

WYSTĘPOWANIE PRZECIWCIAŁ PRZECIWIW *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM* I *BORRELIA BURGdorFERI* U LEŚNIKÓW W REGIONIE LUBELSKIM

JACEK ZWOLIŃSKI, JOLANTA CHMIELEWSKA-BADORA, EWA CISAK,
ALICJA BUCZEK* I JACEK DUTKIEWICZ

Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin; *Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej im. prof. Feliksa Skubiszewskiego, ul. Radziwiłłowska 11, 20-080 Lublin

ABSTRACT. Prevalence of antibodies to *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in forestry workers from the Lublin region. Ticks are recently regarded as ones of the most important vectors of emerging diseases. One of these diseases is human granulocytic ehrlichiosis caused by obligatory intracellular microorganism recently named as *Anaplasma phagocytophilum*. 334 sera from forestry workers and 56 sera from blood donors (as a control group) were collected and examined for antibodies to *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi*. The antibodies were found statistically more frequently in sera from foresters compared to sera of the control group, both to *A. phagocytophilum* (19,8% vs. 5,4%, $p < 0,001$) and *B. burgdorferi* (32,0% vs. 7,1%, $p < 0,01$). Only 15 sera (4.5%) were found positive for both examined bacteria suggesting inhibition of coexistence although it was not statistically significant. No correlation was found between percentages of antibodies to *A. phagocytophilum* and to *B. burgdorferi* from different locations.

Key words: *Anaplasma*, antibodies, *Borrelia*, coexistence, forestry workers, tick-borne diseases.

WSTĘP

Kleszcze *Ixodidae* są wektorami wielu chorób transmisyjnych, do których, poza najbardziej rozpowszechnioną obecnie boreliozą z Lyme, należy m.in. rzadko diagnozowana i mniej znana ludzka erlichioza granulocytarna (HGE). Jej czynnikiem etiologicznym jest pasożyt wewnątrzkomórkowy *Anaplasma phagocytophilum*. Erlichioza była znana jako choroba zwierząt od lat trzydziestych XX-go wieku. W latach 80. została rozpoznana u ludzi w Stanach Zjednoczonych (Rikihisa 1991). W 1991 wyizolowano czynnik ludzkiej erlichiozy monocytarnej *Ehrlichia* sp., z krwi pacjenta (Dawson i wsp. 1991) następnie nazwany *E. chaffeensis*. W 1994 Chen i wsp. stwierdzili metodą PCR DNA tzw. HGE factor, który był blisko spokrewniony z *E. phagocytophila* i *E. equi* i został wraz z nimi zaliczony do jednego gatunku *A. phagocytophilum* (Dumler i wsp. 2001).

W 2001 r. Tylewska-Wierzbanowska opisała pierwsze przypadki erlichiozy u ludzi w Polsce. Dotychczasowe badania nad występowaniem *A. phagocytophilum* w naszym kraju dotyczyły badań serologicznych osób zamieszkujących Puszcę Białowieską oraz badań metodą PCR kleszczy z Puszczy Białowieskiej i terenów Polski Północno-Zachodniej (Grzeszczuk i wsp. 2002, Skotarczak i wsp. 2003).

Uważa się, że obszar rozprzestrzenienia erlichiozy pokrywa się z terenami endemicznego występowania boreliozy (Brouqui 1999). Ludzka erlichioza jest chorobą wieloukładową. Rozpoznanie opiera się przede wszystkim na testach serologicznych, a także analizie DNA *A. phagocytophilum* przy zastosowaniu reakcji łańcuchowej polimerazy PCR.

Celem pracy była ocena częstości występowania przeciwciał przeciw czynnikowi ludzkiej erlichiozy granulocytarnej (HGE) u osób zawodowo narażonych (tj. leśników) w regionie lubelskim. Sprawdzono również zależność współzakażeń *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum*.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 334 pracowników leśnictwa zatrudnionych w nadleśnictwach, parku narodowym i dyrekcji regionalnej z województwa lubelskiego. Surowice od 56 krwiodawców stanowiły grupę kontrolną (Tabela 1).

Tabela 1. Liczebności badanych leśników i grupy kontrolnej

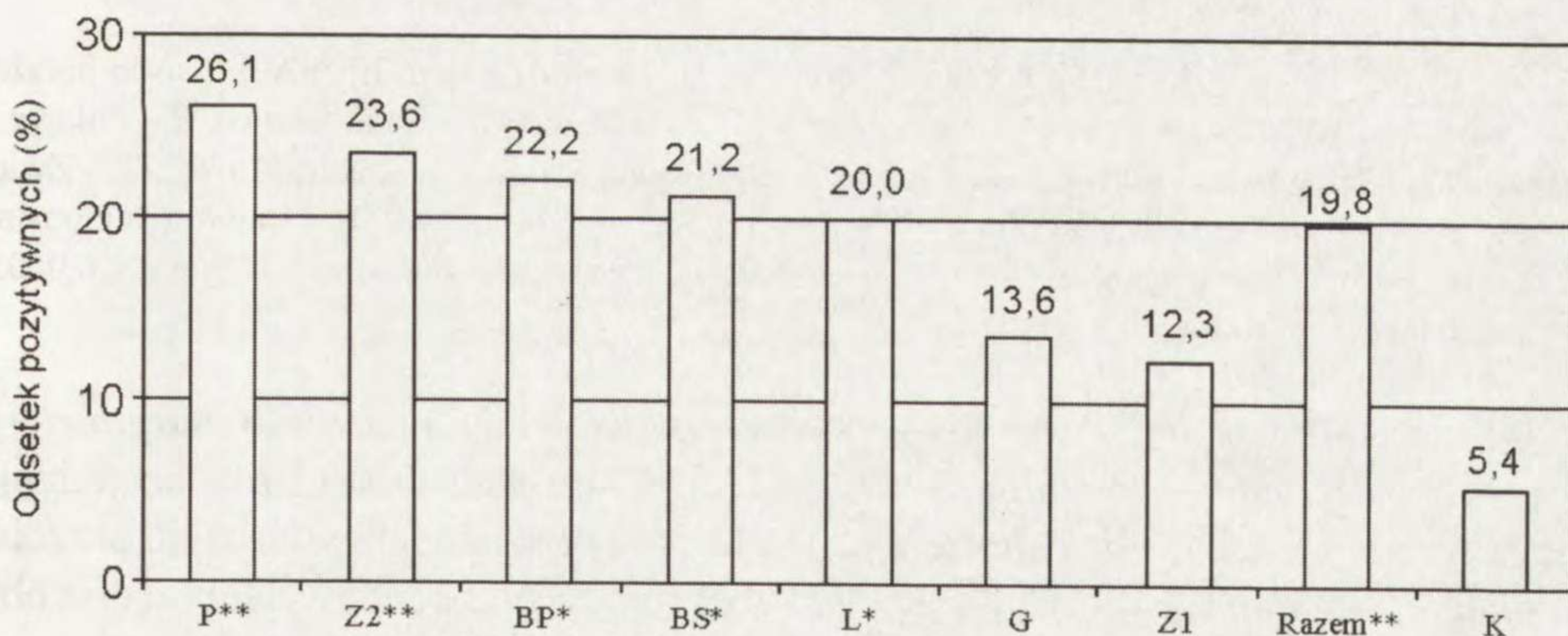
Grupa badana	Powiat	
Nadleśnictwo Gościeradów	Kraśnik	44
Nadlesnictwo Zwierzyniec	Zamość	57
Roztoczański Park Narodowy Zwierzyniec	Zamość	55
Nadleśnictwo Buda Stalowska	Kraśnik	66
Nadleśnictwp Biała Podlaska	Biała Podlaska	36
Nadleśnictwp Puławy	Puławy	46
Dyrekcja Lasów Państwowych Lublin	Lublin	30
Grupa kontrolna – krwiodawcy	Lublin	56

Podczas badań serologicznych w kierunku erlichiozy zastosowano metodę immunofluorescencji pośredniej przy użyciu testu *Anaplasma phagocytophilum* (HGE) IFA IgG (Focus Technologies, USA) przyjmując rozcieńczenie surowicy 1:64 za miano diagnostyczne. Wynik dodatni charakteryzuje się widocznymi w mikroskopie fluorescencyjnym świecącymi morulami. Są to charakterystyczne okrągłe mikrokolonie, które wiążą swoiste przeciwciała. Obliczeń statystycznych dokonano testem χ^2 .

Wszyscy leśnicy wraz z grupą kontrolną byli wcześniej zbadani w kierunku boreliozy testami immunoenzymatycznymi ELISA IgG (Bellco Biomedica, Austria).

WYNIKI

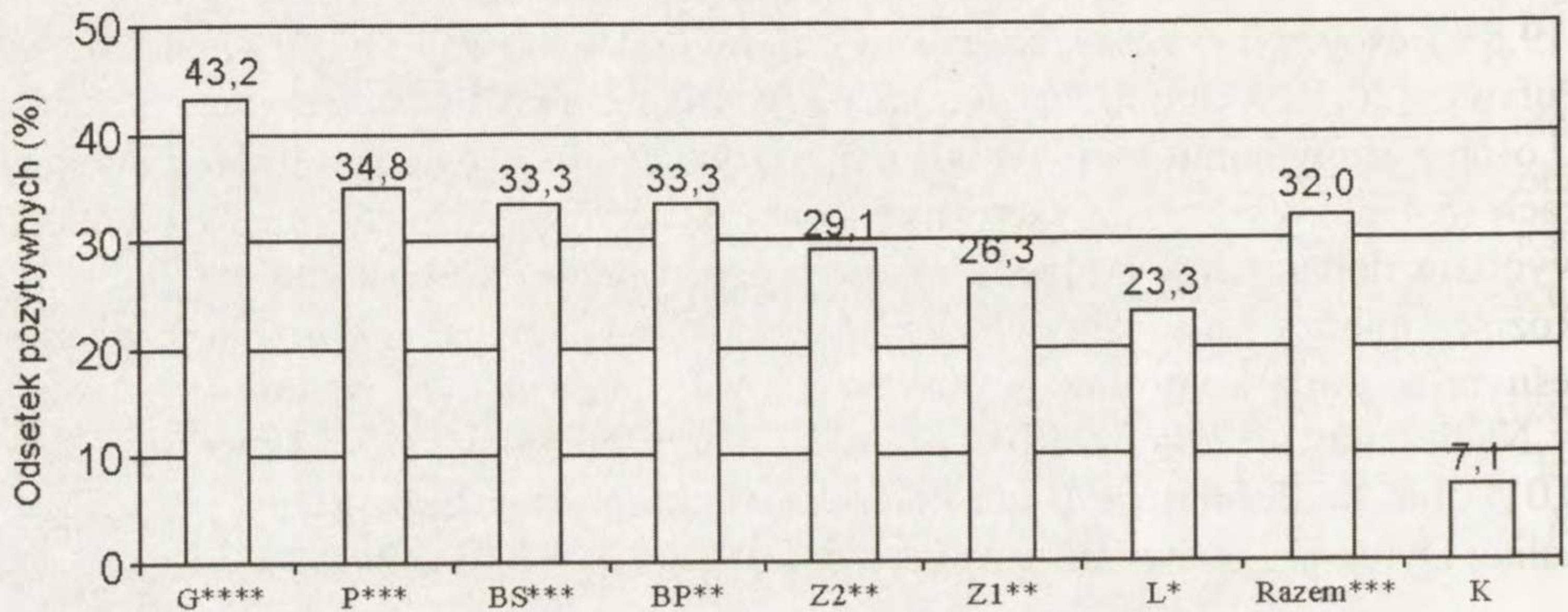
Badaniem serologicznym na obecność swoistych przeciwciał przeciw *A. phagocytophilum* u 334 osób zawodowo narażonych stwierdzono wynik dodatni u 66 (19,8%) osób. Najwyższy odsetek wyników dodatnich wykryto w Nadleśnictwie Puławy (26,1%), najniższy natomiast w Nadleśnictwie Zwierzyniec (12,3%). U osób z grupy kontrolnej wyniki seropozytywne obserwowano tylko w 3 przypadkach (5,4%). Wysoce statystycznie istotna okazała się różnica między odsetkiem wyników dodatnich w grupie leśników w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0,01$). Różnice między seropozytywnością osób zawodowo związanych ze środowiskiem leśnym a grupą kontrolną w poszczególnych grupach były istotne statystycznie w Nadleśnictwie Puławy, Roztoczańskim Parku Narodowym w Zwierzyńcu ($p < 0,01$) oraz Nadleśnictwie Biała Podlaska, Nadleśnictwie Buda Stalowska i Regionalnej Dyrekcji Lasów Państwowych w Lublinie ($p < 0,05$) (Rys. 1).



Rys. 1. Wyniki badań w kierunku erlichiozy (*Anaplasma phagocytophilum*) odczynem immunofluorescencji pośredniej (OIF) osób narażonych zawodowo z terenu województwa lubelskiego. P – Puławy – nadleśnictwo, Z2 – Zwierzyniec – Roztoczański Park Narodowy, BP – Biała Podlaska – nadleśnictwo, BS – Buda Stalowska – nadleśnictwo, L – Lublin (Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych), G – Gościeradów – nadleśnictwo, Z1 – Zwierzyniec – nadleśnictwo, K – grupa kontrolna. Analiza statystyczna – test χ^2 : ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

W badanej grupie leśników obecność swoistych przeciwciał przeciw *Borrelia burgdorferi* wykryto w surowicy krwi 107 (32,0%) osób. Najwyższy odsetek wyników dodatnich wykazano w Nadleśnictwie Gościeradów (43,2%), zaś najniższy w Regionalnej Dyrekcji lasów Państwowych w Lublinie (23,3%). W grupie kontrolnej dodatnie reakcje stwierdzono u 4 osób (7,1%). Analiza statystyczna przy pomocy testu χ^2 porównująca poszczególne grupy badanych wykazała istotną statystycznie różnicę między narażonymi zawodowo leśnikami i grupą kontrolną ($p < 0,001$). We wszystkich przypadkach stwierdzono istotnie statystycznie różnice w porównaniu do grupy kontrolnej. Największe różnice wystąpiły w Nadleśnictwie

Gościeradów ($p < 0,0001$) oraz w Nadleśnictwie Puławy i Buda Stalowska ($p < 0,001$) (Rys. 2).



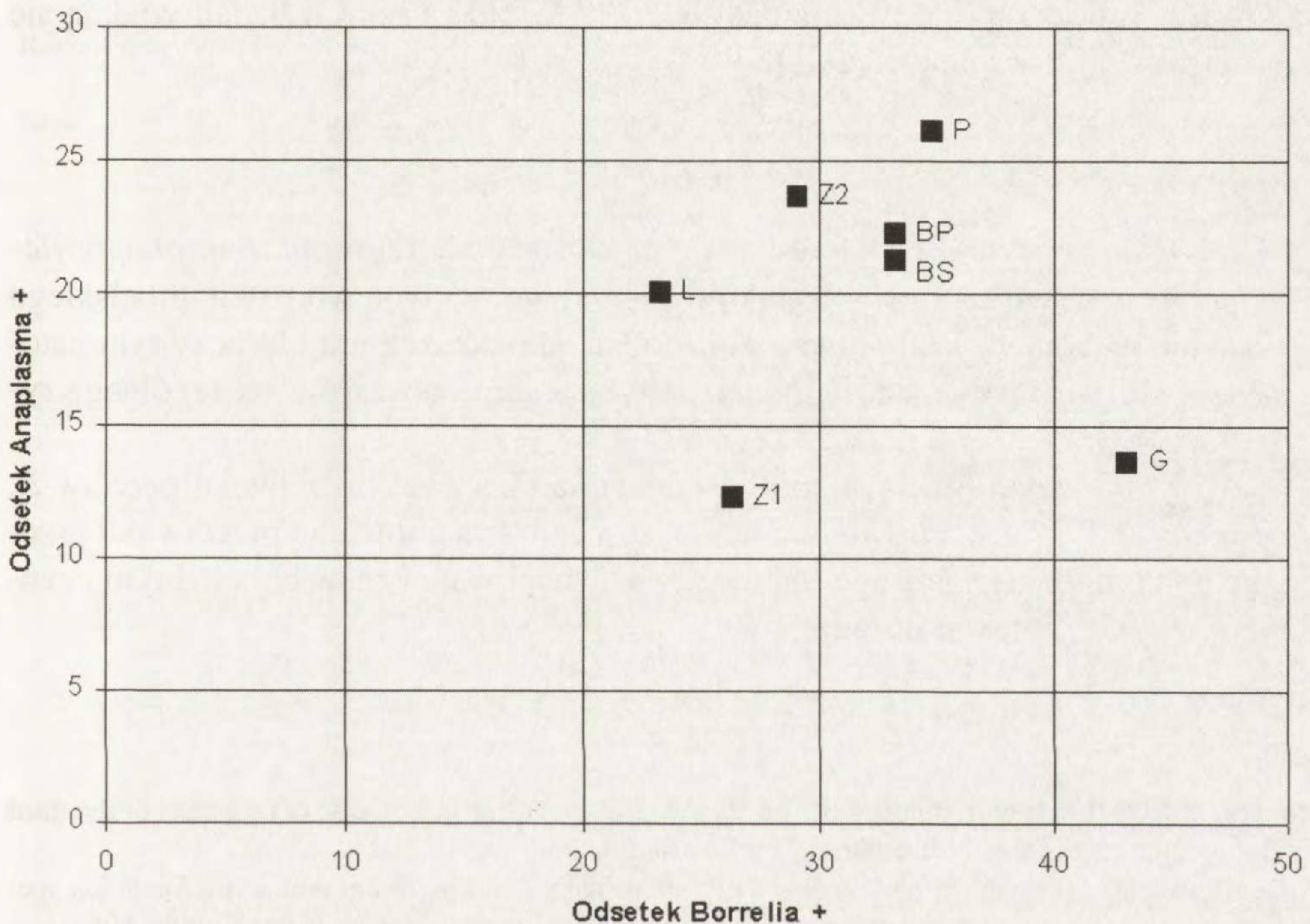
Rys. 2. Wyniki badań w kierunku boreliozy (*Borrelia burgdorferi*) testem ELISA IgG osób narażonych zawodowo z terenu województwa lubelskiego. G – Gościeradów – nadleśnictwo, P – Puławy – nadleśnictwo, BP – Biała Podlaska – nadleśnictwo, BS – Buda Stalowska – nadleśnictwo, Z2 – Zwierzyniec – Roztoczański Park Narodowy, Z1 – Zwierzyniec – nadleśnictwo, L – Lublin (Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych), K – grupa kontrolna. Analiza statystyczna – test χ^2 : **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

W 176 surowicach (52,7%) nie wykryto przeciwciał ani przeciw *B. burgdorferi*, ani przeciw *A. phagocytophilum*. W 92 (27,5%) surowicach stwierdzono jedynie przeciwciała przeciw *B. burgdorferi*, u 51 (15,3%) przeciwciała wyłącznie przeciw *A. phagocytophilum*, zaś u 15 (4,5%) współwystępowanie przeciwciał przeciw obu patogenom. Na podstawie wyniku testu χ^2 stwierdzono bliskie istotności statystycznej hamowanie współwystępowania boreliozy i erlichiozy ($p = 0,07$) tzn. dużo częściej występował jeden marker zakażenia niż oba jednocześnie.

Współwystępowanie boreliozy i erlichiozy w poszczególnych nadleśnictwach zbadano również testem korelacji liniowej Pearsona, w którym analizie statystycznej poddano odsetki seropozytywności w badanych grupach leśników. W badaniach tych nie stwierdzono istotnej zależności (Rys. 3) między odsetkiem przeciwciał przeciw *A. phagocytophilum* i przeciwciał przeciw *B. burgdorferi*.

DYSKUSJA

Badania epidemiologiczne dotyczące zakażeń *A. phagocytophilum* u pracowników leśnictwa były już prowadzone w kraju i zagranicą. W Polsce Grzeszczuk i wsp. (2002) u 7% spośród 100 badanych leśników z Puszczy Białowieskiej stwierdzili przeciwciała przeciwko *E. phagocytophila* (*A. phagocytophilum*). Nuti i wsp. (1998) w północnych Włoszech wykryli przeciwciała u 8,6% leśników. Według



Rys. 3. Porównanie odsetków pozytywnych reakcji w kierunku *Anaplasma* i *Borrelia* w poszczególnych grupach. BP – Biała Podlaska – nadleśnictwo, BS – Buda Stalowska – nadleśnictwo, G – Gościeradów – nadleśnictwo, L – Lublin (Regionalna Dyrekcja Lasów Państwowych), P – Puławy – nadleśnictwo, Z1 – Zwierzyniec – nadleśnictwo, Z2 – Zwierzyniec – Roztoczański Park Narodowy. Współczynnik korelacji liniowej $r = -0,08$.

tych autorów (l.c.) u 17,1% leśników w Szwajcarii, 11,4% w Szwecji, 6,3% we Włoszech i 5% w Wielkiej Brytanii występują przeciwciała przeciw *A. phagocytophilum*. Groen i wsp. (2002) uzyskali wyniki dodatnie jedynie u 1% leśników badanych na terenie Holandii, zaś Fingerle i wsp. (1997) u 14% leśników w południowych regionach Niemiec. Wyniki naszych badań sięgające 19,8% są najwyższe z cytowanych w literaturze. Wskazuje to na duże zagrożenie zakażeniem bakteriami *A. phagocytophilum* we wschodniej części Polski.

Dumler i wsp. (1997), wśród 185 badanych osób w Szwecji, stwierdzili u 19 badanych tylko przeciwciała przeciwko *B. burgdorferi* i u 15 przeciwciała przeciw czynnikowi HGE; u 6 potwierdzono wcześniejszy kontakt z obiema bakteriami. Grzeszczuk i wsp. (2002) podają, że osoby seropozytywne w kierunku boreliozy mają częściej przeciwciała przeciwko czynnikowi HGE ($p < 0,05$). Mało znane są mechanizmy współwystępowania różnych patogenów. Levin i Fish (2001) w badaniach doświadczalnych prowadzonych na myszach białonogich (*Peromyscus leucopus*) zaobserwowali, że pierwotne zakażenie jednym czynnikiem (*B. burgdorferi* lub *E. phagocytophila*) utrudnia zakażenie drugim, niezależnie który z nich pierw-

szy był wprowadzony do organizmu zwierząt. Wyniki naszych badań wydają się potwierdzać obserwacje tych autorów.

WNIOSKI

(1) Uzyskane wyniki badań wskazują na występowanie *Anaplasma phagocytophilum* w środowisku pracy leśników na terenie województwa lubelskiego i wskazują na konieczność prowadzenia badań nad zakażeniem kleszczy tym patogenem w różnych częściach regionu w celu określenia obszarów szczególnego ryzyka zachorowań na erlichiozę.

(2) Wyniki badań pracowników leśnictwa na obecność przeciwciał przeciw *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* i jednoczesnego występowania przeciwciał przeciwko obu tym bakteriom sugerują możliwość hamowania zakażenia jednym czynnikiem w czasie infekcji drugim.

LITERATURA

- Brouqui P. 1999. Ehrlichiosis in Europe. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium*. (Eds. D. Raoult, P. Brouqui). Elsevier, Paris: 220-232.
- Chen S., Dumler J.S., Bakken J.S., Walker D.H. 1994. Identification of a granulocytic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *Journal of Clinical Microbiology* 32: 589-595.
- Dawson J.E., Anderson B.E., Fishbein D.B., Sanchez J.L., Goldsmith C.S., Wilson K.H., Duntley C.W. 1991. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 29: 2741-2745.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisa Y., Rurangirwa F.R. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145-2165.
- Dumler J.S., Dotevall L., Gustafson R., Granstrom M. 1997. A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *Journal of Infectious Diseases* 175: 720-722.
- Fingerle V., Goodman J.L., Johnson R.C., Kurtti T.J., Munderloh U.G., Wilske B. 1997. Human granulocytic ehrlichiosis in southern Germany: increased seroprevalence in high-risk groups. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 3244-3247.
- Groen J., Koraka P., Nur Y.A., Avsic-Zupanc T., Goessens W.H., Ott A., Osterhaus A.D. 2002. Serologic evidence of ehrlichiosis among humans and wild animals in The Netherlands. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21: 46-49.
- Grzeszczuk A., Stańczak J., Kubica-Biernat B. 2002. Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieska), Northeastern Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21: 6-11.
- Levin M.L., Fish D. 2001. Interference between the agents of Lyme disease and human granulocytic ehrlichiosis in a natural reservoir host. *Vector Borne Zoonosis Diseases* 1: 139-148.
- Nuti M., Serafini D.A., Bassetti D., Ghionni A., Russino F., Rombola P., Macri G., Lillini E. 1998.

- Ehrlichia* infection in Italy. *Emerging Infectious Diseases* 4: 663-665.
- Rikihisa Y. 1991. The tribe *Ehrlichieae* and *Ehrlichia* diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 286-308.
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *Journal of Parasitology* 89:194-196.
- Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T., Kondrusik M., Hermanowska-Szpakowicz T., Sawicki W., Sułek K. 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 20: 196-198.

Zaakceptowano do druku 30 maja 2004