

*Ireneusz Matuszczyk*¹, *Halina Tarnowska*¹, *Jadwiga Żabicka*², *Włodzimierz Gut*³

OGNISKO EPIDEMII MLECZNEJ KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU W WOJEWÓDZTWIE KIELECKIM

¹ Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Kielcach
Dyrektor: Dr *I. Matuszczyk*

² Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: Prof. *W. Magdzik*

³ Zakład Wirusologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: Prof. *M. Kańtoch*

Opisano ognisko zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu spowodowane picciem surowego mleka koziego w Busku Zdroju. Za stwierdzoną etiologią przemawia obecność swoistych dla wirusa kzm przeciwciał w płynie mózgowo rdzeniowym i w surowicach osób chorych. Jedna z 19 kóz, których mleko piły osoby chore również była serodatnia.

WSTĘP

Zakażenie człowieka wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (kzm) może być następstwem ukłucia przez zakażonego kleszcza (1, 2, 6, 9) lub spożycia nieopracowanego termicznie mleka od zakażonego zwierzęcia będącego w okresie wiremii (tzw. gorączka mleczna) (6). W 1995 roku nowe ognisko zachorowań wywołanych wirusem kzm zaobserwowano w województwie kieleckim. Województwo to nie należy do endemicznych terenów występowania kzm (6, 8) i tym samym ustalenie źródła i drogi zakażenia zachorowań było istotne dla obrazu epidemiologicznego zakażeń tym wirusem w Polsce. Przedstawione poniżej opracowanie ogniska może być użyteczne dla innych WSSE przy wystąpieniu zakażeń wywoływanych wirusem kzm.

MATERIAŁ I METODY

W okresie 5.06.–17.06.1995 w oddziale zakaźnym Szpitala Miejskiego w Busku Zdroju hospitalizowano zwiększoną jednocześnie liczbę pacjentów (15 osób) z objawami neuroinfekcji. W związku z tym faktem rozpoczęto dochodzenie epidemiologiczne mające na celu ustalenie źródła zakażenia. Wstępne badania sugerowały, że źródłem zakażenia było kozie mleko i dochodzenie epidemiologiczne objęło 48 osób z objawami grypopodobnymi w tym 33 osoby bez objawów neurologicznych, które

stanowiły prawdopodobnie poronne przypadki zakażenia wirusem kzm oraz 15 chorych hospitalizowanych z objawami neurologicznymi.

Badania serologiczne w kierunku zakażenia wirusem kzm ludzi:

– badanie poziomu swoistych dla wirusa kzm przeciwciał IgG i IgM w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym przeprowadzono u wszystkich 15 hospitalizowanych osób w Zakładzie Wirusologii PZH metodą immunoenzymatyczną ELISA (Immuno AG) zgodnie z instrukcją producenta, określając poziom przeciwciał w VIEU/ml (VIEU – międzynarodowa tzw. „wiedeńska” jednostka aktywności IgG surowicy przeciwko antygenowi wirusa kzm w teście ELISA; za ujemne przyjmuje się < 60 VIEU, za wątpliwe $60\text{--}125$ VIEU, za dodatnie > 125 VIEU, wysokododatnie > 300 VIEU).

– badanie poziomu swoistych dla wirusa kzm przeciwciał IgG i IgM w surowicy przeprowadzono u dodatkowych 20 osób bez objawów neurologicznych leczonych ambulatoryjnie w maju 1995 z powodu zakażeń grypopodobnych. Osoby te piły mleko kozie z tego samego źródła.

Badania serologiczne w kierunku zakażenia wirusem kzm kóz:

– surowice 19 kóz, od których mleko było podejrzane jako źródło zakażenia wirusem kzm, przebadano na obecność swoistych dla tego wirusa przeciwciał metodą ELISA, stosując zestaw i warunki podobne do stosowanych przy badaniu surowic ludzkich, zastępując znakowaną peroksydazą surowice anty ludzkie IgG odpowiednim rozcieńczeniem znakowanych peroksydazą króliczych przeciwciał anty kozie Ig (DAKO). Test potwierdzenia wykonano metodą ELISA kompetencyjnego blokowania z surowicą ludzką zawierającą swoiste dla wirusa kzm przeciwciała IgG w stężeniu 600 VIEU/ml.

W pośredniej metodzie ELISA poziom przeciwciał dla wirusa kzm u badanych kóz oceniano przez porównanie wartości OD odczytu z podwojonym wynikiem uzyskanym z surowicą ujemną (DAKO) (3).

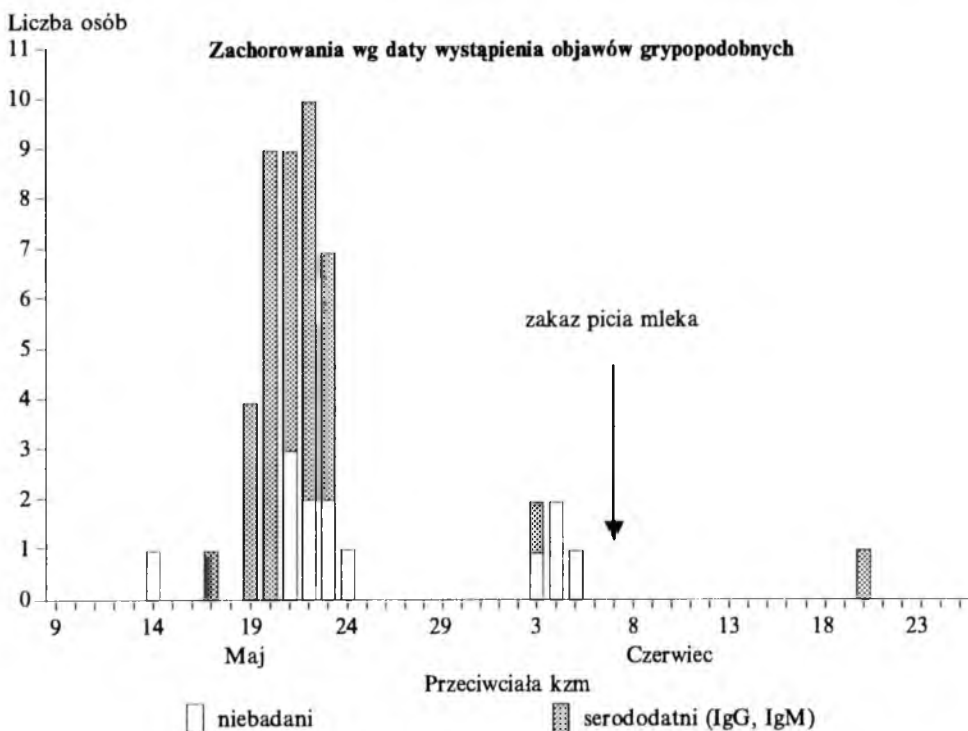
WYNIKI

Dane epidemiologiczne i kliniczne

Ogółem z 63 osób pijących mleko kozie, zachorowało z objawami grypopodobnymi (pierwsza faza zakażenia wirusem kzm) 48 osób, z czego 42 zachorowały między 14 a 24 maja a 6 między 3 a 20 czerwca (ryc. 1). Wszyscy chorzy byli mieszkańcami Buska lub okolic. Nikt z badanych chorych nie podawał ukąszenia przez kleszcze w 1995 roku ani nie był związany pracą z rolnictwem, leśnictwem i hodowlą. U 15 z tych osób wystąpiły objawy 2 fazy zakażenia wirusem kzm w postaci neuroinfekcji (ryc. 2). W związku z epidemią 7 czerwca wstrzymano sprzedaż mleka z hodowli będącej prawdopodobnym źródłem zakażenia i przeprowadzono badania osób pijących mleko oraz kóz w kierunku obecności przeciwciał dla wirusa kzm. Wśród osób pijących mleko wyodrębniono 4 grupy:

Grupa 1

15 osób hospitalizowanych w czerwcu, wśród których było dwoje dzieci w wieku 11 i 12 lat oraz trzynaście osób dorosłych od 21 do 71 lat. Jak wynika z wywiadu



Ryc. 1. Ognisko kzm w Busku w 1995 r.

przebieg choroby był dwufazowy (ryc 2). U wszystkich 15 pacjentów na 6–10 dni przed przyjęciem do szpitala wystąpiły różne nasilone objawy złego samopoczucia, bóle głowy, bóle mięśniowe, temp. 37–39°C. Po 4–5 dniowym okresie remisji dolegliwości znacznie nasiliły się a u części chorych wystąpiły wymioty i objawy oponowe. Wyniki badania płynu mózgowo-rdzeniowego sugerowały zakażenie wirusowe. U wszystkich hospitalizowanych chorych stwierdzono zwiększoną pleocytozę z przewagą limfocytów, podwyższony poziom białka i dodatni odczyn Pandeyego (tab. I). Chorzy otrzymywali Groprinosin* oraz byli leczeni objawowo. Średni okres hospitalizacji wynosił 22 dni, wszystkich chorych wypisano w stanie dobrym bez następstw pochorobowych.

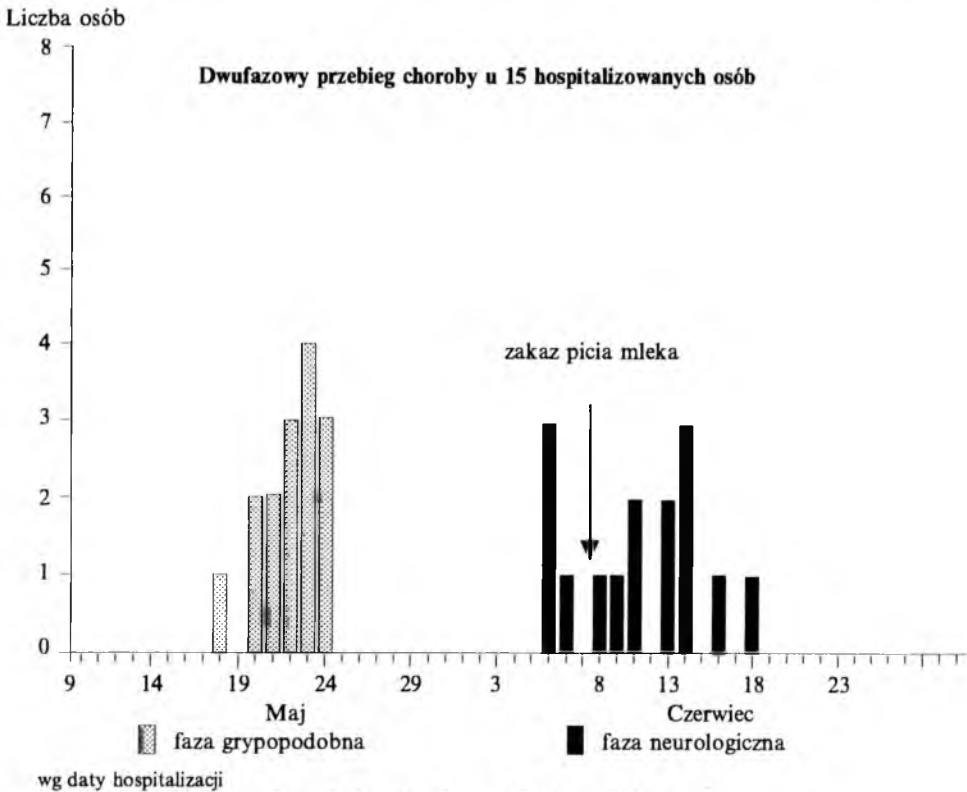
Grupa 2

33 osoby, u których występowały w maju różne dolegliwości grypopodobne, najczęściej w okresie 18–22 maja, które po leczeniu ambulatoryjnym (27 osób) lub samoistnie ustąpiły (ryc. 1).

Grupa 3

11 osób, które przerwały picie mleka w maju i nie zgłaszały dolegliwości.

* Groprinosin – (Polfa-Grodzisk) – lek o postulowanym działaniu immunostymulującym



Ryc. 2. Ognisko kzm w Busku w 1995 r.

Grupa 4

4 osoby, które przez cały okres objęty analizą piły mleko kozie i nie zgłaszały dolegliwości w maju 1995 roku.

Nikt z ww. grup nie podawał informacji o pokluciu w 1995 roku przez kleszcze i nie był szczepiony przeciwko kzm.

Poza wymienionymi osobami analizą objęto również hodowcę i hodowlę kóz. Hodowca chorował z objawami grypopodobnymi w pierwszych dniach maja 1995 a przed tym okresem był 4 razy pokąsany przez kleszcze. Nie był szczepiony przeciwko kzm. W jego surowicy stwierdzono przeciwciała IgG dla wirusa kzm (617 VIEU/ml) przy braku swoistych IgM. Hodowlę kóz prowadził od 1994 roku na obrzeżach miasta. Kozy wypasały się na terenie porośniętym wysokimi trawami i krzakami w pobliżu lasów. Hodowla była systematycznie powiększana. Jak wynika z informacji Inspektoratu Weterynarii właściciel fermi dokupił dwie kozy w kwietniu a następnie pięć kóz w dniu 6 V 1995 na rynku w Nowym Targu. Stado liczyło 19 sztuk. Kozy były przez cały czas zdrowe a na ich skórze stwierdzono duże ilości kleszczy.

Wyniki badań serologicznych

Wyniki oznaczeń przeciwciał dla wirusa kzm w materiałach od osób z poszczególnych grup przedstawione są w tabeli II. U wszystkich badanych osób z objawami

Tabela I. Wyniki badań płynu m.-rdz. osób hospitalizowanych z powodu neuroinfekcji

| Lp* | Data hospitalizacji | Wiek (lata) | Pleocytoza w mm ³ | % limfocytów | Białko mg % | Odczyn Pandeyego |
|-----|---------------------|-------------|------------------------------|--------------|-------------|------------------|
| 1 | 05.06. | 49 | 243 | 75 | 66 | + |
| 2 | 05.06 | 27 | 874 | 75 | 72 | + |
| 3 | 05.06 | 21 | 270 | 79 | 50 | + |
| 4 | 06.06 | 36 | 590 | 56 | 47 | + |
| 5 | 08.06 | 40 | 81 | 77 | 46 | + |
| 6 | 09.06 | 58 | 460 | 85 | 72 | + |
| 7 | 10.06 | 47 | 322 | 95 | 90 | + |
| 8 | 10.06 | 70 | 91 | 71 | 46 | + |
| 9 | 12.06 | 42 | 518 | 90 | 68 | + |
| 10 | 12.06 | 12 | 191 | 70 | 68 | + |
| 11 | 13.06 | 28 | 93 | 79 | 50 | + |
| 12 | 13.06 | 11 | 404 | 87 | 40 | + |
| 13 | 15.06 | 42 | 320 | 80 | 66 | + |
| 14 | 17.06 | 44 | 70 | 70 | 72 | + |

* – jedna osoba hospitalizowana na oddziale kardiologicznym 13.06.1995 r.

tak neurologicznymi (15 z 15 osób należących do grupy 1) jak i grypopodobnymi (20 osób z 33 należących do grupy 2), wykryto w surowicy przeciwciała IgG i IgM swoiste dla wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Ponadto u osób z objawami neurologicznymi stwierdzono w ośrodkowym układzie nerwowym miejscową produkcję przeciwciał dla tego wirusa. Swoiste przeciwciała dla wirusa kzm wykryto także u hodowcy kóz i 2 osób (z 11 badanych z grupy 3), które nie zgłaszały zachorowań i przerwały picie mleka koziego w maju 1995.

Tabela II. Analiza występowania przeciwciał IgG i IgM swoistych dla wirusa kzm w materiałach badanych osób

| Badana grupa* | Przeciwciała dla wirusa kzm w surowicy (a/b) | | Przeciwciała dla wirusa kzm w pmr [#] |
|---------------|--|-------|--|
| | IgG | IgM | |
| Grupa 1 | 15/15 | 15/15 | 15 |
| Grupa 2 | 20/20 | 19/19 | nb |
| Grupa 3 | 2/11 | nb | nb |
| Grupa 4 | nb | nb | nb |
| Hodowca | + | - | nb |

* – podział na grupy opisany w części materiał i metody

a/b – liczba osób badanych w danej grupie z wynikiem dodatnim oznaczenia przeciwciał dla wirusa kzm w stosunku do liczebności badanych osób.

U 11 kóz wynik badania wykluczył obecność przeciwciał kzm w surowicy, u 7 uzyskano wynik wątpliwy a surowice tych kóz reagowały z antygenem kontrolnym uzyskanym z niezakażonej hodowli komórkowej. U jednej kozy wynik badania

wskazywał na obecność w surowicy swoistych przeciwciał dla wirusa kzm. Wyniki badania obiema metodami – podstawową ELISA i testu potwierdzającego metodą kompetencyjnego blokowania przedstawia tabela III.

Tabela III. Wyniki badań serologicznych 19 kóz z hodowli w Busku Zdroju

| Badanie podstawowe (pośrednia ELISA) | | Test potwierdzenia (ELISA – metoda kompetencyjnego blokowania) | |
|--------------------------------------|----------------|--|--------------------------------|
| Reaktywność z badanymi antygenami | Liczba surowic | Liczba surowic blokujących | Liczba surowic nie blokujących |
| A – tylko z wirusem kzm | 1 | 1 | 0 |
| C – z wirusem kzm i kontrolnym | 7 | 0 | 7 |
| B – brak reaktywności | 11 | 0 | 11 |
| Razem badanych | 19 | 1 | 18 |

Tylko surowica jednej kozy (uprzednio dodatnia w metodzie pośredniej ELISA) blokowała wiązanie się do antygeny przeciwciał z wysokododatniej dla przeciwciał IgG dla kzm surowicy ludzkiej (A). Pozostałe surowice były albo ujemne (B) albo reagujące nieswoiście (C).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W przedstawionej pracy opisano drugie w Polsce ognisko zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu w formie gorączki mleczej. W pierwszym przed ponad 20 laty (5) źródłem zakażenia było mleko krowie. Ponadto zakażenia z 1974 roku podobnie jak zidentyfikowane w innych krajach ogniska gorączki mleczej (7), występowały w rejonie, w którym kleszczowe zapalenie mózgu ma charakter endemiczny. Wystąpienie zakażeń kzm na nowych terenach wiązało się najczęściej z ich zasiedleniem przez zakażone kleszcze (1, 2, 6) i w takiej sytuacji na danym obszarze obserwowano bądź zachorowania rozciągnięte na cały sezon epidemiczny (lub kilka sezonów) do wygaśnięcia ogniska lub jego ustabilizowania (1, 2, 9). Z tego względu opracowanie ogniska w województwie kieleckim nabiera istotnego znaczenia. W województwie kieleckim jedynie sporadycznie zgłaszano zachorowania na kzm, w 1994 roku stwierdzono 1 zachorowanie potwierdzone badaniem serologicznym a w 1995 r. poza 15 zachorowaniami w rejonie Buska Zdroju zgłoszono 4 przypadki kzm (z okolic Jędrzejewa, Opatowa, Zagnańska i Włoszczowej).

Potwierdzenie podejrzanego na podstawie danych epidemiologicznych źródła zakażenia w przypadkach gorączki mleczej można uzyskać jedynie przez identyfikację zakażonego zwierzęcia (5). Badania wirusologiczne nie wchodzi w grę, gdyż wirus u zwierząt jest krótkotrwały i poprzedza wystąpienie neuroinfekcji u ludzi, którzy najczęściej są indykatozem zakażeń kzm na danym terenie. W tych warunkach jedyną możliwą metodą potwierdzenia zakażenia u zwierząt są badania serologiczne (3, 4). Obecnie u ludzi badania te wykonywane są metodą ELISA za pomocą komercyjnych

zestawów diagnostycznych (4). Stosowany w nich koniugat stanowią znakowane enzymem przeciwciała dla ludzkich immunoglobulin i tym samym nie może być użyty w badaniu zwierząt. Wobec powyższego faktu podjęto próbę adaptacji posiadanego zestawu przez użycie koniugatu dla kozich immunoglobulin do wykrycia w/w przeciwciał w surowicach kóz.

Ze względu na brak odpowiednich układów kontrolnych (dodatnich dla kzm surowic kozich o znanym mianie przeciwciał dla kzm) przy adaptacji testu, niezbędne było wykonanie testu potwierdzenia. Do tego celu użyto metody kompetencyjnego blokowania przez kozie surowice wiązania ludzkich IgG z wysokododatniej surowicy chorego człowieka.

Za szerzeniem się w tym ognisku kzm poprzez picie zakażonego mleka koziego przemawia nie tylko dodatni wynik badania serologicznego zwierzęcia ale także:

- dodatnie wyniki badań serologicznych krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego u wszystkich 15 chorych hospitalizowanych z objawami II fazy choroby (neurologicznej);

- dodatnie wyniki badań serologicznych u badanych 20 osób (60%) spośród 33, które chorowały z objawami I fazy zakażenia (grypopodobnej); przy braku u wszystkich tych osób zgłoszeń pokłucia przez kleszcze.

Natomiast dodatnie wyniki badania serologicznego w kierunku przeciwciał dla wirusa kzm u dwojga dzieci, które przerwały picie mleka w maju i nie chorowały świadczą o kontakcie z wirusem kzm i bezobjawowym zakażeniu. Zakażenia bezobjawowe wg danych z piśmiennictwa mogą występować u ponad połowy zakażonych osób (7).

Fakt, że koza będąca prawdopodobnym źródłem zakażenia, została zakupiona na około 2 tygodnie przed wystąpieniem u ludzi pierwszej fazy zakażenia (grypopodobnej) sugeruje pierwotne zakażenie zwierzęcia poza obszarem wystąpienia ogniska gorączki mlecznej. Potwierdza tę sugestię szybkie wygaśnięcie epidemii i powrót po krótkim okresie od jej początku, do normalnej znanej dla obszarów nieendemicznych, sytuacji kzm w województwie kieleckim.

I. Matuszczyk, H. Tarnowska, J. Żabicka, W. Gut

THE OUTBREAK OF MILKY EPIDEMIC OF ENCEPHALITIS CAUSED BY TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS IN KIELCE PROVINCE

SUMMARY

Outbreak of tick-borne encephalitis (TBE) was reported between May 14 and June 20 1995 in Busko Zdrój in Kielce Province. Drinking fresh (unboiled) goat's milk from private breeding was probable reason of the outbreak. 63 person drank goat's milk from the same source; 15 were hospitalized with neurological symptoms, 33 persons had an influenza-like symptoms and were treated in out-patient department (27) or healed spontaneously (6), and 15 persons were healthy. TBE virus antibodies were found in CSF of all 15 persons with neuroinfection syndromes. IgM and IgG against TBE virus were present in sera of 15 hospitalized patients and 20 patients with influenza like-syndromes. Antibodies to TBE virus were detected in serum of one of 19 goats from the breeding farm confirming the source of TBE virus infection.

PIŚMIENICTWO

1. *Bednarz K., Nawrocka E., Sadowski W., Żukowski K.*: Przeg. Epid., 1984, 38, 3. – 2. *Bednarz K., Nawrocka E., Wegner Z., Pruszyńska I.*: Przeg. Epid., 1985, 39, 224. – 3. *Gut W., Panfist A., Jarząbek Z.*: Med. Exp. Microbiol., 1990, 42, 61. – 4. *Gut W., Kowalewska A.*: Med. Og., 1995 I. (XXX), 2, 110. – 5. *Jeżyna C., Węglińska T., Nawrocka E., Fałęcka W., Wieliczko-Gębska L., Rodkiewicz T., Piesiak Z., Ciesielski T.*: Przeg. Epid., 1977, 30, 224. – 6. *Kańtoch M.*: Zbl. Bakt., 1994, 281, 365. – 7. *Plasmann E.*: Artzl. Praxis, 1980, 32, 2025. – 8. *Wróblewska-Mularczykowa Z., Żabicka J., Nawrocka E., Olkowska D., Taytsch-Kapulkin Z.*: Acta Microbiol. Pol., 1973, 5, 123. – 9. *Wróblewska-Mularczykowa Z., Żabicka J., Nawrocka E., Olkowska D., Taytsch-Kapulkin Z.*: Przeg. Epid., 1974, 1, 116.

Adres: Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna 25-956 Kielce, ul. Jagiellońska 68