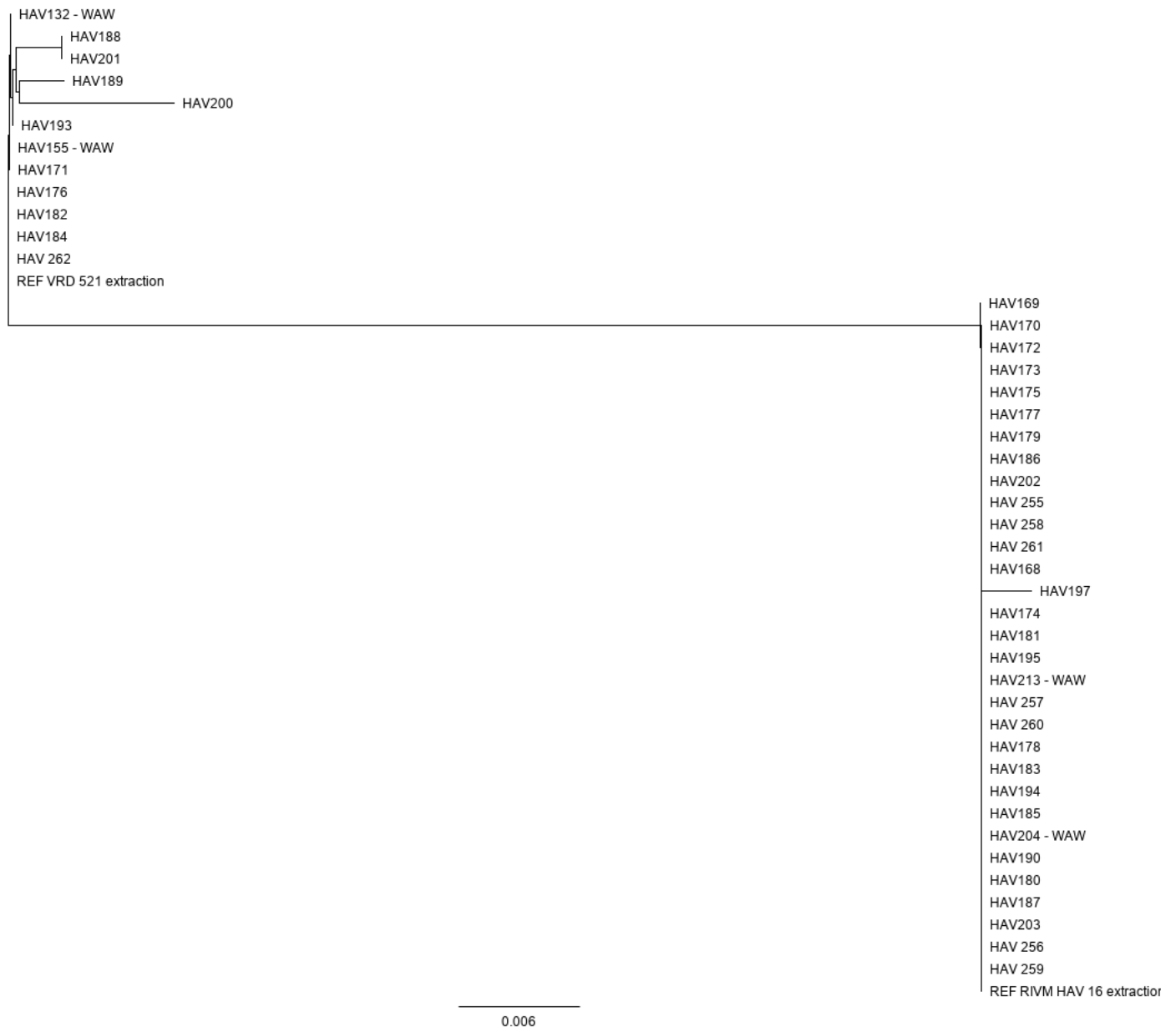


Rys. 5. A. Drzewo filogenetyczne sekwencji izolowanych z materiału od pacjentów z Gdańska i Bydgoszczy
B. Drzewo filogenetyczne sekwencji izolowanych z materiału od pacjentów z Poznania

Dla porównania przedstawiono 4 sekwencje wirusa HAV genotyp IA wyizolowane od pacjentów z Warszawy HAV132 – WAW, HAV155 - WAW, HAV204 – WAW, HAV213 – WAW



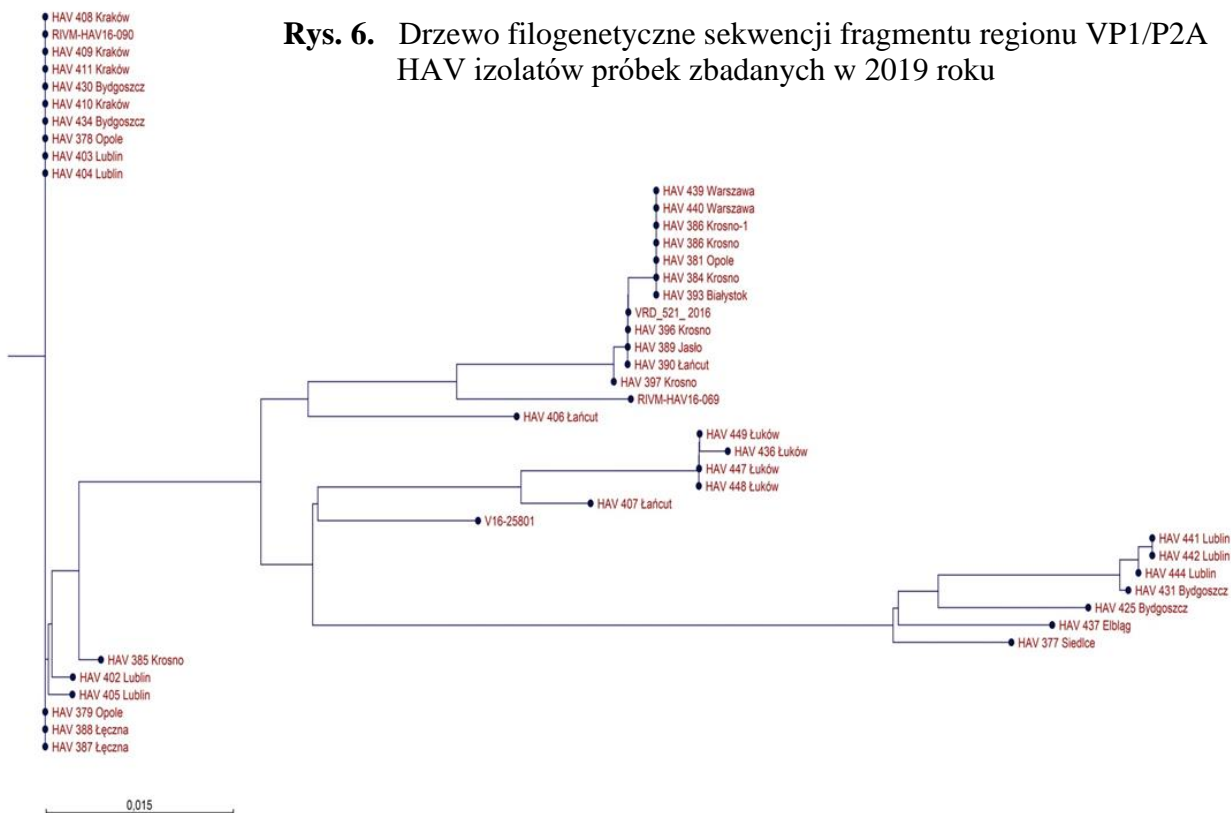
B



W 2019 roku przebadano 55 surowic od pacjentów, u których zachorowanie stwierdzono pod koniec 2018 roku lub w 2019 roku. Badane próbki surowic pozyskano z województwa opolskiego, lubelskiego, podlaskiego, kujawsko-pomorskiego, małopolskiego, podkarpackiego, warmińsko-mazurskiego, mazowieckiego. Obecność RNA HAV stwierdzono w 48 próbkach badanych surowic od pacjentów co stanowiło 87,3%. Materiały od pacjentów badane w latach 2017-2018 nie stanowiły próby reprezentatywnej dla całego kraju a próbki z województwa mazowieckiego były w tej grupie nadreprezentowane. Z tego względu do analizy w 2019 roku

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

pozyskano i wybrano próbki pochodzące z różnych regionów Polski. Próbki, w których uzyskano dodatni wynik badania PCR HAV (48) poddano sekwencjonowaniu, a na podstawie uzyskanych sekwencji nukleotydowych możliwe było ustalenie genotypów w 38 próbkach. Większość zbadanych izolatów HAV należała do genotypu IA dominującego w Europie, 7 próbek należało do genotypu IB HAV. Były to próbki z Siedlec, Lublina, Bydgoszczy i Elbląga. Na podstawie uzyskanych wyników analiz filogenetycznych ustalono, że szczepy o bardzo zbliżonej sekwencji fragmentu regionu VP1/P2A genomu HAV występowały w różnych regionach Polski (Rys. 6), a z drugiej strony w tych samych regionach występowały zróżnicowane genetycznie szczepy. Obserwacja ta pokazuje, że wykryte, zróżnicowane genotypy HAV krążyły w 2019 roku na terenie wielu województw. Ponadto, te same genotypy i subtypy wirusa HAV wykrywane były zarówno u mężczyzn i kobiet, co może świadczyć o tym, że ognisko HAV w Polsce nie było już związane z MSM w takim stopniu, jak w latach ubiegłych. Ponadto w próbkach zbadanych w 2019 roku, a pochodzących z drugiej połowy 2018 roku i z 2019 roku wykryto genotyp HAV IB, a ognisko europejskie HAV powiązane z MSM charakteryzowało się występowaniem prawie wyłącznie genotypu HAV IA [4].



W roku 2020 przebadano 125 próbek surowic, ale tylko 9 z nich zostało przesłanych do analizy w roku badania. Tak mała ilość przesłanych próbek mogła być związana zarówno ze spadkiem liczby zakażeń HAV, jak również z sytuacją związaną z pandemią SARS - CoV 2. Przesłane próbki pochodziły z Bydgoszczy. Na 9 przebadanych próbek w 8 wykryto obecność RNA HAV, a wyniki sekwencjonowania i genotypowania wykazały wśród tych 8 próbek 5 z genotypem IA, a 3 z genotypem IB. Pozostałe 116 próbek zbadane w roku 2020 było próbkami zgromadzonymi we wcześniejszych latach, które nie weszły w cykl badań. Pochodziły one od pacjentów hospitalizowanych w latach 2017-2019 w Poznaniu, Bydgoszczy i Katowicach. Na 116 przebadanych próbek, 14 było ujemnych w reakcji RT-PCR HAV. Wyniki sekwencjonowania i genotypowania ujawniły w próbkach z Poznania i Katowic wyłącznie genotyp IA.

Do końcowej (zbiorczej) analizy filogenetycznej wybrano próbki pozyskane w całym okresie 2017-2020, które spełniały określone kryteria. Przy wyborze próbek kierowano się przede wszystkim: wynikiem uzyskanym w reakcji RT-PCR HAV, rejonem Polski, z którego pochodziła próbka (miejsce hospitalizowania/miejsce zamieszkania); dostępnością danych na temat płci i wieku pacjenta; obecnością danych dotyczących wyjazdów za granicę w okresie bezpośrednio poprzedzającym zachorowanie; dostępnością danych dotyczących okresu, jaki upłynął od pojawienia się objawów choroby a pobraniem surowicy do badania oraz jakością materiału otrzymanego w procesie sekwencjonowania, który pozwalał na określenie genotypu HAV. Do końcowej analizy starano się włączyć jak najmniejszą liczbę próbek dla których nie pozyskano żadnych informacji poza miejscem hospitalizacji pacjenta i kodem jakim oznakowano próbkę surowicy do badań. Biorąc te wszystkie kryteria pod uwagę do końcowej analizy filogenetycznej wyselekcjonowano ok. 250 próbek (izolatów). Posiadane sekwencje wybranych izolatów zostały dokładnie przeanalizowane pod kątem technicznym (jakość złożonych konsensusów), a brakujące konsensusy, zostały złożone na podstawie odczytu z dwóch nici lub jednej pod warunkiem, że przebieg sekwencjonowania nie budził wątpliwości, a poziom tła był minimalny. Do składania konsensusu został wykorzystany program Pregap4 wersja 1.6 r, a weryfikacji program Gap wersja 4.11.2 r z pakietu Staden (Staden Package v. staden 2.0.0b11 2016). Po tej wstępnej analizie technicznej do sporządzenia drzew filogenetycznych zostały wybrane 224 próbki (izolaty), które zapewniały wysoką jakość i czytelność analizy.

Pochodzenie geograficzne próbek, które zostały włączone do końcowej analizy filogenetycznej przedstawiono na mapie poniżej (Rys.7).

Rys. 7. Liczba próbek z poszczególnych województw włączonych do końcowej analizy filogenetycznej badanych. Kolorem czerwonym zaznaczono województwa, z których pochodziło powyżej 10 próbek.



Województwo	Liczba próbek
mazowieckie	77
wielkopolskie	50
śląskie	18
kujawsko-pomorskie	17
lubelskie	15
zachodniopomorskie	13
pomorskie	9
podkarpackie	9
dolnośląskie	5
małopolskie	4
opolskie	3
podlaskie	1
łódzkie	1
świętokrzyskie	1
warmińsko-mazurskie	1

Długość sekwencji konsensusu wykorzystanego do dalszych analiz wyniosła 414 par zasad ograniczonych sekwencjami 5'-ATGAATATTT AGATTTGGCT- 3' (z możliwymi jednonukleotydowymi odstępstwami ze względu na zmienność pomiędzy izolatami). Pierwszym etapem analizy było połączenie w grupy izolatów o identycznej sekwencji badanego 414 nukleotydowego odcinka. W wyniku tej analizy stwierdzono, że wśród 224 izolatów można wyróżnić:

- 30 izolatów, które posiadają unikalne sekwencje, w tym dla 2 reprezentujących genotyp IIIA, 6 reprezentujących genotyp IB i 22 reprezentujących genotyp IA.
- 194 izolaty, które można podzielić na 7 grup / wariantów badanego fragmentu genu VP1/P2A reprezentowanych przez co najmniej dwa izolaty.

W grupie 30 unikalnych sekwencji badanego fragmentu genu VP1/P2A znalazły się izolaty próbek pacjentów hospitalizowanych w:

- Poznaniu (HAV001-Poz, HAV002-Poz, HAV023-Poz, HAV197-Poz, HAV453-Poz, HAV456-Poz) - 6
- Warszawie (HAV008-Waw, HAV060-Waw, HAV105-Waw, HAV120-Waw, HAV208-Waw, HAV440-Waw) - 6
- Szczecinie (HAV013-Szcz, HAV014-Szcz, HAV015-Szcz, HAV016-Szcz) - 4
- Bydgoszczy (HAV314-Byd, HAV425-Byd, HAV527-Byd) - 3
- Wrocławiu (HAV081-Wroc) - 1
- Katowicach (HAV349-Kat) - 1
- Lublinie (HAV402-Lub, HAV405-Lub) - 2
- oraz przesłane przez stacje SANEPID z Siedlec (HAV377-Sied), Krosna (HAV385-Kros), Łańcuta (HAV406-Lanc, HAV407-Lanc), Łukowa (HAV436-Luk, HAV447-Luk) i Elbląga (HAV437-Elbl) - 7.

Kod izolatu zawiera numer oraz skrót miasta z którego została przesłana próbka, kolorem czerwonym zaznaczono izolaty dla których określono genotyp IIIA, a kolorem niebieskim izolaty dla których określono genotyp IB. Pozostałe 194 izolaty, ze względu na sekwencję nukleotydów badanego fragmentu genu VP1/P2A zostały podzielone na 7 głównych grup (od A do G), w których wydzielono podgrupy ze względu na miasto z którego została przesłana próbka (Tabela 6). Utworzenie grup izolatów poza identycznością analizowanej sekwencji podyktowane było czytelnością drzewa filogenetycznego, utworzonego z tych izolatów.

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

Tabela 6. Podział izolatów na grupy ze względu na podobieństwo analizowanej sekwencji nukleotydów badanego fragmentu genu VP1/P2A. Liczby po myślniku oznaczają ilość izolatów znajdujących się w danej podgrupie.

HAV-A (11 podgrup):	HAV-B (10 podgrup):	HAV-C (6 podgrup):	HAV-D:
HAV-Waw_1 - 2	HAV-Waw_2 - 56	HAV-Waw_3 - 15	HAV-Poz_4 - 3
HAV-Poz_1 - 35	HAV-Wroc_2 - 1	HAV-Poz_3 - 1	HAV-E:
HAV-Gda_1 - 4	HAV-Szcz_2 - 2	HAV-Byd_3 - 3	HAV-Byd_4 - 3
HAV-Wroc_1 - 3	HAV-Gda_2 - 4	HAV-Opo_2 - 1	HAV-F:
HAV-Szcz_1 - 9	HAV-Kat_2 - 10	HAV-Kros_2 - 2	HAV-Lub_2 - 3
HAV-Byd_1 - 7	HAV-Poz_2 - 7	HAV-Bial_1 - 1	HAV-G
HAV-Kat_1 - 5	HAV-Kros_1 - 2		HAV-Luk_1 - 2
HAV-Opo_1 - 2	HAV-Byd_2 - 1		
HAV-Lecz_1 - 2	HAV-Jas_1 - 1		
HAV-Lub_1 - 2	HAV-Lanc_1 - 1		
HAV-Krak_1 - 4			

Otrzymano 3 grupy główne podzielone dodatkowo na 11 (Grupa HAV-A), 10 (Grupa HAV-B) i 6 (Grupa HAV-C) podgrup oraz 4 mniej liczne grupy, które składały się tylko z izolatów pochodzących z jednego miasta. Izolaty należące do Grupy HAV-E (z Bydgoszczy) oraz do Grupy HAV-F (z Lublina) reprezentowały genotyp IB HAV. Podział na grupy i podgrupy przedstawiono w Tabeli 7A i B.

Tabela 7A. Skład Grup głównych (od C do G) izolatów wraz z podgrupami

GRUPA HAV-C (23 izolaty / 6 podgrup)		GRUPA HAV-D	GRUPA HAV-F
HAV-Waw_3 (15)	HAV-Poz_3 (1)	(3 izolaty / 1 podgrupa)	(3 izolaty / 1 podgrupa)
HAV067-Waw	HAV189-Poz	HAV-Poz-4 (3)	HAV-Lub_2 (3)
HAV075-Waw	HAV-Byd_3 (3)	HAV188-Poz	HAV441-Lub
HAV102-Waw	HAV315-Byd	HAV201-Poz	HAV442-Lub
HAV103-Waw	HAV316-Byd	HAV266-Poz	HAV444-Lub
HAV108-Waw	HAV318-Byd		
HAV118-Waw	HAV-Opo_2 (1)		
HAV134-Waw	HAV381-Opo	GRUPA HAV-E	GRUPA HAV-G
HAV136-Waw	HAV-Kros_2 (2)	(3 izolaty / 1 podgrupa)	(2 izolaty / 1 podgrupa)
HAV157-Waw	HAV384-Kros	HAV-Byd_4 (3)	HAV-Luk_1 (2)
HAV212-Waw	HAV386-Kros	HAV431-Byd	HAV448-Lub
HAV219-Waw	HAV-Bial_1 (1)	HAV529-Byd	HAV449-Lub
HAV226-Waw	HAV393-Bial	HAV533-Byd	
HAV227-Waw			
HAV243-Waw			
HAV439-Waw			

Tabela 7B. Skład Grup głównych (od A do B) izolatów wraz z podgrupami

GRUPA HAV-A (75 izolatów / 11 podgrup)		GRUPA HAV-B (85 izolatów / 10 podgrup)	
HAV-Waw_1 (2) HAV004-Waw HAV204-Waw	HAV-Wroc_1 (3) HAV079-Wroc HAV080-Wroc HAV082-Wroc	HAV-Waw_2 (56)	
HAV-Poz_1 (35) HAV012-Poz HAV021-Poz HAV025-Poz HAV027-Poz HAV168-Poz HAV169-Poz HAV172-Poz HAV173-Poz HAV174-Poz HAV177-Poz HAV178-Poz HAV179-Poz HAV180-Poz HAV183-Poz HAV185-Poz HAV187-Poz HAV190-Poz HAV194-Poz HAV195-Poz HAV199-Poz HAV202-Poz HAV203-Poz HAV255-Poz HAV256-Poz HAV257-Poz HAV258-Poz HAV259-Poz HAV261-Poz HAV263-Poz HAV264-Poz HAV267-Poz HAV452-Poz HAV454-Poz HAV455-Poz HAV461-Poz	HAV-Szcz_1 (9) HAV084-Szcz HAV085-Szcz HAV086-Szcz HAV087-Szcz HAV088-Szcz HAV089-Szcz HAV092-Szcz HAV093-Szcz HAV094-Szcz	HAV019-Waw HAV049-Waw HAV052-Waw HAV054-Waw HAV056-Waw HAV057-Waw HAV058-Waw HAV061-Waw HAV062-Waw HAV065-Waw HAV072-Waw HAV077-Waw HAV098-Waw HAV099-Waw HAV101-Waw HAV104-Waw HAV110-Waw HAV111-Waw HAV112-Waw HAV114-Waw HAV115-Waw HAV116-Waw HAV117-Waw HAV119-Waw HAV121-Waw HAV122-Waw HAV124-Waw HAV126-Waw	HAV127-Waw HAV128-Waw HAV129-Waw HAV132-Waw HAV135-Waw HAV146-Waw HAV147-Waw HAV148-Waw HAV153-Waw HAV155-Waw HAV156-Waw HAV158-Waw HAV162-Waw HAV163-Waw HAV165-Waw HAV166-Waw HAV206-Waw HAV207-Waw HAV209-Waw HAV211-Waw HAV215-Waw HAV220-Waw HAV221-Waw HAV229-Waw HAV234-Waw HAV241-Waw HAV242-Waw HAV244-Waw
HAV-Gda_1 (4) HAV048-Gda HAV096-Gda HAV246-Gda HAV247-Gda	HAV-Byd_1 (7) HAV312-Byd HAV313-Byd HAV317-Byd HAV430-Byd HAV434-Byd HAV525-Byd HAV526-Byd		HAV-Wroc_2 (1) HAV078-Wroc
	HAV-Kat_1 (5) HAV336-Kat HAV350-Kat HAV357-Kat HAV365-Kat HAV367-Kat		HAV-Szcz_2 (2) HAV090-Szcz HAV091-Szcz
	HAV-Opo_1 (2) HAV378-Opo HAV379-Opo		HAV-Gda-2 (4) HAV095-Gda HAV245-Gda HAV249-Gda HAV254-Gda
	HAV-Lecz_1 (2) HAV387-Lecz HAV388-Lecz		HAV-Kat_2 (10) HAV338-Kat HAV339-Kat HAV351-Kat HAV355-Kat HAV356-Kat HAV358-Kat HAV364-Kat HAV366-Kat HAV368-Kat HAV370-Kat
	HAV-Lub_1 (2) HAV403-Lub HAV404-Lub		HAV-Poz_2 (7) HAV176-Poz HAV193-Poz HAV262-Poz HAV457-Poz HAV458-Poz HAV459-Poz HAV460-Poz
	HAV-Krak_1 (4) HAV408-Krak HAV409-Krak HAV410-Krak HAV411-Krak		HAV-Kros_1 (2) HAV396-Kros HAV397-Kros
			HAV-Byd_2 (1) HAV528-Byd
			HAV-Jas_1 (1) HAV389-Jas
			HAV-Lanc_1 (1) HAV390-Lanc

Do analizy filogenetycznej wykorzystano następujące sekwencje referencyjne wskazane dla różnych genotypów podane poniżej.

genotyp IA:

VRD_521_2016, RIVM HAV16 090 (AB020565), RIVM HAV16 069, V16 25801 (LT799836)

genotyp IB:

KX035096, AF314208, DQ646426

genotyp IIA/IIB:

AY644670, AY644676

genotyp IIIA:

AB279732, AB279733, AJ299464

genotyp IIIB:

AB279735, AB425339, AB258387

Analiza filogenetyczna została wykonana z wykorzystaniem programu MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) wersja 10.2.2 [10]. Wyniki analizy filogenetycznej zostały przedstawione na Rys. 8 i na Rys. 9.

Rys 8. Przedstawia analizę filogenetyczną sekwencji unikalnych (30), przedstawicieli głównych grup (7 grup: od A do G) i sekwencji referencyjnych (15) dla 5 genotypów (IA, IB, IIA/IIB, IIIA, IIIB) przeprowadzoną metodą największej wiarygodności (ang. *Maximum likelihood method*) i modelu Tamura Nei [11]. Analizy ewolucyjne przeprowadzono w MEGA X [10].

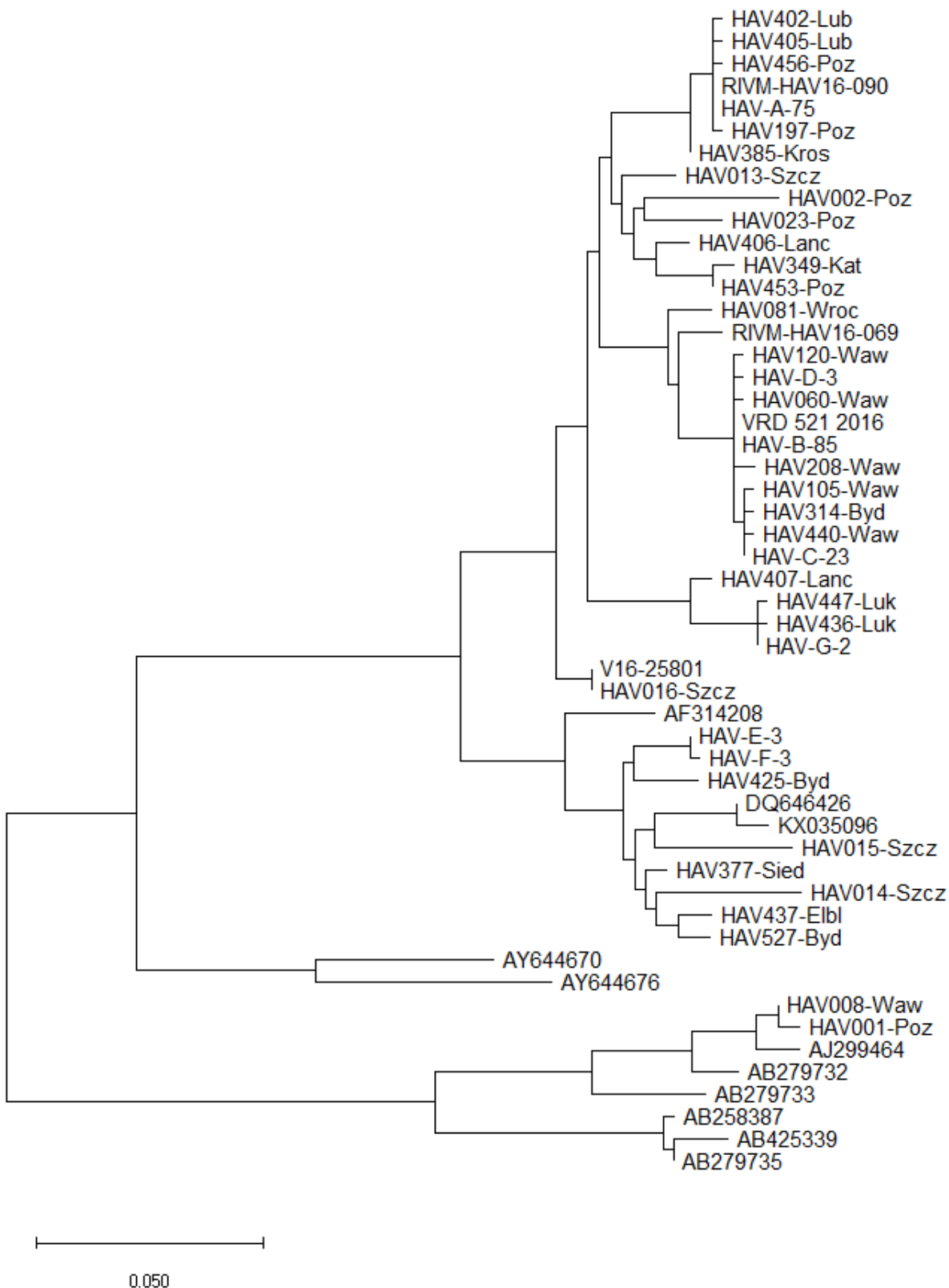
Drzewo filogenetyczne przedstawione jest w skali, w której długość gałęzi jest proporcjonalna do ilości podstawień nukleotydowych przypadających na dane miejsce. Łącznie analizie poddano 52 różne sekwencje nukleotydowe. Większość badanych izolatów wykazuje największe pokrewieństwo do genotypu IA, tylko dwa unikalne izolaty lokują się w obrębie genotypu IIIA, HAV008 Waw i HAV001 Poz. Żaden izolat nie należy do genotypu IIA/IIB i IIIB.

Wśród genotypu IA 75 izolatów należących do grupy A (HAV A 75) posiada sekwencję w 100% identyczną z sekwencją RIVM HAV16 090 (AB020565), 85 izolatów należących do grupy B (HAV B 85) sekwencję identyczną w 100% z VRD_521_2016, a unikalny izolat HAV016 Szcz jest identyczny z V16 25801 (LT799836) w obrębie 414 nukleotydowego badanego fragmentu.

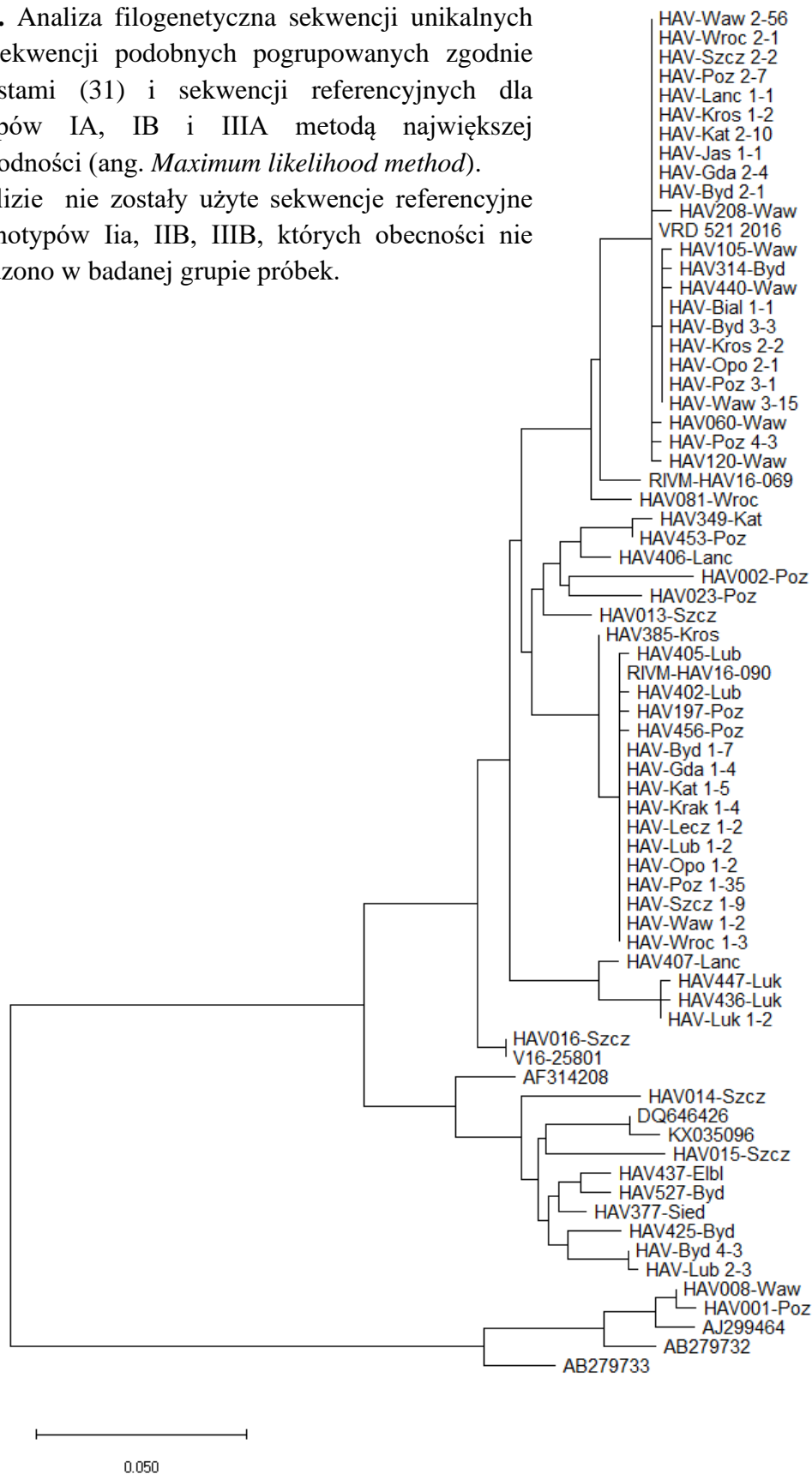
Na rysunku przedstawiono również 2 grupy główne (E i F) zawierające po 3 izolaty o identycznej sekwencji należące do genotypu IB oraz 6 pojedynczych izolatów należących do genotypu IB (HAV425-Byd, HAV014-Szcz, HAV015-Szcz, HAV377-Sied, HAV437-Elbl, HAV-527-Byd).

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

Rys.8. Analiza filogenetyczna sekwencji unikalnych (30), przedstawicieli głównych grup (7 grup: od A do G) i sekwencji referencyjnych (15) dla 5 genotypów (IA, IB, IIA/IIB, IIIA, IIIB)



Rys. 9. Analiza filogenetyczna sekwencji unikalnych (30), sekwencji podobnych pogrupowanych zgodnie z miastami (31) i sekwencji referencyjnych dla genotypów IA, IB i IIIA metodą największej wiarygodności (ang. *Maximum likelihood method*).
W analizie nie zostały użyte sekwencje referencyjne dla genotypów Iia, IIB, IIIB, których obecności nie stwierdzono w badanej grupie próbek.



Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

PODSUMOWANIE

Ostre wirusowe zapalenie wątroby typu A (WZW A, kod ICD-10 B15.9) jest chorobą obowiązkowo zgłaszaną w Polsce. Ponieważ diagnostyka tego zakażenia jest w większości przypadków ograniczona do zachorowań wymagających hospitalizacji niektóre przypadki zakażenia HAV mogą nie być zgłaszane do nadzoru i obraz sytuacji epidemiologicznej ostrych zapaleń wątroby typu A nie jest pełny. Zachorowania na wzv typu A występują w Polsce przede wszystkim w dużych miastach >100 tys. mieszkańców i w okresie jesienno-zimowym. W latach, w których prowadzone były badania, najliczniej zgłaszane przypadki pochodzą z województwa śląskiego, mazowieckiego i kujawsko-pomorskiego, a w dalszej kolejności z województwa dolnośląskiego, małopolskiego, pomorskiego i wielkopolskiego. Uczestnictwo w projekcie było dobrowolne, zarówno dla pacjentów, jak i lekarzy lub SSE. Liczba otrzymanych w ramach projektu próbek do badań dość dobrze odzwierciedla istotność problemu HAV dla poszczególnych regionów, bowiem wśród próbek nadesłanych do badań dominują zebrane od pacjentów hospitalizowanych w Warszawie, Poznaniu, Bydgoszczy, Katowicach. Przewaga próbek nadesłanych z dużych ośrodków może być spowodowana także dostępnością diagnostyki różnicującej lub miejscem hospitalizacji. Mimo wszystko zebrane próbki i wykonane badania genotypowania przybliżają obraz sytuacji epidemicznej HAV w Polsce.

Badania zostały rozpoczęte w trakcie trwania epidemii HAV w Europie i potwierdziły, że epidemia ta obejmowała także Polskę. Dominującym typem genetycznym wirusa HAV, zarówno w 2017 roku, jak i w latach późniejszych, był genotyp IA, a sekwencje szczepów wirusa były bardzo zbliżone/identyczne ze szczepami epidemicznymi VRD 521 2016, RIVM-HAV16-090 i V16-25801. Ze względu na specyfikę epidemii (MSM) w 2017 roku chorowali przede wszystkim młodzi mężczyźni. Natomiast w okresie późniejszym zachorowania WZW A diagnozowane były także wśród kobiet i mężczyzn w różnym wieku, w tym również u dzieci od 1 roku życia.

W roku 2018 stwierdzono, że we wszystkich przesłanych próbkach występował wirus HAV należący do genotypu IA. Analizy wskazują na wysoką homogenność określanych sekwencji wirusa. Dopiero w następnym roku ponownie zwiększyła się różnorodność wykrywanych genotypów HAV oraz udział różnych wiekowo grup populacji w tych zachorowaniach. Wskazywałoby to na stopniowe zmniejszanie udziału w ogólnej liczbie zachorowań na WZW A

epidemicznego genotypu IA oraz zwiększanie innych wariantów, genotypów importowanych do Polski.

Drugim czynnikiem ryzyka i drogą przywlekania zakażeń HAV do Polski są podróże zagraniczne, szczególnie do krajów rozwijających się. Jednak nie zawsze zachorowania wywołane danym wariantem utrzymują się długo w populacji. Możliwym wytłumaczeniem czasowej reprezentacji genotypu w badaniach może być wywoływanie zachorowań o łagodniejszym przebiegu, które nie wymagały hospitalizacji. Przykładem są 2 zachorowania wywołane w 2017 roku przez HAV genotyp IIIA (jeden z pacjentów wskazał podróż zagraniczną jako prawdopodobne miejsce narażenia), które wystąpiły tylko w tym roku, natomiast nie stwierdzano obecności tego genotypu w latach następnych. Wydaje się, że poza okresem epidemii, szczepy HAV krążące w Polsce wykazują zróżnicowanie genetyczne, wywołane zapewne importem zakażeń z podróży zagranicznych, jak i zmiennością wirusa. W okresie 2017-2020 w badanych próbkach nie wykryto obecności ani jednego wirusa HAV należącego do IIA/IIB i IIIB. Może to być wynikiem preferencji wyjazdowych Polaków lub ograniczonym dostępem do próbek (badania dobrowolne w wybranych szpitalach/SSE).

GLÓWNE WYNIKI / WNIOSKI:

1. Na podstawie wyników badań otrzymanych w ramach realizacji tego projektu stwierdzono, że w Polsce w latach 2017-2020 dominującym typem genetycznym HAV był genotyp IA.
2. Epidemia HAV, która była obserwowana w 2017 roku w Europie, objęła swoim zasięgiem także Polskę. Szczepy epidemiczne IA dominowały wśród czynników wywołujących HAV w ciągu całego badania.
3. W miarę upływu czasu od zakończenia epidemii wzrastało zróżnicowanie genetyczne szczepów HAV w Polsce, jednak dotyczyło to przede wszystkim zróżnicowania w obrębie genotypu IA i mogło być wynikiem importu wirusa z zagranicy, jak również zmienności genetycznej.
4. Wykrywanie obecności RNA HAV można ograniczyć do badania w próbce surowicy chorego, u którego stwierdzono znamiennej poziom IgM swoistych dla HAV.
5. Otrzymane wyniki badań pozwoliły na stworzenie bazy danych dotyczących genotypów wirusa HAV krążących w Polsce w latach 2017-2020 wraz z sekwencjami fragmentu genomu WZW A z regionu VP1/P2A użytego do genotypowania.

Zadanie realizowane ze środków Narodowego Programu Zdrowia na lata 2016-2020, finansowane przez Ministra Zdrowia

REKOMENDACJE:

1. Ze względu na potwierdzone ryzyko przywleczenia zakażenia HAV z zagranicy i możliwości jego szerzenia się w środowisku, należy przeprowadzić kampanię informacyjną skierowaną do pracowników opieki medycznej, nadzoru sanitarnego mającą na celu zwiększenie wiedzy nt. zakażeń HAV, objawów, sposobów diagnozowania i zapobiegania.
2. Wskazana jest także kampania informacyjna skierowana do osób należących do grup ryzyka, w szczególności osób wyjeżdżających za granicę oraz mężczyzn uprawiających seks z mężczyznami, o możliwości zapobiegania zakażeniom HAV poprzez efektywne szczepienie.
3. Oznaczanie poziomu przeciwciał IgM swoistych dla HAV jest dobrym narzędziem w celu wykrycia zakażeń tym wirusem i taka diagnostyka serologiczna powinna być dostępna w wielu laboratoriach, i w każdym województwie.
4. Surowica jest także wystarczającym materiałem klinicznym do izolacji RNA wirusa i identyfikacji genotypów HAV, dlatego warto zabezpieczać badane w tym kierunku próbki surowicy dla celów nadzoru epidemiologicznego (badania wykonywane w 1 lub 2 wybranych laboratoriach w Polsce).

LITERATURA

- [1] HO „Key fact” (data publikacji - 27.07.2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-a> (dostęp 13.12.2020).
- [2] Halliday ML, Kang LY, Zhou TK, Hu MD, Pan QC, Fu TY, Huang YS, Hu SL. An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. *J Infect Dis.* 1991;164(5):852-859.
- [3] <https://www.epa.gov/ccl> (dostęp 13.12.2020).
- [4] <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-hepatitis-outbreak-eueea-mostly-affecting-men-who-have-sex-men-2>.
- [5] Beebeejaun K, Degala S, Balogun K, Simms I, Woodhall SC, Heinsbroek E, Crook PD, Kar-Purkayastha I, Treacy J, Wedgwood K, Jordan K, Mandal S, Ngui SL, Edelstein M. Outbreak of hepatitis A associated with men who have sex with men (MSM), England, July 2016 to January 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(5):pii=30454.
- [6] Freidl GS, Sonder GJ, Bovée LP, Friesema IH, van Rijckevorsel GG, Ruijs WL, van Schie F, Siedenburg EC, Yang J, Vennema H. Hepatitis A outbreak among men who have sex with men (MSM) predominantly linked with the EuroPride, the Netherlands, July 2016 to February 2017. *Euro Surveill.* 2017;22(8):pii=30468.
- [7] Dane ECDC - <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?> (dostęp 13.12.2020).
- [8] http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html.
- [9] <https://www.gov.pl/web/gis>.
- [10] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 2018; 35:1547-1549.
- [11] Tamura K. and Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 1993; 10:512-526.