

**OCENA WYSTĘPOWANIA KRĘTKÓW *BORRELIA BURGENDORFERI*
SENSU LATO W KLESZCZACH *IXODES RICINUS* NA TERENIE
WYBRANYCH REJONÓW LUBELSZCZYZNY PRZY ZASTOSOWANIU
METODY ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR)**

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

Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych, Instytut Medycyny Wsi, ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin; E-mail: jcb@galen.imw.lubli.pl

ABSTRACT. Evaluation of occurrence of spirochetes *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in selected areas of the Lublin Region by polymerase chain reaction method (PCR). During the period 2001-2002, 1098 *Ixodes ricinus* ticks were collected at forest sampling sites and the degree of their infection with *Borrelia burgdorferi* spirochetes was determined by means of polymerase chain reaction (PCR). The presence of *Borrelia burgdorferi* genetic material was noted in 69 cases (6.3%). It was confirmed that the frequency of infection of adult forms of ticks (males and females) was nearly twice as high as nymphs. The highest degree of infection was observed in females – 9.5%. The degree of infection among males and nymphs was smaller – 5.9% and 4.4% respectively in individual provinces. The percentage of infected females ranged from 7.9% in the Zamość Province to 13.6% in the Włodawa Province. In males, the percentage of infected ticks remained within the range from 3.1% in the Lublin Province to 13.3% in the Lubartów Province.

Key words: *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, PCR, the Lublin region.

WSTĘP

Kleszcze pospolite (*Ixodes ricinus*) odgrywają kluczową rolę w epidemiologii boreliozy z Lyme jako wektor i rezerwuar krętków *Borrelia burgdorferi* (Wegner 1995, Wegner i Stańczak 1995). Są one w Polsce bardzo częste i szeroko rozprzecznione (Siuda 1993). Również na terenie Lubelszczyzny znane są liczne stanowiska kleszczy tego gatunku (Wegner 1995).

Wykrycie krętków *B. burgdorferi* w kleszczach odłowionych na określonym terenie jest bardzo ważne, ponieważ daje podstawę do uznania badanego rejonu za obszar endemii choroby. Również ważne jest określenie procentu zakażonych kleszczy, gdyż pozwala to ustalić ryzyko nabycia infekcji (Jenek i Głazaczow 1996, Petko i wsp. 1997, Chmielewska-Badora 1998, Skotarczak i Wodecka 1998, Nowosad i wsp. 1999, Stańczak i wsp. 1999, Cisak i wsp. 2002).

W związku z tym, że borelioza jest narastającym problemem zdrowotnym i epidemiologicznym, również na obszarze Lubelszczyzny, w obecnej pracy podjęto próbę oceny zakażenia kleszczy *Ixodes ricinus* krętkami *B. burgdorferi* na tym terenie oraz określenia ich sezonowej aktywności.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 1098 kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w dwóch kolejnych sezonach wegetacyjnych od kwietnia do października w latach 2001-2002. Obszar badań obejmował tereny o bogatym poszyciu i bardzo podobnym zadrzewieniu (liściastym i liściasto-iglastym). Były to miejsca, gdzie kontakt między kleszczami a ludźmi był bardzo prawdopodobny (np. ścieżki leśne, szlaki turystyczne, polany, leśne parkingi samochodowe oraz linie brzegowe lasów i pól uprawnych). Zbioru kleszczy dokonywano przez omiatanie flanelową flagą krzewów i poszycia leśnego na terenie pięciu obszarów leśnych położonych w powiatach Lublin, Włodawa, Zamość, Chełm, Lubartów, w każdym z powierzchni 1 km². Względną gęstość (aktywność) *Ixodes ricinus* określano obliczając średnią liczbę kleszczy zebranych przez 1 osobę na jednym stanowisku w ciągu jednej godziny.

W latach zbioru w okresie wiosenno-letnim (maj-czerwiec) zebrano 917 kleszczy, zaś w okresie letnio-jesiennym (sierpień-wrzesień) 181 osobników. Zebrane kleszcze przenoszono do próbek z 70% etanolem i przechowywano do chwili wykonania dalszych badań.

W ocenie zakażenia kleszczy pospolitych krętkami *B. burgdorferi* wykorzystano bardzo czułą i swoistą metodę amplifikacji DNA – łańcuchową reakcję polimerazy (PCR).

Kleszcze wyjmowano z alkoholu, po czym dokładnie osuszano na bibule filtracyjnej. Każdą dorosłą postać oddzielnie i nimfy w pulach po 5-6 osobników zawieszano w 100 µl 0,7 M wodorotlenku amoniaku w próbkach Eppendorfa, rozcierano końcówkami pipet i zamykano próbki. Otrzymaną zawiesinę gotowano przez 15-20 minut w temp. 98°C w bloku grzewczym w tych samych zamkniętych próbkach, następnie próbki otwierano i kontynuowano ogrzewanie przez kolejne 10 minut w celu odparowania amoniaku i zredukowania zawartości próbki do 50 µl (Stańczak i wsp. 1999).

Amplifikację DNA fragmentu genu kodującego flagelinę (fla) przeprowadzono za pomocą zestawu diagnostycznego PCR-*Borrelia* (DNA-Gdańsk).

Do reakcji PCR zastosowano:

- primery komplementarne do wszystkich znanych sekwencji genu fla dla *B. burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*)
- polimerazę termostabilną Delta 2 (DNA Gdańsk)
- wzorzec masowy DNA (Fermentas, Litwa) od 53 do 1031 par zasad
- mieszaninę nukleotydów dNTP (DNA Gdańsk)

- kontrolę pozytywną *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (DNA Gdańsk)
- kontrolę negatywną – woda destylowana
- bufor obciążający do próbek przy wykonywaniu elektroforezy (Fermentas, Litwa)
- wyizolowany DNA z badanych kleszczy.

Amplifikacja DNA odbywała się w termocyklerze Hot-Shot 25 firmy DNA Gdańsk i obejmowała następujące etapy:

- denaturacja wstępna 2 min. w 93°C, a następnie 40 cykli z których każdy obejmował :
 - denaturację właściwą 30 s w 93°C
 - dołączenie primerów 60 s w 52°C
 - wydłużanie 60 s w 72°C
 - wydłużanie końcowe 60 s w 72°C.

Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosiła 442 pary zasad. Produkty amplifikacji wykrywano w 1,5% żelu agarozowym po wykonaniu elektroforezy w warunkach standardowych i wybarwieniu w bromku etydyny w celu uwidocznienia produktów amplifikacji. Wyniki reakcji odczytywano w transiluminatorze w świetle ultrafioletowym. Minimalny wskaźnik zakażenia obliczano wg Kahla i wsp. (1989). Zależność pomiędzy aktywnością *I. ricinus* a częstością zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi* określono za pomocą testu korelacji Spearmana stosując pakiet CSS Statistica v. 5.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

WYNIKI

W latach 2001-2002 na 5 stanowiskach leśnych Lubelszczyzny ogółem odłowiono 1098 kleszczy *Ixodes ricinus* (Tabela 1). W zbiorze tym dominowały zdecydowanie nimfy (47,8%) następnie samice (27,7%) i samce (24,5%). Na wszystkich badanych terenach obserwowano różnice w stopniu zakażenia postaci rozwojowych.

Tabela 1. Wyniki badania kleszczy metodą PCR w kierunku boreliozy

Stadium rozwojowe	Liczba dodatnich/liczba zbadanych (%)	Odsetek zbadanych kleszczy (%)
Samice	29/304 (9,5)	27,7
Samce	16/269 (5,9)	24,5
Nimfy	23/525 (4,4)*	47,8
Razem	69/1098 (6,3)	100,0

*minimalny wskaźnik zakażenia (pule po 5 lub 6)

Wśród wszystkich zbadanych kleszczy, najwyższy stopień zakażenia stwierdzono u samic. Spośród 304 samic *I. ricinus* było 29 zakażonych osobników, co stanowiło 9,5%. Stopień zakażenia samców i nimf był mniejszy. Obecność materiału ge-

netycznego krętków *Borrelia* wykazano u 5,9% samców (16 prób dodatnich na 269 zbadanych osobników). U nimf minimalny wskaźnik zakażenia wyniósł 4,4% (23 próby dodatnie na 525 nimf zbadanych w pulach po 5 lub 6 osobników). Ogółem u zbadanych 1098 kleszczy obecność materiału genetycznego *Borrelia burgdorferi* wykazano w 69 przypadkach (6,3%) (Tabela 1).

Tabela 2. Wykaz stanowisk z podaniem liczby zebranych i zakażonych kleszczy

Stanowisko	Stadium rozwojowe	Liczba zebranych osobników (% całości)	Liczba zakażonych osobników	Odsetek zakażonych kleszczy (%)
Dąbrowa – pow. Lublin	Nimfy	196	6	3,1*
	Samce	146	8	5,5
	Samice	150	12	8,0
	Razem	492 (44,8)	26	5,3
Sobibór – pow. Włodawa	Nimfy	135	4	3,0*
	Samce	62	2	3,2
	Samice	44	6	13,6
	Razem	241 (21,9)	12	5,0
Zwierzyniec – pow. Zamość	Nimfy	129	10	7,8*
	Samce	17	2	11,8
	Samice	38	3	7,9
	Razem	184 (16,8)	15	8,2
Urszulin – pow. Chełm	Nimfy	50	2	4,0*
	Samce	44	4	9,1
	Samice	72	8	11,1
	Razem	166 (15,1)	14	8,4
Wandzin – pow. Lubartów	Nimfy	15	2	13,3*
	Samce	0	0	0
	Samice	0	0	0
	Razem	15 (1,4)	2	13,3
Razem		1098 (100)	69	6,3

*minimalny wskaźnik zakażenia

Występowanie krętków *B. burgdorferi* sensu lato w badanych kleszczach z zaznaczeniem stadiów i miejsc zbioru przedstawia Tabela 2. Najwięcej kleszczy zebrano na terenie powiatu lubelskiego: 492 kleszcze, co stanowiło 44,8% całego zbioru *Ixodes ricinus*. O połowę mniej kleszczy zebrano z powiatu Włodawa – 241 osobników (21,9%). Na terenie powiatu zamojskiego zebrano 184 kleszcze tj. 16,8%, a w powiecie chełmskim 166 osobników czyli 15,1% całego zbioru *Ixodes ricinus*. Z całości przeprowadzonych badań wynika, że odsetki zakażonych samic, samców i nimf są różne w poszczególnych powiatach. W większości powiatów najwięcej pozytywnych reakcji amplifikacji DNA *Borrelia burgdorferi* sensu

lato obserwowano u samic. Odsetek zakażonych osobników wahał się od 7,9% w powiecie zamojskim do 13,6% w powiecie włodawskim. U samców odsetek zakażonych osobników zawierał się w przedziale od 3,2% w powiecie włodawskim do 11,8% w powiecie zamojskim. W powiecie chełmskim odsetki zakażonych samców i samic były zbliżone i wynosiły odpowiednio 9,1% i 11,1%. Odsetki zakażonych nimf zawierały się w przedziale od 3,1% w powiecie lubelskim do 13,3% w powiecie lubartowskim (Tabela 2).

Tabela 3. Zestawienie aktywności kleszczy *Ixodes ricinus* i ich zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi*

Powiat	Względna gęstość aktywnych kleszczy	Liczba dodatnich/ogół badanych (%)
Lublin	30,7	26/492 (5,3)
Włodawa	26,8	12/241 (5,0)
Zamość	46,0	15/184 (8,1)
Chełm	27,5	14/166 (8,4)
Lubartów	15,0	2/15 (13,3)
Mediana	29,2	69/1098 (6,3)

Tabela 3 przedstawia zestawienie zbiorczych danych dotyczących aktywności kleszczy *Ixodes ricinus* oraz ich zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi*. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy aktywnością kleszczy a częstością zakażenia krętkami ($p > 0,1$).

DYSKUSJA

Badania nad występowaniem krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach pospolitych prowadzone są w wielu krajach, w tym również w Polsce (Wegner i Stańczak 1995, Jenek i Głazaczow 1996, Chodyncka i wsp. 1997, Petko i wsp. 1997, Wegner i wsp. 1997). W pracach tych stosowano różne metody badawcze: metodę immunofluorescencji (Tylewska-Wierzbanowska i wsp. 1996, Wegner i wsp. 1997), badania mikroskopowe w ciemnym polu widzenia (Petko i wsp. 1997), posiew na pożywki oraz reakcję łańcuchowej polimerazy (Jenek i Głazaczow 1996, Nowosad i wsp. 1999, Siński i Pawełczyk 1999, Stańczak i wsp. 1999).

Wyniki tych prac wykazały znaczne zróżnicowanie zakażenia kleszczy. W różnych częściach Niemiec rozpowszechnienie zakażenia wśród kleszczy oceniono na 3-26% w stadium nimfy, natomiast u postaci dorosłych 11-34% (Wilske i wsp. 1987). Podobne wyniki odnotowano w Szwajcarii (5-34%), nieznacznie niższe w Szwecji (nimfy 7-15%, postaci dorosłe 3-23%) i na Litwie (odpowiednio 0,5-4% i 9-12%), natomiast wyższe w Rosji – 16% (Motiejunas i wsp. 1994, Gustafson i wsp. 1995).

W Polsce badania przeprowadzone przez Wegner i wsp. (1997) z zastosowaniem metody immunofluorescencji wykazały, że częstość zakażenia kleszczy krętkami *B. burgdorferi* w woj. olsztyńskim wynosiła 11,5%, a na niektórych stanowiskach dochodziła do 35,7%. Autorzy ci wykazali obecność krętków tylko u 8,8% kleszczy (Wegner i wsp. 1995). W badaniach Sińskiego i wsp. (1994) prowadzonych tą samą techniką na kleszczach zebranych z wielu stanowisk w woj. zamojskim, krakowskim, suwalskim i katowickim, odsetek zakażonych kleszczy wahał się od 4% do 58,3%. Jenek i Głazaczow (1996) stosując metodę PCR stwierdzili zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi* u 24,5% kleszczy *Ixodes ricinus* odłowionych na terenie Wielkopolski.

Podobnie jak w badaniach większości cytowanych autorów, również w obecnej pracy odsetek zakażonych samic i samców *Ixodes ricinus* był zbliżony i wyższy w porównaniu z odsetkami zakażonych nimf (Jenek i Głazaczow 1996, Wegner i wsp. 1997, Skotarczak i Wodecka 1998, Siński i Pawełczyk 1999, Stańczak i wsp. 1999). Bardzo zbliżone odsetki zakażonych samic i samców (12,1% i 12,3%) stwierdziły, również metodą PCR, Skotarczak i Wodecka (1998) w kleszczach odłowionych na terenie woj. szczecińskiego. Wyniki badań własnych wykazały mniejszy stopień zbliżenia pomiędzy odsetkami zakażenia samic i samców, które wynosiły odpowiednio 9,5% i 5,9%.

WNIOSKI

- (1) Kleszcze *Ixodes ricinus* zamieszkujące lasy Lubelszczyzny zakażone są krętkami *Borrelia burgdorferi* średnio w 6,3%, co stwarza realne zagrożenie dla osób przebywających w lasach w związku z wykonywanym zawodem, lub w celach rekreacyjnych.
- (2) Stwierdzono, że częstość zakażenia form dorosłych kleszczy (samic i samców) jest prawie dwukrotnie większa od częstości zakażenia nimf.
- (3) Odsetki kleszczy zakażonych krętkami *Borrelia burgdorferi* były różne w poszczególnych powiatach, co świadczy o geograficznym zróżnicowaniu występowania boreliozy na terenie Lubelszczyzny.

LITERATURA

- Chmielewska-Badora J. 1998. Seroepidemiologic study on Lyme boreliosis in the Lublin region. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 5: 183-186.
- Chodyncka B., Łukaszuk C., Flisiak J., Puciło K., Poczobut P., Trybuła I. 1997. Badania wstępne nad występowaniem krętków *Borrelia* w kleszczach na terenie Białostocczyzny. *Przegląd Dermatologiczny* 84: 179-182.
- Cisak E., Chmielewska Badora J., Rajtar B., Zwoliński J., Jabłoński L., Dutkiewicz J. 2002. Study on the occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks

- collected in Lublin Region (Eastern Poland). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9: 105-110.
- Gustafson R., Jaenson T.G., Gardulf A., Mejlom H., Svenungsson B. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in *Ixodes ricinus* in Sweden. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 27: 597-601.
- Jenek J., Głazaczow A. 1996. Ocena występowania krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* w wybranych regionach Wielkopolski metodą łańcuchowej polimerazy (PCR). *Przegląd Epidemiologiczny* 50: 383-386.
- Kahl O., Schmidt K., Schonberg A., Laukamm-Josten U., Knulle W., Bienzle U. 1989. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West.). *Zentralblatt für Bakteriologie* 270: 434-440.
- Motiejunas L., Bunikis J., Barbour A.G., Sadziene A. 1994. Lyme borreliosis in Lithuania. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26: 149-155.
- 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., 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.
- Siński E., Karbowski G., Siuda K., Buczek A., Jongejan F. 1994. Zakażenie kleszczy *Borrelia burgdorferi* w wybranych rejonach Polski. *Przegląd Epidemiologiczny* 48: 461-465.
- Siński E., Pawełczyk A. 1999. Detection of reservoirs for lyme borreliosis in the Mazury District, Poland. *Zentralblatt für Bakteriologie* 289: 698-703.
- Siuda K. 1993. Kleszcze Polski. Część II. Systematyka i rozmieszczenie. PWN, Warszawa.
- Skotarczak B., Wodecka B. 1998. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach *Ixodes ricinus* w lasach województwa szczecińskiego. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 227-232.
- 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 (*Acarri, Ixodidae*) in different Polish woodlands. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 6: 127-132.
- 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: 241-246.
- Wegner Z. 1995. Znaczenie kleszczy (*Acarri, Ixodidae*) w epidemiologii chorób transmisyjnych w Polsce. Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdynia.
- Wegner Z., Racewicz M., Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Stańczak J. 1997. Występowanie kleszczy *Ixodes ricinus* (*Acarri, Ixodidae*) na zalesionych obszarach Trójmiasta i ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi*. *Przegląd Epidemiologiczny* 51: 11-20.
- Wegner Z., Stańczak J. 1995. Rola kleszczy w epidemiologii boreliozy z Lyme. *Przegląd Epidemiologiczny* 49: 245-250.
- Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B. 1995. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach *Ixodes ricinus* na terenie województwa białostockiego. *Międzynarodowe sympozjum nt. Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze, Białowieża 28-29 kwietnia*: 12.
- Wilske B., Steinhuber R., Bergmeister H. 1987. Epidemiologische Daten zum Auftreten von Erkrankungsfällen sowie zur Durchseuchung von Zecken (*Ixodes ricinus*) mit *Borrelia burgdorferi*. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 112: 1730-1736.