

Małgorzata Sadkowska-Todys¹, Dorota Dudek-Godeau², Sylwia Kamińska¹, Anna Baumann-Popczyk¹,
Michał Czerwiński¹, Bożena Kucharczyk¹, Andrzej Zieliński¹

WYSTĘPOWANIE I UTRZYMYWANIE SIĘ ZAKAŻEŃ HANTAWIRUSAMI W POPULACJACH GRYZONI W ŚRODOWISKU NATURALNYM – WYNIKI BADAŃ Z TERENU WOJEWÓDZTWA PODKARPACKIEGO, W LATACH 2010-2012*

¹Zakład Epidemiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
– Państwowy Zakład Higieny, Warszawa

²Centrum Badań Ekologicznych PAN, Dziekanów Leśny

STRESZCZENIE

W Polsce od roku 2007 stwierdzane są corocznie zachorowania wywołane przez hantawirusy wśród ludzi w województwie podkarpackim, liczba zachorowań wyraźnie wzrosła w roku 2014. Jest to powód prowadzenia na terenie kraju coraz większej liczby badań poświęconych różnym aspektom zakażeń hantawirusami.

CEL. Celem przeprowadzonych badań była ocena rozpowszechnienia, możliwość utrzymywania się i monitoring dynamiki zakażeń hantawirusami w populacjach nornicy rudej (*Myodes glareolus*) i myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*) w środowisku naturalnym.

MATERIAŁ I METODY. Odłowy gryzoni przeprowadzono na 7 powierzchniach badawczych w województwie podkarpackim, w okresie od lata 2010 do wiosny 2012 roku. Do odławiania gryzoni zastosowano pułapki żywołowne zgodnie z protokołem CMR (*Catch-Mark-Release*), liczebność populacji określono jako MNA (*Minimum Number Alive*). Krew do badań serologicznych pobierano przyżyciowo od zwierząt z żyły odpiszczelowej. W celu stwierdzenia zakażenia nornic hantawirusami stosowano test ReaScan Ab-Dect Puumala IgG - Reagent[®], a myszy test ELISA – test Mouse Hanta Virus ELISA Kit (Version with Control Antigen Wells) - BioCat GmbH[®]. Zależność między wiekiem, płcią oraz wielkością populacji a rozpowszechnieniem zakażeń hantawirusami wykazano stosując test χ^2 lub test Fishera oraz obliczając współczynnik korelacji.

WYNIKI. Łącznie odłowiono 854 gryzoni: 222 nornice, 592 myszy leśne, 4 norniki i 36 myszy polnych. Spośród nich przebadano 564 osobniki. Obecność swoistych przeciwciał przeciwko hantawirusom stwierdzono u 9,7% nornic i 9,5% myszy leśnych. Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w zakażeniu samców i samic myszy leśnej, jak również w grupie osobników dorosłych i juwenilnych. Natomiast takie różnice stwierdzono u nornicy rudej tylko w przypadku wieku. Dynamika rozpowszechnienia zakażenia hantawirusami najbardziej zaznaczona była na powierzchni badawczej Sanok. Współczynnik korelacji pomiędzy liczbą złowionych osobników a rozpowszechnieniem zakażenia hantawirusami wyniósł dla myszy leśnych -0,87, a dla nornicy rudej 0,76.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI. Wyniki przeprowadzonego badania wskazują, że zakażenia hantawirusami populacji myszy i nornic mają charakter punktowy, zmienny w czasie, a zmiany te najbardziej widoczne są po zimie, w sezonie wiosennym. Ponadto obserwowano różnice w dynamice zakażeń w zależności od gatunku gospodarzy zwierzęcych. Rekomendowane jest prowadzenie badań w cyklu wieloletnim, co pozwoliłoby na przeprowadzenie oceny ryzyka możliwości przejścia punktowo zlokalizowanych ognisk populacji zakażonych do stanu utrwalenia zakażenia w populacji zwierząt i określenie obszarów endemicznego występowania hantawirusów.

Słowa kluczowe: hantawirusy, Polska, *Myodes glareolus*, *Apodemus flavicollis*, Dobrava, Puumala

* Badanie zostało sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach środków przeznaczonych na finansowanie projektów badawczych, nr projektu NN303 590138 (nr umowy: 5901/B/P01/2010/38).

WSTĘP

Rodzaj Hantavirus jest jednym z 5 rodzajów należących do dużej rodziny wirusów *Bunyaviridae*. W rodzaju Hantavirus wyodrębniono co najmniej 29 genotypów i 23 serotypy, z których 17 jest patogennych dla człowieka (1). Rezerwuarem hantawirusów w przyrodzie i zarazem ich przenosicielami są gryzonie, zwierzęta owadożerne, takie jak ryjówki i krety oraz jak stwierdzono ostatnio – nietoperze (2, 3). Hantawirusy, w odróżnieniu od czterech pozostałych rodzajów *Bunyaviridae*, nie są przenoszone przez stawonogi. Gryzonie są naturalnymi gospodarzami hantawirusów i są zakażane trwale, co wiąże się m.in. z przewlekłym wydalaniem wirusa przez całe życie zwierzęcia. Materiałem zakaźnym dla ludzi są wydaliny i wydzieliny gryzoni. Zakażenie rozprzestrzenia się drogą wziewną, z aerozolem lub cząsteczkami kurzu zawierającego cząstki wydaliny i wydzieliny gryzoni lub przez bezpośredni z nimi kontakt. Fakt, iż gryzonie rozpowszechnione są na całym świecie stanowi o tym, iż zakażenia hantawirusami należą do najbardziej rozpowszechnionych zoonoz na świecie (2, 3).

Na terenie Polski występuje co najmniej 6 gatunków gryzoni, które są potencjalnymi gospodarzami hantawirusów. Jednym z najbardziej rozpowszechnionych gatunków gryzoni jest nornica ruda (*Myodes glareolus*), która jest gospodarzem serotypu Puumala (PUUV), podobnie jak mysz domowa (*Mus musculus*). Rezerwuarem serotypu Dobrava (DOBV) jest mysz leśna (*Apodemus flavicollis*), Saarema (SAAV) mysz polna (*Apodemus agrarius*), a serotypu Tula (TUUV) nornik zwyczajny (*Microtus arvalis*).

W Polsce pierwsze ognisko zachorowań u ludzi, obejmujące 9 przypadków, zarejestrowano w 2007r. na terenie województwa podkarpackiego (4). Od tego czasu corocznie stwierdza się zachorowania na tym terenie, co sugeruje obecność miejsc, na których występuje ryzyko zakażenia dla człowieka. W 2014 r. zgłoszono w ramach rutynowego nadzoru aż 55 zachorowań, w których do zakażenia doszło na terenie województwa podkarpackiego (5). Ponadto wcześniejsze badania zrealizowane przez NIZP-PZH dotyczące występowania przeciwciał przeciwko hantawirusom wśród przyrodników, którzy zawodowo zajmują się gryzoniami, wykazały obecność przeciwciał u 26% osób objętych badaniem (6).

Podstawą wyjaśnienia mechanizmów transmisji wirusów do populacji ludzkiej są dwa elementy - poziom rozpowszechnienia zakażenia w populacji gospodarza oraz liczebność populacji gospodarza. W Polsce dotychczas nie prowadzono długofalowych badań terenowych z zakresu epidemiologii środowiskowej, które mają kluczowe znaczenie dla zrozumienia powstawania ognisk występowania, szerzenia się i utrzymywania się

hantawirusów w populacjach gryzoni, w tym serotypów patogennych dla człowieka.

Celem prowadzonych badań było określenie rozpowszechnienia zakażeń hantawirusami w populacji gryzoni na wybranych terenach województwa podkarpackiego oraz określenie intensywności krążenia wirusa u ich naturalnego gospodarza. W odróżnieniu od dotychczas prowadzonych prac zastosowana metodyka pozwalała na śledzenie w czasie tych samych populacji zwierząt i osobników w warunkach naturalnych.

MATERIAŁY I METODY

Teren badań. Odłowy gryzoni zostały przeprowadzone w województwie podkarpackim, w nadleśnictwach Brzozów oraz Lesko. Oba nadleśnictwa położone są w VIII Karpackiej Krainie Przyrodniczo – Leśnej, w Dzielnicy Pogórza Środkowobeskidzkiego i Dzielnicy Bieszczadów. Znaczne różnice wysokości względnej i ukształtowanie terenu wpływają na zróżnicowanie klimatu, który został zaliczony do klimatów górskich i podgórskich. W nadleśnictwie Brzozów dominują lasy mieszane z przewagą buka i jodły (odpowiednio 50 % i 25 % powierzchni nadleśnictwa). W bardziej wysuniętym na południe nadleśnictwie Lesko w składzie gatunkowym drzewostanu dominuje sosna (33%), a w następnej kolejności buk i jodła (28% i 25% odpowiednio).

Aby prowadzić badania w najbardziej zbliżonym do siebie pod względem typu roślinności środowisku, w każdym z nadleśnictw wybrano podobny typ lasu. Przeważały niewielkie płaty grądów (*Tilio-Carpinetum*), występujących w tych rejonach często z domieszką jaworu, jodły i buka. Ogółem przeprowadzono odłowy na 7 powierzchniach badawczych wielkości 1 ha, na jednej powierzchni wielkości 0,3 ha oraz na 5 transektach, czyli pułapkach ustawionych w linii co 10 m poprowadzonej tak, aby objąć najbardziej różne siedliska. Transekty pozwalają na monitoring większej przestrzeni, złowienie większej liczby osobników oraz większej liczby gatunków niż powierzchnia badawcza, lecz nie pozwalają na monitorowanie obszaru aktywności poszczególnych osobników. Wprowadzenie transektów do metodyki odłowów miało na celu wstępną identyfikację miejsca występowania zakażonej populacji gryzoni.

Odłowy gryzoni. Przeprowadzono 6 sesji odłowów gryzoni: w 2010 r. (lato, jesień), 2011 r. (wiosna, lato, jesień), 2012 (wiosna). Odłowy objęły głównie Nadleśnictwo Brzozów - 8 stanowisk oraz Nadleśnictwo Lesko - 4 stanowiska.

Odłowy prowadzono metodą CMR (*Catch-Mark-Release*) przez kolejne cztery dni i cztery noce. Tak zaplanowane badania dają możliwość odłowienia około 95% osobników z badanej populacji nornicy rudej

(7). Po oznaczeniu gatunku, zważeniu, określeniu płci i oznakowaniu gryzonia, pobierano krew i wypuszczano osobnika w miejscu złowienia. Znakowanie indywidualnym numerem każdego nowo złowionego osobnika miało umożliwić szacowanie liczebności populacji oraz śledzenie losów zwierząt w kolejnych seriach odłowów.

Na podstawie wstępnych badań zakażenia populacji wytypowano 2 powierzchnie, na których kontynuowano monitoring dynamiki liczebności w sezonach wiosennym, letnim i jesiennym w 2011 r. oraz wiosną 2012 r. Pozwoliło to na prześledzenie historii zakażenia osobników ponownie odławianych. W 2011 roku dodatkowo wytypowano trzecią powierzchnię (Weremień), na której prowadzono badania jesienią 2011 i wiosną 2012 r.

Liczebność populacji przedstawiono jako MNA (*Minimum Number Alive*), czyli liczbę złowionych osobników w trakcie jednej serii odłowów.

Pobranie krwi do badań. Zwierzęta do pobrania krwi nie były poddawane premedykacji, a krew była pobierana z żyły odpiszczelowej, po uprzednim przygotowaniu miejsca wkłucia. Po nakłuciu naczynia krwionośnego przy pomocy jednorazowej igły, kropla krwi pojawiająca się na powierzchni była pobierana pipetą i/lub specjalnymi probówkami typu Microvette z kapilarą.

Badania laboratoryjne. W celu stwierdzenia zakażenia zwierząt hantawirusami stosowano testy wykrywające obecność specyficznych przeciwciał przeciwko tym wirusom. Do badań nornic używano testu ReaScan Ab-Dect Puumala IgG (Producent: Reagen). Test wykonywano zgodnie z procedurą podaną przez producenta. Do odczytania wyniku używano elektronicznego czytnika, który pozwalał na ocenę intensywności odpowiedzi immunologicznej. Do badania krwi pobranej od myszy w pierwszym roku badań stosowano ten sam test, którego używano do badań nornic, co dopuszczala podana oficjalnie przez producenta specyfikacja testu.

Ponieważ w czasie dwóch sesji nie uzyskano żadnego pozytywnego ani wątpliwego wyniku testu z materiału pobranego od tych zwierząt, po kontakcie z producentem podjęto decyzję o zmianie testu i kolejne badania myszy wykonywano przy użyciu testu ELISA – test Mouse Hanta Virus ELISA Kit (Version with Control Antigen Wells) - producent: BioCat GmbH.

Badania rozpowszechnienia zakażenia w populacjach gryzoni. Zależność pomiędzy wiekiem, płcią oraz wielkością populacji a rozpowszechnieniem zakażeń hantawirusami wykazano stosując test χ^2 lub test Fishera oraz obliczając współczynnik korelacji.

WYNIKI

Zakażenie gryzoni hantawirusami. Odłowiono łącznie 854 gryzoni: 222 nornice, 592 myszy leśne, 4 norniki i 36 myszy polnych. Spośród nich przebadano

564 zwierzęta w kierunku obecności przeciwciał przeciwko hantawirusom, będących wskaźnikiem zakażenia gryzoni tymi wirusami. W odłowach przeprowadzonych w 2010 r. u żadnego z badanych zwierząt nie stwierdzono obecności przeciwciał świadczących o zakażeniu. Ze względu na to, że w 2010 r. materiał pobrany od myszy badano testem ReaScan Ab-Dect Puumala IgG, w dalszych analizach nie uwzględniono wyników tych badań.

W przeważającej większości badanych zespołów gryzoni gatunkiem dominującym była mysz leśna, następnie nornica ruda, a najmniej liczna była mysz polna, która zachodzi na skraj leśnych powierzchni głównie jesienią.

Na 564 przebadane zwierzęta przeciwciała swoiste dla hantawirusów stwierdzono u 55 osobników. Łącznie w okresie od lata 2010 r. do wiosny 2012 r. przebadano 222 nornice, w tym u 20 (9,7%) osobników wykryto obecność swoistych przeciwciał (Tab. I) oraz 4 norniki, wśród których żaden nie posiadał przeciwciał świadczących o zakażeniu. Natomiast badania myszy leśnej przeprowadzono na materiale pobranym od 348 osobników odłowionych w okresie od wiosny 2011 do wiosny 2012 r. W tej grupie przeciwciała stwierdzono u 33 (9,5%) osobników (Tab. I). Ponadto przebadano 36 myszy polnych. U dwóch z nich wykryto obecność przeciwciał. Analizując dane dla całej badanej grupy stwierdzono istotnie statystycznie wyższy odsetek (12,9%) zakażonych samców niż samic (5,6%) wśród badanych myszy ($p=0,00$). Również wyższy i statystycznie istotny w porównaniu do grupy osobników młodocianych i młodych był odsetek zakażeń wśród dorosłych myszy leśnych (17%; $p=0,000$) i dorosłych nornic (18,1%, $p=0,000$).

Odsetek zakażonych zwierząt różnił się także istotnie w poszczególnych porach roku i najwyższy był wiosną zarówno dla nornicy rudej (23%; $p=0,003$), jak i dla myszy leśnej (16%; $p=0,008$).

W trakcie badań wykryto zakażone osobniki na czterech z siedmiu powierzchni badawczych. Ponieważ poszczególne serotypy hantawirusów są specyficzne dla określonych gospodarzy zwierzęcych, a szerzenie się i zmiany w rozpowszechnieniu zakażenia najlepiej można obserwować w populacji na tym samym terenie w dłuższym okresie czasu, dalsza analiza została przeprowadzona osobno w odniesieniu do poszczególnych gatunków gospodarzy zwierzęcych. Analizowano wyniki z powierzchni badawczych, na których stwierdzono przeciwciała u co najmniej jednego osobnika podczas przynajmniej jednej serii odłowów.

Zakażenia hantawirusami *Myodes glareolus*. Analiza wyników rozpowszechnienia zakażenia wśród nornicy rudej (Tab. II) łącznie dla wszystkich 4 powierzchni i dla wszystkich okresów badawczych wykazała, że rozpowszechnienie zakażenia u przebadanych zwierząt wynosi 12,5%. Przeciwciała wykrywane były zarówno u osobników juwenilnych, jak i u osobników z grupy

„subadultus” oraz osobników dorosłych. Odsetek rozpowszechnienia przeciwciał był statystycznie różny i w grupie dorosłych wynosił 22,7% i był wyższy niż u osobników juwenilnych - 3,5% i młodocianych - 3,6 ($p=0,002$). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w rozpowszechnieniu zakażenia w grupie samców i samic. W kolejnym sezonie powtórnie złowiono i zbadano 23 osobniki, z tego dwa były odłowione po raz trzeci. Tylko u jednego z nich stwierdzono zmianę statusu zakażenia z ujemnego na dodatni.

Na poszczególnych powierzchniach i dla poszczególnych sezonów odłowów rozpowszechnienie zakażeń różniło się zarówno pomiędzy powierzchniami w tym samym okresie roku, jak i na tej samej powierzchni w zależności od sezonu odłowów. O ile na jesieni 2011 r. zakażone osobniki stwierdzano na wszystkich badanych powierzchniach, to wiosną 2012 r. nie stwierdzono ich na żadnej (Tab. II). Dynamika rozpowszechnienia zakażenia hantawirusami zaznaczona była najbardziej na powierzchni badawczej Sanok. Współczynnik korelacji pomiędzy liczbą złowionych osobników w trakcie serii odłowów a rozpowszechnieniem zakażenia hantawirusami wyniósł 0,76, co wskazuje na dodatnią korelację pomiędzy zmianami w liczebności populacji nornicy a rozpowszechnieniem w niej zakażenia.

Zakażenia hantawirusami *Apodemus flavicollis*. Rozpowszechnienie zakażenia w populacji myszy leśnej łącznie dla wszystkich 4 powierzchni i dla wszystkich okresów badawczych wynosiło 9%. Przeciwciała wykryto jedynie w grupie osobników młodocianych i dorosłych (Tab. III). Nie stwierdzono obecności przeciwciał wśród osobników juwenilnych (Tab. III). Odsetek zakażeń w grupie samców był wyższy niż w grupie samic i wynosił odpowiednio 12,9 oraz 4,7, a różnica ta była istotna statystycznie ($p=0,012$).

Trzydzieści sześć osobników zostało powtórnie złowionych i zbadanych w kolejnych sezonach, z tego trzy były odłowione także po raz trzeci. Trzy osobniki w trakcie ponownego złowienia zmieniły status zakażenia z ujemnego na dodatni.

Współczynnik korelacji pomiędzy liczbą złowionych osobników w trakcie serii odłowów a rozpowszechnieniem zakażenia hantawirusami dla powierzchni Sanok wyniósł -0,87, a dla Turzego Pola -0,5. Wskazuje to, że zależność pomiędzy rozpowszechnieniem zakażenia a liczbą osobników jest odwrotna niż w przypadku nornicy rudej, czyli wraz ze wzrostem liczebności populacji, spada wśród nich rozpowszechnienie zakażeń hantawirusami.

DYSKUSJA

Dotychczas prowadzone badania zakażeń hantawirusami wśród gospodarzy zwierzęcych w Polsce

dotyczyły jedynie wykrywania i oceny ich występowania (8, 9). Uzyskane obecnie wyniki wskazują, że zakażenia hantawirusami populacji myszy i nornicy mają charakter punktowy, zmienny w czasie, a zmiany te najbardziej widoczne są po zimie w sezonie wiosennym. Taki charakter występowania zakażeń powoduje, że dużym wyzwaniem jest przede wszystkim znalezienie populacji, w której wykrywa się osobniki posiadające przeciwciała przeciwko hantawirusom.

Aby wyniki oraz wnioski z prowadzonych obserwacji były poparte silnymi dowodami, obserwacje powinny być zaplanowane na dłuższy okres czasu – po trzy sezony minimum przez trzy lata, optymalnie 5 do 10 lat. Świadczą o tym obserwacje prowadzone na Turzym Polu, gdzie na sześć sesji odłowów nornicy rudej zakażone zwierzęta znaleziono tylko raz, w piątej sesji odłowów.

Otrzymane wyniki z przeprowadzonych badań mogą posłużyć bardziej do stawiania hipotez niż do wyciągania wiążących wniosków. Jednak niektóre z nich, a zwłaszcza współczynniki korelacji pomiędzy liczbą złowionych osobników w trakcie jednej serii odłowów a rozpowszechnieniem zakażenia hantawirusami oraz różnice występowania zakażeń w zależności od wieku i płci badanych zwierząt wskazują jednoznacznie na to, że szerzenie się hantawirusów w populacji nornicy rudej i populacji myszy leśnej ma inny przebieg. Wskazywałoby to, że inne czynniki mają większe znaczenie w rozprzestrzenianiu się zakażenia wśród myszy – ma tu prawdopodobnie znaczenie płeć i wiek osobników, natomiast w przypadku nornicy rudej większe znaczenie może mieć liczba osobników w populacji. Różnice te można powiązać z odmiennymi systemami socjalnymi tych gatunków, a tym samym z różnym mechanizmem zwiększającym częstość kontaktów międzyosobniczych w populacji, co w przypadku szerzenia zakażenia hantawirusami ma istotne znaczenie.

WNIOSKI

Poznanie dynamiki szerzenia się zakażeń hantawirusami w populacji zwierzęcych gospodarzy może mieć bardzo istotne znaczenie dla zdrowia publicznego. Prowadzenie takich badań w cyklu wieloletnim prawdopodobnie pozwoliłoby na przeprowadzenie oceny ryzyka możliwości przejścia punktowo zlokalizowanych ognisk do stanu utrwalenia zakażenia w populacjach gospodarzy zwierzęcych i powstanie większych lub mniejszych obszarów endemicznego występowania tych wirusów.

Obserwowany w roku 2014 znaczący wzrost zachorowań ludzi wywołanych przez zakażenie hantawirusami wskazuje na istotny aspekt poznawczy takich badań. Poznanie mechanizmów i czynników

sprzyjających utrwaleniu się wirusa w środowisku naturalnym pozwoliłoby na opracowanie opartej na wiedzy naukowej informacji dla społeczeństwa o czynnikach stanowiących zagrożenie zakażeniem hantawirusami i sposobach zapobiegania.

Podziękowania

Autorzy pragną podziękować Nadleśnictwu Brzozów oraz Lesko, a także panu Jerzemu Ginalskiemu Dyrektorowi Muzeum Budownictwa Ludowego w Sanoku za wyrażenie zgody na przeprowadzenie odłowów gryzoni i udostępnienie powierzchni badawczych. Ponadto dziękujemy Wiktorowi Gregorowiczowi, Monice Leszkiewicz, Jean-François Godeau, Piotrowi Ceryngierowi, Agnieszce Napiórkowskiej, Agnieszce

Kloch, Maćkowi Sierakowskiemu, Joannie Ostrek oraz uczniom i wychowawcom z Zespołu Szkół Leśnych w Lesku za ogromną pomoc w realizacji prac terenowych.

Otrzymano: 18.05.2015 r.

Zaakceptowano do druku: 3.06.2015 r.

Adres do korespondencji:

Dr Małgorzata Sadkowska-Todys

Zakład Epidemiologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy

Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

email: mtodys@pzh.gov.pl

**XX JUBILEUSZOWY ZJAZD
POLSKIEGO TOWARZYSTWA EPIDEMIOLOGÓW
I LEKARZY CHORÓB ZAKAŻNYCH**

**BYDGOSZCZ, Opera Nova
17 – 19 września 2015 r.**

www.pteilchz.org.pl

www.batumi-agency.pl