

CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO U KLESZCZY *IXODES RICINUS* Z OKOLIC TARNOWSKICH GÓR

GRAŻYNA SPAUSTA, ANDRZEJ WICZKOWSKI, JOLANTA CIARKOWSKA, JOANNA STRZELCZYK, GIZELA TRAPP, BRYGIDA ADAMEK I MARZENA ZALEWSKA-ZIOB

Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej, Śląska Akademia Medyczna, ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze

ABSTRACT. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks, *Ixodes ricinus* in Tarnowskie Góry district. *Borrelia burgdorferi* is an aetiological factor of borreliosis (Lyme disease). The main vectors of *Borrelia burgdorferi* are larvae, nymphs, and females of *Ixodes ricinus*. The aim of this paper was to analyse infection parameters of *Borrelia burgdorferi* in a selected populations of *Ixodes ricinus*. The study was conducted in Tarnowskie Góry administrative district (Krupski Młyn, Zielona, Lubliniec, Tarnowskie Góry, Świerklaniec, Tworóg, and Zbrosławice). A total of 85 ticks were collected with a piece of cloth dragged over the vegetation. The *Borrelia burgdorferi* infection was confirmed with a PCR method, using flagellin protein gene DNA amplification. DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato was present in 14 ticks, which constituted 16.5% of the population studied. The percentage of infected females and nymphs was 26.8%, 22.2%, and 5.6%, respectively. A high prevalence of the pathogen (50%) was in ticks revealed in the recreation areas and the community forest in Świerklaniec.

Key words: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ixodes ricinus*, PCR.

WSTĘP

Borrelia burgdorferi, krętek z rodziny Spirochaetaceae (rząd Spirochetales) – gramujemna, spiralnego kształtu bakteria o długości 20–30 μm z peryplazmatycznymi wiciami, jest etiologicznym czynnikiem boreliozy (choroby z Lyme). W Europie głównym wektorem *Borrelia burgdorferi* są larwy, nimfy i samice kleszcza pospolitego – *Ixodes ricinus*, najczęściej i najliczniej występującego gatunku kleszcza w biotopach leśnych (wilgotne lasy liściaste i mieszane, bory mieszane ze świerkiem, obrzeża lasu, łąki śródleśne). Brak go w środowiskach skrajnie suchych (bory sosnowe, wydmy), nadmiernie wilgotnych (torfowiska) i najwyższych partiach gór (Prokopowicz 1995).

Żywicielami kleszczy są przede wszystkim drobne gryzonie, jelenie, sarny, a także dziki, lisy, psy oraz wiele innych zwierząt dzikich i domowych. Coraz większą uwagę zwraca się na rolę ptaków w cyklu krążenia kleszczy i krętków w środowisku naturalnym. Człowiek jest żywicielem przypadkowym (Flisiak i Żabicka 1995).

Zakażony kleszcz przekazuje krętki swemu żywicielowi, a pobierając krew zakażonego zwierzęcia sam ulega zakażeniu. Krętki obecne w przewodzie pokarmowym kleszcza po namnożeniu przechodzą do ślinianek, stąd dostają się do skóry człowieka, a następnie migrują do odległych układów i narządów. Zakażenie *Borrelia burgdorferi* wymaga co najmniej 24 godzinnego kontaktu z kleszczem. Ryzyko zakażenia zwiększa się wraz z czasem trwania kontaktu, osiągając blisko 100% zakażeń w trzeciej dobie. Krętki utrzymują się w kleszczach przez wiele pokoleń, ponieważ przekazywane są na potomne osobniki transstadialnie i transowarialnie (Prokopowicz 1995, Siński 2002).

Transmisja *Borrelia burgdorferi* wykazuje dużą sezonowość wyrażoną dwoma szczytami: wiosennym i jesiennym. Intensywność transmisji i rozprzestrzenienie *Borrelia* zależą nie tylko od czynników fenologicznych (pora roku, wilgotność, temperatura), ale przede wszystkim od obecności wektora w środowisku i zwierząt będących naturalnym rezerwuarem zoonotycznym krętków (Siński i wsp. 1997).

Przy użyciu technik molekularnych scharakteryzowano trzy odrębne genogatunki – patogenne dla człowieka: *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*. Gatunki te traktowane są łącznie jako *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Posiadają one wysoce konserwatywną sekwencję DNA dla genu flakodującego flagelinę (Johnson i wsp. 1992). Umożliwia to jednoczesne zidentyfikowanie wszystkich trzech genogatunków (Skotarczak i Wodecka 2000). Ponadto wyróżniono dwa genogatunki niepatogenne: *Borrelia lusitania* i *Borrelia valaisiana* (Siński 2002).

Zależnie od przynależności krętków do określonego genogatunku zwrócono uwagę na różne symptomy chorobowe boreliozy z Lyme. Krętki *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (występujące w Europie, Ameryce) wywołują u ludzi przewlekłe zapalenie stawów. *Borrelia garinii* (spotykana w Europie i Azji) jest przyczyną objawów neurologicznych, natomiast *Borrelia afzelii* (występująca w Europie i Azji) powoduje idiopatyczny zanik skóry, tzw. syndrom ACA (acrodermatitis chronica atrophicans) (Siński 2002).

Na terenach objętych obserwacją, mimo iż w ostatnich latach zauważa się stały wzrost zachorowań ludzi na boreliozę, nie dokonywano kompleksowej oceny środowiskowych uwarunkowań pojawiania się tej choroby. Nie są objęte dokładnymi badaniami biotopy leśne i parki, atrakcyjne tereny rekreacyjne i turystyczne, często odwiedzane przez ludzi. Nie jest również poznany stopień zakażenia kleszczy i ich udział w transmisji tego patogenu w tych środowiskach.

Celem pracy było zbadanie ekstensywności występowania *Borrelia burgdorferi sensu lato* w wybranych populacjach kleszczy *Ixodes ricinus* na terenie powiatu tarnogórskiego.

MATERIAŁ I METODY

Obszar badań obejmował kilka miejscowości powiatu tarnogórskiego (Krupski Młyn, Zielona, Lubliniec, Tarnowskie Góry, Świerklaniec, Tworóg, Zbrostawice). Tereny te wykorzystywane są między innymi jako miejsca rekreacji i wypoczynku dla mieszkańców Górnego Śląska.

Kleszcze *Ixodes ricinus* w liczbie 85 sztuk zebrano metodą flagowania z krzewów i poszycia leśnego w okresie wiosenno-letnim 2001r. W zbiorze tym dominowały samice w liczbie 40 (47,0%), samców było 27 (31,8%), natomiast nimf 18 (21,2%).

Wykrywanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* przeprowadzono metodą PCR (Polymerase Chain Reaction) z amplifikacją DNA genu fla kodującego białko rzęskowe flagelinę.

Izolacji genomowego DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato dokonywano zgodnie z protokołem zestawu Genomic DNA Prep Plus firmy A & A Biotechnology (Gdynia). Wyizolowane DNA wykorzystano do reakcji PCR.

W celu określenia obecności w badanym materiale *Borrelia burgdorferi* sensu lato zastosowano zestaw diagnostyczny PCR – *Borrelia* (DNA – Gdańsk II). Detekcja oparta była na amplifikacji fragmentu genu kodującego flagelinę. Zastosowano startery reakcji specyficzne do sekwencji DNA w obrębie genu kodującego białko wici: starter BFL1 – 5` GCT CAA TAT AAC CAA ATG CAC ATG 3` oraz starter BFL2 – 5` CAA GTC TAT TTT GGA AAG CAC CTA A 3`.

Mieszanina do reakcji PCR zawierała: 20 µl Master Mix (primery, bufor, woda dest., jony MgCl₂); 2,5 µl mieszaniny nukleotydów dNTPs (2mM); 0,5 µl polimerazy termostabilnej Delta 2 oraz 2,0 µl badanego DNA. W każdej serii badań przeprowadzono kontrolę dodatnią z wzorcowym DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato oraz kontrolę ujemną (jałowa woda destylowana). Reakcja PCR przebiegała w termocyklerze firmy Eppendorf typu Mastercykler Personal (Hamburg, Niemcy) i obejmowała 40 cykli z denaturacją DNA w 93°C przez 30 sekund, przyłączeniem starterów w 52°C przez 60 sekund i wydłużeniem w 72°C przez 60 sekund.

Produkty reakcji rozdzielano w 2% żelu agarozowym z bromkiem etydy. Jako wzorca mas cząsteczkowych użyto markera wielkości DNA M1 (DNA Gdańsk). Analizę produktów reakcji PCR przeprowadzano przy użyciu transiluminatora i fotografowano. Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosiła 442 pary zasad.

WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie analizy danych epidemiologicznych można przypuszczać, że borelioza staje się narastającym problemem zdrowotnym także wśród mieszkańców powiatu tarnogórskiego.

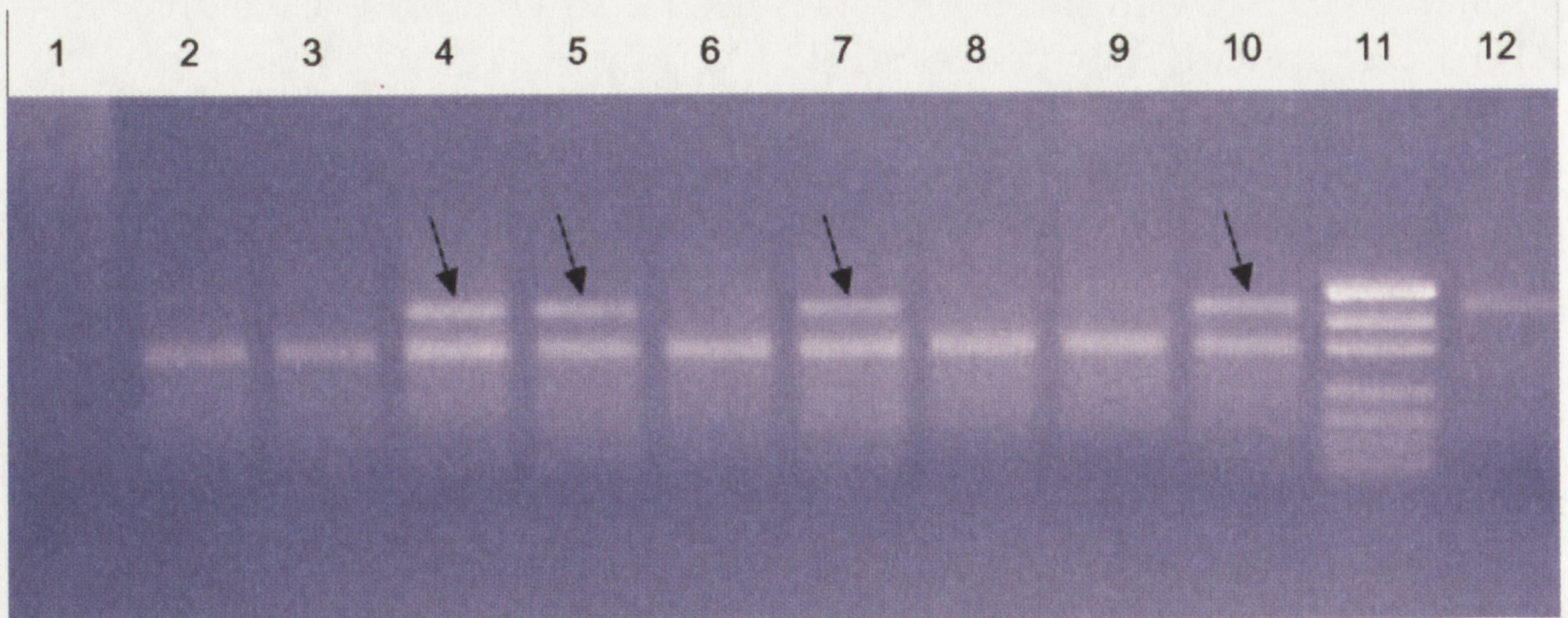
Na 85 badanych kleszczy u 14 (16,5%) wykryto obecność DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Odsetek zakażonych samic i samców wynosił odpowiednio

26,8% i 22,2%, a nimf 5,6% (Tabela 1). Wysoką ekstensywnością zakażenia kleszczy charakteryzowały się tereny rekreacyjne oraz lasy komunalne w Świerklańcu (50%), a najmniejszą najbliższe okolice Tarnowskich Gór (7,7%).

Tabela 1. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w różnych stadiach rozwojowych *Ixodes ricinus*

Stadia rozwojowe	Liczba analizowanych osobników	Liczba zakażonych kleszczy	Odsetek zakażonych
Larwy	0	0	0,0%
Nimfy	18	1	5,6%
Samce	27	6	22,2%
Samice	40	7	26,8%
Razem	85	14	16,5%

Rysunek 1 przedstawia rozdzał elektroforetyczny na żelu agarozowym produktów ampifikacji DNA izolowanego z 9 kleszczy. Obecność w żelu produktu reakcji PCR wielkości 442 par zasad świadczy o pozytywnym wyniku testu (próbki 4, 5, 7, 10). Zastosowana przez nas technika łańcuchowej reakcji polimerazowej DNA (PCR) pozwala na selektywną ampifikację wybranych regionów genu flagelliny w warunkach *in vitro* (Kur i wsp. 1996).



Rys. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato w izolatach kleszczy *Ixodes ricinus*. 1 – kontrola negatywna, 2–10 – produkty ampifikacji, 11 – marker wielkości DNA M1, 12 – kontrola pozytywna, ↘ – strzałki wskazują prążki obrazujące produkty reakcji PCR wielkości 442 par zasad

Badania obecności krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* prowadzone w Polsce i innych krajach wykazują duże zróżnicowanie częstości występowania zakażonych kleszczy. Najniższą ekstensywność zakażenia kleszczy w Polsce, 0,77% (koszalińskie, krośnieńskie, suwalskie), podała Tylewska-Wierzbanowska i wsp. (1996). W województwie olsztyńskim w 1993

roku stopień zakażenia kleszczy oceniono na 11–35% (Wegner i Stańczak 1995). Badania larw *Ixodes* prowadzone na Mazurach w latach 1992–1994 wykazały 3,5% zakażenia *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Siński i wsp. 1998). Na terenie Białowieskiego Parku Narodowego zakażenie kleszczy wynosiło 14,3% (Chodynicka i wsp. 1995). Na terenach województwa białostockiego w 1994 badania wykazały 4–15,6% zakażonych kleszczy (Wegner i Stańczak 1995). W województwie zamojskim, krakowskim, suwalskim i katowickim odsetek postaci dojrzałych kleszczy zakażonych krętkami wynosił ok. 4% a larw do 58,3% (Siński i wsp. 1994). Natomiast badania Stańczak i wsp. (1999) na terenie Katowic wykazały wysoki procent (37,5%) zainfekowanych kleszczy *Ixodes ricinus*.

W badaniach prowadzonych przez Wegner i wsp. (1997) w okolicach Trójmiasta w latach 1994–1995 metodą immunofluorescencji pośredniej (IFA) stwierdzono 10,5% zakażenia populacji kleszczy. Najwyższy poziom infekcji obserwowano u samców 18,9%, niższy u samic 14,9%, a najniższy u nimf 8,2%. Badania prowadzone przez Michalika i Rejmenciaka (1998) w okolicach Poznania z zastosowaniem metody immunofluorescencji (IFA) wykazały, że średnia ekstensywność zakażonych kleszczy wynosi 22,0% (w tym 20,5% nimf, 23,8% samców i 31,0% samic). Na terenach leśnych woj. szczecińskiego procent zakażenia kleszczy wynosił 12,57% (Skotarczak i Wodecka 1998). Badania prowadzone w 1996 roku przez Petko i wsp. (1997) na Śląsku wykazały najwyższy odsetek zakażonych kleszczy w lasach z okolic Mikołowa (17,8% samców i 12,7% samic) i najniższy na obszarze Wojewódzkiego Parku Kultury i Wypoczynku w Katowicach (5% samców i 2,9% samic). W późniejszym doniesieniu, obejmującym również dane z innych regionów Polski południowo-wschodniej, Petko (2002) podaje, że liczba zakażonych kleszczy wahała się od 4,0 do 15,0%.

Jenek i Głazaczow (1996) metodą PCR na terenie Wielkopolski wykryli DNA *Borrelia burgdorferi* u 24,5% kleszczy. W późniejszej pracy Jenek i Siuda (1997) dokonali analizy DNA *Borrelia burgdorferi*, również metodą PCR, z kolekcji muzealnej kleszczy zebranych w latach 1948–1987 na terenie Wielkopolski. Obecność krętków stwierdzono tylko w 5,6% populacji kleszczy, przy czym procentowy udział zakażonych nimf był wyższy i wynosił 21,4%. Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Nowosada i wsp. 1999 metodą PCR u kleszczy zebranych w lasach komunalnych Poznania (w latach 1997–1998) stwierdzono występowanie *Borrelia burgdorferi* sensu lato u 22,6% badanej populacji kleszczy, w tym stopień zakażenia nimf i samców był największy (25,6% i 27,3%), a larw najmniejszy (5,0%). Nie jest to zgodne z doniesieniami innych autorów z terenu Polski, gdzie średnia ekstensywność zakażenia jest wyższa u samców i samic niż u nimf, co potwierdzają również nasze badania. Duże zróżnicowanie częstości występowania *Borrelia burgdorferi* wśród kleszczy zależy nie tylko od warunków środowiskowych i czasu zebrania kleszczy, ale także od metody wykrywania bakterii. Przykładem na to jest praca Stańczak i wsp. (1997), którzy wykazali, że

w zależności od doboru rodzaju primerów uzyskiwali 45,5% lub 27,3% zakażonych kleszczy. W przedstawionej pracy posłużyliśmy się starterami BFL1/BFL2 dla genu fla, podobnymi do primerów użytych przez Stańczak i wsp. 1997 w przypadku większego odsetka wyników dodatnich.

Geograficzne rozmieszczenie kleszczy *Ixodes* jest ograniczone do umiarkowanej strefy klimatycznej półkuli północnej. Udział zakażonych kleszczy bardzo różni się pomiędzy poszczególnymi rejonami Europy i świata, (Mrozek-Budzyn 1999). Na terenach endemicznego występowania boreliozy w USA, odsetek kleszczy zarażonych przez *Borrelia burgdorferi* ocenia się na 61%. Natomiast w Niemczech zarażenie kleszczy na terenach endemicznego występowania boreliozy oceniono na 35% (Pfister i Weber 1991), a na pozostałych terenach 3–26% nimf i 11–34% w stadium dojrzałym. W Szwajcarii zarażenie kleszczy wynosiło 5–34%, w Szwecji w stadium nimfy 7–15% i 3–23% u imago. Najniższy procent zarażenia wykazano na Litwie 0,5–4% u nimf i 9–12% u imago (Prokopowicz 1995). Na Białorusi zarażenie *Ixodes ricinus* wynosiło 14,4–57,5% (Trofimov i wsp. 1995).

Przedstawione wyniki wskazują na to, że kleszcze *Ixodes ricinus* występujące w okolicach powiatu tarnogórskiego mogą być źródłem zakażeń *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

WNIOSKI

(1) Kleszcze *Ixodes ricinus* występujące na zalesionych, rekreacyjnych terenach powiatu tarnogórskiego są nosicielami krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

(2) Największe zagrożenie zakażenia człowieka boreliozą z Lyme występowało w lasach graniczących ze Świerklańcem.

LITERATURA

- Chodynicka B., Łukaszuk C., Pucilo K., Poczobut P., Flisiak I., Trybuła J. 1995. Wstępne badania nad występowaniem krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach na terenie Białostoczczyzny. *Materiały Międzynarodowego Sympozjum: Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze*. 28-29 kwiecień 1995, Białowieża, Polska, 56.
- Flisiak R., Żabicka J. 1995. Sytuacja epidemiologiczna boreliozy z Lyme w Europie. *Przegląd Epidemiologiczny* 49: 375–379.
- Jenek J., Głazaczow A. 1996. Ocena występowania krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* w wybranych rejonach Wielkopolski metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). *Przegląd Epidemiologiczny* 50: 383–386.
- Jenek J., Siuda K. 1997. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* z muzealnej kolekcji kleszczy ocenione metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). *Przegląd Epidemiologiczny* 51: 437–440.
- Johnson B., Happ C., Mayer L., Piesman J. 1992. Detection of *Borrelia burgdorferi* in ticks by species-specific amplification of the flagellin gene. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 6: 730–741.

- Kur J., Samet A., Juszczyk J., Gładysz A. 1996. PCR – nowa era w klinicznej diagnostyce mikrobiologicznej i badaniach epidemiologicznych? (Część I). *Przegląd Epidemiologiczny* 50: 219–225.
- Michalik J., Rejmenciak A. 1998. Occurrence of *Ixodes ricinus* in different types of forest habitats of the city of Poznań and their infection rate with *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 388.
- Mrozek-Budzyn D. 1999. Borelioza z Lyme. *Przegląd Epidemiologiczny* 53: 325–330.
- Nowosad A., Jenek J., Głazaczow A., Wal M. 1999. Kleszcze pospolite *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) z wybranych lasów komunalnych Poznania oraz ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Przegląd Epidemiologiczny* 53: 299–308.
- Petko B. 2002. Lyme borreliosis in Carpathian region of central Europe – ecological aspect of diagnostics. W: *Stawonogi w medycynie* (Red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Liber, Lublin, 93–104.
- Petko B., Siuda K., Stanko M., Tresova G., Karbowski G., Fricova J. 1997. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the *Ixodes ricinus* ticks in southern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 4: 263–269.
- Pfister H. W., Weber K. 1991. *Lyme borreliosis*. Editiones „Roche”, Basel, Switzerland.
- Prokopowicz D. 1995. Choroby przenoszone przez kleszcze. Wydawnictwo Fundacji Buchnera, Warszawa.
- Siński E. 2002. Transmisja *Borrelia* sp.: ekologiczne i fizjologiczne oddziaływania wektor – patogen – żywiciel. W: *Stawonogi w medycynie* (Red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Liber, Lublin, 81–91.
- Siński E., Karbowski G., Siuda K., Buczek A., Jongean F. 1994. Zakażenie kleszczy *Borrelia burgdorferi* w wybranych rejonach Polski. *Przegląd Epidemiologiczny* 48: 461–465.
- Siński E., Karbowski E., Marciniak T., Stelmaszczyk Z., Rijpkem S. 1997. Kleszcze *Ixodes ricinus* w szerzeniu zakażeń *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Problemy Higieny* 54: 116–121.
- Siński E., Pawelczyk A., Karbowski G. 1998. Current data about the reservoir for *Borrelia burgdorferi s.l.* in the district of Mazury lakes, Poland. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 396.
- Skotarczak B., Wodecka B. 1998. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi s.l.* u kleszczy *Ixodes ricinus* w lasach województwa szczecińskiego. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 227–232.
- Skotarczak B., Wodecka B. 2000. Zastosowanie łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrywania krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* w badaniach przesiewowych. *Folia Medica Cracoviensia* 41: 35–42.
- Stańczak J., Kubica-Biernat B., Burkiewicz A., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kur J. 1997. Wstępne badania nad zastosowaniem techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do wykrywania krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae). *Problemy Higieny* 54: 122–126.
- Stańczak J., Racewicz M., Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Dąbrowski J., Adamczyk A., Markowska M. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 6: 127–32.
- Trofimov N. M., Erofeeva N., Korzan A., Borisevitch S. 1995. Natural foci of Lyme disease in the south-westh regions of Belarus. *Materiały Międzynarodowego Sympozjum: Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze*. 28–29 kwiecień 1995, Białowieża, Polska, 66.
- Tylewska-Wierzbanowska S., Kruszewska D., Chmielewski T. 1996. Zastosowanie odczynu immunofluorescencji pośredniej i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) do wykrywania krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach. *Przegląd Epidemiologiczny* 50: 239–244.
- Wegner Z., Stańczak J. 1995. Rola kleszczy w epidemiologii boreliozy z Lyme. *Przegląd Epidemiologiczny* 49: 245–250.
- Wegner Z., Racewicz M., Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Stańczak J. 1997. Występowanie kleszczy *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na zalesionych obszarach Trójmiasta i ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi*. *Przegląd Epidemiologiczny* 51: 11–20.