

## PREWALENCJA ZAKAŻENIA KLESZCZY *I. RICINUS* KRĘTKAMI *BORRELIA BURGDORFERI* S.L.: SEZONOWE I ROCZNE ZMIANY

AGNIESZKA PAWEŁCZYK<sup>1</sup> I EDWARD SIŃSKI

Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1,  
02-096 Warszawa; <sup>1</sup>Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Instytut  
Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna, ul. Pawińskiego 3c,  
02-106 Warszawa

**ABSTRACT. Prevalence of *Ixodes ricinus* infection with *Borrelia burgdorferi* s.l.: seasonal and annual variations.** The present study deals with the ecology of Lyme borreliosis in Northern Poland. The complexity of environmental conditions are: (1) the presence of certain rodent hosts for the *Borrelia*, (2) the seasonal patterns of abundance and infection rate of *I. ricinus* in the population of rodents and on vegetation, (3) the prevalence of *B. burgdorferi* s.l., *B. garinii* and *B. afzelii*. The long-term studies were carried out on a monthly basis from April to October (1998-2001) in woodlands at Urwitałt near Mikołajki on the Mazury Lakes. Two methods of spirochate detection were used: indirect immunofluorescence assay (IFA) and polymerase chain reaction (PCR). The dynamics of ticks infestation, differences in infestation rates between years, months, age and sex for two species of rodents (*Clethrionomys glareolus*, *Apodemus flavicollis*) were analysed using the software package Statgraphics version 7 and GLIM 4 (statistical system for generalized linear interactive modeling, Royal Statistical Society 1993). We were able to demonstrate that in selected habitat of Mazury Lakes the spirochaetal agent of Lyme borreliosis occurs quite frequently, both in rodents and in vector – *I. ricinus*. Comparing *C. glareolus* and *A. flavicollis*, each rodent species showed different, seasonal and sex dependent, host infection with *Borrelia*. Due to the courses of prevalence of infection, both for partially engorged ticks and questing ticks, the risk of human infection seems to be highest in spring. The infection rate of engorged larvae was much higher than in questing larvae. We conclude that both species of rodents, highly abundant in the Mazury Lakes district, may represent significant zoonotic reservoir for *B. burgdorferi* s.l., *B. garinii* and *B. afzelii*.

**Key words:** *Borrelia afzelii*, *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *Ixodes ricinus*, Poland, small rodents.

### WSTĘP

Krążenie *Borrelia burgdorferi* s.l. w środowisku naturalnym oraz prewalencja zakażenia u ludzi zależą od czynników biotycznych, tj. od wysokiego zagęszczenia właściwego wektora i od obecności w danym biotopie zwierząt należących do grupy kompetentnego rezerwuaru, oraz od czynników abiotycznych (Randolph i Storey 1999). Kleszcze *I. ricinus* charakteryzuje wyraźny rytm aktywności sezonowej i okołodobowej (Gray 1985). Aktywność sezonowa (od wiosny do jesieni) charak-

teryzuje się zmianami zagęszczenia kleszczy w środowisku oraz zmianami w ekstensywności i intensywności infestacji żywicieli (Siuda 1993, Gray i wsp. 1997, Pawełczyk 2003). Rytm aktywności sezonowej kleszczy zależy przede wszystkim od czynników abiotycznych, tj. położenia geograficznego siedliska, warunków klimatycznych, a nawet mikroklimatycznych danego terenu (Lindgren i wsp. 2000). Rytm okołodobowe zależą od stadium rozwojowego kleszcza. Obserwowano dwa okresy szczególnej aktywności kleszczy w ciągu dnia: rano i wieczorem. Aktywność ta była bezpośrednio związana z warunkami abiotycznymi, oraz z trybem życia danego gatunku zwierzęcia będącego potencjalnym żywicielem kleszczy (Siuda 1991, Siński i Pawełczyk 1999, Estrada-Pena 2001, Pawełczyk 2003).

Dynamika sezonowa zakażeń kleszczy *I. ricinus* przez krętki *B. burgdorferi* s.l. na badanym terenie jest ściśle związana z wieloma czynnikami kształtującymi populacje kleszczy i ich żywicieli. Pogląd ten potwierdzają wyniki badań środowiskowych i laboratoryjnych prowadzonych w Zakładzie Parazytologii UW, których celem było wykazanie wzajemnych zależności pomiędzy czynnikami wewnątrz- i zewnątrz-populacyjnymi. Na podstawie zebranych wyników konstruowano przy użyciu programu GLIM (a statistical system for generalized linear interactive modeling) minimalne modele czynników wpływających na zarażenie kleszczy *I. ricinus* krętkami *Borrelia* (Bajer i wsp. 2001, Pawełczyk 2003).

#### MATERIAŁ I METODY

Badania prowadzono od kwietnia do października w latach 1998-2001 w Urwi-talcie k/Mikołajek. Materiał badawczy stanowiły kleszcze *I. ricinus* zbierane z roślinności oraz kleszcze pasożytujące na gryzoniach należących do dwóch gatunków: *Apodemus flavicollis* i *Clethrionomys glareolus*. Krętki *Borrelia* wykrywano testem immunofluorescencji pośredniej (IFA) oraz techniką PCR (Picken i wsp. 1996, Stańczak i wsp. 2000, Pawełczyk i Siński 2001). Izolacje genomowego DNA z kleszczy wykonano przy użyciu 0,7 M NH<sub>4</sub>OH (Rijpkema i wsp. 1996). Metodą IFA zbadano 1258 kleszczy zebranych z roślinności (671 larw, 331 nimf, 65 osobników dorosłych) oraz 1329 (1314 larw i 15 nimf) zebranych z odłowionych gryzoni; z *A. flavicollis* – 629 larw i 5 nimf, z *C. glareolus* – 695 larw i 10 nimf.

Do analizy wyników zastosowano test  $\chi^2$  kwadrat (w programie INSTAT) oraz techniki najwyższej wiarygodności opierające się na analizie log-liniowej tablic kontyngencji (ang. maximum likelihood technique based on log linear analysis of contingency tables), w programie Statgraphics Version 7. W zależności od tego, co stanowiło przedmiot analizy, konstruowano w programie GLIM 4 (wersja PC, Royal Statistical Society, UK) odpowiednie arkusze zawierające potrzebne dane (Tabela 1).

Tabela 1. Minimalny wystarczający model czynników wpływających na zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi* s.l. kleszczy *Ixodes ricinus*. Porównanie zakażenia kleszczy zebranych ze środowiska i z gryzoni

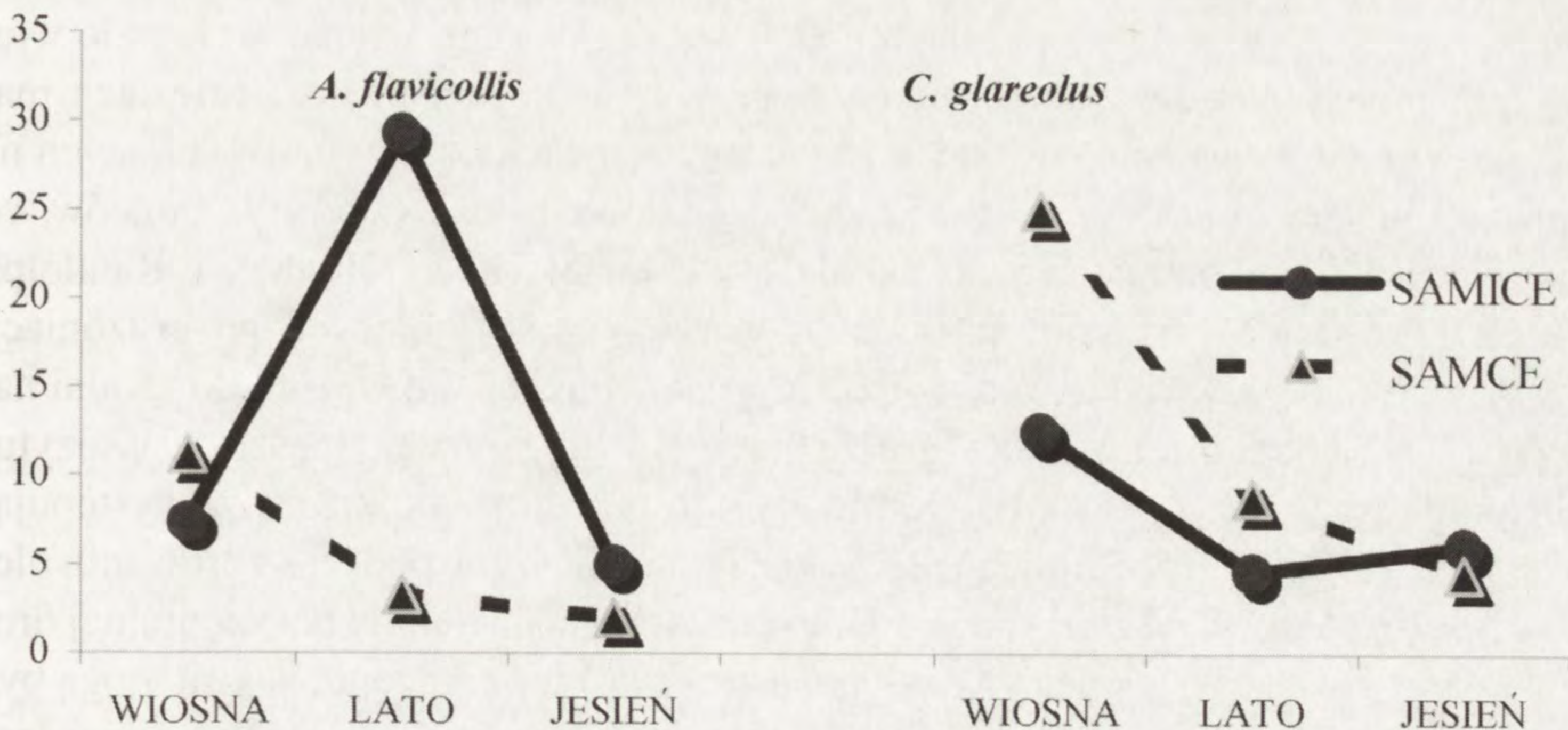
Główne interakcje tłumaczące zmienność danych <sup>1</sup>	Wpływ zmienności poszczególnych źródeł na model			Wartość dopasowania min. wystarczającego modelu		
	$\chi^2$	dof*	P**	$\chi^2$	dof*	P***
Stadium rozwojowe kleszczy x faza cyklu	7.51	1	0.0061			
Sezon x faza cyklu	22.45	2	0.0001	10.29	26	0.9974
Rok x faza cyklu	11.73	3	0.0063			

<sup>1</sup> – rok: 4 poziomy (1998, 1999, 2000, 2001); sezon: 3 poziomy (wiosna, lato, jesień); stadium rozwojowe kleszczy: 2 poziomy (larwy, nimfy); faza cyklu: 2 poziomy (zwierzęta, roślinność); zarażenie kleszczy krętkami: 2 poziomy (jest, brak);

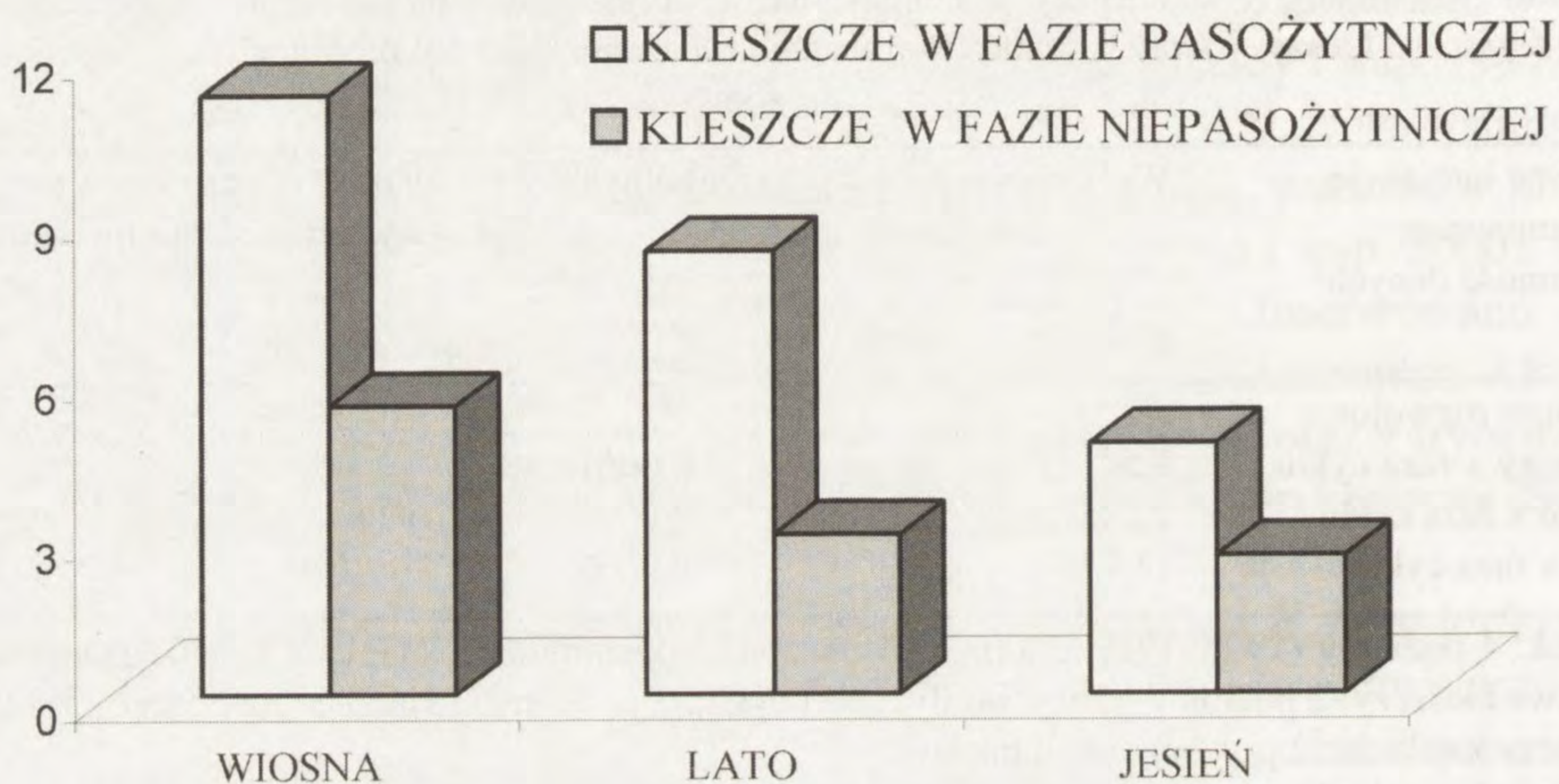
\* – stopnie swobody, \*\* – prawdopodobieństwo, że eliminacja wpływu czynnika/interakcji czynników nie będzie miała znaczącego wpływu na model, \*\*\* – prawdopodobieństwo, że dane nie różnią się znacząco od minimalnego modelu opisanego przez główne czynniki i interakcje czynników. Zakażenie badano testem IFA.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

Wykazano, że zakażenie krętkami *B. burgdorferi* s.l. kleszczy będących w fazie niepasżytniczej zależy przede wszystkim od stadium rozwojowego, fazy cyklu rozwojowego kleszczy oraz sezonu badań. Najwyższy odsetek kleszczy zakażonych (22,8%) stwierdzano wśród samic kleszczy. Odsetek zarażonych samców wynosił 13%, nimf – 10,5%, a larw – 7,4% (stadium x zakażenie:  $n = 1258$ ;  $\chi^2 = 7,51$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0,006$ ). Dane te wskazują na istnienie transmisji transstadialnej krętków oraz nabywanie zarażenia podczas żerowania kleszczy (Talleklint i Jaenson 1996,



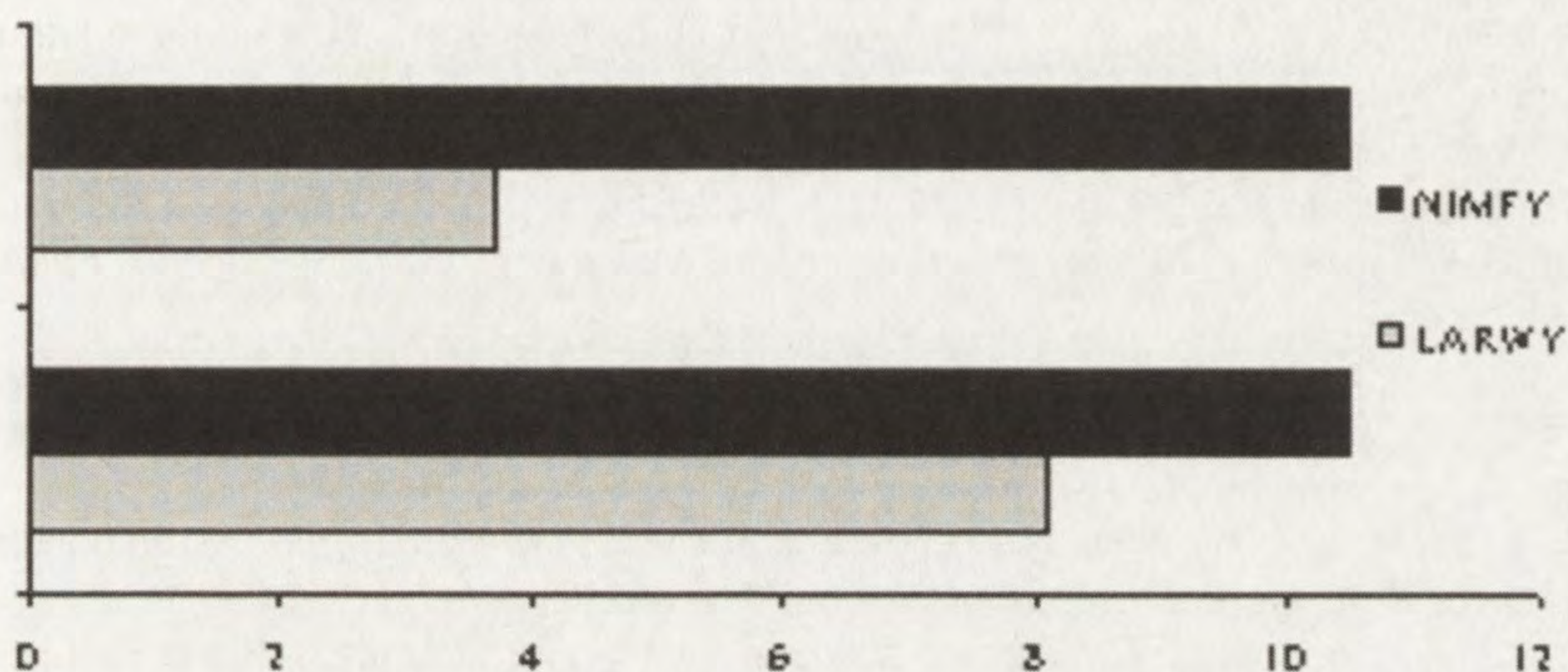
Rys. 1. Wpływ sezonu badań, gatunku i płci żywiciela na zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi* s.l. kleszczy *Ixodes ricinus* pasżytniczych na gryzoniach



Rys. 2. Porównanie zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi* s.l. kleszczy *Ixodes ricinus* pasożytujących na gryzoniach (faza pasożytnicza) i zebranych w środowisku (faza niepasożytnicza)

Siński i Pawełczyk 1999). Jest to bardzo istotne z medycznego i epidemiologicznego punktu widzenia, ponieważ to samice głównie pasożytują na ludziach. Od wiosny do jesieni obserwowano spadek *Borrelia* pozytywnych kleszczy z 11,7% do 2,6% (Rys. 1). Podobny rozkład zarażenia opisali Rijpkema i wsp. (1994) oraz Gern i wsp. (1999). Różnice dotyczące odsetka zakażenia przez krętki poszczególnych stadiów rozwojowych kleszczy wskazują na lokalny charakter występowania zakażenia krętkami *B. burgdorferi* s.l. w badanym środowisku.

Wykazano również istotne sezonowe różnice zakażenia larw krętkami *B. burgdorferi* s.l. w zależności od gatunku i płci badanych gryzoni. Najwięcej zarażonych kleszczy w przypadku *A. flavicollis* obserwowano wiosną na samcach, latem i jesienią na samicach (Rys. 1). W przypadku *C. glareolus* na samcach pasożytowało więcej zarażonych kleszczy niż na samicach, przy czym ekstensywność infestacji malała od wiosny do jesieni. Większy odsetek zarażonych kleszczy pasożytujących na samcach można tłumaczyć podwyższonym poziomem testosteronu u samców, co sprzyja transmisji patogenów w układzie wektor-żywiciel (Hughes i Randolph 2001). Porównano zarażenie krętkami u kleszczy pasożytujących na gryzoniach z zarażeniem kleszczy będących w fazie niepasożytniczej. Od wiosny do jesieni następował spadek zarażenia w obu grupach, przy czym zarażenie kleszczy pasożytujących na gryzoniach było kilkakrotnie wyższe niż zarażenie kleszczy występujących na roślinności (Rys. 2). Dane te wskazują, że kleszcze podczas żerowania ulegają zarażeniu krętkami *Borrelia*. Ponadto potwierdzają istnienie horyzontalnej drogi transmisji krętków, jak też wskazują na istotne źródło zakażenia, jakim mogą być gryzonie. Nimfy były częściej zarażone krętkami niż larwy (Rys. 3). Nie stwierdzono różnic w zarażeniu nimf wśród kleszczy pasożytujących na gryzoniach i wśród



Rys. 3. Porównanie zarażenia krętkami *Borrelia burgdorferi* s.l. larw i nimf *Ixodes ricinus* pasożytujących na gryzoniach (u dołu) i zebranych w środowisku (u góry)

osobników będących w fazie niepasożytniczej. Wyniki te można tłumaczyć transstadialną transmisją krętków z larw do nimf oraz możliwością zakażenia się nimf podczas żerowania na zainfekowanym żywicielu, przy niewielkim udziale transmisji transowarialnej (Nefedova i wsp. 2004). A zatem w przyrodzie występuje transmisja wertykalna i horyzontalna krętków *B. burgdorferi* s.l. W dalszej analizie wykazano dwa razy więcej zakażonych larw krętkami *Borrelia* wśród pasożytów zebranych z gryzoni niż zebranych ze środowiska (Rys. 3). Wyniki te potwierdzają hipotezę, że do zakażenia kleszczy przez *Borrelia* dochodzi w czasie żerowania na żywicielach wykazujących spirochetemię, lub podczas współżerowania na jednym żywicielu kleszczy zakażonych i niezakażonych (Gern i Rais 1996). Przedstawione wyniki jednoznacznie wskazują na wysokie ryzyko zarażenia ludzi krętkami *Borrelia* w badanym rejonie Pojezierza Mazurskiego.

#### LITERATURA

- Bajer A., Pawełczyk A., Behnke J.M., Gilbert F.S., Sinski E. 2001. Factors affecting the component community structure of haemoparasites in bank voles (*Clethrionomys glareolus*) from the Mazury Lake District region of Poland. *Parasitology* 122: 43-54.
- Estrada-Pena A. 2001. Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology* 98: 111-132.
- Gern L., Rais O. 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33: 189-192.
- Gern L., Hu C.M., Kocianova E., Vyrostekova V., Rehacek J. 1999. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *European Journal of Epidemiology* 15: 665-669.
- Gray J.S. 1985. Studies on the larval activity of the tick *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. *Experimental and Applied Acarology* 1: 307-316.
- Gray J.S., Robertson J.N., Kahl O. 1997. Lyme borreliosis and other emerging tick-borne zoonoses in Europe. In: *Modern perspectives on zoonoses* (Ed. C.V. Holland): 84-94.
- Hughes V.L., Randolph S.E. 2001. Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology* 123: 365-371.

- Lindgren E., Talleklint L., Polfeldt T. 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environmental Health Perspectives* 108: 119-123.
- Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B., Kovalevskii Y.V. 2004. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitologica* 51: 67-71.
- Pawełczyk A. 2003. Rola dziko żyjących gryzoni w utrzymywaniu w przyrodzie źródeł infekcji *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Parazytologii Uniwersytetu Warszawskiego.
- Pawełczyk A., Siński E. 2001. Współwystępowanie *Borrelia garinii* i *B. afzelii* wśród populacji gryzoni leśnych. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 741-746.
- Picken R.N., Cheng Y., Strle F., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Ruzic Sablijic E., Han D., Nelson J.A., Picken M.M., Trenholme G.M. 1996. Molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Slovenia revealing significant differences between tick human isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15: 313-323.
- Randolph S.E., Storey K. 1999. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology* 36: 741-748.
- Rijpkema S., Nieuwenhuijs J., Franssen F.F.J., Jongejan F. 1994. Infection rates of *Borrelia burgdorferi* in different instars *Ixodes ricinus* ticks from the Dutch North Sea island of Ameland. *Experimental and Applied Acarology* 18: 531-542.
- Rijpkema S., Golubić D., Molkenboer M., Verbeek-De Kruif N., Schellekens J. 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental and Applied Acarology* 20: 23-30.
- Siński E., Pawełczyk A. 1999. Detection of reservoirs for Lyme borreliosis in the Mazury Lakes District, Poland. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 698-703.
- Siuda K. 1991. Kleszcze Polski (Acari: Ixodida). Część I: Zagadnienia ogólne. PWN, Warszawa.
- Siuda K. 1993. Kleszcze Polski (Acari: Ixodida). Część II: Systematyka i rozmieszczenie. PTP, Warszawa.
- Stańczak J., Kubica-Biernat B., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kur J. 2000. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* tick collected in different regions of Poland. *International Journal of Medical Microbiology* 290: 559-556.
- Talleklint L., Jaenson T.G.T. 1996. Seasonal variations in density of questing *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs and prevalence of infection with *B. burgdorferi* s.l. in south central Sweden. *Journal of Medical Entomology* 33: 592-597.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004