

Znaczenie diagnostyki wirusologicznej dla skuteczności leczenia hospitalizowanych chorych zakażonych wirusem grypy

Significance of virological diagnostics for the effective treatment of hospitalized patients infected with influenza virus

Magdalena Machała¹, Elżbieta Wiatr², Dariusz Gawryluk², Lidia B. Brydak¹

¹ Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Państwowy Zakład Higieny, Warszawa;
kierownik : Prof. dr hab. L. B. Brydak

² III Klinika Chorób Płuc, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa;
kierownik : Prof. dr hab. med. K. Roszkowski-Śliż

Summary: In the case of influenza disease there is no possible to make unquestionable diagnosis only on the basis of clinical picture. Therefore, virological laboratory diagnostics is important, especially in hospitalized patients and those who highly risk post-influenza complications and severe course of the disease. Virological diagnostic tests for influenza and positive result obtained in these tests allow to use effective antiviral-antiinfluenza drugs as new generation drugs: oseltamivir and zanamivir and also old generation drugs: amantadine and rimantadine. Since these antivirals are effective only in the case of influenza infection, diagnostic tests should be performed previously. Present methods allow to obtain the result of the test within less than 1 hour to 8 hours. This is of great importance, because the administration of the drug within 36 hours from the onset of symptoms is one of the factors conditioning the effectiveness of antiviral therapy. In the present paper there are described four cases of hospitalized patients in whom the infection with influenza virus was confirmed by immunofluorescence test and RT-PCR, and then the antiviral-antiinfluenza drugs were immediately introduced. This antiviral therapy in a short time resulted in the improvement of patients' condition and allowed to discharge them from the hospital. Antiviral-antiinfluenza drugs together with virological diagnostics are the effective tool in the case of patients not vaccinated against influenza, who were infected with influenza virus and fell ill.

Pneumonol. Alergol. Pol. 2006, 74, 166:170

Key words: influenza, virus, infection, oseltamivir, amantadine

Wstęp

Grypa jest chorobą, której objawy nie są na tyle charakterystyczne, by możliwe było ustalenie pewnej diagnozy w oparciu jedynie o obraz kliniczny (1, 6, 12). Dlatego też istotne jest korzystanie z wirusologicznej diagnostyki laboratoryjnej, która zwłaszcza u pacjentów hospitalizowanych i szczególnie- zagrożonych wystąpieniem powikłań pogrypowych i ciężkim przebiegiem choroby, może mieć kluczowe znaczenie. Wykonanie odpowiednich badań wirusologicznych w kierunku grypy i uzyskanie wyniku dodatniego pozwala bowiem nie tylko na uniknięcie niepotrzebnej antybiotykoterapii w sytuacji, gdy przyczyną choroby jest wirus i nie ma ryzyka nadkażenia bakteryjnego, ale przede wszystkim pozwala na zastosowanie skutecznych leków antywirusowych-antygrypowych (2, 4). Należą do nich inhibitory neuraminidazy wirusa grypy: oseltamivir i zanamivir oraz leki starej generacji, będące inhibitorami białka M2: amantadyna i rymantadyna. Wśród nich trzy pierwsze są zarejestrowane w Polsce, a polrymantadyna jest w trakcie procesu

rejestracji. Inhibitory neuraminidazy są skuteczne zarówno w zakażeniach wirusami grypy typu A, jak i typu B. Z kolei inhibitory białka M2 mogą być skutecznie stosowane jedynie w zakażeniach wirusami typu A, choć powoli odchodzi się od tej grupy leków ze względu na coraz więcej doniesień na temat pojawiania się szczepów opornych (8). Z wyjątkiem zanamiviru, dopuszczonego jedynie do leczenia, wszystkie pozostałe leki mogą być stosowane zarówno do leczenia, jak i do profilaktyki. Ponieważ te inhibitory są skuteczne tylko w zakażeniach wirusem grypy, użycie ich w celach leczniczych wymaga wcześniejszego wykonania badań wirusologicznych. Obecne metody pozwalają na uzyskanie wyniku takiego badania już w ciągu 2 godzin (test immunofluorescencji) do 8 godzin (badanie RT-PCR), a przy dostępie do techniki Real-time PCR – nawet w czasie poniżej 1 godziny. Ma to bardzo istotne znaczenie, ponieważ jednym z warunków skuteczności terapii antywirusowej-antygrypowej jest jak najszybsze podanie leku pacjentowi, tj. najlepiej do 36 godzin od chwili wystąpienia objawów choroby (2, 4, 14). Późniejsze podanie leku, podobnie jak skrócenie

wymaganego czasu trwania kuracji nie gwarantuje skuteczności leczenia (9, 13).

Wydaje się, że zgodnie z zasadą „lepiej zapobiegać niż leczyć” powszechnie dostępne szczepienia przeciwko grypie, zapobiegające zachorowaniu na grypę i powikłaniom pogrypowym, powinny wyeliminować problem leczenia pacjentów chorych na grypę. Niestety jednak szczepionki przeciwko grypie nadal są rzadko stosowane, nawet u chorych z grup podwyższonego ryzyka (3, 15). Zatem u pacjentów, którzy z jakichkolwiek powodów nie skorzystali z tej formy profilaktyki, leki antywirusowe-antygrypowe w połączeniu z szybką diagnostyką laboratoryjną stanowią w przypadku zachorowania na grypę jedyną i skuteczną alternatywę.

Material i metody

Prezentowana praca dotyczy 4 chorych hospitalizowanych w III Klinice Chorób Płuc Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w okresie od 11.02 do 14.03.2005r., u których, w ramach diagnostyki przedłużającej się infekcji, pobrano płyn z płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BALF) do badań wirusologicznych

Przypadek I – chory U.K. lat 42 przewlekle leczony dużymi dawkami prednizonu (40-60mg/d) od początku 2004r. z powodu hipereozynofilii obwodowej i płucnej i podejrzenia zespołu Churga-Strauss. Kwasochłonne zapalenie naczyń i nacieki kwasochłonne potwierdzono badaniem mikroskopowym w wycinkach płuc pobranych metodą otwartej biopsji płuca w październiku 2004 r.

Pacjenta przyjęto do Kliniki 11 lutego 2005r. Obok nasilenia duszności, chory zgłaszał wyraźnie gorszą tolerancję wysiłku oraz okresowe stany podgorączkowe, kaszel z odkrztuszaniem białawej wydzieliny i wodnisty katar. Początkowo zwiększono dawki kortykosteroidów (dodano metyloprednizolon 2 x 40mg doż.). 17.02.05r wdrożono dodatkowo Endoksan, który stosuje się w przypadkach opornych na kortykoterapię. Jednak duszność nie ustępowała, nasilił się kaszel z odkrztuszaniem żółtej wydzieliny i pogorszyły się parametry spirometryczne. Odstawiono metyloprednizolon i 22.02.05 włączono amoksycylinę z kwasem klawulanowym 3 x 1,2g doż. W dniu 27.02.05r chory zagorączkował do 38°C z dreszczami. Odstawiono poprzedni antybiotyk i podano cyprofloksacynę 2 x 0,4 doż. W dniu 28 lutego 2005r. gorączka z dreszczami powtórzyła się, wykonano bronchfibroskopię i pobrano BALF w celu wykonania badań wirusologicznych.

Przypadek II – chory D.A. lat 54 długotrwale unieruchomiony, poruszający się na wózku lub przy pomocy kul z powodu wrodzonej miopatii i wielokrotnych operacji ortopedycznych został przyjęty z powodu podejrzenia pleuropneumonii lewostronnej. Poza chorobą mięśniowo-kostno-stawową chory w wywiadzie podawał: kamice nerkową, nadciśnienie tętnicze, hyperurykemię, nawracające zapalenia zatok obocznych nosa, łagodny przerost prostaty oraz nadwagę. Miesiąc przed przyjęciem do szpitala u chorego wystąpiły stany podgorączkowe do 37,5°C i kaszel. Po zastosowaniu cefuroksymu uzyskano normalizację ciepłoty ciała ale kaszel

się utrzymywał. Pięć dni przed przyjęciem do szpitala objawy nasiliły się. Występowały napady suchego kaszlu z bólem w lewej połowie klatki piersiowej, ropny katar, stany podgorączkowe i opryszczka na wardze. Zastosowano doksycylinę- bez efektu.

Pacjenta przyjęto do Kliniki 18 lutego 2005r. w stanie dobrym. W badaniu przedmiotowym nad płucami stwierdzono obustronnie świsty podczas kaszlu oraz trzeszczenia u podstawy obu płuc. Od 19.02.05r zastosowano klarytromycynę (2x500mg). Tomografia komputerowa uwidoczniła znaczną deformację klatki piersiowej, związaną ze skrzywieniem kręgosłupa oraz znacznie wyżej ustawioną lewą kopułę przepony, co bardzo utrudniało ocenę miąższu płuc. Nie wykazano ogniskowych zmian miąższowych, a w płacie dolnym lewego płuca stwierdzono zaciemnienia pasmowate, które mogły odpowiadać ustępującemu zapaleniu. Ponieważ chory leżał w sali, w której znajdowali się chorzy na grypę 21.02.05- profilaktycznie wdrożono amantydynę w dawce 2 x 100mg obok klarytromycyny. Jednak w dniach 23-24.02. 05 wystąpiły zwyczajki ciepłoty ciała do 38,2st.C. z objawami infekcji wirusowej. W dniu 24 lutego 2005r wykonano bronchoskopię stwierdzając przekrwienie i kruchość błony śluzowej oskrzeli i pobrano BALF do badań mikrobiologicznych, w tym- wirusologicznych. W materiale z wydzielin oskrzelowej nie wykazano obecności bakterii ani grzybów.

Przypadek III – chory K.D. lat 30 przyjęty z powodu duszności nasilającej się od około 10 miesięcy. Od listopada 2004r. po infekcji dróg oddechowych pojawił się suchy napadowy kaszel, który zmniejszył się po lekach przeciwkaszlowych. W lutym 2005r. ponownie wystąpiły objawy infekcji dróg oddechowych z kaszlem i gorączką do 38,5°C, które ustąpiły po leczeniu klarytromycyną. W wykonanym wówczas RTG klatki piersiowej wykazano obecność zmian śródmiąższowych w płucach. Cztery dni przed przyjęciem do Kliniki pojawiły się u chorego stany podgorączkowe do 37,8°C, ból barku lewego oraz uczucie wysychania błon śluzowych nosa i jamy ustnej. Pacjenta przyjęto do Kliniki 2 marca 2005r. w celu wykonania diagnostyki zmian śródmiąższowych w płucach. Stan ogólny chorego był dobry. W badaniu przedmiotowym stwierdzono liczne trzeszczenia nad obydwoma płucami. Stwierdzono znaczne zaburzenia czynności płuc w ocenie dynamicznej (6-minutowy test marszu).

W dniu 3 marca 2005r. wykonano bronchoskopię w celu przeprowadzenia przezoskrzelowej biopsji płuca i jednocześnie pobrano BALF w kierunku zakażenia wirusem grypy Na podstawie wyniku badania mikroskopowego materiału pobranego w czasie bronchoskopii rozpoznano złączające śródmiąższowe zapalenie płuc (DIP- desquamative interstitial pneumonitis). Nie wykazano cech choroby układowej, jak i bezpośredniego związku choroby z paleniem tytoniu, z którego chory zrezygnował 10 miesięcy wcześniej. Z BALF nie wyhodowano bakterii ani grzybów.

Przypadek IV – chory C.M. lat 25, palący tytoń przyjęty 8 marca 2005r z powodu krwioplucia. Chory od tygodnia miał kaszel z odkrztuszaniem śluzowo-ropnej wydzieliny podbarwionej krwią, duszność wysiłkową, gorączkę do 39°C z dreszczami i bólami kostno-stawowymi, ból gardła, kłujący ból w klatce piersiowej, a 2 dni przed przyjęciem do Kliniki krwioplucie wystąpiło kilka razy w ciągu doby.

Przy przyjęciu chory był w stanie ogólnym dobrym, mimo, że utrzymywała się wysoka gorączka i śladowe krwioplucie. Nie stwierdzono zmian osłuchowych nad płucami. W badaniach radiologicznych klatki piersiowej (RTG i TKWR) nie wykazano nieprawidłowości. Od 9.03.05r zastosowano amoksylicynę z kwasem klawulanowym w dawce 3 x 1,2g. 10 marca 2005r. wykonano bronchoskopię, podczas której stwierdzono nasilony stan zapalny oskrzeli oraz dużą ilość zalegającej ropnej wydzieliny, którą odessano. Nie znaleziono cech ani miejsca krwawienia. Wykonano płukanie oskrzeli z pobraniem BALF do badań mikrobiologicznych, w tym- wirusologicznych. Z posiewów wydzieliny oskrzelowej nie uzyskano wzrostu bakterii, ani grzybów. W badaniu laryngologicznym stwierdzono ropne zmiany w nosie, przy czym nie uwidoczniło cech ani źródeł krwawienia.

Diagnostyczne badania wirusologiczne wykonano w Krajowym Ośrodku ds. Grypy, PZH w Warszawie. Materiał do badań stanowił BALF, który poddano testom:

- immunofluorescencji (IF) bezpośredniej w celu wykrycia antygenów siedmiu wirusów zakażeń układu oddechowego: grypy typu A oraz typu B, wirusa RS, wirusa paragrypy typu 1, 2 i 3 oraz adenowirusa,
- izolacji wirusa grypy na hodowli komórkowej MDCK oraz zarodkach kurzych,
- reakcji RT-PCR w celu wykrycia materiału genetycznego wirusa grypy.

Test IF wykonano przy użyciu zestawów IMAGEN (DakoCytomation, Wielka Brytania) zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Za wynik dodatni uznawano przynajmniej jedną całą komórkę w preparacie, wykazującą specyficzne zielone świecenie w postaci ziarnistości widocznych w jądrze komórkowym i/lub cytoplazmie.

Izolację wirusa grypy prowadzono na 12-dolkowych płytkach z hodowlą MDCK, którą po zakażeniu inkubowano w temperaturze +35°C w atmosferze dwutlenku węgla (5% CO₂) do maksymalnie 12 dni (10, 11). Prowadzono także izolację wirusa grypy na zarodkach kurzych, przy czym BALF-em zakażano owodnię zarodków 8-dniowych (I pasaż), natomiast następnym pasażem do III włącznie wykonywano do omocznia zarodków

11-dniowych (5, 10, 11). Zebrany płyn owodniowy/omocznioy z zarodków kurzych oraz płyn z hodowli MDCK poddawano testowi hemaglutynacji w celu wykrycia obecności wirusa (5, 10, 11). W przypadku wyniku dodatniego wykonywano analizę antygenową izolatu, aby określić typ (A, B) i podtyp (H1, H3) izolowanego szczepu wirusa grypy. Analizę tę wykonano za pomocą odczynu zahamowania hemaglutynacji z odczynnikami referencyjnymi i antygenami kontrolnymi wirusa grypy.

W celu wykrycia w BALF materiału genetycznego wirusa grypy wykonano izolację wirusowego RNA przy użyciu zestawu QIAamp MinElute Virus Spin (Qiagen, Niemcy), natomiast do reakcji RT-PCR użyto zestawu QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Niemcy). Zastosowano 24-zasadowe pary starterów (IDT, USA), zaprojektowanych dla konserwowanych sekwencji w obrębie genów kodujących hemaglutyninę H1, H3 oraz HB wirusa grypy, których produktami są fragmenty DNA wielkości odpowiednio 761pz, 670pz i 774pz. Elektroforezą produktów reakcji RT-PCR prowadzono w buforze TAE w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 60V. Do analizy rozdzielonych produktów użyto systemu do dokumentacji żeli GelDoc EQ System i oprogramowania Quantity One 1-D Analysis Software (Bio-Rad, USA).

Wyniki badań

W każdym przypadku potwierdzono zakażenie wirusem grypy badaniem RT-PCR i/lub testem IF (Ryc. 1). Ponadto u pacjenta IV wyizolowano także wirus grypy typu B, spokrewniony ze szczepem B/Jiangsu/10/2003 (Tab. I, Ryc.1).

U wszystkich badanych chorych zastosowano leczenie lekami antywirusowymi-antygrypowymi, tj. inhibitorem neuraminidazy wirusa grypy – oseltamivirem lub lekiem starej generacji – amantadyną (Tab. I). Po wdrożeniu leków antywirusowych stan pacjentów przedstawiał się następująco:

Tabela I. Wyniki badań wirusologicznych z BALF i zastosowane leczenie antywirusowe
Table I: Results of the laboratory diagnostic tests and antiviral treatment used in patients

numer przypadku i wiek/ number of case, age	data pobrania materiału/data of specimen's collection	wynik testu IF/ result of IF test	wynik badania RT-PCR/ result of RT-PCR	początek leczenia antywirusowego i rodzaj leku/start of antiviral treatment/drug
I-42	28.02.05.	grypa typu A/ influenza type A	grypa podtypu A(H3)/ influenza subtype A (H3)	28.02.05. oseltamivir
II-55	24.02.05.	grypa typu A/ influenza type A	grypa podtypu A(H3)/ influenza subtype A (H3)	21.02.2005. amantadyna
III-30	04.03.05.	grypa typu A/ influenza type A	-	04.03.05r oseltamivir
IV-25	10.03.05.	grypa typu B/ influenza type B	grypa typu B/ influenza type B	14.03.05. oseltamivir

IF – test immunofluorescencji/ immunofluorescence test

BALF – płyn z płukania oskrzelowo -pęcherzykowego/bronchoalveolar lavage fluid

Przypadek I (Ryc. 2) – W dniu wykonania bronchoskopii i pobrania BALF do badań uzyskano pozytywny wynik w kierunku wirusa grypy. Podano oseltamiwir 2 x 75mg uzyskując ustąpienie dolegliwości i poprawę stanu chorego. Zmniejszyła się duszność, ustąpiła gorączka, wyraźnie poprawiło się samopoczucie. Po trzech tygodniach hospitalizacji, w dniu 05.03.05. w stanie stabilnej poprawy chory został wypisany do domu. Za przyczynę zaostrzenia objawów ze strony układu oddechowego z gorączką uznano infekcję grypową .

Przypadek II (Ryc. 3) – Amantadyna została podana choremu 21.02.05r, jeszcze przed wykonaniem diagnostycznych badań wirusologicznych, ze względu na to, że pacjent przebywał w sali z chorymi na grypę. W okresie 3-4 dni od rozpoczęcia leczenia antywirusowego obserwowano jednak zwiększenie ciepłoty ciała do 38,2°C. Odstawiono zatem amantadynę i klarytromycynę i w dniu 26 lutego 2005r. wdrożono ceftriakson, co spowodowało normalizację ciepłoty ciała i poprawę stanu ogólnego. Po 17 dniach hospitalizacji, w dniu 05.03.05. pacjent został wypisany ze szpitala z rozpoznaniem zapalenia płuc i grypy.

Przypadek III (Ryc. 4) – Pozytywny wynik badania wirusologicznego otrzymano w dniu wykonania BAL i od razu podano oseltamivir. Po leczeniu oseltamivirem objawy kliniczne ustąpiły, a podwyższone wstępnie wskaźniki zapalne wyraźnie zmniejszyły się. W stanie dobrym, po 2 tygodniach hospitalizacji, w dniu 14.03.05. chory został wypisany do domu z zaleceniem kontynuacji kortykoterapii, którą rozpoczęto 11.03.05r, po zakończeniu stosowania leku antywirusowego. U tego chorego objawy będące bezpośrednią przyczyną hospitalizacji jednoznacznie ustąpiły po leczeniu antygrypowym

Przypadek IV (Ryc. 5) – Pozytywny wynik badania wirusologicznego otrzymano w piątej dobie (weekend) antybiotykoterapii, kiedy chory gorączkował mimo stosowania amoksycyliny i kwasu klawulanowego. Po dołączeniu leczenia oseltamivirem nastąpiła poprawa stanu ogólnego, normalizacja ciepłoty ciała i ustąpienie krwioplucia. Po tygodniu hospitalizacji, w dniu 16.03.05. chory został na własne żądanie wypisany ze szpitala z rozpoznaniem: ropne zapalenie oskrzeli i górnych dróg oddechowych, grypa, z zaleceniem dokończenia kuracji antywirusowej i antybiotykoterapii oraz dokonania kontroli laryngologicznej.

Omówienie

Praca dotyczy bardzo nielicznej grupy chorych ale wartej prezentacji . Wszyscy chorzy byli hospitalizowani z powodu stanów podgorączkowych i kaszlu z odkrztuszaniem wydzieliny. Jednak u każdego z tych chorych występowały różne okoliczności przy przyjęciu do szpitala: przypadek I- w przebiegu długiego leczenia immunosupresyjnego, przypadek II- z wieloma chorobami współistniejącymi, przede wszystkim z dużym zniekształceniem klatki piersiowej zaburzającym prawidłową czynność układu oddechowego i nawracającymi ropnymi zapaleniami zatok, przypadek III-w trakcie diagnostyki choroby śródmiąższowej , której istotą było nagromadzenie dużej liczby makrofagów o upośledzonej aktywności i przypadek IV- z ropnym procesem w jamie nosa i oskrzelach, u którego bezpośrednią przyczyną hospitalizacji było krwioplucie. U wszystkich zastosowano antybiotyki ale jednocześnie szukano dodatkowego czynnika infekcyjnego, zwłaszcza, że w oddziale wielu chorych manifestowało objawy grypowe. W przypadku I i III można uznać, że dzięki leczeniu antywirusowemu, zastosowanemu bezpośrednio po wykonaniu BAL i wykryciu wirusa grypy uzyskano ustąpienie objawów. Natomiast w przypadku II nie obserwowano już tak wyraźnego efektu – być może dlatego, że zastosowano lek wcześniejszej generacji- amantadynę, a być może, dlatego, że w obrazie klinicznym dominowało jednak zakażenie bakteryjne, które opanowano antybiotykiem. W przypadku IV- lek antygrypowy zastosowano w trakcie 7- dniowego leczenia antybiotykiem, który nie spowodował zamierzonego skutku. Natomiast dołączenie oseltamiviru spowodowało szybką i wyraźną poprawę.

Wnioski

- laboratoryjna diagnostyka wirusologiczna w przypadku pacjentów podejrzanych o zakażenie wirusem grypy ma istotne znaczenie ze względu na możliwość zastosowania skutecznego leczenia antywirusowego z użyciem leków nowej generacji, tj. inhibitorów neuraminidazy wirusa grypy,
- wykonane odpowiednio wcześnie laboratoryjne badania diagnostyki wirusologicznej umożliwiają szybkie wdrożenie terapii antywirusowej, co jest warunkiem jej skuteczności,
- korzystanie z nowoczesnych i szybkich metod diagnostyki wirusologicznej i idącego za tym leczenia antywirusowego skraca czas pobytu

- chorego w szpitalu i ogranicza koszty, jakie są z tym związane oraz pozwala nie dopuścić do rozprzestrzenienia się zakażenia na oddziale,
- diagnostyczne badania wirusologiczne powinny wyprzedzać wdrożenie określonej terapii, co pozwala uniknąć zastosowania leków, które w przypadku zakażenia danym patogenem okażą się nieskuteczne, jak również pozwala zmniejszyć ryzyko pojawiania się szczepów/wariantów opornych na te leki.

Piśmiennictwo

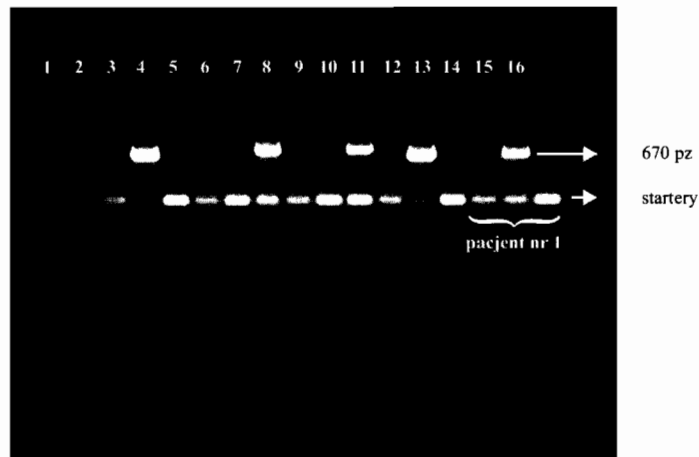
1. Boivin G. i wsp. Predicting influenza infections during epidemics with use of clinical case definition. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31, 1166-1169.
2. Brydak L. B. Grypa i jej profilaktyka. Wyd. II, Termedia, Poznań 2004, 1-272.
3. Brydak L. B.: Grypa istotnym problemem zdrowia publicznego w Polsce. *Family Medicine & Primary Care Review*, 2005 7(2), 261-271.
4. Brydak L. B., Machała M.: Inhibitory neuraminidazy wirusa grypy. *Przewodnik Lekarza* 2001, 7-8(31-32), 55-60.
5. Centers for Disease Control and Prevention. WHO Collaborating Center for the Surveillance, Epidemiology and Control of Influenza. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, July 1982.
6. Centers for Disease Control and Prevention, Department of Health and Human Services: Detection & Control of Influenza Outbreaks in Acute Care Facilities, CDC 2001.
7. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR* 2005, 54 (no. RR-8): 1-40.
8. Centers for Disease Control and Prevention: High levels of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses and interim guidelines for use of antiviral agents--United States, 2005-06 influenza season. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2006, 55(2), 44-46.
9. de Jong M. D. i wsp. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med* 2005, 353, 25, 2667-2672.
10. ESWI Lab Course, Basic Laboratory Methods for Influenza Diagnosis – For use in National Influenza Centers and Correspondant Laboratories. Institut Pasteur, Paris, 17-21 July 2000.
11. Manuguerra J.-C., Hannoun C.: Influenza and other viral respiratory diseases. Surveillance and laboratory diagnosis. Institut Pasteur, Paris 1999, 1-286.
12. Monto A. S. i wsp. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch. Intern. Med.* 2000, 160, 3243-3247.
13. Moscona A.: Neuraminidase inhibitors for influenza. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353, 13, 1363-1373.
14. Nicholson K. G. i wsp. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomized controlled trial. *The Lancet* 2000, 355, 1845-1850.
15. van Essen G. A.: Results of the ESWI-Nivel survey on vaccination rate in at-risk groups in Poland in 2003. Polish Influenza Network Meeting, 30 November 2004, Warsaw.

Wpłynęła: 24.01.2006.

Adres Krajowy Ośrodek ds. Grypy, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

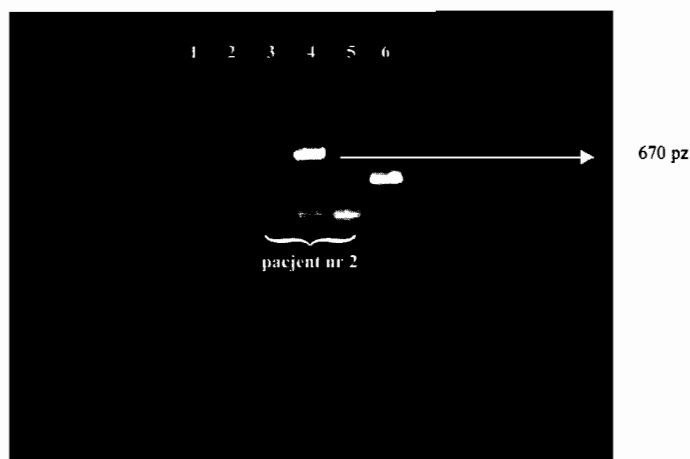


Ryc. 1. Komórki nabłonka układu oddechowego zakażone wirusem grypy typu A, wybarwione metodą immunofluorescencji (IMAGEN Influenza Virus A and B, DakoCytomation, W. Brytania; wykonano w Krajowym Ośrodku ds. Grypy PZH)
Fig. 1. Respiratory epithelium cells infected with influenza virus type A and dyed with immunofluorescence method (IMAGEN Influenza Virus A and B, DakoCytomation, G. Britain; performed at the National Influenza Center, NIH, Poland)



Ryc. 2. Przyp. I: Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR wykonanej z BALF .
Poszczególne ścieżki przedstawiają:

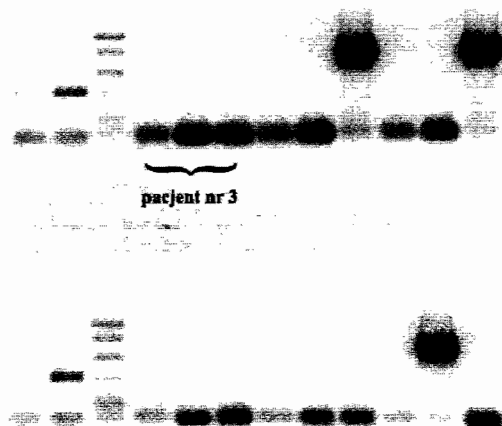
- Fig. 2. Case I: Electrophoresis of RT-PCR products obtained from BALF. The lanes presents:
- ścieżka 1/lane 1: marker DNA,
 - ścieżka 14/lane 14: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutinin podtypu H1/negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H1,
 - ścieżka 15/lane 15: produkt 670pz reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutinin podtypu H3/ 670bp product of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H3,
 - ścieżka 16/lane 16: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutinin typu B/negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin type B



Ryc. 3. Przyp. II. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR wykonanej z BALF. Poszczególne ścieżki przedstawiają:

Fig. 3. Case II. Electrophoresis of RT-PCR products obtained with BALF. The lanes presents:

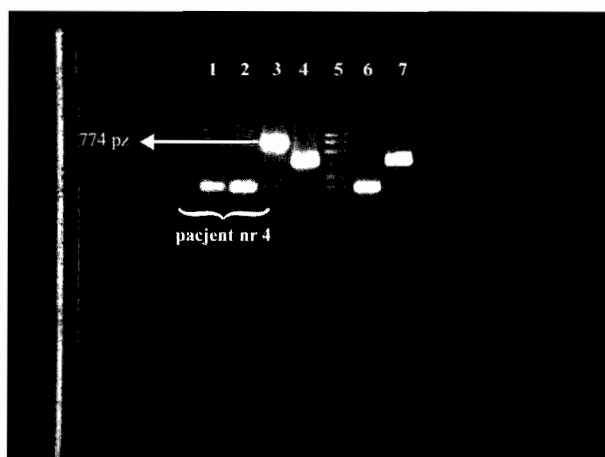
- ścieżka 1/lane 1: kontrola negatywna/negative control
- ścieżka 2/lane 2: marker DNA,
- ścieżka 3/lane 3: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H1/ negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H1,
- ścieżka 4/lane 4: produkt 670pz reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H3/ 670bp product of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H3,,
- ścieżka 5/lane 5: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny typu B/negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin type B,
- ścieżka 6/lane 6: kontrola dodatnia prawidłowego wykonania reakcji/positive control of RT-PCR reaction..



Ryc. 4. Przyp. III. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR wykonanej z BALF. Poszczególne ścieżki przedstawiają:

Fig. 4. Case III. Electrophoresis of RT-PCR products obtained from BALF. The lanes presents:

- ścieżka 1/lane 1: kontrola negatywna/negative control
- ścieżka 2/lane 2: kontrola dodatnia prawidłowego wykonania reakcji/ positive control of RT-PCR reaction,,
- ścieżka 3/lane 3: marker DNA,
- ścieżka 4/lane 4: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H1/negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H1,
- ścieżka 5/lane 5: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H3/negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H3,
- ścieżka 6/lane 6: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny typu B/ negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin type B..



Ryc. 5. Przyp. IV. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji RT-PCR wykonanej z BALF. Poszczególne ścieżki przedstawiają:

Fig. 5. Case IV. Electrophoresis of RT-PCR products obtained from BALF . The lanes presents:

- ścieżka 1/lane 1: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H1//negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H1,
- ścieżka 2/lane 2: negatywny wynik reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny podtypu H3//negative result of RT-PCR with primers for hemagglutinin subtype H3,,
- ścieżka 3/lane 3: produkt 774pz reakcji RT-PCR ze starterami dla genu hemagglutyniny typu B//774bp product of RT-PCR with primers for hemagglutinin type B,,
- ścieżka 4/lane 4: kontrola dodatnia prawidłowego wykonania reakcji//positive control of RT-PCR reaction,,
- ścieżka 5/lane 5: marker DNA