

Znaczenie jeleni (*Cervus elaphus*) w ekologii *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Significance of red deer (*Cervus elaphus*) in the ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Beata Wodecka

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin;
E-mail: Beata.Wodecka@univ.szczecin.pl

ABSTRACT. Background. Red deer (*Cervus elaphus*) is one of the most important host of the adult tick (*Ixodes ricinus*) which is the basic vector of the Lyme disease causative agent — *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. The aim of the present study was to establish the role of red deer in the transmission of *B. burgdorferi* s.l. **Material and methods.** Tissues from 74 red deers were evaluated and the presence of *B. burgdorferi* s.l DNA was identified using nested PCR technique based on *fla* gene. The identification of species belonging to *B. burgdorferi* s.l complex was performed after restriction digestion of nested PCR product with *DdeI* enzyme and sequencing of nested PCR product. The study included also 55 isolates of *I. ricinus* females removed from red deer and 466 ticks (73 adult and 393 nymphs) collected from the vegetation in the area where the red deer lives. **Results.** There were no DNA of *B. burgdorferi* s.l complex in the red deer tissues and in ticks removed from deer, however in one tick removed from deer the DNA of other *Borrelia* species — *B. miyamotoi* was identified. In ticks collected from vegetation 3 species belonging to *B. burgdorferi* s.l. complex were identified: *B. garinii* (3.2% ticks studied), *B. afzelii* (6.9%) and *B. valaisiana* (3.6%), however DNA of *B. miyamotoi* was absent. These results confirm inability of survival of *B. burgdorferi* s.l. species in tick *I. ricinus* feeding on red deer blood. However there is a possibility of survival of *B. miyamotoi* in presence of deer blood at least in ticks feeding on red deer. The main role of red deer in keeping the constant infection level of *B. burgdorferi* s.l. in the whole population of *I. ricinus* ticks does not concern *B. miyamotoi*.

Key words: *Borrelia*, red deer, reservoir.

Wstęp

Cykl życiowy bakterii wywołujących boreliozę z Lyme, krętków należących do kompleksu *Borrelia burgdorferi*, oparty jest na naprzemiennym bytowaniu w organizmie zwierząt stałocieplnych będących jego rezerwuarem (głównie ssaków i ptaków) oraz zmiennocieplnych stawonogów pełniących rolę wektora tych krętków — kleszczy z rodzaju *Ixodes* [1, 2]. Na kontynencie europejskim głównym wektorem *B. burgdorferi* s.l. jest kleszcz pospolity *I. ricinus*, który bierze udział w rozprzestrzenianiu wszystkich siedmiu wykrytych w Europie gatunków należących do tego kompleksu, tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. lusitanae*, *B. bissettii* i *B. spielmani* [3-9]. Jednak mimo

braku specyficzności w stosunku do gatunku wektora wymienione gatunki krętków charakteryzują się zróżnicowaną przeżywalnością w organizmie różnych gatunków kręgowców będących żywicielami *I. ricinus* [10]. Dotychczas ustalono, że duże ssaki leśne, między innymi sarny, jelenie i dziki, które są podstawowymi żywicielami stadium dojrzałego *I. ricinus*, nie mogą pełnić roli rezerwuaru gatunków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. Nie ma natomiast jednoznacznych ustaleń dotyczących zdolności przeżywania tych krętków w kleszczach opitych krwią wymienionych gatunków ssaków. Istnieją dane przemawiające zarówno za możliwością ich przeżywania w obecności krwi jeleni [11], czy

nawet krótkotrwałym przebywaniem w ich skórze [12, 13], jak i brakiem możliwości przeżycia [10, 13]. Z tego względu w prezentowanej pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie dotyczące roli jeleni w rozprzestrzenieniu gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. na bazie ich wzajemnych interakcji.

Material i metody

Stanowisko badań. Materiał do badań pozyskano z terenów łowieckich zlokalizowanych w okolicach Dobrej Szczecińskiej na terenie Puszczy Wkrzańskiej w województwie zachodniopomorskim. Teren ten pokryty jest lasem mieszanym z przewagą sosny zwyczajnej (*Pinus silvestris*), dębu bezszypułkowego (*Quercus sessilis*) i buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica*), stanowi więc typowe środowisko bytowania kleszcza *I. ricinus*.

Pozyskiwanie materiału do badań. Materiałem do badań była krew i wycinki narządów (nerka, płuco, serce, wątroba, śledziona) oraz najedzone kleszcze *I. ricinus* pobrane przez myśliwych z 74 jeleni, upolowanych jesienią w latach 2004 i 2005. Krew zawieszoną w 10% roztworze EDTA (9:1 obj.) oraz wycinki narządów przechowywano w -70°C do czasu izolacji DNA.

Zbiór kleszczy z roślinności. Kleszcze poszukujące żywiciela zbierano z roślin w czerwcu oraz w październiku 2005 roku na obszarze, gdzie wcześniej odbywał się odstrzał zwierząt. Zbiór odbywał się przy użyciu flanelowej flagi o wymiarach 1 x 1,2 m, którą omiatano rośliny do wysokości 1 m. Kleszcze umieszczano w probówkach typu Eppendorf i przechowywano w -20°C do czasu izolacji DNA.

Izolacja DNA. DNA z krwi i narządów jeleni oraz z kleszczy izolowano przy użyciu gotowego zestawu do izolacji MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, Madison, WI, USA), zawieszano w buforze TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) i przechowywano w temperaturze -70°C do czasu analiz.

Wykrywanie DNA *B. burgdorferi* s.l. metodą nested PCR. Markerem do wykrywania DNA *B. burgdorferi* s. l. był gen *fla* kodujący białko rzęskowe flagelinę. Detekcję fragmentu genu *fla* przeprowadzono metodą nested PCR z zastosowaniem 2 par starterów opracowanych przy użyciu oprogramowania DNAMAN 5.2.9 (Lynnon Biosoft, Kanada). W pierwszej reakcji zastosowano startery 132f (5'-TGGTATGGGAGTTTCTGG-3') i 905r (5'-TCTGTCATTGTAGCATCTTT-3') dające produkt długości 774 pz, zaś w drugiej startery

220f (5'-CAGACAACAGAGGGAAAT-3') i 823r (5'-TCAAGTCTATTTTGGAAAGCACC-3'), komplementarne do sekwencji amplifikowanej przy użyciu starterów 132f i 905r, a produkt tej reakcji miał długość 604 pz.

Mieszanina reakcyjna o objętości 10 μl zawierała: 0,5 U polimerazy Allegro Taq DNA (Novazym, Poznań), 70 mM Tris-HCl (pH 8,6 w 25°C), 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 mM MgCl_2 , 0,75 μM każdego z trójfosforanów deoksyrybonukleozydów, oraz 2 pmol każdego z pary starterów, 132f i 905r lub 220f i 823r. Matrycę w reakcji ze starterami 132f i 905r stanowił 1 μl zawiesiny DNA wyizolowanego z tkanek jeleni lub z kleszczy, a w reakcji ze starterami 220f i 824r 1 μl 10-krotnie rozcieńczonej mieszaniny poreakcyjnej uzyskanej ze starterami 132f i 905r. Kontrolę dodatnią stanowił DNA szczepu Bo-148c/2 *B. burgdorferi* s.s. uzyskany dzięki uprzejmości dr. J. Stańczak (Akademia Medyczna w Gdańsku), a kontrolę negatywną — woda sterylna.

Warunki reakcji były następujące: denaturacja wstępna w 94°C przez 10 min., 40 cykli obejmujących denaturację w 94°C przez 30 s, przyłączanie starterów w 50°C (startery 132f i 905r) lub 54°C (startery 220f i 824r) przez 45 s oraz wydłużanie łańcucha DNA w 72°C przez 1 min., a także wydłużanie końcowe w 72°C przez 7 min. Produkty reakcji rozdzielano na 2% żelu agarozowym (ICN, USA) barwionym bromkiem etydyny (Sigma-Aldrich, Niemcy) w buforze TBE (0,089 M Tris, 0,089 M kwasu borowego, 0,002 M EDTA) i archiwizowano w pamięci komputera przy użyciu programu BioCapt (Vilber Lourmat, Francja). W celu minimalizacji zanieczyszczeń, procesy izolacji DNA, przygotowania mieszaniny reakcyjnej i elektroforezy przeprowadzono w odrębnych pomieszczeniach.

Identyfikacja gatunków kompleksu *B. burgdorferi* s.l. metodą PCR-RFLP. DNA zamplifikowany przy użyciu starterów 220f i 824r poddano trawieniu enzymem restrykcyjnym *DdeI* (Sigma-Aldrich). Enzym *DdeI* wybrano na podstawie analizy sekwencji genu *fla* uzyskanych z Banku Genów, którą przeprowadzono przy użyciu programu DNAMAN. Analiza wykazała możliwość uzyskania 6 zróżnicowanych wzorów restrykcyjnych, na podstawie których identyfikuje się 6 gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l.: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* i *B. bissettii* [3–6, 8, 9, 14]. Produkty trawienia rozdzielano na 3% żelu agarozowym i archiwizowano według wcześniejszego opisu.

Sekwencjonowanie genu *fla*. W celu potwierdzenia przynależności gatunkowej krętków, których DNA uzyskano w reakcji nested PCR i analizowano metodą PCR-RFLP, fragmenty genu *fla* uzyskane ze starterami 220f i 824r poddano sekwencjonowaniu w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk (Warszawa). Uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami szczepów referencyjnych pochodzących z Banku Genów (GeneBank) przy użyciu programu DNAMAN.

Wyniki

Zarażenie jeleni kleszczami *I. ricinus*. Z 27 (29,7%) badanych zwierząt zebrano ogółem 55 najedzonych samic *I. ricinus*. Średnia zarażenia wynosiła 2,03 (Tabela 1).

***Borrelia burgdorferi* s.l. w najedzonych kleszczach i w jeleniach.** Badanie metodą nested PCR nie wykazało obecności DNA *B. burgdorferi* s.l. w narządach i krwi badanych jeleni (Tabela 2). Spośród 55 usuniętych ze zwierząt najedzonych samic *I. ricinus*, DNA *Borrelia* wykryto tylko u 1 (1,8%) osobnika (Tabela 2), a przy użyciu metody PCR-RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *DdeI* stwierdzono w badanej próbce nietypowy wzór restrykcyjny.

***Borrelia burgdorferi* s.l. w kleszczach zebranych z roślinności.** Ogółem na obecność DNA *B. burgdorferi* s.l. przebadano metodą PCR 466 kle-

szczy (393 nimfy, 73 dorosłe osobniki) poszukujących żywicieli, zebranych z roślin w Puszczy Wkrzańskiej. DNA *B. burgdorferi* s.l. wykryto u 13,7% kleszczy *I. ricinus* (Tabela 3). Na podstawie analizy PCR-RFLP ustalono, że przeważającym gatunkiem w nimfach był *B. afzelii* (52,6% zakażonych osobników), natomiast w stadium imago nieznacznie przeważał *B. garinii* (42,9% zakażonych osobników). Trzecim gatunkiem wykrytym w niejedzonych kleszczach był *B. valaisiana* (Tabela 3).

Sekwencjonowanie fragmentu genu *fla*. Sekwencjonowanie objęło 5 prób reprezentujących różne izolaty i gatunki *Borrelia*, zidentyfikowane na podstawie wzorów restrykcyjnych, tj. 2 o wzorach restrykcyjnych charakterystycznych dla *B. afzelii*, oraz po 1 próbce o wzorze charakterystycznym dla *B. garinii* i *B. valaisiana*, a także 1 o nietypowym wzorze restrykcyjnym. Sekwencjonowanie potwierdziło przynależność badanych prób do gatunków zidentyfikowanych na podstawie wzorów restrykcyjnych. Dodatkowy wzór zidentyfikowano na podstawie sekwencji DNA jako *B. miyamotoi* (Rys. 1). Uzyskane sekwencje zgłoszono do Banku Genów (Tabela 4).

Dyskusja

Małe i średnie ssaki oraz ptaki leśne, będące żywicielami larw i nimf *I. ricinus*, pełnią rolę rezerwu-

Tabela 1. Zarażenie jeleni (*Cervus elaphus*) przez dojrzałe stadium *I. ricinus* jesienią (lata 2004 i 2005) na terenie Puszczy Wkrzańskiej

Table 1. Infestation of red deer (*Cervus elaphus*) with adult *I. ricinus* ticks on autumn (in the years 2004 and 2005) in Wkrzańska Forest

Rok	Liczba badanych zwierząt	Liczba (%) zwierząt infestowanych	Liczba zebranych kleszczy	
			ogółem	na 1 zwierzęciu ± SD
2004	58	21 (36,2)	41	1,95 ± 4,05
2005	16	6 (37,5)	14	2,33 ± 1,67
Razem	74	27 (36,5)	55	2,03 ± 3,97

Tabela 2. Występowanie krętków z rodzaju *Borrelia* w jeleniach infestowanych kleszczami *I. ricinus* oraz w samicach kleszczy zebranych z tych jeleni z Puszczy Wkrzańskiej

Table 2. Distribution of *Borrelia* spirochetes in red deer infested with *I. ricinus* and in *I. ricinus* females removed from red deer in Wkrzańska Forest

Sezon/rok	Jelenie		Samice <i>I. ricinus</i>
	Liczba zwierząt badanych/zakażonych ¹ (%)	Liczba (%) infestowanych ¹ co najmniej 1 zakażonym kleszczem	Liczba kleszczy badanych/zakażonych (%)
Jesień 2004	21/0 (0)	1 (4,8)	41/1 (2,4)
Jesień 2005	6/0 (0)	0 (0)	14/0 (0)
Jelenie ogółem	27/0 (0)	1 (3,7)	55/1 (1,8)

¹Termin „zakażonych” odnosi się do występowania krętków w organizmie żywicieli; termin „infestowanych” — do występowania kleszczy na żywicielu

Tabela 3. Gatunki *Borrelia* wykryte w kleszczach *I. ricinus* zebranych z roślin w 2005 roku oraz zebranych z jeleni w latach 2004-2005 na terenie Puszczy Wkrzańskiej

Table 3. *Borrelia* species detected in *I. ricinus* ticks collected from vegetation in the year 2005 and removed from red deer in 2004-2005 in Wkrzańska Forest

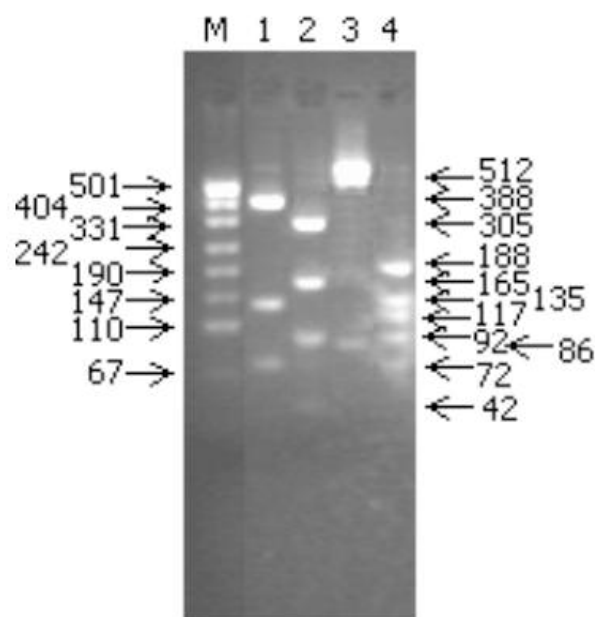
Źródło kleszczy	Stadium kleszczy	Liczba badanych/PCR pozytywnych (%)			Liczba kleszczy zakażonych gatunkiem			
		ogółem	wiosna	jesień	Bg	Ba	Bv	Bm
Rośliny	nimfy	393/57 (14,5)	207/33 (15,9)	187/24 (12,8)	12	30	15	0
	dorośle	73/7 (9,5)	24/5 (20,0)	48/2 (4,2)	3	2	2	0
	ogółem	466/64 (13,7)	231/38 (16,5)	235/26 (11,1)	15	32	17	0
Jelenie	dorośle	55/1 (0,8)	—	55/1 (0,8)	0	0	0	1

Bg — *B. garinii*, Ba — *B. afzelii*, Bv — *B. valaisiana*, Bm — *B. miyamotoi*.

aru dla poszczególnych gatunków kompleksu *B. burgdorferi* s.l., przenoszonych przez ten gatunek kleszcza w Europie [1, 2, 7]. Kwestionowana jest jednak możliwość pełnienia roli rezerwuaru przez dzikie przeżuwacze, które są głównymi żywicielami stadium imago kleszczy *I. ricinus* [1, 2].

Uznanie danego gatunku zwierzęcia za rezerwu- ar *B. burgdorferi* s.l. opiera się na założeniu, że krętki te są w stanie przeżyć w jego organizmie. Analizując krążenie *B. burgdorferi* s.l. w przyrodzie oraz rolę, jaką odgrywają w nim poszczególne gatunki żywicieli kleszczy przenoszących te krętki, należy rozpatrywać trzy możliwe scenariusze zdarzeń [2, 10, 15]. Po pierwsze, bakterie mogą przeżywać w organizmie żywiciela kleszcza do czasu rozwinięcia infekcji, i taki gatunek zwierzęcia określany jest jako zdolny do pełnienia roli rezerwuaru *B. burgdorferi* s.l. Gatunek taki umożliwia najskuteczniejsze rozprzestrzenienie krętków, gdyż pochodzące od jednego zakażonego kleszcza bakterie mogą zakażać wiele kleszczy żerujących na zainfekowanym przez niego zwierzęciu. Po drugie, bakterie mogą być eliminowane z organizmu żywiciela na skutek lizy komórki bakteryjnej wywoływanej przez kompleks białek zawarty w surowicy kręgowca, podczas gdy oddziaływanie surowicy na bakterie pozostające w treści jelitowej żerującego kleszcza jest na tyle słabe, że są one w stanie przeżyć w jego treści jelitowej. W tym przypadku krętki pozostające

w trakcie żerowania kleszcza w jego treści jelitowej mogą zostać transstadialnie przekazane na kolejne pokolenie i stanowią źródło zakażenia dla kolejnego żywiciela. Sposób ten jest mniej wydajny niż zakażenie za pośrednictwem kręgowca, gdyż zakażony pozostaje tylko jeden kleszcz. Trzeci przypadek ma miejsce, gdy działanie lizujące surowicy danego gatunku kręgowca jest na tyle silne, że jest w stanie wyeliminować krętki zarówno z organizmu kręgow-



Rys. 1. Wzory restrykcyjne uzyskane na bazie fragmentu genu *fla* trawionego enzymem restrykcyjnym *DdeI*. M — marker masowy MW 501, ścieżki 1-4 — wzory restrykcyjne produkowane przez cztery gatunki *Borrelia*: 1 — *B. garinii*, 2 — *B. afzelii*, 3 — *B. miyamotoi*, 4 — *B. valaisiana*

Fig. 1. *DdeI* restriction patterns obtained on the basis of *fla* gene fragment of *Borrelia* strains from ticks. M — molecular weight marker MW 501, lanes 1-4 — restriction patterns produced by four *Borrelia* species: 1 — *B. garinii*, 2 — *B. afzelii*, 3 — *B. miyamotoi*, 4 — *B. valaisiana*

Tabela 4. Numery akcesyjne sekwencji genu *fla* krętków *Borrelia* zgłoszonych do Banku Genów

Table 4. Accession numbers of *fla* gene sequences of *Borrelia* submitted to GeneBank

Gatunek <i>Borrelia</i>	Próba	Numer akcesyjny
<i>B. afzelii</i>	RP11N7-05	DQ650334
	ST28N7-05	DQ650335
<i>B. garinii</i>	T32-5-05	DQ650336
<i>B. valaisiana</i>	BA9F9-05	DQ650330
<i>B. miyamotoi</i>	WL10-6-05	DQ650338

ca, jak i z kleszcza, przez co uniemożliwione jest rozprzestrzenienie tej puli krętków. Kurtenbach i wsp. [2, 15], badając stopień lizy komórki bakteryjnej różnych gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. w obecności surowic 14 gatunków ssaków stwierdzili, że surowica jelenia (*C. elaphus*) eliminuje wszystkie gatunki krętków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. w czasie nieprzekraczającym 24 godziny od momentu wnikięcia do jego organizmu. Ponieważ *B. burgdorferi* s.l. po wnikięciu do organizmu żywiciela może przebywać nawet do 4 tygodni w jego skórze, zanim rozpocznie wędrówkę do tkanek i narządów [16, 17], czas w którym surowica jelenia jest w stanie wyeliminować krętki z organizmu uniemożliwia rozwinięcie trwałej infekcji u tego gatunku.

W prezentowanej pracy badania przeprowadzono na wycinkach tkanek pochodzących z jeleni upolowanych w sezonie jesiennym 2004 i 2005 roku. Ograniczenie badań do sezonu jesiennego związane było z sezonem polowań na *C. elaphus*, w którym możliwe było pozyskanie materiału do badań, co utrudniało pełną analizę aktywności żerowania kleszcza *I. ricinus* na jeleniach. Z przeprowadzonych badań dotyczących aktywności *I. ricinus* poszukujących żywiciela wynika, że w sezonie jesiennym kleszcze *I. ricinus* wykazują mniejszą aktywność w porównaniu do sezonu wiosennego [18–20]. Wykryte w prezentowanej pracy zarażenie jeleni przez *I. ricinus* nie było znaczące, gdyż spośród 74 zwierząt obecność kleszczy stwierdzono u 36,5%, a średni stopień infestacji wynosił nieco ponad 2 osobniki na jedno zwierzę. W analogicznych badaniach, przeprowadzonych na sarnach w sezonie wiosennym i jesiennym, wykazano wyższy stopień ich zarażenia oraz większą liczbę kleszczy przypadających na jedno zwierzę w sezonie wiosennym (dane niepublikowane).

Badanie jeleni na obecność DNA *B. burgdorferi* s.l. metodą PCR dało wynik ujemny zarówno w izolatach DNA z tkanek jeleni, jak i zebranych z nich kleszczy. DNA krętków *Borrelia* wykryto w jednym izolacie z kleszcza usuniętego z jelenia. Gatunek *B. miyamotoi*, którego DNA wykryto w opitym krwią jelenia kleszczu, nie należy jednak do kompleksu *B. burgdorferi* s.l., lecz do grupy borelii wywołujących gorączki powrotne (relapsing fever borreliae) [21]. Jednakże DNA tego gatunku nie wykryto ani we krwi, ani w tkankach jelenia, z którego pochodził zakażony kleszcz, należy więc przypuszczać, że źródłem zakażenia był w tym przypadku jedynie kleszcz. Z badań, które przeprowadzili Kur-

tenbach i wsp. [10, 15] wynika, że bakterie z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. są w stanie przetrwać kilka godzin w niesprzyjającym ich przeżyciu środowisku, jakim jest organizm gatunku zwierzęcia nie pełniącego roli rezerwuaru tych krętków. W organizmie jelenia, w którym czas przeżywania *B. burgdorferi* s.l. ograniczony jest do 24 godzin, wykrycie krętków w tym krótkim okresie jest możliwe tylko w skórze. Pichon i wsp. [13] wykryli metodą PCR DNA *B. burgdorferi* s.l. w skórze kończyn jeleni, których wycinki pobrano ze świeżo upolowanych zwierząt i poddano hodowli. Badania te potwierdzają obserwacje dotyczące możliwości przetrwania niewielkiej liczby bakterii *B. burgdorferi* s.l. we wczesnym etapie infekcji w organizmie jelenia, która jednak nie rozwija się dalej ze względu na skuteczny mechanizm eliminacji krętków przez surowicę *C. elaphus* w miarę upływu czasu [15]. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy potwierdzają, że gatunki z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. są eliminowane zarówno w samym organizmie jelenia, jak i w kleszczu najedzonym krwią tego gatunku zwierzęcia. Jednakże wykrycie gatunku *B. miyamotoi* w organizmie w pełni najedzonej samicy kleszcza świadczy o tym, że gatunek ten jest bardziej odporny na działanie surowicy jelenia poza jego organizmem.

Na terenach, z których pochodziły upolowane zwierzęta, wykryto w kleszczach zebranych z roślinności trzy występujące w Europie gatunki z kompleksu *B. burgdorferi* s.l., tj. *B. garinii*, *B. afzelii* i *B. valaisiana*. Gatunki były wcześniej wykrywane również w kleszczach zebranych z roślinności na terenie północno-zachodniej Polski [22, 23]. W kleszczach zebranych z roślinności nie wykryto gatunku *B. miyamotoi*, dlatego jego rozprzestrzenienie wymaga dalszych badań.

Kleszcze zebrane z roślinności wykazywały niższy stopień zakażenia przez *B. burgdorferi* s.l. w sezonie jesiennym, niż kleszcze zebrane z jeleni zwłaszcza w stadium imago, co zgadza się z danymi z terenu Pomorza Zachodniego uzyskanymi we wcześniejszych badaniach [22, 24, 25]. Jedną z przyczyn tego zjawiska może być obecność na badanym obszarze gatunków zwierząt, które przyczyniają się do eliminacji krętków *B. burgdorferi* s.l. z kleszczy. W sezonie wiosennym, kiedy *I. ricinus* aktywnie poszukuje żywiciela, żerując na jeleniach pozbawiany jest *B. burgdorferi* s.l., co dotyczy zwłaszcza stadium nimfy i postaci dojrzałej, dlatego w sezonie jesiennym zakażenie tych stadiów kleszczy może być niższe.

Literatura

- [1] Gern L., Estrada-Pena A., Frandsen F., Gray J.S., Jansen T.G., Jongejan F., Kahl O., Korenberg E., Mehl R., Nuttall P.A. 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Zentralblatt für Bakteriologie* 287: 196–204.
- [2] Kurtenbach K., Schafer S.M., Sewell H.S., Peacey M., Hoodless A., Nuttall P.A., Randolph S.E. 2002. Differential survival of Lyme borreliosis spirochetes in ticks that fed on birds. *Infection and Immunity* 70: 5893–5895.
- [3] Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A. 1992. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42: 3782–383.
- [4] Canica M.M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton G., Postic D. 1993. Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 25: 441–448.
- [5] Johnson R.C. 1984. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiological agent of Lyme disease. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34: 496–497.
- [6] Le Fleche A., Postic D., Girardet K., Peter O., Baranton G. 1997. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 921–925.
- [7] Richter D., Schlee D.B., Allgower R., Matuschka F.R. 2004. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 6414–6419.
- [8] Strle F., Picken R.N., Cheng Y., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljić E., Picken M.M. 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis causing by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clinical Infectious Diseases* 25: 273–280.
- [9] Wang G., van Dam A.P., Le Fleche A., Postic D., Peter O., Baranton G., de Boer R., Spanjaard L., Dankert J. 1997. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 926–932.
- [10] Kurtenbach K., De Michelis S., Etti S., Schafer S.M., Sewell H.-S., Brade V., Kraiczy P. 2002. Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato — the key role of host complement. *Trends in Microbiology* 10: 74–79.
- [11] Telford S.R., Mather T.N., Moore S.I., Wilson M.L., Spielman A. 1988. Incompetence of deer as reservoirs of the Lyme disease spirochete. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39: 105–109.
- [12] Kimura K., Isogai E., Isogai H., Kamewaka Y., Nishikawa T., Ishii N., Fujii N. 1995. Detection of Lyme disease spirochetes in the skin of naturally infected wild sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1641–1642.
- [13] Pichon B., Gilot B., Perez-Eid C. 2000. Detection of spirochaetes of *Borrelia burgdorferi* complexe in the skin of cervids by PCR and culture. *European Journal of Epidemiology* 16: 869–873.
- [14] Wodecka B. 2005. Gen *fla* jako marker do identyfikacji genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato występujących w Europie. W: Doskonalenie metod wykrywania oraz ocena zagrożeń w zakresie chorób odzwierzęcych i skażeń żywności. (red. T. Wijaszka). PIWet PIB, Puławy: 61–67.
- [15] Kurtenbach K., Sewell H.-S., Ogden N.H., Randolph S.E., Nuttall P.A. 1998. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infection and Immunity* 66: 1248–1251.
- [16] Gern L., Rais O. 1996. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33: 189–192.
- [17] Randolph S.E., Gern L., Nuttall P.A. 1996. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today* 12: 472–479.
- [18] Skotarczak B., Soroka M., Wodecka B. 1999. Występowanie *Ixodes ricinus* na wybranych terenach rekreacyjnych województwa szczecińskiego. Część I. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 507–517.
- [19] Skotarczak B., Wodecka B. 2000. Występowanie *Ixodes ricinus* na wybranych terenach rekreacyjnych województwa szczecińskiego. Część II. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 265–272.
- [20] Skotarczak B., Wodecka B. 2002. Występowanie *Ixodes ricinus* na wybranych terenach byłego województwa szczecińskiego. III. *Wiadomości Parazytologiczne* 48: 201–206.
- [21] Fukunaga M., Takahashi Y., Tsuruta Y., Matsushita O., Ralph D., McClelland M., Nakao M. 1995. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45: 804–810.
- [22] Wodecka B. 2004. Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. W: Stawonogi: interakcje pasożyt-żywiciel. (Red. A. Buczek, C. Błaszak). Liber, Lublin: 185–191.
- [23] Wodecka B., Skotarczak B. 2005. First isolation of *Borrelia lusitaniae* DNA from *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 37: 27–34.

[24] Wodecka B. 2003. Detection of DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks in north-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 171–178.

[25] Wodecka B., Sawczuk M. 2004. Występowanie chorobotwórczych genogatunków z obrębu *Borrelia*

burgdorferi sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* odławianych z północno-zachodniej Polski. *Wiadomości Parazytologiczne* 50: 545–553.

Wpłynęło 31 sierpnia 2006

Zaakceptowano 21 grudnia 2006