

*Sambor Grygorczuk, Sławomir Pancewicz, Joanna Zajkowska, Maciej Kondrusik,
Renata Świerżbińska, Anna Moniuszko, Wioletta Pawlak-Zalewska*

WYSTĘPOWANIE PRZECIWCIAŁ PRZECIWKO HANTAWIRUSOM WŚRÓD PRACOWNIKÓW LEŚNYCH Z TERENU POLSKI PÓŁNOCNO-WSCHODNIEJ

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku
Kierownik: Sławomir Pancewicz

W grupie badanych 69 pracowników Lasów Państwowych z północno-wschodniej Polski, u 6 osób (8,7%) stwierdzono obecność przeciwciał IgG przeciwko wirusom Puumala i/lub Hantaan, sugerującą przebycie w przeszłości nierozpoznanego zakażenia hantawirusowego.

Słowa kluczowe: hantawirus, wirus Puumala, nefropatia epidemiczna, zakażenie odzwierzęce

Key words: hantavirus, Puumala virus, nephropathia epidemica, zoonosis

WSTĘP

Chorobotwórcze dla człowieka szczepy wirusów z rodzaju *Hantavirus* występują prawie na całym świecie u dziko żyjących gryzoni, które przez całe życie pozostają bezobjawowo zakażone gatunkowo swoistym typem wirusa i wydalają go z moczem, kałem i śliną (1). Hantawirus może przetrwać w środowisku kilkanaście dni, a w niskiej temperaturze dłużej, co umożliwia zakażenie drogą inhalacyjną z pyłem i kurzem lub przez uszkodzoną skórę, bez bezpośredniego kontaktu z gryzoniami (2,3). Szczególnie narażeni są pracownicy leśni, myśliwi, żołnierze, a także biwakujący turyści i wszystkie osoby mieszkające w pobliżu miejsc występowania gryzoni (4,5). W Europie za zachorowania u ludzi odpowiadają wirusy *Dobrava* (DOBV) występujący u myszy leśnych *Apodemus flavicollis* na Półwyspie Bałkańskim oraz *Puumala* (PUUV) obecny u nornic *Clethrionomys glareolus* na całym kontynencie oprócz krańców południowych (1,4,6-10). Niedawno wyodrębniony wirus *Saaremaa*, genetycznie i antygenowo zbliżony do DOBV, występuje w centralnej i wschodniej Europie (Niemcy, Słowacja, Estonia) u myszy polnych *A. agrarius* (11,12,13).

Zakażenie hantawirusowe przebiega jako ostra choroba gorączkowa, często wikłana hipotonią lub śródmiąższowym zapaleniem i niewydolnością nerek, a rzadziej skazą krwotoczną; duży jest odsetek zakażeń bezobjawowych lub skąpoobjawowych (1,2,7). DOBV

oraz pokrewne wirusy *Hantaan* (HTNV) i *Seul* w Azji wywołują gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym (HFRS), w przebiegu której śmiertelność dochodzi do 12% (1,2,10). PUUV odpowiada za nefropatię epidemiczną (NE), o przebiegu analogicznym do HFRS, ale znacznie łagodniejszym, ze śmiertelnością poniżej 1% (1,2,10). Choroba powodowana przez wirus *Saaremaa* ma prawdopodobnie przebieg stosunkowo łagodny, zbliżony do NE (13).

Dane serologiczne sugerują występowanie prawdopodobnie bezobjawowych lub skąpoobjawowych, a w konsekwencji nie rozpoznawanych zakażeń hantawirusowych u ludzi na terenie Polski (12,14). W celu oceny narażenia na kontakt z tymi wirusami mieszkańców północno-wschodniej Polski oznaczyliśmy przeciwciała przeciwko PUUV i HTNV w surowicy osób zdrowych, należących do grupy wysokiego ryzyka zakażenia.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 69 pracowników Lasów Państwowych z województw podlaskiego i warmińsko-mazurskiego. Grupa I liczyła 59 osób - pracowników nadleśnictw położonych na terenie dużych kompleksów leśnych: Puszczy Boreckiej – 18 osób, Puszczy Augustowskiej – 18 osób, Puszczy Knyszyńskiej – 15 osób, oraz Biebrzańskiego Parku Narodowego – 8 osób. Grupa II objęła 10 pracowników Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Białymstoku, okresowo przebywających na terenach leśnych na całym badanym obszarze.

Badania surowicy na obecność przeciwciał IgG przeciwko HTNV i PUUV przeprowadzono przy użyciu zestawów Hantavirus (Hantaan) IgG/IgM ELISA oraz Hantavirus (Puumala) IgG/IgM ELISA firmy Progen Biotechnik GmbH (Niemcy), według instrukcji producenta. Za wynik dodatni przyjęto: 1) zgodnie z danymi producenta wskaźnik $>1,5$ (graniczny: 1,0-1,5); 2) wskaźnik przekraczający 3 odchylenia standardowe powyżej średniej dla wyników ujemnych, zgodnie z zasadami interpretacji zaproponowanymi przez *Guta* i wsp. (15). Tak wyliczony poziom odcięcia wynosił 1,16 dla anti-PUUV i 1,17 dla anti-HTNV. Różnice między badanymi zależne od miejsca pracy (grupa I w porównaniu z II oraz poszczególne nadleśnictwa w grupie I) oceniono metodą nieparametrycznej analizy wariancji przy użyciu pakietu STATISTICA, przyjmując miejsce pracy za zmienną niezależną, a wynik badania serologicznego (dodatni lub ujemny) za zmienną zależną. Za istotne przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

Wynik dodatni na obecność anti-PUUV IgG według kryteriów producenta uzyskano u 1 osoby (w grupie I), u 10 stwierdzono wyniki graniczne. Wynik graniczny dla anti-HTNV IgG stwierdzono u 7 badanych, w tym u 5 towarzyszył on obecności anti-PUUV. Według *Guta* i wsp. proponowany przez producenta testu poziom odcięcia przeznaczony do diagnostyki ostrych zakażeń może być zbyt restrykcyjny do potwierdzenia zakażenia przebytego w przeszłości (15). Zastosowanie alternatywnej wartości poziomu odcięcia, wyliczonej na podstawie wyników ujemnych uzyskanych w naszym badaniu, umożliwiło potwierdzenie swoistej reaktywności anti-PUUV u 3 kolejnych badanych osób z wynikami granicznymi i uznanie pozostałych wyników za ujemne. Według tych samych kryteriów, anti-HTNV-IgG było obecne u 3 badanych, w tym u 1 osoby ze współistniejącą silniejszą

reaktywnością anti-PUUV. Łącznie, po zastosowaniu wyliczonego poziomu odcięcia do weryfikacji wyników granicznych, potwierdzono obecność anti-PUUV IgG u 4 badanych, a anti-HTNV IgG u 3 (tab. I).

Tabela I. Częstość występowania przeciwciał IgG przeciwko wirusom *Puumala* (PUUV) i *Hantaan* (HTNV) w badanej populacji; wyniki dodatnie przy zastosowaniu kryteriów interpretacji wg *Gut* i wsp. (16).

Table I. Frequency of IgG anti-*Puumala* (PUUV) and anti-*Hantaan* (HTNV) antibodies in the study population; results interpreted as positive according to criteria by *Gut* et al. (16).

Grupa / Group	PUUV IgG (+) HTNV IgG (-) (n, %)	PUUV IgG (+) HTNV IgG (+) (n, %)	PUUV IgG (-) HTNV IgG (+) (n, %)	Wszystkie (+) / All (+) (n, %)
grupa I / group I (n = 59)	3 (5,1%)	0 (0%)	1 (1,7%)	4 (6,8%)
Puszcza Borecka (n = 18)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Puszcza Augustowska (n = 18)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Biebrzański PN (n = 8)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (12,5%)	2 (25%)
Puszcza Knyszyńska (n = 15)	2 (13,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13,3%)
grupa II / group II (n = 10)	0 (0%)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
grupa badana łącznie / whole study population (n = 69)	3 (4,3%)	1 (1,4%)	2 (2,9%)	6 (8,7%)

Nie było znamiennej różnicy po względem ilości wyników dodatnich pomiędzy grupą I a II. W grupie I wyniki dodatnie stwierdzono w południowej części badanego obszaru, odpowiadającej terenom w promieniu 60 km wokół Białegostoku (Puszcza Knyszyńska i Biebrzański Park Narodowy), a nie w części północnej, obejmującej północne krańce województwa podlaskiego i przylegające tereny warmińsko-mazurskiego (Puszcza Augustowska i Borecka). Różnica pomiędzy tak wyodrębnionymi obszarami pod względem obecności anti-PUUV IgG była statystycznie znamienna ($p = 0,03$).

DYSKUSJA

Występowanie klinicznie jawnych zakażeń hantawirusowych u ludzi potwierdzono w prawie całej Europie. W Skandynawii i europejskiej części Rosji duża jest częstość zachorowań powodowanych przez PUUV (w Rosji 20 tysięcy w 1997 roku), co może mieć związek z dłuższym utrzymywaniem zakaźności wirusa w niskiej temperaturze (1,12,13). W krajach o cieplejszym klimacie zachorowalność jest nieco mniejsza, np. Belgii i Francji do 2005 roku rozpoznano łącznie około 2200 zakażeń (6). W Niemczech, gdzie zachorowalność wynosi około 0,25/100 tys. rocznie, PUUV w roku 2005 odpowiadała za 82% zachorowań,

a wirus serologicznie zbliżony do HTNV za 2% (6). W krajach Półwyspu Bałkańskiego potwierdzone zachorowania notuje się od lat osiemdziesiątych XX wieku, a PUUV i DOBV występują tam z porównywalną częstością (1,10). Na Słowacji badanie surowic 102 chorych z objawami sugerującymi HFRS wykazało obecność swoistych przeciwciał u 28 z nich (27,5%), pojedyncze zachorowania opisywano też w Czechach (9,17).

Odpowiedź serologiczna w zakażeniu hantawirusowym pojawia się wraz z objawami klinicznymi i jest długotrwała. U osób zakażonych PUUV potwierdzono obecność swoistych przeciwciał IgG do 10 lat po zachorowaniu, co czyni z nich dobry wykładnik przebytej infekcji (8). Testy immunoenzymatyczne umożliwiają różnicowanie zakażeń powodowanych przez dwie grupy serologiczne hantawirusów: pierwszą, obejmującą HTNV i zbliżone (w Europie – DOBV i *Saaremaa*) i drugą, w Europie reprezentowaną przez PUUV. W obrębie tych grup występują silne reakcje krzyżowe, praktycznie uniemożliwiające precyzyjniejszą diagnostykę serologiczną (7,8,10). Przeciwciała reagujące z antygenami HTNV mogą być w związku z tym uważane za wykładnik zakażenia DOBV na Bałkanach i wirusem *Saaremaa* w Europie Środkowej (7,8,9,10). Badania serologiczne osób zdrowych potwierdzają dość duże narażenie mieszkańców krajów europejskich na kontakt z hantawirusami i dużą liczbę zakażeń bezobjawowych lub nierozpoznanowych. W Skandynawii, Niemczech, Włoszech i Austrii wykryto swoiste przeciwciała u kilku procent mieszkańców terenów endemicznych, w tym w północnej Szwecji u 8,9%, a w Finlandii do 20% (1,4,8,18). W Czechach wykryto przeciwciała anti-HTNV u 1,0%, a anti-PUUV u 1,4% z 710 losowo wybranych zdrowych osób dorosłych (17). Na Słowacji swoiste przeciwciała stwierdza się u 0,54–1,91% badanych, zależnie od regionu kraju (9).

Ryzyko zakażenia zależy od narażenia na kontakt z gryzoniami, a to z kolei od miejsca zamieszkania, wykonywanej pracy i aktywności pozazawodowej z jednej, a od czynników przyrodniczych wpływających na liczebność gryzoni z drugiej strony (4,8,19). Rozmieszczenie myszy i nornic będących rezerwuarem hantawirusów zależy od klimatu i roślinności, a ich liczebność zmienia się w ciągu roku i w cyklach kilkuletnich, zależnie od temperatury i aktywności drapieżników, co przekłada się na wahania zachorowalności wśród ludzi (1,4,6,19). Narażenie na zakażenie koncentruje się na terenach endemicznych, najczęściej związanych ze zwartymi obszarami lasów, zwłaszcza liściastych (3,6,10,18,19). Endemiczne występowanie zachorowań obserwuje się m.in. na terenie Alp Szwabskich w Niemczech, Ardenów we Francji, Styrii i Karyntii w Austrii oraz gór Karst i Pindos na pograniczu Grecji i Albanii (6,10,18). Częstość występowania swoistych przeciwciał jest większa u mężczyzn, osób starszych, mieszkających na wsi, w pobliżu lasu lub często w nim przebywających (1,4,8,19,20). Jeszcze większe ryzyko zakażenia dotyczy myśliwych i osób pracujących w lesie, np. we wschodniej Słowacji przeciwciała wykryto u 5,88% pracowników leśnych wobec 1,91% w populacji ogólnej (4,19).

W Polsce potwierdzono występowanie u gryzoni niepatogennego dla ludzi hantawirusa *Tula*, zbliżonego do PUUV, znanego też z Rosji, Czech i Słowacji (21). Czynnych zakażeń hantawirusowych u ludzi jak dotąd nie opisano, jednak ich obecność jest prawdopodobna, wobec występowania PUUV i wirusa *Saaremaa* w sąsiednich krajach, w podobnych warunkach przyrodniczych. Nie prowadzono badań serologicznych w większych grupach pacjentów z możliwym ostrym zakażeniem hantawirusowym. Jedynie *Sadkowska-Todys* i wsp. zbadali grupę 9 chorych z objawami sugerującymi NE, nie wykrywając u nich swoistej odpowiedzi serologicznej (12). Natomiast badania serologiczne osób zdrowych

z grup ryzyka potwierdzają występowanie nierozpoznawanych zakażeń. *Szenborn* i wsp. badając surowice 144 pracowników leśnych z Opolszczyzny, w kilku przypadkach wykazali obecność przeciwciał reagujących z antygenami HNTV, DOBV i/lub PUUV, których swoistość potwierdzono metodą Western-blot. Badane osoby nie zgłaszały występowania w przeszłości objawów wskazujących na HFNR lub NE, co sugeruje bezobjawowy lub niecharakterystyczny przebieg zakażeń (14). *Sadkowska-Todys* i wsp. nie stwierdzili przeciwciał IgG anty-PUUV ani anty-HNTV u żadnego z 86 pracowników leśnych z Górnego Śląska, natomiast w grupie osób o szczególnie dużym narażeniu, zoologów prowadzących badania terenowe nad dzikimi gryzoniami różnych miejscach w Polsce, wyniki dodatnie uzyskano u 9 z 78 badanych (11%) (12,15).

W naszych badaniach stwierdziliśmy izolowaną obecność anty-PUUV IgG u 4, a anty-HNTV IgG u 3 osób spośród 69 badanych, przy czym u jednej z nich wykrywalna była reakcja z antygenami obu wirusów. Pomiędzy PUUV a HNTV obserwuje się krzyżowe reakcje serologiczne, które mogą odpowiadać za pojawienie się anty-HNTV IgG u tej osoby (14,16). Natomiast przeciwciała anty-HNTV wykryte u badanych osób bez odpowiedzi przeciwko PUUV przemawiają za przebyciem zakażeniem wirusem antygenowo zbliżonym do HNTV, najprawdopodobniej *Saaremaa*. Nie dysponujemy danymi na temat możliwego pozazawodowego narażenia badanych przez nas osób na zakażenie hantawirusowe, np. związanego z wyjazdami zagranicznymi, jednak, zwłaszcza w wypadku osób z grupy I, wydaje się mieć ono drugorzędne znaczenie w porównaniu z ewidentnym narażeniem zawodowym (regularna praca w terenie, na obszarze występowania zwierząt stanowiących rezerwuar hantawirusów).

Widoczna była tendencja do występowania odpowiedzi przeciwko hantawirusom tylko u osób pracujących w centralnej części województwa podlaskiego, ale nie w jego północnej części (Puszcza Augustowska) ani w przyległej części województwa warmińsko-mazurskiego (Puszcza Borecka). Obserwacja ta wymaga potwierdzenia, ale może sugerować ograniczenie ryzyka zakażeń hantawirusowych do terenów endemicznych, zależnie od lokalnych warunków przyrodniczych, podobnie jak to obserwowano w innych krajach (19).

WNIOSKI

Przeprowadzone badania sugerują występowanie wirusów *Puumala* i prawdopodobnie *Saaremaa* na terenie dużych kompleksów leśnych w północno-wschodniej Polsce oraz ekspozycję na zakażenie osób tam przebywających. Narażenie na zakażenie hantawirusami leśników z centralnej części województwa podlaskiego wydaje się być porównywalne z danymi z innych krajów europejskich i większe niż w badanej przez *Sadkowską-Todys* i wsp. populacji pracowników leśnych z Górnego Śląska (12). Większość zakażeń ma prawdopodobnie przebieg bezobjawowy lub łagodny i niecharakterystyczny.

*S Grygorczuk, S Pancewicz, J Zajkowska, M Kondrusik, R Świerzińska, A Moniuszko,
W Pawlak-Zalewska*

DETECTION OF ANTI-HANTAVIRUS ANTIBODIES IN FOREST WORKERS IN THE
NORTH-EAST OF POLAND

SUMMARY

Objective: To estimate exposition to hantaviruses in a high-risk population (forest workers) in the north-east of Poland.

Methods: IgG antibodies against virus Puumala (PUUV) and Hantaan (HTNV) were detected by ELISA in sera of 59 forest workers from Podlaskie and Warmińsko-Mazurskie provinces (group I), as well as in 10 employees of Regional Forest Administration in Białystok (group II).

Main observations: Anti-PUUV IgG antibodies were detected in 3 persons in group I and 1 in group II. Anti-HTNV IgG were present in 1 person in group I and 2 in group II, in one case accompanying strong reactivity towards PUUV.

Results: Anti-PUUV IgG, suggestive of the history of non-diagnosed PUUV infection, were detected in 4 persons of 69 (5,7%). Isolated anti-HTNV IgG, which could indicate past infection with Saaremaa virus, antigenically related to HTNV, were present in 2 subjects (2,9%).

Conclusions: Non-diagnosed infections with Puumala and Saaremaa viruses seem to occur in the high risk groups in the north-east of Poland, with frequency comparable to other European countries. Most infections are probably mild or asymptomatic.

PIŚMIENNICTWO:

1. Mustonen J, Vapalahti O, Henttonen H, i in. Epidemiology of hantavirus infections in Europe. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2729-31.
2. Welzel TM, Zeier M, Darai G, i in. Hantavirus infection – new threats by an old virus. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2731-3.
3. Kallio ER, Klingström J, Gustafsson E, i in. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J Gen Virol* 2006; 87: 2127-34.
4. Zöller L, Faulde M, Meisel H, i in. Sero-prevalence of hantavirus antibodies in Germany by a new recombinant enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:305-13.
5. Clement J, Underwood P, Ward D, i in. Hantavirus outbreak during military maneuvers in Germany. *Lancet* 1996;347:336.
6. Mailles A, Abu Sin M, Ducoffre G, i in. Larger than usual increase of hantavirus infections in Belgium, France and Germany, June 2005. *Euro Surveill* 2005;10(7):E050721.4
7. Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, i in. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1122-30.
8. Ahlm C, Juto P, Stegmayr B, i in. Prevalence of serum antibodies to hantaviruses in Northern Sweden as measured by recombinant nucleocapsid proteins. *Scand J Infect Dis*. 1997;29:349-54.
9. Sibold C, Meisel H, Lundkvist A, i in. Short report: simultaneous occurrence of Dobrava, Puumala and Tula hantaviruses in Slovakia. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:409-11.
10. Antoniadias A, Stylianakis A, Papa A, i in. Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis* 1996;174:407-10.
11. Plyusnin A, Vapalahti O, Vasilenko V, i in. Dobrava hantavirus in Estonia: does the virus exist throughout Europe? *Lancet* 1997;349:1369-70.

12. Sadowska-Todys M, Gut W, Baumann A, i in. Ocena problemu występowania zakażeń ludzi hantawirusami na terenie Polski, ze szczególnym uwzględnieniem wirusa Puumala. *Przegl Epidemiol* 2007;61:497-503.
13. Vapalahti O, Mustonen J, Lundkvist A, i in. Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 2003;3:653-61.
14. Szenborn L, Górecka J, Thalaska T. Badanie występowania przeciwciał przeciwko wirusom gorączek krwotocznych: Hanta, Dobrava, Puumala u pracowników leśnych. *Przegl Epidemiol* 2006;60,supl.2:8.
15. Gut W, Siennicka J, Sadowska-Todys M, i in. Występowanie przeciwciał klasy IgG swoistych dla hantawirusów w populacji pracowników leśnych i zoologów. *Przegl Epidemiol* 2007;61:483-8.
16. Gut W, Siennicka J, Sadowska-Todys M, i in. Problem występowania reakcji krzyżowych i nieswoistych w badaniach odpowiedzi humoralnej dla hantawirusa Puumala. *Przegl Epidemiol* 2007;61:489-95.
17. Pejcoch M, Kríz B. Hantaviruses in the Czech Republic. *Emerg Infect Dis* 2003;9:756-7.
18. Aberle SW, Lehner P, Ecker M, i in. Nephropathia epidemica and Puumala virus in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:467-72.
19. Linard C, Lamarque P, Heyman P, i in. Determinants of geographic distribution of Puumala virus and Lyme borreliosis infections in Belgium. *Int J Health Geographics* 2007;6:15.
20. Crowcroft NS, Infuso A, Ilfeld D, i in. Risk factors for human hantavirus infection: Franco-Belgian collaborative case-control study during 1995-6 epidemic. *BMJ* 1999;318:1737-8.
21. Song JW, Baek LJ, Song KJ, i in. Characterization of Tula virus from common voles (*Microtus arvalis*) in Poland: evidence for geographic-specific phylogenetic clustering. *Virus Genes* 2004;29:239-47.

Otrzymano: 19.05.2008 r.

Adres do korespondencji:

dr n. med. Sambor Grygorczuk

Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku

ul. Żurawia 14; 15-540 Białystok

tel. 085-74 09 519, - 514, fax. 085-74 09 515

e-mail: neuroin@amb.edu.pl