



**Uniwersytet Rzeszowski  
Kolegium Nauk Medycznych**

**Anna Nowakowska**

**Wykrycie gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym  
ludzi w Polsce w latach 2004 – 2018  
oraz badania nad jej występowaniem i charakterystyką.**

**rozprawa na stopień doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu  
w dyscyplinie nauk o zdrowiu  
promotor: prof. dr hab. n. med. Józef Piotr Knap**

**Rzeszów, 2023r.**

*pracę dedykuję moim synom*

Rozprawę wykonano w oparciu o badania realizowane w:

1. projekcie MNiSW nr N N404 204636  
„Badania seroepidemiologiczne i kliniczne nad występowaniem zakażeń hantawirusowych (HFRS – gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym) u ludzi Lubelszczyzny i nad ich przenosicielami”  
kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Józef Piotr Knap  
realizacja: Instytut Medycyny Wsi w Lublinie  
w okresie 2009 – 2012r.
  
2. projekcie MNiSW nr N N308 091937  
„Występowanie zakażeń hantawirusowych w rezerwuarze zwierzęcym w aspekcie przypadków zachorowań u ludzi w województwie podkarpackim”  
kierownik projektu: dr M. Niemcewicz  
realizacja: Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Puławach  
w okresie 2009 – 2011r.
  
3. Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Rzeszowie  
kierownik: dr inż. Adam Sidor  
realizacja: Laboratorium Diagnostyki Medycznej  
w okresie 2007 – 2018r.

## Spis treści

strona/strony

Strona tytułowa		
Wykaz projektów badawczych realizowanych w pracy		
Spis treści		1 - 2
Stosowane skróty, oznaczenia, terminologia.		3 - 4
Spis rycin		5 - 7
Spis tabel		8 - 9
Spis załączników		10
Słowa kluczowe		11
Streszczenie		12 - 13
Abstract		14 - 15
I. WSTĘP		16 - 56
1.	Czynnik etiologiczny choroby.	16 - 23
1.1.	Hantawirusy – przynależność taksonomiczna, zasady prawidłowej nomenklatury.	16 - 18
1.2.	Historia identyfikacji hantawirusów.	18 - 20
1.3.	Budowa strukturalna wirionu hantawirusów.	20
1.4.	Organizacja genomu – cykl replikacyjny i morfogeneza hantawirusów.	20 - 22
1.5.	Różnorodność hantawirusów. Genetyczne zróżnicowanie. Filogeneza molekularna.	22 - 23
2.	Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym – opis choroby.	23 - 42
2.1.	Ciężkość przebiegu klinicznego HFRS.	23 - 25
2.2.	Główne cechy kliniczne HFRS. Fazy kliniczne w przebiegu HFRS.	25 - 32
2.3.	Cechy kliniczne hantawirusowego zespołu płucnego (HPS / HCPS).	32 - 33
2.4.	Patomechanizm rozwoju zakażeń hantawirusowych w organizmie gospodarza – człowieka i zwierzęcia. Tropizm zakażeń. Rola śródbłonka naczyniowego w patogenezie zakażeń hantawirusowych. Rola odpowiedzi immunologicznej organizmów w	33 - 39

	patogenezie zakażeń hantawirusowych. Uwarunkowania genetyczne przebiegu klinicznego zachorowań hantawirusowych.	
2.5.	Powikłania w HFRS i po przebyciu zachorowania.	39 - 40
2.6.	Leczenie, profilaktyka zakażeń hantawirusowych, szczepienia ochronne.	40 - 42
3.	Epidemiologia choroby.	42 - 54
3.1.	Choroba wywołana przez hantawirusy – definicja przypadków.	42 - 44
3.2.	Występowanie zachorowań wśród ludności na świecie w XX i XXI wieku.	44 - 47
3.3.	Występowanie rezerwuarów zwierzęcych hantawirusów, wektorów zakażeń hantawirusowych. Ewolucjonizm czynników etiologicznych i gospodarzy zwierzęcych.	47 - 51
3.4.	Ekologia zakażeń – czynniki biotyczne, abiotyczne (klimatyczne) wpływające na rozprzestrzenianie się zakażeń hantawirusowych.	51 - 52
3.5.	Grupy narażonych na zakażenia hantawirusowe. Okoliczności zarażenia się.	52 - 54
3.6.	Ogniska zachorowań, endemie, epidemie, pojedyncze zachorowania u ludzi. Enzoocja i epizoocja wśród zwierząt.	54
4.	Zastosowanie metod diagnostyki laboratoryjnej do wykrywania hantawirusów w materiale ludzkim.	55 - 56
<b>II. CEL PRACY</b>		<b>57 - 83</b>
<b>III. MATERIAŁY I METODY BADAŃ</b>		<b>58 -</b>
1.	Badania serologiczne.	59 - 81
2.	Badania ankietowe.	81 - 82
3.	Analiza statystyczna.	82 - 83
<b>IV. WYNIKI</b>		<b>84 - 143</b>
<b>V. DYSKUSJA</b>		<b>144 - 172</b>
<b>VI. WNIOSKI</b>		<b>173 - 174</b>
<b>PIŚMIENNICTWO</b>		<b>175 - 193</b>
<b>ZAŁĄCZNIKI</b>		<b>194 - 206</b>

## Stosowane skróty, oznaczenia, terminologia

AKI	ostre uszkodzenie nerek ( <i>ang.</i> Acute Kidney Injury)
A27	kod z klasyfikacji ICD-10 dotyczący leptospirozy
A98.5	kod z klasyfikacji ICD-10 dotyczący gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym
A549	linia komórkowa ludzkiego gruczolaka płuc ( <i>ang.</i> lung adenocarcinoma)
białko N	białko nukleokapsydu wirusa
B33.4	kod z klasyfikacji ICD-10 dotyczący hantawirusowego zespołu (sercowo) płucnego
ELISA	Test immunoenzymatyczny ( <i>ang.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
DOBV	gatunek ortohantawirusa ( <i>łac.</i> <i>Orthohantavirus dobravaense</i> )
DOBV-HFRS	gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym wywołana przez <i>Orthohantavirus dobravaense</i>
FRNT	odmiana testu zahamowania neutralizacji na liniach komórkowych, test ogniskowego zahamowania neutralizacji ( <i>ang.</i> Focus Reduction Neutralization Test)
G1/G2 Glikopeptydy	glikopeptydy G1/G2 nukleokapsydu wirusa
HCPS	hantawirusowy zespół kardio-płucny ( <i>ang.</i> Hantavirus Cardio-Pulmonary Syndrome)
HFRS	gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym ( <i>ang.</i> Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome)
HPS	hantawirusowy zespół płucny ( <i>ang.</i> Hantavirus Pulmonary Syndrome)
HTNV	gatunek ortohantawirusa ( <i>łac.</i> <i>Orthohantavirus hantanense</i> )
HVD	choroba hantawirusowa ( <i>ang.</i> Hantavirus disease)
IB	Test immunoblottingu ( <i>ang.</i> Immunoblot Assay)
ICD-10:2009	X rewizja Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych, wydanie 2019r.
ICTV	Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów ( <i>ang.</i> International Committee on Taxonomy of Viruses)

IgM, IgG, IgA	przeciwciała, immunoglobuliny klasy M, klasy G, klasy A
IIFT	test immunofluorescencji pośredniej (ang. Indirect Immunofluorescence Test)
LIA	odmiana testu immunoblottingu z odczytem liniowym (ang. Line Immunoblot Assay)
MAT	test aglutynacji mikroskopowej (ang. Microscopic Agglutination Test)
NE	nefropatia epidemiczna / nagminna (ang. Nephropathia epidemica)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)
PRNT	test zahamowania neutralizacji łysinek (ang. Plaque Reduction Neutralization Test)
PUUV	gatunek ortohantawirusa (łac. <i>Orthohantavirus puumalaense</i> )
PUUV-HFRS	gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym wywołana przez <i>Orthohantavirus puumalaense</i>
RdRp	polimeraza RNA zależna od RNA
real-time RT PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (ang. real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
RNP	rybonukleoproteina nukleokapsydu wirusa
SEOV	gatunek ortohantawirusa (łac. <i>Orthohantavirus seoulense</i> )
SIA	odmiana testu immunoblottingu z odczytem w pasmach (ang. Strip Immunoblot Assay)
SQ	sekwencjonowanie genomowe, (ang. Sequencing)
TULV	gatunek ortohantawirusa (łac. <i>Orthohantavirus tulaense</i> )
Vero E6	linia komórkowa – nabłonkowa z nerki małpy zielonej - Cercopithecus aethiops - kotawca zielonosiwego
vRNA	wirusowy RNA
Zapadalność (I)	miara częstości występowania chorób, stanowiąca iloraz nowych zachorowań, które pojawiły się w określonym przedziale czasowym w określonej populacji w stosunku do liczebności tej populacji (ang. incidence, I)

## Spis rycin

**Ryc.1.** Pacjent z krwotocznym zapaleniem spojówek, łac. hemorrhagic conjunctivitis w przebiegu HFRS.

**Ryc.2.** Obraz skazy krwotocznej plamicy piorunującej, łac. purpura fulminans w przebiegu HFRS.

**Ryc.3.** Postępujące zmiany w kanalikach nerkowych podczas ciężkiego przebiegu HFRS

**Ryc.4.** Przebieg gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym, HFRS.

**Ryc.5.** Występowanie HFRS i HPS wśród ludności na świecie.

**Ryc.6.** Rozmieszczenie geograficzne ortohantawirusów na świecie.

**Ryc.7.** Rozmieszczenie rezerwuaru zwierzęcego i przenosicieli hantawirusów na świecie.

**Ryc.8.** Rozmieszczenie antygenów na pasku testowym w immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM / IgG

**Ryc.9.** Identyfikacja swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano DOBV-HFRS. Identyfikacja swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano DOBV-HFRS.

**Ryc.10.** Identyfikacja swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano DOBV-HFRS – II część dokumentacji badania nr 03349.

**Ryc.11.** Identyfikacja swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano PUUV-HFRS.

**Ryc.12.** Identyfikacja swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano PUUV-HFRS – II część dokumentacji badania nr 04066.

**Ryc.13.** Brak obecności swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, wynik negatywny w kierunku rozpoznania HFRS.

**Ryc.14.** Brak obecności swoistych przeciwciał anti-hantawirusowych w surowicy chorego, wynik negatywny w kierunku rozpoznania HFRS – II część dokumentacji badania nr 04176.

**Ryc.15.** - Rozmieszczenie antygenów na pasku testowym w immunoblottingu recomLine Bunyavirus IgG/IgM Stripe / Line Immunoblot Assay Test, MIKROGEN

**Ryc.16.** – Pozycje antygenów hantawirusów na płytce mikroskopowej w teście immunofluorescencji pośredniej Hantavirus Mosaic IgG/IgM IIFT.

- Ryc.17.** Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano HFRS, test IIFT wykonany w laboratorium WSSE w Rzeszowie.
- Ryc.18.** Badanie zależności między wystąpieniem bólów brzucha w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.19.** Badanie zależności między długością trwania objawów grypopodobnych (w dniach) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.20.** Badanie zależności między podwyższonym poziomem kreatyniny w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.21.** Badanie zależności między ciężkością obrazu klinicznego w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.22.** Badanie zależności między ciężkim objawowo przebiegiem HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.23.** Badanie zależności między czasem pierwszego kontaktu chorego z lekarzem (w numerach dób upływających od pierwszych objawów HFRS) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.24.** Badanie zależności między długością trwania hospitalizacji (w dniach) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.
- Ryc.25.** Badania serologiczne w rozpoznaniu przypadków HFRS z okresu 2004 – 2018r. wykrytych w Polsce.
- Ryc.26.** Występowanie przypadków DOBV-HFRS, PUUV-HFRS w miesiącach kalendarzowych w latach 2004 – 2018r.
- Ryc.27.** Rozkład zachorowań HFRS w poszczególnych miesiącach w okresie od 2004r. do 2018r.
- Ryc.28.** Liczba wykrytych przypadków DOBV-HFRS i PUUV-HFRS w Polsce w poszczególnych latach w okresie od 2004r. do 2018r.
- Ryc.29.** Wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFRS o etiologii PUUV ze szczytem w VII 2014r. i o etiologii DOBV ze szczytem w X 2014r. w województwie podkarpackim.
- Ryc.30.** Zapadalność w latach 2007 – 2022 na chorobę wywołaną przez hantawirusy u ludzi w Polsce – wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFRS w roku 2014r. i w roku 2021r.
- Ryc.31.** Rozmieszczenie przypadków HFRS w okresie od 2004r. do 2018r. w gminach woj. podkarpackiego.

- Ryc.32.** Liczba chorych w gminach województwa podkarpackiego z rozpoznaniem HFRS w latach 2004 – 2018r.
- Ryc.33.** Liczba miejscowości w powiatach woj. podkarpackiego, w których zarejestrowano przypadki HFRS w latach 2004 – 2018r.
- Ryc.34.** Liczba chorych z rozpoznaniem HFRS w powiatach województwa podkarpackiego zarejestrowanych w latach 2004 -2018r.
- Ryc.35.** Badanie seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami wśród zdrowych leśników w woj. lubelskim – próbki pobrane w 2006r.
- Ryc.36.** Badanie seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami wśród zdrowych rezydentów DPS-ów oraz leśników w woj. podkarpackim – próbki pobrane w 2004 - 2006r.
- Ryc.37.** Występowanie DOBV-HFRS i PUUV-HFRS rozpoznanych w Polsce.
- Ryc.38.** Zapadalność na zakażenie ortohantawirusami i na HFRS w grupach narażenia w Polsce.
- Ryc.39.** Występowanie hantawirusów w rezerwarze zwierzęcym i gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u ludzi w Polsce.
- Ryc.40.** Ropienka pow. bieszczadzki woj. podkarpackie – przykład narażenia środowiskowego
- Ryc.41.** Gmina Komańcza pow. sanocki, woj. podkarpackie – teren hiperendemicznego występowania ortohantawirusów.
- Ryc.42.** Ślezański Park Krajobrazowy – woj. dolnośląskie miejsce izolacji od myszarki polnej DOBV genotyp Kurkino.
- Ryc.43.** Stawy Milickie – woj. dolnośląskie miejsce izolacji od myszarki polnej DOBV genotyp Kurkino.
- Ryc.44.** Rejon Puumala w Finlandii – miejsce izolacji Puumala ortohantawirusa, jedyne go patogennego hantawirusa w Finlandii.
- Ryc.45.** Rozmieszczenie raportowanych zakażeń hantawirusowych w Europie, w 2018r.

## Spis tabel

**Tab.1.** Kryteria odczytu pasków w immunoblottingu wg intensywności uzyskanego sygnału (prążków) w metodzie wizualnej i automatycznej - I.

**Tab.2.** Kryteria odczytu pasków w immunoblottingu wg intensywności uzyskanego sygnału (prążków) w metodzie wizualnej – II.

**Tab.3.** Zestawienie grup badawczych i liczby wykonanych badań serologicznych u osób z objawami HFRS i u osób zdrowych badanych w identyfikacji seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami.

**Tab.4.** Badanie cech klinicznych w przebiegu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u osób hospitalizowanych - zestawienie ogólne.

**Tab.5.** Badanie zależności pomiędzy czynnikami DOBV, PUUV a występującymi cechami klinicznymi w przebiegu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u osób hospitalizowanych - zestawienie poziomu istotności statystycznej.

**Tab.6.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem bólów brzucha.

**Tab.7.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem zaburzeń układu pokarmowego.

**Tab.8.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem nudności.

**Tab.9.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem wymiotów.

**Tab.10.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem biegunki.

**Tab.11.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem kaszlu.

**Tab. 12.** Wystąpienie objawów klinicznych poza zespołem nerkowym – zaburzenia oddechowe w przebiegu HFRS.

**Tab.13.** Wystąpienie objawów skazy krwotocznej w przebiegu HFRS.

**Tab.14.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem krwinkomoczu.

**Tab.15.** Konsekwencje zespołu przecieku naczyń włosowatych – nieprawidłowości w USG / RTG.

**Tab.16.** Konsekwencje przecieku naczyń włosowatych – zwiększenie ilości płynu w jamach ciała.

**Tab.17.** Wystąpienie objawów klinicznych poza syndromem nerkowym – zaburzenia neurologiczne i zaburzenia widzenia w przebiegu HFRS.

**Tab. 18.** Wystąpienie objawów klinicznych poza syndromem nerkowym – zaburzenia czynności wątroby w przebiegu HFRS.

**Tab.19.** Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – białkomocz w przebiegu HFRS.

**Tab.20.** Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – ostre uszkodzenie nerek, podwyższenie poziomu kreatyniny.

**Tab.21.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem skąpomoczu.

**Tab.22.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem wielomoczu.

**Tab.23.** Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a wprowadzeniem leczenia nerkozastępczego - hemodializ.

**Tab.24.** Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – ostre uszkodzenie nerek – leczenie nerkozastępcze.

**Tab.25.** Zakończenie zachorowania – podsumowanie liczby przypadków HFRS.

**Tab.26.** Badanie zależności między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem ciężkiego przebiegu HFRS.

**Tab.27.** Badanie zależności między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem łagodnego / umiarkowanego (średniego) oraz ciężkiego przebiegu HFRS.

**Tab.28.** Liczebność pacjentów hospitalizowanych z powodu HFRS - wg płci, wieku i miejsca zamieszkania.

**Tab.29.** Badanie zależności pomiędzy DOBV-HFRS, PUUV-HFRS a narażeniem pobytowym i zawodowym osób hospitalizowanych - zestawienie poziomu istotności statystycznej.

**Tab.30.** Choroba hantawirusowa (A. 98.5) w Polsce – zestawienie zapadalności.

**Tab.31.** Rejestracja choroby wywołanej przez hantawirusy (ICD-10 A98.5) w Polsce.

## **Spis załączników**

**Załącznik 1.** Diagnostyka zakażeń hantawirusowych – wykaz metod laboratoryjnego rozpoznawania czynnika etiologicznego zakażeń hantawirusowych i potwierdzania jego udziału w zachorowaniach i zakażeniach u ludzi.

**Załącznik 2.** Schemat wyszukiwania przypadków HFRS / NE – dla lekarzy klinicznych i rodzinnych.

**Załącznik 3.** Badanie ankietowe przypadków zakażeń hantawirusowych (HVD Hantavirus disease).

**Załącznik 4.** Zakażenia hantawirusowe – notatka epidemiologiczna przypadku.

## **Słowa kluczowe**

gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS), nefropatia epidemiczna (NE), choroba hantawirusowa, zoonoza, zakażenia przenoszone przez gryzonie, *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV), *Orthohantavirus dobravaense* (DOBV), ostre uszkodzenie nerek (AKI)

## **Key words**

haemorrhagic fever with renal syndrome, nephropathia epidemica, hantavirus disease (HVD), zoonosis, rodent-borne disease, *Orthohantavirus puumalaense* (PUUV), *Orthohantavirus dobravaense* (DOBV), acute kidney injury (AKI)

## STRESZCZENIE

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie: czy w Polsce występuje hantawirusowa gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS) u ludzi? Badania HFRS rozpoczęto w roku 2004 po zdiagnozowaniu pierwszego (indeksowego), potwierdzonego przypadku u kobiety w woj. podkarpackim. Przedstawiono okres 15 lat badań potwierdzających endemiczne, utrwalone i rodzime występowanie zakażeń hantawirusowych w Polsce. Badania te pozwoliły na wdrożenie w kraju od 2007 roku identyfikowanie choroby w bieżącej, rutynowej diagnostyce wirusologicznej oraz ustawy o obowiązkach jej zgłaszania i rejestracji. Ponadto w przeprowadzonych badaniach retrospektywnych, stwierdzono występowanie zakażeń hantawirusowych ludzi w latach wcześniejszych. W pracy wdrożono sposób podwójnej weryfikacji wyników serologicznych, jako metody określającej etiologię HFRS. Wprowadzono uzupełnienie wywiadów lekarskich u chorych o badanie ankietowe własnego pomysłu. Pozwoliło ono na wykrycie szeregu parametrów epidemiologicznych HFRS (w tym narażenia środowiskowego), rozpropagując zarazem informację o gorączce krwotocznej z zespołem nerkowym, jedynej rodzimej gorączce krwotocznej występującej w Polsce. W latach 2004 – 2018 przeprowadzono ogółem 1370 badań diagnostycznych u 721 osób, których objawy chorobowe sugerowały możliwość zachorowania. Rozpoznano 164 przypadki HFRS (22,7% badanych). Serologicznie, etiologię hantawirusów wykazano w 93 przypadkach PUUV-HFRS (59%) i 71 przypadkach DOBV-HFRS (41%). Wśród chorych hospitalizowanych, w grupie DOBV-HFRS było 43% chorych z ciężkim przebiegiem choroby, 52% z przebiegiem umiarkowanym, 5% z łagodnym a wśród chorych w grupie PUUV-HFRS było 4% chorych z ciężkim przebiegiem choroby, 66% z przebiegiem umiarkowanym i 30% z łagodnym. 2,3% wszystkich przypadków HFRS zakończyło się zgonem i byli to chorzy, u których zdiagnozowano DOBV-HFRS. Wdrożenie leczenia nerkozastępczego było konieczne w 2,5% przypadkach PUUV-HFRS i aż u 31% chorych z DOBV-HFRS. W obrazie klinicznym, HFRS w Polsce była chorobą gorączkową, z ostrą małopłytkowością i skazą krwotoczną, z ostrym uszkodzeniem nerek i powikłaniami wielonarządowymi. Etiologia DOBV podwyższała ciężkość przebiegu HFRS 18-krotnie (OR=18,05 (CI 5,05-64,57)).

Stwierdzono 2 przypadki koinfekcji z *Leptospira interrogans*, skutkujące cięższym przebiegiem PUUV-HFRS.

Częstość identyfikacji HFRS wywołanego przez DOBV u ludności w Polsce jest wyższa niż rejestrowana w Europie Północnej i Zachodniej (tam ok. 3% stanowi DOBV-HFRS). Wśród grup zawodowych narażonych na zakażenia hantawirusowe stwierdzono serokonwersję przeciwciał anti-hantawirusowych na poziomie 3,18% w grupie leśników na Lubelszczyźnie (wykryto przeciwciała IgG anti-DOBV i IgG anti-PUUV) i 2,4% w woj. podkarpackim (obecne przeciwciała IgG anti-PUUV). Epidemiczny wzrost zachorowań na HFRS wystąpił u ludzi w Polsce w latach 2007, 2014 i 2021 (z przedziałami 7 – letnimi).

HFRS zdiagnozowano w 8 województwach Polski: Wschodniej, Południowo-Wschodniej, Południowej i Centralnej. Obszarem endemicznym, z najwyższą zapadalnością na HFRS w Polsce, jest województwo podkarpackie, zaś terenem hiperendemii jest powiat sanocki i gmina Komańcza tegoż województwa. Średnia zapadalność w Polsce na HFRS w latach 2007 – 2018 była na poziomie 0,021 zachorowań na 100 000 mieszkańców ( od 0,008 do 0,140 / 100 000), w woj. podkarpackim zapadalność na HFRS była 16-krotnie większa. W powiecie sanockim tego województwa zachorowalność była bardzo wysoka, osiągając 30,26 przypadków na 100 tysięcy mieszkańców. W Polsce HFRS jest chorobą skrajnie „niedoszacowaną”, konieczna jest zdecydowana poprawa wykrywania jej przypadków zwłaszcza u osób narażonych środowiskowo i zawodowo na kontakt z tą groźną zoonozą. Osiągnąć to można poprzez wprowadzenie czynnego nadzoru epidemiologicznego (lub nawet typu „sentinel”), rozszerzenie diagnostyki laboratoryjnej i stałe działania edukacyjne, zarówno wśród ludności z grup ryzyka, jak i personelu systemu ochrony zdrowia.

## ABSTRACT

The aim of the study was an attempt to answer the question: Does hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) occur in humans in Poland? The HFRS research began in 2004 when the first index confirmed case (a woman from the Province of Subcarpathian) was diagnosed. Study presents data from 15-years research confirming the endemic, established and indigenous occurrence of hantavirus infections in Poland. Since 2007, these studies have allowed the implementation of identifying the disease in the country, with the current, routine virological diagnostics and the statutory obligation of report and register. In addition, retrospective studies showed that human hantavirus infections were also found in earlier years. The study implemented a method of double verification of serological results as a method for determining the etiology of HFRS. Medical interviews with patients were supplemented with a self-designed survey. These methods allowed it to detect a number of epidemiological parameters of HFRS (including environmental exposure), at the same time disseminating information about hemorrhagic fever with renal syndrome, the only native hemorrhagic fever occurring in Poland. In the years 2004 - 2018, a total of 1,370 diagnostic tests were carried out in 721 people whose symptoms suggested the possibility of contracting the disease. 164 cases of HFRS were diagnosed (22.7% of the patients). Serologically, hantavirus etiology was demonstrated in 93 cases of PUUV-HFRS (59%) and 71 cases of DOBV-HFRS (41%). Among hospitalised patients, 43% of patients in the DOBV-HFRS group had severe disease, 52% had moderate disease, 5% had mild disease, and among patients in the PUUV-HFRS group, 4% had severe disease, 66% had moderate disease and 30% with mild. 2.3% of all HFRS cases were fatal and these were patients diagnosed with DOBV-HFRS. Implementation of renal replacement therapy was necessary in 2.5% of PUUV-HFRS cases and up to 31% of DOBV-HFRS patients. In the clinical presentation, HFRS in Poland was a febrile disease, with acute thrombocytopenia and hemorrhagic diathesis, with acute kidney injury and multi-organ complications. DOBV etiology increased the severity of HFRS 18-fold (OR=18.05 (CI 5.05-64.57)). Two cases of co-infection with *Leptospira interrogans* have been reported, resulting in a more severe course of PUUV-HFRS. The frequency of identification of HFRS caused by DOBV in the population in Poland is higher than that recorded in Northern and Western Europe (there are approx. 3% as DOBV-HFRS). Among occupational groups exposed to hantavirus infections, seroconversion of anti-

hantavirus antibodies was found at the level of 3.18% at foresters in the Lublin Region (IgG anti-DOBV and IgG anti-PUUV antibodies were detected) and 2.4% at foresters in the Province of Subcarpathian (IgG anti-PUUV antibodies were present). An epidemic increase in the incidence of HFRS in humans had occurred in Poland in 2007, 2014 and 2021 (with 7-year intervals).

HFRS was diagnosed in 8 voivodeships of Poland: Eastern, South-Eastern, Southern and Central. The endemic area with the highest incidence of HFRS in Poland is the Province of Subcarpathian and the area of hyperendemia in the Sanok powiat and the Komańcza commune of the same region. The average incidence of HFRS in Poland in 2007-2018 was 0.021 cases per 100,000 inhabitants (from 0.008 to 0.140 / 100,000), in the Province of Subcarpathian - the incidence of HFRS was 16 times higher. In the Sanok powiat of this province, the incidence was very high, reaching 30.26 cases per 100,000 inhabitants. In Poland, HFRS is an extremely "underestimated" disease and it is necessary to significantly improve detection of its cases, especially among people who are environmentally and professionally exposed to this dangerous zoonosis. This can be achieved through the introduction of active epidemiological or sentinel surveillance, the expansion of laboratory diagnostics and continuous educational activities, both among the population at risk and health care personnel.

## I. WSTĘP

Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym; ang. haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) jest odzwierzcącą chorobą wywołaną przez RNA ortohantawirusy. Człowiek zakaża się od drobnych ssaków, gryzoni głównie drogą aerogenną wdychając cząstki wirusów niesionych na drobinach aerozolu. HFRS występuje wśród ludności w Europie i Azji, jest jedną z postaci infekcji hantawirusowych, ang. hantavirus disease (HVD) w przebiegu, której objawy niewydolności nerek są głównym zespołem klinicznym zachorowania, w przeciwieństwie do zakażeń hantawirusowych występujących w Ameryce Północnej i Południowej, gdzie głównym zespołem objawów jest niewydolność płuc w hantawirusowym zespole płucnym (HPS) [Noh 2019 <sup>134</sup>], [Krautkrämer 2013 <sup>96</sup>], [Jonsson 2008 <sup>74</sup>], [Johnson 2001 <sup>72</sup>]. Choroba występuje w całej Eurazji („od Pacyfiku do Atlantyku”), a więc i w całej Europie. Polska była jednym z ostatnich krajów kontynentu, w którym – mimo wieloletnich poszukiwań [Panasiak 1989 <sup>141</sup>], [Szenborn 2006 <sup>166</sup>], [Bauman 2007 <sup>9</sup>], [Sadkowska-Todys 2007 <sup>157</sup>], nie wykryto przypadków tej choroby u ludzi, ani obecności aktywnego zakażenia hantawirusami u ludzi. Wykrycie przez nasz zespół w roku 2004 na Podkarpaciu, indeksowego – pierwszego w Polsce - przypadku u człowieka [Knap, Trybusz 2006 <sup>90</sup>], [Knap 2006 <sup>84</sup>], stało się przyczyną podjęcia niniejszej pracy.

### 1. CZYNNIK ETIOLOGICZNY CHOROBY

#### 1.1. Hantawirusy – przynależność taksonomiczna, zasady prawidłowej nomenklatury.

Wirusy chorobotwórcze dla człowieka, odpowiedzialne za chorobę hantawirusową we wszystkich jej postaciach (ang. hantavirus disease), należą do rodzaju *Orthohantavirus*. Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV) w 9-tym Raporcie z 2011r. i w aktualizacji z 2020r. przedstawił 38 gatunków RNA-wirusów z rodzaju *Orthohantavirus* ( ), spośród których 28 gatunków obecnie uznaje się za przyczynę infekcji hantawirusowych u ludzi [Avšič-Županc 2019 <sup>8</sup>]. Od 2016r. w nowo utworzonym rzędzie *Bunyavirales* i rodzinie *Hantaviridae*, znalazły się w sumie 4 podrodziny, 7 rodzajów i 53 gatunki hantawirusów, International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 2011 [<sup>97</sup>], [<https://talk.ictvonline.org/ictv->

reports/ictv\_9th\_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna\_viruses/205/bunyaviridae 2011 <sup>57</sup>], [Abudurexiti 2019 <sup>1</sup>], [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> <sup>58</sup>], [Laenen 2019 <sup>98</sup>]. Nazwy taksonomiczne poszczególnych gatunków hantawirusów zapisywane są typowo drukiem pochyłym, od marca / publikacja kwiecień 2023r. zmieniło się nazewnictwo ortohantawirusów, wszystkie gatunki mają odniesienie do rodzaju tj. *Orthohantavirus* i następnie mają nazwy wyrażające poszczególne gatunki, nowością jest obecność w nazwie gatunkowej końcówki - *ense* np. dawniej *Puumala orthohantavirus* teraz jest zapisany w nowej nomenklaturze jako *Orthohantavirus puumalaense*. Nadal powszechnie używa się nazewnictwa skróconego do pierwszego członu nazwy gatunkowej wirusa, zapisywanego z dużej litery i bez pochylenia [Piekarowicz 2004 <sup>145</sup>], np. Puumala virus, Puumala wirus lub akronimu zapisywanego dużymi literami np. PUUV [Abudurexiti 2019 <sup>1</sup>]. Podobnie używa się też dawnej nazwy hantawirus, ang. hantavirus w opisie choroby hantawirusowej. W stosowanej nomenklaturze pojawiają się także nazwy hantawirusów odnoszące się do ich podziału na dwie zasadnicze grupy wynikające z lokalizacji geograficznej zwierzęcych rezerwuarów, tj.: hantawirusy Starego Świata występujące wśród zwierząt w Azji, Europie oraz hantawirusy Nowego Świata występujące wśród zwierząt w Ameryce Północnej i Południowej [Cross 2014 <sup>23</sup>]. W pracach badawczych pojawiają się też nazwy hantawirusów, pochodzące od miejsc geograficznych pierwszych izolacji lub identyfikacji wirusów np. Saaremaa virus (SAAV) to ortohantavirus, który nie uzyskał statusu odrębnego gatunku i został zakwalifikowany do gatunku *Orthohantavirus dobravaense* dawniej *Dobrava-Belgrade orthohantavirus* (DOBV genotyp Saaremaa) a zapisywany jako SAAV przywołuje miejsca pierwszej izolacji na terenie Estonii w okolicach miejscowości Saaremaa i obecnie jego nazwa wskazuje tylko na odrębność genotypu DOBV i zwierzęcego gospodarza - myszarki polnej *Apodemus agrarius* a nie jak to jest w przypadku prototypowego wirusa DOBV (DOBV genotyp Dobrava) - myszarki leśnej *Apodemus flavicollis*. Przytoczony przykład powiązań pomiędzy wirusem a jego zwierzęcym gospodarzem w przypadku hantawirusów odzwierciedla szczególne trudności w uznawaniu, czy wyodrębnianiu nowych jednostek taksonomicznych [ICTV Taxonomy history: Orthohantavirus <sup>58</sup>]. Kolejny problem taksonomiczny wynika z tego, że wiele opisywanych hantawirusów nie ma scharakteryzowanych kompletnych sekwencji swoich genomów (co jest podstawą do wyodrębniania gatunków), dlatego lista gatunków ulega weryfikacji [Laenen 2019 <sup>98</sup>]. Oto np. w 2020r. dodano 2 nowe gatunki ortohantawirusów *Orthohantavirus*

*robinaense*, dawn. Robina virus (ROBV) wyizolowany od ryjówki australijskiej oraz *Orthohantavirus tatenaleense*, dawn. Tatenale virus (TATV) wyizolowany od nornika schwytanego w Wlk. Brytanii [Kuhn 2020 <sup>97</sup>]. Wykaz członków rodziny *Hantaviridae* wraz z nazwami wirusów reprezentujących dany gatunek podaje [<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/12314> <sup>56</sup>].

## **1.2. Historia identyfikacji hantawirusów.**

Koniec lat 70-tych XX wieku był czasem pionierskiego wykrywania i potwierdzania technikami diagnostyki laboratoryjnej czynników wirusowych odpowiadających za występowanie wcześniej opisywanej choroby u ludzi, nazwanej później gorączką krwotoczną z zespołem nerkowym (HFRS). Lata 80-te to czas, w którym nastąpił największy okres przekazywania informacji przez badaczy na temat wirusów i wywoływanej przez nich jednostki chorobowej. Pierwsze opisy ostrej choroby gorączkowej z powikłaniem narządowym można jednak znaleźć już w zapisach sporządzonych przez chińskich lekarzy w X wieku n.e. [Brown 1916 <sup>14</sup>]. W dokumentacji szpitalnej we Władywostoku z 1913r. odnajduje się także opis choroby występującej na dalekim wschodzie Rosji [Casals 1970 <sup>17</sup>], której przypadki wielokrotnie opisywali na tamtych terenach autorzy rosyjscy w latach 1935-1938 (Pokrowskij i Roszczupkin, 1983r.). Jednak dopiero konflikty wojenne: starcia rosyjsko-japońskie nad rzeką Chałchyn-Goł (1939), a następnie – II Wojna Światowa (1939 – 1945r.) na Dalekim Wschodzie, które przyniosły zachorowania ponad 10 000 japońskich i kilkuset rosyjskich żołnierzy, zwróciły uwagę na epidemiczną chorobę gorączkową z uszkodzeniem nerek o nieznanym przyczynie [Czuriłow 1941 <sup>24</sup>], [Noh 2019 <sup>134</sup>]. Kolejna, wielka epidemia nieznanego gorączki krwotocznej wśród żołnierzy i osób cywilnych obu walczących stron w czasie Wojny Koreańskiej (1950 - 1953r.), przebiegającej z wysoką śmiertelnością spowodowały wielokierunkowe, w tym środowiskowe, badania amerykańskie, rosyjskie i południowokoreańskie. Poszukiwano głównie nieznanego czynnika etiologicznego, opracowano jej epidemiologię, patogenezę i postępowanie kliniczne [Oliver 1957 <sup>138</sup>], [Smadel 1957 <sup>161</sup>]. Chorobę tę nazwano roboczo „koreańską gorączką krwotoczną” lub wiązano eponimicznie z nazwą rzeki Hantan – w środkowej Korei. Już w 1943r., mimo braku identyfikacji czynnika etiologicznego, uznano że u ludzi jest to choroba odzwierzęca i po przeanalizowaniu przypadków zachorowań wskazano myszarkę polną *Apodemus agrarius* za zwierzę, które można było połączyć z wystąpieniem choroby u ludzi.

Koniec wojny koreańskiej, zakończony niestabilnym rozejmem i podziałem Korei na wrogie państwa spowodował, że żołnierze stacjonujący wzdłuż strefy demarkacyjnej na 38 równoleżniku pomiędzy Koreą Północną i Południową przebywali w obszarze endemicznych zakażeń, gdzie wybuchały ogniska zachorowań. W związku z tą sytuacją, w 1952 r. w Seulu założono amerykański ośrodek badawczy gorączek krwotocznych [Lee HW 1999 <sup>102</sup>]. W latach 60-tych kolejne ogniska zachorowań na gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym opisywali badacze rosyjscy i chorwaccy, ci ostatni dokładnie opisywali jednostkę chorobową i badali gryzonie, które potencjalnie były podejrzane o rezerwuar czynnika, wskazywali u gryzoni nerki jako narządy zmienione, przy bezobjawowości zakażenia [Vesenjak-Hirjan 1971 <sup>171</sup>]. W 70-latach, przy ciągle prowadzonych badaniach ludzi, odławianiu zwierząt, udało się badaczom przedstawić dowody potwierdzające istnienie powiązania pomiędzy wykrytym czynnikiem a diagnozowaną chorobą. W 1976 r. potwierdzono zwierzęce źródło zakażenia oraz sposób przeniesienia zakażenia na człowieka, udowodniono, że antygen z tkanek *Apodemus agrarius* odłowionych na terenach występowania zachorowań ludzi reaguje swoiście z ludzkimi surowicami rekonwalescentów koreańskiej gorączki krwotocznej. W kolejnym doświadczeniu, po podaniu myszarce surowicy osób, u których rozpoznano ostrą fazę zachorowania, stwierdzono w tkance płucnej zwierzęcia ten sam typ antygeny, wykrywanego w reakcji immunofluorescencyjnej, jaki był już znany z poprzednich badań z surowicami rekonwalescentów [Lee HW 1978 <sup>106</sup>]. Następnie w 1978r. udało się wykryć w ludzkich zakażonych komórkach antygen koreańskiej gorączki krwotocznej, który reagował ze znakowanymi przeciwciałami w testach immunofluorescencji bezpośredniej i pośredniej. W tym samym roku udało się też doprowadzić do wielokrotnych pasażu czynnika na linii komórkowej A549 (linia komórkowa ludzkiego gruczolaka płuca; ang. lung adenocarcinoma) [French 1981 <sup>34</sup>]. Przeprowadzone prace pozostawały w pełnej zgodzie z postulatami Roberta Kocha, wyznaczającymi standard dowodu dla potwierdzenia chorobotwórczości czynnika biologicznego w zakażeniach ludzkich [Fredricks 1996 <sup>33</sup>] i stały się podstawą uznania odzwierzęcej etiologii HFRS u ludzi [Noh 2019 <sup>134</sup>]. W Polsce, jak wspomniano, pierwszy przypadek choroby, potwierdzony etiologicznie, wykryto dopiero w roku 2004. Jednak w roku 1970, rosyjski lekarz wojskowy stacjonujący w naszym kraju, Walery Mielnikow, opisał w polskim piśmiennictwie przypadek „*nephroso-nephritis hemorrhagica*” u mężczyzny pracującego w zaszczurzonej pralni. Mimo iż był to

okres sprzed izolacji hantawirusa (1976 r.), surowica chorego reagowała z nieswoistym układem antygen-przeciwciała, stosowanym wówczas doświadczalnie w Związku Sowieckim przy pracach nad HFRS. Jeszcze wcześniej, wielki klinicysta polski, Anastazy Landau (1876-1957), opisuje zakończony zgonem przypadek o nieznannej etiologii, mogący obrazem odpowiadać HFRS [Landau 1928 <sup>99</sup>].

### **1.3. Budowa strukturalna wirionu hantawirusów.**

Wirion ortohantawirusów jest strukturą pleomorficzną, najczęściej sferyczną, identyfikowaną wśród hantawirusów Starego i Nowego Świata oraz tubularną lub nieregularną stwierdzaną wśród hantawirusów Nowego Świata [Parvate 2019 <sup>143</sup>], wielkości od 80 do 120nm, posiada dwuwarstwową lipidową osłonkę o grubości ok. 5 nm, której struktura pochodzi z komórki gospodarza [Muyangwa 2015 <sup>132</sup>]. W osłonce lokowane są powierzchniowe glikoproteiny Gn i Gc, które dodatkowo wystają poza jej powierzchnię na ok. 12 nm na zewnątrz wirionu, glikoproteiny pełnią rolę białek receptorowych [Cifuentes-Muñoz 2014 <sup>21</sup>]. W każdym wirionie znajdują się trzy pojedyncze rybonukleokapsydy złożone z: rybonukleoproteiny (RNP) będącej kompleksem wirusowego RNA i nukleoproteiny N oraz związanej z tymi kompleksami polimerazy RNA zależnej od RNA (RdRp) [Cifuentes-Muñoz 2014 <sup>21</sup>]. Wirion nie zawiera białek macierzy, funkcję tę pełni białko N, które umożliwia interakcje między rybonukleoproteinami (RNP), glikoproteinami (Gn i Gc) i lipidową osłonką. [Jonsson 2010 <sup>73</sup>]. Sekwencje nukleotydów na końcach 5' i 3' każdego segmentu genomu są częściowo komplementarne i podlegają parowaniu zasad azotowych, tworząc struktury panhandle charakterystyczne dla poszczególnych gatunków. Ortohantawirusy wykazują pewną różnorodność np. wiriony PUUV, TULV zawierają białko niestrukturalne (NS) [Jääskeläinen 2007 <sup>68</sup>].

### **1.4. Organizacja genomu – cykl replikacyjny i morfogeneza hantawirusów.**

Genom ortohantawirusów to trzy jednoniciowe segmenty RNA o ujemnej polarności (ss(-) RNA), tworzące trzy odrębne części – segment mały (S), wielkości ok. 1800 nukleotydów koduje białko N nukleokapsydu; segment średni (M), wielkości ok. 3700 nukleotydów kodujący poliproteinowy prekursor, który rozszczepia się na dwie glikoproteiny Gn i Gc [Piekarowicz 2004 <sup>145</sup>], segment duży (L), wielkości ok. 6 500 nukleotydów koduje RNA zależną RNA polimerazę (RdRp) i wirusowy RNA [Plyusnin 1994 <sup>149</sup>]. W przypadku PUUV i TULV segment S koduje także

niestrukuralne białko NS [Jääskeläinen 2007 <sup>68</sup>], [Muyangwa 2015 <sup>132</sup>]. Cykl replikacyjny hantawirusów to proces tworzenia nowych struktur wirionu oraz wirusowego genomu, który prowadzi do powstania kompletnej aktywnej cząstki wirusa. Rozpoczyna się wejściem wirusa do komórki gospodarza, główną rolę odgrywają tu glikoproteiny otoczki wirusa Gn i Gc, sama fuzja wirusa z błoną komórkową jest realizowana z rolą glikoproteiny Gc. Glikoproteiny wirusowe wchodzi w interakcję z glikoproteinowymi receptorami transbłonowymi komórek gospodarza zwanymi integrynami, które oprócz funkcji receptorów uczestniczą w przyleganiu i tworzeniu połączeń komórek z macierzą pozakomórkową. [Cifuentes-Muñoz 2014 <sup>21</sup>], [Ermonval 2016 <sup>30</sup>]. Wirion dostaje się do wnętrza komórki na drodze endocytozy. W obszarach błony komórkowej, w których znajdują się dolki opłaszczone białkiem klatryną, po przyłączeniu wirionów tworzą się pęcherzyki endosomalne, które wnikają do cytoplazmy gospodarza, tam tracą osłonkę i dochodzi do uwolnienia trzech białek RNP do cytoplazmy komórki gospodarza [Mittler 2019 <sup>129</sup>], [Jonsson 2010 <sup>73</sup>]. Strategia replikacji u ortohantawirusów jest złożona, podobnie jak u innych wirusów RNA o ujemnej polarności [Piekarowicz 2004 <sup>145</sup>]. Wirusowa transkryptaza (polimeraza) RNA inicjuje proces transkrypcji każdego segmentu RNA i doprowadza do utworzenia komplementarnych nici o dodatniej polarności, które następnie w procesie translacji pełnią funkcję trzech odrębnych mRNA, wykorzystywanych jako matryce do syntezy wirusowych białek nukleokapsydu, glikoprotein, polimerazy RNA, białek niestrukuralnych (u niektórych hantawirusów). Polimeraza RNA kieruje także procesem tworzenia kopii nici RNA, odbywa się to poprzez utworzenie form pośrednich dwuniciowych, z których w następnej kolejności transkrybowane są potomne genomowe nici RNA o ujemnej polarności. Proces transkrypcji przebiega w cytoplazmie [Meier 2021 <sup>121</sup>], natomiast translacja odbywa się w rybosomach gospodarza. Proces morfogenezy, składania potomnych wirionów odbywa się w kompleksach Golgiego, jest kierowany przez glikoproteinę Gc i stabilizowany przez glikoproteinę Gn [Sperber 2019 <sup>164</sup>]. Nowo zsyntezowane vRNA otoczone białkiem N, transportowane są do systemu błon komórkowych i tak hantawirusy Starego Świata gromadzą się na błonach aparatu Golgiego a wirusy Nowego Świata na błonie komórkowej [Muyangwa 2015 <sup>132</sup>]. Osłonka lipidowa odgrywa szczególną rolę, umożliwia przejście wirusów przez błonę komórkową i tym samym infekowanie innych komórek, proces opuszczania komórki gospodarza nazywa się pączkowaniem i w przypadku hantawirusów jest procesem niecytolitycznym, nie

dochodzi do śmierci komórki. Nowe wiriony są uwalniane na drodze egzocytozy. [Welsch 2007 <sup>175</sup>].

### **1.5. Różnorodność hantawirusów. Genetyczne zróżnicowanie. Filogeneza molekularna.**

9-ty Raport ICTV podaje, że rozróżnienie gatunków ortohantawirusów przeprowadza się w oparciu o analizę sekwencji aminokwasów kodowanych przez matrycowy RNA segmentów S i M. Białko nukleokapsydu oraz białko prekursora dwóch glikoprotein musi wykazywać >7% różnic aminokwasów w stosunku do sekwencji już określonych i zatwierdzonych jako gatunki (informacja o każdym gatunku jest zdeponowana w GenBanku [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>]). Dodatkowo nowy gatunek musi wykazywać co najmniej 4-krotną różnicę w teście neutralizacji (złoty standard w analizie serologicznej, PRNT plaque reduction neutralization test) oraz powinien pochodzić z unikalnej niszy ekologicznej / gatunku zwierzęcia rezerwurowego i w sposób naturalny nie powinien tworzyć reasortantów z innymi gatunkami [Laenen 2019 <sup>98</sup>], [<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> <sup>58</sup>], [Maes 2009 <sup>115</sup>]. Wyznaczone warunki przynależności gatunkowej określają ograniczoną ilość gatunków i porządkują wiedzę o krążących wirusach w ich naturalnych siedliskach. Do genetycznego zróżnicowania hantawirusów dochodzi w wyniku zmienności mutacyjnej i rearanzacji materiału genetycznego wirusów. Mechanizmy te w ewolucji hantawirusów odegrały ważną rolę w tworzeniu gatunków, wariantów genetycznych, genotypów. Mutacje pojawiają się w genomie jako zmiany punktowe dotyczące pojedynczej zasady nukleotydowej lub pary zasad nukleotydowych, jako zmiany delecyjne dotyczą wypadnięcia pojedynczej lub większej liczby zasad a insercyjne dotyczą wstawienia pojedynczej lub większej liczby zasad. Rearanzacja materiału genetycznego zachodzi podczas jednoczesnej replikacji dwóch hantawirusów w tej samej komórce gospodarza. W zależności od rodzaju mechanizmu zmian, powstają genomy potomne w wyniku reasortacji (wymieszania) lub rekombinacji (wymiany) materiału genetycznego pochodzącego od wirusów rodzicielskich. Rekombinacja u RNA wirusów z segmentowanym genomem nie jest znaczącym mechanizmem zmienności genetycznej, reasortacja polegająca na aranzacji potomnego genomu z kombinacji trzech segmentów pochodzących od jednego i drugiego wirusa, ma większy wpływ na ewolucję hantawirusów. [Sibold 1999 <sup>159</sup>]. Przykładem naturalnie występujących reasortantów są hantawirusy przenoszone przez gryzonie z

graniczących obszarów występowania nosicieli tych wirusów [Sibold 1999 <sup>159</sup>]. [Razzauti 2008 <sup>152</sup>], [Muyangwa 2015 <sup>132</sup>]. Dryf genetyczny kształtujący różnorodność *Orthohantavirus tulaense* został opisany już przy okazji identyfikacji tego hantawirusa w 1994r. Izolacje TULV od różnych osobników *Microtus arvalis*, *Microtus rossiaemeridionalis* (blisko spokrewnionych) wskazują na różnice w genomach wirusa utrwalone przez nagromadzenie się delecji, insercji i substytucji nukleotydów, co w konsekwencji w tym przypadku tworzy zjawisko powstawania „quasi gatunków” [Plyusnin 1994 <sup>149</sup>]. Przykładem niewielkiego zróżnicowania genetycznego jest *Orthohantavirus seoulense*, pomimo że SEOV jest rozpowszechniony razem ze swoim gospodarzem szczurem wędrownym (*Rattus norvegicus*), szczurem śniadym (*Rattus rattus*) na całym świecie, wykazuje w różnych lokalizacjach bliskie spokrewnienie [Lin 2012 <sup>110</sup>]. Zróżnicowanie genetyczne ortohantawirusów jest możliwe dzięki migracji naturalnych gospodarzy i zmianę miejsca ich bytowania, ponieważ zwierzęta te dostosowują się do nowych warunków środowiskowych a genomy hantawirusów ulegają w wysokim stopniu zróżnicowaniu ewolucyjnemu. Najbardziej widoczne jest to w przypadku *Orthohantavirus puumalaense*, w segmentach genomu PUUV stwierdza się wiele dowodów na punktowe mutacje i reasortacje [Razzauti 2009 <sup>153</sup>]. Rodzaj *Orthohantavirus* charakteryzuje się wysokim poziomem różnorodności genetycznej wyrażonym w wyodrębnionych liniach genetycznych i tak identyfikuje się 9 linii HTNV, 6 linii SEOV, 8 linii PUUV, 2 linie DOBV z różnicami w sekwencjach nukleotydów sięgającym nawet do 15% [Kabwe 2020 <sup>76</sup>].

## **2. GORĄCZKA KRWOTOCZNA Z ZESPOŁEM NERKOWYM – OPIS CHOROBY**

HFRS to wieloukładowa choroba wywołana przez ortohantawirusy [Noh 2019 <sup>134</sup>].

### **2.1. Ciężkość przebiegu klinicznego HFRS.**

Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym opisywana jest w czterech obrazach objawów (stopniach ciężkości) – subklinicznym, łagodnym, umiarkowanym i ciężkim, jest to związane częściowo z samym gatunkiem ortohantawirusa powodującego zakażenie oraz z zaawansowaniem występowania objawów chorobowych i częstotliwości zgonów wynikających z zachorowania:

- **subkliniczny** – utajony, bez charakterystycznych objawów choroby, bez notowanych zgonów wśród zakażonych
- **łagodny** (inne stosowane określenia: **lekki**) – z objawami ustępującymi szybko, ze śmiertelnością chorych poniżej 1%
- **umiarkowany** (inne stosowane określenia: **średni, średnio-ciężki**) – z objawami bez ciężkich powikłań, ze śmiertelnością chorych ok. 1 - 2%
- **ciężki** – z objawami ciężkich powikłań, ze śmiertelnością chorych od 5 – 15% [Avšič-Županc 2019 <sup>8</sup>], [Hepojoki 2014 <sup>48</sup>], [Clement 2019 <sup>22</sup>].

HFRS wywołany przez HTNV, Amur hantavirus mają przebieg ciężki, pełnoobjawowy, z powikłaniami krwotocznymi i nerkowymi, z rozwijającym się wstrząsem, z powikłaniami wieloukładowymi, z immunopatologią związaną z odpowiedzią prozapalną. Infekcje DOBV mają przebieg ciężki, umiarkowany, łagodny i subkliniczny, ponieważ *Orthohantavirus dobravaense* występuje w 4 genotypach, ciężkość zachorowań wiąże się z genotypem powodującym HFRS. Zachorowania z etiologią DOBV genotyp Dobrava (DOBV-Af) mają przebieg ciężki, umiarkowany ze śmiertelnością 10 – 12%, DOBV genotyp Sochi (DOBV-Ap) ma przebieg ciężki, umiarkowany ze śmiertelnością 6%, DOBV genotyp Kurkino (DOBV-Aa) ma przebieg umiarkowany, łagodny ze śmiertelnością poniżej 1%, DOBV genotyp Saaremaa (DOBV-Aa) ma przebieg subkliniczny i nie ma ustalonej śmiertelności z powodu braku rejestrowanych przypadków zgonu. W Europie DOBV jest najbardziej patogennym hantawirusem dla ludzi i jest odpowiedzialny za prawie wszystkie notowane zgony z powodu HFRS [Klempa 2013 <sup>81</sup>]. Infekcje SEOV mają przebieg umiarkowany, łagodny i subkliniczny, najbardziej objawowe zachorowania rozpoznaje się w Chinach. Poza Chinami identyfikacja zakażeń powodowanych przez SEOV jest sporadyczna i dotyczy zachorowań z przebiegiem łagodnym, tak jest w innych częściach Azji, w Europie, Amerykach, Afryce a w Australii nie wykrywa się chorych w ogóle pomimo potwierdzenia SEOV w rezerwuarze zwierzęcym. W tej sytuacji uważa się, że poza Chinami jest więcej przypadków subklinicznych i łagodnych. W przebiegu SEOV – HFRS pojawia się gorączka, przejściowa małopłytkowość, krótkotrwały białkomocz, a szczególną cechą jest zapalenie wątroby szybko ustępujące [Clement 2019 <sup>22</sup>]. Infekcje PUUV mają przebieg subkliniczny, łagodny i umiarkowany. W przebiegu PUUV – HFRS, który jest nazywany nefropatią epidemiczną (NE) pojawia się gorączka, przejściowa małopłytkowość, białkomocz,

który może być krótkotrwały, a szczególną cechą jest kaszel [Rasmuson 2013 <sup>150</sup>]. Te dwie infekcje HFRS, wywołane przez SEOV i PUUV mogą także przebiegać ciężko w wyniku predyspozycji genetycznych osób zakażonych oraz skali uruchomienia „burzy cytokinowej” jako odpowiedzi immunopatologicznej na zakażenie [Clement 2019 <sup>22</sup>], [Rasmuson 2013 <sup>150</sup>].

## **2.2. Główne cechy kliniczne HFRS:**

1. Ostre uszkodzenie nerek (ang. acute kidney injury, AKI), łącznie z ostrą niewydolnością nerek.
2. Przeciek naczyń włosowatych (ang. capillary leakage ).
3. Ostra małopłytkowość.
4. Reakcje immunopatologiczne dotyczące odpowiedzi immunologicznej na zakażenie, dysfunkcji płytek krwi, deregulacji funkcji barierowej komórek śródbłonna.

### **Ostre uszkodzenie nerek ang. acute kidney injury (AKI)**

W HFRS dominują cechy ostrego śródmiąższowego zapalenia nerek. Ostre uszkodzenie nerek, bez względu na czynnik bodźcowy to stan szybko narastającego zmniejszenia funkcji filtracji nerkowej. Wiodącymi wskaźnikami tego procesu jest podwyższony poziom azotu mocznikowego we krwi i podwyższony poziom kreatyniny i spadek filtracji kłębkowej. Czynnikiem wpływającym na wystąpienie AKI jest stan uszkodzenia i funkcjonowania nabłonków i naczyń nerkowych, odpowiedź immunologiczna na ten stan doprowadzająca do utraty czynnych nefronów i w konsekwencji do utraty zdolności filtracyjnej nerek. Następnie dochodzi do niedokrwienia nerek, zwiększonej aktywności prozapalnej, stresu oksydacyjnego doprowadzającego końcowo do ostrej martwicy kanalików nerkowych. Rozwój AKI doprowadza do dysfunkcji śródbłonnków nerkowych i powikłań w funkcjonowaniu nerek, co może doprowadzić do zwłóknienia śródmiąższowego i wystąpienia przewlekłej choroby nerek [Mir S 2022 <sup>128</sup>]. HFRS postrzegany jest jako jedna z 15 przyczyn AKI [Adams 2014 <sup>2</sup>]. W przebiegu klinicznym HFRS występuje ostra niewydolność nerek ze znacznie podwyższonym białkomoczem spowodowanym zajęciem kanalików i kłębuszków nerkowych. W przypadkach HFRS mówi się o AKI

indukowanej przez hantawirusy, cechą charakterystyczną jest bezpośredni brak mechanizmów uszkodzenia struktury komórek śródbłonna ze strony wirusów ale występuje uszkadzający wpływ cytokin uwalnianych w procesach prozapalnych, czyli uszkodzenia nerek mają podłoże immunopatologiczne (poprzez oddziaływanie tzw. burzy cytokinowej) [Mir S 2022 <sup>128</sup>].

### **Fazy kliniczne w przebiegu HFRS**

HFRS rozwija się jako ostry zespół patologii ogólnoustrojowej z dominującymi zaburzeniami strukturalnymi i funkcjonalnymi nerek, także z zajęciem innych narządów (układ sercowo-naczyniowy, płuca, ośrodkowy układ nerwowy, przewód pokarmowy, zaburzenia hematologiczne). Badacze wskazują na system powiązań fizjologicznych i biochemicznych w rozwijających się fazach zaburzeń jako charakterystyczny obraz choroby nerek, który wyróżnia się z innych zespołów klinicznych, takich jak wstrząs, niedociśnienie lub nadciśnienie, zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej związane z rozwijającą się niewydolnością nerek o innej etiologii. W aspekcie klinicznym gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym przebiega z ostrym uszkodzeniem nerek (AKI) i charakterystycznym białkomoczem, skąpomoczem i w konsekwencji wielomoczem. W aspekcie fizjologicznym występuje nerkowe zaburzenie przepływu krwi. W obrazie histologicznym w nerkach widoczna jest martwica podobna do tej, która rozwija się w przypadku toksycznych czy urazowych przyczyn ostrego uszkodzenia nerek. Rozwój zaburzeń w nerkach doprowadza do zmian patologicznych w różnym czasie i intensywności, przez co ma zróżnicowany charakter i obejmuje naczynia nerkowe, części śródmiąższowe i mięższowe nerek [Oliver 1957 <sup>138</sup>].

Przebieg kliniczny HFRS określany jest w fazach:

- 1) faza gorączkowa – trwa 1 - 7 dni
- 2) faza hipotensyjna (wstrząsowa) – trwa 1 - 3 dni
- 3) faza skąpomoczu – trwa 2 - 6 dni
- 4) faza wielomoczu – trwa ok. 2 tygodnie
- 5) faza rekonwalescencji – trwa 3 - 6 miesięcy

[Adams 2014 <sup>2</sup>], [Hepojoki 2014 <sup>48</sup>], [Jiang 2016 <sup>70</sup>], [Knap, Trybusz 2006 <sup>90</sup>], [Knap 2006 <sup>84</sup>], [Knap 2009 <sup>88</sup>].

Faza 1) **gorączkowa** charakteryzuje się podwyższoną lub wysoką gorączką, z dreszczami, bólem głowy, mięśni, stawów, nudnościami, wymiotami, zaburzeniami w krążeniu obwodowym takim, jak zaczerwienienie skóry twarzy („spoliczkowana” twarz), karku, klatki piersiowej, błon śluzowych gardła, gałek ocznych - Ryc.1. („czerwone oczy”). Pod koniec tej fazy uwidoczniają się pierwsze zaburzenia równowagi wodno-elektrolitowej, które aż do końca fazy 4) diuretycznej będą podstawowym tłem pojawiających się zaburzeń pracy nerek. Następuje też charakterystyczny podwyższony napływ krwi do naczyń nerkowych, który inicjuje rozwój zmian w strukturze a potem w funkcjonowaniu nerek [Oliver 1957 <sup>138</sup>].



Ryc.1. Pacjent z krwotocznym zapaleniem spojówek, łac. hemorrhagic conjunctivitis w przebiegu HFRS. Źródło: Avellaneda-Campos R. Haemorrhagic fever with renal failure syndrome: a case report. Nefrologia. 2012;32(1):131-2 [7].

Faza 2) **hipotensyjna** to okres rozpoczynający się od początku opadania temperatury, w obrazie zaburzeń krążenia obwodowego pojawiają się wybroczyny, wysypka krwawa - Ryc.2. fusowate wymioty, smoliste stolce, krwiopłucie wraz ze zmniejszeniem liczby płytek krwi (charakterystyczna trombocytopenia gorączek krwotocznych). Wzrost hematokrytu wskazuje na zmniejszającą się ilość krążącej krwi, co można bezpośrednio powiązać z przedostawaniem się osocza do przestrzeni tkankowych przez uszkodzone naczynia włosowate (ang. capillary leakage), w wyniku czego dochodzi do obniżenia ciśnienia krwi i w zaawansowanej postaci zaburzeń dochodzi do wstrząsu pierwotnego, który jest najczęściej przyczyną ponad 30% zgonów chorych. W tej fazie dochodzi do rozwoju zaburzeń czynności nerek, pojawia się białkomocz, wydalanie moczu zostaje zmniejszone, wzrasta azot mocznikowy we krwi. To pierwsza faza widocznych zmian w strukturze nerek, które obejmują zastoinowe przekrwienie (czyli lokowanie krwinek w części podkorowej rdzenia

nerki), początek rozległych zaburzeń w łożysku naczyń związanych ze zwiększeniem przepuszczalności naczyń włosowatych i żył, które uczestniczą w rozwoju zaburzeń krążenia obwodowego. Rozwija się obrzęk kory i kanalików nerkowych jako kolejny symptom zmian patologicznych w nerkach. Naczynia tracą napięcie, są atoniczne i przepuszczalne, co jest charakterystyczne dla obrazów wszystkich gorączek krwotocznych. Przepływ krwi przez nerki zmniejsza się, co świadczy też o ogólnej zapaści krążeniowej. Nefrony ulegają destrukcji, dochodzi do nieodwracalnych zmian uszkodzenia nerek [Oliver 1957 <sup>138</sup>].



Ryc.2. Obraz skazy krwotocznej plamicy piorunującej, łac. purpura fulminans w przebiegu HFRS. Źródło: Atalay YO et al.: Hantaviral Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: A Case Report and Review. Olgu Sunumu ve Derleme Yoğun Bakım Dergisi 2012;10(4):210-216 [6].

Faza 3) **skąpomoczu** charakteryzuje się utrwaleniem oligurii, jest to zarazem faza która może rozwijać się w zaostrzenie zaburzeń ogólnoustrojowych, ale to także faza od której rozpoczynają działać mechanizmy naprawcze, jednym z nich jest wyrównywanie spadku objętości krążącej krwi poprzez powrót płynów z przestrzeni tkankowych do naczyń, trwa to ok. 3 dni. W tym czasie, przy dalszym przedostawaniu się białka do krwi, poziom białka nie musi wzrastać ze względu na zwiększającą się

ilość płynów w naczyniach, ale też może doprowadzić do pojawienia się nadciśnienia, które wraz z utrzymującą się skazą krwotoczną może zaostrić stan poprzez dołączenie się powikłań (określanych jako stan szoku przejściowego między fazami) w postaci obrzęku płuc, krwotoku, ciężkich objawów neurologicznych doprowadzając do zgonu chorych. W obrazie histologicznym nerek wraz z obniżeniem hematokrytu, powrotem osocza do naczyń, zmniejszają się obrzęki powstałe w przestrzeniach tkankowych, dochodzi do powrotu krążenia, ale utrzymywac się może dysfunkcja krążenia i rozwój szoku przejściowego. Faza oliguryczna to faza zmian kanalikowych pod postacią ostrej martwicy kanalików. Zmiany w nerkach dotyczą obszarów zatorów i krwotoków wynikających z zaburzeń krążenia, w tym oddziaływania ciśnienia krwi, niedotlenienia tkanek (anoksja, deficyt tlenowy), wynikające z zastoju krwi i gromadzenia się płynów („śródnerkowe wodonercze”). W konsekwencji jest to okres krytyczny w funkcjonowaniu nerek [Oliver 1957 <sup>138</sup>], postępujące zmiany w kanalikach nerkowych ukazują dowodnie rycina z tej pracy - Ryc.3.

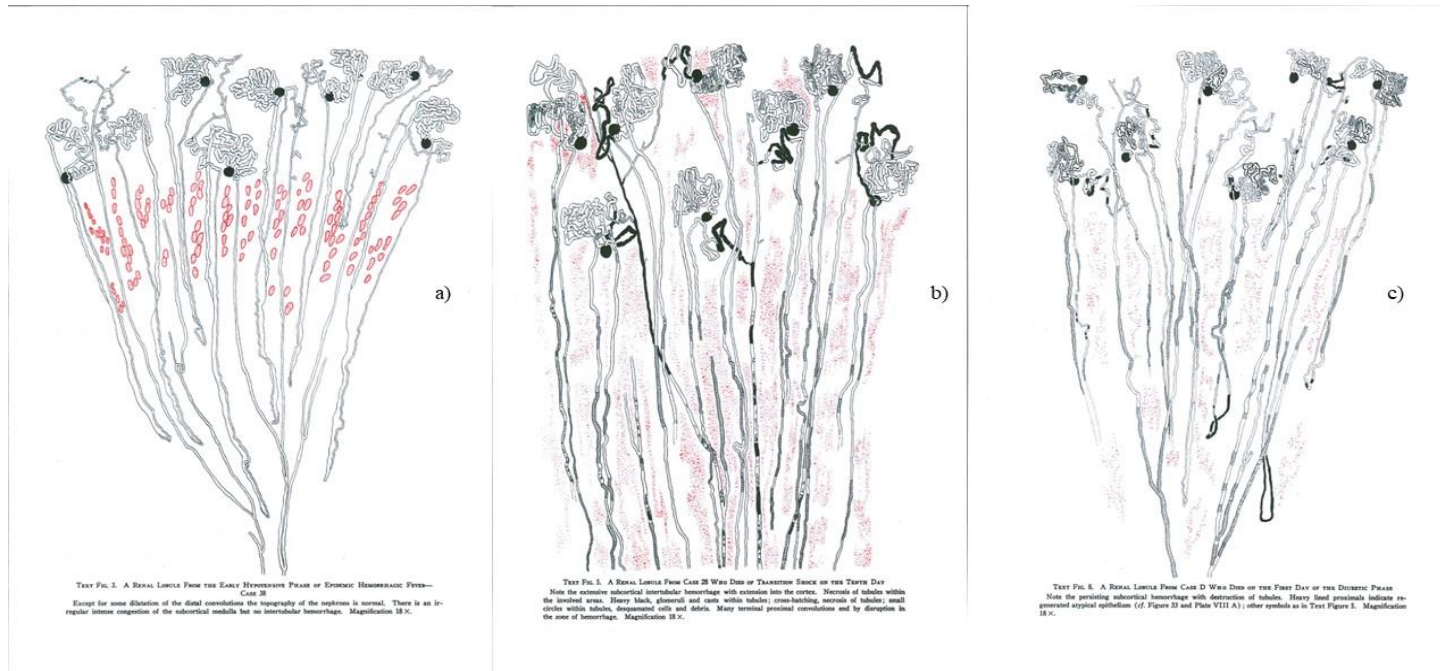
Faza 4) **wielomoczu** to stan kompensacyjny dla czynności nerek, poliuria rozwijać się może spontanicznie, ilość wydalanego moczu wzrasta do kilku a nawet kilkunastu litrów na dobę, to także czas zaburzeń równowagi wodno-elektrolitowej, w którym może dojść do wtórnego wstrząsu z obrzękiem płuc włącznie. Jeżeli jednak mechanizmy naprawcze doprowadzają do względnej homeostazy, następuje poprawa w krążeniu nerkowym, spada też poziom białkomoczu. Faza ta trwa dłużej od poprzednich, ok. 2 tygodni [Oliver 1957 <sup>138</sup>].

Faza 5) **rekonwalescencji** to okres zdrowienia i pełnego dojścia do prawidłowego funkcjonowania organizmu. W nerkach osób, które zdrowieją znajduje się włókniste bliznowacenia, niekiedy nacieki z monocytów w miejscach zniszczenia nefronów. Trwa odwracanie szkód w strukturze i funkcjonowaniu nerek, powrót do funkcjonowania nerek jest możliwy ze względu na nienaruszoną zmianami część struktur nerek i funkcjonujących tam nefronów (nerki jako narządy mają dużą rezerwę nefronów, gotowych do zastępowania zniszczonych). Okres ten trwa najdłużej, nawet do kilku miesięcy [Oliver 1957 <sup>138</sup>].

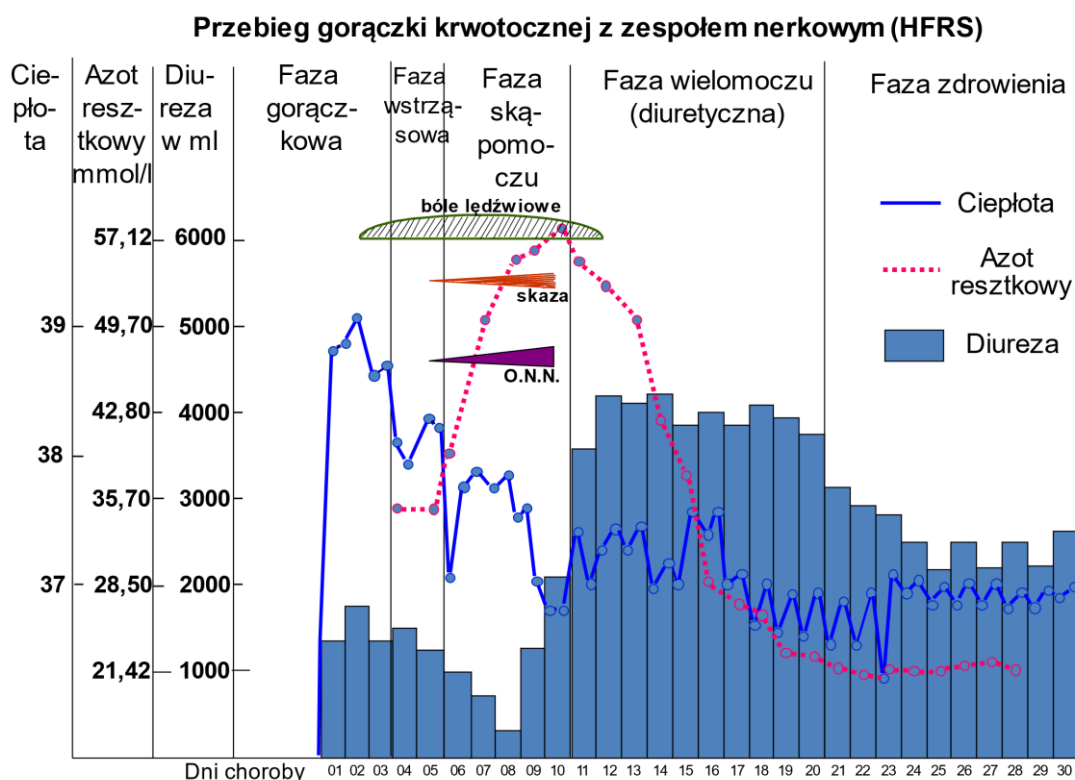
U osób, u których przebieg HFRS nie jest pełnoobjawowy, u których nie było incydentów wstrząsów w fazie hipotensyjnej, oligurycznej i poliurycznej, u których nie było ciężkich manifestacji skazy krwotocznej, nie dochodzi do zmian w strukturze

nerek na taką skalę, która doprowadza do dysfunkcji nerek zagrażających życiu chorych, nie pojawiają się także u tych osób ciężkie powikłania ze strony funkcjonowania płuc, serca, mózgu doprowadzających do zgonów. Ostre uszkodzenie nerek (AKI) w przebiegu HFRS na ogół nie przebiega z nieodwracalnym uszkodzeniem nerek [Oliver 1957 <sup>138</sup>].

Przebieg gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym przedstawia schemat – Ryc.4.



Ryc.3. Postępujące zmiany w kanalikach nerkowych podczas ciężkiego przebiegu HFRS; na czerwono zaznaczono zastoinowe gromadzenie się krwinek w części podkorowej rdzenia nerek lub masywniejsze krwawienie a) faza hipotensyjna – przekrwienie bez krwotoku, kanaliki nerkowe prawidłowe b) odcinki kreskowane w obszarze kanalików – ostra martwica kanalików nerkowych, na czerwono krwawienie c) faza skąpomoczu - linie przerywane szare – destrukcja kanalików nerkowych, na czerwono krwawienie. Źródło Oliver J, Macdowell M. The renal lesion in epidemic hemorrhagic fever. *J Clin Invest.* 1957;36(1 Part 2):99-223 [138].



Ryc.4. Przebieg gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym, HFRS. Źródło: wg Pokrowskiego i Roszczupkina, 1983r. – zmienione J. P. Knap i A. Trybusz, 2006r [90].

### 2.3. Cechy kliniczne hantawirusowego zespołu płucnego (HPS / HCPS)

Hantawirusowy zespół płucny (HPS) to ciężka choroba układu oddechowego, która jak się uważa, wynika z rozregulowanej odpowiedzi immunologicznej na zakażenie patogennymi hantawirusami, takimi jak wirus Sin Nombre (SNV) lub wirus Andes (ANDV). Hantawirusy Nowego Świata, takie jak wirus Prospect Hill (PHV), nie są związane z chorobami człowieka. HPS inaczej określane jest jako HCPS, hantawirusowy zespół kardio-płucny, w przebiegu którego dochodzi do obrzęku płuc i niewydolności serca [Spiropoulou 2007 <sup>165</sup>]. Choroba, która została po raz pierwszy rozpoznana w 1993 roku w Stanach Zjednoczonych, identyfikowana jest rzadko, często kończy się zgonem, a śmiertelność wśród chorych wynosi ok. 40%. Rozpoczyna się w sposób niespecyficzny ze stosunkowo krótką, trwającą 3-5 dni gorączką powyżej 38,3 C i bólami mięśni, bólami głowy, z dreszczami, zawrotami głowy, kaszlem bez odkrztuszania, nudnościami, wymiotami i objawami żołądkowo-jelitowymi. Złe samopoczucie, biegunka i zawroty głowy są zgłaszane przez około połowę wszystkich

pacjentów, rzadziej występują bóle stawów, bóle pleców i bóle brzucha. Objawy HPS na ogół nie rozwijają się do około siódmego dnia, potem zaczynają się objawy płucne, takie jak kaszel i przyspieszenie oddechu. Pacjenci odczuwają duszność. Po rozpoczęciu fazy krążeniowo-oddechowej choroba postępuje szybko, wymaga hospitalizacji i często wentylacji w ciągu 24 godzin. U niewielkiego odsetka pacjentów z zakażeniem hantawirusem objawy sercowo-płucne nie rozwijają się. W definicji przypadku HPS/HCPS do kryteriów klinicznych umożliwiających rejestrację zachorowania bierze się pod uwagę: obustronny rozlany obrzęk śródmiąższowy lub rozpoznanie kliniczne zespołu ostrej niewydolności oddechowej (ARDS), lub radiograficzne dowody niekardiogenego obrzęku płuc lub niewyjaśniona choroba układu oddechowego prowadząca do zgonu, obejmująca badanie autopsyjne wykazujące niekardiogeny obrzęk płuc bez możliwej do zidentyfikowania przyczyny / lub rozpoznanie zespołu płucnego hantawirusa / lub zgon / lub istotny stan przyczyniający się do zgonu z powodu HPS. Do kryteriów laboratoryjnych potwierdzających rozpoznanie kliniczne HPS należy wykrycie swoistych antyhantawirusowych przeciwciał IgM lub rosnącego miana swoistych przeciwciał IgG / lub wykrycie specyficznego dla hantawirusa kwasu rybonukleinowego w próbkach klinicznych / lub wykrycie antygeny hantawirusa metodą immunohistochemiczną w tkankach z biopsji płuc lub autopsji [<https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/hantavirus-pulmonary-syndrome-2015/> <sup>55</sup>]. Śmiertelność w HPS następuje z powodu niedociśnienia, niedotlenienia i wstrząsu [Majda-Stanisławska 1998 <sup>116</sup>]. Badanie zamrożonych, przechowywanych próbek tkanki płucnej od osób, które zmarły z powodu niewyjaśnionej choroby płuc w przeszłości, ujawniło, że HPS jest chorobą, której przypadki zachorowań sięgają co najmniej 1959 roku [Mir MA 2010 <sup>127</sup>].

#### **2.4. Patomechanizm rozwoju zakażeń hantawirusowych w organizmie gospodarza - człowieka i zwierzęcia.**

##### **Tropizm zakażeń.**

W prowadzonych doświadczeniach hantawirusy wykazywały zdolność zakażenia komórek śródbłonka naczyniowego, komórek nabłonka, komórek układu odpornościowego, w tym makrofagów, komórek dendrytycznych, limfocytów, megakariocytów, płytek krwi. Spośród wymienionych komórki śródbłonka są głównym celem infekcji hantawirusowej, następnie makrofagi i taka sytuacja ma

miejsce tak u ludzi, jak i u zwierząt. Zidentyfikowanie zakażenia keranocytów potwierdza, że przeniesienie zakażenia możliwe jest wśród zwierząt poprzez pogryzienia [Ermonval 2016 <sup>30</sup>].

### **Rola śródbłonna naczyniowego w patogenezie zakażeń hantawirusowych.**

Podstawową rolę w patomechanizmie rozwoju zakażeń hantawirusowych odgrywa śródbłonek naczyniowy a właściwie stan jego funkcjonowania w stosunku do prawidłowych jego funkcji w sytuacji braku zakażenia. W nerkach występują różne typy śródbłonna, z których każdy ma specyficzne cechy strukturalne i funkcjonalne. Śródbłonek kłębuszków jest silnie usiany szczelinami filtracyjnymi i jest pokryty bogatym glikokaliksem, uczestniczy w tworzeniu bariery filtracyjnej kłębuszków. Śródbłonek mikronaczyniowy w okołokanalikowych naczyniach włosowatych ma również szczeliny filtracyjne, odgrywa także rolę w transporcie filtrowanych składników i w funkcji barierowej EC. Śródbłonek dużych i małych naczyń wspomaga unaczynienie nerek. Śródbłonek nerki jest zarówno miejscem (celem) oddziaływania bodźców patologicznych, jak i przyczyną powikłań nerkowych i w konsekwencji ogólnoustrojowych powikłań np. sercowo-naczyniowych. Pojawiające się strategie terapeutyczne, które są ukierunkowane na oddziaływanie na organizację i funkcjonowanie komórek śródbłonna nerek mogą prowadzić do lepszych wyników leczenia zarówno rzadkich, jak i powszechnych chorób nerek [Jourde-Chiche 2019 <sup>25</sup>].

Rozwój zakażenia rozpoczyna się z chwilą rozpoczęcia replikacji wirusa. Podjednostka  $\beta 3$  integrzyn jest miejscem receptorowym występującym na powierzchni komórek śródbłonna, trombocytów, komórek dendrytycznych - komórek odgrywających kluczową rolę w patogenezie zakażeń hantawirusowych [Ermonval 2016 <sup>30</sup>]. Wejście hantawirusów poprzez fuzję z receptorami komórki gospodarza nie jest do końca wyjaśnione, powszechnie przyjmuje się, że glikoproteinowe integryny  $\alpha 1 \beta 3$  są receptorami dla hantawirusów patogennych odpowiedzialnych za HCPS, integryny  $\alpha \nu \beta 3$  są receptorami dla hantawirusów patogennych odpowiedzialnych za HFRS, integryny  $\alpha 5 \beta 1$  są receptorami dla hantawirusów niepatogennych. Opiszano też przypadek afrykańskiego *Orthohantavirus sangassouense*, który wykorzystuje rzadziej receptor  $\beta 1$  niż  $\beta 3$  do zakażenia swojego mysiego przenosiciela i choć nadal uważa się go za wirusa niepatogennego dla ludzi, jest jednak pierwszym opisanym niejednoznacznym przypadkiem, który wskazuje na rolę innych czynników wykorzystywanych w patomechanizmie zakażenia przez ortohantawirusy [Klempa

2010 <sup>82</sup>], [Klempa 2012 <sup>83</sup>]. Poza wymienionymi receptorami  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  wirusa, rolę mediatorów w adhezji pełnią także struktury komórki gospodarza. Gdy dochodzi dołączenia wirionu z receptorem wykazano, że muszą być obecne jeszcze czynniki białkowe komórki gospodarza np. glikoproteiny, w tym lektyny, które łączą się z glikopeptydami ortohantawirusa i tak naprawdę determinują jego zakaźność i patogenność, podobny mechanizm znany jest też u arena -, korona- i filo-wirusów. Bez tej relacji wirusy nie ulegają przyłączeniu do receptora i nie rozpoczyna się proces replikacyjny i nie ma zakaźności szczepu [Klaus 2013 <sup>80</sup>]. Receptory adhezji determinowane są też przez specyficzność gospodarza oraz tropizm narządu, w którym następuje replikacja wirusa [Müller 2019 <sup>131</sup>]. Są doniesienia, że rolę innych, może nawet ważniejszych receptorów wejścia mogą odgrywać protokadheryny, białka uczestniczące w przyleganiu do siebie komórek. Mechanizm ten wykazano w przypadkach zakażeń ortohantawirusami Nowego Świata, w przypadku wirusów Starego Świata przewiduje się, że rolę receptorów może pełnić jeszcze większy kompleks struktur receptorowych, obecnie nie do końca poznany [Dieterle 2021 <sup>28</sup>]. Integrynę  $\beta 3$ , której do tej pory poświęcono najwięcej czasu badawczego, uznaje się za czynnik kluczowy w rozwoju zakażenia komórek ludzkich i gryzoni wskazując, że jeżeli jest nieobecna to, zwierzęta które mogłyby być gospodarzami nie ulegają zakażeniu, nie stanowią źródła zakażenia dla innych zwierząt i człowieka, przykładem tego jest mysz domowa, u której nie stwierdza się aktywnego zakażenia, natomiast może przenosić hantawirusa poprzez skażenie kontaktowe hantawirusem [Müller 2019 <sup>131</sup>]. Integryny to transbłonowe glikoproteidy, które utrzymują połączenia międzykomórkowe oraz połączenia macierzy zewnątrzkomórkowej z cytoszkieletem wewnątrzkomórkowym. Głównym ich zadaniem jest odbieranie i przekazywanie biochemicznych i mechanicznych sygnałów przez błonę komórkową, w obu kierunkach poprzez wysoce czuły mechanizm aktywacji receptorów [Campbell 2011 <sup>16</sup>]. Patogenne ortohantawirusy hamują funkcję integryn  $\alpha \nu \beta 3$  w komórkach śródbłonna, efektem czego jest przepuszczalność naczyń, blokują także funkcje płytek krwi, które dążą do przywrócenia szczelności bariery naczyniowej. Ciężkość zakażenia zależy od samego patogenu, HTNV i ANDV zwiększają wprost ogromnie przepuszczalność śródbłonna, przez co odpowiadają za zachorowania o najcięższym przebiegu. W krótkim czasie, bo w ok. 3 dniu od zakażenia patogennymi hantawirusami, wirusy uwrażliwiają komórki śródbłonna powodując ich ogromną nadprzepuszczalność, przy czym nie przejawiają zdolności degradujących komórki

śródbłonna, tylko dezorganizujących ich naturalne funkcje. Przepuszczalność śródbłonna naczyniowego jest regulowana przez wiele związków pochodzących z osocza i płytek krwi. Integryny są czynnikami modulującymi przepuszczalność śródbłonna poprzez wpływ na czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), który w normalnym swym działaniu w poważnym stopniu powoduje rozluźnienie komórek śródbłonna i powoduje jego przepuszczalność a w przypadku zakażenia hantawirusowego staje się głównym sprawcą przecieku kapilarnego naczyń. Inne czynniki mające działanie antagonistyczne do VEGF lub stabilizujące połączenia między komórkami śródbłonna dążą do przywrócenia stanu funkcjonującej prawidłowo bariery naczyniowej. Dodatkowo w czasie infekcji to właśnie pojawiające się przeciwciała anty VEGF wraz z inhibitorami VEGF hamują proces kierowania przez wirusa przepuszczalnością komórek śródbłonna i powodują powrót do prawidłowego funkcjonowania komórek śródbłonna [Gavrilovskaya 2008 <sup>35</sup>]. W przypadku zakażeń hantawirusami zasadniczą rolę w patogenezie odgrywają mediatory stanu zapalnego, komórki odpornościowe biorące udział w zaburzeniu funkcji komórek śródbłonna, makrofagi, monocyty. Interferon makrofagów, monocytów może indukować tkankowy aktywator plazminogenu (tPA, ang. tissue plasminogen activator), jeden z czynników gospodarza przyczyniający się do chorobotwórczości hantawirusów. Wpływ interferonu indukującego tPA obserwuje się także w komórkach śródbłonna (tPA uwalniane jest z komórek endotelium) dochodzi do rozszerzania naczyń krwionośnych i w pośredni sposób do zwiększania przepuszczalności komórek śródbłonna naczyń włosowatych (ang. increased capillary permeability), co jest kluczowym elementem patogenezy choroby hantawirusowej, przecieku naczyń kapilarnych (ang. vascular leakage) [Mackow 2014 <sup>114</sup>]. W podsumowaniu można powiedzieć, że kluczowym mechanizmem patogenezy HFRS i HPS jest zwiększona przepuszczalność naczyń, która jest bezpośrednim skutkiem infekcji hantawirusowej lub wynikiem niezrównoważonej odpowiedzi immunologicznej podczas próby usunięcia wirusa przez organizm gospodarza [Noack 2020 <sup>133</sup>]. W tym kontekście, mechanizmy patogenezy HFRS i HPS wyjaśnia się interakcjami pomiędzy wirusem a układem odpornościowym gospodarza, zależności te są podobnie zidentyfikowane wśród innych wirusowych gorączek krwotocznych oraz w przypadkach zakażeń wirusem grypy czy SARS-CoV-2 [Malavige 2017 <sup>117</sup>], [Libby 2020 <sup>109</sup>]. Należy jeszcze podkreślić, że zakażenie hantawirusowe nie ma charakteru cytolitycznego, nie doprowadza do apoptozy zakażonych komórek

[Ermonval 2016 <sup>30</sup>], [Hepojoki 2014 <sup>48</sup>]. Obserwowane wspólne cechy patomechanizmu rozwoju zakażenia wywołanego przez ortohantawirusy Nowego i Starego Świata związane z patogenezą HCPS, HFRS i Nephropathia Epidemica odpowiadają roli, jaką pełnią hantawirusy w rozregulowywaniu funkcji komórek mikronaczyniowego śródbłonka naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz zakłócaniu integralności bariery dla płynów z naczyń i tkanek. Przepuszczalność naczyń indukowana przez hantawirusy ma charakter wieloczynnikowy [Mackow 2014 <sup>114</sup>].

### **Rola odpowiedzi immunologicznej organizmów w patogenezie zakażeń hantawirusowych.**

Patogeneza HFRS jest zależna od cech samego wirusa, predyspozycji genetycznych i odpowiedzi układu odpornościowego zakażonych organizmów. Immunopatogeneza jest indukowana przez etiologiczne ortohantawirusy i dotyczy tworzenia kompleksów immunologicznych, aktywacji dopełniacza, odpowiedzi limfocytów T, odpowiedzi limfocytów B oraz produkcji cytokin. [Jiang 2016 <sup>70</sup>]. Patogenezę zakażeń naczyniowych zarówno w HFRS (NE) jak i w HPS (HCPS) wyznaczają reakcje immunopatologiczne wpływające na dysfunkcję płytek krwi i deregulację funkcji bariery komórek śródbłonka. Mechanizmy tych procesów nie są do końca poznane, niektóre prace przybliżają wyjaśnienie zagadnienia w odniesieniu do badanych hantawirusów. Podstawowy zespół patologii zakażenia hantawirusowego, czyli przeciek naczyniowy ma wiele mechanizmów, które jeżeli są znacząco uaktywnione wpływają na ciężkość przebiegu zakażenia [Taylor 2013 <sup>168</sup>]. Przykładów immunopatologii ze strony odpowiedzi organizmów na zakażenie jest wiele. Zakażone komórki dendrytyczne i monocyty przyczyniają się do rozprzestrzenienia wirusa w organizmie człowieka. Zakażone komórki EC mogą być omijane przez cytotoksyczne komórki NK, przy czym w tym samym czasie niezakażone komórki EC mogą ulegać cytolizie przez pobudzone komórki NK, co jest swoistym paradoksem przyczyniającym się do patogenezy HFRS, HPS. W immunopatogenezie indukowanej przez hantawirusy biorą udział też neutrofile, które uaktywnione doprowadzają do lizy komórek śródbłonka i płytek krwi. Samo zakażenie np. przez HTNV, ANDV a właściwie poziom RNA-wiremii powoduje aktywację mechanizmów powodujących uwolnienie dużych ilości bradykininy w naczyniach włosowatych, komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych i komórkach śródbłonka, następstwem czego jest silna

reakcja przepuszczalności naczyń, powstawanie obrzęków i niedociśnienia. W zakażonych komórkach EC stwierdza się podwyższony poziom czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), który powoduje też zwiększoną przepuszczalność naczyń. Infekcja hantawirusowa podobnie, jak inne infekcje wirusowe inicjuje odpowiedź immunologiczną, której celem jest zmniejszenie replikacji wirusa. Wczesną rolę w zapewnianiu bezpośredniej ochrony przeciwwirusowej odgrywiają interferony. W strategii wypracowanej ewolucyjnie, wirusy żeby móc namnażać się w komórkach gospodarza zmieniają mechanizmy zapobiegające ich eliminacji np. poprzez hamowanie szlaków aktywujących IFN- $\beta$  [Finlay 2006 <sup>32</sup>]. Powszechnie przyjmuje się, że patogenne hantawirusy w przeciwieństwie do wirusów niepatogennych, różnią się selektywną zdolnością do opóźniania wczesnej indukcji odporności wrodzonej (reakcji IFN- $\beta$ ), która w przypadku wirusów niepatogennych ogranicza replikację ale nie w przypadku patogennych [Hepojoki 2014 <sup>48</sup>]. Tę zależność potwierdzono także u pacjentów z HPS, w odpowiedzi na infekcję komórek śródbłonna płuc, głównych komórek docelowych obserwuje się aktywację odpowiedzi przeciwwirusowej i silną odpowiedź antywirusową IFN- $\beta$ , nie dzieje się tak jednak w przypadku infekcji ANDV, hantawirusem o największym potencjale patogenności [Spiropoulou 2007 <sup>165</sup>]. Zdolność hamowania odpowiedzi interferonów przez hantawirusy związana jest z różnicami w strukturze glikoproteiny Gn (wirionowego białka kolca, ang. spike) a właściwie cytoplazmatycznej części Gn, co powoduje, że w przypadku replikacji hantawirusów patogennych występuje oporność na działanie odpowiedzi antywirusowej komórek i tym samym różnice w strukturze Gn są specyficzną cechą zjadliwości hantawirusów wysokocho robotwórczych (zjadliwość zależna od glikoproteiny) [Alff 2006 <sup>4</sup>], [Jiang 2016 <sup>70</sup>].

Związki immunologiczne między hantawirusami a ich gospodarzami zwierzęcymi są jeszcze bardziej złożone. Infekcja u zwierząt podatnych na zakażenie prowadzi w ciągu kilku dni do rozsianej infekcji, ale bez widocznych objawów choroby. Dzieje się tak dlatego, że od początku zakażenia działają procesy immunologiczne nie dopuszczające do zmian immunopatologicznych, co sugeruje wrodzoną i adaptacyjną odporność. Znaczenie też ma wielkość (zaawansowanie reakcji immunologicznej) w odpowiedzi zwierząt na zakażenie, odpowiedź jest znacząco mniejsza u zwierząt niż w przypadku zakażenia ludzi [Schountz 2014 <sup>158</sup>]. U zwierząt jest widoczna także stale

utrzymująca się odpowiedź immunologiczna regulatorowa, niedopuszczająca do rozwoju mechanizmów immunopatologicznych [Mir S 2022 <sup>128</sup>].

### **Uwarunkowania genetyczne przebiegu klinicznego zachorowań hantawirusowych**

Przebieg zakażenia hantawirusowego u ludzi jest związany z typem ludzkich antygenów leukocytarnych ang. human leukocyte antigens (HLA) i predyspozycjami genetycznymi [Avšič-Županc 2019 <sup>8</sup>]. Geny kodujące antygeny HLA są polimorficzne stąd u ludzi pojawiają się różnice w HLA. W Chinach u pacjentów z HFRS wywołanym przez HTNV identyfikowano haplotypy HLA-DRB1 \* 09 i HLA-B \* 46-DRB \* 09, w Finlandii w ciężkich postaciach zakażenia PUUV stwierdzano allele HLA HLA-B8, HLA-C4A \* Q0 i HLA-DRB1 \* 0301 a w łagodnych HLA-B27, w Stanach Zjednoczonych wyższe ryzyko ciężkiego HCPS wywołanego przez SNV potwierdzano u pacjentów z HLA-B \* allele 350. Typ HLA ma znaczenie w rozwoju ciężkich postaci HFRS a haplotyp HLA-B8-DR3, został wskazany jako kluczowa determinanta ciężkości choroby. Poza tymi determinantami wskazuje się także polimorfizmy czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ), polimorfizmy cytokin które prowadzą do obserwowanej zmienności odpowiedzi immunologicznej u osób zakażonych [Jiang 2016 <sup>70</sup>], [Krautkrämer 2011 <sup>95</sup>], [Charbonnel 2014 <sup>18</sup>]. Na stopień ciężkości HFRS wpływają również osobnicze różnice, na przykład w aktywacji odpowiedzi immunologicznej na zakażenie [Hepojoki 2014 <sup>48</sup>]. Ścisłą korelację między wiremią a ciężkością choroby stwierdzono również w przypadkach HTNV, DOBV, ANDV [Jiang 2016 <sup>70</sup>]. U osób z zaburzeniami odporności opisano przypadek zakażenia drogą krwiopochodną, przez przetoczenie krwi rozwinęła się choroba z objawami, takimi jak ból głowy i spadek płytek krwi [Sinisalo 2010 <sup>160</sup>]. Do innych czynników predysponujących do HFRS należy wymienić płęć męską [Krautkrämer 2011 <sup>95</sup>] i czynniki behawioralne np. palenie tytoniu [Charbonnel 2014 <sup>18</sup>].

### **2.5. Powikłania w HFRS i po przebyciu zachorowania**

Zakażenia o ostrym przebiegu rozszerzają się w chorobę wieloukładową, do powikłań procesu chorobowego poza występującym zespołem objawów nerkowych głównie dochodzi w ośrodkowym układzie nerwowym, w płucach, sercu i w układzie hormonalnym. Opisano pojawienie się zaburzenia endokrynologicznego dotyczącego uszkodzenia przysadki mózgowej z objawami niedoczynności, dochodzi do tego

rzadziej w okresie aktywnego zakażenia ortohantawirusami, częściej pojawia się po kilku miesiącach po HFRS. Przyczynami uszkodzenia przysadki mózgowej może być niedociśnienie rozwijające się w fazie hipotensyjnej, krwotok w przebiegu krwotocznym HFRS lub reakcja immunopatologiczna obejmująca ten gruczoł. Niedoczynność przysadki wpływa na układ hormonalny regulujący pracę tarczycy, nerek, gonad, ciśnienia krwi, stąd powikłania mogą dotyczyć wielu układów w organizmie człowieka [Bhoelan 2019 <sup>12</sup>]. Ze strony OUN, w ciężko przebiegającej NE i HFRS stwierdza się zapalenie mózgu, opon mózgowo-rdzeniowych, napady padaczkowe, rozwój pęcherza neurogennego, przejściową krótkowzroczność, napady ostrej jaskry a nawet utratę wzroku [Hautala 2021 <sup>46</sup>]. Ostra infekcja także niesie ryzyko rozwoju ostrej koagulopatii na podłożu immunopatologicznym, wiąże się z małopłytkowością, rozsianym wykrzepianiem wewnątrznaczyniowym (DIC) [Koskela 2021 <sup>94</sup>]. Objawy sercowo-naczyniowe, zapalenia mięśnia sercowego i objawy płucne po obrzęku tych narządów, objawy trzustkowo-żółciowe to kolejne manifestacje poza nerkowego HFRS [Park 2011 <sup>142</sup>]. Należy jeszcze podkreślić fakt, że HFRS wywołany przez ortohantawirusy Starego Świata, wysoko patogenny HTNV i łagodniejszy PUUV mogą być przyczyną objawów z powodu zajęcia płuc, powodując zespół kardio-płucny, tak charakterystyczny dla HPS i ortohantawirusów Nowego Świata [Hägele 2021 <sup>47</sup>].

## **2.6. Leczenie, profilaktyka zakażeń hantawirusowych, szczepienia ochronne.**

### **Leki przeciwwirusowe**

Obecnie leczenia celowanego skierowanego przeciwko hantawirusom nie opracowano, w przypadku stosowanej terapii podejmuje się leczenie objawowe. Kluczowym problemem jest utrzymanie równowagi płynów i elektrolitów i powstrzymanie procesów komplikujących przebieg zachorowania, np. wyrównywanie dysfunkcji nerek, utrzymywanie ciśnienia krwi w normach fizjologicznych, wyrównywanie poziomu płytek krwi, przeciwdziałanie skazie krwotocznej i innym powikłaniom narządowym np. obrzękowi płuc a w przypadku wystąpienia ARDS, kompensacja natlenienia. W ciężkich przypadkach AKI stosuje się terapię nerkozastępczą [Jiang 2016 <sup>70</sup>]. W przypadkach ciężkich zakażeń hantawirusowych, w zagrożeniu życia pacjenta rozważano wiele terapii przeciwdziałających immunopatologii rozwijających się w przebiegu zakażenia. W leczeniu HCPS i HFRS istnieje już pewna praktyka w stosowaniu rybawiryny.

Rybawiryna zastosowana w początkowej fazie zachorowania działa cytotoksycznie przeciwko hantawirusom, podobnie jak przeciwko innym RNA wirusom. Korzystny efekt leczenia uzyskiwano w przypadkach HFRS, choć leczenie rybawiryną niesie ze sobą poważny skutek uboczny w postaci niedokrwistości hemolitycznej. Innym testowanym lekiem jest fawipirawir, który – jako inhibitor wirusowej polimerazy RNA - wykazuje aktywność przeciwko ortohantawirusom ANDV, SNV, HTNV a w leczeniu skojarzonym podwyższa skuteczność rybawiryny [Mayor 2021 <sup>120</sup>]. Zauważono też, że zastosowanie leków blokujących bradykininę np. ikatybantu (firma „Rambaxy”, amp. a 30 mg), daje wymierne korzyści u pacjentów z PUUV i innymi zakażeniami hantawirusowymi. Zastosowanie inhibitorów integryn  $\alpha\beta 3$  czy inhibitorów aktywności VEGFR2 ograniczające przepuszczalność komórek śródbłonna też są badane jako środki przeciwwirusowe [Hall 2010 <sup>45</sup>], [Gorbunova 2011 <sup>37</sup>]. W ramach eksperymentów klinicznych, w Chinach testowano także immunoterapię z zastosowaniem mysich przeciwciał monoklonalnych podawanych dożylnie przeciwko wirusowi HTNV i wykazano ich skuteczność [Xu 2002 <sup>178</sup>].

### **Szczepienia ochronne**

Pierwszą szczepionkę przeciwko hantawirusom opracowano w Korei Południowej, w 1990r. została zarejestrowana do użytku, była to szczepionka inaktywowana Hantavax, antygen służący do konstrukcji szczepionki pochodził od pacjenta zakażonego HTNV, wirus był inaktywowany 0,05% formaliną. Szczepionkę przetestowano szczepiąc 1900 osób żyjących na obszarach endemicznych HFRS w Jugosławii w latach 1996-1998, szczepionka okazała się immunogenna, nie było wśród szczepionych znaczących niepożądanych odczynów poszczepiennych (NOP) [Chu 1999 <sup>20</sup>]. W grupie 1900 szczepionych, nie stwierdzono w okresie 2 lat obserwacji, przypadków choroby. W grupie kontrolnej 2000 nieszczepionych, stwierdzono w tym okresie 20 zachorowań na HFRS. Kolejne badania pokazywały mniejszą immunogenność Hantavax, którą podwyższało stosowanie kolejnych dawek szczepienia podstawowego i dawki przypominające po upływie roku, do obecnych czasów nie rozstrzygnięto, które antygeny wpływają na skuteczną i trwałą ochronę poszczepienną [Oh 2012 <sup>137</sup>]. W 2009 r. w Chinach wprowadzono inaktywowaną szczepionkę biwalentną skierowaną przeciwko HTNV i SEOV do podawania w odstępie dwutygodniowym, w grupie osób od 16 do 60 r.ż. W Chinach szczepienia przeciwko hantawirusom prowadzi się od ponad 20 lat w rejonach o wysokiej zapadalności na HFRS, skuteczność uodpornienia

szczepionką biwalentną ocenia się na ok. 3 lata. Szczepienie spowodowało przesunięcie osób ulegających zakażeniu na osoby poniżej 16 r.ż. i powyżej 60 r.ż. [He 2013 <sup>50</sup>], [Mir S 2022 <sup>128</sup>]. Nową perspektywą profilaktyki są szczepionki genetyczne. Szczepionki plazmidowe DNA, których zaletą jest brak możliwości replikowania i przywracania zjadliwości, są obecnie oceniane w ramach badania klinicznego. Badania dotyczą szczepionki tetrawalentnej przeciwko HTNV, PUUV, ANDV, SNV oraz monowalentnej przeciwko ANDV i drugiej monowalentnej przeciwko HTNV. Po sukcesie szczepionek mRNA przeciwko SARS-CoV-2 poruszono problem opracowania szczepionki mRNA przeciwko HFRS oraz HPS, ponieważ postrzega się je jako bardziej skuteczne niż plazmidowe DNA i tradycyjne inaktywowane, są bezpieczniejsze i można je produkować w szybszym procesie technologicznym, mRNA szczepionkowy jest niezakaźny, nie stwarza potencjalnego ryzyka integracji czy mutagenezy. Szczepienia ochronne przeciwko zakażeniom hantawirusowym są dedykowane dla ludności zamieszkujących tereny endemiczne albo takich, którzy przyjeżdżają na tereny endemiczne. Ze względu na różnorodność genotypów ortohantawirusów opracowanie szczepionki uniwersalnej jest problematyczne, dlatego obecne prace nad szczepionkami odnoszą się do gatunków najbardziej chorobotwórczych [Mir S 2022 <sup>128</sup>].

### **3. EPIDEMIOLOGIA CHOROBY**

#### **3.1. Choroba wywołana przez hantawirusy - definicja przypadku**

W celu uporządkowania i identyfikowania przypadków chorób, w tym chorób wywołanych przez hantawirusy przyporządkowuje się chorobom kody alfanumeryczne ustalone przez gremium organizacji koordynowanych przez WHO i obecnie wg X rewizji Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych w stosowanym wydaniu ICD-10:2019 podano, że HFRS jako jednostka chorobowa skodyfikowana jest pod kodem A98.5 Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym [<sup>54</sup>], z możliwością używania innych określeń jak: Gorączka krwotoczna epidemiczna, Gorączka krwotoczna koreańska, Rosyjska choroba wywołana przez hantawirusy, Hantaan virus disease, Hantaanvirus disease with renal manifestations, Nephropathia epidemica. HPS, HCPS jako jednostkę chorobową skodyfikowano jako B33.4 Zespół (sercowo-)płucny wywołany przez hantawirusy, z możliwością używania innych określeń jak: Choroba wywołana przez

hantawirusy z objawami płucnymi, Choroba wywołana przez wirus Sin Nombre [<https://cez.gov.pl/fileadmin/> <sup>53</sup>]. Na potrzeby nadzoru epidemiologicznego w Polsce od 2009r. obowiązuje rejestracja przypadków choroby wywołanej przez hantawirusy – wg definicji przypadków w wersji (6b) z lutego 2020r. podanej przez NIZP PZH – PIB [[http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def\\_PL2\\_6b.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_6b.pdf) strona 16 <sup>66</sup>]:

### **„Kryteria kliniczne**

Każda osoba, która spełnia co najmniej jedno z następujących czterech kryteriów:

- gorączka
- różne objawy nefropatii
- różne objawy krwotoczne, które mogą spowodować niewydolność narządów wewnętrznych
- objawy niewydolności oddechowej.

### **Kryteria laboratoryjne**

*Kryteria laboratoryjne przypadku potwierdzonego*

Co najmniej jedno z następujących czterech kryteriów:

- izolacja hantawirusa z materiału klinicznego
- wykrycie kwasu nukleinowego hantawirusa w materiale klinicznym
- wysokie miano swoistych przeciwciał IgM przeciw hantawirusom
- znamieny wzrost swoistych przeciwciał przeciw hantawirusom.

*Kryteria laboratoryjne przypadku prawdopodobnego*

Wykrycie obecności swoistych przeciwciał przeciw hantawirusom.

### **Kryteria epidemiologiczne**

Co najmniej jedno z następujących dwóch kryteriów:

- przeniesienie ze zwierzęcia na człowieka (zamieszkiwanie, pobyt lub narażenie na bezpośredni kontakt z gryzoniami na obszarze endemicznego występowania hantawirusów)
- pobyt w rejonie, w którym podejrzewa się lub stwierdzono występowanie przypadków zachorowań spowodowanych hantawirusami, w okresie 6 tygodni poprzedzających zachorowanie.

### **Klasyfikacja przypadku**

#### **A. Przypadek możliwy**

Nie dotyczy.

#### **B. Przypadek prawdopodobny**

Każda osoba, która spełnia kryteria kliniczne oraz co najmniej jedno z dwóch

następujących kryteriów:

- kryterium epidemiologiczne
- kryterium laboratoryjne przypadku prawdopodobnego.

### **C. Przypadek potwierdzony**

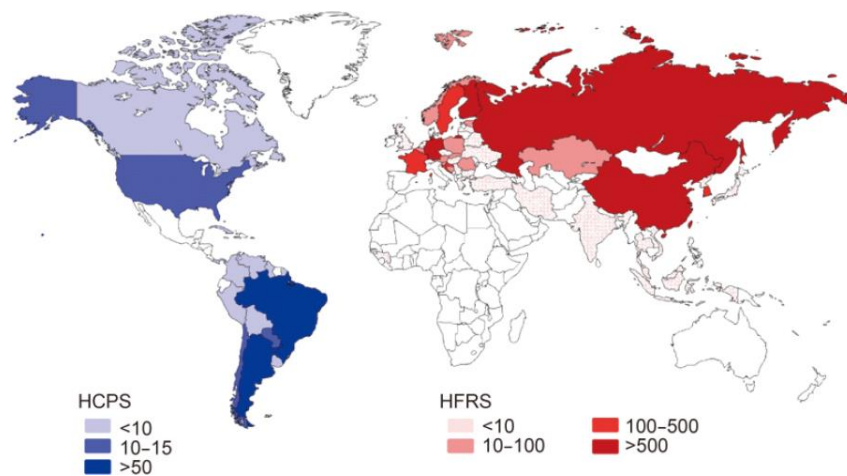
Każda osoba spełniająca kryteria laboratoryjne przypadku potwierdzonego.”

### **3.2. Występowanie zachorowań wśród ludności na świecie w XX i XXI wieku.**

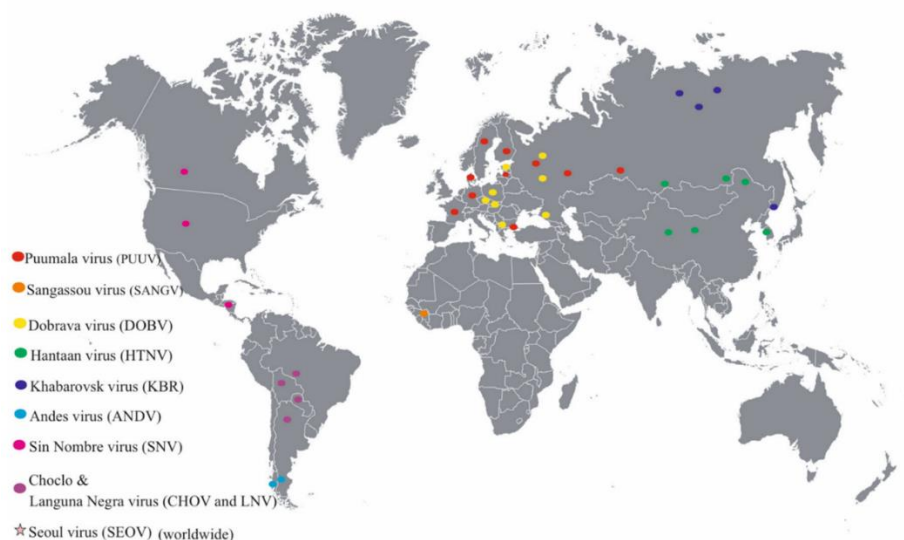
Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS) jest zachorowaniem epidemicznym występującym głównie w Azji i Europie. W Euroazji najczęstszą etiologią są ortohantawirusy HTNV, SEOV, PUUV i DOBV, z najcięższym przebiegiem choroby, wywołanej przez HTNV, DOBV i lżejszą postacią wywołaną przez SEOV, PUUV. W Europie najczęstszym zachorowaniem jest NE, łagodniejsza postać HFRS, wywołana przez PUUV, ciężko przebiegające zachorowania wywołuje DOBV, wirus ten krąży na Bałkanach, w Europie Środkowej, występuje też w Rosji. Co roku na świecie dokumentuje się około 200 000 przypadków HFRS, z których większość odnotowywana jest w Chinach, Korei i Rosji. Najwięcej, bo aż 90% wszystkich przypadków HFRS z całego świata rejestrowana jest w Chinach. W latach 1950–2014 w Chinach zgłoszono łącznie ponad 1,6 mln. przypadków i 47 tys. zgonów, śmiertelność wyniosła 2,89% [Jiang 2016 <sup>70</sup>]. W Chinach od 2008r. poprzez program szczepień ochronnych na terenach endemicznych zużywa się ok. 2 milionów dawek szczepionki przeciwko HTNV / SEOV - HFRS co spowodowało spadek liczby przypadków do mniej niż 20 000 rocznie [Liu 2020 <sup>112</sup>]. W Rosji w sumie od 2000r. zarejestrowano ponad 117 tys. przypadków, w tym u dzieci poniżej 14 r.ż. było 2800 chorych i we wszystkich grupach wiekowych zmarło 516 osób. Wirusy Sin Nombre (SNV), ANDV odpowiedzialne za HPS występują tylko na kontynencie amerykańskim, od 1993r. zarejestrowano ogółem ok. 1000 przypadków, szacuje się że z powodu niewystarczającego rozpoznania klinicznego liczba powinna być wyższa [Jiang 2016 <sup>70</sup>], [Avšič-Županc 2019 <sup>8</sup>], [Kabwe 2020 <sup>76</sup>]. Występowanie ortohantawirusów na świecie pokrywa się z zasięgiem geograficznym życia zwierząt rezerwuarnych, od których zaraża się człowiek, wyjątkiem jest kontynent australijski, gdzie hantawirusy identyfikowane są wśród zwierzęcych przenosicieli, natomiast nie notowany jest ich udział w zakażeniach ludzi, ale ten problem wyjaśnia się raczej prowadzoną niedostateczną diagnostyką kliniczną [Clement 2019 <sup>22</sup>]. Wirus Hantaan jest w dużej mierze ograniczony geograficznie do obszarów wiejskich

północno-wschodnich Chin, Korei i wschodniej Rosji, przenoszony jest przez myszarkę polną, *Apodemus agrarius* i jest główną przyczyną HFRS w tym regionie [Yu 2014 <sup>181</sup>]. W Korei występowanie gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym potwierdzono wykryciem w 1976 roku antygenu Hantaan wirusa w tkankach płuc i nerek *Apodemus agrarius* schwytanych w pobliżu linii demarkacyjnej wyznaczonej w zakończeniu wojny koreańskiej, na terenach gdzie opisano ogniska zachorowań nazwanych koreańską gorączką krwotoczną a od 1982r. nazywaną gorączką krwotoczną z zespołem nerkowym. W Korei następne identyfikacje hantawirusów dotyczyły Seoul wirusa w 1982r., Soochong wirusa w 2006r., Muju wirusa w 2007r., Imjin wirusa w 2009r., Jeju wirusa w 2012r. Potwierdzonymi czynnikami etiologicznymi HFRS są Hantaan, Seoul, Soochong i Muju wirusy, natomiast Imjin i Jeju wirusy zidentyfikowane u ryjówek koreańskich nadal mają ustaloną patogenność dla człowieka [Noh 2019 <sup>134</sup>]. *Orthohantavirus seoulense* izolowany jest od szczurów *Rattus norvegicus* i *Rattus rattus*, rezerwuaru epizootycznego występującego na całym Świecie, jest przykładem hantawirusa Starego i Nowego Świata SEOV czyli jedynym, który występuje globalnie. Występowanie SEOV poza Azją zidentyfikowano w Europie, Afryce, Ameryce Północnej i Ameryce Południowej, Australii, wszędzie powoduje zakażenia ludzi, uważa się, że tylko problematycznie nie jest potwierdzony w zakażeniach ludzi w Australii [Cross 2014 <sup>23</sup>], [Clement 2019 <sup>22</sup>]. *Orthohantavirus puumalaense* to jedyny hantawirus chorobotwórczy dla ludzi stwierdzany w Skandynawii - opisany w 1980r. przez zespół wirusologów fińskich [Brummer-Korvenkontio 1980 <sup>15</sup>]. *Orthohantavirus dobravaense* jest przykładem hantawirusa ze złożoną historią filogenetyczną na kontynencie europejskim, jest przenoszony przez myszarki *A. flavicollis*, *A. agrarius*, *A. ponticus* i występuje geograficznie w 4 genotypach: Dobrava (DOBV-Af) w południowo-wschodniej i środkowej Europie, Kurkino (DOBV-Aa) w zachodnio-północnej Europie i w centralnych regionach europejskiej części Rosji, Saaremaa (DOBV-Aa) w Estonii, Sochi (DOBV-Ap) w Rosji, w obszarze Morza Czarnego. Zachorowania DOBV-HFRS notowane są na Bałkanach, Grecji, Albanii, w Europie Środkowej tj. w Polsce, na Słowacji, w Czechach oraz w Niemczech, Rumunii, na Węgrzech, w Estonii, Rosji, Turcji [Klempa 2013 <sup>81</sup>], [Lee SH 2020 <sup>107</sup>]. W Stanach Zjednoczonych i Kanadzie *Orthohantavirus sinnombreense* jest odpowiedzialny za większość przypadków hantawirusów prowadzących do hantawirusowego zespołu płucnego (HPS). Poza Ameryką Północną pojedyncze przypadki i małe lokalizacje HPS zostały zgłoszone w Argentynie, Boliwii,

Brazylia, Chile, Ekwadorze, Paragwaju, Panamie, Urugwaju i Wenezueli. W Kolumbii, Kostaryce i Meksyku wirusy podobne do wirusa Sin Nombre znaleziono u gryzoni. Nie wiadomo, czy te konkretne hantawirusy powodują choroby u ludzi. *Orthohantavirus andesense* to hantawirus występujący u gryzoni w Ameryce Południowej i prowadzi do najcięższej postaci HPS. Andes hantawirus występuje głównie w Argentynie i Chile. Gryzonie w Stanach Zjednoczonych nie są nosicielami Andes wirusa, pierwsza potwierdzona zawleczona infekcja ANDV w Stanach Zjednoczonych miała miejsce w styczniu 2018 r., to był przypadek podróżnika powracającego z regionu Andów w Argentynie i Chile [Mull 2020 <sup>130</sup>], <https://www.cdc.gov/hantavirus/surveillance/international.html> [<sup>59</sup>]. Występowanie HFRS i HPS wśród ludności na świecie przedstawia - Ryc.5., rozmieszczenie geograficzne ortohantawirusów na świecie, będących przyczyną HFRS i HPS – Ryc.6.



Ryc.5. Występowanie HFRS i HPS wśród ludności na świecie. Źródło: Jiang, H., Zheng, X., Wang, L. *et al.* Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. *Virol. Sin.* 32, 32–43 (2017) [<sup>71</sup>].



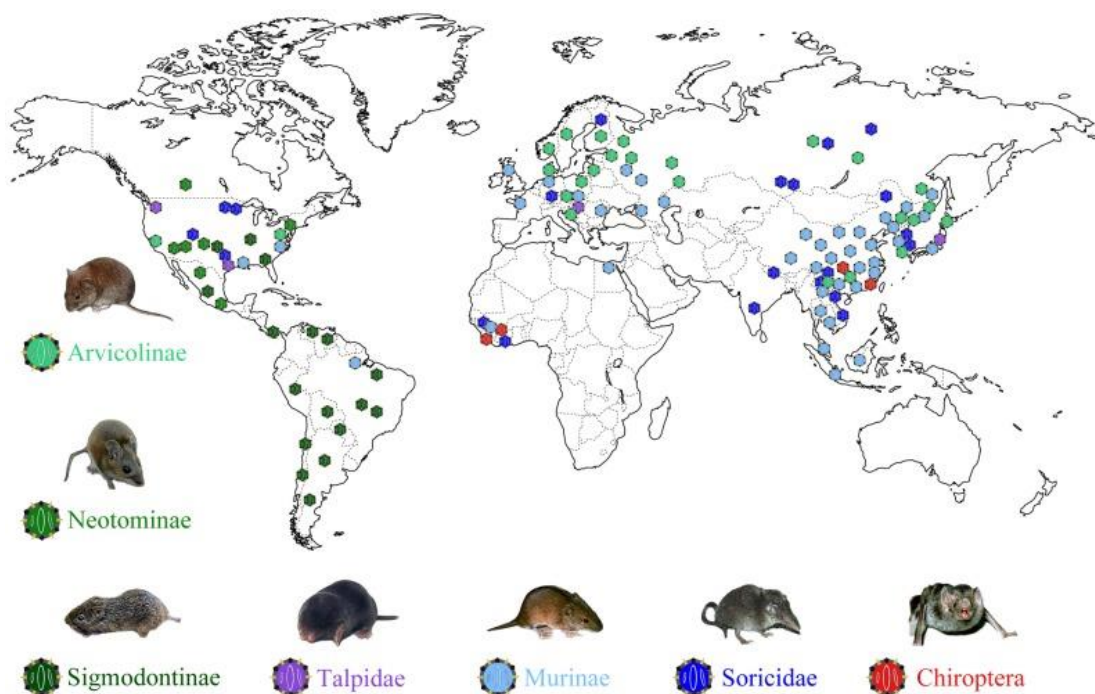
Ryc.6. Rozmieszczenie geograficzne ortohantawirusów na świecie. Źródło: Kabwe E et al., *Pathogens* 2020, 9(9), 775 [76].

### 3.3. Występowanie rezerwuarów zwierzęcych hantawirusów, wektorów zakażeń hantawirusowych.

Ortohantawirusy zakażają wiele gatunków ssaków, obecnie najczęściej potwierdzonych izolacji tych wirusów zidentyfikowano u gryzoni, następnie u owadożernych, w tym u ryjówek i kretów a ostatnio też u nietoperzy [Guo 2013 <sup>42</sup>], [Zhang 2014 <sup>184</sup>], [Holmes 2015 <sup>51</sup>]. Znanych jest ponad 80 gatunków naturalnych zwierząt rezerwuarowych, w tym co najmniej 51 gatunków wśród gryzoni, 20 gatunków ryjówek i kretów, 7 gatunków nietoperzy [de Oliveira 2014 <sup>27</sup>]. Zakażenie u wymienionych zwierząt jest długotrwałe i najpewniej utrzymujące się przez całe życie zwierzęcia (ang. persistent), bezobjawowe. Po 7-dniowej wiremii pojawiają pierwsze przeciwciała i utrzymują się do końca życia zwierząt, mają charakter neutralizujący w stosunku do replikującego wirusa, dlatego zwierzęta nie rozwijają objawów zakażenia ale wirusa zawsze można izolować z narządów tych zwierząt [Lee HW 1981 <sup>105</sup>], [Voutilainen 2015 <sup>173</sup>]. Wykazano, że między zwierzętami dochodzi do horyzontalnej transmisji [Kariwa 1998 <sup>79</sup>]. Hantawirusy stanowią źródło zakażeń innych wrażliwych zwierząt i człowieka, u którego są przyczyną chorób hantawirusowych odzwierzęcych. Obecnie uznaje się, że tylko wśród ortohantawirusów powiązanych relacjami wirus – gospodarz tj. gryzonie *Murinae*, *Arvicolinae* i *Sigmodontinae* można zidentyfikować gatunki patogenne dla człowieka [Ermonval 2016 <sup>30</sup>], stąd dla hantawirusów używa się epidemiologicznego (nie taksonomicznego) określenia “robowirusy” (ang. rodent-borne viruses).

Poszczególne gatunki ortohantawirusów związane są przeważnie z jednym lub z kilkoma blisko spokrewnionymi gatunkami gospodarza [Plyusnin 2001 <sup>148</sup>]. Była rozpatrywana także droga przeniesienia zakażenia pomiędzy gryzoniem a człowiekiem przez roztocza (żukowce glebowe/gamasidy i roztocza żniwne/trombikulidy), które brano pod uwagę jako źródło zakażenia gryzoni oraz wektor transmisji zakażenia na inne zwierzęta i człowieka, problem jest otwarty i czeka na potwierdzenie pomimo dość istotnych przesłanek dotyczących tego potencjalnego źródła i wektora HFRS [Yu 2014 <sup>181</sup>]. Obecnie uważa się, że zakażenia hantawirusowe grupują się jako rodent-borne infection dla gryzoni i człowieka, soricid-borne infection dla owadożernych, w tym shrew-borne infection dla ryjówek, talpid-borne infection dla kretów oraz bat-borne infection dla nietoperzy. Zestawienie tak przedstawianych zakażeń hantawirusowych jest pewnym nadużyciem, ponieważ przywołują skojarzenie grup zakażeń wektorowych innych chorób ludzi takich jak arbowirusy (ang. arthropod borne viruses), natomiast na obecnym poziomie wiedzy potwierdza się tylko rodent-borne infection dla zakażeń ludzkich [Song 2007 <sup>162</sup>]. Naturalny zasięg występowania zwierzęcych gospodarzy ortohantawirusów kształtuje zasięg krążenia wirusów. Nornica ruda *Myodes glareolus*, jako naturalny gospodarz Puumala virus żyje na rozległym terenie od północnej Hiszpanii po Syberię i od Bałkanów po północną Skandynawię, w siedliskach leśno-stepowych i leśnych, gdzie znajduje pożywienie i schronienie, w związku z czym PUUV występuje w Europie Zachodniej, Środkowej, na Półwyspie Skandynawskim, na Bałkanach i w Rosji [Kabwe 2020 <sup>76</sup>], <https://www.iucnredlist.org/species/4973/197520967> [<sup>64</sup>]. Myszarka leśna *Apodemus flavicollis*, naturalny rezerwuar DOBV występuje od Anglii poprzez większą część kontynentalnej Europy, od północnej części Hiszpanii aż do Uralu w Rosji, na Półwyspie Skandynawskim tylko w zachodnio-południowej części oraz od wschodniej Turcji do zachodniej Armenii, środowisko występowania to przede wszystkim lasy mieszane, lasostepy, trawiaste pola, <https://www.iucnredlist.org/species/1892/197269879> [<sup>62</sup>]. Myszarka polna *Apodemus agrarius*, naturalny rezerwuar i przenosiciel HTNV zamieszkuje lasy i stepy Europy Środkowej i Wschodniej, oraz dużą część Palearktycznej Azji. Występuje w dwóch populacjach. W zachodniej – od wschodnich Niemiec i Danii przez Polskę, europejską część Rosji i południe Syberii aż po okolice jeziora Bajkał; na północnym zachodzie obszar ten sięga południowej Finlandii, na południowym zachodzie sięga po północne Włochy, a na południowym wschodzie rozciąga się po Kirgistan. W populacji

wschodniej obejmuje południową część rosyjskiego Dalekiego Wschodu, wschodnią Mongolię, wschodnie Chiny, Tajwan i Półwysep Koreański [Latinne 2020 <sup>100</sup>], [https://www.iucnredlist.org/species/1888/115057408 <sup>61</sup>]. *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* to zwierzęta rezerwurowe i przenosiciele SEOV pochodzące z wschodniej Azji, rozprzestrzenione są obecnie na wszystkich zamieszkałych przez człowieka kontynentach jako gatunki synantropijne. Występują na terenach nizinnych i przybrzeżnych jako gatunki naziemny (*R. norvegicus*) i w lasach, krzewach, użytkach zielonych, w terenie podmokłym jako gatunek naziemny, nadrzewny lub komensalny (*R. rattus*). *R. norvegicus* w zasięgu naturalnym zamieszkuje Chiny, Japonię, Rosję, w zasięgu ekspansywnym występuje w całej Europie, w zachodniej, centralnej i na obrzeżach wschodnich Rosji i w Indonezji. *R. rattus* w zasięgu naturalnym zamieszkuje Indie i Pakistan, w zasięgu ekspansywnym występuje w Europie poza Skandynawią, środkową Europą i Anglią, w południowej i wschodniej Azji, w Indonezji, wzdłuż wybrzeży Afryki [https://www.iucnredlist.org/species/19353/165118026 <sup>63</sup>]. Rozmieszczenie rezerwuaru zwierzęcego i przenosicieli hantawirusów na świecie podaje – Ryc.7.



Ryc.7. Rozmieszczenie rezerwuaru zwierzęcego i przenosicieli hantawirusów na świecie. Źródło: Guo WP et al., PLoS Pathog. 2013 Feb;9(2):e1003159 [42].

### **Ewolucjonizm czynników etiologicznych i gospodarzy zwierzęcych.**

Hantawirusy rozprzestrzenione są na całej kuli ziemskiej w sposób ogniskowy, ich lokalizacje są odzwierciedleniem występowania zwierząt rezerwuwarowych (naturalnych gospodarzy) [Guo 2013 <sup>42</sup>], [Kabwe 2020 <sup>76</sup>]. Obecnie uważa się, że do ewolucji hantawirusów przyczyniła się historia zdarzeń wielu czynników. Zasadniczą rolę odegrała transmisja międzygatunkowa, która odbywała się także na wyższych poziomach taksonomicznych hantawirusów niż tylko wśród gatunków. Zanim hantawirusy pojawiły się u gryzoni prawdopodobnie miały pierwszych przodków wśród owadożernych nietoperzy (*Chiroptera*) lub owadożernych ryjówek i kretów (*Soricomorpha*) [Guo 2013 <sup>42</sup>]. Nietoperze są po gryzoniach drugą grupą ssaków zamieszkującą wszystkie kontynenty oprócz Antarktydy, miały duże znaczenie w przeszłości w przenoszeniu infekcji a i teraz są uznanym rezerwuarem i przenosicielem wirusów patogennych dla ludzi np. Ebola wirusa, Marburg wirusa, Nipah wirusa, Hendra wirusa, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 [Letko 2020 <sup>108</sup>]. Wskazuje się obecnie, że były najprawdopodobniej w przeszłości główną grupą zwierząt zakażoną hantawirusami, od której hantawirusy rozeszły się i opanowały inne rezerwuary, w tym obecnie najlepiej przebadane gryzonie [Witkowski 2016 <sup>176</sup>]. Ważną płaszczyzną ewolucji była współspecjacja hantawirus - żywiciel, wspólna migracja, adaptacja do zmieniających się warunków. Hantawirusy ewoluowały ze swoimi naturalnymi gospodarzami, dlatego nie są dla nich patogenami [Ermonval 2016 <sup>30</sup>]. Wskazuje się także, że procesy ewolucyjne hantawirusów są znacznie bardziej złożone, ponieważ identyfikuje się znacznie większe geograficzne zróżnicowanie genetyczne hantawirusów niż gryzoni, ich nosiciele. Badania wskazują na występowanie czterech odrębnych grup filogenetycznych: hantawirusów od azjatyckich ryjówek (*Soricidae*) (klad I); hantawirusów od azjatyckich nietoperzy (*Chiroptera*) oraz europejskich kretów (*Talpidae*) (klad II), jest najbardziej rozbieżną grupą; hantawirusy od owadożernych azjatyckich, europejskich, z Ameryki Północnej, Afryki (*Soricomorpha*) i od gryzoni azjatyckich i europejskich (*Murinae*) (klad III); hantawirusy od gryzoni azjatyckich, europejskich, z Ameryki Północnej (*Arvicolinae*), od gryzoni Nowego Świata (*Neotominae*, *Sigmodontinae*) (klad IV) [Yanagihara 2014 <sup>179</sup>]. Wielki wpływ na ewolucjonizm hantawirusów miały powtarzające się okresy zlodowaceń, zwłaszcza na półkuli północnej, przesuwanie naturalnych granic życia na inne tereny, powstawanie barier w naturalnym zasięgu występowania i powodowane tym migracje zwierząt rezerwuwarowych przyczyniły się do

współistnienia w niektórych regionach różnych zwierząt rezerwuuarowych a także do grupowanie się wariantów genetycznych hantawirusów jako gatunków geograficznie specyficznych. Zakażenia człowieka jako tzw. „ślepe ogniwo” w transmisji zakażeń hantawirusowych nie wpłynęło na ich ewolucję *Hantavirus* [Plyusnin 2001 <sup>148</sup>].

### **3.4. Ekologia zakażeń - czynniki biotyczne, abiotyczne (klimatyczne) wpływające na rozprzestrzenianie się zakażeń hantawirusowych.**

#### **Temperatura**

Hantawirusy są stabilne w środowisku nie tracąc zakaźności przez ponad 18 dni w temperaturze od -20°C do 4°C a przez 10 – 15 dni w temperaturze pokojowej i 24 godziny w temperaturze ok. 37°C a w warunkach wysuszenia w 56°C po 1 godz. cząstki wirusa są nadal zakaźne. Do zakaźności nie jest wymagana bezpośrednia obecność nosiciela zwierzęcego, środowisko nieożywione w pośredni sposób umożliwia zakażenie wrażliwych organizmów tak zwierzęcych, jak i ludzi [Liu 2020 <sup>112</sup>], [Riccò 2021 <sup>154</sup>], [Kallio 2006 <sup>77</sup>].

#### **Środowisko życia rezerwuuaru i przenosicieli zwierzęcych.**

Wśród zwierząt będącymi ich przenosicielami, ortohantawirusy najefektywniej rozprzestrzeniają się horyzontalnie [Yasuda 2021 <sup>180</sup>], sprzyja temu ruch wędrowkowy zwierząt w celu zdobycia pożywienia, przetrwania suszy czy zimy, znalezienia partnera rozrodczego [Piłacińska 2005 <sup>146</sup>], [Tian 2019 <sup>169</sup>]. Wpływ na migracje zwierząt rezerwuuarowych mają czynniki biotyczne (żywnościowe) i abiotyczne (klimatyczne) oraz występowanie naturalnych barier środowiskowych ograniczających wędrówki zwierząt. W sprzyjających warunkach natłoku osobników w danym siedlisku dochodzi do bezpośredniego przekazywania wirusa wśród zwierząt, dotyczy to głównie populacji młodych pokoleń, osobniki młode zarażają się od swoich matek lub bezpośrednio z najbliższego środowiska [Ferro 2020 <sup>31</sup>]. Samo ukształtowanie terenu – możliwość utworzenia siedlisk, lesistość – możliwość zakładania gniazd, klimat – temperatura i opady korelują z zagęszczeniem występowania zwierząt w środowisku i z ich mikroewolucją, co z kolei przyczynia się do zmienności samych hantawirusów. Można powiedzieć, że ekologia wpływa na życie zwierząt i na ich współbytujące z nimi hantawirusy [Razzauti 2021 <sup>151</sup>]. Zauważono, że zwiększona ilość pożywienia dla nornicy rudej w tak zwanych „latach

nasiennych” - „mast years” (obfitych w nasiona roślin, będących podstawą diety gryzoni) ma powiązanie „ekologiczne” z wybuchami ognisk nefropatii epidemicznej u ludzi powodowanych Puumala wirusem. Opady, utrzymująca się wilgotność jest także pozytywnie skorelowana z populacją gryzoni i występowaniem HFRS w trzecim i czwartym kwartale roku [Jiang 2017 <sup>69</sup>]. Zwiększona ilość przypadków HFRS wiąże się z pewną sezonowością i cyklicznością, powiązania nie mają jednak trwałych wzorów występowania, są zróżnicowane w różnych obszarach, ze względu na udział innych czynników zewnętrznych wpływających na liczebność i zagęszczenie zwierząt, przykładem jest występowanie zwierząt drapieżnych ograniczających występowanie gryzoni [Tian 2019 <sup>169</sup>], [Min 2020 <sup>126</sup>], [Voutilainen 2016 <sup>172</sup>]. Zaobserwowano też inną korelację, która wcześniej nie była brana pod uwagę z powodu, jak się wydawało braku negatywnego wpływu hantawirusów na zakażone zwierzęta rezerwuarowe. Przykładem takiej korelacji jest Puumala virus, który dla swojego gospodarza, nornicy rudej jest czynnikiem wpływającym na zdolność przeżycia zimy, w populacjach zakażonych istnieje wyraźna ujemna korelacja między częstością zakażenia PUUV wśród tych zwierząt w okresie jesieni a wielkością i gęstością populacji wiosennej, badanie to podważa dotychczasowy pogląd, że zwierzęta gospodarze nie przechorowują zakażenia hantawirusowego [Kallio 2007 <sup>78</sup>].

### **3.5. Grupy narażonych na zakażenia hantawirusowe. Okoliczności zarażania się.**

We wszystkich lokalizacjach zakażeń hantawirusowych na świecie, w przypadkach indywidualnych i w wybuchających ogniskach epidemicznych można wskazać podobne narażenie ludzi:

- *narażenie pobytowe / środowiskowe* - ludność wiejska mieszkająca i pracująca w terenie rolniczym, lesistym lub przebywająca czasowo w swoich sezonowych domostwach
- *narażenie zawodowe* - leśnicy przebywający ze względu na swój charakter pracy w terenie lesistym oraz w sąsiedztwie pól, nieużytków, łąk
- *narażenie związane z pełnieniem służby wojskowej* – żołnierze stacjonujący w terenie rolniczym, lesistym, biorący udział w manewrach na poligonach
- *narażenie miejskie* – ludność mieszkająca lub odwiedzająca miasta z dużym arealem terenów zadrzewionych, łąk, nieużytków, ze starymi zabudowaniami, kanałami
- *rekreacyjne* – turyści, wędkarze, działkowicze przebywający w środowisku naturalnym gryzoni

- *związane ze sprzedażą gryzoni* jako zwierząt domowych – sprzedający i klienci sklepów zoologicznych
- *związane z organizacją pokazów gryzoni*, objazdowym „mini ZOO” – właściciele i biorący udział w spotkaniach np. dzieci w żłobkach, przedszkolach, szkołach
- *związane z odławianiem gryzoni* – tak zawodowo jak i w swoich domostwach
- *narażenie laboratoryjne* – w zwierzętarniach, do których odławia się wolno żyjące gryzonie – pracownicy uczelniani techniczni, naukowci i studenci oraz pracownicy weterynaryjni, medyczni różnych instytucji

[Clement 2019 <sup>22</sup>], [Ricco 2021 <sup>154</sup>], [Lee HW 1982 <sup>103</sup>], [Lee HW 1982 <sup>104</sup>], [Markotić 2002 <sup>118</sup>].

Najbardziej znaczącą drogą wtargnięcia hantawirusów do organizmu ludzkiego jest wdychanie zakaźnego aerozolu unoszącego się z powierzchni skażonego środowiska (droga aerogenna), bądź poprzez bezpośredni kontakt z zakażonymi zwierzętami. Skażenie środowiska i aerozolu pochodzi z wydaliny i wydzielin zakażonych gryzoni, najczęściej z moczu, kału, śliny gryzoni. Orthohantawirusy utrzymują swoją zakaźność poza organizmem gospodarza w środowisku zewnętrznym nawet przez kilkanaście dni w sprzyjających warunkach temperatury w środowisku kurzu, ściółce. Środowisko naturalne bierze udział w transmisji zakażenia [Kallio 2006 <sup>77</sup>]. Wykonywanie takich czynności jak zamiatanie, młócenie i innych czynności rolniczych, przenoszenie składowisk, czołganie się w terenie i wykonywanie innych czynności wojskowych np. na poligonie, spanie bezpośrednio na ziemi, słomie, w drewnianych opuszczonych domach, szałasach są ryzykowne, ponieważ wzmożony ruch powietrza wprowadza cząstki zakaźne z powierzchni na wysokość umożliwiającą wtargnięcie wirusów poprzez nozdrza i dostania się do płuc człowieka [Jiang H 2006 <sup>70</sup>]. W terenie endemicznego występowania HFRS zawsze występują okoliczności przeniesienia zakażenia, ze względu na obecność rezerwuaru zwierzęcego, który na ogół nie wyraża objawowo zakażenia, nie widać padłych zwierząt, co dodatkowo nie alarmuje ludzi i powoduje swobodne użytkowanie tych terenów. Należy jeszcze zaznaczyć, że znaleziono materiał genetyczny Puumala wirusa w ślinie pacjentów, co może wskazywać na możliwe inne narażenie i przeniesienie zakażenia przez ślinę (droga kontaktowa) [Pettersson 2008 <sup>144</sup>], podobnie jak w przypadku bliskich kontaktów np. rodzinnych przy infekcji Andes wirusem. *Orthohantavirus andesense* jest obecnie jedynym potwierdzonym orthohantawirusem, który może przenosić się z człowieka na człowieka, kontakt ok. 1 godziny w bliskim sąsiedztwie chorego wystarcza do

zakażenia drugiego człowieka [https://www.cdc.gov/hantavirus/surveillance/international.html <sup>59</sup>]. W 1996r. w Argentynie doszło do przypadku przeniesienia ANDV między osobami pozostających w bliskim lub długotrwałym kontakcie np. w kontakcie domowym [Padula 1998 <sup>139</sup>]. W 2018 - 2019r. sytuacja przeniesienia hantawirusa z człowieka na człowieka rozgrywała się w innych okolicznościach, z jednego przypadku zakażenia odzwierzęcego, poprzez trzy zainfekowane osoby, które uczestniczyły w jednej uroczystości nastąpiło przeniesienie infekcji na kolejne osoby, w sumie zachorowało 34 osoby, z których 11 zmarło. Osoby, które rozprzestrzeniały wirusa miały wysoką wiremę i uszkodzenie wątroby, co sprzyjało siewstwu ANDV [Martínez 2020 <sup>119</sup>]. Kolejną okoliczność narażenia ludzi na zakażenie hantawirusowe bada się w kontekście udziału dodatkowego wektora, jakim są roztocza pasożytujące na gryzoniach, które też mogą przenosić zakażenie na człowieka [Yu 2014 <sup>181</sup>].

### **3.6. Ogniska zachorowań, endemie, epidemie, pojedyncze zachorowania u ludzi. Enzoocja i epizoocja wśród zwierząt.**

Obserwuje się korelację między gatunkami zwierząt przenosicieli/wektorów a występowaniem zachorowań wśród ludności [Ermonval 2016 <sup>30</sup>] oraz zależność występowania hantavirus disease (HVD) u ludzi od poziomu zakażenia zwierząt rezerwuarnych. U zwierząt na danym terenie występuje enzootia, czyli dość stała obecność zakażeń hantawirusami u zwierząt, w okresach sprzyjających pojawia się u zwierząt epizoocja, jako okres wzrostu zakażeń, po czym dochodzi do spadku zakażeń wśród zwierząt i kolejnego powrotu do okresu enzoocji. Zakażenia wśród ludzi występują także z różnym nasileniem, podobnie jak u zwierząt rejestruje się zakażenia endemiczne związane z utrwalonym rezerwuarem zakażenia wśród zwierząt, zakażenia epidemiczne ze znacznym wzrostem zapadalności na HVD ale także zakażenia mogą wystąpić w formie zakażeń pojedynczych i lokalnych ognisk epidemicznych. Wzrost zachorowań u ludzi pojawia się w ciągu roku kalendarzowego w szczytach wiosennych i jesienno-zimowych, ale pojedyncze zachorowania notuje się stale w ciągu każdego roku. Wygaszanie zachorowań wśród ludzi może odbyć się między innymi poprzez ograniczenie zakażeń wśród zwierząt [Wang 2016 <sup>174</sup>].

#### **4. ZASTOSOWANIE METOD DIAGNOSTYKI LABORATORYJNEJ DO WYKRYWANIA HANTAWIRUSÓW W MATERIALE LUDZKIM**

W odpowiedzi humoralnej organizmu na zakażenie hantawirusem powstają swoiste przeciwciała, które są skierowane przeciwko białkom strukturalnym hantawirusa, czyli przeciwko białku N (nukleokapsydu), glikopeptydom Gn i Gc (wypustek; ang. spike). W diagnostyce laboratoryjnego rozpoznawania udziału hantawirusów w zakażeniach organizmów wykorzystuje się te swoiste przebiegające reakcje immunologiczne. W surowicy pacjenta można stwierdzić pierwsze przeciwciała w 3 – 5 dniu od wystąpienia objawów chorobowych, tj. po zakończeniu wirerii. Przeciwciała IgM powstają szybko, maksymalny poziom osiągają w 7 – 11 dniu choroby a w fazie zdrowienia pacjenta rozpoczyna się ich spadek mogą utrzymywać się dość długo, nawet przez kilka miesięcy [Tariq 2022 <sup>167</sup>]. Przeciwciała IgA wykrywa się w surowicy pacjentów na dużym poziomie od ostrej fazy zakażenia do początku zdrowienia, potem ich poziomy spadają, mogą utrzymywać się także dość długo ale mimo tego uważa się, że uzupełniają diagnostykę potwierdzającą wczesne stadium infekcji tak jak wykrycie przeciwciał IgM, najczęściej identyfikuje się przeciwciała IgA skierowane przeciwko białku N i glikopeptydom Gn i Gc [de Carvalho Nicacio 2000 <sup>25</sup>]. W ostrej fazie choroby można też wykryć wysoki poziom przeciwciał IgE, zagadnienie powiązania IgE z procesem chorobowym HFRS jest nadal słabo przebadane, obecnie nie ma zastosowania w serodiagnostyce HFRS [Alexeyev 1994 <sup>3</sup>]. Wykrycie przeciwciał IgG w diagnostyce infekcji hantawirusowych jest patognomicznie potwierdzające zakażenie, które jest aktywne bądź, które przebiegało w przeszłości. Swoistość przeciwciał IgG skierowanych przeciwko białku N, glikoproteinom Gn i Gc jest większa aniżeli innych wykrywanych przeciwciał, dlatego stanowi główną oś badań serologicznych w rozpoznaniu HFRS czy HPS. Przeciwciała IgG są wykrywane dość szybko, bo w ok. 7 dniu (od początku wystąpienia objawów) i utrzymują się przez wiele lat, są badania wykazujące 50-letnie utrzymywanie się przeciwciał antyhantawirusowych [Bergstedt 2016 <sup>11</sup>]. Jeżeli chodzi o podklasy IgG, to najbardziej znamienne są przeciwciała IgG1 i IgG3, ponieważ w przebiegu HFRS to ich poziomy znacząco wzrastają (IgG2 po wdrożeniu w ostrej fazie utrzymują się na tym samym poziomie). W fazie zdrowienia u pacjentów stwierdza się najwyższe poziomy IgG3 skierowane przeciwko białku N i glikopeptydom Gn a u pacjentów z krwawieniami w przebiegu choroby identyfikuje się także przeciwciała IgG4, które są jeszcze

wykrywane przez co najmniej 10 lat. W rutynowych badaniach nie prowadzi się analiz podklas IgG [Lundkvist 1993 <sup>113</sup>]. Ogólnie w serodiagnostyce HFRS najczęściej surowice pacjentów są badane w klasach IgM i IgG skierowanych przeciwko antygenom białka N, w mniejszym stopniu identyfikuje się przeciwciała przeciwko glikoproteinom Gn i Gc, choć te są uznawane za przeciwciała neutralizujące hantawirusy [Xu 2002 <sup>178</sup>]. W podobny sposób wykrywa się przeciwciała antyhantawirusowe u zwierząt rezerwuarowych, problemem jest jednak serologiczne wyszukiwanie nowych zwierząt mogących przenosić ortohantawirusy, ponieważ nie można wykorzystać już przygotowanej diagnostyki do wykrywania krzyżowego przeciwciał przeciwko wirusom przenoszonym przez inne zwierzęta [de Oliveira 2021 <sup>26</sup>]. Inne metody wykrywania ortohantawirusów w materiale ludzkim i zwierzęcym zawiera - Zał.1.

## **CEL PRACY**

1. Próba odpowiedzi na pytanie: Czy w Polsce występują rodzime przypadki zakażeń hantawirusowych u ludzi? po stwierdzeniu w roku 2004 przypadku indeksowego (opublikowanego w 2006r.) i wprowadzeniu badań nad wykryciem i charakterystyką etiologiczną (wirusologiczną), kliniczną i epidemiologiczną zakażeń ortohantawirusam ludzi w Polsce w latach 2004 – 2018.
2. Ustalenie udziału (odsetka) hantawirusów DOBV i PUUV w przypadkach zachorowań na HFRS, z uwzględnieniem danych epidemiologicznych obu grup.
3. Przedstawienie cech charakterystycznych przebiegu klinicznego (wraz z danymi laboratoryjnymi) DOBV-HFRS i PUUV-HFRS u osób hospitalizowanych w latach 2004-2018, uściślane przeprowadzonym na bieżąco badaniem ankietowym.
4. Wstępna analiza sytuacji epidemiologicznej zakażeń ortohantawirusowych ludzi na terenach objętych badaniami wraz z próbą ich ekstrapolacji na sytuację endemiczną w Polsce.

### III. MATERIAŁY I METODY BADAŃ

W latach 2007 – 2018 próbki do badań pobierano na bieżąco, od osób hospitalizowanych z podejrzeniem zakażenia hantawirusowego. Przebadano także retrospektywnie zamrożone próbki, pozyskane w latach 2004 – 2007 w województwie podkarpackim i lubelskim od osób nie wykazujących objawów HFRS. Podstawą rozpoznania etiologii zakażeń hantawirusowych oraz potwierdzenia udziału hantawirusów w zakażeniach / zachorowaniach ludzi były badania serologiczne stwierdzające obecność swoistych przeciwciał antyhantawirusowych w klasie IgG, IgM. Od 28.09.2007r. do 31.12.2018r. przeprowadzono ogółem 1370 badań surowic ludzkich, w tym było 721 badań diagnostycznych klinicznych, 468 z narażenia zawodowego od osób bez objawów chorobowych (leśnicy, zoolodzy), 181 z narażenia środowiskowego, pobytowego od osób bez objawów chorobowych (rezydenci DPS-ów, współdomownicy osób z rozpoznaną HFRS) – Tab.3. U osób z podejrzeniem HFRS przeprowadzano także badania przeciwciał anty-*Leptospira*, w celu rozpoznania drugiej zoonozy wywołanej czynnikiem bakteryjnym, który przenosi się na człowieka przez kontakt z tym samym rezerwuarem zwierzęcym – gryzoni, jest więc możliwa koinfekcja ortohantawirusami i krętkiem *Leptospira*, ogółem takich badań w okresie 2007 – 2018 wykonano 371, w tym u 114 chorych, którzy mieli potwierdzone rozpoznanie zachorowanie HFRS i w tej grupie zidentyfikowano w 2 przypadkach PUUV-HFRS koinfekcję *Leptospira*, natomiast u pozostałych 257 chorych, u których nie potwierdziło się zachorowanie na HFRS zidentyfikowano 12 przypadków możliwej leptospirozy.

#### **Pobieranie krwi do badań serologicznych**

Krew pobierano w ilości ok. 5 mL z żyły łokciowej, próbki krwi po dostarczeniu do laboratorium były odwirowywane przy 2500-3000 rpm przez 10 min., surowicę ściągano znad osadu krwinek do kilku plastikowych probówek po ok. 500  $\mu$ L, jedną z probówek wykorzystywano do badań serologicznych bieżących, pozostałe były mrożone i przechowywane w temp. minus 20<sup>0</sup>C $\pm$ 1<sup>0</sup>C, w celu utworzenia kolekcji surowic do kolejnych badań. Surowice przed badaniem diagnostycznym, tak jak i inne odczynniki diagnostyczne wykorzystywane do wykonania testów serologicznych były poddawane wyrównywaniu temperatur w temperaturze otoczenia.

## **1. Badania serologiczne**

Badania diagnostyczne były prowadzone dwuetapowo, w pierwszym etapie wykonywano badanie immunoenzymatyczne ELISA, surowice seronegatywne /niereaktywne nie podlegały dalszej weryfikacji w testach serologicznych wykonywanych w drugim etapie, natomiast surowice reaktywne w badaniu immunoenzymatycznym (ELISA) były testowane w drugim etapie w technice immunoblottingu (IB) i/lub immunofluorescencji pośredniej (IIFT), w wyniku końcowym otrzymywano nie tylko potwierdzenie obecności swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych IgM i/lub IgG ale też odczytywano najsilniejszą reakcję serologiczną związaną z daną grupą antygenową hantawirusów.

### **Stosowane testy diagnostyczne**

W procedurze badań serologicznych używano testów komercyjnych, odczynniki były przechowywane w temp. chłodni +2°C do +8°C i przygotowywane do użytku poprzez stabilizowanie w temperaturze +18°C do +25 °C przez 30 min., odczynniki przechowywane w temp. pokojowej były gotowe do użytku. Zestawy odczynnikowe zawierały wszystkie odczynniki potrzebne do wykonania pełnej analizy przeciwciał anty-hantawirusowych. W celu sprawdzenia jakości stosowanych testów używano kontroli pozytywnej dostarczonej przez producentów testów, kontrole pozytywne były przygotowywane w rozcieńczeniu jak próbki badawcze albo były w formie gotowej do użytku w danej analizie. W przypadku analizy przeciwciał IgM używano odczynnika absorbentu przeciwciał IgG / RF (czynnika reumatoidalnego), aby podczas reakcji immunologicznej między antygenem a badaną klasą przeciwciał IgM zmniejszyć wpływ konkurencyjny przeciwciał IgG, które mogłyby podwyższać nieswoiście odczyt przeciwciał IgM lub odwrotnie blokować odczyt IgM. W każdej zastosowanej metodzie serologicznej tj. ELISA, IIFT i IB poniżej podano najważniejszy sprzęt laboratoryjny używany w metodzie, ogólny skład zestawu odczynnikowego, poziom rozcieńczenia próbek badawczych, dla których test był zwalidowany przez producenta oraz prowadzone etapy analizy serologicznej w celu wykrycia przeciwciał anty-hantawirusowych i anty-*Leptospira*, następnie podano szczegółowe kryteria interpretacji wyników tych badań serologicznych.

## **ELISA ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

**Test immunoenzymatyczny (Hantaan IgG/IgM ELISA oraz Puumala IgG/IgM ELISA firmy PROGEN)** wykorzystuje antygeny rekombinowane białka nukleokapsydu szczepu CG 76-118 (Hantaan) oraz szczepu CG 18-20 (Puumala). Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu - Hantaan IgG/IgM ELISA, PROGEN; Puumala IgG/IgM ELISA, PROGEN. Zestaw odczynnikowy zawierał:

- mikropłytkę 96-dołkową titracyjną opłaszczoną antygenami Puumala lub Hantaan
- kontrolę pozytywną IgG, ludzką
- kontrolę pozytywną IgM, ludzką
- kontrolę referencyjną IgG, ludzką
- kontrolę referencyjną IgM, ludzką
- kontrolę negatywną, ludzką
- bufor do rozcieńczania próbek (PBS pH=7,4 z 0,01% detergentem timerosalem)
- bufor płuczący (PBS pH=7,5 z 0,01% detergentem timerosalem)
- koniugat anti-IgG ludzkiej znaczonej peroksydazą
- koniugat anti-IgM ludzkiej znaczonej peroksydazą
- substrat tetrametylobenzydyna
- roztwór stopujący – 0,5 M kwas siarkowy
- IgG/RF (czynnika reumatoidalnego)
- użyty sprzęt laboratoryjny: Analizator ELISA miniBOS, nr S 1972, ADALTIS S.r.l.; Czytnik ELISA Expert Plus; G020.150; ASYS HITECH GmbH; Płuczka Atlantis; G021.101; ASYS HITECH GmbH; ciepłarka inkubator laboratoryjny NuAire, NU-4750E, NuAire Lab Equipment
- test wykonywano w mikropłytkach titracyjnych dostarczonych w zestawie odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG dla PUUV i HTNV (dla jednego badanego przeznaczano cztery zestawy odczynnikowe)
- rozcieńczenia próbek: 5µL badanej surowicy rozcieńczano w 1000 µL buforu do rozcieńczeń próbek i mieszano poprzez pipetowanie, w przypadku analizy przeciwciał IgM do 250 µL rozcieńczonej próbki dodawano 15 µL absorbent IgG/RF i inkubowano w temp. pokojowej (+20°C do +26°C) przez 30 min.
- badanie prowadzono w etapach:

1. inkubacja próbek – na poszczególne dołki mikro płytki nanoszono po 100  $\mu$ L kontroli negatywnej, kontroli pozytywnej IgG, kontroli referencyjnej IgG, kontroli pozytywnej IgM, kontroli referencyjnej IgM i rozcieńczonej próbki badanej, następnie płytkę inkubowano w 37°C przez 45 min. a po tym czasie płukano czterokrotnie każdy dołek 200  $\mu$ L buforu płuczającego
2. inkubacja z koniugatami - na poszczególne dołki mikro płytki nanoszono po 100  $\mu$ L koniugatu (odrębnie IgM i IgG) i inkubowano w 37°C przez 45 min. a po tym czasie płukano czterokrotnie każdy dołek 200  $\mu$ L buforu płuczającego
3. inkubacja z substratem - na poszczególne dołki mikro płytki nanoszono po 100  $\mu$ L substratu i inkubowano w temp. pokojowej (+20°C do +26°C) przez 30 min.
4. zatrzymanie reakcji – następowało po dodaniu do poszczególnych dołków po 100  $\mu$ L roztworu stopującego
5. odczyt absorbancji próbek prowadzono przy długości fali 450 nm i referencyjnej długości 650 nm.

Wyniki odczytywano wg kryteriów podanych przez producenta testu. Obecność przeciwciał IgG anty-*Hantavirus*, wynik pozytywny dla obu serotypów ustalono na poziomie odczytywanego współczynnika powyżej 1,5; brak przeciwciał IgG anty-*Hantavirus*, wynik negatywny dla obu serotypów ustalono na poziomie niższym niż 1,0; wynik w strefie szarej, wątpliwy ustalono na poziomie pomiędzy 1,0 – 1,5 wartości odczytywanego współczynnika. Obecność przeciwciał IgM anty-*Hantavirus* (wynik pozytywny) dla obu serotypów ustalono na poziomie współczynnika wyższym niż 2,0; brak przeciwciał IgM anty *Hantavirus* wynik negatywny dla obu serotypów ustalono na poziomie niższym niż 1,0; wynik w szarej strefie ustalono na poziomie pomiędzy 1,0 – 2,0 wartości odczytywanego współczynnika. Wyniki formułowano w kategorii jakościowej: przeciwciała klasy IgG / IgM anty-*Hantavirus* obecne/nieobecne, oraz w kategorii ilościowej określając stosunek OD (*Optic Density*) badanej próbki do OD surowicy referencyjnej.

**Test immunoenzymatyczny IgG/IgM ELISA Hantavirus Pool 1 „Eurasia” firmy EUROIMMUN** wykorzystuje antygeny rekombinowane, mieszaniny białek nukleokapsydów wirusów Hantaan, Puumala oraz Dobrava-Belgrade. Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu - IgG/IgM ELISA Hantavirus Pool 1 „Eurasia”, EUROIMMUN, Lübeck, Germany. Zestaw odczynnikowy zawierał:

- mikroplótkę 96-dołkową titracyjną opłaszczoną spulowanymi antygenami Puumala, Dobrava, Hantaan
- kontrolę pozytywną IgM, ludzką
- kontrolę referencyjną IgM, ludzką – kalibrator M
- bufor do próbek zawierający absorbent IgG/RF (czynnika reumatoidalnego)
- koniugat anty-IgM ludzkiej znaczonej peroksydazą (kozi)
- kontrolę pozytywną IgG, ludzką
- kontrolę referencyjną IgG 200 RU/mL, ludzką – kalibrator G 1
- kontrolę referencyjną IgG 20 RU/mL, ludzką – kalibrator G 2
- kontrolę referencyjną IgG 2 RU/mL, ludzką – kalibrator G 3
- koniugat anty-IgG ludzkiej znaczonej peroksydazą (króliczy)
- kontrolę negatywną, ludzką
- bufor do próbek
- bufor płuczący
- substrat chromogenny TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- roztwór stopujący – 0,5 M kwas siarkowy
- użyty sprzęt laboratoryjny: Analizator ELISA miniBOS, nr S 1972, ADALTIS S.r.l; Czytnik ELISA Expert Plus; G020.150; ASYS HITECH GmbH; Płuczka Atlantis; G021.101; ASYS HITECH GmbH; ciepłarka inkubator laboratoryjny NuAire, NU-4750E, NuAire Lab Equipment
- test wykonywano w mikroplótkach titracyjnych dostarczonych w zestawie odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG dla PUUV i HTNV (dla jednego badanego przeznaczano dwa zestawy odczynnikowe)
- rozcieńczenia próbek: 10 µL badanej surowicy rozcieńczano w 1000 µL buforu do rozcieńczeń próbek i mieszano, w przypadku analizy przeciwciał IgM używano buforu do próbek zawierający absorbent IgG/RF
- badanie prowadzono w etapach:
  1. inkubacja próbek – na poszczególne dołki mikroplótki nanoszono po 100 µL kontroli negatywnej, kontroli pozytywnej IgG, kalibratorów G1, G2, G3 / IgG, kontroli pozytywnej IgM, kalibratora M / IgM i rozcieńczonej próbki badanej, następnie plótkę inkubowano w 37°C +/- 1°C przez 60 min. a po tym czasie płukano trzykrotnie każdy dołek 450 µL buforu płuczącego
  2. inkubacja z koniugatami - na poszczególne dołki mikroplótki nanoszono po 100 µL koniugatu (odrębnie IgM i IgG 1-3) i inkubowano w temp. pok. (+18°C do

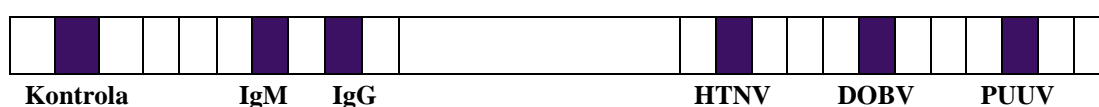
- +25°C) przez 30 min. a po tym czasie płukano trzykrotnie każdy dołek 450 µL buforu płuczającego
3. inkubacja z substratem - na poszczególne dołki mikropłytki nanoszono po 100 µL substratu i inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 15 min.
  4. zatrzymanie reakcji – następowało po dodaniu do poszczególnych dołków po 100 µL roztworu stopującego
  5. odczyt absorbancji próbek prowadzono przy długości fali 450 nm i referencyjnej długości 620 – 650 nm.

Wyniki odczytywano wg kryteriów podanych przez producenta testu. Do stwierdzenia obecności przeciwciał w klasie IgM uznaje się poziom powyżej 1,1 odczytywanego wskaźnika Ratio (stosunku ekstynkcji kontroli lub próbki pacjenta do ekstynkcji kalibratora), za wynik negatywny uznaje się odczyt wskaźnika Ratio poniżej 0,8, Ratio zakresie 0,8-1,1 to wynik wątpliwy, podlegający kontroli za ok. 2 tygodnie, w celu oceny serokonwersji. Przeciwciała klasy IgG stwierdza się w jednostkach relatywnych, odczyt powyżej 22 RU/mL wskazuje na wynik pozytywny, brak identyfikowanych przeciwciał IgG to odczyt poniżej 16 RU/mL, w zakresie 16-22 RU/mL, to wynik do oceny serokonwersji, wynik wątpliwy.

#### **IMMUNOBLOT (SIA / LIA – Stripe / Line Immunoblot Assay)**

**Test EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG firmy EUROIMMUN** wykorzystuje oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa antygeny nukleokapsydowe wirusów Puumala, Dobrava-Belgrade, Hantaan naniesione oddzielnie na pasek reakcyjny. Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu - EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG, EUROIMMUN, Lübeck, Germany. Zestaw odczynnikowy zawierał:

- paski testowe pokryte oddzielnie naniesionymi antygenami nukleokapsydowymi PUUV, DOBV, HTNV – Ryc.8.



Ryc.8. Rozmieszczenie antygenów na pasku testowym w immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM / IgG (wybarwiona kontrola testu na pasku oznaczała, że proces testowania przeszedł przez wszystkie etapy).

- kontrolę pozytywną – surowica ludzka IgM
- kontrolę pozytywną – surowica ludzka IgG
- koniugat enzymatyczny (kozi) znakowany fosfatazą alkaliczną antyludzka IgM), rozcieńczenie 1:101
- koniugat enzymatyczny (kozi) znakowany fosfatazą alkaliczną antyludzka IgG), rozcieńczenie 1:101
- bufor blokujący
- bufor do płukania (uniwersalny)
- roztwór substratu – chlorek nitrobluetetrazolium/fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indolyli
- IgM-bufor do próbek – zawierający IgG/RF absorbent – stosowany w analizie przeciwciał IgM
- użyty sprzęt laboratoryjny: kołyska laboratoryjna / wytrząsarka wahadłowa z pojedynczą platformą typ: Labnet Rocker 25; S2025-XL-230V; Labnet International INC, skaner pasków Stripe / Line Immunoblot Assay z oprogramowaniem EUROLiScan wersja 3.4.5 YG 0006-0101, Euroimmun ML AG
- test wykonywano w rynienkach dostarczonych w zestawie odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG (dla jednego badanego przeznaczano dwie rynienki)
- rozcieńczenia próbek: 15 µL badanej surowicy rozcieńczano w 1,5 mL buforu i mieszano poprzez worteksowanie, w przypadku analizy przeciwciał IgM używano buforu zawierającego absorbent przeciwciał IgG a w przypadku analizy przeciwciał IgG stosowano bufor uniwersalny
- badanie prowadzono w etapach:
  1. przygotowanie - blokowanie pasków testowych poprzez umieszczenie ich w rynienkach testowych zawierających 1,5 mL buforu blokującego, inkubacja w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 15 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek

2. inkubacja próbek – do każdej rynienki z przygotowanym paskiem testowym dodawano 1,5 mL rozcieńczonych próbek 1:101 – odpowiednio do analiz IgM i IgG (oddzielnie), następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 30 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek
3. płukanie – proces płukania prowadzono używając 1,5 mL buforu do płukania / na rynienkę testową, na kołysce laboratoryjnej w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 5 min., po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek – cykl płukania powtarzano trzykrotnie
4. inkubacja z koniugatami - do każdej rynienki z paskiem testowym dodawano 1,5 mL koniugatu – odpowiednio do analiz IgM i IgG (oddzielnie), następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 30 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek
5. płukanie – proces płukania prowadzono używając 1,5 mL buforu do płukania / na rynienkę testową, na kołysce laboratoryjnej w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 5 min., po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek – cykl płukania powtarzano trzykrotnie
6. inkubacja z substratem - do każdej rynienki z paskiem testowym dodawano 1,5 mL koniugatu, następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 10 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z rynienek
7. zatrzymanie reakcji – płukanie trzykrotne wodą destylowaną pasków testowych w rynienkach w czasie po 1 min., za każdym razem usuwając wodę z rynienek, na końcu osuszano lekko bibułą paski testowe
8. odczyt prowadzono wizualnie lub za pomocą skanera odczytu EUROLineScan dostarczonego przez producenta testów, analizę wyników prowadzono wg wystandardyzowanych kryteriów odczytu – Tab.1. Obecność przeciwciał klasy IgM/IgG była odczytywana na podstawie porównania intensywności pojawiającego się pasma kontrolnego testu, pasma kontrolnego dla użytego koniugatu IgM lub IgG oraz pasma wskazującego na obecność reakcji serologicznej, która zaszła pomiędzy naniesionym antygenem PUUV, DOBV, HTNV a przeciwciałami obecnymi w surowicy badanej osoby. Wyniki

formułowano w kategorii jakościowej: przeciwciała klasy IgG/IgM anty-*Hantavirus* obecne/nieobecne.

Tab.1. Odczyt pasków w immunoblottingu wg intensywności uzyskanego sygnału (prążków) w metodzie wizualnej i automatycznej

Ocena wizualna	Intensywność sygnału EUROLineScan	Odczytywany wynik	
brak prążka	0 - 11	o	negatywny
słabe zabarwienie prążka	12 - 18	(+)	graniczny
średnie zabarwienie prążka	19 - 30	+	pozytywny
silne zabarwienie prążka	31 - 55	++	pozytywny
bardzo silne zabarwienie prążka – porównywalne do prążka kontroli	powyżej 55	+++	mocno pozytywny

Załączone zdjęcia z własnych badań nad etiologią HFRS pokazują istotę interpretacji wyników badań serologicznych z wykorzystaniem metody immunoblottingu, które umożliwiają rozróżnienie PUUV-HFRS i DOBV-HFRS na podstawie oceny sygnałów (intensywności prążków immunoblotingu) pochodzących od badanych przeciwciał.

Ryc.9. i Ryc.10. – wynik badania nr 03349 – wynik pozytywny, obecne przeciwciała IgM i IgG anty-hantawirusowe, stwierdzono najsilniejszą reakcję badanych przeciwciał z antygenem DOBV

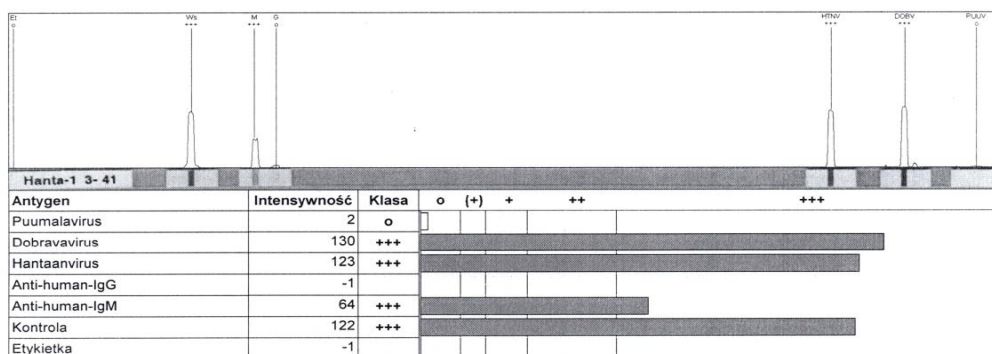
- badane przeciwciała anty-DOBV IgM chorego=130 (kontrola przeciwciał IgM=64)
- badane przeciwciała anty-PUUV IgM chorego=2
- badane przeciwciała anty-DOBV IgG chorego=124 (kontrola przeciwciał IgG=67)
- badane przeciwciała anty-PUUV IgG chorego=56

Ryc.11. i Ryc.12. – wynik badania nr 04066 – wynik pozytywny, obecne przeciwciała IgM i IgG anty-hantawirusowe, stwierdzono najsilniejszą reakcję badanych przeciwciał z antygenem PUUV

- badane przeciwciała anty-PUUV IgM chorego=115 (kontrola przeciwciał IgM=63)
- badane przeciwciała anty-DOBV IgM chorego=6
- badane przeciwciała anty-PUUV IgG chorego=120 (kontrola przeciwciał IgG=110)
- badane przeciwciała anty-DOBV IgG chorego=18

ID pacjenta: 03349  
 Utworzony: 2014-06-18  
 Wyniki z: 2014-08-21

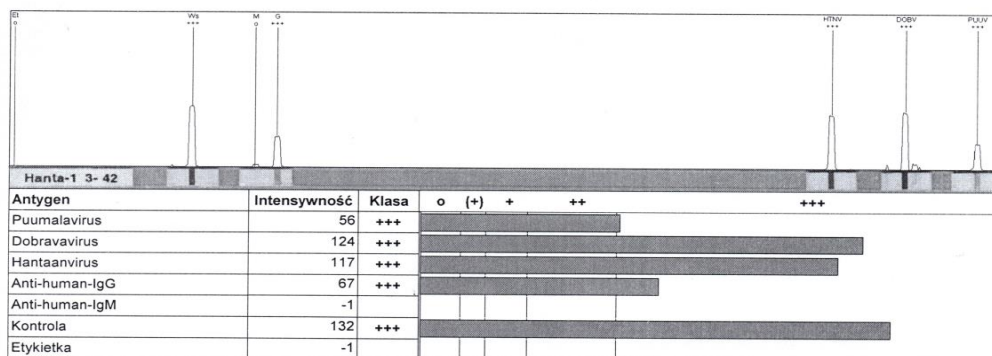
Badanie: Hantaviren Profil 1 IgM  
 Pasek: 1



Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgM	pozytywny

ID pacjenta: 03349  
 Utworzony: 2014-06-18  
 Wyniki z: 2014-08-21

Badanie: Hantaviren Profil 1 IgG  
 Pasek: 2



Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgG	pozytywny

Ryc.9. Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano DOBV-HFRS. Test immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG firmy EUROIMMUN wykonano w laboratorium WSSE w Rzeszowie – I część dokumentacji badania nr 03349.



Badane przeciwciała IgM i IgG najsilniej reagowały z antygenem DOBV. Skan wyniku diagnostycznego, odczyt z wykorzystaniem programu EUROLIneScan. Interpretacja automatyczna wg. zasad podanych w Tab.1. Źródło własne.

EUROLineScan - Ewolucja

Strona 1 z 1



Protokół: HANTA-13-02-2014  
Obsługujący: S.CH

Data: 13.02.2014 11:55:26  
Drukować: 21.08.2014 13:50:36

Nr	ID pacjenta PESEL Zestaw testowy Otrzymanie materiału do bad. Nadawca krwi Test	Obraz paska	Pasma pozytywne	Wynik paska
1	03349 3-41 12.02.2014 PSSE Wieluń Hanta Profil 1_IgM		Ws (+++/122); M (+++/64); HTNV (+++/123); DOBV (+++/130)	pozytywny
2	03349 3-42 12.02.2014 PSSE Wieluń Hanta Profil 1_IgG		Ws (+++/132); G (+++/67); HTNV (+++/117); DOBV (+++/124); PUUV (+++/56)	pozytywny

**EUROLineScan - protokół**

Protokół: HANTA-13-02-2014      Data: 2014-02-13  
Obsługujący: S.CH                      Drukować: 2014-08-21

Nr	Patient / Test	Partia	Pasek
1	03349 Hanta Profil 1_IgM	3-41	
2	03349 Hanta Profil 1_IgG	3-42	

Hantawirus Profil 1\_IgM  
Etykieta, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, Hantawirus, Dobravavirus, Puumatavirus

Hantawirus Profil 1\_IgG  
Etykieta, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, Hantawirus, Dobravavirus, Puumatavirus

Protocol cleared: Yes / No

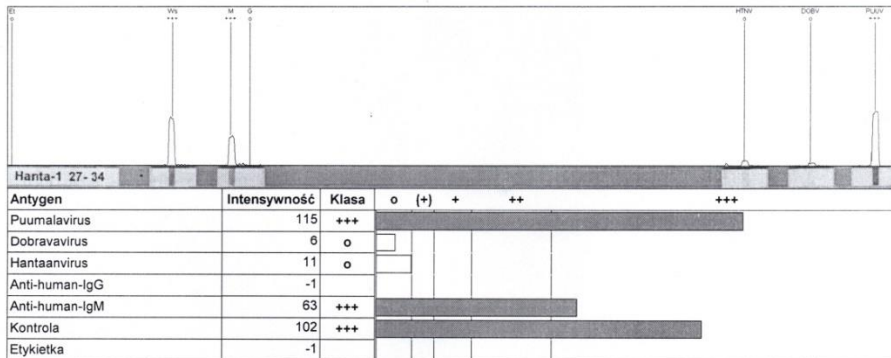
Podpis: \_\_\_\_\_

*AMe*

Ryc.10. Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano DOBV-HFRS – II część dokumentacji badania nr 03349. Paski immunoblottingu do odczytu obecności przeciwciał anty-hantawirusowych umieszczone są na zielonym tle. Interpretacja wizualna wg. zasad podanych w Tab.1. Źródło własne.

ID pacjenta: 04066  
 Utworzony: 2014-08-21  
 Wyniki z: 2014-08-21

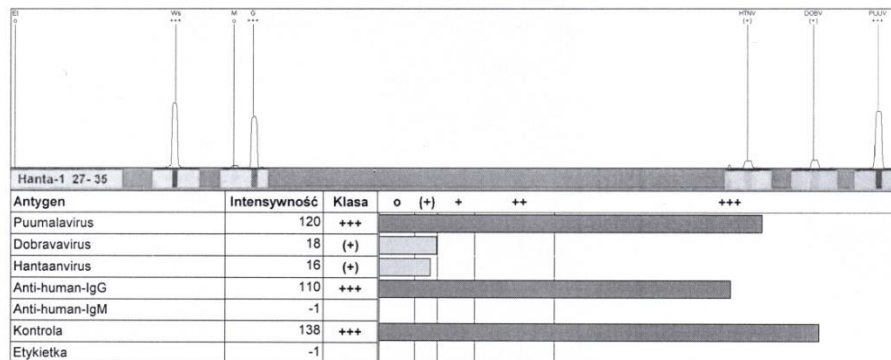
Badanie: Hantaviren Profil 1 IgM  
 Pasek: 1



Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgM	pozytywny

ID pacjenta: 04066  
 Utworzony: 2014-08-21  
 Wyniki z: 2014-08-21

Badanie: Hantaviren Profil 1 IgG  
 Pasek: 2



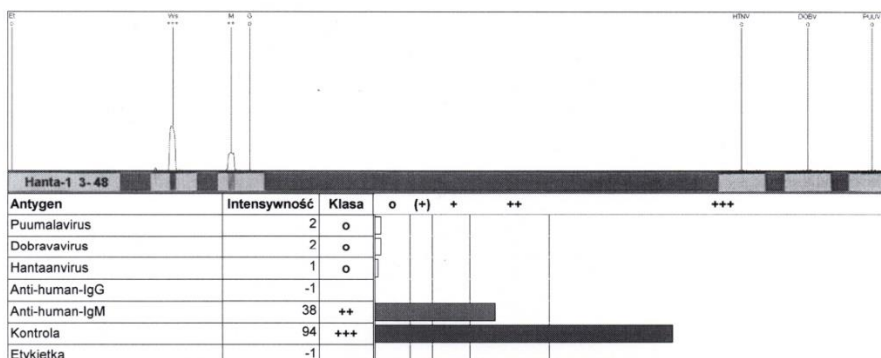
Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgG	pozytywny

Ryc.11. Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano PUUV-HFRS. Test immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG firmy EUROIMMUN wykonano w laboratorium WSSE w Rzeszowie – I część dokumentacji badania nr 04066.

Badane przeciwciała IgM i IgG najsilniej reagowały z antygenem PUUV. Skan wyniku diagnostycznego, odczyt z wykorzystaniem programu EUROLinScan. Interpretacja automatyczna wg. zasad podanych w Tab.1. Źródło własne.

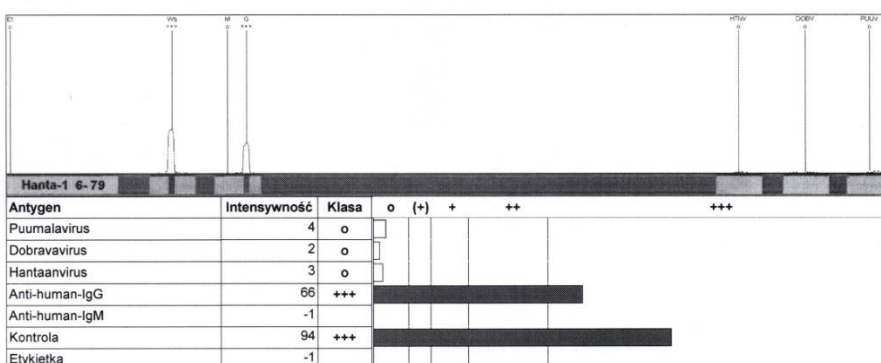


ID pacjenta: 04176      Badanie: Hantaviren Profil 1 IgM  
 Utworzony: 2015-05-14      Pasek: 1  
 Wyniki z: 2015-05-14



Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgM	negatywny

ID pacjenta: 04176      Badanie: Hantaviren Profil 1 IgG  
 Utworzony: 2015-05-14      Pasek: 2  
 Wyniki z: 2015-05-14



Test	Wynik
Hantaviren Profil 1 IgG	negatywny

Ryc.13. Brak obecności swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, wynik negatywny w kierunku rozpoznania HFRS. Test immunoblottingu EUROLINE Anty-Hanta Profil 1 IgM/IgG firmy EUROIMMUN wykonano w laboratorium WSSE w Rzeszowie – I część dokumentacji badania nr 04176. Skan wyniku diagnostycznego, odczyt z wykorzystaniem programu EUROLiScan. Interpretacja automatyczna wg. zasad podanych w Tab.1. Źródło własne.

EUROLineScan - Ewolucja

Strona 1 z 1

Protokół: HANTA-09.05.2015  
Obsługujący: A.N.

Data: 09.05.2015 13:14:06  
Drukować: 14.05.2015 13:33:10

ID pacjenta PESEL Zestaw testowy Otrzymanie materiału do bad. Nadawca krwi Test	Obraz paska	Pasma pozytywne	Wynik paska
1 04176 3-48 08.05.2015 SzpitalMiejskiO Kardio. Hanta Profil 1_IgM		Ws (+++/94); M (++/38)	negatywny
2 04176 6-79 08.05.2015 SzpitalMiejskiO Kardio. Hanta Profil 1_IgG		Ws (+++/94); G (+++/96)	negatywny

**EUROLineScan - protokół**

Protokół: HANTA-09.05.2015      Data: 2015-05-09  
Obsługujący: A.N.                      Drukować: 2015-05-14

Nr	Pacjent / Test	Paska	Pasek
1	04176 Hanta Profil 1_IgM	3-48	
2	04176 Hanta Profil 1_IgG	6-79	

*Hantavirus Profil 1\_IgM*  
Etykieta, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, Hantaavirus, Dobrovavirus, Puumalavirus

*Hantavirus Profil 1\_IgG*  
Etykieta, Kontrola, Anti-human-IgM, Anti-human-IgG, Hantaavirus, Dobrovavirus, Puumalavirus

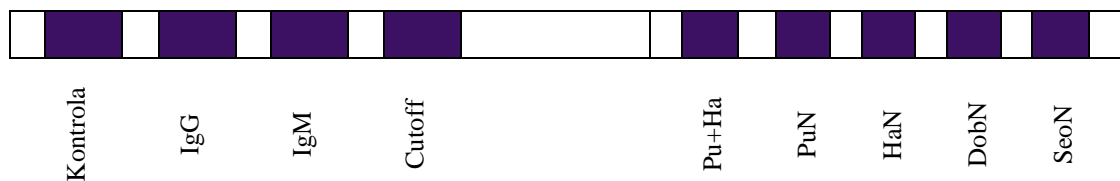
Protocol cleared:  Yes /  No

Podpis:

Ryc.14. Brak obecności swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, wynik negatywny w kierunku rozpoznania HFRRS – II część dokumentacji badania nr 04176. Paski immunoblottingu pokazujące brak obecności przeciwciał anty-hantawirusowych umieszczone są na zielonym tle. Interpretacja wizualna wg. zasad podanych w Tab.1. Źródło własne

**Test Bunyavirus IgG/IgM firmy MIKROGEN** wykorzystuje antygeny rekombinowane białka N nukleokapsydu odpowiednio szczepu Puumala, Hantaan, Dobrava, Seoul. Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu - recomLine Bunyavirus IgG/IgM Stripe / Line Immunoblot Assay Test, MIKROGEN Neuried, Germany. Zestaw odczynnikowy zawierał:

- paski testowe pokryte oddzielnie naniesionymi antygenami nukleokapsydowymi PUUV (PuN), HTNV (HaN), DOBV (DobN), SEOV (SeoN) – Ryc.15.



Ryc.15. - Rozmieszczenie antygenów na pasku testowym w immunoblottingu recomLine Bunyavirus IgG/IgM Stripe / Line Immunoblot Assay Test, MIKROGEN (wybarwiona kontrola testu na pasku oznaczała, że proces testowania przeszedł przez wszystkie etapy, cutoff – odczyt reakcji badanych przeciwciał zależał od intensywności tego prążka).

- bufor A – bufor płuczący (2 mL buforu płuczącego zawiera 0,01g odtłuszczonego mleka w proszku)
- koniugat anty-ludzka IgG (króliczy), rozcieńczenie 1:101
- koniugat anty-ludzka IgM (króliczy), rozcieńczenie 1:101
- chromogenny substrat tetrametylobenzydyna
- użyty sprzęt laboratoryjny: kołyska laboratoryjna / wytrząsarka wahadłowa z pojedynczą platformą typ: Labnet Rocker 25; S2025-XL-230V; Labnet International INC.
- test wykonywano w rynienkach dostarczonych w zestawie odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG (dla jednego badanego przeznaczano dwie rynienki)
- rozcieńczenia próbek: 20  $\mu$ L badanej surowicy rozcieńczano w 2 mL buforu A i mieszano poprzez worteksowanie
- badanie prowadzono w etapach:
  1. inkubacja próbek – do każdej rynienki z przygotowanym paskiem testowym dodawano 2 mL rozcieńczonych próbek 1:101 – odpowiednio do analiz IgM i IgG

- (oddzielnie), następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 60 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z ryńienek
2. płukanie – proces płukania prowadzono używając 2 mL buforu A / na ryńienkę testową, na kołysce laboratoryjnej w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 5 min., po tym czasie usuwano zawartość buforów z ryńienek – cykl płukania powtarzano trzykrotnie
  3. inkubacja z koniugatami - do każdej ryńienki z paskiem testowym dodawano 2 mL koniugatu – odpowiednio do analiz IgM i IgG (oddzielnie), następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 45 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z ryńienek
  4. płukanie – proces płukania prowadzono używając 2 mL buforu A / na ryńienkę testową, na kołysce laboratoryjnej w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 5 min., po tym czasie usuwano zawartość buforów z ryńienek – cykl płukania powtarzano trzykrotnie
  5. inkubacja z substratem - do każdej ryńienki z paskiem testowym dodawano 1,5 mL koniugatu, następnie inkubowano w temp. pokojowej (+18°C do +25°C) przez 5 - 10 min. na wytrząsarce o ruchu wahadłowym (kołyska laboratoryjna), po tym czasie usuwano zawartość buforów z ryńienek
  6. zatrzymanie reakcji – płukanie trzykrotne wodą destylowaną pasków testowych w ryńienkach w czasie po 1 min., za każdym razem usuwając wodę z ryńienek, na końcu osuszano lekko bibułą paski testowe
- odczyt prowadzono wizualnie wg wystandaryzowanych kryteriów odczytu – Tab.2.

Tab.2. Odczyt pasków w immunoblottingu wg intensywności uzyskanego sygnału (prążków) w metodzie wizualnej

<b>Ocena wizualna</b>	<b>Odczytywany wynik</b>	
	brak prążka	o
słabe zabarwienie prążka, niższa intensywność niż cutoff	(+)	graniczny
średnie zabarwien. prążka, taka sama intensywność jak cutoff	+	pozytywny

silne zabarwienie prążka, wyższa intensywność niż cutoff	++	pozytywny
bardzo silne zabarwienie prążka, bardzo wysoka intensywność	+++	mocno pozytywny

Obecność przeciwciał IgG lub IgM anty-*Hantavirus* w technice *stripe - line assay*, wynik pozytywny dla poszczególnych serotypów odczytywano porównując intensywność pasma cutoff testu z pasmami reakcji immunologicznej, które zaszły pomiędzy przeciwciałami osoby badanej a naniesionymi na membranę antygenami hantawirusowymi. Brak przeciwciał anty-*Hantavirus*, wynik negatywny dla poszczególnych serotypów stwierdzano na podstawie braku obecności charakterystycznych pasm. Za swoistą reakcję w teście uznawano pojawienie się jednoczesne dwóch odczytów: jednego dla reakcji przeciwciał z komponentem antygenowym złożonym ze wszystkich ww. szczepów oraz drugiego, dla co najmniej jednego pojedynczego szczepu hantawirusa. Wyniki formułowano w kategorii jakościowej: przeciwciała klasy IgG/IgM anty-*Hantavirus* obecne/nieobecne.

#### **Test immunofluorescencji pośredniej (IIFT – Indirect Immunofluorescence Test)**

**Test Hantavirus Mosaic IgG/IgM IIFT firmy EUROIMMUN** wykorzystuje antygeny przygotowane na liniach komórkowych Vero zainfekowanych odpowiednio szczepami Hantaan (HTNV), Puumala (PUUV), Seoul (SEOV), Saaremaa (SAAV), Dobrava (DOBV), Sin Nombre (SNV). Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu – IIFT Hantavirus Mosaic IgG/IgM, EUROIMMUN, Lübeck, Germany. Zestaw odczynnikowy Hantavirus Mosaic IgG/IgM IIFT – odczynniki nanoszono na płytki pomocnicze reakcyjne dostarczone wraz z zestawem odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG (dla jednego badanego przeznaczano dwa pola reakcyjne), zestaw zawierał:

- płytkę mikroskopową z polami, gdzie naniesiono odrębnie sześć różnych antygenów ze szczepów hantawirusów namnożonych na liniach komórkowych w układzie podanym poniżej – Ryc.16. płytka mikroskopowa była kompatybilna do płytki reakcyjnej i po złożeniu obu płytek „na zatrask” tworzą komorę reakcyjną, w której przebiegały reakcje immunologiczne pomiędzy antygenami a przeciwciałami.

<b>HTNV</b>	<b>SNV</b>
<b>PUUV</b>	<b>DOBV</b>
<b>SEOV</b>	<b>SAAV</b>

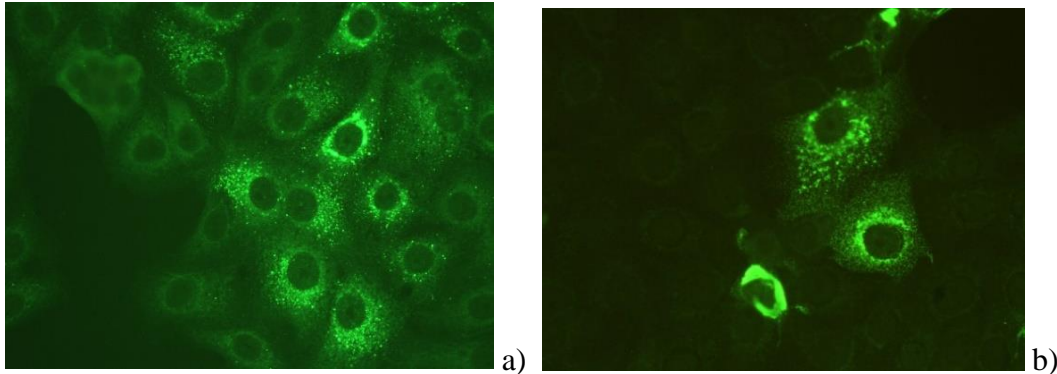
Ryc.16. – Pozycje antygenów hantawirusów na płytce mikroskopowej w teście immunofluorescencji pośredniej Hantavirus Mosaic IgG/IgM IIFT.

- znakowaną fluoresceiną surowicę anti-ludzką IgG (kozią) – koniugat IgG
- znakowaną fluoresceiną surowicę anti-ludzką IgM (kozią) – koniugat IgM
- absorbent IgG / RF
- pozytywną surowicę kontrolną ludzką IgM
- pozytywną surowicę kontrolną ludzką IgG
- negatywną surowicę kontrolną ludzką
- bufor do próbek
- PBS pH=7,2 i Tween 20
- środek pokrywający i szkiełka nakrywkowe
- użyty sprzęt laboratoryjny: mikroskop fluorescencyjny AXIO Imager.A1; 430005; Carl Zeiss Werk Göttingen; kołyska laboratoryjna / wytrząsarka wahadłowa z pojedynczą platformą typ: Labnet Rocker 25; S2025-XL-230V; Labnet International INC.
- rozcieńczenia próbek do oceny przeciwciał IgM: 11,1 µL badanej surowicy dodawano do 100 µL absorbent IgG / RF, inkubowano 15 min. w temp. pokojowej (+18°C do +25°C), nie mieszano uzyskanego osadu, z nad osadu pobierano 11,1 µL rozcieńczonej próbki i dodawano 100 µL buforu do próbek i mieszano poprzez worteksowanie uzyskując końcowe rozcieńczenie badanej próbki 1:100
- rozcieńczenia próbek do oceny przeciwciał IgG: 11,1 µL badanej surowicy dodawano do 100 µL buforu do próbek i mieszano poprzez worteksowanie, następnie pobierano 11,1 µL rozcieńczonej próbki i dodawano 100 µL buforu do próbek i mieszano ponownie poprzez worteksowanie uzyskując końcowe rozcieńczenie badanej próbki 1:100
- badanie prowadzono w etapach:

1. nanoszenie 30  $\mu$ L badanej (rozcieńczonej 1:100) surowicy (odrębnie do oceny IgM i IgG) na płytkę reakcyjną, zamknięcie komory reakcyjnej poprzez zatrask płytką mikroskopową, inkubacja 30 min. w temp. pokojowej (j.w.)
2. płukanie – najpierw strumieniem przygotowanego PBS-Tween w czasie ok. 1s potem poprzez zanurzenie płytki mikroskopowej przez 5 min. w kuwecie z PBS-Tween ustawionej na kołysce laboratoryjnej z ruchem wahadłowym w celu polepszenia procesu płukania
3. nanoszenie 25  $\mu$ L koniugatu znakowanego fluoresceiną (odrębnie do oceny IgM i IgG) na płytkę reakcyjną, zamknięcie komory reakcyjnej poprzez zatrask płytką mikroskopową, inkubacja 30 min. w temp. pokojowej (j.w.)
4. płukanie – najpierw strumieniem przygotowanego PBS-Tween w czasie ok. 1s potem poprzez zanurzenie płytki mikroskopowej przez 5 min. w kuwecie z PBS-Tween ustawionej na kołysce laboratoryjnej z ruchem wahadłowym w celu polepszenia procesu płukania
5. przygotowanie płytki mikroskopowej do oceny obrazu fluorescencji w mikroskopie poprzez zamknięcie pól reakcyjnych szkiełkiem nakrywkowym (używa się do osadzenia szkiełka nakrywkowego środka pokrywającego)
6. ocenę wizualną immunofluorescencji prowadzono pod powiększeniem obiektyw 20x lub 40x, okular 10x w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss AXIO Imager.A1

Wyniki odczytywano wg kryteriów podanych przez producenta testu. Obecność przeciwciał IgG lub IgM anty *Hantavirus*, wynik pozytywny dla poszczególnych serotypów odpowiadał wystąpieniu fluorescencji, przy czym intensywność fluorescencji oznaczano według skali: „+” fluorescencja o niskiej intensywności; „++” fluorescencja o intensywności znaczącej; „+++” fluorescencja o wysokiej intensywności. Brak przeciwciał anty *Hantavirus*, wynik negatywny dla poszczególnych serotypów stwierdzano na podstawie braku fluorescencji. Za swoistą reakcję fluorescencji uznawano charakterystyczne świecenie ziarnistości w cytoplazmie zainfekowanych komórek, układające się pojedynczo, grupami lub pasmowo wokół jąder komórkowych od strony cytoplazmy. Fluorescencję w innych elementach komórek np. w jądrze, jąderkach lub w całych komórkach traktowano jako reakcję nieswoistą, bez znaczenia diagnostycznego. Wyniki formułowano w kategorii jakościowej: przeciwciała klasy IgG/IgM anty *Hantavirus* obecne/nieobecne. W grupie najbliższej spokrewnionych hantawirusów Hantaan / Seoul / Saaremaa / Dobrava-

Belgrade oraz w grupie Puumala / Sin Nombre śledzono intensywność reakcji fluorescencji i zaznaczano antygen, który najsilniej reagował z surowicą badanej osoby - Ryc.17.



Ryc.17. Identyfikacja swoistych przeciwciał anty-hantawirusowych w surowicy chorego, u którego rozpoznano HFRS, test IIFT wykonany w laboratorium WSSE w Rzeszowie.

a), b) fluorescencja o wysokiej intensywności +++, reakcja przeciwciał pacjenta z antygenem ortohantawirusa DOBV wyznakowana fluoresceiną (kolor jasnozielony). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym Zeiss AXIO Imager.A1, powiększenie 200x. Źródło własne.

### **Badania serologiczne w rozpoznawaniu dodatkowej infekcji - krętkami *Leptospira*; leptospiroza (wg klasyfikacji chorób ICD-10 A27)**

#### **ELISA ( Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)**

**Test immunoenzymatyczny (SERION ELISA classic *Leptospira* IgG/IgM firmy Instytut Virion/Serion Würzburg, Niemcy)** wykorzystuje antygeny powierzchniowe gatunku *Leptospira interrogans* i ich zmienność antygenową, która jest podstawą wyróżnienia różnych serogrup/serowarów. Producent testu zwalidował czułość i specyficzność z udziałem krętków *Leptospira interrogans*: *L. icterohaemorrhagiae* (RGA), *L. copenhageni* (M20), *L. canicola* (Hond Utrecht IV), *L. pomona* (Pomona), *L. bratislava* (Jez Bratislava), *L. grippityphosa* (Moskwa V), *L. hebdomadis* (Hebdomadis), *L. sejroe* (M84), *L. bataviae* (Swart), *L. tarassovi* (Perepelicin) i *L. hardjo* z kolekcji szczepów Instytutu Mikrobiologii Lekarskiej i Higieny Kliniki Uniwersyteckiej Carl-Gustav-Carus w Dreźnie.

Zestaw odczynnikowy zawierał:

- mikropłytkę 96-dołkową titracyjną opłaszczoną antygenami *Leptospira interrogans*
- surowicę standardową IgM
- negatywną kontrolę IgM (ludzką surowicę w buforze fosforanowym z białkiem)
- koniugat anty-IgM (antyludzkie przeciwciało poliklonalne IgM skoniugowane z fosfatazą alkaliczną, stabilizowane roztworem zawierającym białka)
- surowicę standardową IgG
- negatywną kontrolę IgG (ludzką surowicę w buforze fosforanowym z białkiem)
- koniugat anty-IgG (antyludzkie przeciwciało poliklonalne IgG skoniugowane z fosfatazą alkaliczną, stabilizowane roztworem zawierającym białka)
- bufor do rozcieńczania próbek
- bufor płuczący
- substrat (para-nitrofenylofosforan w buforze bez rozpuszczalnika)
- roztwór zatrzymujący reakcję (1,2 N wodorotlenek sodu)
- RF Absorbent do testów immunoenzymatycznych ELISA firmy Virion/Serion (odczynnik do usuwania czynnika reumatoidalnego RF-IgM z próbek surowicy, w celu wykrycia specyficznych przeciwciał IgM
- użyty sprzęt laboratoryjny: Analizator ELISA miniBOS, nr S 1972, ADALTIS S.r.l.; Czytnik ELISA Expert Plus; G020.150; ASYS HITECH GmbH; Płuczka Atlantis; G021.101; ASYS HITECH GmbH; ciepłarka inkubator laboratoryjny NuAire, NU-4750E, NuAire Lab Equipment
- test wykonywano w paskach mikrotitracyjnych dostarczonych w zestawie odczynnikowym – oddzielnie prowadzono analizę przeciwciał IgM i IgG (dla jednego badanego przeznaczano dwa zestawy odczynnikowe)
- rozcieńczenia próbek: 10  $\mu$ L badanej surowicy rozcieńczano w 1000  $\mu$ L buforu do rozcieńczeń próbek i mieszano, w przypadku analizy przeciwciał IgM używano buforu do próbek 800  $\mu$ L oraz odczynnika RF Absorbent 200  $\mu$ L
- badanie prowadzono w etapach:
  1. inkubacja próbek – na poszczególne dołki mikropłytki nanoszono po 100  $\mu$ L kontroli negatywnej IgG, surowicy standardowej IgG (x2), kontroli negatywnej IgM, surowicy standardowej IgM (x2) i rozcieńczonej próbki badanej, zostawiano jedną wolną studzienkę jako próbkę ślepą substratu, a następnie płytkę inkubowano w 37°C +/- 1°C przez 60 min., po tym czasie płukano czterokrotnie każdy dołek 300  $\mu$ L buforu płuczącego

2. inkubacja z koniugatami - na poszczególne dołki mikropłytki nanoszono po 100  $\mu$ L koniugatu (odrębnie IgM i IgG) i inkubowano w temp. pok. 37°C +/- 1°C przez 30 min., po tym czasie płukano czterokrotnie każdy dołek 300  $\mu$ L buforu płuczającego
3. inkubacja z substratem - na poszczególne dołki mikropłytki nanoszono po 100  $\mu$ L substratu i inkubowano w temp. 37°C +/- 1°C przez 30 min.
4. zatrzymanie reakcji – następowało po dodaniu do poszczególnych dołków po 100  $\mu$ L roztworu stopującego
5. odczyt absorbancji próbek prowadzono przy długości fali 405 nm, długość fali referencyjnej 620 nm – 690 nm.

Wyniki z wykonanego testu odczytywano z użyciem dostarczanych przez producenta właściwych dla serii odczynników krzywych standardowych i tabel odczytu miana badanych przeciwciał. Na podstawie krzywej standardowej określano aktywność przeciwciał w jednostkach IU/mL lub U/mL. Obecność przeciwciał w klasie IgM, wynik pozytywny stwierdzano, jeżeli odczyty były powyżej wartości 20 U/mL, w przypadkach odczytu poniżej 15 U/mL wynik był negatywny, nie stwierdzano obecności przeciwciał w klasie IgM, odczyty w zakresie 15-20 U/mL stanowiły tzw. strefę szarą, czyli wyniki wątpliwe, które wymagały powtórzenia badania za okres ok. 2 tygodni do wykazania serokonwersji w odczytywanych poziomach przeciwciał. Obecność przeciwciał w klasie IgG, wynik pozytywny stwierdzano, jeżeli odczyty były powyżej wartości 15 U/mL, w przypadkach odczytu poniżej 10 U/mL wynik był negatywny, odczyty w zakresie 10-15 U/mL stanowiły wyniki wątpliwe, które wymagały powtórzenia, podobnie jak w przypadku wątpliwych wyników dla klasy IgM. Badanie wykonano wg komercyjnej procedury producenta testu - SERION ELISA *classic* Leptospira IgG/IgM, Institut Virion/Serion Würzburg, Germany.

### **Test mikroaglutynacji (MAT) – kryteria interpretacji wyników badań laboratoryjnych**

Badania laboratoryjne były wykonane w Laboratorium WSSE we Wrocławiu pełniącego funkcję laboratorium referencyjnego dla przypadków ludzkich zachorowań wg akredytowanej procedury badawczej PB-05 WSSE we Wrocławiu; zastosowana metodyka wykonania badania laboratoryjnego została opisana w pracy Litarskiej

[Litarska 2006 <sup>111</sup>]. Metoda MAT jest prostym testem aglutynacji mikroskopowej ale o poziomie metody weryfikacyjnej, ze względu na wykorzystanie się antygenów przygotowanych z hodowli bakteryjnych na podłożach wzrostowych dla prowadzonych szczepów *Leptospira*. W teście identyfikuje się przeciwciała przeciwko najczęściej występującym geograficznie leptospirom *L. interrogans* (serowary: Icterohaemorrhagiae, Canicola, Zanoni, Autumnalis, Bataviae, Hebdomadis, Australis, Pomona), *L. borgpetersenii* (serowary: Poi, Ballum, Tarassovi, Mini, Sejroe), *L. weilii* (serowar Celledoni), *L. kirschneri* (serowary: Cynopteri, Grippotyphosa). Miana przeciwciał powyżej lub równe 1:400 przyjmuje się za wynik dodatni, świadczą o aktywnej fazie zakażenia, miana poniżej 1:100 uznaje się za seronegatywne, miana w zakresach 1:100 oraz 1:200 jako wątpliwe, wymagają powtórzenia i ponownej oceny serokonwersji. Test mikroaglutynacji nie identyfikuje poszczególnych klas przeciwciał, tj. IgM czy IgG, wyniki odnoszą się ogólnie do stwierdzenia swoistych przeciwciał anty-*Leptospira*.

## **2. Badania ankietowe**

Dla przypadków HFRS, laboratoryjnie potwierdzonych zachorowań przeprowadzono badanie ankietowe zbierające dane do wywiadu epidemiologicznego w dochodzeniu epidemiologicznym. Wzory opracowanych i stosowanych ankiet własnych, z zakresem zbieranych danych demograficznych, klinicznych i epidemiologicznych zamieszczone są w Zał.3. „Badanie ankietowe przypadków zakażeń hantawirusowych (HVD Hantavirus disease)” oraz w Zał.4. „Zakażenia hantawirusowe – notatka epidemiologiczna przypadku”. Informacje zbierane w ankietach były dobrowolne, z wyrażoną zgodą osoby badanej i zawierały oprócz danych jednostki zgłaszającej przypadek HFRS/NE, informacje dotyczące osoby badanej, takie jak:

- dane socjodemograficzne
- status immunologiczny
- datę wystąpienia pierwszych objawów
- objawy grypopodobne, w tym poziom temperatury, wystąpienie zespołu bólowego, nudności, wymiotów, dreszczy, zaburzenia widzenia
- objawy skazy krwotocznej, w tym poziom płytek krwi
- objawy powiększenia węzłów chłonnych
- wystąpienie / poziom hipotonii
- objawy ze strony układu krążenia / niewydolności krążeniowej

- objawy ze strony układu oddechowego / niewydolności oddechowej, w tym obrzęku płuc, obecności płynu w opłucnej
- wystąpienie wstrząsu
- objawy niewydolności/uszkodzenia wątroby, w tym wystąpienie żółtaczki
- objawy uszkodzenia nerek, w tym poziomu białkomoczu, wystąpienie krwinkomoczu, zaburzeń wodno-elektrolitowych, poziomu oligurii, poliurii, anurii, poziomu kreatyniny, poziomu hipertonii, włączenia leczenia nerkozastępczego
- wyniki badań diagnostycznych, w tym USG/RTG/EEG i in.
- włączenie leków antywirusowych, w tym rybawiryny
- historia hospitalizacji
- zakończenie zachorowania/zakażenia, w tym zejście śmiertelne osoby badanej
- historia narażenia na zakażenie hantawirusowe, w tym odbyte podróże zagraniczne
- ustalenie osób podobnie narażonych z otoczenia osoby badanej.

Ankiety wg wzoru - Zał.3. stosowano od II poł. 2007r. do I poł. 2014r. a wzór - Zał.4. stosowano od II poł. 2014r. do końca roku 2018. Ankiety były opracowane i dostarczone przez laboratorium diagnostyczne WSSE w Rzeszowie. Wszystkie ww. informacje zbierano w przedziałach czasowych tj. od dnia - do dnia, w których się pojawiły, w celu oceny wystąpienia i natężenia badanego zjawiska. Ankietyzację prowadzili na oddziałach szpitalnych lekarze podczas pobytu pacjentów a następnie były włączane do historii choroby pacjentów oraz przekazywane pracownikom stacji sanitarno-epidemiologicznym jako notatki epidemiologiczne poszerzające dokumentację zgłaszanych przypadków do krajowej rejestracji choroby hantawirusowej. W przypadkach, gdy badane osoby nie były hospitalizowane badanie ankietowe przeprowadzali pracownicy stacji sanitarno-epidemiologicznych podczas prowadzenia czynności badających okoliczności wystąpienia zachorowania/zakażenia podlegającego rejestracji. Ankietyzację prowadzono tylko dla przypadków identyfikowanych na bieżąco, dla przypadków badanych retrospektywnie, które były badane w ramach wyznaczonych grup badawczych nie prowadzono badania ankietowego.

### **3. Analiza statystyczna**

Zmienne kategoryczne przedstawiono w postaci liczb i wartości procentowych. Różnice między zmiennymi kategorycznymi były oceniane za pomocą testu chi-kwadrat Pearsona i największej wiarygodności (NW). Gdy licznosci były mniejsze niż

5 zastosowano poprawkę Yatesa. Zmienne ciągłe były przedstawione jako mediany z 50% rozstępem kwartylowym. Dla zmiennych ciągłych zastosowano test Shapiro-Wilka w celu oceny rozkładu. Ze względu na to, że rozkłady odbiegały od rozkładów normalnych, ciągłe zmienne porównano za pomocą testu U Manna Whitneya dla dwóch grup, lub nieparametryczną analizą wariancji Kruskala-Wallisa z dodatkowymi porównaniami *post hoc* dla trzech lub więcej grup. Dla czynników epidemiologicznych obliczono iloraz szans (OR) wraz z 95% przedziałem ufności. Za poziom istotności statystycznej przyjęto 5%. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.3PL (Statsoft, Polska).

#### IV. WYNIKI

Ogółem, w okresie 2007r. – 2018r. wykonano 1370 badań serologicznych, wykrywających swoiste przeciwciała anty-hantawirusowe w klasie IgM i IgG. Przebadano w tym, 721 osób (52,6% wszystkich badanych), które miały objawy infekcji gorączkowej z zespołem objawów sugerujących możliwość HFRS, badania wykonywano na bieżąco i 649 osób (47,4% wszystkich badanych) bez objawów infekcji, te osoby były badane retrospektywnie. Liczebność obu grup różniła się niewiele, bo tylko +/- 5% ale były wobec siebie przeciwstawne pod względem statusu klinicznego badanych osób tj. w statusie chory / zdrowy. W obu grupach badań, bardzo ważną przesłanką skierowania na badania, była informacja o podejrzeniu zoonozy, ze względu na zgłaszany kontakt z gryzoniami lub ich odchodami oraz na przedstawiane okoliczności narażenia pobytowego i/lub zawodowego. U 164 chorych na 721 wszystkich badanych w tej grupie (u 22,7%), potwierdzono etiologię zakażenia hantawirusowego aktywnego, czyli prawie u ¼ wszystkich chorych stwierdzono HFRS, w tym rozpoznano 71 przypadki DOBV-HFRS (stanowiło to 41% wszystkich wyników potwierdzających zachorowanie) i 93 przypadki PUUV-HFRS (to 59% wyników pozytywnych). W drugiej grupie, zidentyfikowano 43 osoby na 649 ogółem badanych w tej grupie (6,6%), u których można było potwierdzić utrzymującą się serokonwersję przeciwciał anty-hantawirusowych bez objawów infekcji aktywnej. Druga grupa badawcza nie była jednolita pod względem narażenia na zakażenie, liczba i odsetek osób seropozytywnych sięgał 43 osób, ponieważ wśród badanych znaleźli się zoolodzy, badani z powodu wystąpienia laboratoryjnego ogniska epidemicznego spowodowanego PUUV przeniesionym z hodowanych nornic rudych. W zwierzętarni laboratoryjnej powstały szczególne warunki narażenia, stąd wśród 52 zdrowych zoologów stwierdzono aż u 21 osób przeciwciała IgG anty-hantawirusowe a u jednej osoby przeciwciała obu klas, tj. IgG i IgM, seropozytywnych osób było aż 46,3%, przeciwciała były skierowane przeciwko Puumala ortohantawirusowi, badani zoolodzy pracowali w woj. małopolskim i podlaskim. Poza zoologami, w omawianej grupie osób zdrowych byli badani leśnicy z dwóch województw – podkarpackiego i lubelskiego. Wśród leśników tych dwóch województw uzyskano podobne odsetki wyników wskazujących na zakażenie hantawirusowe przebiegające w przeszłości i tak przeciwciała anty-hantawirusowe tylko w klasie IgG stwierdzono u 2,4% leśników podkarpackich (ze swoistością przeciwciał anty-PUUV) i u 3,18% leśników na

Lubelszczyźnie (ze swoistością przeciwciał anti-PUUV i anti-DOBV). Kolejną grupę osób badanych bez objawów infekcji, zdrowych, mieszkających w woj. podkarpackim w różnych powiatach stanowili, m. in. rezydenci Domów Pomocy Społecznej i zdrowi współdomownicy osób, u których bieżąco rozpoznano HFRS – odsetek osób pozytywnych w tej grupie różnił się znacząco, ze względu na okoliczności narażenia - w rodzinach osób HFRS+ wykazano obecność przeciwciał anti-hantawirusowych u 13,8% badanych a wśród rezydentów DPS tylko u 2,7% osób, czyli stwierdzana u nich serokonwersja była na podobnym poziomie, jak u leśników podkarpackich (2,4% osób) ale ze swoistością przeciwciał anti-DOBV. Należy jeszcze zauważyć, że w grupie osób, które były diagnozowane z objawami chorobowymi 44 osoby skierowane były do badań diagnostycznych z podejrzeniem HFRS z innych województw tj. z lubelskiego, małopolskiego, śląskiego, opolskiego, dolnośląskiego i łódzkiego, u 13 z nich potwierdzono zachorowanie (29,5%), co stanowiło blisko 1/3 wszystkich diagnozowanych osób, w tym u 11 stwierdzono w surowicach obecność swoistych przeciwciał w obu klasach, tj. IgM i IgG a u 2 pozostałych tylko w klasie IgG i tak wśród chorych z woj. lubelskiego rozpoznano DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, z woj. małopolskiego PUUV-HFRS, z woj. śląskiego DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, z woj. opolskiego DOBV-HFRS, z woj. dolnośląskiego DOBV-HFRS i z woj. łódzkiego DOBV-HFRS. Porównując obie grupy chorych – diagnozowanych w czasie kiedy mieli objawy, które można było ukierunkować na rozpoznanie HFRS – w podkarpackiej grupie osób hospitalizowanych odsetek osób pozytywnych mieścił się na poziomie 22,5% chorych (150 osób na 665 badanych ogółem), podobnie było pomimo mniejszej grupy badanych w grupie „poza-podkarpackiej”, tam HFRS potwierdzono u 29.5% hospitalizowanych. Zestawienie grup badawczych i liczby wykonanych badań serologicznych i etiologii zakażeń ortohantawirusowych przedstawia - Tab.3.

W wyniku wykonanych badań serologicznych u osób, które miały objawy choroby rozpoznano 164 przypadki HFRS wraz z zidentyfikowaniem etiologii tych zakażeń. Na podstawie analizy odpowiedzi immunologicznej na zakażenie hantawirusowe stwierdzono swoiste przeciwciała u 81 osób w obu klasach przeciwciał IgM i IgG anti-PUUV i u 60 osób przeciwciała w klasach IgM i IgG anti-DOBV, razem u 140 osób, co potwierdziło u tych chorych aktywny status infekcji. U 24 osób, które miały objawy HFRS ale były badane po zachorowaniu, rozpoznanie HFRS opierało się na stwierdzeniu w surowicy tych pacjentów obecności swoistych przeciwciał w klasie

IgG i taki status post-infekcyjny zidentyfikowano u 13 osób jako IgG anty-PUUV obecne i u 11 osób IgG anty-DOBV. W 2 przypadkach PUUV-HFRS wykryto koinfekcję *Leptospira*, w tym w jednym przypadku metodą MAT (test aglutynacji mikroskopowej) zidentyfikowano przeciwciała w mianie 400 przeciwko krętkom *Leptospira interrogans* serowar Australis (w wynikach ELISA anty-*Leptospira* obecne były przeciwciała IgM i IgG) a w drugim przypadku stwierdzono przeciwciała przeciwko krętkom *Leptospira interrogans* w mianie 100 / 200, serowaru nie oznaczono (w wynikach ELISA anty-*Leptospira* obecne były przeciwciała IgM). Na podstawie Definicji przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego, [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def\\_PL2\\_6b.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_6b.pdf) strona 16 [66] w badanym czasie tj. od 2007r. do 2018r. stwierdzono na podstawie spełnienia kryteriów laboratoryjnych 140 przypadków potwierdzonej choroby hantawirusowej oraz 24 przypadki spełniające kryteria przypadków prawdopodobnych, ogólnie 164 przypadki choroby hantawirusowej w Polsce a wg Międzynarodowej Statystycznej Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych choroby hantawirusowe sklasyfikowane są jako A98.5 Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym ICD-10:2019 [54].

Tab.3. Zestawienie grup badawczych i liczby wykonanych badań serologicznych u osób z objawami HFRS i u osób zdrowych badanych w identyfikacji seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami.

Grupa badawcza	Lokalizacja	Województwo	Grupa badawcza	Liczba badań ogółem	Liczba wyników	Odsetek wyników pozytywnych	Obecność anty – Hantawirus IgG+ IgM-	Obecność anty – Hantawirus IgG+ IgM+	Charakterystyka osób badanych
<b>1. Badania epidemiologiczne, retrospektywne wynikające z narażenia środowiskowego – zawodowego</b>									
1.1.	Komańcza	podkarpackie	leśnicy / pracownicy gospodarki leśnej	165	4	2,4%	4 anty-PUUV	0	grupa badana w kierunku bąblowicy, zdrowa, dodatkowo w kierunku HFRS
1.2.	Zwierzyniec <sup>a</sup>	lubelskie	leśnicy / pracownicy gospodarki leśnej	251	8	3,18%	8 b/1 anty-DOBV d/2 anty-DOBV e/1 anty-PUUV f/1 anty-DOBV h/2 anty-PUUV 1 anty-DOBV	0	grupa badana w kierunku boreliozy, zdrowa, dodatkowo w kierunku HFRS
	Puławy <sup>b</sup>								
	Józefów <sup>c</sup>								
	Mircza <sup>d</sup>								
	Radzyń <sup>e</sup>								
	Krasnystaw <sup>f</sup>								
	Biała Podlaska <sup>g</sup>								

	Roztoczański Park Narodowy <sup>h</sup>								
1.3.	Kraków	małopolskie	zoolodzy	41	19	46,3%	18 anty-PUUV	1 anty-PUUV	grupa badana w kierunku zakażeń hantawirusowych z powodu aktywnego ogniska HFRS, zdrowa
1.4.	Białystok	podlaskie	zoolodzy	11	3	*	3 anty-PUUV	0	
<b>RAZEM – badania wynikające z narażenia zawodowego – grupa badawcza 1</b>				<b>468</b>	<b>34</b>	<b>7,2%</b>	<b>33</b> 28 anty-PUUV 5 anty-DOBV	<b>1</b> anty-PUUV	<b>osoby bez objawów HFRS</b>
<b>2.</b>	<b>Badania epidemiologiczne, retrospektywne wynikające z narażenia środowiskowego – pobytowego</b>								
2.1.	z różnych powiatów	podkarpackie	mieszkańcy DPS	145	4	2,7%	4 anty-DOBV	0	grupa badana w kierunku HCV / HBV, zdrowa, dodatkowo w kierunku HFRS
2.2.	z różnych powiatów	podkarpackie	rodzina osób z HFRS	36	5	13,8%	5 anty-DOBV	0	grupa badana w kierunku HFRS, zdrowa
<b>RAZEM – badania wynikające z narażenia środowiskowego – grupa badawcza 1+2</b>				<b>649</b>	<b>43</b>	<b>6,6 %</b>	<b>42</b> 28 anty-PUUV	<b>1</b> anty-PUUV	<b>osoby bez objawów HFRS</b>

							14 anty-DOBV		
<b>3.</b>	<b>Badania diagnostyczne, kliniczne</b>								
3.1.	Dębica	podkarpackie	hospitalizowani	1	1	*	0	1 anty-PUUV	przypadek indeksowy badany w kierunku HFRS, retrospektywnie
3.2.	z różnych powiatów	podkarpackie	hospitalizowani	11	0	-	0	0	badani w kierunku HFRS, retrospektywne
3.3.	z różnych powiatów	podkarpackie	hospitalizowani	665	150	22,5%	22 11 anty-PUUV 11 anty-DOBV	128 75 anty-PUUV 53 anty-DOBV	grupa chorych badana w HFRS
3.4.	z różnych powiatów	lubelskie <sup>a</sup> dolnośląskie <sup>b</sup> małopolskie <sup>c</sup> łódzkie <sup>d</sup> opolskie <sup>e</sup> śląskie <sup>f</sup>	hospitalizowani	44	13	29,5%	2 <sup>a</sup> /1 anty-PUUV	11 <sup>a</sup> /3 anty-DOBV <sup>b</sup> /1 anty-DOBV <sup>c</sup> /2 anty-PUUV <sup>d</sup> /1 anty-DOBV <sup>e</sup> /1 anty-DOBV <sup>f</sup> /2 anty-PUUV 1 anty-DOBV	grupa chorych nefrologicznych badana w kierunku HFRS

<b>RAZEM – grupa badawcza 3</b>	<b>721</b>	<b>164</b>	<b>22,7%</b>	<b>24</b> 13 anty-PUUV 11 anty-DOBV	<b>140</b> 80 anty-PUUV 60 anty-DOBV	<b>osoby z objawami HFRS, w tym 92 anty-PUUV 72 anty-DOBV</b>
<b>RAZEM – grupa badawcza 1+2+3</b>	<b>1370</b>	<b>207</b>	<b>15,1%</b>	<b>66</b> 41 anty-PUUV 25 anty-DOBV	<b>141</b> 81 anty-PUUV 60 anty-DOBV	<b>osoby badane w kierunku HFRS</b>
	<b>1370</b>	<b>207</b>	<b>15,1%</b>	<b>122 anty-PUUV 85 anty-DOBV</b>		<b>osoby badane w kierunku HFRS</b>

\*mała liczebność grupy badawczej, nie liczono oddzielnie odsetka wyników pozytywnych, - brak wyników pozytywnych

Aby dokładniej zbadać przebieg zakażeń hantawirusowych ludzi w Polsce, równoległe dla przypadków z potwierdzoną serologicznie etiologią HFRS wykonywano badania ankietowe, na podstawie których w kolejnym etapie badań analizowano cechy kliniczne związane z przebiegiem zachorowania i sytuacją narażenia na zakażenie. Podsumowanie danych z przekazanych 130 ankiet zawiera – Tab.4.

Tab.4. Badanie cech klinicznych w przebiegu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u osób hospitalizowanych - zestawienie ogólne.			
Objawy kliniczne HFRS	% występowanie objawów klinicznych, mediana wartości związanych z objawami klinicznymi wg ciężkości przebiegu HFRS		
	HFRS ogółem	DOBV-HFRS	PUUV-HFRS
wystąpienie objawów klinicznych z nagłym początkiem; <i>acute onset</i>	100%	100%	100%
mediana – nr doby, w której wystąpił nagły początek objawów	1	1	1
gorączka $T \geq 38^{\circ}\text{C}$	96%	96%	96%
mediana poziomu odczytu wartości gorączki $T \geq 38^{\circ}\text{C}$	39,5°C	39,5°C	39,9°C
mediana liczby dni z gorączką $T \geq 38^{\circ}\text{C}$	5	5	6
osłabienie	100%	100%	100%
dreszcze	69%	<b>79%</b>	65%
wystąpienie zespołu objawów bólowych: ból głowy, mięśni, stawów, brzucha, okolicy lędźwiowo-krzyżowej	96%	96%	96%
mediana – nr doby, od której wystąpił zespół bólowy	1	1	1
mediana liczby dni z zespołem objawów bólowych	7	5	8

nudności	52%	<b>66%</b>	43%
wymioty	48%	<b>66%</b>	37%
biegunka	41%	<b>64%</b>	23%
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia układu pokarmowego	1	1	1
mediana liczby dni z zespołem zaburzeń układu pokarmowego	6	4,5	8
trombocytopenia < 150 x10 <sup>3</sup> /μL	87%	<b>92%</b>	84%
mediana – nr doby, od której wystąpiła trombocytopenia	5	5	5
mediana liczby dni z trombocytopenią	5	5	5
mediana poziomu trombocytopenii	59x10 <sup>3</sup> /μL	52x10 <sup>3</sup> /μL	59,5x10 <sup>3</sup> /μL
wystąpienie skazy krwotocznej – rodzaj Tab.11.	29%	<b>52%</b>	13%
mediana – nr doby, od której wystąpiła skaza krwotoczna	5	5	7,5
mediana liczby dni ze skazą krwotoczną	3	3	4,5
ciśnienie krwi poniżej 100 mmHg	26%	<b>44%</b>	15%
mediana – nr doby, od której wystąpiło ciśnienie krwi poniżej 100 mmHg	5	5,5	5
mediana liczby dni z ciśnieniem krwi poniżej 100 mmHg	3	3	5
konsekwencje zespołu przecieku naczyń włosowatych – nieprawidłowości w USG/RTG	47%	<b>58%</b>	39%

powiększenie narządów wewnętrznych, zwiększenie ilości płynu śródmiąższowego	38%	<b>50%</b>	31%
zwiększenie ilości płynu w jamach ciała	16%	<b>21%</b>	12%
wystąpienie zaburzeń neurologicznych ogólnych – Tab.15.	7,5%	<b>14%</b>	3%
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia neurologiczne ogólne	5	4	8,5
mediana liczby dni z zaburzeniami neurologicznymi ogólnymi	2	2	2
zaburzenia widzenia	18%	<b>22%</b>	15%
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia widzenia	2	3	1
mediana liczby dni z zaburzeniami widzenia	5	4	1
wystąpienie zaburzeń oddechowych ogólnych	36%	31%	<b>39%</b>
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia oddechowe	4	5	3,5
mediana liczby dni z zaburzeniami oddechowymi	6,5	6	7
kaszel	28%	15%	<b>36%</b>
mediana – nr doby, od której wystąpił kaszel	2	1	2
mediana liczby dni z kaszlem	6	6	7
wystąpienie zaburzeń czynności wątroby	63%	<b>73%</b>	57%
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia czynności wątroby	5	5	6

mediana liczby dni z zaburzeniami czynności wątroby	7	7,5	7
mediana podwyższonego poziomu AlAT > 50U/L	112 U/L	82 U/L	<b>115 U/L</b>
mediana podwyższonego poziomu AspAT > 50U/L	84 U/L	86 U/L	83 U/L
białkomocz > 15 mg/dL	72%	<b>88%</b>	62%
mediana – nr doby, od której wystąpił białkomocz	6	6	5
mediana liczby dni z białkomoczem	6	6	6
mediana podwyższonego poziomu białka w moczu > 15 mg/dL	265 mg/dL	<b>320 mg/dL</b>	195 mg/dL
krwinkomocz	29%	<b>47%</b>	18%
mediana – nr doby, od której wystąpił krwinkomocz	6	6	5,5
mediana liczby dni z krwinkomoczem	4,5	2	6
zaburzenia wodno-elektrolitowe	39%	<b>52%</b>	31%
mediana – nr doby, od której wystąpiły zaburzenia wodno-elektrolitowe	6	5	7
mediana liczby dni z zaburzeniami wodno-elektrolitowymi	4,5	6	4
skąpomocz	39%	<b>60%</b>	26%
mediana – nr doby, od której wystąpił skąpomocz	6	6	5
mediana liczby dni z skąpomoczem	3	2	5,5
mediana dobowego poziomu diurezy < 2000 mL/dobę w okresie skąpomoczu	500 mL / dobę	<b>300 mL / dobę</b>	650 mL / dobę
bezmocz	3,4%	<b>6,7%</b>	1,4%
wielomocz	45%	<b>65%</b>	33%

mediana – nr doby, od której wystąpił wielomocz	9,5	9	10
mediana liczby dni z wielomoczem	5,5	6	5
mediana dobowego poziomu diurezy < 2000 mL/dobę w okresie wielomoczu	5000 mL	<b>5200 mL</b>	4400 mL
ostre uszkodzenie nerek -AKI	73%	<b>91%</b>	61%
mediana – nr doby, od której wystąpiło ostre uszkodzenie nerek	6	6	7
mediana liczby dni z ostrym uszkodzeniem nerek	8	8,5	7
podwyższony poziom kreatyniny w surowicy krwi > 1,3 mg/dL	70%	<b>93%</b>	54%
mediana poziomu kreatyniny w surowicy krwi > 1,3 mg/dL w okresie AKI	3,70 mg/dL	4,47 mg/dL	2,86 mg/dL
wdrożenie leczenia nerkozastępczego	14%	<b>30%</b>	2,6%
mediana – nr doby, w której rozpoczęto hemodializę	11,5	11,5	5 oraz 15 / 2przypadki
mediana liczby dni z przeprowadzaną hemodializą	4	9	3
mediana krotności wykonywanych hemodializ	5,5	<b>7</b>	3
zakończenie zachorowania – wyzdrowienie	97,7%	94,5%	<b>100%</b>
zakończenie zachorowania – zgon	2,3%	<b>5,5%</b>	0%
koinfekcje z <i>Leptospira</i>	1,5%	0%	<b>2,6%</b>
koinfekcje z Influenza A virus (IAV)	<1,0%	<b>1,8%</b>	0%
mediana liczby dni w zachorowaniu	16	<b>19</b>	15,5
wystąpienie zachorowań w formie ogniska epidemicznego – liczba przypadków	4 przypadki w 2 ogniskach epidemicznych	2 przypadki w 1 ognisku epidemicznym	2 przypadki w 1 ognisku epidemicznym

W kolejnym etapie badań wskazano zależność wraz z poziomem istotności statystycznej występowania objawów klinicznych w przebiegu HFRS w odniesieniu do dwóch czynników DOBV i PUUV wywołujących HFRS. Wartość p (prawdopodobieństwa testowego), jeżeli była niższa od poziomu istotności  $\alpha=0,05$ , czyli  $p<0,05$ , to wykazywano wpływ jednego z czynników etiologicznych, jako istotnie wyższy w porównaniu z drugim, natomiast gdy wartość  $p>0,05$  stwierdzano brak zależności badanych cech HFRS z rozróżnieniem wpływu czynników DOBV i PUUV, oznaczało to, że badana zależność była nieistotna statystycznie - Tab.5.

Tab.5. Badanie zależności pomiędzy czynnikami DOBV, PUUV a występującymi cechami klinicznymi w przebiegu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u osób hospitalizowanych - zestawienie poziomu istotności statystycznej.	
Objawy HFRS	DOBV-HFRS / PUUV-HFRS
Objawy grypopodobne długość trwania w dniach	Test U Manna-Whitneya $p=0,003$ dłużej dla PUUV-HFRS
Gorączka długość trwania w dniach	$p= 0,057033$
Dreszcze	ns $p=0,08$
Zespół bólowy - ogólnie	ns
Bóle głowy	ns
Bóle mięśni i stawów	ns
Bóle lędźwiowo-krzyżowe	ns
Bóle brzucha	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,006$ częściej w DOBV-HFRS
Zaburzenia układu pokarmowego - ogólnie	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,02$ częściej w DOBV-HFRS
Nudności	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,02$ częściej w DOBV-HFRS
Wymioty	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,002$ częściej w DOBV-HFRS
Biegunka	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,00009$ częściej w DOBV-HFRS
Kaszel	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,01$ częściej w PUUV-HFRS
Zaburzenia widzenia - ogólnie	ns
Zaburzenie czynności wątroby	ns
Żółtaczka	ns

Małopłytkowość - ogólnie	ns
Małopłytkowość długość trwania w dniach	p=0,055702
Krwinkomocz	Chi <sup>2</sup> NW p=0,0008 częściej w DOBV-HFRS
USG/RTG nieprawidłowości	Chi <sup>2</sup> NW p=0,04 częściej w DOBV-HFRS
Kreatynina największy poziom	Test U Manna-Whitneya p=0,003 wyżej w DOBV-HFRS
Białkomocz	Chi <sup>2</sup> NW p=0,002 częściej w DOBV-HFRS
Zaburzenia wodno-elektrolitowe	Chi <sup>2</sup> NW p=0,03 częściej w DOBV-HFRS
Skąpomocz	Chi <sup>2</sup> NW p=0,0004 częściej w DOBV-HFRS
Wielomocz	Chi <sup>2</sup> NW p=0,0008 częściej w DOBV-HFRS
AKI	Chi <sup>2</sup> NW p=0,0001 częściej w DOBV-HFRS
Hemodializy	Chi <sup>2</sup> Yatesa p=0,00003 częściej w DOBV-HFRS

p – prawdopodobieństwo testowe, ns – badana zależność jest nieistotna statystycznie

Ostatecznie, w celu scharakteryzowania polskich przypadków gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym zestawiono analizowane objawy kliniczne ze stwierdzoną etiologią HFRS i określoną istotnością statystyczną tej zależności, poniżej podano wyniki badania.

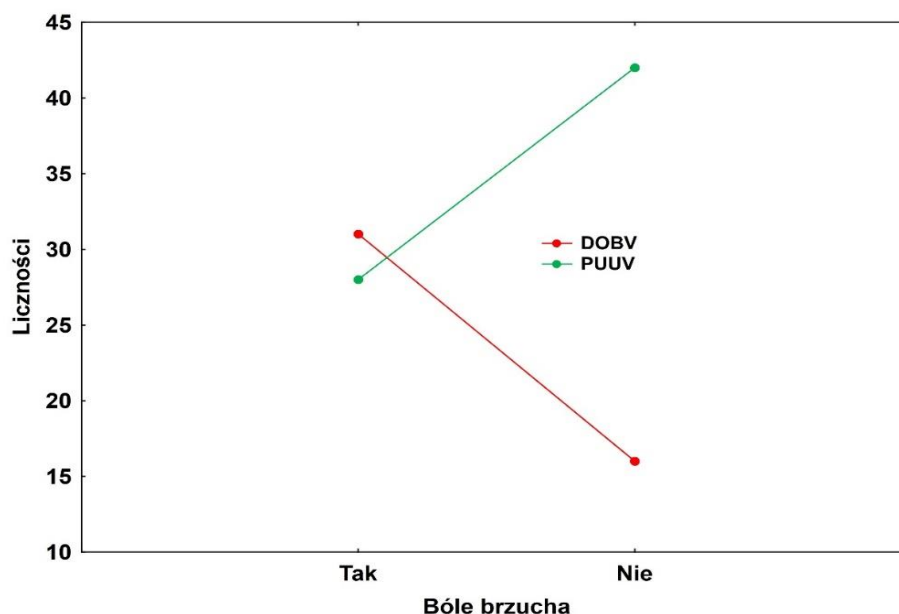
## I. Charakterystyka kliniczna wykrytej gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004 – 2018

(punkty od 1. do 26.)

### **od 1 dnia choroby pojawiały się objawy:**

1. choroba zaczynała się z **ostrym początkiem** rozwijanych objawów (ang. *acute onset*) i osłabieniem we wszystkich badanych przypadkach (100% przypadków), najczęściej od pierwszego dnia choroby występowała **wysoka gorączka** (96% wszystkich przypadków) na poziomie powyżej 38°C (mediana=39,5°C ogólnie w HFRS) i trwała przeciętnie 5 dni (mediana=5 dni ogólnie w HFRS), nie wykazano zależności między długością trwania gorączki w dniach a DOBV i PUUV, p=0,057033 - dane szczegółowe - Tab.4. , Tab.5.

2. **dreszcze** – z początkiem choroby obserwowano występowanie dreszczy, ogólnie u 69% wszystkich przypadków, nie wykazano zależności między występowaniem dreszczy a DOBV i PUUV,  $p=0,08$  - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5.
3. **zespół bólów** – bólu głowy, mięśni, stawów, brzucha, okolicy lędźwiowo-krzyżowej występował od pierwszego dnia choroby (96% wszystkich przypadków) i trwał przeciętnie 5 - 8 dni (mediana=7 dni ogólnie w HFRS; 5 dni w DOBV-HFRS, 8 dni w PUUV-HFRS), zespół bólów rozpatrywany ogólnie – nie był statystycznie istotny w zależności od DOBV i PUUV, podobnie oddzielnie ból głowy, ból mięśni i stawów, bóle lędźwiowo-krzyżowe - Tab.2. i Tab.3., natomiast zaobserwowano, że bóle brzucha wystąpiły w 66% przypadkach DOBV-HFRS i w 40% w PUUV-HFRS i wykazano, że jest to cecha istotnie wyższa dla DOBV-HFRS,  $p=0,006$  - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.6, Ryc.18.
4. **zaburzenia układu pokarmowego** – zaczynały się od 1 dnia choroby (mediana=1 doba ogólnie w HFRS) i trwały przeciętnie 4,5 – 8 dni (mediana=6 dni ogólnie w HFRS; 4,5 dni w DOBV-HFRS; 8 dni w PUUV-HFRS), wystąpiły w 77% DOBV-HFRS i w 57% w PUUV-HFRS. Najbardziej charakterystyczną cechą zaburzeń pokarmowych była biegunka, stwierdzono ją u 64% pacjentów z DOBV-HFRS w porównaniu z 23% pacjentów z PUUV-HFRS. Wykazano, że biegunka istotnie częściej występuje w DOBV-HFRS,  $p=0,00009$ . Statystycznie istotne różnice widać było również w DOBV-HFRS w przypadku wystąpienia wymiotów  $p=0,002$  i nudności  $p=0,02$  - niż w przypadku PUUV-HFRS. Ogólnie wymioty występowały w 66% przypadków DOBV-HFRS i w 37% przypadków PUUV-HFRS a nudności w 66% przypadków DOBV-HFRS i w 43% przypadków PUUV-HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.7 - 9.



Ryc.18. Badanie zależności między wystąpieniem bólów brzucha w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

Tab.6. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem bólów brzucha.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego; **OR=2,9 (1,34-6,27)**

**szansa na występowanie bólów brzucha jest prawie 3 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	bóle brzucha n	bóle brzucha t	Razem
DOBV	16	31	47
PUUV	42	28	70
Ogółem	58	59	117

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab.7. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem zaburzeń układu pokarmowego.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=2,5 (1,1-5,8) szansa na występowanie zaburzeń ukl. pokarmowego jest 2,5 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	zaburzenia układu pokarmowego n	zaburzenia układu pokarmowego t	Razem
DOBV	11	38	49
PUUV	31	42	73
Ogółem	42	80	122

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab.8. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem nudności.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=2,6 (1,1-5,7) szansa na występowanie nudności jest 2,6 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	nudności n	nudności t	Razem
DOBV	14	28	42
PUUV	40	31	71
Ogółem	54	59	113

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab.9. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem wymiotów.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=3,4 (1,5-7,4) szansa na występowanie wymiotów jest 3,4 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	wymioty n	wymioty t	Razem
DOBV	15	30	45

PUUV	46	27	73
Ogółem	61	57	118

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

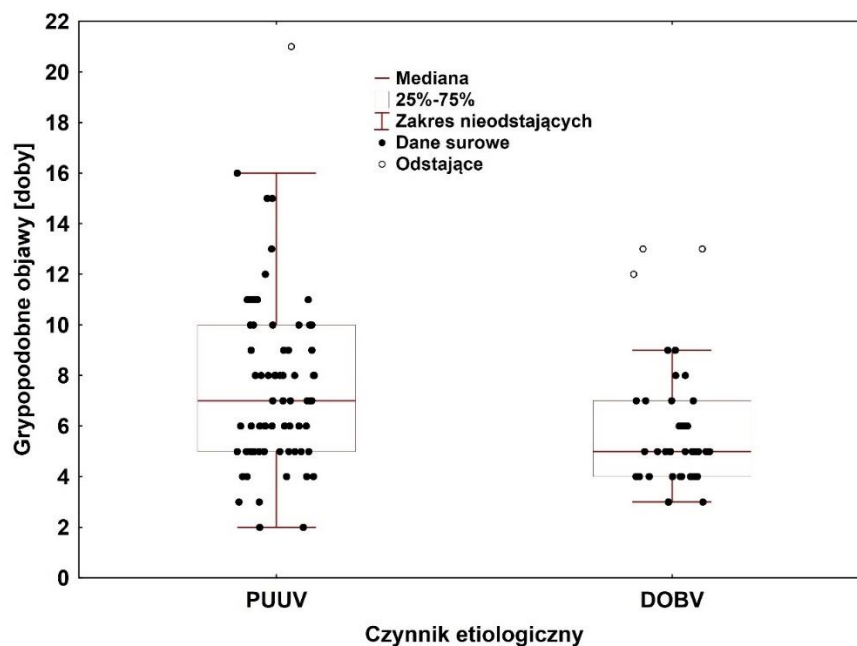
Tab.10. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem biegunki.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=6,0 (2,3-15,3) szansa na występowanie biegunki jest 6 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	biegunka		Razem
	n	t	
DOBV	14	25	39
PUUV	37	11	48
Ogółem	51	36	87

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

5. **objawy grypopodobne** – opisywane ogólnie, zawierały m. in. cechy z punktu 1-4, rozpoczynały się wraz z wysoką gorączką i innymi objawami, przeciętnie trwały 5 – 7 dni (mediana=5 dni w DOBV-HFRS, 7 dni w PUUV-HFRS), wykazano, że długość trwania objawów grypopodobnych w dniach jest istotnie wyższa w PUUV-HFRS,  $p=0,003$ . Objawy grypopodobne zaczynają się wcześniej o dobę w PUUV-HFRS (2 doba zachorowania) niż w DOBV-HFRS (3 doba zachorowania) - Ryc.19.



Objawy grypopodobne długość trwania w dniach
--

Test U Manna-Whitneya $p=0,003$ dłużej dla PUUV
---

Ryc.19. Badanie zależności między długością trwania objawów grypopodobnych (w dniach) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

6. **zaburzenia układu oddechowego** - wystąpiły w 31% w DOBV-HFRS i w 39% w PUUV-HFRS, pojawiały się przeciętnie w 1 – 3 dniu choroby i trwały przeciętnie 6 - 7 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 5/6 dni w DOBV-HFRS; 3,5/7 dni w PUUV-HFRS). Najczęściej obserwowano kaszel – u 33 chorych na 43 stwierdzanych ogółem (u prawie 77% ogółu), z tego kaszel był charakterystycznie stwierdzany w PUUV-HFRS, u 26 chorych na 28 (u prawie 93% badanych z tą etiologią w HFRS), w przypadku występującego kaszlu stwierdzono statystyczną istotność na poziomie  $p=0,01$  w PUUV-HFRS. Kaszel zaczynał się przeciętnie w 1 – 2 dniu choroby i trwał przeciętnie 6 - 7 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 1/6 dni w DOBV-HFRS; 2/7 dni w PUUV-HFRS). Inne rejestrowane objawy zaburzeń układu oddechowego obejmowały występowanie duszności (13,5%), trudności w oddychaniu (ok. 7%), zapalenia płuc/obustronne zapalenie płuc (9%) i kolejno w (2%) - śródmiąższowe zapalenie płuc, pleuropneumonię obustronną, zespół niewydolności oddechowej, niewydolność oddechowo-kръżeniową, zapalenie opłucnej, nasilenie astmy oskrzelowej, poza kaszlem inne objawy zaburzeń układu oddechowego nie miały statystycznie istotnej

zależności z czynnikami DOBV i PUUV wywołujących HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5, Tab.11, Tab.12.

Tab.11. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem kaszlu.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=3,2 (1,3-8,2) szansa na występowanie kaszlu jest 3,2 razy większa w przypadku PUUV**

czy Czynnik ty	kaszel n	kaszel t	Razem
DOBV	39	7	46
PUUV	45	26	71
Ogółem	84	33	117

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab. 12. Wystąpienie objawów klinicznych poza syndromem nerkowym – zaburzenia oddechowe w przebiegu HFRS.

Pacjenci liczba przypadków		Opis zaburzeń oddechowych - z wielokrotnością stwierdzania objawów u chorych <sup>x</sup>
<b>PUUV – HFRS</b>	28	26 <sup>x</sup> kaszel, 2 <sup>x</sup> duszność, trudność w oddychaniu, 2 <sup>x</sup> zapalenie płuc, 2 <sup>x</sup> obustronne zapalenie płuc, śródmiąższowe zapalenie płuc, pleuropneumonia obustronna, zapalenie opłucnej
ciężki	2	2 <sup>x</sup> kaszel, trudność w oddychaniu
umiarkowany	28	16 <sup>x</sup> kaszel, duszność, 2 <sup>x</sup> zapalenie płuc, obustronne zapalenie płuc, pleuropneumonia obustronna, zapalenie opłucnej
łagodny	9	8 <sup>x</sup> kaszel, duszność, obustronne zapalenie płuc
<b>DOBV – HFRS</b>	15	7 <sup>x</sup> kaszel, 4 <sup>x</sup> duszność, 2 <sup>x</sup> trudność w oddychaniu, zespół niewydolności oddechowej, niewydolność oddechowo-kръżeniowa, nasilenie astmy oskrzelowej

ciężki	8	kaszel, 3 <sup>x</sup> duszność, 2 <sup>x</sup> trudność w oddychaniu, zespół niewydolności oddechowej, niewydolność oddechowo-kръżeniowa, nasilenie astmy oskrzelowej
umiarkowany	7	6 <sup>x</sup> kaszel, duszność
łagodny	0	-
<b>HFRS ogółem</b>	43	34 <sup>x</sup> kaszel, 6 <sup>x</sup> duszność, 3 <sup>x</sup> trudność w oddychaniu, 2 <sup>x</sup> zapalenie płuc, 2 <sup>x</sup> obustronne zapalenie płuc, śródmiąższowe zapalenie płuc, pleuropneumonia obustronna, zespół niewydolności oddechowej, niewydolność oddechowo-kръżeniowa, zapalenie opłucnej, nasilenie astmy oskrzelowej
ciężki	10	3 <sup>x</sup> kaszel, 3 <sup>x</sup> duszność, 3 <sup>x</sup> trudność w oddychaniu, zespół niewydolności oddechowej, niewydolność oddechowo-kръżeniowa, nasilenie astmy oskrzelowej
umiarkowany	24	22 <sup>x</sup> kaszel, 2 <sup>x</sup> duszność, 2 <sup>x</sup> zapalenie płuc, obustronne zapalenie płuc, śródmiąższowe zapalenie płuc, pleuropneumonia obustronna, zapalenie opłucnej
łagodny	9	8 <sup>x</sup> kaszel, duszność, obustronne zapalenie płuc

% przypadków z wystąpieniem zaburzeń oddechowych ogólnych:

**HFRS ogółem** - 36% [43/120]

**DOBV – HFRS** - 31% [15/48]

**PUUV – HFRS** - 39% [11/72]

% przypadków z wystąpieniem kaszlu:

**HFRS ogółem** - 28% [33/117]

**DOBV – HFRS** - 15% [7/46]

**PUUV – HFRS** - 36% [26/71]

**od 5 dnia choroby pojawiały się objawy:**

7. **małopłytkowość** – poniżej normy fizjologicznej  $150 \times 10^3 / \mu\text{L}$  wystąpiła w 92% DOBV-HFRS i w 84% w PUUV-HFRS, pojawiała się przeciętnie w 5 dniu choroby i trwała przeciętnie 5 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 5/5 dni ogólnie dla HFRS; 5/5 dni w DOBV-HFRS; 5/5 dni w PUUV-HFRS) z przeciętnym poziomem  $59 \times 10^3 / \mu\text{L}$  (mediana= $59 \times 10^3 / \mu\text{L}$  ogólnie w HFRS;  $52 \times 10^3 / \mu\text{L}$  w DOBV-

HFRS;  $59,5 \times 10^3/\mu\text{L}$  w PUUV-HFRS). Badana długość trwania trombocytopenii w dniach nie pozostawała w zależności z czynnikami DOBV i PUUV,  $p=0,055702$  - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5.

8. **skaza krwotoczna** - wystąpiła w 52% DOBV-HFRS i w 13% w PUUV-HFRS, pojawiała się przeciętnie w 5 dniu choroby (mediana=5 dzień ogólnie w HFRS; 5 dzień w DOBV-HFRS; 7,5 dnia w PUUV-HFRS) i trwała przeciętnie 3 – 4,5 dni (mediana= 3 dni ogólnie w HFRS; 3 dni w DOBV-HFRS; 4,5 dni w PUUV-HFRS). Do najczęstszych objawów skazy krwotocznej należały krwinkomocze i było ich 21 przypadków na 37 stwierdzanych (56,7% ogółu), z wysoką statystyczną istotnością,  $p=0,0008$  częściej w DOBV-HFRS. Krwinkomocze przeciętnie obserwowano ogólnie w HFRS - od 6 dnia choroby i trwały 4,5 dnia (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 6/2 dni w DOBV-HFRS; 5,5/6 dni w PUUV-HFRS). Wystąpiły też zaczerwienienia spojówek – 8 na 37 przypadków (21,6%), rumienie na twarzy - 6 na 37 przypadków (16,2%), krwawa wysypka na skórze - 4 na 37 przypadków (10,8%), krwawienia z nosa - 2 na 37 przypadków (5,4%) i pojedyncze – krwawa biegunka (2,7%), wybroczynki na skórze kończyn dolnych (2,7%) - dane szczegółowe – Tab.4., Tab.5, Tab.13., Tab.14.

Tab.13. Wystąpienie objawów skazy krwotocznej w przebiegu HFRS.								
Pacjenci wg ciężkości przebiegu klinicznego	Objawy skazy krwotocznej z liczbą przypadków w stosunku do ogółu badanych[../..] <sup>n</sup> i wielokrotnością pojawienia się objawów u chorych <sup>x</sup>							
	Liczba n	W	B	N	S	R	Z	K
<b>PUUV – HFRS</b>	<b>10/75</b>	-	-	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 2	-	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 6
ciężki	1/1	-	-	-	-	-	-	<sup>x</sup> 1
umiarkowany	7/45	-	-	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	-	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 4
łagodny	2/16	-	-	-	<sup>x</sup> 1	-	-	<sup>x</sup> 1
<b>DOBV – HFRS</b>	<b>27/52</b>	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 6	<sup>x</sup> 7	<sup>x</sup> 15
ciężki	14/20	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	-	<sup>x</sup> 3	<sup>x</sup> 4	<sup>x</sup> 9

umiarkowany	12/29	-	-	-	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 3	<sup>x</sup> 6
łagodny	1/3	-	-	-	-	<sup>x</sup> 1	-	-
<b>HFRS</b>								
<b>ogółem</b>	<b>37/127</b>	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 4	<sup>x</sup> 6	<sup>x</sup> 8	<sup>x</sup> 21
ciężki	15/23	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	-	-	<sup>x</sup> 3	<sup>x</sup> 4	<sup>x</sup> 10
umiarkowany	19/79	-	-	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 3	<sup>x</sup> 2	<sup>x</sup> 4	<sup>x</sup> 10
łagodny	3/25	-	-	-	<sup>x</sup> 1	<sup>x</sup> 1	-	<sup>x</sup> 1

W – wybroczynki na skórze kończyn dolnych, B – krwawa biegunka, N – krwawienia z nosa, S – wysypka krwawa na skórze, R – rumień na twarzy, Z – zaczerwienienie spojówek, K – krwinkomocz, (-) – brak objawu

Tab.14. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem krwinkomoczu.

Podsumowanie liczebności przypadków objawu w HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=3,9 (1,7-9,2) szansa na występowanie krwinkomoczu jest 3,9 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	krwinkomocz	krwinkomocz	Razem
	n	t	
DOBV	25	22	47
PUUV	59	13	72
Ogółem	84	35	119

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

9. **obniżenie ciśnienia krwi** poniżej 100 mmHg – wystąpiło w 44% DOBV-HFRS i w 15% w PUUV-HFRS, pojawiało się przeciętnie w 5 dniu choroby (mediana=5 dni ogólnie w HFRS; 5,5 dni w DOBV-HFRS; 5 dni w PUUV-HFRS) i trwało przeciętnie 3 –5 dni (mediana=3 dni ogólnie w HFRS; 3 dni w DOBV-HFRS; 5 dni w PUUV-HFRS) - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5.

10. **zespół przeciekających włósniczek** (przeciek naczyń włosowatych) (ang. *capillary leakage*) – zwiększenie ilości płynu śródmiąższowego i/lub zwiększenie ilości płynu w jamach ciała ocenione w nieprawidłowościach w USG, RTG wystąpiło w 58%

DOBV-HFRS i w 39% w PUUV-HFRS. Badanie konsekwencji przecieku włósniczek częściej było w zależności z DOBV i jest to cecha statystycznie istotna,  $p=0,04$ . Do najczęściej widocznych zmian zwiększenia ilości płynu śródmiąższowego dochodziło w obrębie nerek - wystąpiło 26 przypadków na 68 wykazanych ogółem (38%), następnie – w wątrobie (29%), w płucach (16%), w śledzionie (ok. 15%), w trzustce (1,5%). Do przypadków wystąpienia zwiększenia ilości płynu w jamach ciała dochodziło najczęściej w jamie opłucnej – było 12 przypadków na 25 ogółem obserwowanych (48%), w przestrzeni wewnątrztrzewnowej (16%), w przestrzeni zewnątrztrzewnowej (8%), w jamie brzusznej (bez jednoznacznego opisu przestrzeni) - (16%), w miednicy mniejszej (8%), w worku osierdziowym (4%) - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5, Tab.15., Tab.16.

Tab.15. Konsekwencje zespołu przecieku naczyń włosowatych – **nieprawidłowości w USG / RTG**

**HFRS ogółem** – ilość wykazanych zmian 68 u 50 osób, w tym:

<b>nerki</b>	<b>26</b>	<b>wątroba</b>	<b>20</b>	<b>płuca</b>	<b>11</b>	<b>śledziona</b>	<b>10</b>	<b>trzustka</b>	<b>1</b>
obustronnie powiększone nerki	12	powiększona wątroba	17	ogniska, pasma zagęszczeń miąższowych obustronnie w płucach	6	powiększenie śledziony	10	pasmo płynu w trzustce	1
kora nerek obustronnie o podwyższonej echogenności	1	poszerzona żyła wrotna	1	zagęszczenia w dolnych polach obu płuc	1				
pogrubiała hyperechogenna część miąższowa nerek	1	płyn w wątrobie	1	zagęszczenia w nadprzeponowym polu płucnym, zatarte obrysy przepony	1				

pogrubiała ściana miedniczki nerkowej i powięzi okołonerkowej lewej	1	płyn śródmiąższowy w wątrobie	1	ogniska zagęszczeń w przywnękowym polu płuca prawego	1				
obrzęk nerek	1			pasma zagęszczeń w prawym płucu	1				
powiększenie prawej nerki	3			płyn w dolnym lewym polu płucnym	1				
płyn w nerkach	4								
zatarta struktura nerek	1								
płyn śródmiąższowy w nerkach	1								
płyn w dolnym biegunie nerki prawej	1								

Tab.16. Konsekwencje zespołu przecieku naczyń włosowatych – **zwiększenie ilości płynu w jamach ciała**

**HFRS ogółem** – ilość wykazanych zmian 25 u 19 badanych, w tym:

<b>w jamie opłucnej</b>	<b>12</b>	<b>w przestrzeni wewnątrzotrzewnowej</b>	<b>4</b>	<b>w przestrzeni zewnątrzotrzewnowej</b>	<b>2</b>	<b>w jamie brzusznej*</b>	<b>4</b>	<b>w miednicy mniejszej</b>	<b>2</b>	<b>w worku osierdziowym</b>	<b>1</b>
płyn obustronnie w jamach opłucnej	8	płyn w jamie otrzewnowej	3	pasma płynu w przestrzeni zaotrzewnowej	1	płyn w jamie brzusznej	4	płyn w miednicy mniejszej	1	płyn w worku osierdziowym	1
płyn w jamie opłucnej	4	płyn okołopętlowy	1	płyn w przestrzeni okołonerkowej	1		płyn w zatoce Douglasa – zachyłku odbytniczomacicznym	1			

\*- brak jednoznacznego opisu w wyniku USG przestrzeni ze zwiększoną ilością płynu (wewnątrz- czy zewnątrzotrzewnowej)

11. **zaburzenia neurologiczne** - wystąpiły w 14% DOBV-HFRS i w 3% w PUUV-HFRS, pojawiały się przeciętnie w 4 – 8,5 dnia choroby i trwała przeciętnie 2 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 4/2 dni w DOBV-HFRS; 8,5/2 dni w PUUV-HFRS). W spektrum objawów neurologicznych ogólnych były silne bóle głowy, zawroty głowy, zaburzenia świadomości (2 chorych), depresja, napad padaczkowy, niedowład kończyn górnych i dolnych, spowolnienie, splątanie, zaburzenia słuchu. Odrębnie oceniano zaburzenia widzenia, które dotyczyły większej liczby chorych niż omawiane wcześniej zaburzenia neurologiczne ogólne i tak wystąpiły w 22% DOBV-HFRS i w 15% w PUUV-HFRS, pojawiały się przeciętnie w 1-3 dobie choroby i trwały przeciętnie 1-4 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 3/4 dni w DOBV-HFRS; 1/1 dni w PUUV-HFRS), zaburzenia neurologiczne ogólne i zaburzenia widzenia nie były statystycznie istotne dla wykazania zależności z czynnikami DOBV i PUUV - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5, Tab.17.

Tab.17. Wystąpienie objawów klinicznych poza syndromem nerkowym – zaburzenia neurologiczne i zaburzenia widzenia w przebiegu HFRS.		
Pacjenci	Liczba przypadków	Opis zaburzeń neurologicznych i zaburzeń widzenia
<b>PUUV – HFRS</b>	3	silne bóle głowy, napad padaczkowy
ciężki	0	-
umiarkowany	3	silne bóle głowy, napad padaczkowy
łagodny	0	-
<b>DOBV – HFRS</b>	7	zawroty głowy, zaburzenia świadomości (2 przypadki), depresja, niedowład kończyn górnych i dolnych, spowolnienie, splątanie, zaburzenia słuchu
ciężki	3	zaburzenia świadomości, niedowład kończyn górnych i dolnych, spowolnienie, splątanie, zaburzenia słuchu.
Umiarkowany	4	zawroty głowy, zaburzenia świadomości, depresja
łagodny	0	-

<b>HFRS ogółem</b>	10	silne bóle głowy, zawroty głowy, zaburzenia świadomości (2 przypadki), depresja, napad padaczkowy, niedowład kończyn górnych i dolnych, spowolnienie, splątanie, zaburzenia słuchu
ciężki	3	zaburzenia świadomości, niedowład kończyn górnych i dolnych, spowolnienie, splątanie, zaburzenia słuchu
umiarkowany	7	silne bóle głowy, zawroty głowy, zaburzenia świadomości, depresja, napad padaczkowy
łagodny	0	-

% przypadków z wystąpieniem zaburzeń neurologicznych ogólnych:

**HFRS ogółem** - 7,5% [9/120]  
**DOBV – HFRS** - 14% [7/49]  
**PUUV – HFRS** - 3% [2/71]

% przypadków z wystąpieniem zaburzeń widzenia:

**HFRS ogółem** - 18% [22/121]  
**DOBV – HFRS** - 22% [11/49]  
**PUUV – HFRS** - 15% [11/72]

12. **zaburzenia czynności (uszkodzenie) wątroby** - wystąpiły w 73% DOBV-HFRS i w 57% w PUUV-HFRS, pojawiały się przeciętnie w 5 – 6 dniu choroby i trwała przeciętnie 7 – 7,5 dnia (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 5/7,5 dni w DOBV-HFRS; 6/7 dni w PUUV-HFRS). W oznaczeniach ilościowych markerów uszkodzenia wątroby AlAT i AspAT powyżej normy fizjologicznej 50 U/L - przeciętny poziom tych enzymów wynosił ogólnie 112 U/L dla AlAT (mediana= 82 U/l w DOBV-HFRS; 115 U/L w PUUV-HFRS) i 84 U/l dla AspAT (mediana= 86 U/l w DOBV-HFRS; 83 U/L w PUUV-HFRS). Zaburzenia czynności wątroby nie były statystycznie istotne dla wykazania wpływu czynników DOBV i PUUV, podobnie wystąpienie żółtaczki w dwóch przypadkach - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5, Tab. 18.

Tab. 18. Wystąpienie objawów klinicznych poza syndromem nerkowym – zaburzenia czynności wątroby w przebiegu HFRS.

<b>Przypadki zaburzeń czynności wątroby *– poziom markerów AlAT i AspAT</b>					
<b>wg ciężkości przebiegu klinicznego</b>	<b>nr doby początek syndromu mediana / zakres</b>	<b>liczba dni trwania syndromu mediana / zakres</b>	<b>% przypadków</b>	<b>poziom AlAT &gt; 50U/L mediana / zakres</b>	<b>poziom AspAT &gt; 50U/L mediana / zakres</b>
<b>PUUV - HFRS</b>	6 / 3-16	7 / 4-14	33,5% [42/125]	115 /57-10024	83/53-7861
ciężki	11,5 / 8-15	8,5 / 6-11	1,5% [2/125]	260 (1przypadek)	bd
umiarkowany	6 / 3-16	7 / 4-14	25,5% [32/125]	108 /57-10024	95 / 53-7861
łagodny	5 / 4-8	6 / 5-11	6,5% [8/125]	116 / 93- 345	68,5 / 54-388
<b>DOBV - HFRS</b>	5 / 3-11	7,5 / 1-14	29,5% [37/125]	82 / 54- 988	86 / 56-2050
ciężki	4 / 3-6	3 / 2-4	9,5% [12/125]	149 / 59- 988	130 / 58-2050
umiarkowany	6 / 3-11	8,5 / 1-14	17,5% [22/125]	75 / 54- 350	78 / 56-365
łagodny	6 / 5-10	bd	2,5% [3/125]	353-508 (2przypadki)	65-40 (3przypadki)
<b>HFRS ogółem</b>	5 / 3–16	7 / 1-14	63% [79/125]	112 /54-10024	84 / 53-7861
ciężki	5 / 3-15	5 / 2-11	11% [14/125]	145 / 59- 988	130 / 58-2050
umiarkowany	6 / 3-16	7 / 1-14	43% [54/125]	85 / 54-10024	81 / 53-7861
łagodny	5 / 4-10	6 / 5-11	9% [11/125]	144 / 86- 508	71 / 54-401

bd – brak danych

\*wśród 125 przypadków zaburzeń czynności wątroby w przebiegu HFRS stwierdzono tylko 2 przypadki żółtaczki, w tym u 1 osoby bilirubina całkowita była na poziomie 5,8 mg/dL (zakres normy fizjologicznej: 0,2 – 1,1 mg/dL).

% przypadków z wystąpieniem zaburzeń czynności wątroby:

**HFRS ogółem** - 63% [79/125]

**DOBV – HFRS** - 73% [37/51]

**PUUV – HFRS** - 57% [42/74]

### **zespół objawów nerkowych – syndrom nerkowy**

13. **białkomocz** - wystąpił w 88% DOBV-HFRS i w 62% w PUUV-HFRS, pojawiał się przeciętnie w 5 – 6 dniu choroby i trwał przeciętnie 6 dni (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 6/6 dni w DOBV-HFRS; 5/6 dni w PUUV-HFRS), ilość białka w moczu powyżej 15 mg/dL (normy fizjologicznej) obserwowano przeciętnie na poziomie 265 mg/dL ogólnie w HFRS (mediana=320 mg/dL w DOBV-HFRS; 195 mg/dL w PUUV-HFRS). Stwierdzono, że białkomocz jest cechą statystycznie istotną na wysokim poziomie  $p=0,002$  częściej w DOBV-HFRS, natomiast nie koreluje z ciężkością przebiegu HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5, Tab.19.

Tab.19.Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – białkomocz w przebiegu HFRS.				
Przypadki białkomoczu			białko w moczu > 15 mg/dL	
Pacjenci z oznaczonym poziomem białka w moczu - ogółem badanych 122			Poziom białka w moczu [mg/dL]	
wg ciężkości przebiegu klinicznego	liczba osób pozytywnych/osób badanych	% przypadków pozytywnych	zakres wartości	mediana
<b>PUUV – HFRS</b>	46 / 74	62%	20 – 6000	195
ciężki	2 / 3	66%	249 – 6000	bw
umiarkowany	36 / 49	73%	20 – 3300	195
łagodny	8 / 22	36%	78 – 3400	180

<b>DOBV – HFRS</b>	42 / 48	88%	44 – 7000	320
ciężki	17 / 18	94%	52 – 2200	315
umiarkowany	22 / 27	81%	44 – 7000	390
łagodny	3 / 3	100%	84 – 300	192
<b>HFRS ogółem</b>	88 / 122	72%	20 – 7000	265
ciężki	19 / 21	90%	52 – 6000	315
umiarkowany	58 / 76	76%	20 – 7000	266
łagodny	11 / 25	44%	78 – 3400	180

bw – brak wartości do policzenia mediany

14. **zaburzenia wodno-elektrolitowe** - występowały w 52% DOBV-HFRS i w 31% w PUUV-HFRS, obserwowano je przeciętnie w 6 dniu choroby i trwały przeciętnie 4,5 dnia w HFRS (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu= 5/6 dni w DOBV-HFRS; 7/4 dni w PUUV-HFRS). Występowanie zaburzeń wodno-elektrolitowych był cechą statystycznie istotną  $p=0,03$  częściej w DOBV-HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5.

15. **kreatynina** – podwyższony poziom kreatyniny w surowicy krwi powyżej 1,3 mg/dL (norma fizjologiczna) występował w 93% w DOBV-HFRS i w 54% w PUUV-HFRS, przeciętnie na poziomie 3,7 mg/dL ogólnie w HFRS (mediana=4,47 mg/dL w DOBV-HFRS; 2,86 mg/dL w PUUV-HFRS, w tym dla chorych z woj. podkarpackiego mediana=4,11 mg/dL w DOBV-HFRS; 2,76 mg/dL w PUUV-HFRS). Podwyższony poziom kreatyniny był istotny statystycznie,  $p=0,003$  częściej w DOBV-HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.20., Ryc.20.

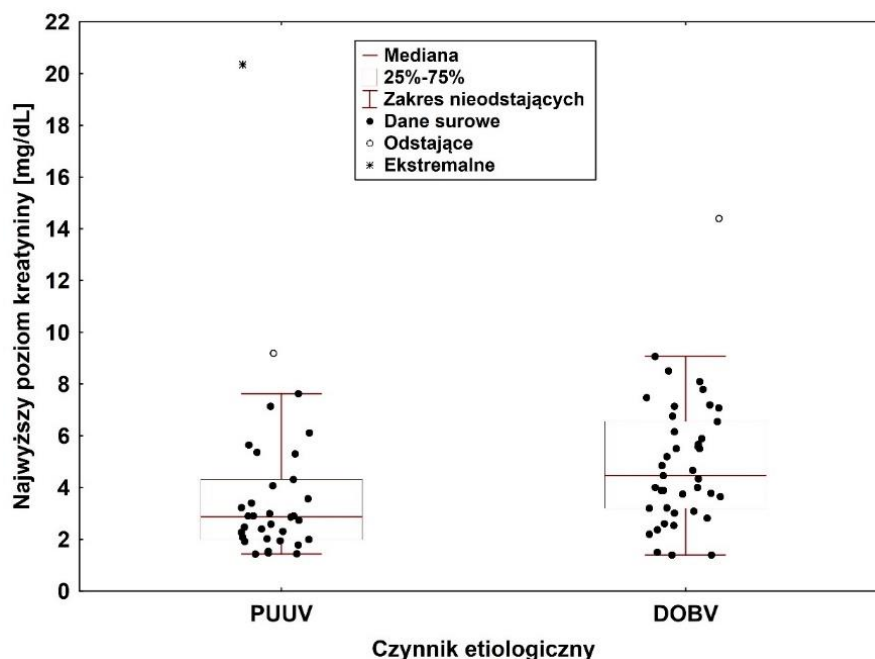
% przypadków z podwyższonym poziomem kreatyniny w surowicy krwi

> 1,3 mg/dL:

**HFRS ogółem** - 70% [76/108]

**DOBV – HFRS** - 93% [41/44]

**PUUV – HFRS** - 54% [35/64]



Kreatynina najwyższy poziom w mg/dL
poziom kreatyniny dla DOBV mediana = 4,11 mg/dL
poziom kreatyniny dla PUUV mediana = 2,76 mg/dL
Test U Manna-Whitneya p=0,003

Ryc.20. Badanie zależności między podwyższonym poziomem kreatyniny w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

16. **ostre uszkodzenie nerek (AKI)** - występowało w 91% w DOBV-HFRS i w 61% w PUUV-HFRS, pojawiało się przeciętnie w 6 dniu choroby i trwało przeciętnie 8 dni ogólnie w HFRS (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu=6/8,5 dni w DOBV-HFRS; 7/7 dni w PUUV-HFRS), występowanie AKI było cechą wysoko statystycznie istotną p=0,0001, częściej w DOBV-HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.20.

Tab.20. Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – ostre uszkodzenie nerek, podwyższenie poziomu kreatyniny.				
<b>Przypadki ostrego uszkodzenia nerek</b>				
<b>wg ciężkości przebiegu klinicznego</b>	<b>AKI</b>			<b>Poziom kreatyniny powyżej 1,3 mg/dL</b>
	<b>nr doby początek</b>	<b>liczba dni trwania syndromu</b>	<b>% przypadków pozytywnych</b>	

	syndrom u mediana / zakres	mediana / zakres		mediana / zakres / % pozytywnych przypadków / liczba pozytywnych przypadków
<b>PUUV – HFRS</b>	7 / 1-15	7 / 2-16	61% [46/75]	2,86 / 1,43-20,35* / 54% / <b>35</b>
ciężki	8 / 4-15	14 / 2-16	100% [3/3]	<sup>1</sup> przyp <b>20,35*</b> / 50% / <b>1</b>
umiarkowany	7 / 1-15	7 / 2-13	68% [34/50]	<b>2,95</b> / 1,92-9,19 / 58% / <b>24</b>
łagodny	7 / 3-11	6 / 2-11	41% [9/22]	<b>1,66</b> / 1,43-4,07 / 47% / <b>10</b>
<b>DOBV – HFRS</b>	6/2-16	8,5/1-26	91% [48/53]	4,47 / 1,40-14,40 / 93% / <b>41</b>
ciężki	5/3-8	12/2-26	100% [20/20]	<b>4,57</b> / 2,37-14,40 / 100% / <b>14</b>
umiarkowany	6/2-16	7/1-15	87% [26/30]	<b>4,85</b> / 1,40-8,10 / 92% / <b>25</b>
łagodny	5/4-6	9 8-10	66% [2/3]	<b>1,97</b> / 1,40-2,54 / 66% / <b>2</b>
<b>HFRS ogółem</b>	6/1-16	8/1-26	73% [94/128]	3,70 / 1,40-20,35* / 70% / <b>76</b>
ciężki	5/3-15	12/2-26	100% [23/23]	<b>4,67</b> / 2,37-20,35 / 94% / <b>15</b>
umiarkowany	6/1-16	7/1-15	75% [60/80]	<b>3,78</b> / 1,40-9,19 / 72% / <b>49</b>
łagodny	6/3-11	8/2-11	44% [11/25]	<b>1,66</b> / 1,40-4,07 / 50% / <b>12</b>

\*- przypadek koinfekcji z *Leptospira interrogans* serowar Australis

17. **skąpomocz** - występował w 60% w DOBV-HFRS i w 26% w PUUV-HFRS, pojawiał się przeciętnie w 6 dniu choroby i trwał przeciętnie 3 dni ogólnie w HFRS (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu=6/2 dni w DOBV-HFRS;

5/5,5 dni w PUUV-HFRS). ), ilość dobową moczu w tej fazie zachorowania przeciętnie była stwierdzana na poziomie 500 mL ogólnie w HFRS (mediana=300 mL w DOBV-HFRS; 650 mL w PUUV-HFRS). Występowanie skąpomoczu było cechą wysoko statystycznie istotną  $p=0,0004$ , częściej w DOBV-HFRS - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.21.

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab.21. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem skąpomoczu.			
Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, <b>OR=4,1 (1,8-9,0) szansa na występowanie skąpomoczu jest 4,1 razy większa w przypadku DOBV-HFRS</b>			
Czynnik	skąpomocz n	skąpomocz t	Razem
DOBV	18	27	45
PUUV	52	19	71
Ogółem	70	46	116

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

18. **wielomocz** - występował w 65% w DOBV-HFRS i w 33% w PUUV-HFRS, pojawiał się przeciętnie w 9,5 dniu choroby i trwał przeciętnie 5,5 dnia ogólnie w HFRS (mediana pojawienia się objawu/mediana trwania objawu=9/6 dni w DOBV-HFRS; 10/5 dni w PUUV-HFRS), ilość dobową moczu w tej fazie zachorowania przeciętnie była stwierdzana na poziomie 5000 mL ogólnie w HFRS (mediana=5200 mL w DOBV-HFRS; 4400 mL w PUUV-HFRS). Występowanie wielomoczu było cechą wysoko statystycznie istotną  $p=0,0008$ , częściej w DOBV-HFRS- dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.22.

Tab.22. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem wielomoczu.			
Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, <b>OR=3,8 (1,7-8,5) szansa na występowanie wielomoczu jest 3,8 razy większa w przypadku DOBV-HFRS</b>			

Czynnik	wielomocz bez zgonu n	wielomocz bez zgonu t	Razem
DOBV	15	28	43
PUUV	47	23	70
Ogółem	62	51	113

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

19. **wdrożenie leczenia nerkozastępczego** – hemodializy wprowadzono w 30% w DOBV-HFRS i w 2,6% w PUUV-HFRS, przeciętnie w 11,5 dniu choroby i trwały przeciętnie 4 dni ogólnie w HFRS (mediana wprowadzenia leczenia/mediana trwania leczenia=11,5/9 dni w DOBV-HFRS; 5/3 dni w 1 przypadku PUUV-HFRS). Hemodializy były powtarzane wg potrzeb klinicznych, przeciętna ilość wykonanych hemodializ była na poziomie 5,5 razy ogólnie w HFRS (mediana=7 razy w DOBV-HFRS; w PUUV-HFRS był opisany tylko 1 przypadek z trzema hemodializami), wprowadzenie potrzeby hemodializ było cechą wysoko statystycznie istotną  $p=0,00003$ , częściej w DOBV-HFRS- dane szczegółowe - Tab.4., Tab.5., Tab.23., Tab.24.

Tab.23. Badanie zależności w przebiegu HFRS między czynnikami DOBV, PUUV a wprowadzeniem leczenia nerkozastępczego - hemodializ.

Podsumowanie liczebności przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=16 (3,5-73,3) szansa na potrzebę wprowadzenia hemodializy do leczenia jest 16 razy większa w przypadku DOBV-HFRS**

Czynnik	hemodializy bez zgonu n	hemodializy bez zgonu t	Razem
DOBV	37	16	53
PUUV	74	2	76
Ogółem	111	18	129

n – nie wystąpiły objawy; t – wystąpiły objawy

Tab.24. Wystąpienie objawów klinicznych syndromu nerkowego – ostre uszkodzenie nerek – leczenie nerkozastępcze.				
wg ciężkości przebiegu klinicznego	Przypadki wprowadzenia leczenia nerkozastępczego			
	nr doby początek hemodializ mediana / zakres	liczba dni trwania hemodializ mediana / zakres	% przypadków pozytywnych *	krotność hemodializ mediana/zakres
<b>PUUV – HFRS</b>	2przyp / 5 i 15	2przyp / 3	2,5% [2 /76]	1przyp / 3
ciężki	2przyp / 5 i 15	2przyp / 3	2,5% [2 /76]	1przyp / 3
umiarkowany	0	0	0% [0 /76]	0
łagodny	0	0	0% [0 /76]	0
<b>DOBV – HFRS</b>	11,5 / 8-23	9 / 3-28	31% [16/52]	7 / 2-14
ciężki	11,5 / 8-23	9 / 3-28	31% [16/52]	7 / 2-14
umiarkowany	0	0	0% [0 /52]	0
łagodny	0	0	0% [0 /52]	0
<b>HFRS ogółem</b>	11,5 / 5-23	4 / 3-28	14% [18/128]	5,5 / 2-14
ciężki	11,5 / 5-23	4 / 3-28	14% [18/128]	5,5 / 2-14
umiarkowany	0	0	0% [0 /128]	0
łagodny	0	0	0% [0 /128]	0

\*% przypadków pozytywnych w stosunku do wszystkich badanych osób

20. **zakończenie zachorowania** – HFRS zakończył się 3 zgonami na 131 badanych (2,3%), **zgony** wystąpiły tylko w DOBV-HFRS (3 zgony na 55 ogółem zdiagnozowanych DOBV-HFRS, 5,5%). W przebiegu PUUV-HFRS stwierdzono koinfekcję z *Leptospira* w 2 przypadkach na 76 ogółem badanych z tą etiologią, w przebiegu DOBV-HFRS stwierdzono koinfekcję z wirusem grypy A w 1 przypadku na 54 ogółem badanych z tą etiologią - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.25.

Tab.25. Zakończenie zachorowania – podsumowanie liczby przypadków HFRS.				
wg ciężkości przebiegu klinicznego	Przypadki HFRS o zidentyfikowanej etiologii			
	ogólna liczba chorych	wyzdrowienie	zgon	koinfekcje
<b>PUUV – HFRS</b>	76	76	0	2 <sup>L</sup>
ciężki	3	3	0	2 <sup>L</sup>
umiarkowany	50	50	0	0
łagodny	23	23	0	0
<b>DOBV – HFRS</b>	54	52	2+	1 <sup>G</sup>
ciężki	23	21	2+	1 <sup>G</sup>
umiarkowany	28	28	0	0
łagodny	3	3	0	0
<b>HFRS ogółem</b>	130	128	2+	2 <sup>L</sup> , 1 <sup>G</sup>
ciężki	26	24	2+	2 <sup>L</sup> , 1 <sup>G</sup>
umiarkowany	78	78	0	0
łagodny	26	26	0	0

+dotatkowo zarejestrowano 1 zgon DOBV – HFRS – nie opisany w ankietach, brak danych o przypadku, <sup>L</sup>koinfekcja z *Leptospira*, <sup>G</sup>koinfekcja wirusem grypy A

% przypadków koinfekcji z *Leptospira*:

**HFRS ogółem** - 1,5% [2/130]

**DOBV – HFRS** - 0% [0/54]

**PUUV – HFRS** - 2,6% [2/76]

% przypadków koinfekcji z Influenza A virus (IAV):

**HFRS ogółem** - <1,0% [1/130]

**DOBV – HFRS** - 1,8% [1/54]

**PUUV – HFRS** - 0% [0/76]

% przypadków zakończonych wyzdrowieniem:

**HFRS ogółem** - 97,7% [128/131]

**DOBV – HFRS** - 94,5% [52/55]

**PUUV – HFRS** - 100% [76/76]

% przypadków zakończonych zgonem:

**HFRS ogółem** - 2,3% [3/131]

**DOBV – HFRS** - 5,5% [3/55]

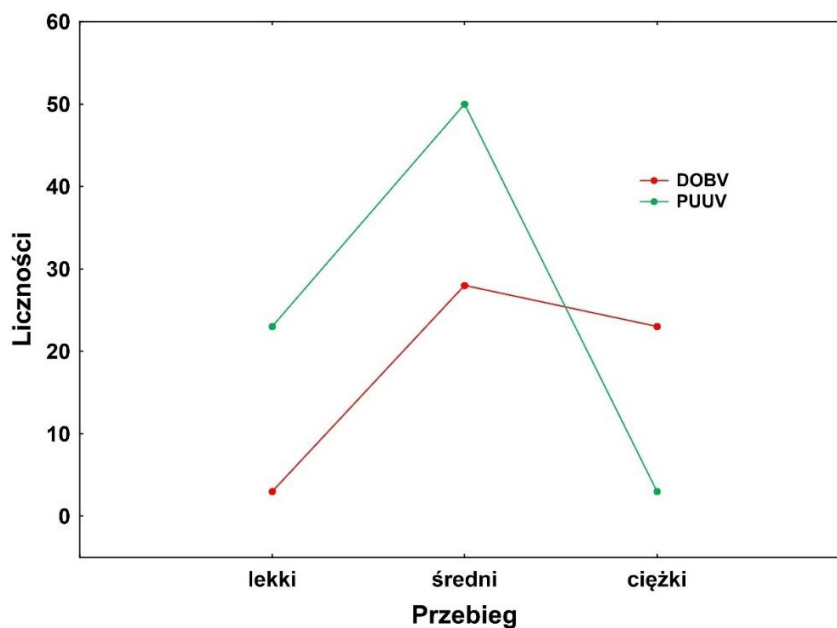
**PUUV – HFRS** - 0% [0/76]

### inne cechy zachorowania

21. **koinfekcje** - w przebiegu PUUV-HFRS stwierdzono koinfekcję z *Leptospira* w 2 przypadkach na 76 ogółem badanych z tą etiologią, w przebiegu DOBV-HFRS stwierdzono koinfekcję z wirusem grypy A w 1 przypadku na 54 ogółem badanych z tą etiologią - dane szczegółowe - Tab.4., Tab.25.

22. **zachorowania w ognisku epidemicznym** – stwierdzono 2 przypadki w ognisku DOBV-HFRS i 2 przypadki w ognisku PUUV-HFRS, pozostałe przypadki były zachorowaniami indywidualnymi - dane szczegółowe - Tab.4.

23. **ciężkość przebiegu klinicznego HFRS** - DOBV-HFRS przebiega ciężiej ( $\chi^2$  z poprawką Yatesa  $p < 0,00001$ , OR=18,05 CI 5,05-64,57), szansa na cięższy przebieg jest 18 razy większa niż w PUUV-HFRS - dane szczegółowe – Ryc.21., Tab.26., natomiast nie stwierdza się różnic w przebiegu HFRS wywołanym przez DOBV i PUUV w sposób umiarkowany i łagodny, stąd te dwa przebiegi kliniczne zostały połączone w następnym testowaniu - dane szczegółowe - Ryc.22., Tab.27.

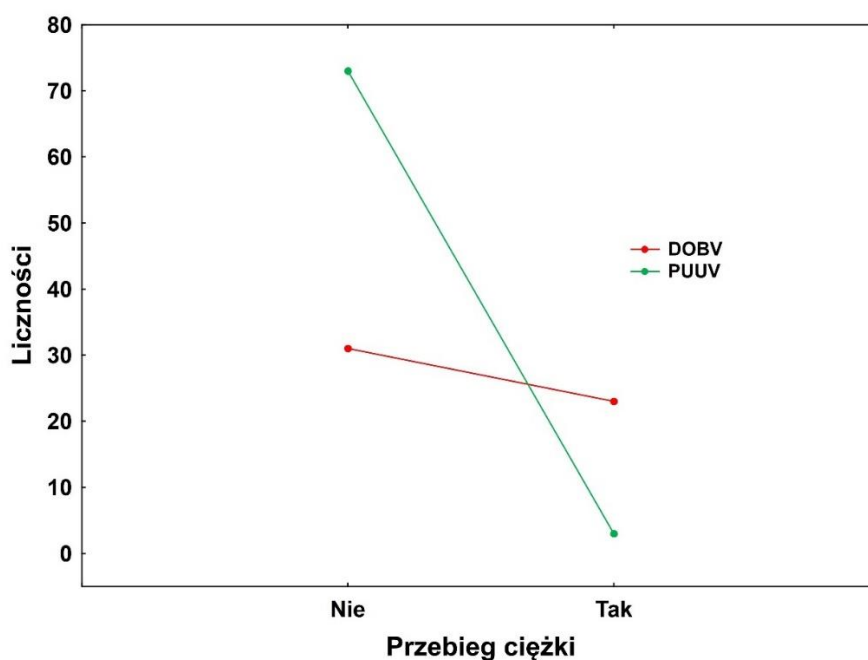


Ryc.21. Badanie zależności między ciężkością obrazu klinicznego w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

Tab.26. Badanie zależności między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem ciężkiego przebiegu HFRS.

Podsumowanie liczebności / % przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego, **OR=18,05 (CI 5,05-64,57)** szansa na wystąpienie przebiegu ciężkiego jest 18-krotnie większa w przypadku zakażenia DOBV niż w przypadku zakażenia PUUV

Czynnik	Przebieg łagodny-lekki	Przebieg umiarkowany- średni	Przebieg ciężki	Razem
DOBV	3/5%	28/52%	23/43%	54
PUUV	23/30%	50/66%	3/4%	76
Ogółem	26/20%	78/60%	26/20%	130



Ryc.22. Badanie zależności między ciężkim objawowo przebiegiem HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

Tab.27. Badanie zależności między czynnikami DOBV, PUUV a występowaniem łagodnego / umiarkowanego (średniego) oraz ciężkiego przebiegu HFRS.

Podsumowanie liczebności / % udziału przypadków HFRS wg stwierdzonego czynnika etiologicznego

Czynnik	Przebieg łagodny i umiarkowany (średni) razem <sup>Nie ciężki</sup>	Przebieg ciężki <sup>Tak</sup>	Razem
DOBV	31 / 57%	23 / 43%	54
PUUV	73 / 96%	3 / 4%	76
Ogółem	104 / 80%	26 / 20%	130

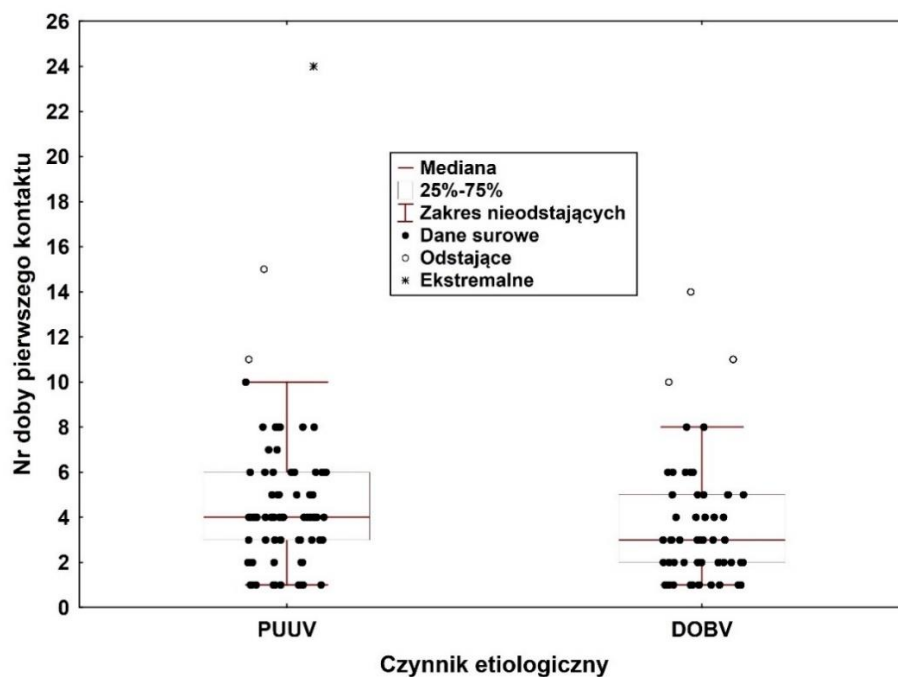
24. **pierwszy kontakt chorego z lekarzem w przebiegu HFRS** – pacjent zgłasza się do lekarza z objawami choroby przeciętnie około 3 - 4 dnia zachorowania (mediana=2,9 dnia w DOBV-HFRS; mediana=3,9 dnia w PUUV-HFRS) i przeciętnie o jedną dobę później w PUUV-HFRS - Ryc.23.

25. **długość trwania zachorowania** – HFRS przeciętnie trwał 16 dni ogólnie w HFRS (mediana =19 dni w DOBV-HFRS; 15,5 dni w PUUV-HFRS) - dane szczegółowe - Tab. 4.

Mediana/zakres liczby dni w zachorowaniu:

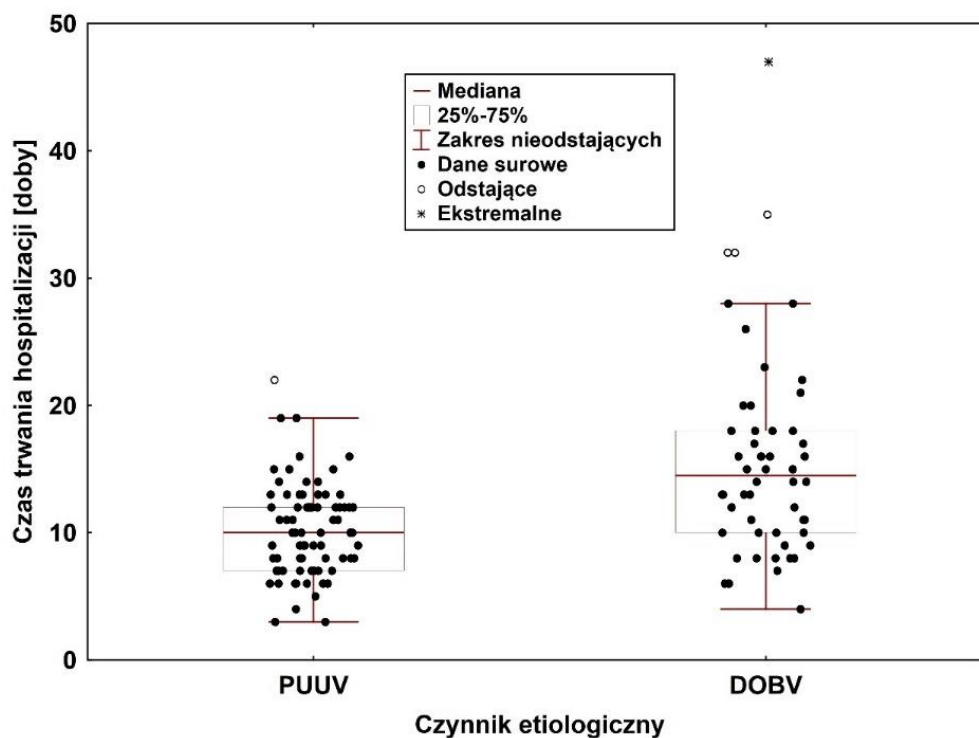
**HFRS ogółem** - 16 [7 – 51]  
**DOBV – HFRS** - 19 [7 – 51]  
**PUUV – HFRS** - 15,5 [8 – 30]

26. **długość trwania hospitalizacji** – przeciętnie trwała 10 – 14 dni ogólnie w HFRS (mediana =14 dni w DOBV-HFRS; 9,8 dni w PUUV-HFRS). Ilość dni, które pacjent spędził w szpitalu było cechą wysoko statystycznie istotną  $p= 0,000002$ , częściej w DOBV-HFRS - Ryc.24.



Nr doby pierwszego kontaktu z lekarzem	
mediana = 3,9 dnia dla PUUV	mediana = 2,9 dnia dla DOBV

Ryc.23. Badanie zależności między czasem pierwszego kontaktu chorego z lekarzem (w numerach dób upływających od pierwszych objawów HFRS) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.



Długość trwania hospitalizacji w dniach	
mediana = 14 dni dla DOBV	mediana = 9,8 dnia dla PUUV

Test U Manna-Whitneya  $p= 0,000002$  dłużej dla DOBV

Ryc.24. Badanie zależności między długością trwania hospitalizacji (w dniach) w przebiegu HFRS a czynnikami DOBV i PUUV.

W przebiegu HFRS o etiologii DOBV zmarły 3 osoby, w przypadkach PUUV-HFRS nie było przypadku śmiertelnego.

Dalsze badania, jakie prowadzono w celu scharakteryzowania wykrytej gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym odnosiły się do przedstawienia ekologii zakażeń ortohantawirusami i charakterystyki występowania HFRS u ludzi w Polsce w latach 2004 – 2018. Badanie wykonano na podstawie zebranych danych ankietowych dla przypadków HFRS, hospitalizowanych – Zał. 3 i 4 oraz wyników badań kohortowych - dane szczegółowe – Tab.4. - poniżej zestawienia wyników analiz dotyczących okoliczności narażenia ludzi na zakażenie ortohantawirusami oraz na HFRS.

## **II. Charakterystyka występowania i narażenia na gorączkę krwotoczną z zespołem nerkowym ludzi w Polsce w latach 2004 – 2018.**

(punkty od 1. do 8.)

**1. płeć, wiek i miejsce zamieszkania osób narażonych** – na HFRS chorowało więcej mężczyzn niż kobiet, ogółem zidentyfikowano wśród chorych 69% mężczyzn i 31% kobiet (mężczyzn było prawie 2 razy więcej niż kobiet), mediana wieku chorych analizowanych ogółem wynosił 43 lata (mediana wieku chorych DOBV-HFRS=46 lat, ale chorowały osoby od 17r.ż. do 78 r.ż; mediana wieku chorych PUUV-HFRS=39 lat i chorowały osoby od 15r.ż. do 61 r.ż). Płeć i wiek osób, które chorowały na HFRS nie miały związku z ciężkością przebiegu klinicznego DOBV-HFRS i PUUV-HFRS (te relacje nie były istotne statystycznie) Osoby, u których wykryto HFRS pochodziły w 89% z miejscowości wiejskich, 11% mieszkających w miastach pochodziło z małych miast z ludnością do 20 000 mieszkańców, byli też chorzy z 2 miast liczących do 40 000 (Sanok i Jarosław) i chorzy z dużego miasta z narażenia zawodowego (zoolodzy z Krakowa) - dane szczegółowe - Tab. 28.

Tab.28. Liczebność pacjentów hospitalizowanych z powodu HFRS - wg płci, wieku i miejsca zamieszkania.

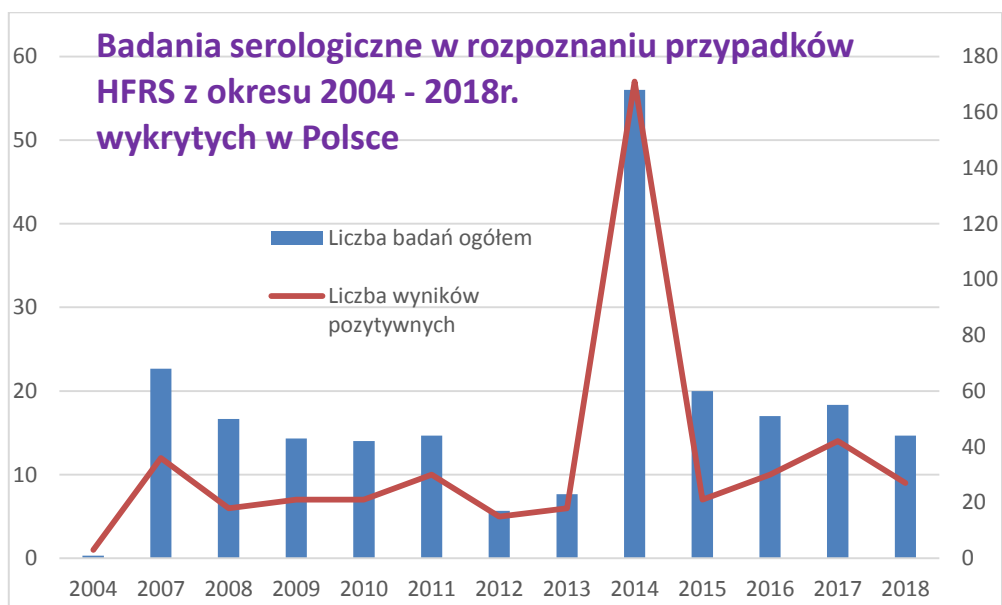
wg ciężkości przebiegu klinicznego	liczba mężczyzn / % przypadków	liczba kobiet / % przypadków	wiek mężczyzn mediana / zakres	wiek kobiet mediana / zakres	liczba osób / % przypadków	
					wieś	miasto
<b>PUUV - HFRS</b>	54 / 71%	22 / 29%	39,0 / 15-61	43,0 / 12-65	67 / 88%	9 / 12%
ciężki	2 / 67%	1 / 33%	39,0 / 39-39	23,0 / <sup>1</sup> przyp	3 / 100%	0 / 0%
umiarkowany	36 / 72%	14 / 28%	38,0 / 15-59	46,5 / 12-65	44 / 88%	6 / 12%
łagodny	16 / 70%	7 / 30%	46,0/ 21-61	37,0 / 22-56	20 / 87%	3 / 13%
<b>DOBV - HFRS</b>	36 / 67%	18 / 33%	46,0 / 17-78	39,5 / 15-77	49 / 91%	5 / 9%
ciężki	16 / 70%	7 / 30%	43,5 / 17-67	37,0 / 30-77	22 / 96%	1 / 4 %
umiarkowany	19 / 68%	9 / 32%	45,0 / 18-67	39,0 / 15-64	25 / 89%	3 / 11%
łagodny	1 / 33%	2 / 67%	78,0 / <sup>1</sup> przyp	45,5 / 40-51	2 / 67%	1 / 33%
<b>HFRS ogółem</b>	90/ 69%	40 / 31%	43,0 / 15-78	40,0 / 12-77	116 / 89%	14 / 11%
ciężki	18 / 69%	8 / 31%	39,5 / 17-67	35,5 / 23-77	25 / 96%	1 / 4%
umiarkowany	55 / 70%	23 / 30%	40,5 / 15-67	43,0 / 12-65	69 / 88%	9/ 12%
łagodny	17 / 65%	9 / 35%	47,0 / 21-78	40,0 / 22-56	22 / 85%	4 / 15%

**HFRS ogółem bez rozróżniania płci** – zakres wieku 12-78 lat, mediana 42,5 lat

**DOBV-HFRS ogółem bez rozróżniania płci** – zakres wieku 15-78 lat, mediana 44,0 lat

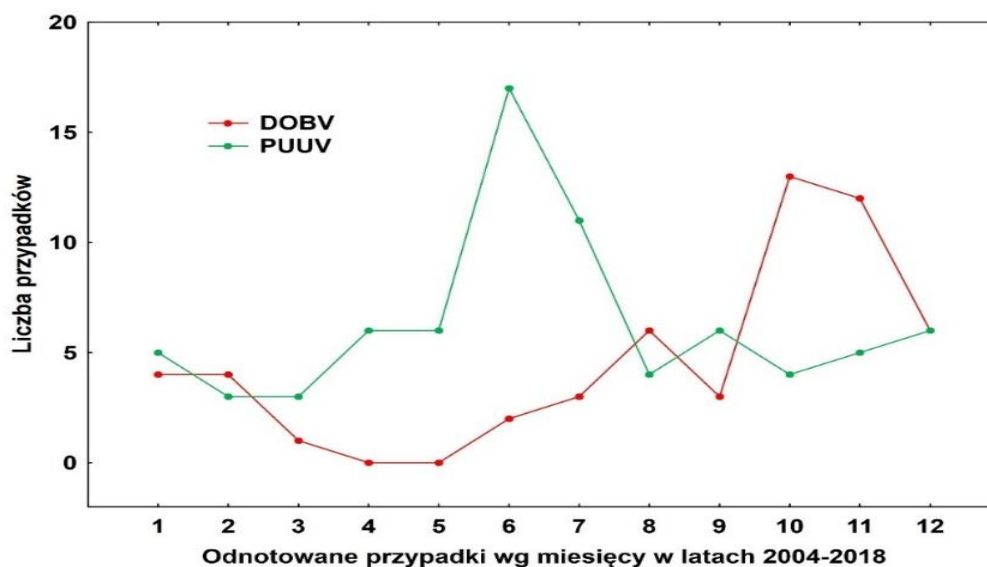
**PUUV-HFRS ogółem bez rozróżniania płci** – zakres wieku 12-65 lat, mediana 39,5 lat

**2. utrwalone występowanie zachorowań w Polsce** - obserwuje się stałe, coroczne występowanie przypadków gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u ludzi, identyfikowane w rutynowo wykonywanych serologicznych badaniach diagnostycznych, wykrywających poziom reaktywnych przeciwciał antyhantawirusowych w klasie IgM i IgG u osób z objawami klinicznymi infekcji hantawirusowej ang. *hantavirus disease* HVD. Najwięcej, 57 przypadków HFRS rozpoznano w 2014r., w tym samym roku było też najwięcej (prawie 34%) dobrze postawionych diagnoz objawów klinicznych i skierowań lekarskich na badania laboratoryjne - Ryc.25.

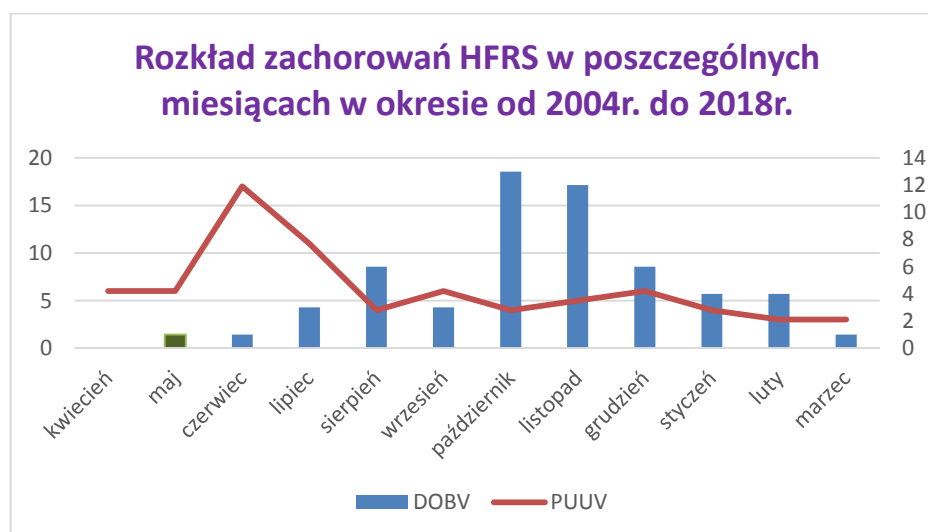


Ryc.25. Badania serologiczne w rozpoznaniu przypadków HFRS z okresu 2004 – 2018r. wykrytych w Polsce.

**3. sezonowość zachorowań** – badanie zależności między wystąpieniem przypadków HFRS rejestrowanych w miesiącach kalendarzowych wykazało, że HFRS identyfikuje się w ciągu całego roku, przy czym obserwuje się występowanie dwóch niezależnych szczytów zachorowań – PUUV-HFRS ze szczytem w czerwcu i DOBV-HFRS ze szczytem w październiku. W badanym okresie zachorowania DOBV-HFRS nie były stwierdzane w kwietniu i maju, natomiast PUUV-HFRS występował w każdym miesiącu kalendarzowym - Ryc.26., Ryc.27.



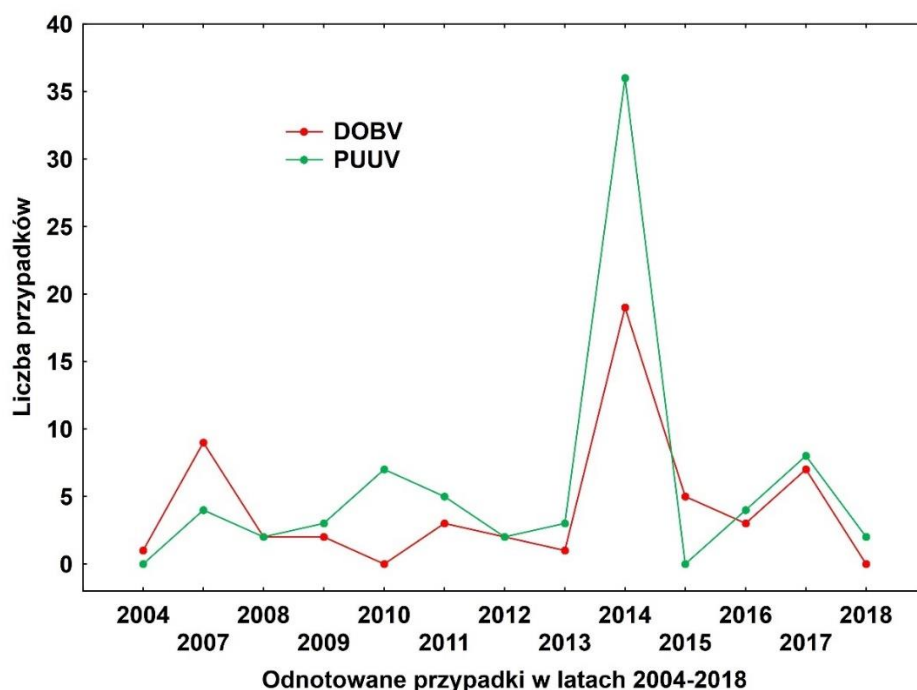
Ryc.26. Występowanie przypadków DOBV-HFRS, PUUV-HFRS w miesiącach kalendarzowych w latach 2004 – 2018r.



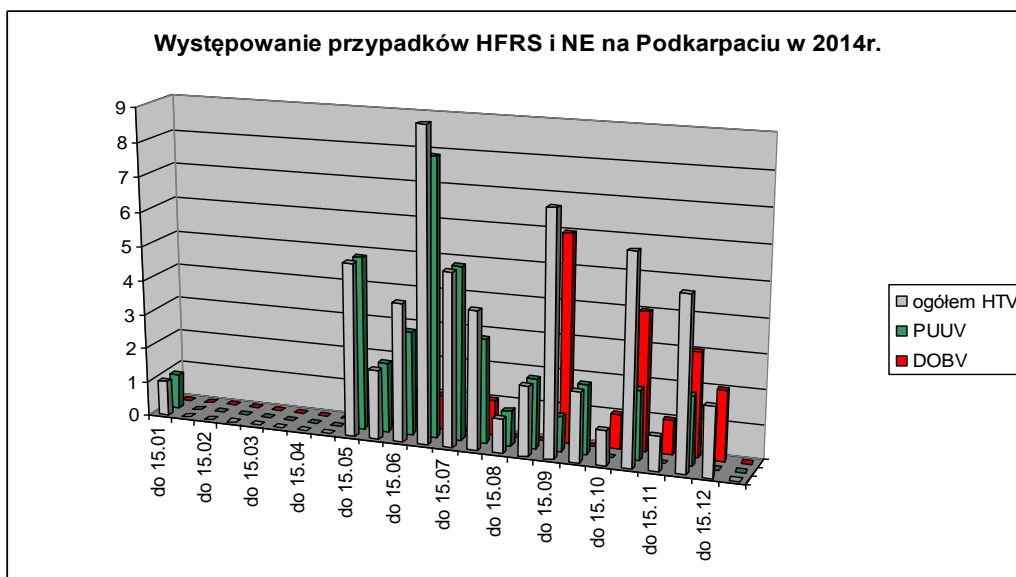
Ryc.27. Rozkład zachorowań HFRS w poszczególnych miesiącach w okresie od 2004r. do 2018r., zielonym kolorem zaznaczono wystąpienie przypadku indeksowego HFRS

**4. cykliczność występowania zwiększonej liczby przypadków** - badanie zależności między wystąpieniem przypadków DOBV-HFRS, PUUV-HFRS a ich liczebnością w poszczególnych latach z okresu 2004 – 2018 wykazało, że PUUV-HFRS w Polsce występował w cyklach ze zwiększoną ilością w stosunku do poprzednich lat w roku: 2007, 2010, 2014, 2017 a DOBV-HFRS w cyklach: 2007, 2011, 2014, 2017. Zaobserwowano, że ogólnie cykliczność HFRS w Polsce można

także przedstawiać w cyklach małych i dużych, małe cykle to te z różnicą zachorowań w stosunku do poprzednich lat i z wzrostem do 10 przypadków, duże cykle to wzrost zachorowań powyżej 10 przypadków, właściwie z wielokrotnym wzrostem liczby rejestrowanych przypadków HFERS, rok 2014 był takim dużym cyklem wzrostu zachorowań w okresie od IX 2007r. do końca XII 2018r. Dla zobrazowania dużego cyklu zachorowań w roku 2014, sporządzono wykres rejestracji przypadków w systemie tygodniowym, widać, że zachorowania ogólnie rozpoczęły się w połowie maja 2014r. i trwały nieprzerwanie 7 miesięcy do połowy grudnia 2014r., szczyt zachorowań PUUV-HFERS był w czwartym tygodniu czerwca 2014r. a DOBV-HFERS w pierwszym tygodniu września 2014r. Dużą cykliczność HFERS wyraża zestawienie zapadalności zachorowań na 100 000 mieszkańców w Polsce, które obejmuje rozszerzenie okresu badawczego i uchwyciły wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFERS w roku 2014r. i w roku 2021r., przy czym w roku 2007r. badania rozpoczęły się dopiero we wrześniu i nie uwidoczniły sytuacji w II i III kwartale 2007r., ale ze względu na widoczny wzrost zachorowań uznano rok 2007 za rok z dużego cyklu HFERS w Polsce - Ryc.28., Ryc.29., Ryc.30.



Ryc.28. Liczba wykrytych przypadków DOBV-HFERS i PUUV-HFERS w Polsce w poszczególnych latach w okresie od 2004r. do 2018r.



Ryc.29. Wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFRS o etiologii PUUV ze szczytem w VII 2014r. i o etiologii DOBV ze szczytem w X 2014r. w województwie podkarpackim.



Ryc.30. Zapadalność w latach 2007 – 2022 na chorobę wywołaną przez hantawirusy u ludzi w Polsce – wystąpienie wzrostu epidemicznego przypadków HFRS w roku 2014r. i w roku 2021r.

**5. lokalizacje zakażeń ortohantawirusowych i zachorowań na HFRS** – w obszarach gmin woj. podkarpackiego, gdzie zidentyfikowano HFRS obserwuje się koncentrację przypadków PUUV-HFRS zlokalizowanych głównie w części środkowo-wschodniej na Południu województwa – poniżej na zamieszczonej mapce obszar gromadzenia się tych przypadków zaznaczono zielonym kręgiem, natomiast DOBV-HFRS (na mapce zaznaczono pomarańczowym kręgiem) wykrywana była prawie jako jedyny rodzaj HFRS, w części środkowej na Wschodzie województwa i w drugim obszarze razem z PUUV-HFRS na Południu województwa. W innych częściach województwa podkarpackiego identyfikowano tylko pojedyncze przypadki HFRS - Ryc.31. W sumie w woj. podkarpackim, zlokalizowano HFRS w 96 miejscowościach w obrębie 44 gmin 15-stu powiatów (w woj. podkarpackim jest 160 gmin i 25 powiatów). Liczba miejscowości w gminach, w których stwierdzano chorych była zróżnicowana, najczęściej były to przypadki pojedyncze (mediana lokalizacji w gminach=1miejscowość), na 44 badane gminy było 25 gmin z pojedynczą lokalizacją, 8 z dwoma lokalizacjami, 4 z trzema lokalizacjami, 3 z czterema i jedna gmina z 5-cioma lokalizacjami, jedna z 6-cioma, jedna z 8-mioma i jedna z 12-stoma lokalizacjami HFRS. Wśród wszystkich opisywanych lokalizacji najwięcej przypadków HFRS, tj. 33 zarejestrowano w 12 miejscowościach gminy Komańcza (30 przypadków PUUV-HFRS i 3 przypadki DOBV-HFRS), następnie 9-ciu chorych było z 8 miejscowości gminy Sanok, 6-ciu z 6 miejscowości gminy Solina, 7-dmiu z 5 miejscowości gminy Ustrzyki Dolne. Gmina Komańcza należy jest obszarem ze stwierdzoną najwyższą liczbą przypadków HFRS w woj. podkarpackim i w Polsce. Szczegółowe dane dotyczące liczby miejscowości i lokalizacji przypadków PUUV-HFRS i DOBV-HFRS w gminach pokazuje wykres - Ryc.32. Oceniając lokalizację występowania HFRS w obrębie większych obszarów - powiatów w woj. podkarpackim, najwięcej lokalizacji, w których stwierdzono zachorowania z etiologią hantawirusową znajduje się w powiecie sanockim (32 miejscowości), następnie w leskim (17 miejscowości) i bieszczadzkiem (9 miejscowości) – czyli w 3 sąsiadujących powiatach - Ryc.33. W dalszej analizie rozpatrywano liczebność przypadków PUUV-HFRS i DOBV-HFRS w powiatach. Powiat sanocki i leski można określić jako rejony z 4-krotną przewagą PUUV-HFRS - w sanockim 46 przypadków PUUV-HFRS do 11 DOBV-HFRS; 80% ogólnie stwierdzanych było PUUV-HFRS, podobnie było w powiecie leskim -14 przypadków PUUV-HFRS do 4 DOBV-HFRS; 77% ogólnie stwierdzanych było

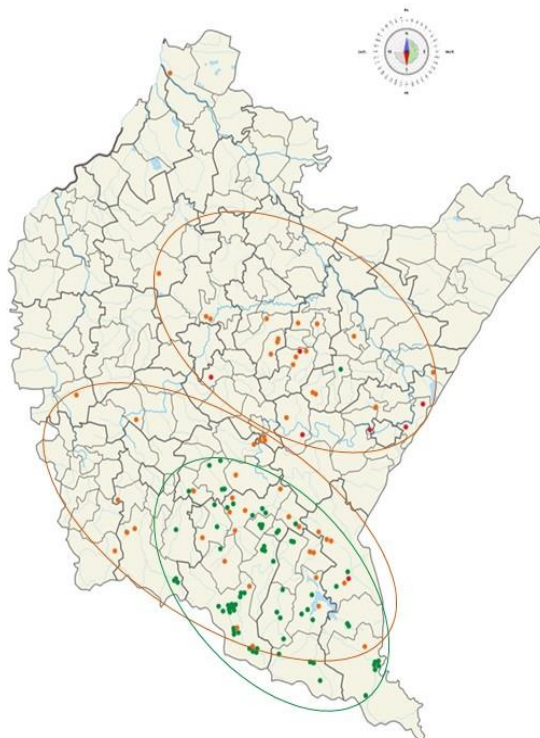
PUUV-HFRS, natomiast w powiatach przemyskim, przeworskim, jarosławskim, łańcuckim, rzeszowskim widoczna była regionalizacja DOBV-HFRS, w sumie w tych powiatach zarejestrowano 20 przypadków DOBV-HFRS i jeden PUUV-DOBV i jest to jedyne zachorowanie z tą etiologią poza Południem woj. podkarpackiego. W części powiatów występowały przypadki HFRS z etiologią PUUV lub DOBV z podobną liczebnością i były to powiaty bieszczadzki oraz sąsiadujące ze sobą brzozowski i krośnieński - w sumie w tych powiatach zarejestrowano 11 przypadków DOBV-HFRS i 13 PUUV-DOBV. W pozostałych powiatach, tj. w stalowowolskim, kolbuszowskim, dębickim, strzyżowskim i jasielskim – powiatach na zachodzie woj. podkarpackiego zanotowano tylko po 1 przypadku DOBV-HFRS i nie stwierdzono PUUV-HFRS - Ryc.34.

Mapa konturowa źródło Internet:

Aotearoa/mapy; modyfikacja własna,

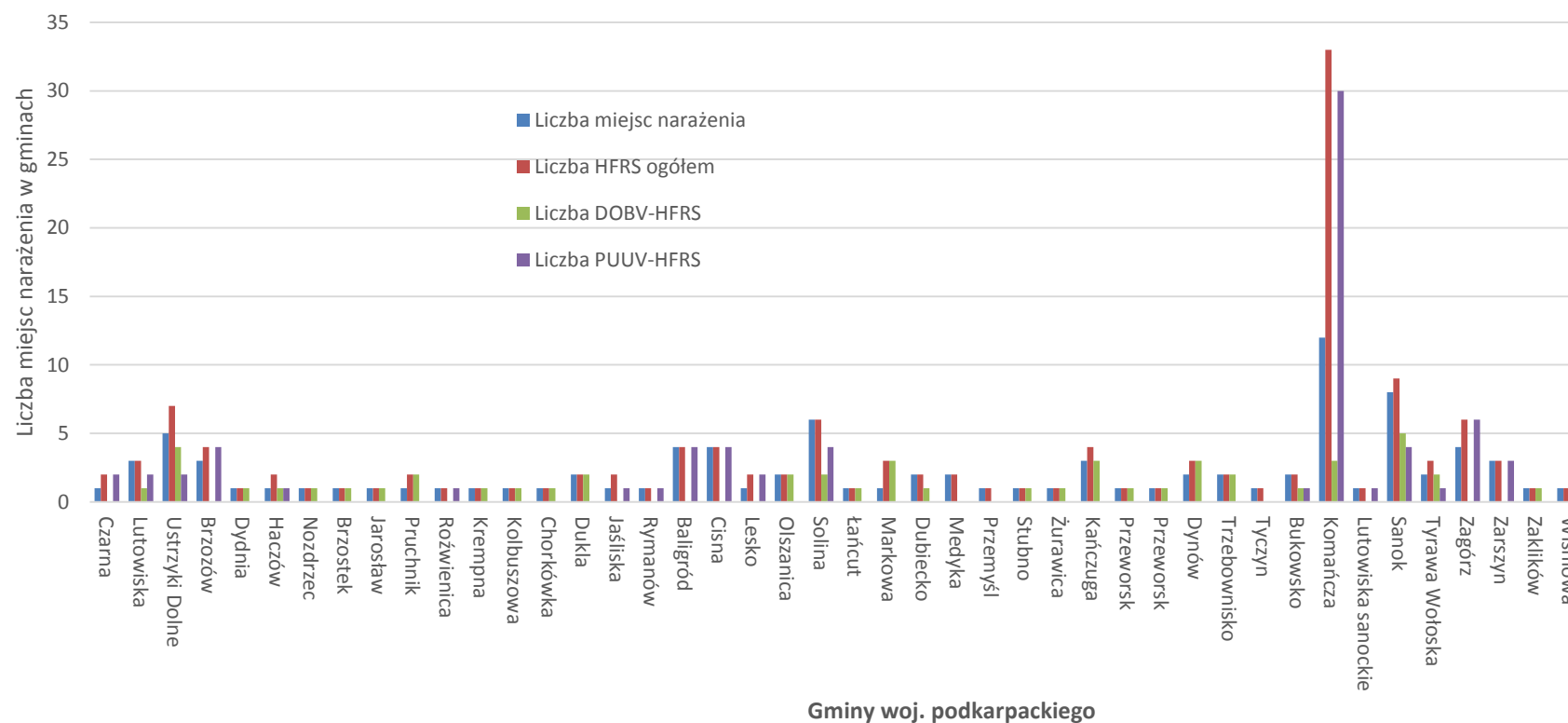
wprowadzona kolorystyka:

- przypadek i obszar DOBV – HFRS
- przypadek i obszar PUUV – HFRS
- przypadek HFRS (PUUV/DOBV nieokreślony)

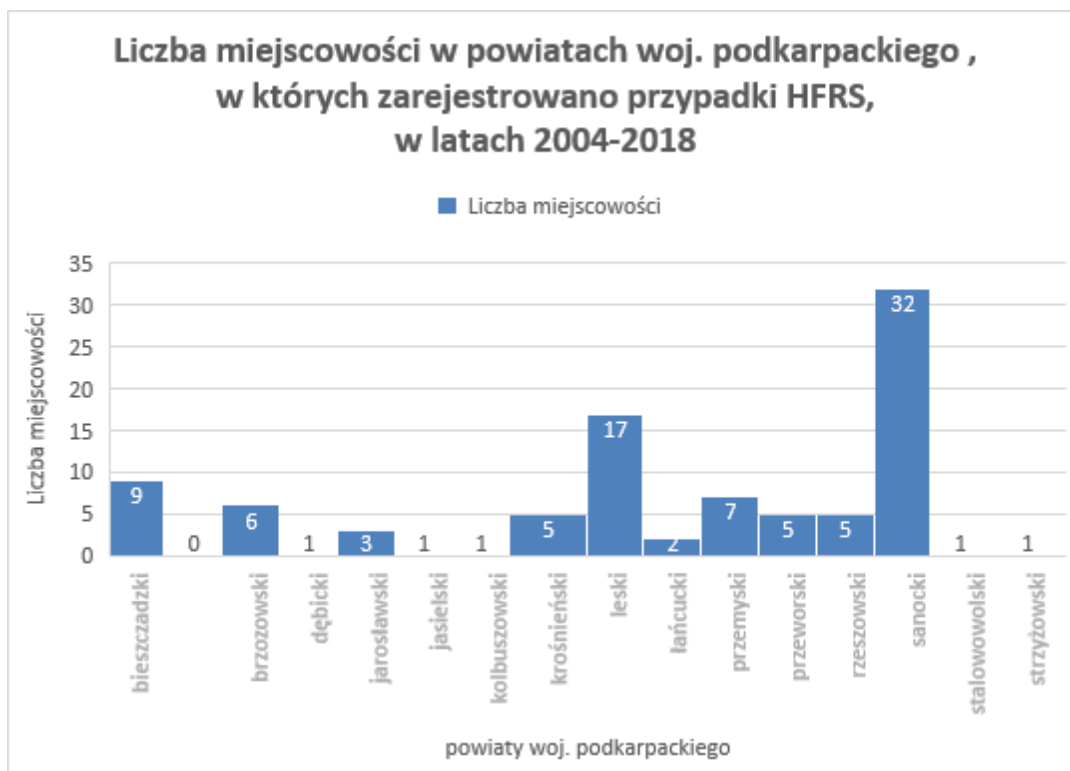


Ryc.31. Rozmieszczenie przypadków HFRS w okresie od 2004r. do 2018r. w gminach woj. podkarpackiego.

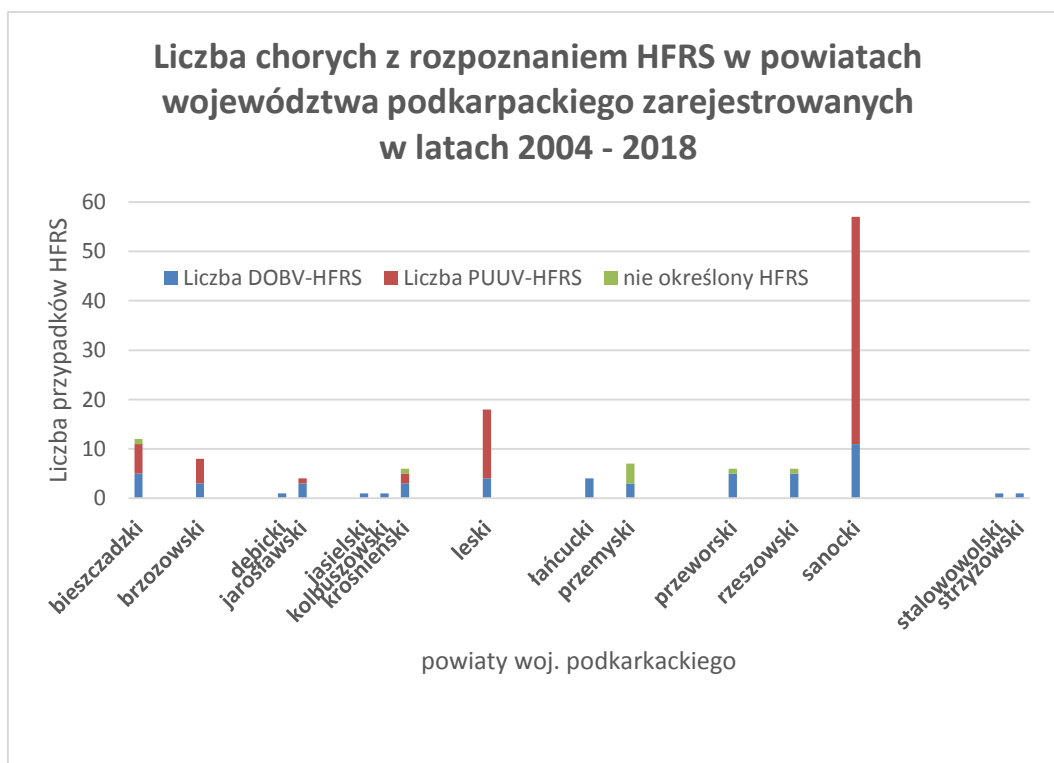
### Liczba chorych z rozpoznaniem HFRS wg miejsc narażenia na zakażenie hantawirusami w latach 2004-2018 w województwie podkarpackim



Ryc.32. Liczba chorych w gminach województwa podkarpackiego z rozpoznaniem HFRS w latach 2004 – 2018r.

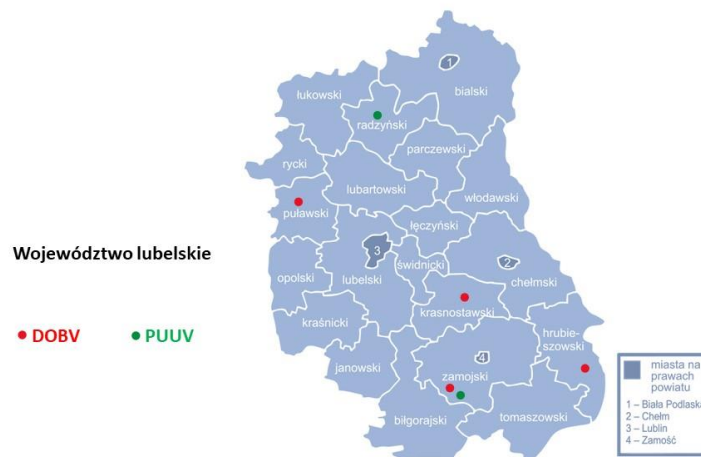


Ryc.33. Liczba miejscowości w powiatach woj. podkarpackiego, w których zarejestrowano przypadki HFRS w latach 2004 – 2018r.

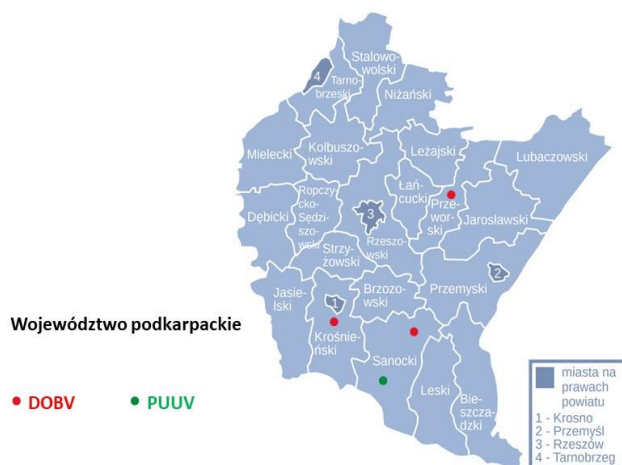


Ryc.34. Liczba chorych z rozpoznaniem HFRS w powiatach województwa podkarpackiego zarejestrowanych w latach 2004 -2018r.

Poza badaniami wykonywanymi w grupie osób hospitalizowanych w kierunku rozpoznania HFRS były przeprowadzone w latach 2007 – 2018 badania retrospektywne surowic osób zdrowych z woj. podkarpackiego i lubelskiego, którzy mogli być narażeni na zakażenia hantawirusowe ze względu na wykonywany zawód – grupa leśników Ryc.35. oraz na warunki środowiska życia w woj. podkarpackim – grupa rezydentów DPS-ów - Ryc.36. Źródło mappek: Internet – modyfikacja własna



Ryc.35. Badanie seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami wśród zdrowych leśników w woj. lubelskim – próbki pobrane w 2006r.



Ryc.36. Badanie seroprewalencji zakażeń ortohantawirusami wśród zdrowych rezydentów DPS-ów oraz leśników w woj. podkarpackim – próbki pobrane w 2004 - 2006r.

W obu grupach – stwierdzono seroprewalencję – wyniki zamieszczono w Tab.3., jeżeli chodzi o lokalizację zakażeń hantawirusowych to w woj. podkarpackim przeciwciała anti-PUUV wykazano wśród leśników z Nadleśnictwa w Komańcza a przeciwciała anti-DOBV u rezydentów DPS z powiatów krośnieńskiego, sanockiego i przeworskiego - Ryc.36. W woj. lubelskim wykazano przeciwciała anti-PUUV wśród leśników Nadleśnictw w 2 lokalizacjach tj. na południu w Roztoczańskim Parku Narodowym i na północy w Radzynie Podlaskim a przeciwciała anti-DOBV stwierdzono wśród leśników w 4 lokalizacjach tj. na południu w Roztoczańskim Parku Narodowym, na wschodzie w Mircze, na zachodzie w Puławach i w środkowej części województwa w Krasnymstawie.



Ryc.37. Występowanie DOBV-HFRS i PUUV-HFRS rozpoznanych w Polsce - u osób hospitalizowanych w latach 2007-2018 - oznaczono żółtym polem, przypadki zakażenia objawowego u uczestników ogniska zakażenia zawodowego PUUV-NE w 2013r., nie hospitalizowanych – zaznaczono zielonym kołem. Źródło mappek: Internet – modyfikacja własna.

Przeprowadzono także badania serologiczne wśród grupy 44 pacjentów hospitalizowanych z podejrzeniem HFRS i kierowanych do diagnostyki z innych województw, badania takie wykonywano na bieżąco, badane surowice pochodziły z różnych województw z Polski, potwierdzenie kolejnych 6-ciu województw z lokalizacją 4 przypadków DOBV-HFRS i 9 PUUV-HFRS uzyskano dla pacjentów z woj. dolnośląskiego (powiat wrocławski, gmina Kobierzyce), opolskiego (powiat Opole), łódzkiego (powiat wieluński, gmina Wieluń), śląskiego (powiaty: cieszyński, Bytom, Katowice, Gliwice), lubelskiego (powiat łączyński, gmina Cyców), małopolskiego (powiat Kraków). W badaniach ogniska epidemicznego nefropatii epidemicznej (PUUV-HFRS) wśród zoologów stwierdzono 19 przypadków z potwierdzoną obecnością przeciwciał anti-PUUV w małopolskim a w podlaskim przeciwciała anti-PUUV stwierdzono u 3 zoologów – wyniki w Tab.3. W sumie wraz z województwem podkarpackim HFRS wykryto w 8 województwach w Polsce (tj. w połowie województw w kraju) w obszarze Wschodniej i Południowej Polski - Ryc.37.

### **Okoliczności narażenia ludzi na zakażenie ortohantawirusami oraz na HFRS**

6. **narażenie pobytowe / środowiskowe** – związane z zamieszkaniem w bliskiej odległości do naturalnych siedlisk gryzoni (rezerwuaru i przenosicieli ortohantawirusów na polach i w lasach) oraz wykonywanie prac sezonowych w ogrodzie, polu i w otoczeniu domostw stwarzały warunki większego narażenia na PUUV-HFRS, stwierdzono w tej zależności wysoką statystyczną istotność,  $p=0,0003$  - dane szczegółowe - Tab.27.

Ocenie statystycznej poddano także zależność pomiędzy wystąpieniem PUUV-HFRS, DOBV-HFRS a odległością domostwa od siedlisk gryzoni tj. pól i lasów, w tym układzie nie znaleziono istotnej statystycznie zależności.

7. **narażenie zawodowe** – związane z wykonywaniem pracy (w gospodarce leśnej, przebywaniem zawodowym w lesie, transportem drewna z lasu, składowaniem drewna, porządkowaniem magazynów, pomieszczeń, odławianiem gryzoni) stwarzały warunki większego narażenia na PUUV-HFRS, stwierdzono w tej zależności wysoką statystyczną istotność,  $p=0,0003$ . Grupa czynności związanych tylko z pracą w gospodarce leśnej i przebywaniem zawodowym w lesie była czynnościami, które wpływały na narażenie więcej w PUUV-HFRS niż DOBV-HFRS na poziomie

statystycznej istotności  $p=0,01$ . Prace porządkowe w zakładowych magazynach częściej narażał na DOBV-HFRS, poziom statystycznej istotności  $p=0,04$  - dane szczegółowe - Tab.29.

Tab.29. Badanie zależności pomiędzy DOBV-HFRS, PUUV-HFRS a narażeniem pobytowym i zawodowym osób hospitalizowanych - zestawienie poziomu istotności statystycznej.	
Narażenie pobytowe - prace sezonowe - w ogrodzie i w polu	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,0003$ częściej w PUUV
Narażenie zawodowe – ogółem	Chi <sup>2</sup> NW $p=0,0003$ częściej w PUUV
Prace w gospodarce leśnej, przebywanie zawodowe w lesie	Chi <sup>2</sup> Yatesa $p=0,01$ częściej w PUUV
Prace porządkowe w zakładowych magazynach	Chi <sup>2</sup> Yatesa $p=0,04$ częściej w DOBV

$p$  – prawdopodobieństwo testowe, istotność statystyczna  $p<0,05$

**8. zapadalność na zakażenie ortohantawirusami i na HFRS w grupach narażenia**  
- w końcowym etapie opracowywania wyników zestawiono grupy badawcze z Tab.3. jako kohorty osób powiązanych wspólnymi cechami epidemiologicznymi, które można porównać między sobą:

**kohorta nr 1** - grupa osób hospitalizowanych z powodu infekcji, z objawami ogólnymi syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego - Tab.3. – pozycja 3.3.

$I_1 = 150/665 = 0,23$	zapadalność wyrażona jako odsetek nowych zachorowań HFRS w populacji hospitalizowanych z woj. podkarpackiego (badanych w kierunku HFRS)
------------------------	---

**kohorta nr 2** - grupa osób narażonych zawodowo, leśników bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego - Tab.3. – pozycja 1.1.

$I_2 = 4/165 = 0,024$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo (zdrowych badanych w kierunku HFRS)
-----------------------	---

**kohorta nr 3** - grupa osób nie narażonych zawodowo, rezydentów Domów Pomocy Społecznej, bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego - Tab.3. – pozycja 2.1.

$I_3 = 4/145 = 0,027$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji nie narażonych zawodowo (badanych w kierunku HFRS)
-----------------------	--

**kohorta nr 4** - grupa osób narażonych zawodowo, leśników bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. lubelskiego - Tab.3. – pozycja 1.1.

$I_4 = 8/251 = 0,032$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo (zdrowych badanych w kierunku HFRS)
-----------------------	---

**kohorta nr 5** - grupa osób narażonych zawodowo, leśników bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego i lubelskiego - Tab.3. – pozycja 1.1. i 1.2.

$I_5 = 12/416 = 0,029$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo leśników (zdrowych badanych w kierunku HFRS)
------------------------	--

**kohorta nr 6** - grupa osób narażonych zawodowo, zoologów z ogniska epidemicznego NE, mieszkańców woj. małopolskiego i podlaskiego - Tab.3. – pozycja 1.3. i 1.4.

$I_6 = 22/52 = 0,42$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo zoologów (zdrowych badanych w kierunku HFRS)
----------------------	--

**kohorta nr 7** - grupa osób narażonych zawodowo, leśników i zoologów bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego, małopolskiego i podlaskiego - Tab.3. – pozycja 1.

$I_7 = 34/468 = 0,073$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo leśników i zoologów (zdrowych badanych w kierunku HFRS)
------------------------	---

**kohorta nr 8** - grupa osób narażonych pobytowo, bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego - Tab.3. – pozycja 2.

$I_8 = 9/181 = 0,05$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji nie narażonych zawodowo (badanych w kierunku HFRS)
----------------------	--

**kohorta nr 9** - grupa osób narażonych zawodowo i pobytowo, bez objawów syndromu nerkowego, mieszkańców podkarpackiego, lubelskiego, małopolskiego, podlaskiego - Tab.3. – pozycja 1. i 2.

$I_9 = 43/649 = 0,066$	zapadalność wyrażona jako odsetek zakażeń hantawirusowych w populacji narażonych zawodowo i nie narażonych zawodowo (badanych w kierunku HFRS)
------------------------	--

**kohorta nr 10** - grupa osób hospitalizowanych z powodu infekcji, z objawami syndromu nerkowego, mieszkańców woj. podkarpackiego, lubelskiego, dolnośląskiego, małopolskiego, łódzkiego, opolskiego, śląskiego - Tab.3. – pozycja 3.

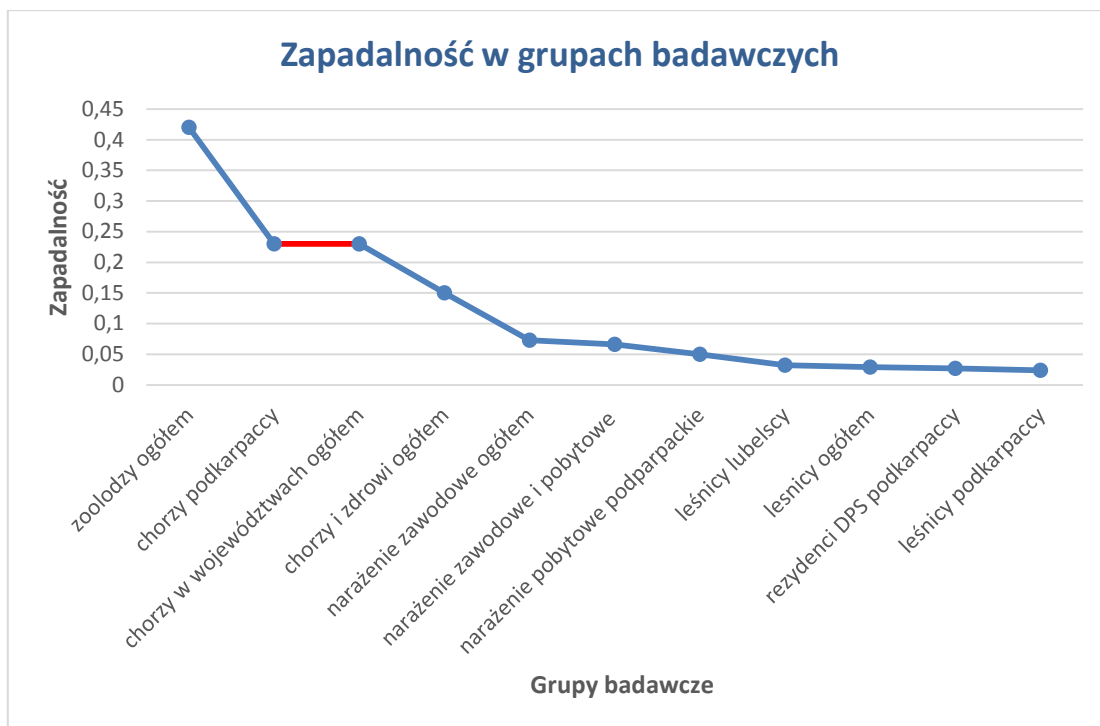
$I_{10} = 164/721 = 0,23$	zapadalność wyrażona jako odsetek nowych zachorowań HFRS w populacji narażonych (chorych z woj. podkarpackiego i z innych województw badanych w kierunku HFRS)
---------------------------	--

**kohorta nr 11** - grupa osób hospitalizowanych z powodu infekcji, z objawami syndromu nerkowego oraz osób narażonych zawodowo i pobytowo, bez objawów syndromu nerkowego - Tab.3. – pozycja 1. i 2. i 3.

$I_{11} = 207/1370 = 0,15$	zapadalność wyrażona jako odsetek nowych zachorowań HFRS w populacji narażonych (chorych badanych w tym kierunku) oraz narażonych
----------------------------	---

	zawodowo i nie narażonych zawodowo (badanych w kierunku HFRS)
--	---

Zestawiając zapadalność z poszczególnych kohort na wykresie Ryc.38. kolorem czerwonym zaznaczono zapadalność dla dwóch kohort nr 1 i 10 – byli to hospitalizowani z powodu infekcji, z objawami syndromu nerkowego, zapadalność w tych dwóch grupach była jednakowa i wynosiła  $I_1=0,23$  i  $I_{10}=0,23$  oraz była tylko niższa od specyficznej sytuacji narażenia zoologów, którzy mieli kontakt z zakażoną PUUV hodowlą nornic  $I_6=0,42$ . Zapadalność na zakażenie ortohantawirusami i zachorowanie na HFRS w grupie leśników z woj. podkarpackiego wynosiła  $I_2=0,024$  a z Lubelszczyzny  $I_4=0,032$  była podobna, przy czym zapadalność wśród leśników woj. podkarpackiego była niższa niż wśród grupy mieszkańców woj. podkarpackiego nienarażonych zawodowo tj. wśród rezydentów DPS-ów woj. podkarpackiego zapadalność wyniosła  $I_3=0,027$  a wśród razem badanych mieszkańców (zdrowych, bez narażenia zawodowego) tj. wśród mieszkańców DPS-ów i zdrowych współdomowników osób, u których wykryto HFRS zapadalność wyniosła  $I_8=0,05$ . Najniższa zapadalność była w grupie leśników z woj. podkarpackiego. W grupie zawodowych zoologów i leśników zapadalność analizowana razem wyniosła  $I_7=0,073$  i nie była dużo większa niż w grupie analizowanych razem osób zdrowych nie narażonych zawodowo - Ryc.38.



Ryc.38. Zapadalność na zakażenie ortohantawirusami i na HFRS w grupach narażenia w Polsce.

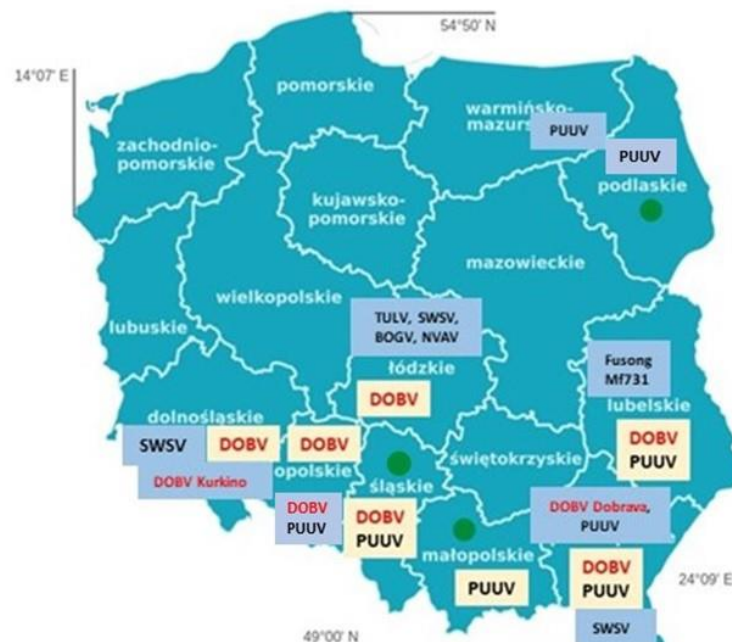
## V. DYSKUSJA

W 2004r. na terenie województwa podkarpackiego zarejestrowano przypadek ciężko przebiegającej infekcji o nierozpoznanej etiologii, która została w następnym roku zidentyfikowana jako zakażenie hantawirusowe [Knap, Trybusz 2006 <sup>90</sup>], [Knap 2009 <sup>88</sup>], [Knap 2010 <sup>89</sup>]. Zachorowanie rozpoczęło się wysoką gorączką z objawami grypopodobnymi, wystąpił kaszel, silne bóle głowy, mięśni; hospitalizacja rozpoczęła się późno, bo aż w 20 dniu zachorowania z powodu podejrzenia myocarditis, następnie stan chorej pogorszył się ze względu na zaburzenia czynności wątroby (1900 U/L, 3820 AspAT U/L, 4,96 mg/dL bilirubina całkowita), zaburzenia czynności nerek (białkomocz, krwinkomocz); po cholecystektomii – nastąpiła u chorej zapaść z powodu niewydolności oddechowej, hipotonii, zespołu wątrobowo-nerkowego, potrzebna była wentylacja mechaniczna; po 24 dniach hospitalizacji w stanie dobrym pacjentka opuściła szpital; w przeprowadzonych badaniach diagnostycznych stwierdzono przeciwciała IgM anty-PUUV, następnie narastanie swoistych przeciwciał IgG; chora wskazywała kontakt z odchodami gryzoni podczas sprzątania stodoły po sianokosach [szczegółowy opis przypadku Knap 2012 <sup>86</sup>]. Infekcja ta została rozpoznana etiologicznie i uznana jako **przypadek indeksowy – pierwszy potwierdzony przypadek gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym w Polsce** rozpoczynający wdrożenie opisywanych prac badawczych.

Do 2007r. w Polsce nie istniała możliwość badania osób w kierunku HFRS w bieżącej rutynowej diagnostyce klinicznej, ani nawet w badaniach referencyjnych, czy naukowych. Polska była jednym z nielicznych państw w Europie, gdzie nie rozpoznawano gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym choć analiza porównawcza danych z literatury, na przykład zachorowań w krajach sąsiadujących z Polską wskazywała na potencjalny udział hantawirusów w etiologii zachorowań w Polsce. Trzeba tu przytoczyć przykład badań i opisu przypadków HFRS we wschodniej Słowacji, badacze na podstawie badań serologicznych rozróżnili u chorych dwa różne serotypy (gatunki) hantawirusów, o różnym obrazie klinicznym choroby hantawirusowej [Bilčíková 1989 <sup>13</sup>] a dodatkowo w pracach Gresíkovej prowadzonych we wschodniej i zachodniej Słowacji wykazano w rezerwuarze zwierzęcym (u odłowionych gryzoni) identyfikację przeciwciał anty-hantawirusowych dla dwóch

różnych serotypów [Gresíková 1988 <sup>39</sup>], świadomość zakażeń hantawirusowych i HFRS na Słowacji był bardziej powszechny wśród badaczy niż w Polsce [Gresíková 1998 <sup>38</sup>]. W zachodniej części Niemiec, w latach 80-tych także opisywano przypadki infekcji hantawirusowej, ostrego uszkodzenia nerek u chorych wykryto przeciwciała antyhantawirusowe [Gärtner 1988 <sup>36</sup>].

W przedstawionych badaniach, w niniejszej pracy wykazano występowanie rodzimych (autochtonicznych), a więc nie przywleczonych zza granic, przypadków gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym wśród ludności Polski Wschodniej, Południowo-Wschodniej, Południowej i Centralnej wywołanych co najmniej dwoma czynnikami etiologicznymi z rodzaju *Orthohantavirus* - *Puumala virus* oraz *Dobrava-Belgrade virus* – Ryc.39.



Ryc.39. Występowanie hantawirusów w rezerwarze zwierzęcym i gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym u ludzi w Polsce. Przypadki HFRS u osób hospitalizowanych w latach 2007-2018 - oznaczono żółtym polem, przypadki zakażenia zawodowego – zaznaczono zielonym kołem, identyfikacje hantawirusów w populacji zwierząt na podstawie danych publikowanych (rozwińcie poniżej w tekście) – zaznaczono niebieskim polem. Źródło mapki: Internet – modyfikacja własna.

Badania genetyczne potwierdzające krążące w rezerwuarach zwierzęcych zoonotyczne wirusy DOBV i PUUV mają szczególne znaczenie, ponieważ wspierają bezpośrednio rozpoznanie DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, które opiera się na wykonywaniu badań serologicznych identyfikujących przeciwciała anty-hantawirusowe u ludzi w odpowiedzi na kontakt z wirusami odzwierzęcymi DOBV i PUUV. Badania genetyczne nie mają jednak bezpośredniego znaczenia w diagnostyce zakażeń hantawirusowych u osób z objawami HFRS, czy w identyfikacji seroprewalencji grup narażenia, są tylko wykorzystywane w wąskim zakresie przypadków rozpoznawanych przed pojawieniem się pierwszych objawów chorobowych, w okresie krótkiej wiremii hantawirusów, ponieważ ok. 3 dnia choroby pojawiają się pierwsze neutralizujące przeciwciała anty-hantawirusowe i użycie metod molekularnych identyfikujących RNA wirusów może nie być stosowne do wykrycia tych czynników; najbardziej zasadną przesłanką stosowania metod identyfikujących RNA Hantavirus w narządach ludzkich jest analiza post mortem [Koehler 2022 <sup>92</sup>], [Tariq 2022 <sup>167</sup>]. W podobny sposób potwierdza się udział hantawirusów w zachorowaniach ludności w Europie czy na świecie [Heyman 2011 <sup>49</sup>], [Koehler 2022 <sup>92</sup>]. Opisywana jest czułość i swoistość testów wykrywających przeciwciała przeciwko białku N hantawirusów w oparciu, o które sporządzane są testy laboratoryjne. Testy komercyjne do *diagnostyki in vitro* w kierunku rozpoznania HFRS w obszarze europejskim zawierają antygeny co najmniej dla DOBV i PUUV i szacuje się, że dla testów ELISA czułość i swoistość jest na poziomie 95%, dla testów immunoblottingu czułość / swoistość to 96% / 100%, dla testów immunofluorescencji pośredniej czułość jest na poziomie 98%, a swoistość na poziomie 91% [Koehler 2022 <sup>92</sup>]. W badaniach prowadzonych w ramach tej pracy, rutynowe zastosowanie dwuetapowej diagnostyki serologicznej (dla obu klas przeciwciał, tj. IgM i IgG wykonywano w I-etapie: badania immunoenzymatyczne/ELISA, w II-etapie weryfikowano wyniki pozytywne w teście immunofluorescencji pośredniej i/lub dodatkowo w immunoblottingu), testy obejmowały jak najszerszy zakres identyfikacji zakażeń wywołanych przez różne hantawirusy (co najmniej DOBV, PUUV ale też w przypadku testów potwierdzenia HTNV, SEOV, SAAV a nawet SNV – w zależności od użytego zestawu komercyjnego IIFT anty-Hantavirus), uzyskane wyniki wskazują na podwyższenie swoistości analizy identyfikowanych przeciwciał. W wynikach badań serologicznych zaobserwowano, że najsilniejszą reakcję immunologiczną pomiędzy badanymi surowicami a antygenami w teście immunofluorescencji pośredniej (IIFT)

można uznać za reakcję swoistą dla identyfikowanego ortohantawirusa - czynnika odpowiedzialnego za wywołanie HFRS lub wskazującego na przebycie zakażenia hantawirusowego w przeszłości, podobnie w Europie stosuje się test IIFT do potwierdzenia uzyskiwanych wyników serologicznych w rozpoznaniu HFRS czy ogólnie zakażeń hantawirusowych [Koehler 2022 <sup>92</sup>], [Lederer 2013 <sup>101</sup>]. Uważa się nawet, że w krajach o wykazywanej niskiej endemiczności zakażeń hantawirusowych należy prowadzić badania serologiczne z potwierdzeniem uzyskanych dodatnich wyników innymi alternatywnymi metodami serologicznymi, przykładem takiego działania diagnostycznego są badania zakażeń hantawirusowych prowadzone w Szwajcarii [Engler 2013 <sup>29</sup>]. Załącznik nr 5. podaje dane dotyczące pierwszych rejestracji przypadków choroby wywołanej przez hantawirusy (ICD-10 A98.5) w Polsce od 2007r. Obecnie w Polsce rejestracja przypadków tej choroby dotyczy kilku – kilkunastu – przypadków rocznie z latami znaczącego wzrostu epidemicznego HFRS w latach 2014 i 2021 – Ryc.21. W celu udowodnienia obecności zachorowań wśród ludności polskiej, w pierwszej fazie badań nad HFRS najważniejszą grupą badawczą stały się osoby hospitalizowane z objawami klinicznymi, które w swoim przebiegu choroby infekcyjnej miały nierozpoznaną przyczynę wystąpienia wysokiej gorączki, zespołu objawów nerkowych np. białkomoczu, skąpomoczu czy wielomoczu. W rozpoznaniu infekcji hantawirusowych bardzo ważną rolę, od samego początku odgrywało powiązanie szukanych przypadków z definicją epidemiologiczną choroby w oparciu o kryteria kliniczne i/lub epidemiologiczne opisane w *Definicjach przypadków chorób zakaźnych na potrzeby nadzoru epidemiologicznego* utworzonych przez Zakład Epidemiologii NIZP PZH w Warszawie [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index\\_p.html](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html) wydaną w 2009r. a wcześniej ze względu na brak definicji polskiej w oparciu o *definicję* Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern Hamburg; Niemcy [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/Archiv/Falldefinitionen\\_2007.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/IfSG/Falldefinition/Archiv/Falldefinitionen_2007.pdf?__blob=publicationFile), pp. 64-65; 15.05.2022r., korzystano również z opisu przypadków zachorowań podanych przez Knapa i wsp. [Knap, Trybusz 2006 <sup>90</sup>]. Podsumowaniem wstępnych działań było opracowanie własnego „Schematu wyszukiwania przypadków HFRS/NE – dla lekarzy klinicznych i rodzinnych”, który został przekazany wraz z informacjami o jednostce chorobowej do placówek medycznych w woj. podkarpackim – Zał.2. Zaplanowane działania realizowano poprzez

badania diagnostyczne zlecane przez oddziały szpitalne, stacje sanitarno-epidemiologiczne, instytuty badawcze, m. in. w ramach projektu badawczego MNiSW nr N N308 091937 „Występowanie zakażeń hantawirusowych w rezerwuarze zwierzęcym w aspekcie przypadków zachorowań u ludzi w województwie podkarpackim” (kierownik projektu: dr M. Niemcewicz, realizacja: Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii w Puławach) w okresie 2009 – 2011r. oraz projektu badawczego MNiSW nr N N404 204636 „Badania seroepidemiologiczne i kliniczne nad występowaniem zakażeń hantawirusowych (HFRS – gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym) u ludzi Lubelszczyzny i nad ich przenosicielami” (kierownik projektu: prof. dr hab. n. med. Józef Piotr Knap, realizacja: Instytut Medycyny Wsi w Lublinie) w okresie 2009 – 2012r. Końcowo badania serologiczne w rozpoznawaniu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym (HFRS); nefropatii epidemicznej (NE); choroby wywołanej przez hantawirusy (HVD) - wg klasyfikacji dotyczącej jednostki chorobowej ICD-10 A98.5 - przeprowadzono w kilku grupach badawczych omawianych szczegółowo w Tab.3.

Badania diagnostyczne w kierunku HFRS prowadzono nieprzerwanie od IX 2007r. Pierwsze zachorowania zaczęto rejestrować w 2007r. wg zasad dotyczących nadzoru epidemiologicznego nad chorobami zakaźnymi podanych powyżej i już w pierwszych wykonanych opisach przypadków zachorowań HFRS zaobserwowano epidemiczny potencjał tej zoonozy, występującej w woj. podkarpackim [Nowakowska 2009 <sup>135</sup>], [Knap 2009 <sup>88</sup>]. Dowodami potwierdzającymi rozróżnianie przypadków DOBV-HFRS i PUUV-HFRS nie były tylko wyniki serologiczne identyfikowanych przeciwciał IgG i IgM w dwu-etapowej diagnostyce wirusologicznej ale także wyniki badań różnych grup badawczych, które identyfikowały hantawirusy w populacji drobnych zwierząt, będących naturalnymi gospodarzami rezerwuarowymi i przenosicielami wirusów na człowieka. W Polsce w okresie XI 2009r. – X 2010r. zorganizowano odławianie gryzoni w miejscach o największej zapadalności HFRS wśród ludzi w woj. podkarpackim, badania zwierząt obejmowały powiaty sanocki, krośnieński, brzozowski, przemyski – w wynikach badań genetycznych z tkanek zwierzęcych potwierdzono udział ortohantawirusów – **DOBV** i **PUUV** [Michalski 2014 <sup>125</sup>] oraz podano pierwszą charakterystykę **DOBV genotyp Dobrava** izolowanego od myszarki leśnej [Kołodziej 2018 <sup>93</sup>]. Podobne badania rezerwuaru zwierzęcego ortohantawirusów przeprowadziły inne zespoły badawcze. Państwowy Zakład Higieny w Warszawie w okresie 2010 – 2012 ustalił w populacji nornicy rudej 9,7% osobników z obecnością przeciwciał anty-

hantawirusowych a w przypadku myszarki polnej, podobny udział osobników seropozytywnych na poziomie 9,5%, badania dotyczyły gryzoni z woj. podkarpackiego [Sadkowska-Todys 2015 <sup>156</sup>] a w analizie genetycznej materiału potwierdzono **ortohantawirusa Puumala**. W badaniach nornicy rudej odłowionej z północno-wschodniej Polski (okolice Mikołajek, woj. warmińsko-mazurskie) inny zespół badawczy potwierdził w rezerwarze zwierzęcym występowanie Puumala wirusa [Ali 2014 <sup>5</sup>]. W kolejnych doniesieniach potwierdzono obecność innego rodent-borne ortohantawirusa w populacji nornika zwyczajnego (*Microtus arvalis*) i scharakteryzowano go jako **TULV**, wirusa niepatogenego dla ludzi, różniącego się od innych europejskich TULV, zaś materiał badawczy pochodził z przechowywanych próbek z odłowów zwierząt z 1995r. w woj. łódzkim [Song 2004 <sup>163</sup>]. Badania drobnych ssaków z zachodniej Polski dowiodły obecności w rezerwarze myszarki polnej **DOBV genotyp Kurkino**, ustalono to w obszarze Stawów Milickich i Ślązańskiego Parku Krajobrazowego a w ryjówkach soricid – borne hantawirusy Seewis (SWSV) w Osobowicach, w województwie dolnośląskim [Lee SH 2020 <sup>107</sup>]. Obecność hantawirusów wśród drobnych ssaków z wschodniej Polski wykazały prace prowadzone przez Instytut Medycyny Wsi w Lublinie; potwierdzono obecność hantawirusów w populacjach myszarki polnej, nornika, nornicy rudej i ryjówki aksamitnej a w wykonanej analizie genomowej wykryty ortohantawirus był najbardziej podobny do hantawirusa azjatyckiego Fusong-Mf-731 [Wójcik-Fatla 2013 <sup>177</sup>]. Różnorodność hantawirusów wśród zakażeń drobnych ssaków w Polsce jest dużo szersza, kolejne badania nad tymi wirusami dostarczyły informacji o hantawirusach niechorobotwórczych dla człowieka, potwierdzono występowanie wśród odłowionych zwierząt w 2010, 2011 i 2012 r. w Bogini, Hucie Dłutowskiej, Kurowicach w centralnej Polsce (okolice Łodzi) - występowanie soricid – borne hantawirusy SWSV – Seewis wirusa, izolowanego od ryjówki *Sorex araneus* i innych gatunków ryjówek. Z racji izolacji nowego hantawirusa, nazwano go od miejsca pierwszej izolacji Boginia wirus (BOGV). Pochodzący od ryjówki, rzęsorka rzecznego (*Neomys fodiens*) jest daleko spokrewniony z SWSV. Kolejnym osiągnięciem na drodze poznawania różnorodności hantawirusów zarażających drobne ssaki w Polsce było zidentyfikowanie grupy talpid – borne hantawirusów i ustalenie obecności Nova wirusa (NVAV) w izolatach od kreta europejskiego. Obszarem izolacji był ten sam region w centralnej Polsce, tj. Huta Dłutowska i Bronisin. Z kolei, w południowo-wschodniej Polsce wykryto w rezerwarze zwierzęcym SWSV w miejscowości Chmiel w gminie Lutowiska, w

powiecie bieszczadzkim woj. podkarpackiego [Gu 2014 <sup>41</sup>]. Opisywane izolacje hantawirusów prowadzone już po zarejestrowaniu pierwszych przypadków zachorowań na HFRS u ludzi nie były jedynymi badaniami wskazującymi na potencjał tej choroby występującej ale wcześniej nie diagnozowanej w Polsce, trzeba przypomnieć prace w środowisku leśników woj. opolskiego, u których stwierdzono przeciwciała anti-PUUV i anti-DOBV [Szenborn 2006 <sup>166</sup>], wśród leśników woj. podlaskiego i warmińsko-mazurskiego, u których stwierdzono przeciwciała anti-PUUV [Grygorczuk 2008 <sup>40</sup>], wśród zoologów na Górnym Śląsku, u których stwierdzono ogólnie przeciwciała anti-hantawirusowe [Sadkowska-Todys 2007 <sup>157</sup>]. Zidentyfikowanie w Polsce DOBV (potwierdzono genotyp Dobrava, który jest odpowiedzialny za HFRS z przebiegiem klinicznym ciężkim lub umiarkowanym oraz genotyp Kurkino etiologicznie związany z HFRS z przebiegiem klinicznym umiarkowanym lub łagodnym) i PUUV w próbkach zwierzęcych potwierdziły wcześniejsze analizy swoistych przeciwciał u ludzi, w próbkach pobieranych w czasie zachorowań, jak i też w obserwowanej utrzymującej się serokonwersji przeciwciał IgG wśród zdrowych osób, które były narażone na kontakt z hantawirusami, ze względu na wykonywaną pracę.

Wyniki badań przedstawiające cechy charakterystyczne w przebiegu klinicznym HFRS w przypadku polskich zachorowań udowadniają, że rozróżnić można trzy postacie zachorowań (ciężki, umiarkowany, łagodny) w dwóch grupach obrazów klinicznych HFRS, w pierwszej grupie widoczna jest zależność związana z etiologią ortohantawirusową, tj. ciężki HFRS związany jest z DOBV, mniej z PUUV (szansa wystąpienia ciężkiego przebiegu HFRS jest 18 razy większa, gdy zachorowanie wywołane jest przez DOBV), natomiast w drugiej grupie mieści się obraz kliniczny umiarkowany i łagodny, który występuje w przebiegu HFRS bez związku z oznaczoną etiologią ortohantawirusową. W przedstawianych wynikach, u osób hospitalizowanych obraz umiarkowany w przebiegu zachorowań stanowił przeważającą część opisywanych cech klinicznych, w DOBV-HFRS było takich przypadków 52% (28 z przebiegiem umiarkowanym / 54 ogółem), w PUUV-HFRS było 66% (50 z przebiegiem umiarkowanym / 76 ogółem) i w takim zestawieniu interesującym faktem jest wysoki odsetek umiarkowanych przypadków PUUV-HFRS. Bardzo często w publikacjach PUUV przedstawia się, jako czynnik wywołujący łagodny obraz objawów klinicznych i jest to zgodne w odniesieniu do wszystkich rozpoznanych przypadków, łącznie z łagodnymi i subklinicznymi, ale w przypadkach osób hospitalizowanych porównując

do ciężkiego przebiegu HFRS związanego z zakażeniem HTNV w Azji i DOBV na południu Europy (tu też trzeba doprecyzować zawężenie do DOBV genotyp Dobrava) w naszych badaniach widać w PUUV-HFRS potencjał rozwijania zaostrzenia zespołów objawów. To spostrzeżenie jest istotne dla klinicystów, którzy w większości przypadków będą mieć takich pacjentów na oddziałach szpitalnych, PUUV też wywołuje cięższe powikłane zachorowania. Podobne zróżnicowane obrazy w przebiegu klinicznym PUUV-HFRS wśród osób hospitalizowanych przedstawiają badacze fińscy, wyjaśnia się to nie zróżnicowaną patogennością samego Puumala wirusa tylko zróżnicowanym rozwojem odpowiedzi immunopatologicznych u zakażonych osób [Vaheeri 2023 <sup>170</sup>]. Dodatkowo w woj. podkarpackim, gdzie badania zwierząt na obecność hantawirusów wykazało DOBV genotyp Dobrava [Kołodziej 2018 <sup>93</sup>], [Michalski 2014 <sup>125</sup>] odpowiedzialny za zachorowania z przebiegiem ciężkim i umiarkowanym, należy spodziewać się w większym odsetku DOBV-HFRS z takim cięższym przebiegiem klinicznym, w przeciwieństwie do DOBV genotypu Kurkino wykazywanego w rezerwarze zwierzęcym w południowo-zachodniej części Polski [Lee SH 2020 <sup>107</sup>], który może u ludzi wywoływać DOBV-HFRS z obrazem klinicznym umiarkowanym i łagodnym. Stwierdzenie pojedynczych zachorowań lub zakażeń hantawirusami w innych częściach Polski, tj. w woj. łódzkim, małopolskim, śląskim, dolnośląskim i lubelskim można określić jako przypadki wskaźnikowe dla tych części Polski a w uogólnieniu, można uznać, że znaczna część Polski ma potwierdzone występowanie HFRS. Badane przypadki należy potraktować jako wskaźnikowe, ponieważ większość skąpoojawowych i bezobjawowych nie zostało zbadanych (ta praca nie obejmuje losowo badanych osób), mimo tego wskazują one na szerszą skalę problemu. Dodatkowo, ze względu na nieliczne potwierdzenia wśród zwierząt rezerwarowych możliwa jest jeszcze większa różnorodność poza typowo przebiegającymi zachorowaniami HFRS, to wydaje się obecnie najistotniejszą konkluzją z dotychczasowego doświadczenia naszego i innych badaczy [Avšič-Županc 2019 <sup>8</sup>]. Jest możliwa dalsza różnorodność etiologii zakażeń hantawirusowych, przykładem jest opisany obraz kliniczny odpowiadający w pierwszych objawach HFRS a wywołany przez TULV, ortohantawirusa uznawanego dotąd za niepatogenny. Przypadek z Francji u zdrowego, młodego mężczyzny, nie narażonego zawodowo na zakażenie hantawirusowe. Do zakażenia doszło typowo – sprzątał otoczenie domostwa z wydaliny normików. Klinicznie: wystąpiła wysoka gorączka, z cechami ostrego uszkodzenia wątroby, z ostrą małopłytkowością ( $31 \times 10^3$  płytek krwi /  $1\mu\text{L}$ ),

krwinkomoczem, powiększeniem narządów mięsaszowych (wątroby, śledziony ale nie nerek), chory był hospitalizowany 16 dni. Przebieg zakażenia TULV był nieoczekiwany u osoby immunokompetentnej, bez zaburzeń odporności. Przypadek przebiegał z ostrym zespołem wątrobowym, co sugerować może jeszcze większy polimorfizm obrazu klinicznego i nieznanne dotąd mechanizmy patogenezy choroby [Reynes 2015 <sup>155</sup>]. W opisie naszej pracy, podobny obraz kliniczny wystąpił w 2004r., w przypadku indeksowym, u chorej w przebiegu HFRS wystąpiło także ostre uszkodzenie wątroby, zespół objawowy, który rzadko występuje w PUUV-HFRS i DOBV-HFRS. U chorej, potwierdzono obecność przeciwciał anti-PUUV, ale czynniki PUUV i TULV są ze sobą spokrewnione, stąd możliwe jest podobieństwo antygenowe i wykrycie podobnych przeciwciał anti-hantawirusowych (w 2005r. diagnostyka przypadku indeksowego opierała się na metodzie identyfikacji tylko przeciwciał anti-PUUV), na tym tle obecnej wiedzy, pierwszy przypadek potwierdzonego HFRS w Polsce przedstawia się jeszcze ciekawiej [Knap 2012 <sup>86</sup>], [Reynes 2015 <sup>155</sup>].

Wykrycie zróżnicowania gatunkowego ortohantawirusów, jako etiologii występujących w Polsce przypadków HFRS u ludzi, na DOBV-HFRS i PUUV-HFRS, a więc postaci uznanych za biegunowe odnośnie ciężkości przebiegu, powikłań i rokowania – obowiązało nas do analizy porównawczej obu form etiologicznych choroby w kraju. Współwystępowanie PUUV-HFRS i DOBV-HFRS, w tym z dominującą rolą etiologii PUUV podobnie jak w Polsce identyfikuje się i w innych krajach na Południu Europy w kierunku Bałkanów, np. w Słowenii. Obraz objawów klinicznych jest także podobny do zachorowań polskich PUUV-HFRS i DOBV-HFRS [Pał 2005 <sup>140</sup>].

### **Polskie przypadki DOBV-HFRS.**

Zachorowania w swoim obrazie klinicznym nie odbiegały od zachorowań, które występują na Słowacji, w Czechach i dalej w południowej i wschodniej Europie [Zelena 2019 <sup>182</sup>], [Zelena 2011 <sup>183</sup>], [Hönig 2022 <sup>52</sup>], [Gresíková 1998 <sup>38</sup>]. DOBV-HFRS w Polsce jest typową zoonozą, potwierdzone są miejsca izolacji DOBV od zwierząt w tych samym obszarze, w którym występują zachorowania wśród ludzi - Ryc.30. DOBV zakaża człowieka drogą oddechową, stąd w obrazie klinicznym HFRS pierwszymi objawami są objawy grypopodobne trwające przez ok. 5 dni, w tym gorączka powyżej 39°C, osłabienie, bóle głowy, mięśni, stawów, okolicy łędźwiowo-krzyżowej. Początek choroby to także pojawienie się kaszlu, który jest obecny przez następnych kilka dni. W

DOBV-HFRS ten okres choroby z objawami grypopodobnymi i kaszlem jest statystycznie mniej istotny niż w PUUV- HFRS. Oznacza to, że objawy te są bardziej powiązane z zakażeniem PUUV. Natomiast po samym tylko wystąpieniu objawów rzekomogrypowych (wysokiej gorączki, osłabieniu, dreszczy, bólów głowy, mięśni, stawów, okolicy lędźwiowo-krzyżowej) - nie można przewidzieć przyszłego przebiegu zachorowania (w analizie statystycznej ten zespół cech był nieistotny statystycznie dla wskazania wpływu hantawirusów DOBV i PUUV na dalszy przebieg zachorowania). Występowanie tych objawów jest bowiem okresem namnażania się ortohantawirusów i początkiem rozwoju patogenezы zakażenia w narządach, bez względu na czynnik etiologiczny HFRS. Chorzy w tej fazie zachorowania nie są diagnozowani w kierunku HFRS, dlatego pierwsze ukierunkowania rozpoznania choroby przez lekarzy pierwszego kontaktu w DOBV-HFRS następują około 3 dnia od pojawienia się pierwszych objawów. Interesującymi objawami chorobowymi pojawiającymi się od pierwszego dnia są zaburzenia ze strony układu pokarmowego trwające przez kilka dni, częstość występowania zaburzeń pokarmowych jest 2,5 razy większa w przypadku DOBV-HFRS, w tym charakterystycznie występujące bóle brzucha ( $p=0,006$ ,  $OR=2,9$  (1,34-6,27)), nudności, ( $p=0,02$   $OR=2,6$  (1,1-5,7)), wymioty ( $p=0,002$   $OR=3,4$  (1,5-7,4)) i najbardziej istotna z ww. objawów biegunka ( $p=0,00009$   $OR=6$  (2,3-15,3)), w przypadku których wskazuje się na istotną zależność między ich występowaniem a czynnikiem etiologicznym DOBV-HFRS. Jest to cenna wskazówka dla klinicyistów, dla których pojawienie się zaburzeń w układzie pokarmowym powinno stanowić przesłankę prognozowania rozwoju przebiegu zachorowania już nie w obrazie łagodnym, lecz średniociężkim lub ciężkim. W okresie pierwszych dni objawów chorobowych mogą pojawić się zaburzenie widzenia, w tym np. przejściowa krótkowzroczność, ta cecha nie jest jednak statystycznie istotna w rozpatrywaniu etiologii HFRS ale jest objawem pojawiającym się u 1/5 przypadków DOBV-HFRS i trwa przeciętnie 4 doby. Wśród innych objawów, w DOBV-HFRS zanotowano zaburzenia neurologiczne z o wiele poważniejszymi konsekwencjami zakażenia (zaburzenia świadomości, niedowład kończyn, spowolnienie, splątanie, zawroty głowy, zaburzenia słuchu i zaburzenia nastroju) niż w PUUV-HFRS (silne bóle głowy). Małopłytkowość (w badanych polskich przypadkach), przeciętnie była na poziomie  $52 \times 10^3$  płytek krwi/ $\mu\text{L}$  krwi, jest kolejnym przykładem objawów bez istotnie statystycznego powiązania z etiologią HFRS ale jest cechą charakterystyczną w obrazie klinicznym 92% przypadków DOBV-HFRS (w PUUV-HFRS występuje u 84% chorych). Objawy skazy krwotocznej pojawiały się w

przebiegu ciężkim, umiarkowanym i nawet w łagodnym i dotyczyły nie tylko krwinkomoczu ale też wybroczyn i wysypek na skórze, rumienia na twarzy, zaczerwienienia spojówek, krwawień z nosa i krwistej biegunki. Podobnie można wskazać brak powiązania występowanie uszkodzenia wątroby z etiologią HFRS, wzrost markerów AlAT i AspAT powyżej normy fizjologicznej 50 U/L – przeciętnie w przypadku AlAT był na poziomie 82 U/L a w przypadku AspAT to 86 U/L, zaburzenia pracy wątroby przeciętnie trwały 7,5 dnia i wystąpiło u 73% przypadków DOBV-HFRS. Stwierdzone w badaniach USG / RTG konsekwencje zespołu przeciekających naczyń włosowatych, jak powiększenie narządów, zwiększenie ilości płynów śródmiąższowych i płynów w jamach ciała, były częściej związane z DOBV-HFRS ( $p=0,04$ ) niż z PUUV-HFRS i wskazują na zaostrzenie ciężkości objawów w zachorowaniu przebiegającym z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego w chorobach naczyniowych. Najbardziej istotnymi cechami związanymi z etiologią i ciężkością HFRS jest zespół objawów ostrego uszkodzenia nerek, łącznie z ostrą niewydolnością nerek, także w naszym materiale przedstawiającym HFRS, występowanie syndromu nerkowego jest cechą istotną statystycznie i łączy się częściej z etiologią DOBV niż PUUV. Oceniając zależność między DOBV a występowaniem podwyższonego poziomu kreatyniny związanego z uszkodzeniem nerek ( $p=0,003$ ), wykazano iż w DOBV-HFRS przeciętny poziom kreatyniny, będący na poziomie prawie 4 razy wyższym niż norma fizjologiczna, wystąpił u 93% chorych, natomiast w PUUV-HFRS przeciętne dwukrotne podwyższenie poziomu kreatyniny wystąpiło u 54% chorych. Podobnie wystąpienie krwinkomoczu ( $p=0,0008$  OR=3,9 (1,7-9,2)), białkomoczu ( $p=0,002$ ), zaburzeń wodno-elektrolitowych ( $p=0,03$ ), skąpomoczu ( $p=0,0004$  OR=4,1 (1,8-9,0)), wielomoczu ( $p=0,0008$  OR=3,8 (1,7-8,5)) koreluje bardziej z DOBV w HFRS. Najbardziej istotną właściwością DOBV-HFRS jest występowanie ostrego uszkodzenia nerek o znamionach niewydolności ( $p=0,0001$ ), wymagające leczenia nerkozastępczego. W przypadkach DOBV-HFRS u 30% chorych przeprowadzono hemodializy, zawsze wielokrotnie. Wykonywano przeciętnie 7 hemodializ dla przypadku, z przykładami, gdzie wykonano 2 hemodializy ale też, gdzie potrzeba było 14 hemodializ do ustabilizowania czynności nerek ( $p=0,00003$  OR=16,0 (3,5-73,3)) co wprost można określić, jako AKI indukowane przez ortohantawirusy, gdzie szansa potrzeby wykonania hemodializy jest 16 razy większa gdy HFRS jest wywołany przez DOBV. Stwierdzono, że rozpoznanie laboratoryjne etiologii przyczyn ostrego uszkodzenia

nerek w HFRS, daje nefrologom możliwość wczesnego na AKI i możliwość podjęcia odpowiedniego postępowania nefrozastępczego.

Podsumowując, wyniki badań polskich przypadków DOBV-HFRS wskazują, że jest to choroba przebiegająca ciężko (43% przypadków) lub umiarkowanie ciężko (52%); jest ostrą chorobą gorączkową z powikłaniem narządowym, w tym z ostrą trombocytopenią, ostrym uszkodzeniem nerek, z zespołem objawów związanych z zaburzeniami wielonarządowymi i skazą krwotoczną. Opisano tylko 5% przypadków z łagodnym przebiegiem klinicznym. Zgony opisane w HFRS były związane tylko z tą etiologią, wśród badanych DOBV-HFRS stanowiło to 5,5% a ogółem wśród wszystkich badanych, u których wykryto HFRS śmiertelność była na poziomie 2,3%. Szansa na wystąpienie ciężkiego przebiegu HFRS w Polsce jest 18-krotnie większa w przypadku, jeżeli HFRS jest wywołany przez DOBV (OR=18,05 (5,05-64,57)), etiologia DOBV zaostża ciężkość i długość zachorowania oraz długość hospitalizacji, DOBV-HFRS trwa przeciętnie 19 dni, hospitalizacja 14 dni i ta ostatnia cecha w analizie statystycznej wykazuje wysoką zależność z DOBV ( $p=0,000002$ ), podobne obserwacje podają inni badacze. W Polsce wśród chorych na DOBV-HFRS było 67% mężczyzn i 33% kobiet, przeciętny wiek mężczyzn chorujących to 46 lat a kobiet 39,5 lat, ogólnie w 91% chorzy byli mieszkańcami wsi i wykonywali prace na obszarach wiejskich. Do zakażenia DOBV dochodziło najczęściej w okolicznościach wykonywania pracy zawodowej w magazynach i pomieszczeniach zakładowych ( $p=0,04$ ) i ta zależność miała poziom istotności statystycznej, dotyczyła m. in. sprzątnia pomieszczeń piekarni, sklepu warzywnego, porządkowania domów drewnianych w skansenie ludowym, zrywania drewnianej podłogi w świetlicy wiejskiej, sprzątnia kabiny samochodu ciężarowego z odchodów gryzoni, wykonywania pracy w składowisku papieru w drukarni.

### **Polskie przypadki PUUV-HFRS.**

PUUV-HFRS jest zoonozą przeniesioną na człowieka z rezerwuaru zwierzęcego nornicy rudej drogą inhalacji wziewnej bioaerozolu niosącego wiriony Puumala wirusa ze środowiska życia zwierząt (sposób zakażenia osób jest taki sam, jak w przypadku DOBV-HFRS). Jest chorobą o początkowych objawach zbliżonych do DOBV-HFRS, ale już od początku zachorowań zauważa się brak tendencji do narastania ciężkości przebiegu. Przeciętny kontakt chorego z lekarzem następuje w 4 dobie od wystąpienia pierwszych objawów, czyli o 1 dobę później niż w przypadku DOBV-HFRS. Pierwsze

objawy PUUV-HFRS to objawy grypopodobne, trwają przeciętnie 7 dni, tj. o 2 doby dłużej niż w DOBV-HFRS i jest to cecha statystycznie istotna ( $p=0,003$ ), charakterystycznie w tym okresie pojawia się kaszel, szansa na występowanie kaszlu w objawach HFRS jest 3,2 razy większa w przypadku etiologii PUUV ( $p=0,01$  OR=3,2 (1,3-8,2)), przeciętna liczba dni z kaszlem u chorych z PUUV-HFRS jest dłuższa o 1 dobę i wynosi 7 dni, ogólnie zaburzenia oddechowe w PUUV-HFRS rozpoczynają się przeciętnie szybciej niż w DOBV-HFRS (o 1,5 dnia). W łagodnym, umiarkowanym i ciężkim przebiegu PUUV-HFRS wśród osób hospitalizowanych zaobserwowano występowanie zaburzeń oddechowych w postaci zapalenia płuc lub zapalenia płuc i opłucnej w porównaniu z DOBV-HFRS, gdzie zaburzenia oddechowe, w tym kaszel nie występowały w łagodnym przebiegu infekcji. W wynikach badań nad innymi cechami choroby już nie znajduje się innych istotności potwierdzonych w analizie statystycznej, odzwierciedlających szczególną rolę PUUV w rozwoju choroby. W przeprowadzonym badaniu zwraca uwagę fakt, że w przebiegu klinicznym PUUV-HFRS pojawiają się wydłużone przeciętne okresy długości występowania objawów, tj. w okresie objawów grypopodobnych obserwuje się występowanie dłuższe gorączki (o 1 dzień), ogólnie rozpatrywanego zespołu bólów, w tym bólów głowy, mięśni, stawów, okolicy lędźwiowo-krzyżowej i in. (o 3 dni), zaburzeń układu pokarmowego (o 3,5 dnia), objawów skazy krwotocznej (o 1,5 dnia) przy podobnym przeciętnym poziomie  $59,5 \times 10^3$  płytek krwi/ $\mu\text{L}$  krwi, a także fakt, że skaza krwotoczna pojawiała się przeciętnie później o 2,5 dnia i dotyczyła 4-krotnie mniejszej ilości chorych (w PUUV-HFRS 13%). Kolejne wydłużone przeciętne okresy długości występowania objawów w PUUV-HFRS dotyczą okresu trwania obniżonego ciśnienia krwi poniżej 100 mmHg (o 2 dni), początku wystąpienia objawów zaburzeń neurologicznych (o 4,5 dnia). W przebiegu PUUV-HFRS widoczne są także konsekwencje zespołu przecieku włóściczek, dotyczy to 1/3 wszystkich przypadków zachorowań o tej etiologii, ale ten obraz objawów (zwiększenia ilości płynu śródmiąższowego, powiększenia narządów wewnętrznych, zwiększenie ilości płynów w jamach ciała) jest 1,5 razy rzadszy niż w przebiegu DOBV-HFRS (dotyczy 58% przypadków w DOBV-HFRS i 39% w PUUV-HFRS). W przypadku wystąpienia zaburzeń wątroby (u 57% chorych) zauważono, że AlAT jako marker uszkodzenia czynności wątroby przeciętnie był na poziomie większym niż w DOBV-HFRS ale przeciętnie tylko dwukrotnie i trwało to przez około 7 dni (AspAT był na podobnym poziomie 83 – 86 U/L i etiologia ortohantawirusowa nie miała znaczenia klinicznego w HFRS). Przeciętny poziom białkomoczu w PUUV-HFRS był dwukrotnie

niższy (195 mg/dL), zaczynał się przeciętnie wcześniej o 1 dobę (w 5-tej dobie) i trwał podobną ilość dni (6 dni), krwinkomocz trwał (6 dni) w przeciwieństwie do krótszego okresu w DOBV-HFRS (2 dni), jednak w analizie statystycznej białkomocz i krwinkomocz bardziej był związany zależnością z czynnikiem DOBV. Później o 2 doby (w PUUV-HFRS w 7 dobie) przeciętnie pojawiały się zaburzenia wodno-elektrolitowe i trwały przeciętnie o 2 doby krócej (4 dni). Skąpomocz pojawiał się przeciętnie o 1 dobę wcześniej (w 5 dobie) i trwał przeciętnie o 3,5 doby dłużej (5,5 doby), przeciętny dobowy poziom diurezy w tym czasie był dwukrotnie wyższy niż w DOBV-HFRS ( w PUUV-HFRS był na poziomie 650 mL wydalanego moczu / na dobę), bezmocz wystąpił tylko w 1,4% przypadków PUUV-HFRS i było to prawie 5-krotnie mniej niż w przypadku DOBV-HFRS. Wielomocz pojawiał się przeciętnie o 1 dobę później (w 10 dobie) i trwał przeciętnie o 1 dobę krócej (5 dni), poziom diurezy dobowej w fazie wielomoczu był niższy niż w DOBV-HFRS i wynosił przeciętnie 4400 mL moczu ( w DOBV-HFRS przeciętnie wielomocz był na poziomie 5200 mL moczu wydalanego na dobę). Zespół objawów rozpatrywanych wspólnie jako ostre uszkodzenie nerek dotyczył 61% pacjentów (w porównaniu z 91% DOBV-HFRS), AKI w PUUV-HFRS rozpoczynało się o 1 dobę później (w 7 dobie) i trwało o 1,5 doby krócej (7 dni), znamionym markerem AKI obok objawów nerkowych było podwyższenie poziomu kreatyniny w krwi chorych – w PUUV-HFRS przeciętnie poziom kreatyniny 2,86 mg/dL był 2 razy wyższy od normy fizjologicznej (w DOBV-HFRS 4,47 mg/dL był 3,5 krotnie wyższy od poziomu normy). Wdrożenie leczenia nerkozastępczego w przypadkach PUUV-HFRS dotyczyło 2,6% chorych (w DOBV-HFRS hemodializy wykonano u 30% chorych), co świadczy najdobitniej o łagodniejszym przebiegu HFRS u zakażonych PUUV, u chorych tych przeciętnie wykonano 3-krotną hemodializę w okresie 3 dni (w DOBV-HFRS przeciętnie wykonywano 7 hemodializ doprowadzających do wyrównania funkcji nerek w okresie 9 dni).

Podsumowując, PUUV-HFRS przebiega ciężko w 4% przypadków HFRS wywołanego Puumala wirusem, 96% przebiega umiarkowanie lub łagodnie (66% umiarkowanie i łagodnie 30%), tylko 2,5% przypadków (3 przypadki) było ciężkich a wśród nich zidentyfikowano dwie bakteryjne koinfekcje spowodowane krętkiem *Leptospira*, pochodzącym ze wspólnego rezerwuaru zwierzęcego i stwierdzono w tych przypadkach podwyższenie ciężkości przebiegu PUUV-HFRS, uwidaczniając potrzebę wspólnego identyfikowania przypadków HFRS i leptospirozy. PUUV-HFRS jest także ostrą

chorobą gorączkową z powikłaniem narządowym, z zespołem objawów ostrego uszkodzenia nerek, w którym nie było jednak potrzeby wdrażania leczenia nerkozastępczego (na 76 przypadków PUUV-HFRS tylko u jednego pacjenta wykonano trzykrotną hemodializę) i nie było zachorowania zakończonego zgonem, co świadczy o istotnie łagodniejszym przebiegu choroby. W Polsce wśród chorych na PUUV-HFRS było 71% mężczyzn i 29% kobiet, przeciętny wiek mężczyzn chorujących to 39 lat a kobiet 43 lata, ogólnie w 88% chorzy byli mieszkańcami wsi i wykonywali prace na obszarach wiejskich. Do zakażenia PUUV dochodziło najczęściej podczas prac sezonowych w ogrodzie i polu ( $p=0,0003$ ), w tym sadzenie drzewek owocowych i pracy w gospodarce leśnej lub w zawodowym przebywaniu w lesie ( $p=0,01$ ), w szczególności zakażenia były związane ze składowaniem drewna, z załadunkiem i rozładunkiem drewna z lasu, z pracą w magazynie rozlewni wody mineralnej, przy prowadzenie odwiertów naftowych, wykonywaniu prac stolarskich, porządkowaniu archiwum, w związku z pracą w zakładzie usytuowanym w lesie, pracą przy wycince drzew, w hurtowni ogrodniczej, w transporcie materiałów budowlanych oraz z pracą w kontakcie z hodowlą nornicy rudej. PUUV odgrywał rolę w zakażeniu nie tylko zawodowym ( $p=0,0003$ ) ale też istotnie w narażeniu pobytowym ( $p=0,0003$ ), w analizie statystycznej oba typy narażenia miały ten sam poziom istotności związany z PUUV. Większa ilość przypadków PUUV-HFRS związana jest z większą ilością kontaktów człowieka z zakażonymi zwierzętami. Zwierzęta rezerwuarowe bardzo silnie wpływają na możliwość rozprzestrzeniania zakażeń wśród ludności, np. biologia nornicy rudej wiąże te zwierzęta z bytowaniem w bliskości domostw ludzkich, na polach i w ogrodach oraz w kompleksach leśnych w pobliżu pól uprawnych [Piłacińska 2005 Rozdział „Migracje osobników z populacji lokalnych” <sup>146</sup>], podobnie zachowuje się myszarka leśna potrafi przystosować się szybko do potrzeby zasiedlenia nowych miejsc życia, jest też o wiele bardziej adaptatywna w tym zakresie niż nornica ruda, która jest o wiele bardziej płochliwa, natomiast myszarka polna ogólnie nie jest gryzoniem, który łatwo podejmuje migracje i zmiany terenu bytowania [Piłacińska 2005 Rozdział „Pochodzenie osobników tworzących populacje lokalne” <sup>146</sup>]. W Europie Zachodniej i w Skandynawii HFRS wywołany przez PUUV jest nazwany nefropatią epidemiczną (NE), uważano, że ze względu na śmiertelność w tym zachorowaniu poniżej 0,1% należy rozumieć, że NE jest chorobą łagodniejszą niż klasyczny HFRS, w wynikach pracy w przypadkach polskich PUUV-HFRS występował w 66% z przebiegiem umiarkowanym i w 30% łagodnym, nie można więc tej choroby ogólnie nazywać, że jest łagodna, do podobnych

wniosków doszli Finowie, u których PUUV jest jedynym ortohantawirusem zakażającym ludzi. Polskie przypadki PUUV-HFRS zostały podsumowane w wynikach pracy u osób hospitalizowanych, jako ostra choroba gorączkowa z zespołem objawów ostrego uszkodzenia nerek, z powikłaniem narządowym.

Badania seroprewalencji wśród zdrowych pracowników gospodarki leśnej pokazało występowanie utrwalonej koegzystencji hantawirusów w woj. podkarpackim i w woj. lubelskim w tych samych grupach narażenia [Knap 2010 <sup>87</sup>]. W woj. podkarpackim obszar gminy Komańcza to nie tylko stwierdzona seroprewalencja u leśników (zakażenia PUUV) ale też obszar endemicznego występowania HFRS wśród miejscowej ludności (zakażenia PUUV, DOBV), zapadalność wśród leśników  $I=0,024$  jest prawie 3,5 razy większa niż zapadalność wśród ludności gminy Komańcza  $I=0,007$ , gdzie w latach 2004 – 2018 wystąpiło najwięcej przypadków HFRS w porównaniu z innymi badanymi obszarami, tj. 33 przypadki na 4631 osób mieszkających w gminie Komańcza (liczba mieszkańców podana na koniec roku 2018), ludność gminy Komańcza stanowi 4,9% ludności powiatu sanockiego i żyje na terenie z dużą lesistością, bo sięgającą 72% całego arealu lasów powiatu sanockiego [<https://rzeszow.stat.gov.pl> <sup>65</sup>]), stąd wyraźna seroprewalencja u leśników mających kontakt ze siedliskiem życia zwierząt będących źródłem i wektorem zakażeń hantawirusowych. Teren gminy Komańcza należy uznać za najbardziej hiperendemiczny obszar występowania HFRS wśród ludności woj. podkarpackiego, w tym obszarze były też przeprowadzone badania gryzoni, w których uzyskano izolację DOBV od myszarki leśnej odłowionej w miejscowości Moszczaniec, która do 2016r. należała do gminy Komańcza [Michalski 2014 <sup>125</sup>], [Pitucha 2013 <sup>147</sup>], [Nowakowska 2013 <sup>136</sup>], [Michalski 2013 <sup>124</sup>] poza tym ten obszar jest położony w niewielkiej odległości do innego terenu endemicznego zakażeń hantawirusowych w rejonie Miedzilaborce – Ruska Poruba-Zavada na Słowacji (Komańcza – Miedzilaborce odległość = 21 km), który to obszar jest przedłużeniem w kierunku południowym wspólnego geograficznego obszaru występowaniu hantawirusów [Knap 2009 <sup>88</sup>], [Nowakowska 2009 <sup>135</sup>]. Podobne wnioski nasuwają się w przypadku badań przeciwciał anty-hantawirusowych u osób pracujących w gospodarce leśnej w woj. lubelskim, pomimo że nie ma wielu przypadków rozpoznanych w diagnostyce chorych ale stwierdza się HFRS o etiologii PUUV i DOBV, podobnie u badanych leśników lubelskich (zapadalność  $I=0,032$ ) potwierdza się także zakażenie w przeszłości dwoma ortohantawirusami PUUV i DOBV a zbadana seroprewalencja dotyczyła lokalizacji w

obszarze Lubelszczyzny tj. powiatu zamojskiego - południowego; hrubieszowskiego – południowo-wschodniego; krasnostawskiego – centralnego; puławskiego – zachodniego i radzyńskiego - północnego w woj. lubelskim, lokalnie tylko w południowej części wiąże się z terenem najbliższych identyfikacji DOBV-HFRS w powiecie stalowowolskim woj. podkarpackiego, w tych okolicznościach udział hantawirusów w etiologii chorób ludności Lubelszczyzny na pewno jest znaczący [Gut AK 2018 <sup>43</sup>]. Tak rozumiane przedstawienie występowania ortohantawirusów DOBV i PUUV skłania do A1uznania wschodniej i południowo-wschodniej Polski za teren o istotnym znaczeniu w rozpoznaniu HFRS u osób z objawami infekcji nerkowej, należy przy tym pamiętać o izolacji DOBV genotyp Dobrava na tym terenie [Kołodziej 2018 <sup>93</sup>], który niesie za sobą rozwój ciężkiej choroby z potrzebą wdrożenia terapii nerkozastępczej a przede wszystkim potrzebę znajomości przez klinicystów etiologii AKI do pełnego zabezpieczenia chorych przed rozwojem ciężkich powikłań. Grupa zawodowa osób pracujących w gospodarce leśnej okazała się grupą wskaźnikową zakażeń hantawirusowych, stąd prace innych, którzy badali poziom przeciwciał antyhantawirusowych u leśników wpisują się w rozumienie rozpoznania występowania ortohantawirusów odpowiedzialnych za zachorowania u ludzi w Polsce. W badaniach seroepidemiologicznych przebadano pracowników leśnych z centralnej części woj. podlaskiego [Grygorczuk 2008 <sup>40</sup>], u których zidentyfikowano przeciwciała IgG u 8,7% badanych, tak wysoki odsetek seroprewalencji wydaje się być konsekwencją użycia testu ELISA w jedno-etapowej diagnostyce, bez weryfikacji innym testem serologicznym, seroprewalencja w grupie leśników z woj. podkarpackiego 2,4% była ponad 3,5 razy niższa i nie wydaje się to zgodne z porównaniem rozpoznawanej liczby objawowych chorych w woj. podkarpackim ale pomimo dyskutowanego poziomu seroprewalencji wyniki te jednak świadczą o kontakcie tej grupy z zakażeniami hantawirusowymi. W badaniach [Żukiewicz-Sobczak 2014 <sup>185</sup>] na Lubelszczyźnie stwierdzono u 9 leśników na 216 badanych przeciwciała antyhantawirusowe tj. u 4%, czyli podobnie jak w badaniu opisywanym w tej pracy, gdzie seroprewalencja była na poziomie 3,18%. Badania seroprewalencji objęły także inną grupę narażenia tj. zoologów badających biologię gryzoni w instytutach badawczych w woj. małopolskim i podlaskim, odsetek osób, u których stwierdzono swoiste przeciwciała antyhantawirusowe zidentyfikowano na poziomie 46,3% (u 18 osób stwierdzono przeciwciała IgG anty-PUUV a u 1 osoby IgM i IgG anty-PUUV na 41 badanych ogółem) w małopolskim laboratorium a w podlaskim laboratorium było zakażonych

PUUV 3 zoologów na 11 badanych, odsetek zakażeń kształtował się na tak wysokim poziomie, ze względu na prowadzoną hodowlę nornicy rudej i ciągły kontakt z zakażonymi gryzoniami (zwierzętami bez objawów chorobowych), zapadalność w tej grupie zawodowej wyniosła  $I=0,42$  i była najwyższa z wszystkich badanych grup kohortowych, w których porównywano zapadalność. Zapadalność rozpatrywana w grupach: leśników, zoologów, rezydentów DPS-ów, osób diagnozowanych i hospitalizowanych w podejrzeniu gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym daje ogólny pogląd na potencjał chorobotwórczy ortohantawirusów w tych indywidualnych grupach, natomiast nie wyraża szansy narażenia ogółu, ponieważ wyniki tych badań nie miały możliwości odniesienia do grupy kontrolnej, były prowadzone w kohortach. Inni badacze [Gut 2007 <sup>44</sup>] także analizowali grupy zoologów i leśników i ich narażenie na zakażenia ortohantawirusowe i stwierdzili u 7 zoologów przeciwciała anti-PUUV IgG i bez powodzenia serologicznego wśród grupy leśników, w innym badaniu 19% badanych zoologów miało IgG anti-PUUV ale nikt wśród leśników i nikt z pacjentów z chorobami nerek nie był seropozytywny [Sadkowska-Todys 2007 <sup>157</sup>], trzeba tu zaznaczyć, że te badania dotyczyły poszukiwania tylko etiologii zakażeń PUUV i nie były związane z analizą potencjalnych zachorowań na HFRS na badanych terenach, odwrotnie niż w tej pracy badano osoby zdrowe do oceny występowania HFRS, niepowodzenie polegało być może na tym, że w zakażeniach hantawirusowych nie spodziewamy się zakażeń wszędzie tylko w określonych niszach ekologicznych [Pitucha 2013 <sup>147</sup>], to jest zakażenie wpisane bardzo mocno w występowanie zgodne z siedliskami zakażonych gryzoni, możliwości ich rozprzestrzeniania się – gryzonie tworzą siedliska w tzw. wyspach leśnych i polnych w krajobrazie rolniczym i w takich rejonach będą występować enzoocje wśród zwierząt i endemie wśród ludzi [Piłacińska 2005 <sup>146</sup> str. 13 – 19]. Ciekawe wyniki badania seroprewalencji leśników uzyskano z terenu wschodnich Niemiec, została potwierdzona obecność przeciwciał anti-hantawirusowych specyficznych dla DOBV (w Niemczech występuje DOBV genotyp Kurkino powodujący umiarkowany lub łagodny HFRS) oraz TULV łącznie u 8,2% mężczyzn (mediana wieku=47 lat) i u 15,6% kobiet (mediana wieku=48 lat), ale od chorych narażonych w tym rejonie notuje się tylko PUUV-HFRS [Mertems 2011 <sup>122</sup>]. Wyniki tych badań wskazują, że nasze identyfikacje DOBV genotyp Kurkino od gryzoni odłowionych w woj. dolnośląskim z terenów Stawów Milickich i Ślęzańskiego Parku Krajobrazowego (ŚPK) oraz opisane w tej pracy zachorowania DOBV-HFRS w gminie Kobierzyce (26 km od izolacji DOBV genotyp Kurkino / ŚPK), w tym rejonie Polski

można więc wyznaczyć co najmniej trójkątny region obejmujący Wrocław/Kobierzyce – Wieluń / zachodnio-południowy obszar woj. łódzkiego – Opole, jako obszar występowania DOBV-HFRS u chorych. W polskich przypadkach PUUV-HFRS i DOBV-HFRS wykazano także podobną do innych obszarów w geografii zakażeń ortohantawirusowych lokalność, sezonowość i cykliczność występowania tej zoonozy. Typowymi przykładami lokalności występowania ognisk epidemicznych HFRS związanych z ekologią tych zakażeń w Polsce są obecnie wyznaczone tereny endemicznego występowania PUUV-HFRS poprzez rejestrację przypadków zachorowań np. w gminie Komańcza (wyżej opisane) i w większym obszarze w powiecie sanockim. W 2014r. zapadalność w powiecie sanockim sięgnęła 30,26 / 100 000 mieszkańców (stwierdzono 29 przypadków HFRS / 95 826 mieszkańców powiatu sanockiego w 2014r.) i tym samym teren ten uzyskał status hiperendemicznego, w Polsce w tym czasie zapadalność była na poziomie 0,14 / 100 000 a w woj. podkarpackim 2,49 / 100 000 – Tab.30.,Tab.31. W 2014r., w okresie największego wzrostu zachorowań stwierdzono sezonowość tej zoonozy, w tym dwa niezależne szczyty zachorowań, dla etiologii Puumala virus był to okres w lipcu, natomiast dla etiologii Dobrava-Belgrade virus był to okres w październiku, potwierdzające dwumodalność etiologii zakażeń ortohantawirusowych u ludzi, ta informacja jest przydatna nie tylko dla klinicystów ale także dla epidemiologów, zauważono konieczność epidemiologicznego opracowywania hospitalizowanych przypadków zachorowań z wykorzystaniem opracowanej ankiety, która daje możliwość przeanalizowania sytuacji epidemiologicznej i przygotowywania informacji dla lekarzy POZ, lekarzy klinicystów oraz dla ludności, wskazującej potrzebę ochrony przed narażeniem pobytowym i zawodowym w terenach o podwyższonym ryzyku zachorowania. Stwierdzono, że ciężiej przebiegające zachorowania wśród ludności w danej lokalizacji spowoduje problem wydłużenia hospitalizacji chorego, dłuższego okresu zdrowienia, wpłynie na wzrost liczby pacjentów oddziałów nefrologicznych wymagających włączenia terapii nerkozastępczej.

Narażenie pobytowe osób, będących w kontakcie ze zwierzętami przenosicielami tego zakażenia oraz ich wydaliniami i wydzielinami skażającymi środowisko wpisuje się w życie codzienne mieszkańców terenów endemicznego występowania hantawirusów – załączone zdjęcie - Ryc.40., to miejscowość Ropienka powiat bieszczadzki, woj. podkarpackie – miejsce wystąpienia zgonu spowodowanego DOBV-HFRS u 17-

letniego mężczyzny, który wykonywał prace przy remoncie starego drewnianego domu, w którym były widoczne odchody gryzoni, zmarł w 6 dobie (od wystąpienia wysokiej gorączki) w fazie wstrząsowej HFRS; Ryc.41. – to zdjęcie z obszaru gminy Komańcza pow. sanocki, woj. podkarpackie, to teren hiperendemicznego występowania ortohantawirusów. Charakterystycznymi cechami środowiska sprzyjającymi zakażeniom hantawirusowym przenoszonym na człowieka jest życie ludzi na terenach rolniczych z obszarami leśnymi w niszach ekologicznego bytowania nornicy rudej (źródło i wektor PUUV), myszarki leśnej (źródło i wektor DOBV genotyp Dobrava) i myszarki polnej DOBV (źródło i wektor DOBV genotyp Kurkino). Załączone kolejne zdjęcia – Ryc.42. i Ryc.43. to tereny, gdzie wyizolowano od myszarki polnej DOBV genotyp Kurkino, niedaleko miejsca zachorowań na HFRS ludzi (Kobierzyce, przypadek DOBV u człowieka). Załączone zdjęcia pokazują podobną topografię środowiska narażenia człowieka, łącznie ze zdjęciem Ryc. 44. z terenu hiperendemicznego w Finlandii – związanego z terenami pierwszej w Europie identyfikacji Puumala hantawirusa, który wywołał nefropatię nagminną i nadal jest znaczącym czynnikiem HFRS wśród mieszkańców i przebywających rekreacyjnie w rejonie Puumala (Nephropathia Epidemica) [Brummer-Korvenkontio 1980 <sup>15</sup>]. W Europie wg danych za 2018r., tj. ostatniego rocznika opisywanych w tej pracy badań, zakażenia hantawirusowe zarejestrowano w 29 krajach, ogółem 1826 przypadków, w 97% wywołane były przez PUUV, 3% przez DOBV i inne - wg raportu Annual Epidemiological Report European Centre for Disease Prevention and Control [<sup>60</sup>] - Ryc.45., obecnie stwierdza się w danych społecznościach występowanie stałego narażenia na to zachorowanie, co powinno skutkować wdrożeniem w Polsce wszystkich faz profilaktyki zdrowotnej HFRS, nie tylko doraźnej ale też długotrwałej z zastosowaniem system zarówno biernego, jak i czynnego nadzoru epidemiologicznego wraz z monitoringiem rezerwuaru zwierzęcego tej zoonozy. Docelowo, należałoby może wprowadzić nadzór epidemiologiczny typu „*sentinel*”, który wprowadzony do nadzoru nad gripą, przez panią prof. Lidię B. Brydak z NIZP-PZH, wydatnie polepszył diagnostykę tej choroby w Polsce. Rozeznanie sytuacji epidemiologicznej oraz enzootycznego rezerwuaru zwierzęcego hantawirusów na terenie kraju, ma również znaczenie z uwagi na możliwe wykorzystanie tego czynnika biologicznego jako potencjalnej broni biologicznej – hantawirusy należą do uznanych czynników bioterroru [Michalski 2022 <sup>123</sup>], [Kocik 2011 <sup>91</sup>], [Knap 2013 <sup>85</sup>].



Ryc.40. Ropienka powiat bieszczadzki, woj. podkarpackie – miejsce wystąpienia DOBV-HFRS. Źródło:<https://nad-horylka-ropienka.booked.com.pl/data/Photos/OriginalPhoto/8850/885037/885037285/Nad-Horylka-Villa-Ropienka-Exterior.JPEG>



Ryc.41. Gmina Komańcza pow. sanocki, woj. podkarpackie – teren hiperendemicznego występowania ortohantawirusów. Źródło:[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ac/Koma%C5%84cza%2C\\_widok\\_na\\_wie%C5%9B\\_%28HB5%29.jpg/1280px-Koma%C5%84cza%2C\\_widok\\_na\\_wie%C5%9B\\_%28HB5%29.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ac/Koma%C5%84cza%2C_widok_na_wie%C5%9B_%28HB5%29.jpg/1280px-Koma%C5%84cza%2C_widok_na_wie%C5%9B_%28HB5%29.jpg)



Ryc.42. Śląski Park Krajobrazowy – woj. dolnośląskie miejsce izolacji od myszarki polnej DOBV genotyp Kurkino. Źródło:<https://www.sleza.sobotka.pl/wp-content/uploads/2021/05/parkkielczynskie.jpg>



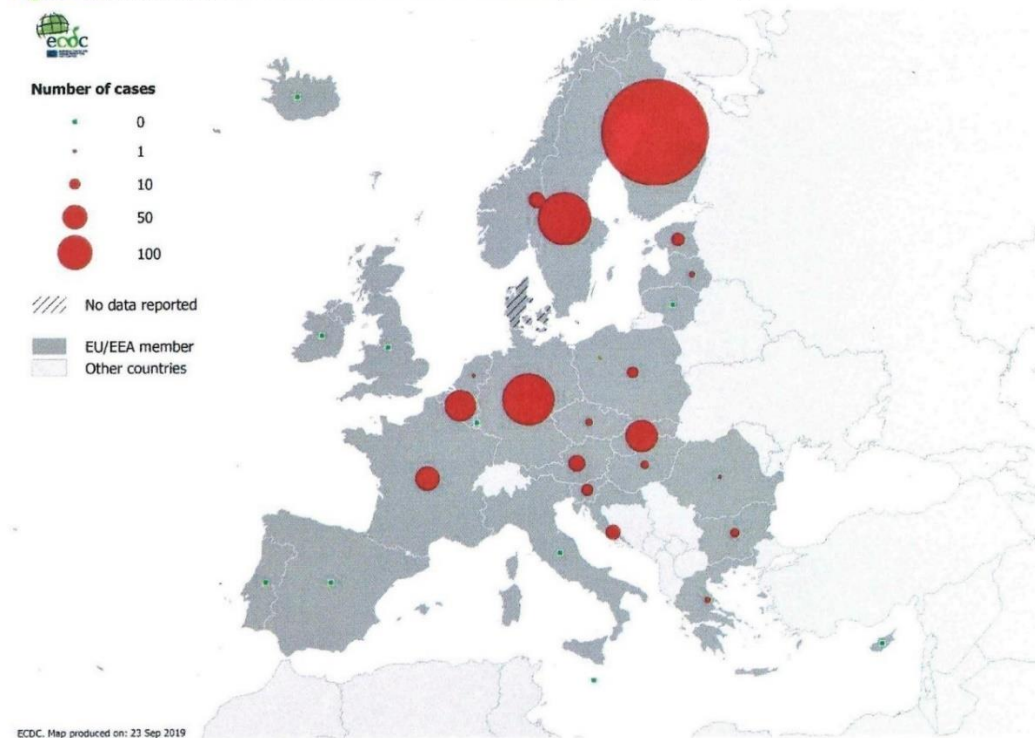
Ryc.43. Stawy Milickie – woj. dolnośląskie miejsce izolacji od myszarki polnej DOBV genotyp Kurkino. Źródło:<https://img-ovh-cloud.zszywka.pl/0/0646/6478-dolina-baryczy-stawy-milickie-woj-d.jpg>



Ryc.44. Rejon Puumala w Finlandii – miejsce izolacji Puumala ortohantawirusa, jedyne patogennego hantawirusa w Finlandii.

Źródło: [https://puumala.fi/wp-content/uploads/kotiniemi2014\\_2.jpg](https://puumala.fi/wp-content/uploads/kotiniemi2014_2.jpg)

**Figure 1. Distribution of Hantavirus infection cases by country, EU/EEA, 2018**



Ryc.45. Rozmieszczenie raportowanych zakażeń hantawirusowych w Europie, w 2018r.

Źródło: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hantavirus-annual-epidemiological-report-2018.pdf>

Podsumowując, wykonana praca diagnostyczna i epidemiologiczna potwierdza, że zastosowany system edukacji zdrowotnej na temat choroby nie identyfikowanej w Polsce i system rozpowszechnienia tej informacji przyniósł efekt w pierwszych identyfikacjach laboratoryjnie potwierdzonych przypadków i przyczynił się do wejście tej etiologii do rutynowych badań diagnostycznych zlecanych przez oddziały zakaźne woj. podkarpackiego oraz nefrologiczne z większej części Polski. Właściwe diagnozowanie HFRS, pozwoliło z kolei na ich właściwą terapię, co miało zasadnicze znaczenie w poprawie rokowania, np. w przypadkach ostrego uszkodzenia nerek wymagającego terapii nerkozastępczej. Dowodem może być cenna rozprawa doktorska, dr n. med. Waclawa Bentkowskiego: „Ostre uszkodzenie nerek w przebiegu infekcji Hantavirusem – analiza zachorowań z rejonu województwa podkarpackiego” Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2015 [Bentkowski 2015 <sup>10</sup>], opracowana na podstawie materiału klinicznego HFRS, gdzie w każdym przypadku diagnoza laboratoryjna HFRS, była postawiona na podstawie badań wykonanych przez nasz zespół i przedstawionych w niniejszej rozprawie. Stwierdzono także przydatność laboratoryjnego modelu diagnostycznego opartego na dwóch etapach badań, przesiewowego i potwierdzającego oraz równoległe prowadzonej diagnostyki leptospirozy, który był realizowany przez cały okres badań nad HFRS, model ten powinien być utrzymany i rozpropagowany w innych lokalizacjach w Polsce, w których nie diagnozuje się tej zoonozy.

Niniejsza rozprawa przedstawia badania lat 2007 – 2018. Udokumentowały one istnienie w Polsce nierozpoznananej dotąd choroby ludzi – zakażenia ortohantawirusowego o zróżnicowanym obrazie klinicznym. Wdrożona diagnostyka hantawirusów w WSSE w Rzeszowie, nie została jednak przerwana – stała się rutynową diagnostyką laboratoryjną. Co więcej, ośrodek nasz stał się *de facto* ośrodkiem referencyjnym w tym zakresie w kraju, wykonującym badania także dla innych województw. Obecnie, choroba wpisana ustawowo w roku 2007 do spisu chorób infekcyjnych podlegających w Polsce obowiązkowi zgłoszenia i rejestracji, jest corocznie diagnozowana w kraju - Tab.30, Tab.31. choć występuje bardzo znaczne niedoszacowanie (ang. *underestimation*) częstości jej rzeczywistego występowania w kraju. Wynika z niej, że w latach 2007 – 2022 rozpoznano w Polsce 198, potwierdzonych etiologicznie przypadków HFRS, zaś w roku 2004, sprzed okresu obligatoryjnej rejestracji, był jeszcze jeden przypadek. W pierwszym kwartale 2023 (do

31 marca 2023r.) zgłoszono 4 zachorowania, co czyni łączną liczbę zgłoszonych potwierdzonych przypadków choroby w sumie do 203. Zapadalność w skali kraju wykazywała znaczne coroczne różnice, osiągając maksymalną wartość 0,14/100 tysięcy mieszkańców w roku 2014, następnie po 7 latach 0,11/100 tysięcy mieszkańców w roku 2021. Znaczny wzrost zachorowań (i zapadalności) w latach 2014 i 2021, spowodowany był lokalnymi, lecz dużymi, ogniskami epidemicznymi, rejestrowanymi tylko na terenie województwa podkarpackiego. Ogniska te powodowały znacznie wyższą zapadalność na terenie województwa, w stosunku do średniej krajowej, wynosząca odpowiednio: 2014 r. – 2,49/100 tys. mieszkańców województwa podkarpackiego i 1,985/100 tysięcy mieszkańców Podkarpacia w roku 2021. Co więcej, w okresie 2004 - 2018 w powiecie sanockim potwierdzono 57 przypadków HFRS, w tym w samej gminie Komańcza było ich 33, obszar tej gminy i cały powiat sanocki jest terenem hiperendemicznym, zachorowalność w latach 2004 – 2018 osiągnęła w powiecie sanockim wysoką wartość 30,26 / 100 000 mieszkańców powiatu. Z cytowanych tabel – Tab.30. i Tab.31. [19] wynika, że przytłaczająca większość przypadków klinicznych HFRS pochodzi z województwa podkarpackiego, wszystkie zaś są zdiagnozowane laboratoryjnie w WSSE w Rzeszowie. O skali niedoszacowania liczby zachorowań na HFRS w Polsce świadczą dane tabel, z których wynika, iż do NIZP-PZH nie zgłoszono nawet wszystkich przypadków rozpoznanych i obserwowanych przez nasz zespół i zamieszczonych w niniejszej pracy.

Tab.30. Choroba hantawirusowa (A. 98.5) w Polsce – zestawienie zapadalności. Zachorowania wg NIZP-PZH&GIS, z zmianą własną.				
ROK	Liczba przypadków (Polska)	Zapadalność /100 tys. (Polska)	Liczba przypadków (woj. podkarpackie)	Zapadalność /100 tys. (woj. podkarpackie)
2007	9	0,024	9	0,429
2008	7	0,018	7	0,334
2009	5	0,013	5	0,238
2010	6	0,016	6	0,285
2011	8	0,021	8	0,376

2012	3	0,008	3	0,141
2013	8*)	0,021	4	0,188
2014	54**)	<b>0,140</b>	53	<b>2,49***)</b>
2015	6	0,016	6	0,282
2016	8	0,021	8	0,376
2017	14	0,036	14	0,658
2018	11	0,029	11	0,517
2019	9	0,023	5	0,235****)
2020	3	0,008	3	0,141
2021	42	<b>0,110</b>	42	<b>1,985</b>
2022	5	0,010		*****)

2023 = 4 przypadki (= 0,01/100.000) w I kwartale (01.01. – 31.03.2023).

\*) 3 zachorowania – woj. małopolskie (0,089/100.000); 1 zachorowanie – woj. opolskie (0,099/100.000); \*\*) 1 zachorowanie w województwie łódzkim (0,045/100 000 mieszkańców); \*\*\*) na terenie ogniska epidemicznego, które wystąpiło na hiperendemicznym obszarze powiatu sanockiego woj. podkarpackiego – zapadalność w roku 2014 wyniosła 30,26/100.000 mieszkańców; \*\*\*\*\*) woj. lubelskie – 4 (0,189/100 tysięcy); \*\*\*\*\*) dane wstępne

Tab.31. Rejestracja choroby wywołanej przez hantawirusy (ICD-10 A98.5) w Polsce - na podstawie opracowań dla lat 2007 - 2022:  
 „Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. Biuletyn roczny.” ISSN 1643-8655 <http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld> [<sup>19</sup>]

Liczba zachorowań w roku w Polsce / wg województw		Liczba zachorowań w kwartałach				Zapadalność na 100 000 mieszkańców	Liczba osób hospitalizowanych	
		I	II	III	IV		liczba	procent
<b>2007</b>								
Polska	9	0	0	0	9	0,024	9	100%
podkarpackie	9	0	0	0	9	0,429	9	100%
<b>2008</b>								
Polska	7	4	0	3	0	0,018	7	100%
podkarpackie	7	4	0	3	0	0,334	7	100%
<b>2009</b>								
Polska	5	2	0	1	2	0,013	5	100%
podkarpackie	5	2	0	1	2	0,238	5	100%
<b>2010</b>								
Polska	6	3	1	1	1	0,016	6	100%
podkarpackie	6	3	1	1	1	0,285	6	100%
<b>2011</b>								
Polska	8	1	2	3	2	0,021	8	100%

podkarpackie	8	1	2	3	2	0,376	8	100%
<b>2012</b>								
Polska	3	2	1	0	0	0,008	3	100%
podkarpackie	3	2	1	0	0	0,141	3	100%
<b>2013</b>								
Polska	8	4	0	0	4	0,021	7	87,50%
podkarpackie	4	1	0	0	3	0,188	4	100%
małopolskie	3	3	0	0	0	0,089	2	66,70%
opolskie	1	0	0	0	1	0,099	1	100%
<b>2014</b>								
Polska	<b>54</b>	2	8	28	16	0,14	54	100%
podkarpackie	<b>53</b>	1	8	28	16	2,49	53	100%
łódzkie	1	1	0	0	0	0,04	1	100%
<b>2015</b>								
Polska	6	5	1	0	0	0,016	6	100%
podkarpackie	6	5	1	0	0	0,282	6	100%
<b>2016</b>								
Polska	8	2	2	1	3	0,021	8	100%
podkarpackie	8	2	2	1	3	0,376	8	100%

<b>2017</b>								
Polska	14	3	4	2	5	0,036	14	100%
podkarpackie	14	3	4	2	5	0,658	14	100%
<b>2018</b>								
Polska	11	4	3	0	4	0,029	11	100%
podkarpackie	11	4	3	0	4	0,517	11	100%
<b>2019</b>								
Polska	9	1	0	5	3	0,023	9	100%
podkarpackie	5	1	0	1	3	0,235	5	100%
lubelskie	4	0	0	4	0	0,189	4	100%
<b>2020</b>								
Polska	3	3	0	0	0	0,008	3	100%
podkarpackie	3	3	0	0	0	0,141	3	100%
<b>2021</b>								
Polska	42	0	13	24	5	0,110	41	97,6%
podkarpackie	42	0	13	24	5	1,985	41	97,6%
<b>2022 – dane wstępne</b>								
Polska	5					0,013		

## VI. WNIOSKI:

1. Stwierdzono występowanie rodzimych (autochtonicznych) przypadków gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym (HFRS) wśród ludności Polski wywołanych co najmniej dwoma czynnikami etiologicznymi z rodzaju *Orthohantavirus* tj. Puumala virus (PUUV) oraz Dobrava-Belgrade virus (DOBV). Chorobę, potwierdzoną badaniami wirusologicznymi, wykryto u 164 chorych. Etiologię PUUV ustalono u 93 chorych (59%), DOBV – u 71 (41%), zaś udział DOBV był w Polsce większy niż w większości krajów europejskich (3%). 151 chorych pochodziło z terenu województwa podkarpackiego, 13 z innych województw. Zachorowania wykryto w 7 województwach.
2. Wśród rozpoznanych przypadków zakażeń ortohantawirusowych wynikających z narażenia środowiskowego i zawodowego zidentyfikowano 6,6% osób z obecnością przeciwciał anty-hantawirusowych, przeważał udział PUUV (67%) nad DOBV (33%). Zakażenia wykryto w 8 województwach, w tym w 7, tych samych co zachorowania.
3. Stwierdzono, że HFRS wywołany zarówno przez Dobrava-Belgrade virus jak i Puumala virus współwystępują (okres 2004 – 2018) w kilku utrwalonych lokalizacjach Polski Południowej i Wschodniej.
4. Stwierdzono, że u osób, które były hospitalizowane z powodu HFRS, u większości chorych zachorowanie przebiegało w obrazie klinicznym umiarkowanym lub ciężkim. DOBV-HFRS jest infekcją o zdecydowanie cięższym przebiegu klinicznym, z powikłaniami narządowymi, ze śmiertelnością na poziomie 2,3% w stosunku do wszystkich przypadków HFRS. W 2 przypadkach potwierdzono wspólne zakażenie (koinfekcję) z leptospirozą (krętkowicą), bakteryjną zoonozą wywołaną czynnikiem z rodzaju *Leptospira* przenoszonym ze wspólnego rezerwuaru przez gryzonie.
5. Stwierdzono występowanie zachorowań wśród ludności Polski Wschodniej, Południowo-Wschodniej, Południowej i Centralnej, terenami endemicznymi z najwyższą zapadalnością na HFRS w Polsce jest powiat sanocki i gmina Komańcza w woj. podkarpackim. W latach 2007, 2014 i 2021 wystąpił wzrost zachorowań na HFRS wskazujący na cykliczność tej zoonozy. W Polsce przeciętna zapadalność na HFRS w latach 2007 – 2018 była na poziomie 0,021 zachorowań na 100 000 mieszkańców ( od 0,008 do 0,140 / 100 000), w woj. podkarpackim zapadalność na

HFRS była 16-krotnie większa. Tak wyraźnie podwyższona zapadalność na Podkarpaciu, nie może być tłumaczona jedynie sprzyjającymi warunkami fizjograficznymi; należy ją odnieść niewątpliwie do prowadzonej stale od roku 2007 akcji informującej lekarzy o występowaniu tej choroby na terenie Podkarpacia.

6. Badanie ankietowe, wystandaryzowane i uwierzytelnione jako dokument diagnostyczny Państwowej Inspekcji Sanitarnej, dołączany na bieżąco do każdego potwierdzonego przypadku HFRS, pozwoliło na ocenę narażenia – ryzyka środowiskowego zachorowania. Rozpropagowywana informacja na temat choroby pozwoliła na uzyskanie lub poszerzenie wiedzy środowiska medycznego na temat HFRS jako choroby obecnej w Polsce.
7. Stwierdzono przydatność laboratoryjnego modelu diagnostycznego opartego na dwóch etapach badań, przesiewowego i potwierdzającego oraz równolegle prowadzonej diagnostyki leptospirozy, który był realizowany przez cały okres badań nad HFRS, model ten powinien być utrzymany i rozpowszechniony w innych ośrodkach diagnostycznych w Polsce, w których nie diagnozuje się tej zoonozy.

## PIŚMIENNICTWO

1. **Abudurexiti**, Abulikemu et al. "Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019." *Archives of virology* vol. 164,7 (2019): 1949-1965. doi:10.1007/s00705-019-04253-6.
2. **Adams K**, Jameson L, Meigh R, Brooks T. Hantavirus: an infectious cause of acute kidney injury in the UK. *BMJ Case Rep.* 2014;2014:bcr2014205529. Published 2014 Jul 17. doi:10.1136/bcr-2014-205529.
3. **Alexeyev**, O A et al. "Elevated levels of total and Puumala virus-specific immunoglobulin E in the Scandinavian type of hemorrhagic fever with renal syndrome." *Clinical and diagnostic laboratory immunology* vol. 1,3 (1994): 269-72. doi:10.1128/cdli.1.3.269-272.1994.
4. **Alff PJ**, Gavrilovskaya IN, Gorbunova E, et al. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses [published correction appears in *J Virol.* 2006 Dec;80(24):12430]. *J Virol.* 2006;80(19):9676-9686. doi:10.1128/JVI.00508-06.
5. **Ali HS**, Drewes S, Sadowska ET, Mikowska M, Groschup MH, Heckel G, Koteja P, Ulrich RG. First molecular evidence for Puumala hantavirus in Poland. *Viruses.* 2014 Jan 23;6(1):340-53. doi: 10.3390/v6010340. PMID: 24452006; PMCID: PMC3917447.
6. **Atalay YO**, Dere K, Şen H, Küçükodacı Z, Önem Y, Özkan S, Dağlı G. Hantavirüs Renal Sendromlu Hemorajik Ateş. Hantaviral Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: A Case Report and Review. *Olgu Sunumu ve Derleme Yoğun Bakım Dergisi* 2012;10(4):210-216.
7. **Avellaneda-Campos R**. Haemorrhagic fever with renal failure syndrome: a case report. *Nefrologia.* 2012;32(1):131-2. English, Spanish. doi: 10.3265/Nefrologia.pre2011.Dec.11225. PMID: 22294021.
8. **Avšič-Županc T**, Saksida A, Korva M. Hantavirus infections. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Apr;21S:e6-e16. doi: 10.1111/1469-0691.12291. Epub 2015 Jun 22. PMID: 24750436.
9. **Baumann A.**, Dudek D., Sadkowska-Todys M.: Rola środowiska naturalnego w szerzeniu się hantawirusów – model współzależności pomiędzy gospodarzem, patogenem i zakażeniami ludzi. *Przegl. Epidemiol.* 2007;61(4):647 – 655.

10. **Bentkowski** Waław – rozprawa doktorska „Ostre uszkodzenie nerek w przebiegu infekcji Hantavirusem – analiza zachorowań z rejonu województwa podkarpackiego”, Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2015.
11. **Bergstedt** Oscarsson, K., Brorstad, A., Baudin, M. et al. Human Puumala hantavirus infection in northern Sweden; increased seroprevalence and association to risk and health factors. *BMC Infect Dis* 16, 566 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1879-2>.
12. **Bhoelan** S, Langerak T, Noack D, et al. Hypopituitarism after Orthohantavirus Infection: What is Currently Known?. *Viruses*. 2019;11(4):340. Published 2019 Apr 10. doi:10.3390/v11040340.
13. **Bilčíková** M, Gresíková M, Valaseková T, Schréter I, Carnická A. Výskyt a klinický obraz hemoragickéj horúčky s renálnym syndrómom (HFRS) na východnom Slovensku: západný a východný typ [The incidence and clinical picture of hemorrhagic fever with renal syndrome in East Slovakia: the eastern and western type]. *Bratisl Lek Listy*. 1989 Nov;90(11):852-6. Slovak. PMID: 2574625.
14. **Brown** WL. Trench nephritis. *Lancet* 1916;187:391–395.
15. **Brummer-Korvenkontio** M, Vaheiri A, Hovi T, von Bonsdorff CH, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Blom N, Lähdevirta J. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis*. 1980 Feb;141(2):131-4. doi: 10.1093/infdis/141.2.131. PMID: 6102587.
16. **Campbell** ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(3):a004994. Published 2011 Mar 1. doi:10.1101/cshperspect.a004994.
17. **Casals** J, Henderson BE, Hoogstraal H, Johnson KM, Shelokov A. A review of Soviet viral hemorrhagic fevers, 1969. *J Infect Dis*. 1970 Nov;122(5):437-53. doi: 10.1093/infdis/122.5.437. PMID: 4920325.
18. **Charbonnel** N, Pages M, Sironen T, Henttonen H, Vapalahti O, Mustonen J, Vaheiri A. Immunogenetic factors affecting susceptibility of humans and rodents to hantaviruses and the clinical course of hantaviral disease in humans. *Viruses*. 2014;6:2214–2241. doi: 10.3390/v6052214.
19. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce. *Biuletyn roczny*. ISSN 1643-8655 <http://www.old.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld>; 11.03.2023r.

20. **Chu** Young-Kyu, Gligic A., Tomanovic S., et al.: A field efficacy trial of inactivated Hantann virus vaccine (Hantavax, TM) against HFRS in the endemic area of Yougoslavia from 1996 – 1998. *Journal Korean Soc. Virol.* 1999,29,55-64.
21. **Cifuentes-Muñoz** N, Salazar-Quiroz N, Tischler ND: Hantavirus Gn and Gc Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses* 2014, 6(4), 1801-1822; doi.org/10.3390/v6041801.
22. **Clement** J, LeDuc JW, Lloyd G, et al. Wild Rats, Laboratory Rats, Pet Rats: Global Seoul Hantavirus Disease Revisited. *Viruses.* 2019;11(7):652. Published 2019 Jul 17. doi:10.3390/v11070652.
23. **Cross** RW, Waffa B, Freeman A, Riegel C, Moses LM, Bennett A, Safronetz D, Fischer ER, Feldmann H, Voss TG, Bausch DG: Old World Hantaviruses in Rodents in New Orleans, Louisiana. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 May 7; 90(5): 897–901. doi: 10.4269/ajtmh.13-0683.
24. **Czurilow** A.W.: Problema gemorragicznego nefrozo-nefrita. I. Klinika tak nazywanego nefrozo-nefrita. *Archiw Biol. Nauk (Moskwa).* 1941,62,2,41-52.
25. **de Carvalho Nicacio** C, Björling E, Lundkvist A. Immunoglobulin A responses to Puumala hantavirus. *J Gen Virol.* 2000 Jun;81(Pt 6):1453-61. doi: 10.1099/0022-1317-81-6-1453. PMID: 10811929.
26. **de Oliveira** RC, Fernandes J, de Sampaio Lemos ER, de Paiva Conte F, Rodrigues-da-Silva RN. The Serological Cross-Detection of Bat-Borne Hantaviruses: A Valid Strategy or Taking Chances?. *Viruses.* 2021;13(7):1188. Published 2021 Jun 22. doi:10.3390/v13071188.
27. **de Oliveira** RC, Guterres A, Fernandes J, et al. Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses.* 2014 Apr;6(5):1929-1973. DOI: 10.3390/v6051929. PMID: 24784571; PMCID: PMC4036540.
28. **Dieterle** ME, Solà-Riera C, Ye C, et al. Genetic depletion studies inform receptor usage by virulent hantaviruses in human endothelial cells. *Elife.* 2021;10:e69708. Published 2021 Jul 6. doi:10.7554/eLife.69708.
29. **Engler** O, Klingstrom J, Aliyev E, Niederhauser C, Fontana S, Strasser M, Portmann J, Signer J, Bankoul S, Frey F, Hatz C, Stutz A, Tschaggelar A, Mutsch M. Seroprevalence of hantavirus infections in Switzerland in 2009: difficulties in determining prevalence in a country with low endemicity. *Euro Surveill.* 2013 Dec 12;18(50):20660. doi: 10.2807/1560-7917.es2013.18.50.20660. PMID: 24342520.

30. **Ermonval M**, Baychelier F, Tordo N: What Do We Know about How Hantaviruses Interact with Their Different Hosts? *Viruses*. 2016 Aug; 8(8): 223 doi: 10.3390/v8080223
31. **Ferro I**, Bellomo CM, López W, Coelho R, Alonso D, Bruno A, Córdoba FE, Martínez VP. Hantavirus pulmonary syndrome outbreaks associated with climate variability in Northwestern Argentina, 1997-2017. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Nov 30;14(11):e0008786. doi: 10.1371/journal.pntd.0008786. PMID: 33253144; PMCID: PMC7728390.
32. **Finlay BB**, McFadden G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):767-82. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.034. PMID: 16497587.
33. **Fredricks DN**, Relman DA. Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(1):18-33. doi:10.1128/CMR.9.1.18.
34. **French GR**, Foulke RS, Brand OA, Eddy GA, Lee HW, Lee PW. Korean hemorrhagic fever: propagation of the etiologic agent in a cell line of human origin. *Science*. 1981 Mar 6;211(4486):1046-8. doi: 10.1126/science.6110243. PMID: 6110243.
35. **Gavrilovskaya IN**, Gorbunova EE, Mackow NA, Mackow ER. Hantaviruses direct endothelial cell permeability by sensitizing cells to the vascular permeability factor VEGF, while angiopoietin 1 and sphingosine 1-phosphate inhibit hantavirus-directed permeability. *J Virol*. 2008;82(12):5797-5806. doi:10.1128/JVI.02397-07.
36. **Gärtner L**, Emmerich P, Schmitz H. Hantavirusinfektionen als Ursache von akutem Nierenversagen. Drei Fallbeobachtungen in der Bundesrepublik Deutschland [Hantaan virus infections as a cause of acute kidney failure. 3 cases in West Germany]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1988 Jun 10;113(23):937-40. German. doi: 10.1055/s-2008-1067745. PMID: 2897900.
37. **Gorbunova EE**, Gavrilovskaya IN, Pepini T, Mackow ER. VEGFR2 and Src kinase inhibitors suppress Andes virus-induced endothelial cell permeability. *J Virol*. 2011 Mar;85(5):2296-303. doi: 10.1128/JVI.02319-10. Epub 2010 Dec 22. PMID: 21177802; PMCID: PMC3067787.
38. **Gresikova M**. (red.): *Hemoragicka horucka s renalnym syndromom*. VEDA.
39. **Gresiková M**, Kozuch O, Sekeyová M, Tkachenko EA, Rezapkin GV, Lysý J. Detection of the antigen and antibodies to the eastern subtype of haemorrhagic fever

- with renal syndrome virus in small rodents in Slovakia. *Acta Virol.* 1988 Mar;32(2):164-7. PMID: 2899965. Bratislava 1998.
40. **Grygorczuk S**, Pancewicz S, Zajkowska J, Kondrusik M, Swierzbńska R, Moniuszko A, Pawlak-Zalewska W. Występowanie przeciwciał przeciwko hantawirusom wśród pracowników leśnych z terenu Polski północno-wschodniej [Detection of anti-hantavirus antibodies in forest workers in the north-east of Poland]. *Przegl Epidemiol.* 2008;62(3):531-7. Polish. PMID: 19108515. G.
  41. **Gu SH**, Hejduk J, Markowski J, Kang HJ, Markowski M, Połatyńska M, Sikorska B, Liberski PP, Yanagihara R. Co-circulation of soricid- and talpid-borne hantaviruses in Poland. *Infect Genet Evol.* 2014 Dec;28:296-303. doi: 10.1016/j.meegid.2014.10.017. Epub 2014 Oct 27. PMID: 25445646; PMCID: PMC4257849.
  42. **Guo WP**, Lin XD, Wang W, Tian JH, Cong ML, Zhang HL, Wang MR, Zhou RH, Wang JB, Li MH, Xu J, Holmes EC, Zhang YZ: Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003159. doi: 10.1371/journal.ppat.1003159.
  43. **Gut AK**, Gut R, Rymarz A, Woźniak-Kosek A. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Poland. *Przegl Epidemiol.* 2018;72(4):477-485. doi: 10.32394/pe.72.4.23. PMID: 30810003.
  44. **Gut W**, Siennicka J, Sadkowska-Todys M, Baumann A, Litwińska B. Występowanie przeciwciał klasy IgG swoistych dla hantawirusów w populacji pracowników leśnych i zoologów [Hantavirus specific IgG antibodies in population of zoologists and forest workers]. *Przegl Epidemiol.* 2007;61(3):483-8. Polish. PMID: 18069384.
  45. **Hall PR**, Leitão A, Ye C, et al. Small molecule inhibitors of hantavirus infection. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20(23):7085-7091. doi:10.1016/j.bmcl.2010.09.092.
  46. **Hautala N**, Partanen T, Kubin AM, Kauma H, Hautala T. Central Nervous System and Ocular Manifestations in Puumala Hantavirus Infection. *Viruses.* 2021 May 31;13(6):1040. doi: 10.3390/v13061040. PMID: 34072819; PMCID: PMC8229408.
  47. **Hägele S**, Nussbag C, Müller A, Baumann A, Zeier M, Krautkrämer E. Cells of the human respiratory tract support the replication of pathogenic Old World orthohantavirus Puumala. *Virol J.* 2021;18(1):169. Published 2021 Aug 17. doi:10.1186/s12985-021-01636-7.

48. **Hepojoki J**, Vaeheri A, Strandin T. The fundamental role of endothelial cells in hantavirus pathogenesis. *Front Microbiol.* 2014 Dec 22;5:727. doi: 10.3389/fmicb.2014.00727. PMID: 25566236; PMCID: PMC4273638.
49. **Heyman P**, Ceianu CS, Christova I, Tordo N, Beersma M, João Alves M, Lundkvist A, Hukic M, Papa A, Tenorio A, Zelená H, Essbauer S, Visontai I, Golovljova I, Connell J, Nicoletti L, Van Esbroeck M, Gjeruldsen Dudman S, Aberle SW, Avšič-Županc T, Korukluoglu G, Nowakowska A, Klempa B, Ulrich RG, Bino S, Engler O, Opp M, Vaeheri A. A five-year perspective on the situation of haemorrhagic fever with renal syndrome and status of the hantavirus reservoirs in Europe, 2005-2010. *Euro Surveill.* 2011 Sep 8;16(36):19961. doi: 10.2807/ese.16.36.19961-en. PMID: 21924118.
50. **He X**, Wang S, Huang X, Wang X. Changes in age distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome: an implication of China's expanded program of immunization. *BMC Public Health.* 2013;13:394. Published 2013 Apr 26. doi:10.1186/1471-2458-13-394.
51. **Holmes EC**, Zhang YZ: The evolution and emergence of hantaviruses. *Curr Opin Virol.* 2015 Feb;10:27-33. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.007.
52. **Hönig V**, Kamiš J, Maršíková A, Matějková T, Stopka P, Mácová A, Růžek D, Kvičerová J. Orthohantaviruses in Reservoir and Atypical Hosts in the Czech Republic: Spillover Infection and Indication of Virus-Specific Tissue Tropism. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct 26;10(5):e0130622. doi: 10.1128/spectrum.01306-22. Epub 2022 Sep 28. PMID: 36169417; PMCID: PMC9604079.
53. [https://cez.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/Wytyczne/statystyka/icd10tomi\\_56a8f5a554a18.pdf](https://cez.gov.pl/fileadmin/user_upload/Wytyczne/statystyka/icd10tomi_56a8f5a554a18.pdf), p.107; 15.05.2022r.
54. <https://icd.who.int/browse10/2019/en#/A92-A99>
55. <https://ndc.services.cdc.gov/case-definitions/hantavirus-pulmonary-syndrome-2015>; 15.05.2022r.
56. <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/12314>; 27.04.2023r.
57. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna\\_viruses/205/bunyaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/205/bunyaviridae); 08.04.2022r.
58. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; 15.05.2022r.
59. <https://www.cdc.gov/hantavirus/surveillance/international.html>; 08.04.2022r.
60. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hantavirus-annual-epidemiological-report-2018.pdf>; 03.04.2023r.

61. <https://www.iucnredlist.org/species/1888/115057408>; 28.03.2022r.
62. <https://www.iucnredlist.org/species/1892/197269879>; 28.03.2022r.
63. <https://www.iucnredlist.org/species/19353/165118026>; 28.03.2022r.
64. <https://www.iucnredlist.org/species/4973/197520967>; 28.03.2022r.
65. [https://rzeszow.stat.gov.pl/vademecum/vademecum\\_podkarpackie/portrety\\_gmin/sanocki/komancza.pdf](https://rzeszow.stat.gov.pl/vademecum/vademecum_podkarpackie/portrety_gmin/sanocki/komancza.pdf); 03.04.2023r.
66. [http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def\\_PL2\\_6b.pdf](http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/inne/Def_PL2_6b.pdf) strona 16; 03.04.2023r.
67. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). ICTV 9th Report (2011) - Negative Sense RNA Viruses – Bunyaviridae.
68. **Jääskeläinen** K, M., Kaukinen P, Plyusnina A, Vapalahti O, Elliott R, M., Weber F, Vaheri A, Plyusnin A: Tula and Puumala hantavirus NSs ORFs are functional and the products inhibit activation of the interferon- beta promoter. *J. Med. Virol.* 79:1527–1536, 2007. doi.org/10.1002/jmv.20948.
69. **Jiang** F, Wang L, Wang S, et al. Meteorological factors affect the epidemiology of hemorrhagic fever with renal syndrome via altering the breeding and hantavirus-carrying states of rodents and mites: a 9 years' longitudinal study. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(11):e104. Published 2017 Nov 29. doi:10.1038/emi.2017.92
70. **Jiang** H, Du H, Wang LM, Wang PZ, Bai XF. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Pathogenesis and Clinical Picture [published correction appears in *Front Cell Infect Microbiol.* 2016 Dec 08;6:178]. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:1. Published 2016 Feb 3. doi:10.3389/fcimb.2016.00001
71. **Jiang** H., Zheng, X., Wang, L. *et al.* Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. *Virol. Sin.* 32, 32–43 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>
72. **Johnson** K.M. Hantaviruses: History and Overview. In: Schmaljohn C.S., Nichol S.T. (eds) Hantaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2001, vol 256. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_1)
73. **Jonsson** CB, Figueiredo LT, & Vapalahti O (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 412–441. doi:10.1128/CMR.00062-09
74. **Jonsson** CB, Hooper J, Mertz G. Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Res.* 2008 Apr;78(1):162-9. doi: 10.1016/j.antiviral.2007.10.012. Epub 2007 Nov 21. PMID: 18093668; PMCID: PMC2810485.

75. **Jourde-Chiche**, N., Fakhouri, F., Dou, L. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol* 15, 87–108 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0098-z>
76. **Kabwe** E, Davidyuk Y, Shamsutdinov A, et al. Orthohantaviruses, Emerging Zoonotic Pathogens. *Pathogens*. 2020;9(9):775. Published 2020 Sep 22. doi:10.3390/pathogens9090775.
77. **Kallio** ER, Klingström J, Gustafsson E, Manni T, Vaheiri A, Henttonen H, Vapalahti O, Lundkvist Å. Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J Gen Virol*. 2006 Aug;87(Pt 8):2127-2134. doi: 10.1099/vir.0.81643-0. PMID: 16847107.
78. **Kallio** ER, Voutilainen L, Vapalahti O, Vaheiri A, Henttonen H, Koskela E, Mappes T. Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology*. 2007 Aug;88(8):1911-6. doi: 10.1890/06-1620.1. PMID: 17824420.
79. **Kariwa** H, Fujiki M, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takashima I, Hashimoto N. Urine-associated horizontal transmission of Seoul virus among rats. *Arch Virol*. 1998;143(2):365-74. doi: 10.1007/s007050050292. PMID: 9541619.
80. **Klaus** JP, Eisenhauer P, Russo J, et al. The intracellular cargo receptor ERGIC-53 is required for the production of infectious arenavirus, coronavirus, and filovirus particles. *Cell Host Microbe*. 2013;14(5):522-534. doi:10.1016/j.chom.2013.10.010.
81. **Klempa** B, Avsic-Zupanc T, Clement J, et al. Complex evolution and epidemiology of Dobrava-Belgrade hantavirus: definition of genotypes and their characteristics. *Arch Virol*. 2013;158(3):521-529. doi:10.1007/s00705-012-1514-5.
82. **Klempa** B., Koivogui L., Sylla O., Koulemou K., Auste B., Kruger D. H., et al. (2010). Serological evidence of human hantavirus infections in Guinea, West Africa. *J. Infect. Dis.* 201 1031–1034 10.1086/651169.
83. **Klempa** B., Witkowski P. T., Popugaeva E., Auste B., Koivogui L., Fichet-Calvet E., et al. (2012). Sangassou virus, the first hantavirus isolate from Africa, displays genetic and functional properties distinct from those of other murinae-associated hantaviruses. *J. Virol.* 86 3819–3827 10.1128/JVI.05879-11.
84. **Knap** JP, Brzostek T, Rączka A, Burzyński W, Litarska U. Przypadek gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym (HFRS) [A case of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS)]. *Pol Merkur Lekarski*. 2006 Nov;21(125):474-6. Polish. PMID: 17345843.

85. **Knap** J. P., Nowakowska A. „Hantavirus Infection as an Important Problem of Military Medicine in the World and in Poland”, 2nd International Scientific Conference Epimilitaris 2013 – Bioterrorism.
86. **Knap** J. P., Nowakowska A. „Infekcja hantawirusowa”. Cianciara J., Juszczak J. „Choroby zakaźne i pasożytnicze” Wydawnictwo Czelej Lublin 2012, wydanie II, tom II str.752 – 756 (rozdział w podręczniku).
87. **Knap** J. P., Nowakowska A., Dutkiewicz J., Zając V., Wójcik-Fatla A., Chmielewska-Badora J., Strupieniuk Z. „ Obecność przeciwciał antyhantawirusowych u leśników Roztoczańskiego Parku Narodowego i Nadleśnictwa Puławy (Makroregion Lubelski). Doniesienie wstępne.”, Medycyna Ogólna, 2010, 16 (XLV), 2.
88. **Knap** JP, Nowakowska A, Heyman P, Burzyński W, Rączka A, Dutkiewicz J, Lech J, Brzostek T, Kornasiewicz R, Bentkowski W, Litarska U, Witas M, Marecki M, Pitucha G: Środowiskowe i epidemiologiczne uwarunkowania infekcji hantawirusowej (Gorączki krwotocznej z zespołem nerkowym – HFRS) w województwie podkarpackim – pierwszej w Polsce epidemii 2007 – 2008 roku – oraz zachorowań endemicznych. Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego 2009; Vol.7, No 2, 124-138.
89. **Knap** J. P., Nowakowska A., Wojtyła A., Rączka A., „Infekcja hantawirusowa: gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS) - nowa choroba wykryta w Polsce” Wydawnictwo „Educator” Akademii Polonijnej w Częstochowie „Zdrowie publiczne: współczesne uwarunkowania i trendy rozwoju” Częstochowa 2010.
90. **Knap** JP, Trybusz A. Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym - zakażenie Hantawirusem występujące w Polsce [Haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS)-Hantavirus infection disease appearing in Poland]. Pol Merkur Lekarski. 2006 Nov;21(125):411-7. Polish. PMID: 17345831.
91. **Kocik** J., Gawęł J., Michalski A., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Nowakowska A., Pitucha G., Marciniak-Niemcewicz A. „Hantavirus - Underestimated threat in Poland”. NeuroCentrum Lublin „Wellness in good health and sickness” 2011, rozdział VIII, str. 93-103.
92. **Koehler** FC, Di Cristanziano V, Späth MR, Hoyer-Allo KJR, Wanken M, Müller RU, Burst V. The kidney in hantavirus infection-epidemiology, virology, pathophysiology, clinical presentation, diagnosis and management. Clin Kidney J.

- 2022 Jan 29;15(7):1231-1252. doi: 10.1093/ckj/sfac008. PMID: 35756741; PMCID: PMC9217627.
93. **Kołodziej** M, Melgies A, Joniec-Wiechetek J, Michalski A, Nowakowska A, Pitucha G, Niemcewicz M. First molecular characterization of Dobrava-Belgrade virus found in *Apodemus flavicollis* in Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2018 Jun 20;25(2):368-373. doi: 10.26444/aaem/90535. Epub 2018 May 22. PMID: 29936795.
  94. **Koskela** S, Mäkelä S, Strandin T, Vaheri A, Outinen T, Joutsu-Korhonen L, Pörsti Viruses. 2021 Aug 6;13(8):1553. doi: 10.3390/v13081553. PMID: 34452419; PMCID: PMC8402851.
  95. **Krautkrämer** E, Grouls S, Stein N, Reiser J, Zeier M. Pathogenic old world hantaviruses infect renal glomerular and tubular cells and induce disassembling of cell-to-cell contacts. *J Virol*. 2011;85(19):9811-9823. doi:10.1128/JVI.00568-11
  96. **Krautkrämer** E, Zeier M, Plyusnin A: Hantavirus infection: An emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney Int*. 2013, 83, 23–27.
  97. **Kuhn** J.H., Adkins S., Alioto D., Alkhovsky S.V., Amarasinghe G.K., Anthony S.J., Avšič-Županc T., Ayllón M.A., Bahl J., Balkema-Buschmann A., et al. 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Arch. Virol*. 2020;165:3023–3072. doi: 10.1007/s00705-020-04731-2.
  98. **Laenen** L, Vergote V, Calisher CH, et al. *Hantaviridae*: Current Classification and Future Perspectives. *Viruses*. 2019;11(9):788. Published 2019 Aug 27. doi:10.3390/v11090788.
  99. **Landau** A. i wsp.: *O zespole żółtaczkowo-nerkowo-krwotocznym*. *Polska Gazeta Lekarska*. 1928,7,26,484-486.
  100. **Latinne**, A., Navascués, M., Pavlenko, M. *et al.* Phylogeography of the striped field mouse, *Apodemus agrarius* (Rodentia: Muridae), throughout its distribution range in the Palaearctic region. *Mamm Biol* 100, 19–31 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42991-019-00001-0>.
  101. **Lederer** S, Lattwein E, Hanke M, Sonnenberg K, Stoecker W, Lundkvist Å, Vaheri A, Vapalahti O, Chan PK, Feldmann H, Dick D, Schmidt-Chanasit J, Padula P, Vial PA, Panculescu-Gatej R, Ceianu C, Heyman P, Avšič-Županc T, Niedrig M. Indirect immunofluorescence assay for the simultaneous detection of antibodies against clinically important old and new world hantaviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Apr

- 4;7(4):e2157. doi: 10.1371/journal.pntd.0002157. Erratum in: PLoS Negl Trop Dis. 2020 Nov 9;14(11):e0008864. PMID: 23593524; PMCID: PMC3617148.
102. **Lee HW**. The miracle of the Hantaan River. 1st edition. Seoul: Sigongsa; 1999. pp. 25–32. pp. 246–254.
103. **Lee HW**, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis*. 1982 Nov;146(5):638-44. doi: 10.1093/infdis/146.5.638. PMID: 6127366.
104. **Lee HW**, Johnson KM. Laboratory-acquired infections with Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1982 Nov;146(5):645-51. doi: 10.1093/infdis/146.5.645. PMID: 6127367.
105. **Lee HW**, Lee PW, Baek LJ, Song CK, Seong IW. Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 Sep;30(5):1106-12. doi: 10.4269/ajtmh.1981.30.1106. PMID: 6116436.
106. **Lee HW**, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. *J Infect Dis*. 1978 Mar;137(3):298-308. doi: 10.1093/infdis/137.3.298. PMID: 24670.
107. **Lee SH**, No JS, Kim WK, et al. Molecular Epidemiology and Genetic Diversity of Orthohantaviruses in Small Mammals in Western Poland. *Am J Trop Med Hyg*. 2020;103(1):193-199. doi:10.4269/ajtmh.19-0802.
108. **Letko M**, Seifert SN, Olival KJ, Plowright RK, Munster VJ. Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(8):461-471. doi:10.1038/s41579-020-0394-z.
109. **Libby P**, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J*. 2020;41(32):3038-3044. doi:10.1093/eurheartj/ehaa62.
110. **Lin XD**, Guo WP, Wang W, et al. Migration of Norway rats resulted in the worldwide distribution of Seoul hantavirus today. *J Virol*. 2012;86(2):972-981. doi:10.1128/JVI.00725-11.
111. **Litarska U**, Knap JP, Zięba J. Pracownia leptospir WSSE we Wrocławiu (1947-2005). Uwagi na tle jej działalności [Leptospirosis laboratory of WSSE in Wrocław (1947-2005). Comment on its activity]. *Przegl Epidemiol*. 2006;60(2):213-24. Polish. PMID: 16964672.
112. **Liu R**, Ma H, Shu J, et al. Vaccines and Therapeutics Against Hantaviruses. *Front Microbiol*. 2020;10:2989. Published 2020 Jan 30. doi:10.3389/fmicb.2019.02989.

113. **Lundkvist** A, Björsten S, Niklasson B. Immunoglobulin G subclass responses against the structural components of Puumala virus. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):368-372. doi:10.1128/jcm.31.2.368-372.1993.
114. **Mackow** ER, Dalrymple NA, Cimica V, Matthys V, Gorbunova E, Gavrilovskaya I: Hantavirus interferon regulation and virulence determinants. *Virus Res.* 2014, *187*, 65–71.
115. **Maes** P, Klempa B, Clement J, Matthijnsens J, Gajdusek DC, Krüger DH, Van Ranst M. A proposal for new criteria for the classification of hantaviruses, based on S and M segment protein sequences. *Infect Genet Evol.* 2009 Sep;9(5):813-20. doi: 10.1016/j.meegid.2009.04.012. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19393771.
116. **Majda-Stanisławska** E, Krzemiński Z. Choroby wywoływane przez hantawirusy [Diseases caused by hantaviruses]. *Przegl Epidemiol.* 1998;52(3):245-53. Polish. PMID: 9919918.
117. **Malavige** GN, Ogg GS. Pathogenesis of vascular leak in dengue virus infection. *Immunology.* 2017;151(3):261-269. doi:10.1111/imm.12748.
118. **Markotić** A, Nichol ST, Kuzman I, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Gagro A, Rabatić S, Zgorelec R, Avsic-Zupanc T, Beus I, Dekaris D. Characteristics of Puumala and Dobrava infections in Croatia. *J Med Virol.* 2002 Apr;66(4):542-51. doi: 10.1002/jmv.2179. PMID: 11857535.
119. **Martínez** VP, Di Paola N, Alonso DO, Pérez-Sautu U, Bellomo CM, Iglesias AA, Coelho RM, López B, Periolo N, Larson PA, Nagle ER, Chitty JA, Pratt CB, Díaz J, Cisterna D, Campos J, Sharma H, Dighero-Kemp B, Biondo E, Lewis L, Anselmo C, Olivera CP, Pontoriero F, Lavarra E, Kuhn JH, Strella T, Edelstein A, Burgos MI, Kaler M, Rubinstein A, Kugelman JR, Sanchez-Lockhart M, Perandonos C, Palacios G. "Super-Spreaders" and Person-to-Person Transmission of Andes Virus in Argentina. *N Engl J Med.* 2020 Dec 3;383(23):2230-2241. doi: 10.1056/NEJMoa2009040. PMID: 33264545.
120. **Mayor** J, Engler O, Rothenberger S. Antiviral Efficacy of Ribavirin and Favipiravir against Hantaan Virus. *Microorganisms.* 2021;9(6):1306. Published 2021 Jun 15. doi:10.3390/microorganisms9061306.
121. **Meier** K, Thorkelsson SR, Quemin ERJ, Rosenthal M. Hantavirus Replication Cycle-An Updated Structural Virology Perspective. *Viruses.* 2021;13(8):1561. Published 2021 Aug 6. doi:10.3390/v13081561.

122. **Mertens** M, Hofmann J, Petraitytė-Burneikiene R, Ziller M, Sasnauskas K, Friedrich R, et al. Seroprevalence study in forestry workers of a non-endemic region in eastern Germany reveals infections by Tula and Dobrava-Belgrade hantaviruses. *Med Microbiol Immunol*. 2011; 200(4): 263–268.
123. **Michalski** A., Knap J., Bielawska-Drózd A., Bartoszcze M.: : Lesson learned from 2001-2021 – to the pandemic era. *Ann. Agric. Environm. Med*. 2022,29(1),1-11.
124. **Michalski** A., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Gawęł I., Nowakowska A., Pitucha G., Bartoszcze M. „Identification of Hantaviruses In the animals reservoir related with endemic foci of HFRS In the south-east part of Poland” *Medical Corps International Forum*, 2011, 4./4, 36- supplement.
125. **Michalski** A, Niemcewicz M, Bielawska-Drózd A, Nowakowska A, Gawęł J, Pitucha G, Joniec J, Zielonka K, Marciniak-Niemcewicz A, Kocik J. Surveillance of hantaviruses in Poland: a study of animal reservoirs and human hantavirus disease in Subcarpathia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014 Jul;14(7):514-22. doi: 10.1089/vbz.2013.1468. Epub 2014 Jun 5. PMID: 24902039; PMCID: PMC4098853.
126. **Min** KD, Kim H, Hwang SS, et al. Protective effect of predator species richness on human hantavirus infection incidence. *Sci Rep*. 2020;10(1):21744. Published 2020 Dec 10. doi:10.1038/s41598-020-78765-6.
127. **Mir** MA. Hantaviruses. *Clin Lab Med*. 2010;30(1):67-91. doi:10.1016/j.cll.2010.01.004.
128. **Mir** S. Hantavirus Induced Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2022;8:795340. Published 2022 Jan 18. doi:10.3389/fmed.2021.795340.
129. **Mittler** E, Dieterle ME, Kleinfelter LM, Slough MM, Chandran K, Jangra RK: Hantavirus entry: Perspectives and recent advances. *Adv Virus Res*. 2019; 104:185-224. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.07.002.
130. **Mull** N, Jackson R, Sironen T, Forbes KM. Ecology of Neglected Rodent-Borne American Orthohantaviruses. *Pathogens*. 2020;9(5):325. Published 2020 Apr 26. doi:10.3390/pathogens9050325.
131. **Müller** A, Baumann A, Essbauer S, Radosa L, Krüger DH, Witkowski PT, Zeier M, Krautkrämer E. Analysis of the integrin  $\beta_3$  receptor for pathogenic orthohantaviruses in rodent host species. *Virus Res*. 2019 Jul 2;267:36-40. doi: 10.1016/j.virusres.2019.04.009. Epub 2019 May 1. PMID: 31054291.

132. **Muyangwa M**, Martynova EV, Khaiboullina SF, Morzunov SP, Rizvanov AA: Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection. *Frontiers in microbiology*, 2015; 6, 1326. doi:10.3389/fmicb.2015.01326.
133. **Noack D**, Goeijenbier M, Reusken CBEM, Koopmans MPG, Rockx BHG. Orthohantavirus Pathogenesis and Cell Tropism. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:399. Published 2020 Aug 4. doi:10.3389/fcimb.2020.00399
134. **Noh JY**, Jung J, Song JW: Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *Infect Chemother*. 2019 Dec;51(4):405-413. <https://doi.org/10.3947/ic.2019.51.4.405>
135. **Nowakowska A**, Heyman P, Knap JP, Burzyński W, Witas M. The first established focus of hantavirus infection in Poland, 2007. *Ann Agric Environ Med*. 2009; 16: 79–85.
136. **Nowakowska A.**, Michalski A., Niemcewicz M., Bielawska-Drózd A., Gawęł J., Pitucha G., Knap J. „The occurrence of haemorrhagic fever with renal syndrome cases (HFRS) in the south-east Poland” *Medical Corps International Forum*, 2011, 4./4, 36- supplement (plakat).
137. **Oh MD**, Lee JK. Milestones in history of adult vaccination in Korea. *Clin Exp Vaccine Res*. 2012;1(1):9-17. doi:10.7774/cevr.2012.1.1.9
138. **Oliver J**, Macdowell M. The renal lesion in epidemic hemorrhagic fever. *J Clin Invest*. 1957;36(1 Part 2):99-223. doi:10.1172/JCI103415
139. **Padula PJ**, Edelstein A, Miguel SD, López NM, Rossi CM, Rabinovich RD. Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus. *Virology*. 1998 Feb 15;241(2):323-30. doi: 10.1006/viro.1997.8976. PMID: 9499807.
140. **Pal E**, Strle F, Avsic-Zupanc T. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Pomurje region of Slovenia--an 18-year survey. *Wien Klin Wochenschr*. 2005 Jun;117(11-12):398-405. doi: 10.1007/s00508-005-0359-2. PMID: 16053195.
141. **Panasiak W**, Wleklík M, Oraczewska A, Luczak M. Serological studies of haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Poland. Preliminary report. *Acta Microbiol Pol*. 1989;38(1):63-7. PMID: 2476002.
142. **Park KH**, Kang YU, Kang SJ, Jung YS, Jang HC, Jung SI. Experience with extrarenal manifestations of hemorrhagic fever with renal syndrome in a tertiary care hospital in South Korea. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;84(2):229-233. doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0024.

143. **Parvate A**, Williams EP, Taylor MK, Chu YK, Lanman J, Saphire EO, Jonsson CB: Diverse Morphology and Structural Features of Old and New World Hantaviruses. *Viruses* 2019 Sep 16;11(9). pii: E862. doi: 10.3390/v11090862.
144. **Pettersson L**, Klingström J, Hardestam J, Lundkvist A, Ahlm C, Evander M. Hantavirus RNA in saliva from patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(3):406-411. doi:10.3201/eid1403.071242.
145. **Piekarowicz A**: Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2004r., 11-29; 263.
146. **Pilacińska B**. Wybrane aspekty ekologii gryzoni z wysp leśnych w krajobrazie rolniczym. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2005, Seria zoologia nr 28, ISBN: 83-232-1591-X, pp. 233-239.
147. **Pitucha G.**, Michalski A., Gawel J., Niemcewicz M., Nowakowska A., Bielawska-Drózd A. “Ecological characterization of the natural foci of hantavirus infection in the animal reservoir in the south part of Subcarpathian Voivodeship in Poland” *Medical Corps International Forum*, 2011, 4./4, 36- supplement (plakat).
148. **Plyusnin A.**, Morzunov S.P. (2001) Virus Evolution and Genetic Diversity of Hantaviruses and Their Rodent Hosts. In: Schmaljohn C.S., Nichol S.T. (eds) *Hantaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 256. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_4)
149. **Plyusnin A**, Vapalahti O, Lankinen H, et al. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol.* 1994;68(12):7833-7839. doi:10.1128/JVI.68.12.7833-7839.1994
150. **Rasmuson J**, Lindqvist P, Sörensen K, Hedström M, Blomberg A, Ahlm C. Cardiopulmonary involvement in Puumala hantavirus infection. *BMC Infect Dis.* 2013;13:501. Published 2013 Oct 28. doi:10.1186/1471-2334-13-501.
151. **Razzauti M**, Castel G, Cosson JF. Impact of Landscape on Host-Parasite Genetic Diversity and Distribution Using the *Puumala orthohantavirus*-Bank Vole System. *Microorganisms.* 2021;9(7):1516. Published 2021 Jul 15. doi:10.3390/microorganisms9071516.
152. **Razzauti M**, Plyusnina A, Henttonen H, et al.: Accumulation of point mutations and reassortment of genomic RNA segments are involved in the microevolution of Puumala hantavirus in a bank vole (*Myodes glareolus*) population. *J Gen Virol*,89(2008), str.1649-1660.

153. **Razzauti M**, Plyusnina A, Sironen T, Henttonen H, Plyusnin A. Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. *J Gen Virol.* 2009 Aug;90(Pt 8):1923-1931. doi: 10.1099/vir.0.011304-0. Epub 2009 Apr 22. PMID: 19386780.
154. **Riccò M**, Peruzzi S, Ranzieri S, Magnavita N. Occupational Hantavirus Infections in Agricultural and Forestry Workers: A Systematic Review and Metanalysis. *Viruses.* 2021;13(11):2150. Published 2021 Oct 25. doi:10.3390/v13112150.
155. **Reynes JM**, Carli D, Boukezia N, Debruyne M, Herti S. Tula hantavirus infection in a hospitalised patient, France, June 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(50). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.50.30095. PMID: 26691901.
156. **Sadkowska-Todys M**, Dudek-Godeau D, Kamińska S, Baumann-Popczyk A, Czerwiński M, Kucharczyk B, Zieliński A. Occurrence and maintenance of hantavirus infections among rodent populations in their natural habitat--results of a field study from Podkarpackie province, Poland 2010-2012. *Przegl Epidemiol.* 2015;69(2):283-8, 395-9. English, Polish. PMID: 26233088.
157. **Sadkowska-Todys M**, Gut W, Baumann A, Siennicka J, Litwińska B, Zieliński A. Ocena problemu występowania zakażeń ludzi hantawirusami na terenie Polski, ze szczególnym uwzględnieniem wirusa Puumala [Occurrence of human hantavirus infections in Poland]. *Przegl Epidemiol.* 2007;61(3):497-503. Polish. PMID: 18069386.
158. **Schountz T**, Prescott J. Hantavirus immunology of rodent reservoirs: current status and future directions. *Viruses.* 2014;6(3):1317-1335. Published 2014 Mar 14. doi:10.3390/v6031317.
159. **Sibold C**, Meisel H, Krüger DH, et al. Recombination in Tula hantavirus evolution: analysis of genetic lineages from Slovakia. *J Virol.* 1999;73(1):667-675. doi:10.1128/JVI.73.1.667-675.1999
160. **Sinisalo M**, Vapalahti O, Ekblom-Kullberg S, Laine O, Mäkelä S, Rintala H, Vaheri A. Headache and low platelets in a patient with acute leukemia. *J Clin Virol.* 2010 Jul;48(3):159-61. doi: 10.1016/j.jcv.2010.02.015. Epub 2010 Mar 21. PMID: 20308016.
161. **Smadel JE**. Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health.* 1953;43:1327-133.

162. **Song JW**, Baek LJ, Schmaljohn CS, Yanagihara R. Thottapalayam virus, a prototype shrewborne hantavirus. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):980-985. doi:10.3201/eid1307.070031.
163. **Song JW**, Baek LJ, Song KJ, Skrok A, Markowski J, Bratosiewicz-Wasik J, Kordek R, Liberski PP, Yanagihara R. Characterization of Tula virus from common voles (*Microtus arvalis*) in Poland: evidence for geographic-specific phylogenetic clustering. *Virus Genes.* 2004 Oct;29(2):239-47. doi:10.1023/B:VIRU.0000036384.50102.cf. PMID: 15284484.
164. **Sperber HS**, Welke RW, Petazzi RA, et al. Self-association and subcellular localization of Puumala hantavirus envelope proteins. *Sci Rep.* 2019;9(1):707. Published 2019 Jan 24. doi:10.1038/s41598-018-36879-y.
165. **Spiropoulou CF**, Albariño CG, Ksiazek TG, Rollin PE. Andes and Prospect Hill hantaviruses differ in early induction of interferon although both can downregulate interferon signaling. *J Virol.* 2007;81(6):2769-2776. doi:10.1128/JVI.02402-06.
166. **Szenborn L**, Górecka J, Thalaska T. Badania występowania przeciwciał przeciwko wirusom gorączek krwotocznych: Hanta, Dobrava, Puumala u pracowników leśnych. *Przegl. Epid.* 2006, 60, supl. 2, 8 (U02).
167. **Tariq M**, Kim DM. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome: Literature Review, Epidemiology, Clinical Picture and Pathogenesis. *Infect Chemother.* 2022;54(1):1-19. doi:10.3947/ic.2021.0148
168. **Taylor SL**, Wahl-Jensen V, Copeland AM, Jahrling PB, Schmaljohn CS. Endothelial cell permeability during hantavirus infection involves factor XII-dependent increased activation of the kallikrein-kinin system. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003470. doi:10.1371/journal.ppat.1003470.
169. **Tian H**, Stenseth NC. The ecological dynamics of hantavirus diseases: From environmental variability to disease prevention largely based on data from China. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(2):e0006901. Published 2019 Feb 21. doi:10.1371/journal.pntd.0006901.
170. **Vaheri A**, Smura T, Vauhkonen H, Hepojoki J, Sironen T, Strandin T, Tietäväinen J, Outinen T, Mäkelä S, Pörsti I, Mustonen J. Puumala Hantavirus Infections Show Extensive Variation in Clinical Outcome. *Viruses.* 2023 Mar 22;15(3):805. doi:10.3390/v15030805. PMID: 36992513; PMCID: PMC10054505.

171. **Vesenjak-Hirjan** J, Hrabar A, Vince-Ribarić V, Borčić B, Brudnjak Z. An outbreak of hemorrhagic fever with a renal syndrome in the Plitvice Lakes area (preliminary report). *Folia Parasitol (Praha)*. 1971;18(3):275-9. PMID: 5163219.
172. **Voutilainen**, L.; Kallio, E.R.; Niemimaa, J.; Vapalahti, O.; Henttonen, H. Temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in cyclic populations of bank voles. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1–15.
173. **Voutilainen** L, Sironen T, Tonteri E, Back AT, Razzauti M, Karlsson M, Wahlstrom M, Niemimaa J, Henttonen H, Lundkvist A: Life-long shedding of Puumala hantavirus in wild bank voles (*Myodes glareolus*). *J. Gen. Virol.* 2015, 96, 1238–1247.
174. **Wang** L, Wang T, Cui F, et al. Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome, Zibo City, China, 2006-2014. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(2):274-276. doi:10.3201eid/2202.151516.
175. **Welsch** S, Müller B, Kräusslich HG. More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* 2007;581(11):2089-2097. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.060
176. **Witkowski** PT, Drexler JF, Kallies R, Ličková M, Bokorová S, Maganga GD, Szemes T, Leroy EM, Krüger DH, Drosten C, Klempa B.: Phylogenetic analysis of a newfound bat-borne hantavirus supports a laurasiatherian host association for ancestral mammalian hantaviruses. *Infect Genet Evol.* 2016 Jul;41:113-119. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.036.
177. **Wójcik-Fatla** A, Zajac V, Knap J P, et al. A small-scale survey of hantavirus in mammals from eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2013;20(2):283-286.
178. **Xu** Z, Wei L, Wang L, Wang H, Jiang S. The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Nov 8;298(4):552-8. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02491-9. PMID: 12408987.
179. **Yanagihara** R, Gu SH, Arai S, Kang HJ, Song JW. Hantaviruses: rediscovery and new beginnings. *Virus Res.* 2014;187:6-14. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.038
180. **Yasuda** SP, Shimizu K, Koma T, et al. Immunological Responses to Seoul Orthohantavirus in Experimentally and Naturally Infected Brown Rats (*Rattus norvegicus*). *Viruses.* 2021;13(4):665. Published 2021 Apr 12. doi:10.3390/v13040665.

181. **Yu XJ**, Tesh RB. The role of mites in the transmission and maintenance of Hantaan virus (Hantavirus: Bunyaviridae). *J Infect Dis.* 2014;210(11):1693-1699. doi:10.1093/infdis/jiu336.
182. **Zelena H**, Strakova P, Heroldova M, Mrazek J, Kastl T, Zakovska A, Ruzek D, Smetana J, Rudolf I. Molecular Epidemiology of Hantaviruses in the Czech Republic. *Emerg Infect Dis.* 2019 Nov;25(11):2133-2135. doi: 10.3201/eid2511.190449. PMID: 31625853; PMCID: PMC6810203.
183. **Zelena H**, Zvolankova V, Zuchnicka J, Liskova K, Papa A. Hantavirus infection during a stay in a mountain hut in Northern Slovakia. *J Med Virol.* 2011 Mar;83(3):496-500. doi: 10.1002/jmv.21984. PMID: 21264871.
184. **Zhang YZ**: Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus Res.* 2014 Jul 17;187:15-21. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.035.
185. **Żukiewicz-Sobczak W**, Zwoliński J, Chmielewska-Badora J, Galińska EM, Cholewa G, Krasowska E, Zagórski J, Wojtyła A, Tomasiewicz K, Kłapeć T. Prevalence of antibodies against selected zoonotic agents in forestry workers from eastern and southern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2014;21(4):767-70. doi: 10.5604/12321966.1129930. PMID: 25528917.

## Załącznik nr 1.

<b>Diagnostyka zakażeń hantawirusowych – wykaz metod laboratoryjnego rozpoznawania czynnika etiologicznego zakażeń hantawirusowych i potwierdzania jego udziału w zachorowaniach i zakażeniach u ludzi:</b>
<b>1. metody bezpośrednie-</b> wykrywające obecność hantawirusa lub jego materiału genetycznego w próbkach klinicznych, w tym:
- metody hodowlane – namnażanie wirusa na liniach komórkowych Vero E6
- metody z zastosowaniem mikroskopii elektronowej
- metody z zastosowaniem barwienia immunohistochemicznego - IHC
- metody identyfikacji molekularnej w technikach RT PCR, real time RT PCR,
<b>2. metody pośrednie</b> - określające powstawanie swoistych przeciwciał antyhantawirusowych:
- w teście immunoenzymatycznym - ELISA
- w teście immunochromatograficznym – ICT
- w HDPA - High-Density Particle Agglutination Test
- w teście immunofluorescencji pośredniej - IIFT
- w immunoblottingu - IB
- w teście neutralizacji - FRNT
- skierowanych przeciwko białku N nukleokapsydu wirusa (antygen, o wysokiej swoistości serogatkowej, najpowszechniej wykorzystywany antygen w przygotowaniu testów komercyjnych i własnych – w formie rekombinowanej lub pochodzącej bezpośrednio z wirionu wirusa)
- skierowanych przeciwko glikopeptydom G1/G2 wirusa (rzadziej wykorzystywany antygen w przygotowaniu testów komercyjnych i własnych, znajduje zastosowanie w dodatkowym różnicowaniu odpowiedzi immunologicznej na zakażenie
- jakościowo - stwierdzając obecność swoistych przeciwciał w klasie IgM, IgG, IgA
- ilościowo - podając w jednostkach poziom swoistych przeciwciał w klasie IgM, IgG, IgA
- w surowicy krwi, osoczu, w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Załącznik nr 2. SCHEMAT WYSZUKIWANIA PRZYPADKÓW HFRS / NE – dla lekarzy klinicznych i rodzinnych

Pacjent z objawami infekcji, gorączka > 38<sup>0</sup>C (średnio 5 dni),

nagły początek objawów chorobowych !



objawy grypopodobne:

dreszcze, ból głowy, ból mięśni, ból karku, ból brzucha, ból w okolicy krzyżowo-lędźwiowej, suchy kaszel, osłabienie nudności, wymioty, biegunka, anorexia

Płytki krwi < 150 000 /mm<sup>3</sup>

lub skaza krwotoczna / krwawienia



Zaburzenia widzenia - krótkowzroczność

Hipotonia < 100 mmHg

Leukocytoza

Uszkodzenie wątroby: AlAT, AspAT > normy

Ostra niewydolność nerek:

białkomocz, krwinkomocz, zaburzenia wodno-elektrolitowe,

kreatynina > normy

wstrząs I, zgony



przeciek naczyń włosowatych / capillary leakage

skapomocz / anuria / leczenie nerkozastępcze



wstrząs II, zgony

wielomocz / spontaniczny



faza zdrowienia

**Późne powikłania:**

hipertonia

nawracające białko- i krwio- mocze

niedoczynność przysadki mózgowej

immunopatologie

**W wywiadzie:**

kontakt z dzikimi gryzoniami lub ich odchodami !!!

w obejściu domostwa, kontakt w miejscu pracy,

kontakt podczas rekreacji

*Schemat sporządziła: Anna Nowakowska*

*WSSE w Rzeszowie*

Schemat wyszukiwania przypadków HFRS / NE dla lekarzy klinicznych i rodzinnych.

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie, wrzesień 2007r.

Załącznik nr 3.



**BADANIE ANKIETOWE  
PRZYPADKÓW ZAKAŻEŃ HANTAWIRUSOWYCH  
(HVD Hantavirus disease)**

**- prosimy do każdego dodatniego wyniku stwierdzającego HVD wypełnić ankietę epidemiologiczną i odesłanie na adres laboratorium:**

Laboratorium Diagnostyki Medycznej  
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Rzeszowie  
ul. Wierzbowa 16  
35-959 Rzeszów  
Tel.: 17 85 22 111 wew. 316 lub 328

**WAŻNE !!**

**– wskazane jest wykonanie badań serologicznych oceniających status odpowiedzi immunologicznej ozdrowieńca!**  
**- wykonujemy badania kontrolne - po zachorowaniu w fazie rekonwalescencji tj. pobranych w okresie od 9 do 10 miesiąca licząc od wystąpienia pierwszych objawów zachorowania**

Ankietę opracowała: Anna Nowakowska

**ZAKAŻENIA HANTAWIRUSOWE**  
**Haemorrhagic Fever with Renal Syndrome - HFRS**  
**Nephropathia epidemica - NE**

**Notatka epidemiologiczna**

Przypadek aktualnie opisywany     Przypadek opisywany retrospektywnie

**Dane zgłoszenia**

Data zgłoszenia do stacji sanitarno-epidemiologicznej    (dd/mm/rrrr)

...../...../.....

Instytucja zgłaszająca (szpital, przychodnia itp.)    .....

Lokalizacja instytucji zgłaszającej (miasto, woj.)    .....

**Dane socjodemograficzne**

Nazwisko i imię    .....

Płeć    M / K / BD

Data urodzenia    (dd/mm/rrrr) ...../...../.....lub wiek    .....

Kraj zamieszkania    .....

Narodowość    .....

Wykonywany zawód/zajęcie .....

Miejsce zamieszkania .....

Powiat.....gmina.....

Odległość w (m) od lasu .....

Odległość w (m) od pól .....

Kontakt z gryzoniami (podać jakimi.....

(określenie terminu).....

Wykonywanie prac sezonowych w ogrodzie\* / polu\*(określenie terminu) .....

Porządkowanie piwnic\* / spichlerzy\* (określenie terminu).....

Wykonywanie sianokosów (określenie terminu) .....

Zbieranie runa leśnego (określenie terminu) .....

Wędkowanie\* / biwakowanie\* (określenie terminu) .....



poziom płytek krwi: .....

Powiększenie węzłów chłonnych T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../.....

Hipotonia < 100 mmHg T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../..... mmHg .....

Objawy ze strony układu krążenia / niewydolność krążeniowa  
T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....  
*rodzaj objawów*.....

Objawy ze strony układu oddechowego

Kaszel T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

Trudności w oddychaniu T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../.....

Objawy zespołu niewydolności oddechowej T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../..... *rodzaj*  
*objawów*.....

obrzęk płuc T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

płyn w opłucnej T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

inne .....

Wstrząs T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

Uszkodzenie wątroby T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../..... .....

Żółtaczka T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

Niewydolność wątrobowa T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....

Niewydolność nerek T / N / BD (dd/mm/rrrr)  
od...../...../.....do...../...../.....

białkomocz T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

poziom białka .....

krwinkomocz T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

zaburzenia wodno-elektrolitowe T / N / BD (dd/mm/rrrr) od.... /...../....  
do.../...../.....

skąpomocz T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

diureza w ml .....

wielomocz T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

diureza w ml ..... poziom kreatyniny .....

Czy pacjent był poddawany hemodializie T / N / BD  
w okresie (dd/mm/rrrr) od...../...../..... do...../...../.....

inne parametry niewydolności nerek .....

Hipertonia T / N / BD (dd/mm/rrrr)

od...../...../.....do...../...../..... mmHg .....

Inne objawy .....

T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

### **Badania diagnostyczne**

Czy wykonano USG / RTG / EEG / inne badania T / N / BD

Wyniki badań.....

### **Zastosowane leki antywirusowe:**

Rybawiryna T / N / BD (dd/mm/rrrr) od...../...../.....do...../...../.....

Inne..... T / N / BD (dd/mm/rrrr)

od...../...../.....do...../...../.....

### **Historia hospitalizacji**

1. Czy pacjent został przyjęty przez lekarza I kontaktu T / N /  
BD

nazwa przychodni .....

data zgłoszenia do lekarza (dd/mm/rrrr) ...../...../.....

data zgłoszenia do lekarza (dd/mm/rrrr) ...../...../.....

z symptomami zakażenia hantawirusowego? T / N / BD

jakimi.....

podjęte działanie:.....

2. Czy pacjent został przyjęty do szpitala T / N / BD

nazwa szpitala ..... .. data przyjęcia do szpitala

(dd/mm/rrrr) ...../...../.....na oddział.....

na oddział .....

na oddział .....

z symptomami zakażenia hantawirusowego? T / N / BD

jakimi.....

3. Czy pacjent był przewieziony do innego szpitala T / N / BD

nazwa szpitala .....data przyjęcia do szpitala

(dd/mm/rrrr) ...../...../.....na oddział.....

z symptomami zakażenia hantawirusowego?

T / N / BD

jakimi.....

### Ostateczny stan

- wyzdrowienie, jeśli był hospitalizowany data wypisu ze szpitala ...../...../.....

- opuścił kraj podczas choroby data wyjazdu ...../...../.....

- nieznanym data utraty kontaktu z chorym ...../...../.....

- zgon data śmierci...../...../.....

### Historia narażenia

Czy pacjent w okresie 2 miesięcy poprzedzających wystąpienie choroby podróżował za granicę kraju T / N / BD

Jeśli tak, to które to były obszary?

1. \_\_\_\_\_ data przybycia) ...../...../.....data wyjazdu ...../...../.....

2. \_\_\_\_\_ data przybycia) ...../...../.....data wyjazdu ...../...../.....

3. \_\_\_\_\_ data przybycia) ...../...../.....data wyjazdu ...../...../.....

Czym się pacjent zajmował w czasie pobytu na ww. obszarach: .....

### Wyszukiwanie osób ze styczności z rezerwuarem zakażenia

Czy ustalono jakie osoby z otoczenia chorego mogły być narażone na zakażenie hantawirusowe T / N / BD

Lp.	Imię i nazwisko	Rodzaj pokrewieństwa	Rodzaj narażenia	Czy był obecny kontakt z gryzoniami
1.				
2.				
3.				

Czy ustalono jakie osoby z otoczenia chorego miały objawy zakażenia hantawirusowego w przeszłości: T / N / BD

1. imię i nazwisko

data zachorowania:

placówka zajmująca się leczeniem chorego -

dane:.....

**ZAKAŻENIE HANTAWIRUSOWE****– NOTATKA EPIDEMIOLOGICZNA PRZYPADKU**

*Proszę wypełniać  - wpisując w okienku T lub N (oznacza: tak-nie)*

<b>Dane</b> Inicjały .../kod próbki .....	<b>Ocena narażenia w pracy zawodowej</b>
<i>Lub Nazwisko i imię</i> ..... Wiek .....	<i>Charakter stanowiska pracy – wymienić miejsce narażenia i rodzaj narażenia</i> <input type="checkbox"/> :.....
Miejsce zamieszkania (miejscowość/powiat) .....	Ciągłe <input type="checkbox"/> - od kiedy? .....
Miejsce narażenia (miejscowość/powiat) .....	Sporadyczne <input type="checkbox"/> w okresie .....
<b>WYRAŻAM ZGODĘ na opracowanie epidemiologiczne oraz przetwarzanie danych osobowych przez WSSE w Rzeszowie w ramach prowadzonego monitoringu zachorowań odzwierzęcych</b>	<i>Charakter narażenia:</i> - bezpośredni kontakt ze zwierzętami <input type="checkbox"/>
	<input type="checkbox"/> z jakimi? .....
	- kontakt z wydaliniami <input type="checkbox"/> , wydzielinami <input type="checkbox"/> , krwią <input type="checkbox"/> , moczem <input type="checkbox"/> , in. z .....
	- czy wystąpiło zainhalowanie kurzu w miejscu kontaktu ze zwierzętami <input type="checkbox"/> – opisać sytuację:.....
TAK / NIE Data / poświadczenia zgody.....	- kontakt w środowisku naturalnym: gdzie i kiedy?.....
<i>W podawanych informacjach uwzględnić sytuacje, w których człowiek zakaża się hantawirusami od ich przenosicieli - gryzoni, owadożernych oraz innych drobnych ssaków.</i>	charakter czynności narażającej.....
	<i>Czy w związku z pracą zawodową wystąpiło zachorowanie o nieustalonej etiologii (przyczynach):</i> <input type="checkbox"/> - kiedy? .....
	<input type="checkbox"/> z nawrotami dolegliwości .....

<p><b><u>Ocena narażenia w środowisku życia i spędzania wolnego czasu</u></b></p> <p><i>Czy w domostwie lub jego obejściu był kontakt z ww. zwierzętami lub ich odchodami <input type="checkbox"/> jakimi?.....kiedy? .....</i></p> <p><i>Formy wypoczynku/prac domowych, które mogły narazić na kontakt z ww. zwierzętami lub ich odchodami: gdzie/kiedy?..... / .....</i></p> <p>charakter czynności narażającej.....</p>	
<p>biwakowanie <input type="checkbox"/>, remontowanie starych drewnianych budynków <input type="checkbox"/>,</p> <p>wędkowanie <input type="checkbox"/>, przebywanie w lesie <input type="checkbox"/>, porządkowanie drewnianych domów <input type="checkbox"/>, piwnic <input type="checkbox"/>, przebywanie w domkach letniskowych <input type="checkbox"/>, prace w ogrodzie <input type="checkbox"/>, wykonywanie prac melioracyjnych lub kontakt z wodą w rowach <input type="checkbox"/>, inne podobne <input type="checkbox"/>,</p> <p>zamieszkiwanie w odległości od pól <input type="checkbox"/> - ile?.....</p> <p>od lasu <input type="checkbox"/> - ile?..... metrów,</p> <p>- pobyt w innych krajach z opisanym ogniskiem zachorowań hantawirusowych <input type="checkbox"/></p> <p>gdzie?.....kiedy? .....</p> <p>- czy narażony chorował ciężko na grypę <input type="checkbox"/> kiedy? .....</p>	<p><b><u>Inne informacje</u></b></p> <p>- status immunologiczny: zdrowy <input type="checkbox"/> stwierdzony niedobór odporności <input type="checkbox"/> (jaki) .....</p> <p>- wcześniejsze stwierdzenie obecności przeciwciał anty <i>Hantavirus</i> IgM - <input type="checkbox"/>, IgG - <input type="checkbox"/> kiedy? .....</p> <p>- wcześniejsze stwierdzenie obecności przeciwciał anty <i>Leptospira</i> IgM - <input type="checkbox"/>, IgG - <input type="checkbox"/> kiedy? .....</p> <p>- rozpoznanie innych chorób odzwierzęcych (zoonoz) IgM - <input type="checkbox"/>, IgG - <input type="checkbox"/> jakie? ..... kiedy? .....</p>

<b>Opis przypadku HVD</b> Inicjały ...../kod próbki .....		
lub Nazwisko i imię .....		
<b>Czy występowały objawy? T/N</b>	<b>DATA początku objawów: .....</b>	<b>– określić w jakim okresie czasowym?:</b>
- grypopodobne z nagłym początkiem <input type="checkbox"/>		.....
- temperatura ..... <sup>0</sup> C		.....
- ból głowy <input type="checkbox"/> , mięśni <input type="checkbox"/> , stawów <input type="checkbox"/> , pleców okolicy lędźwiowo-krzyżowej <input type="checkbox"/>		.....
- ból brzucha <input type="checkbox"/> , żołądka <input type="checkbox"/> , zaczerwienienie / ból gardła <input type="checkbox"/> ,		.....
- nudności <input type="checkbox"/> , wymioty <input type="checkbox"/> , biegunka <input type="checkbox"/>		.....
- osłabienie <input type="checkbox"/> , dreszcze <input type="checkbox"/> kaszel <input type="checkbox"/>		.....
- zaburzenia widzenia <input type="checkbox"/> , przejściowa krótkowzroczność <input type="checkbox"/> ,		.....
- spadek ilości płytek krwi – <b>trombocytopenia/ poziom</b> ..... tys./ $\mu$ L <input type="checkbox"/>		.....
- wysypka na skórze <input type="checkbox"/> , zaczerwienienie spojówek <input type="checkbox"/> , rumień na twarzy <input type="checkbox"/>		.....
- krwinkomocz <input type="checkbox"/> , skaza krwotoczna <input type="checkbox"/> - hospitalizacja z tego powodu <input type="checkbox"/>		.....
- spadek ciśnienia w trakcie zachorowania – hipotonia poniżej 100mmHg <input type="checkbox"/>		.....
- obrzęki obwodowe kończyn <input type="checkbox"/> , powiększenie narządów wewnętrznych <input type="checkbox"/>		.....
- płyn w opłucnej <input type="checkbox"/> , inne infiltraty <input type="checkbox"/> - gdzie? .....		.....
- <b>białkomocz</b> <input type="checkbox"/> / <b>poziom</b> ..... jednoraz. <input type="checkbox"/> , nawracający <input type="checkbox"/> , z.nerczycowy <input type="checkbox"/>		.....
- $\uparrow$ <b>kreatynina</b> <input type="checkbox"/> / <b>poziom</b> ..... zaburz. wodno-elektrolit. <input type="checkbox"/> ,		.....
- <b>skąpomocz</b> <input type="checkbox"/> - <b>poziom</b> w mL..... wielomocz <input type="checkbox"/> - <b>poziom</b> w mL.....		.....

- ostra niewydolność nerkowa <input type="checkbox"/> , przewlekła niewydolność nerkowa <input type="checkbox"/>	..... .....
- hemodializa <input type="checkbox"/> , prowadzona terapia nerkozastępcza <input type="checkbox"/> stała <input type="checkbox"/>	.....
- nadciśnienie tętnicze <input type="checkbox"/> , przewlekła hipertonia <input type="checkbox"/>	.....
- uszkodzenie wątroby <input type="checkbox"/> - hospitalizacja z tego powodu <input type="checkbox"/> , ↑AlAT <input type="checkbox"/> /poziom....., ↑AspAT	.....
<input type="checkbox"/> /poziom....., żółtaczka <input type="checkbox"/>	.....
- niewydolność oddechowa <input type="checkbox"/> - jaka? .....hospitalizacja z tego powodu <input type="checkbox"/>	.....
- zaburzenia neurologiczne <input type="checkbox"/> - jakie?.....hospitalizacja z tego powodu <input type="checkbox"/>	.....
- wstrząs <input type="checkbox"/> - związany z jakim rozpoznanem.....	.....
- istotne zmiany w bad. USG/RTG/EEG <input type="checkbox"/> - dotyczy .....	.....
- leki p-wirusowe np. rybawiryne? <input type="checkbox"/>	.....
- rozpoznanie zachorow.: lekarz I kontaktu <input type="checkbox"/> .....	.....
- <b>okres hospitalizacji</b> na oddz. zakaź <input type="checkbox"/> , wew. <input type="checkbox"/> , nefr. <input type="checkbox"/> , in. .....	.....
- <b>przebieg zachorowania:</b> lekki <input type="checkbox"/> , średnio-ciężki <input type="checkbox"/> , ciężki <input type="checkbox"/>	.....
- czy było szczepienie p-hantawirusowe <input type="checkbox"/> kiedy? .....	

Zbieranie i przetwarzanie powyższych informacji zgodnie z ustawą z dnia 29 sierpnia 1997r. o ochronie danych osobowych Dz.U.1997.133.883 z póź. zm.

### *Podziękowania*

*Pragnę wyrazić szczególną wdzięczność, mojemu promotorowi prof. hab. dr n. med. Józefowi Knapowi za szczere obdarowanie mnie tematem tej rozprawy naukowej, czuję się całym sercem oddana przekazanej przez niego myśli, na czym polega dobro pracy naukowej w rozwiązywaniu problemów zdrowia ludzi.*

*Podziękowania składam także koleżankom z WSSE w Rzeszowie i Laboratorium Diagnostyki Medycznej za wszelakie wsparcie.*