

Ocena narażenia populacji wiejskiej Lubelszczyzny na zakażenie krętkami z rodzaju *Leptospira*, ze szczególnym uwzględnieniem terenów popowodziowych

Jacek Dutkiewicz¹, Angelina Wójcik-Fatla¹, Violetta Zając¹, Bernard Wasiński², Piotr Józef Knap³, Jacek Sroka^{1,4}, Ewa Cisak¹, Anna Sawczyn¹

¹ Zakład Chorób Odrzwierzęcych, Instytut Medycyny Wsi w Lublinie

² Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

³ Katedra i Zakład Epidemiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

⁴ Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

Dutkiewicz J, Wójcik-Fatla A, Zając V, Wasiński B, Knap PJ, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A. Ocena narażenia populacji wiejskiej Lubelszczyzny na zakażenie krętkami z rodzaju *Leptospira*, ze szczególnym uwzględnieniem terenów popowodziowych. Med Og Nauk Zdr. 2015; 21(1): 65–70. doi: 10.5604/20834543.1142362

Streszczenie

Wprowadzenie. Leptospiroza, wywoływana przez krętki z rodzaju *Leptospira*, jest uważana za najbardziej rozprzestrzenioną chorobę odzwierzęcą na świecie. Zapadalność może być zwiększona przez klęski żywiołowe takie jak powodzie i tajfuny.

Cel pracy. Celem pracy było zbadanie sytuacji epidemiologicznej leptospirozy na Lubelszczyźnie (wschodnia Polska), z uwzględnieniem wpływu powodzi Wisły, poprzez badania populacji ludzkiej i różnych elementów środowiska na obecność *Leptospira* w dwóch rejonach: rejonie „A” nawiedzonym przez powodzie i rejonie „B” nienawiedzonym przez powodzie.

Materiał i metody. W rejonach „A” i „B” przebadano surowice, odpowiednio 100 i 98 mieszkanców, surowice 32 i 41 świń oraz surowice 41 i 40 krów – na obecność przeciwciał anti-*Leptospira*, wykorzystując test aglutynacji mikroskopowej (MAT). We wskazanych rejonach przebadano również, odpowiednio 40 i 64 próbki wody, 40 i 68 próbek gleby, próbki organów 30 i 30 drobnych ssaków należących do 5 i 6 gatunków, a także 540 i 296 kleszczy *Ixodes ricinus* – na obecność DNA *Leptospira*; badanie przeprowadzono testem *nested-PCR*.

Wyniki. Obecność przeciwciał anti-*Leptospira* stwierdzono u 3% mieszkanców rejonu „A” i u 9,2% mieszkanców rejonu „B”; różnica ta nie była statystycznie znamienne. Częstość występowania przeciwciał anti-*Leptospira* była większa u świń i krów z rejonu „A” w porównaniu z rejonem „B” (odpowiednio 34,4% wobec 4,9%, i 26,8% wobec 15,0%), a w przypadku świń różnica okazała się znamienne ($P=0,0015$). Także miana dodatnich reakcji były wyższe w rejonie „A” w porównaniu z „B”, a w przypadku krów różnica okazała się znamienne ($P=0,0128$). Obecność DNA *Leptospira* spp. stwierdzono u 20% drobnych ssaków z rejonu „A” i u 30% z rejonu „B”; różnica ta nie była znamienne, chociaż częstość dodatnich wyników była w obu przypadkach wysoka w porównaniu z danymi z piśmiennictwa. Przeważającą część wyników dodatnich uzyskano u myszy polnych (*Apodemus agrarius*). Obecność DNA *Leptospira* spp. wykryto u 15,6% kleszczy *I. ricinus* z rejonu „A” w porównaniu z 1,4% w rejonie „B”, a różnica ta okazała się wysoce znamienne ($P<0,0001$). DNA *Leptospira* spp. zawierało 5% próbek wody z rejonu „A”, podczas gdy wszystkie próbki wody z rejonu „B” oraz wszystkie próbki gleby z rejonów „A” i „B” były ujemne.

Wnioski. • Zakażenia krętkami *Leptospira* występujące u ludności wiejskiej zamieszkującej tereny Lubelszczyzny nawiedzone przez powodzie Wisły nie są częstsze w porównaniu z ludnością zamieszkującą inne części regionu nienawiedzone przez powodzie. • Potencjalnym źródłem zakażeń leptospirami na terenach nawiedzanych przez powodzie są zwierzęta: kleszcze *Ixodes ricinus*, zwierzęta hodowlane (świnie, krowy) i myszy polne (*Apodemus agrarius*). • Wykrycie DNA *Leptospira* spp. w 5% próbek wody z terenów popowodziowych, przy braku pozytywnych wyników z terenu kontrolnego, wydaje się potwierdzać możliwą rolę wody w szerzeniu leptospirozy. • Gleba nie stanowi istotnego zagrożenia na terenach nawiedzanych przez powodzie.

Słowa kluczowe

Leptospira, leptospiroza, Lubelszczyzna, powodzie, epidemiologia, populacja wiejska, świnie, krowy, drobne ssaki, kleszcze, woda, gleba

WSTĘP

Krętki z rodzaju *Leptospira* występują licznie na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Antarktydy [1]. Według najnowszych ustaleń systematycznych, w obrębie tego rodzaju

wyróżnia się 20 gatunków (w tym 13 patogennych) obejmujących ponad 300 serowarów pogrupowanych w ponad 20 serogrupach [1, 2]. Bakterie te występują u ponad 160 gatunków ssaków na świecie, zarówno u domowych (najczęściej u bydła, świń i psów), jak i u dzikich (najczęściej u gryzoni). Krętki rozwijają się u zwierząt w kanalikach krętych nerek, a do zakażenia człowieka dochodzi najczęściej przez kontakt uszkodzonej (a nawet nieuszkodzonej) skóry lub błon śluzowych z wodą, glebą i ściekami zanieczyszczonymi moczem gryzoni.

Adres do korespondencji: Jacek Dutkiewicz, Zakład Chorób Odrzwierzęcych, Instytut Medycyny Wsi, Lublin, ul. Jaczewskiego 2, Poland
E-mail: dutkiewicz.jacek@imw.lublin.pl

Nadesłano: 02 grudnia 2014 roku; Zaakceptowano do druku: 23 grudnia 2014 roku

Patogenne gatunki *Leptospira* wywołują wielopostaciową i wielonarządową chorobę zwaną leptospirozą, która u zwierząt hodowlanych może powodować znaczne straty ekonomiczne, a u ludzi uznawana jest za najbardziej rozprzestrzenioną chorobę odzwierzęcą w skali globu [3, 4, 5]. Ma ona różny przebieg: od formy bezobjawowej poprzez łagodną, grypopodobną formę gorączkową do ciężkiej choroby narządowej powodującej niewydolność i uszkodzenia nerek, wątroby, płuc i innych narządów. Postać kliniczna choroby zależy w dużym stopniu od wywołującego ją serowaru. Do najbardziej znanych jednostek klinicznych leptospirozy należą: choroba Weila (postać żółtaczkowa o ciężkim przebiegu) wywołwana przez *Leptospira interrogans* serowar Icterohaemorrhagiae oraz gorączka błotna (postać najczęściej grypopodobna) wywołwana przez *Leptospira kirschneri* serowar Grippotyphosa. Ocenia się, że na świecie występuje rocznie około pół miliona ciężkich zachorowań, głównie w krajach rozwijających się, a odsetek śmiertelności wynosi 5–20% [6]. Zapadalność w krajach tropikalnych i subtropikalnych oceniana jest na 10–100 przypadków na 100 tysięcy osób, w krajach strefy umiarkowanej na 0,01–1/100 tys. [2, 7]. W Polsce zanotowano w latach 2009–2012 tylko 16 przypadków leptospirozy (zapadalność 0,01/100 tys.) [7], w roku 2013 nie stwierdzono żadnego przypadku, a w roku 2014 zanotowano 25 przypadków (zapadalność 0,06/100 tys.) [8].

W opinii autorów zajmujących się sytuacją epidemiologiczną leptospirozy w skali świata, choroba ta stanowi problem narastający (określany jako „*emerging*” lub „*re-emerging*”), na co składa się szereg przyczyn, m. in. zmiany klimatyczne powodujące powodzie, tajfuny i inne klęski żywiołowe, częstsze kontakty ze zwierzętami, wzrost liczby osób podróżujących, a także rozwój sportów wodnych i innych form rekreacji związanych z kontaktem z przyrodą [3, 4, 5, 6, 9, 10]. W dalszym ciągu w epidemiologii leptospirozy istotne znaczenie ma wykonywany zawód. Na zakażenie narażeni są głównie rolnicy – zwłaszcza ci zbierający owoce niskopiennie, hodowcy zwierząt, pracownicy przemysłu mięsnego, lekarze weterynarii, pracownicy melioracji i kanalizacji. Chociaż narastający problem leptospirozy dotyczy przede wszystkim krajów rozwijających się, ma on również znaczenie dla krajów europejskich, mimo aktualnie znacznie niższej zapadalności w porównaniu z XX wiekiem.

Związek pomiędzy obfitymi opadami i powodzią a wzrostem liczby przypadków leptospirozy opisywany był od dawna, m. in. już w latach 80. XIX wieku w dorzeczu Odry [11, 12] i znalazł potwierdzenie również we współczesnych publikacjach, m. in. z terenu USA, Brazylii, Czech, Indii, Filipin, Laosu, Tajlandii [13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23]. Powódzie są dziś powszechnie uznanym czynnikiem ryzyka zachorowań na leptospirozę [24, 25]. Według Zitka i Benesa [17] katastrofalne powódzie z lat 1997 i 2002 spowodowały trzykrotny wzrost zachorowań na leptospirozę na terenie Czech. Według Kupka i wsp. [15] zwiększenie maksymalnych opadów w brazylijskim mieście Florianópolis o 1 mm powodowało w następnym miesiącu wzrost liczby przypadków leptospirozy o 0,55%. Podobną korelację pomiędzy sumą opadów a liczbą przypadków leptospirozy stwierdzono ostatnio w Rio de Janeiro [26]. W Polsce, w następstwie wielkiej (> 2% powierzchni kraju) powodzi z 1997 roku zarejestrowano wzrost zachorowań na leptospirozę ludzi na terenie województw dotkniętych powodzią (21 chorych, w tym 12 przypadków na terenie województw dotkniętych powodzią) [27].

CEL PRACY

W sytuacji cyklicznie powtarzających się w Polsce powodzi wzrasta groźba zakażenia ludzi i zwierząt krętkami *Leptospira*, co sprawiło, że zdecydowaliśmy się podjąć określone w tytule niniejszej pracy badania w celu określenia skali tego problemu i zaproponowania odpowiednich działań profilaktycznych. Podjęcie tego tematu uzasadnione było również brakiem nowych badań na temat występowania leptospirozy na terenie Polski; większość takich badań wykonano na terenie jej obszarów epidemicznych (Dolny Śląsk, okolice Tomaszowa Lubelskiego) kilkadziesiąt lat temu [11, 12, 28, 29, 30]. Obecnie uważa się, że rozpoznawanie leptospirozy w naszym kraju znacznie się pogorszyło, a rejestrowane dane są wysoce niedoszacowane i nie odzwierciedlają faktycznej liczby zachorowań na tą chorobę [7, 31, 32].

Celem obecnego projektu, sfinansowanego przez Narodowe Centrum Nauki jako grant nr N N404 265840, była ocena narażenia populacji wiejskiej zamieszkującej tereny Lubelszczyzny na zakażenie krętkami z rodzaju *Leptospira*, przy uwzględnieniu możliwego wpływu powodzi. Cel ten został osiągnięty poprzez wykonanie serii badań na obecność krętków *Leptospira* na obszarze dwóch rejonów: • rejonu „A” nawiedzanego przez powódzie, • oraz rejonu „B” nienawiedzanego przez powódzie, który spełniał rolę kontroli. W obu tych rejonach przeprowadzono:

- badania serologiczne na obecność przeciwciał anti-*Leptospira*: • ludności wiejskiej, • zwierząt hodowlanych (trzody chlewnej i bydła);
- badania molekularne na obecność krętków *Leptospira* różnych elementów środowiska: • drobnych ssaków (gryzoni i owadożernych), • kleszczy, • wody, • gleby.

MATERIAŁ I METODY

Dokładny opis terenu badań i zastosowanych metod znajduje się w pięciu publikacjach, w których przedstawiono szczegółowo uzyskane wyniki [33, 34, 35, 36, 37]. Poniżej przedstawiono skróconą wersję opisu metodyki, wyników, dyskusji i wniosków.

Teren badań. Badania przeprowadzono na terenie dwóch rejonów położonych na terenie województwa lubelskiego. Rejon „A” znajduje się w północno-zachodniej części województwa nad brzegiem Wisły i jest często narażony na zalewanie wodami tej rzeki, a w roku 2010 doświadczył dwóch wielkich powodzi. Rejon „B” (kontrolny) położony jest w centralnej części województwa i nie jest narażony na powódzie.

Badania serologiczne ludzi. Surowice 100 mieszkańców rejonu „A” i 98 mieszkańców rejonu „B” przebadano testem aglutynacji mikroskopowej (MAT) z antygenami przygotowanymi z 18 serowarów *Leptospira*: 10 serowarów gatunku *Leptospira interrogans*, 4 serowarów gatunku *L. borgpetersenii*, 2 serowarów gatunku *L. kirschneri*, 1 gatunku *L. weili*, i 1 gatunku *L. biflexa*. Jako dodatnie uznawano reakcje w mianie ≥ 100 [33].

Badania serologiczne zwierząt. Surowice 32 świń i 41 krów hodowanych na terenie gminy „A” oraz surowice 41 świń i 40 krów hodowanych na terenie gminy „B” przebadano

testem aglutynacji mikroskopowej (MAT) z antygenami przygotowanymi z 18 serowarów *Leptospira*, jak wyżej. Jako dodatnie uznawano reakcje w mianie ≥ 100 [34].

Badania drobnych ssaków (gryzoni i owadożernych). Ogółem na terenie rejonu „A” zebrano 30 zwierząt należących do 5 gatunków, a na terenie rejonu „B” – 30 zwierząt należących do 6 gatunków. Od każdego zwierzęcia pobierano pośmiertnie próbki nerek i wątroby, z których ekstrahowano bakteryjne DNA za pomocą zestawu Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA). Obecność DNA *Leptospira* spp. wykrywano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (*nested PCR*) [35].

Badania kleszczy. Metodą flagowania zebrano z roślinności w lasach na terenie rejonu „A” 540 okazów kleszczy *Ixodes ricinus*, a w lasach na terenie rejonu „B” – 296 okazów kleszczy z tego gatunku. Bakteryjne DNA ekstrahowano poprzez gotowanie w 0,7 M roztworze amoniaku. Obecność DNA *Leptospira* spp. wykrywano metodą *nested PCR*. W celu wykluczenia ewentualnych fałszywie dodatnich (krzyżowych) reakcji z gatunkiem *Borrelia burgdorferi* (również należącym do krętków), przebadano ekstrakty wszystkich kleszczy również na obecność DNA tego patogenu [36].

Badania wody. Ogółem przebadano 104 próbki wody pobrane z naturalnych i sztucznych cieków i zbiorników wodnych (rzeki, strumienie, naturalne i sztuczne jeziora, stawy, kanały, studnie), z czego 40 próbek pochodziło z rejonu „A” i 64 próbki z rejonu „B”. Bakteryjne DNA ekstrahowano za pomocą zestawu Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, USA) z osadu otrzymanego na drodze filtracji i wirowania. Obecność DNA *Leptospira* spp. wykrywano metodą *semi-nested PCR* [37].

Badania gleby. Ogółem przebadano 108 próbek gleby pobranych w bliskiej odległości (1–3 m) od badanych zbiorników wodnych, z czego 40 próbek pochodziło z rejonu „A” i 68 próbek z rejonu „B”. Bakteryjne DNA ekstrahowano za pomocą zestawu DNA Stool Mini Kit (Qiagen, USA). Obecność DNA *Leptospira* spp. wykrywano metodą *semi-nested PCR*, jak wyżej [37].

WYNIKI

Uzyskane wyniki przedstawiono zwięźle w tekście poniżej i sumarycznie zestawiono w tabeli 1.

Pełny opis wyników znajduje się w opublikowanych wcześniej artykułach [33, 34, 35, 36, 37]. Przeprowadzone przez nas badania interdyscyplinarne są niejako odległym echem wielokierunkowych – i prowadzonych na szeroką skalę – poszukiwań leptospirozy (i innych zoonoz) wykonanych na Lubelszczyźnie przez IMW i opublikowanych przed 55 laty (28).

Obecność przeciwciał anti-*Leptospira* w populacji wiejskiej. W populacji z rejonu „A” stwierdzono obecność przeciwciał anti-*Leptospira* (reagujących z przynajmniej jednym serowarem) u 3% badanych osób, natomiast w populacji z rejonu „B” przeciwciała stwierdzono u 9,2% badanych osób. Różnica odsetków pomiędzy rejonami okazała się statystycznie nieznamienista (tab. 1). Osoby zamieszkałe w rejonie „A” reagowały z antygenami 4 serowarów, natomiast osoby zamieszkałe w rejonie „B” – z antygenami 8 serowarów [33].

Obecność przeciwciał anti-*Leptospira* u zwierząt hodowlanych. U świń hodowanych w rejonie „A” stwierdzono znamienne wyższy odsetek dodatnich reakcji serologicznych z antygenami *Leptospira* (co najmniej z jednym serowarem) w porównaniu ze świniami hodowanymi w rejonie „B” (34,4% wobec 4,9%). Świnie z rejonu „A” reagowały z antygenami 10 serowarów w mianach do 25600, natomiast świnie z rejonu „B” – z antygenami 2 serowarów w mianach do 200. Różnica w wysokości mian okazała się jednak nieznamienista (tab. 1).

Krowy hodowane w rejonie „A” reagowały także częściej z antygenami *Leptospira* w porównaniu z krowami hodowanymi w rejonie „B” (26,8% wobec 15,0%), ale różnica ta okazała się statystycznie nieznamienista. Krowy z rejonu „A” reagowały z antygenami 8 serowarów w mianach do 6400, natomiast krowy z rejonu „B” – z antygenami 6 serowarów w mianach do 100. Wysokość mian okazała się znamienne wyższa w grupie „A” (tab. 1).

Przy łącznym porównaniu wysokości mian zarejestrowanych u badanych świń i krów, różnica pomiędzy rejonami „A” i „B” okazała się wysoce znamienista ($P=0,0094$) [34].

Obecność krętków *Leptospira* w drobnych ssakach. Obecność DNA *Leptospira* spp. stwierdzono u 20% drobnych ssaków z rejonu „A” i u 30% drobnych ssaków z rejonu „B”. Różnica między tymi odsetkami nie była znamienista statystycznie (tab. 1). Odsetek zwierząt, u których stwierdzono obecność *Leptospira* spp. w obu badanych organach (nerkach i wątrobie) był wyższy w rejonie „A” w porównaniu z rejonem „B” (16,7% wobec 6,7%), ale również i ta różnica nie była znamienista statystycznie. Spośród 5 gatunków drobnych ssaków zbadanych w rejonie „A”, obecność *Leptospira* spp. stwierdzono tylko u myszy polnej (*Apodemus agrarius*), która była gatunkiem zdecydowanie przeważającym w obu rejonach. W rejonie „B”, w którym większość dodatnich wyników dotyczyła również myszy polnej, stwierdzono również w jednym przypadku obecność *Leptospira* spp. u nornika zwyczajnego (*Microtus arvalis*) [35].

Obecność krętków *Leptospira* w kleszczach *Ixodes ricinus*. Kleszcze z rejonu „A” były zakażone krętkami *Leptospira* spp. w znacznie wyższym odsetku niż kleszcze w rejonie „B” (15,6% wobec 1,4%), a różnica ta okazała się wysoce znamienista statystycznie (tab. 1). W obu rejonach, przewalencja *Leptospira* spp. w nimfach *I. ricinus* (16,9%) była znamienne większa niż w samcach (7,1%) i samicach (7,9%) ($P<0.01$). Nie stwierdzono znamiennej korelacji pomiędzy zakażeniem kleszczy krętkami *Borrelia burgdorferi* i krętkami *Leptospira* spp. ($\chi^2=0.05$, $P=0,8195$), co świadczy o tym, że obecność *B. burgdorferi* nie wpływa nieswoiście na wynik testu wykrywającego *Leptospira* spp. [36].

Obecność krętków *Leptospira* w wodzie. Obecność DNA *Leptospira* spp. stwierdzono w dwóch próbach wody pobranych ze studni na terenie rejonu „A”. Uzyskany odsetek dodatnich prób w tym rejonie (5,0%) był nieznamienne wyższy w porównaniu z rejonem „B”, w którym wszystkie próby okazały się ujemne (tab. 1) [37].

Obecność krętków *Leptospira* w glebie. W żadnej z badanych próbek gleby z rejonów „A” i „B” nie stwierdzono obecności DNA *Leptospira* spp. (tab. 1) [37].

Tabela 1. Porównanie wyników badań na obecność *Leptospira* spp. w rejonach „A” i „B”

Przedmiot badania	Obliczony wskaźnik	Rejon „A” nawiedzany przez powodzie	Rejon „B” niewiedzany przez powodzie	Znamiennosc różnicy między rejonami „A” i „B”
Obecność przeciwciał anti- <i>Leptospira</i> u ludności wiejskiej	Odsetek reakcji dodatnich	3,0%	9,2%	Nieznamienność: P=0,0764
	Miano reakcji dodatnich	100–800	100–400	Nieznamienność: P>0,05
Obecność przeciwciał anti- <i>Leptospira</i> u świń	Odsetek reakcji dodatnich	34,4%	4,9%	Znamienność: P=0,0015
	Miano reakcji dodatnich	100–25600	100–200	Nieznamienność: P=0,356
Obecność przeciwciał anti- <i>Leptospira</i> u krów	Odsetek reakcji dodatnich	26,8%	15,0%	Nieznamienność: P=0,189
	Miano reakcji dodatnich	100–6400	100	Znamienność: P=0,0128
Obecność DNA <i>Leptospira</i> spp. w drobnych ssakach	Odsetek próbek dodatnich w co najmniej jednym organie (nerce i/lub wątrobie)	20,0%	30,0%	Nieznamienność: P=0,3748
	Odsetek próbek dodatnich w obu organach (nerce i wątrobie)	16,7%	6,7%	Nieznamienność: P=0,2382
Obecność DNA <i>Leptospira</i> spp. w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i>	Odsetek próbek dodatnich	15,6%	1,4%	Wysoko znamienność: P<0,0001
Obecność DNA <i>Leptospira</i> spp. w wodzie	Odsetek próbek dodatnich	5,0%	0	Nieznamienność: P=0,0738
Obecność DNA <i>Leptospira</i> spp. w glebie	Odsetek próbek dodatnich	0	0	Nieznamienność: P=1,000

DYSKUSJA

Otrzymane wyniki nie wskazują na zwiększoną częstość zakażeń krętkami *Leptospira* ludzi w rejonach nawiedzanych przez powodzie Wisły w porównaniu z rejonami nienawiedzanymi przez powodzie tej rzeki, w związku z czym zagrożenie epidemią leptospirozy rejonów wschodnich kraju po dużej powodzi w roku 2010 nie wydaje się prawdopodobne [33]. Wyniki nasze wskazują natomiast na obecność pewnych zagrożeń środowiskowych, które mogą w przyszłości wpłynąć na wzrost liczby przypadków leptospirozy na terenach popowodziowych. Do zagrożeń tych należy zaliczyć zakażenia wśród zwierząt hodowlanych (świń i krów), które na terenie popowodziowym objawiały się reakcjami seropozytywnymi z antygenami *Leptospira*, występującymi częściej i w wyższych mianach w porównaniu z terenem nienawiedzanym przez powodzie [34].

Stwierdzone przez nas na terenie popowodziowym reakcje seropozytywne u świń występowały częściej w porównaniu z wynikami dotychczasowych badań seroepidemiologicznych autorów polskich i zagranicznych [34, 38, 39], natomiast reakcje seropozytywne u krów na tym terenie były wyższe od wyników dotychczasowych badań polskich i porównywalne z wynikami niektórych badań zagranicznych [34, 38, 39].

Kolejnym istotnym zagrożeniem, które należy brać pod uwagę jako potencjalną przyczynę wzrostu zachorowań na leptospirozę na terenach popowodziowych, są zakażone kleszcze *Ixodes ricinus*. Kleszcze z tego gatunku są na terenie Polski wektorem wielu patogenów [40], ale dotąd nie były brane pod uwagę jako potencjalne wektory krętków *Leptospira* i nasze badania, w których stwierdziliśmy obecność krętków *Leptospira* w kleszczach *I. ricinus* i znamienne częstsze występowanie zakażeń kleszczy na obszarach popowodziowych, sygnalizują ten problem w literaturze światowej po raz pierwszy. Jak dotąd, nigdy nie stwierdzono krętków *Leptospira* w kleszczach z rodzaju *Ixodes*. Jedyne badania dotyczące możliwego udziału kleszczy w epidemiologii leptospirozy wykonano ponad 50 lat temu. Burgdorfer [41, 42] wykazał w nich doświadczalnie możliwość przenoszenia *Leptospira pomona* przez kleszcze z gatunków *Ornithodoros turicata*, *Dermacentor andersoni* i *Amblyomma maculatum*, a Krepkogorskaya i Rementsova [43] izolowały 2 szczepy *Leptospira*

grippotyphosa z kleszczy *Dermacentor marginatus* zebranych z bydła w Kazachstanie. Uzyskane przez nas wyniki wskazują na potencjalne znaczenie kleszczy *Ixodes ricinus* jako wektora i rezerwuaru krętków *Leptospira*, zwłaszcza na terenach nawiedzanych przez powodzie [36]. Kleszcze mogą, podobnie jak gryzonie, przechowywać bakterie *Leptospira* pomiędzy kolejnymi powodziąmi, umożliwiając przetrwanie infekcji w środowisku i domykając niejako trwałę – wieloletnie istnienie ognisk przyrodniczych (*natural focus*, *nidality focus*) leptospirozy jako cyklozoonozy. Osoby zamieszkałe na terenach nawiedzanych przez powodzie powinny w szczególności wystrzegać się kleszczy w czasie bytności w lesie lub na jego obrzeżach i stosować zalecane dla pracowników leśnictwa środki profilaktyczne takie jak: używanie ochronnej odzieży, stosowanie repelentów oraz przeglądanie ciała po powrocie z lasu i wczesne usuwanie kleszczy za pomocą pęsety lub innych obecnych na rynku przyrządów [40].

Chociaż uzyskane przez nas wyniki badania drobnych ssaków nie wykazały znamiennych różnic w zakażeniu krętkami *Leptospira* pomiędzy rejonem nawiedzanym i nienawiedzanym przez powodzie, to jednak odsetek zakażeń w tej grupie zwierząt na terenach popowodziowych (20,0%) okazał się wyższy od wartości uzyskanych przez dotychczasowych autorów badających drobne ssaki na obecność *Leptospira* spp. w Polsce i innych krajach klimatu umiarkowanego, wliczając w to obszerne badania przeprowadzone ostatnio w Niemczech [35, 44]. Świadczy to o realnym zagrożeniu leptospirozą ze strony tej grupy zwierząt, a konkretnie ze strony myszy polnych (*Apodemus agrarius*), również na terenach nawiedzanych przez powodzie [35]. Jeszcze wyższy odsetek zakażeń stwierdzony u zwierząt z terenu „kontrolnego” może świadczyć o tym, że wspomniane myszy polne są rezerwuarem leptospirozy na obszarze całej Lubelszczyzny. Wskazuje to na potrzebę zwalczania gryzoni z tego gatunku w ogniskach przyrodniczych leptospirozy.

Wyniki badania gleby świadczą o tym, że nie stanowi ona obecnie zagrożenia na terenach popowodziowych [37]. Natomiast wykrycie DNA *Leptospira* spp. w 2 próbkach wody studziennej (a więc pitnej) terenów popowodziowych, nie może być oceniane jedynie w kategoriach braku znamienności statystycznej [37] i w szerszym kontekście wydaje się potwierdzać pogląd o bardzo znaczącej roli wody w epidemiologii

leptospirozy. Leptospiroza jest typową zoonozą przenoszoną przez wodę (ang. *waterborne*) [25, 29]. Zawsze występujące skażenie wód powodziowych, także zwałkami drobnych ssaków, będących zarazem rezerwuarem, źródłem zakażenia, jak i wektorem leptospir, niewątpliwie zwiększa ryzyko wystąpienia leptospirozy ludzi oraz ssaków domowych i wolno żyjących. Szacunek ryzyka transmisji tej choroby został przeprowadzony także w Polsce [45]. Ocena wzrostu takiego ryzyka na terenach popowodziowych, ze szczególnym uwzględnieniem źródeł wody pitnej i roli kleszczy, wymagałaby dalszych badań.

WNIOSKI

1. Zakażenia krętkami *Leptospira* występujące u ludności wiejskiej zamieszkującej tereny Lubelszczyzny nawiedzane przez powódzie Wisły nie są częstsze w porównaniu z ludnością zamieszkującą inne części regionu nienawiedzane przez powódzie.
2. Potencjalnym źródłem zakażeń leptospirami na terenach nawiedzanych przez powódzie są zwierzęta: kleszcze *Ixodes ricinus*, zwierzęta hodowlane (świnie, krowy) i myszy polne (*Apodemus agrarius*).
3. Gleba nie stanowi istotnego zagrożenia na terenach nawiedzanych przez powódzie.
4. Wykrycie DNA krętków *Leptospira* w wodzie pitnej, choć wymagające poszerzonych badań, wpisuje się dobrze w pałogenezę i ekologię leptospirozy

PODZIĘKOWANIE

Przedstawione w artykule badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki jako grant nr N N404 265840.

PIŚMIENICTWO

1. Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol.* 2010; 140: 287–296.
2. Pizarro M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Malad Infect.* 2013; 43: 1–9.
3. Guerra MA. Leptospirosis: public health perspectives. *Biologicals.* 2013; 41: 295–297.
4. Adler B. Pathogenesis of leptospirosis: cellular and molecular aspects. *Vet Microbiol.* 2014; 172: 353–358.
5. Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol.* 2010; 5: 1413–1425.
6. Dupouey J, Faucher B, Edouard S, Richet H, Kodjo A, Drancourt M, Davoust B. Human leptospirosis: An emerging risk in Europe? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2014; 37: 77–83.
7. Fiecek B, Tylewska-Wierzbiana S. Krętki *Leptospira* spp. – chorobotwórczość i diagnostyka zakażeń. *Post Mikrobiol.* 2014; 53: 113–122.
8. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny/Główny Inspektorat Sanitarny. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce (Biuletyn Roczne). Warszawa 2009–2014.
9. Schneider MC, Jancloes M, Buss DF, Aldighieri S, Bertherat E, Najera P, Galan DI, Durski K, Espinal MA. Leptospirosis: a silent epidemic disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2013; 10: 7229–7234.
10. Wasiński B, Dutkiewicz J. Leptospirosis – current risk factors connected with human activity and the environment. *Ann Agric Environ Med.* 2013; 20: 239–244.
11. Korczyńska A, Suchowiak J. Epidemia gorączki błotnej na terenie woj. wrocławskiego w roku 1971. *Przeg Epid.* 1973; 27: 563–568.
12. Hałat Z, Korczyńska A, Kasiński J. Epidemia leptospiroz w województwie wrocławskim w roku 1974. *Przeg Epid.* 1976; 30: 491–495.
13. Fuertes L, Nettleman M. Leptospirosis: a consequence of the Iowa flood. *Iowa Med.* 1994; 84: 449–450.
14. Easton A. Leptospirosis in Philippine floods. *BMJ* 1999; 319: 212.
15. Kupek E, de Sousa Santos Faversoni MC, de Souza Philippi JM. The relationship between rainfall and human leptospirosis in Florianópolis, Brazil, 1991–1996. *Braz J Infect Dis.* 2000; 4: 131–134.
16. Barcellos C, Sabroza PC. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. *Cad Saude Publica.* 2001; 17: 59–67.
17. Zitek K, Benes C. Longitudinal epidemiology of leptospirosis in the Czech Republic (1963–2003). *Epidemiol Mikrobiol Immunol.* 2005; 54: 21–26.
18. Niwetpathomwat A, Niwatayakul K, Doungchawee G. Surveillance of leptospirosis after flooding at Loei Province, Thailand by year 2002. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2005; 36 (Suppl. 4): 202–205.
19. Gaynor K, Katz AR, Park SY, Nakata M, Clark TA, Effler PV. Leptospirosis on Oahu: an outbreak associated with flooding of a university campus. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76: 882–885.
20. Kawaguchi L, Sengkeopraseuth B, Tsuyuoka R, Koizumi N, Akashi H, Vongphrachanh P, Watanabe H, Aoyama A. Seroprevalence of leptospirosis and risk factor analysis in flood-prone rural areas in Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78: 957–961.
21. Sohan L, Shyamal B, Kumar TS, Malini M, Ravi K, Venkatesh V, Venena M, Lal S. Studies on leptospirosis outbreaks in Peddamandem Mandal of Chittoor district, Andhra Pradesh. *J Commun Dis.* 2008; 40: 127–132.
22. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AN. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci.* 2008; 33: 557–569.
23. Centers of Disease Control and Prevention (CDC). Brief report: Leptospirosis after flooding of a university campus – Hawaii, 2004. *MMWR Morb Mortal Weekly Rep.* 2006; 55:125–127.
24. Diaz JH. Recognition and management of rodent-borne infectious disease outbreaks after heavy rainfall and flooding. *J La State Med Soc.* 2014; 166: 186–92.
25. Landesman LY. *Public Health Management of Disasters. The Practice Guide.* 3rd edition. American Public Health Association. Washington D.C., 2012.
26. Guimaraes RM, Cruz OG, Parreira VG, Mazoto ML, Vieira JD, Asmus CI. Temporal analysis of the relationship between leptospirosis and the occurrence of flooding due to rainfall in the city of Rio de Janeiro, Brazil, 2007–2012. *Cien Saude Colet.* 2014; 19: 3683–3692.
27. Knap JP, Dębiński W, Galińska EM, Kucharska I, Sujka J, Wdowiak LH. Epidemiologia interwencyjna (*field epidemiology*) zdarzeń masowych (katastrof) w środowisku wiejskim (z uwzględnieniem doświadczeń polskich) W: Konieczny J. (red.): *Ratownictwo medyczne. Determinanty, analizy i rekomendacje.* Poznań: Wyd. Garmond; 2014, 412–431.
28. Parnas J, Zwolski W, Łazuga K, Koślak A, Umiński J, Burdzy K. O badaniach zoologicznych, mikrobiologicznych i parazytologicznych w czasie ekspedycji organizowanych dla opracowania ognisk naturalnych antropozoonoz. *Wiad Parazytol.* 1960; 6: 125–140.
29. Zwierz J. *Leptospirozy.* Warszawa: PZWL, Wyd. 2; 1964.
30. Litarska U, Knap JP, Zięba J, Pracownia Leptospir WSSE we Wrocławiu (1947–2005). Uwagi na tle jej działalności. *Przeg Epid.* 2006; 60: 213–224.
31. Anusz Z. *Zapobieganie i zwalczanie zawodowych chorób odzwierzęcych.* Olsztyn: Wydawnictwo ART; 1995.
32. Knap JP, Trybusz A. Gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym – zakażenie Hantawirusem występującym w Polsce. *Pol Merk Lek.* 2006; 21: 411–417.
33. Wasiński B, Sroka J, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Knap JP, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Seroprevalence of leptospirosis in rural populations inhabiting areas exposed and not exposed to floods in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19: 285–288.
34. Wasiński B, Sroka J, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Knap JP, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Occurrence of leptospirosis in domestic animals reared on exposed or non-exposed to flood areas of eastern Poland. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2012; 56: 489–493.
35. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Sroka J, Piskorski M, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. A small scale survey of *Leptospira* in mammals from eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2013; 20: 705–707.
36. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Cisak E, Sroka J, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Leptospirosis as a tick-borne disease? Detection of *Leptospira* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2012; 19: 656–659.
37. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Wasiński B, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J. Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2014; 21:730–732.

38. Krawczyk M. Serological evidence of leptospirosis in animals in northern Poland. *Veterinary Record*. 2005; 156: 88–89.
39. Wasiński B, Pejsak Z. Occurrence of leptospiral infections in swine population in Poland evaluated by ELISA and microscopic agglutination test. *Pol J Vet Sci*. 2010; 13: 695–699.
40. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zajac V, Dutkiewicz J. Wytyczne dotyczące zmniejszenia zagrożenia chorobami odkleszczowymi u pracowników eksploatacji lasu. Lublin: Instytut Medycyny Wsi; 2013.
41. Burgdorfer W. The possible role of ticks as vectors of leptospires. I. Transmission of *Leptospira pomona* by the argasid tick, *Ornithodoros turicata*, and the persistence of this organism in its tissues. *Exp Parasitol*. 1956; 5: 571–579.
42. Burgdorfer W. The possible role of ticks as vectors of leptospires. II. Infection of the ixodid ticks, *Dermacentor andersoni* and *Amblyomma maculatum*, with *Leptospira pomona*. *Exp Parasitol*. 1959; 8: 502–508.
43. Krepkogorskaya TA, Rementsova MM. Isolation of *Leptospira* strains from the ticks *Dermacentor marginatus* S. collected from cattle. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 1957; 28(2): 93–94 (praca w języku rosyjskim).
44. Mayer-Scholl A, Hammerl JA, Schmidt S, Ulrich RG, Pfeffer M, Woll D, Scholz HC, Thomas A, Nöckler K. *Leptospira* spp. in rodents and shrews in Germany. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11:7562–7574.
45. Krawczyk M. Ocena ryzyka transmisji *Leptospira* sp. w dwóch grupach ludzi. *Przegl. Epidemiol*. 2004; 58: 207–212.

Assessment of risk of infection with *Leptospira* spirochetes among rural population in the Lublin Region, with particular consideration of areas exposed to flooding

Abstract

Background. Leptospirosis, caused by *Leptospira* spirochetes, is considered the most widespread zoonosis worldwide. Morbidity may be increased by natural disasters such as floods or typhoons.

Aim of the study. The aim of the present study was to investigate the epidemiological situation of leptospirosis in the Lublin Region (Eastern Poland) with consideration of the effects of flooding by the Vistula River, by investigating human population and various elements of the environment for the presence of *Leptospira* in two areas: 'Area A' exposed to flooding, and 'Area B' not exposed to flooding.

Material and Methods. In the Areas A and B, sera of 100 and 98 inhabitants, sera of 32 and 41 pigs and sera of 41 and 40 cows were examined, respectively, for the presence of anti-*Leptospira* antibodies by the microscopic agglutination test (MAT), as well as 40 and 64 samples of water, 40 and 68 samples of soil, organ samples of 30 and 30 small mammals from 5 and 6 species, and 540 and 296 *Ixodes ricinus* ticks, respectively – for the presence of *Leptospira* DNA by the nested-PCR test.

Results. The presence of anti-*Leptospira* antibodies was found in 3% of inhabitants of Area A and in 9.2% of Area B; this difference was statistically insignificant. The frequency of anti-*Leptospira* antibodies was higher in pigs and cows from Area A, compared to area B (34.4% vs. 4.9%, and 26.8% vs. 15.0%, respectively), while in the case of pigs the difference was significant ($P=0.0015$). Also, the titers of positive reactions were higher in Area A, compared to Area B, and for cows the difference was significant ($P=0.0128$). The presence of *Leptospira* DNA was found in 20% of small mammals from Area A, and in 30% from Area B; this difference being insignificant; however, in both cases the frequency of positive results was high, compared to the data from literature. The great majority of positive results were obtained in striped field mice (*Apodemus agrarius*). The presence of *Leptospira* DNA was detected in 15.6% of *I. ricinus* ticks from Area A, compared to 1.4% in Area B, and the difference was highly significant ($P<0.0001$). 5% of water samples from Area A contained *Leptospira* DNA, whereas all water samples from Area B, and all soil samples from Areas A and B were negative.

Conclusions. • The infections with *Leptospira* spirochetes among the rural population inhabiting the areas of the Lublin Region exposed to floods by the Vistula River do not occur with a higher frequency, compared to the areas not exposed to floods. • The potential sources of infection with *Leptospira* in the areas exposed to flooding are animals: ticks *Ixodes ricinus*, domestic animals (pigs, cows), and striped field mice (*Apodemus agrarius*). • Detection of *Leptospira* spp. DNA in 5% of water samples in the areas exposed to floods, with negative results in control areas, seems to confirm a possible role of water in spreading leptospirosis. • Soil does not constitute any significant risk of infection in the areas exposed to flooding.

Key words

Leptospira, leptospirosis, Lublin Region, floods, epidemiology, rural population, pigs, cows, small mammals, ticks, water, soil