

WYSTĘPOWANIE *BABESIA MICROTI* W KLESZCZACH *IXODES RICINUS* NA WYBRANYCH TERENACH POMORZA ZACHODNIEGO^{1,2}

BOGUMIŁA SKOTARCZAK I MAREK SAWCZUK

Katedra Genetyki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Szczeciński, Al. Piastów 40B,
71-065 Szczecin; E-mail: Bogumiła.Skotarczak@sus.univ.szczecin.pl

ABSTRACT. Occurrence of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* on selected areas of Western Pomerania. The aim of present study was to evaluate acquisition risk of babesiosis in human population exposed to ticks *Ixodes ricinus* by examination of *Babesia microti* DNA occurrence in ticks of all development stages. The polymerase chain reaction (PCR) was applied to estimate the occurrence of DNA *Babesia microti* in *Ixodes ricinus*. The Bab1 and Bab4 primers were used to amplify fragment, 238bp in length, of 18S rRNA gene for small ribosomal subunit. Amplicons were electrophoretically separated in agarose gels. Ticks were collected in year 1999 and 2000, twice in each year in spring-summer (May-July) and summer-autumn (August-October) seasons from Goleniów Forest and Pobierowo. These places have been classified as people attendance and tourist areas. The 716 *I. ricinus* ticks were collected in 1999 with 61.3% of nymphs, 17.8% larvae, 10.9% females and 9.9% males. Highest range of infection was observed in females – 28.8% studied, than males – 18.3%, nymphs – 7.7% and larvae – 3.1%. The total number of 416 *I. ricinus* was collected in year 2000 with 64% of nymphs, 13.4% males, 11.9% females and 10.7% larvae. The infection with *Babesia microti* occurred only in three nymphs, which was 0.7% of studied population.

Key words: *Babesia microti*, *Ixodes ricinus* infection, PCR.

WSTĘP

Zarażenia spowodowane przez pirpolazmy z rodzaju *Babesia* najprawdopodobniej towarzyszyły człowiekowi i zwierzętom gospodarskim od niepamiętnych czasów. Pierwsze wzmianki na temat babesiozy pochodzą prawdopodobnie z Biblii, z Księgi Wyjścia, w której jedna z egipskich plag opisywana jest jako „straszliwa zaraza”, powodująca pomór bydła. W 1888 roku Vicotr Babes badając w Rumunii chore bydło, jako pierwszy zaobserwował w erytrocytach tych zwierząt komórki gruszkowatego kształtu. Uznał je za czynnik etiologiczny hemoglobinurii u bydła, zaklasyfikował do bakterii i nazwał *Haematococcus bovis*. W 1893 roku Kilborne i Smith wtręty w krwinkach czerwonych chorych zwierząt sklasyfikowali jako pierwotniaki *Babesia* będące czynnikiem etiologicznym gorączki teksańskiej u bydła.

¹ Praca została wykonana w ramach grantu finansowego przez KBN Nr 6P04C 00120.

² Wyniki tych badań zostały przedstawione podczas II-go Ogólnopolskiego Sympozjum „Człowiek i środowisko przyrodnicze Pomorza Zachodniego”, Szczecin-Łukęcin, 15-17 listopada 2001.

Pierwszy opisany i zdiagnozowany przypadek ludzkiej babesiozy wywołanej przez *B. bovis* w Europie pochodzi z 1957; wystąpił on u rolnika na terenach byłej Jugosławii (Boustani i Gelfand 1996, Homer i wsp. 2000). W Polsce, jak dotąd opisano pojedynczy przypadek ludzkiej babesiozy importowanej (Humiczewska i Kuźna-Grygiel 1997).

Obecnie wiadomo, że rodzaj *Babesia* liczy ponad 100 gatunków patogennych dla szerokiego spektrum zwierząt kręgowych w tym i człowieka. Nieformalnie pierwotniaki rodzaju *Babesia* dzieli się na podstawie wielkości trofozoitu na małe (1-2,5 μm średnicy) oraz duże (3-5 μm). Ten podział jest zgodny z klasyfikacją filogenetyczną opartą na porównywaniu sekwencji genów dla małej podjednostki rybosomu pierwotniaków *Babesia*, która zalicza małe i duże trofozoity *Babesia* do dwu różnych grup.

Czynnikiem etiologicznym ludzkiej babesiozy są zasadniczo dwa gatunki: *B. microti* i *B. divergens*. Pierwszy z nich, pasożyt gryzoni zaliczany do małych *Babesia* (około 2 μm), występuje głównie w Ameryce Północnej i jest odpowiedzialny za większość przypadków chorobowych. W Europie natomiast głównym czynnikiem chorobowym jest *B. divergens*, pasożyt bydła. Jednakże badania ostatnich lat sugerują obecność gatunku *B. microti* również w Europie. W Polsce badania dotyczą głównie rezerwuaru *B. microti* (Karbowiak i Siński 1994, Karbowiak i wsp. 1999, Siński 1999), ale podejmowane są próby także oszacowania występowania pierwotniaków obu gatunków u kleszczy *Ixodes ricinus* (Skotarczak i Cichocka 2001a, b; Kuźna-Grygiel i wsp. 2002; Skotarczak i wsp. 2002, 2003). Badania te wykazały, że pierwotniaki *B. divergens*, jak i *B. microti* obecne są u tych roztoczy i stanowią potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi. Szczególnie obecność tego drugiego gatunku zaprzecza sztucznej podziałowi występowania gatunków chorobotwórczych dla człowieka w Europie i Ameryce Północnej.

Na terenie Europy głównym wektorem *B. microti* jest kleszcz pospolity *I. ricinus* (Homer i wsp. 2000).

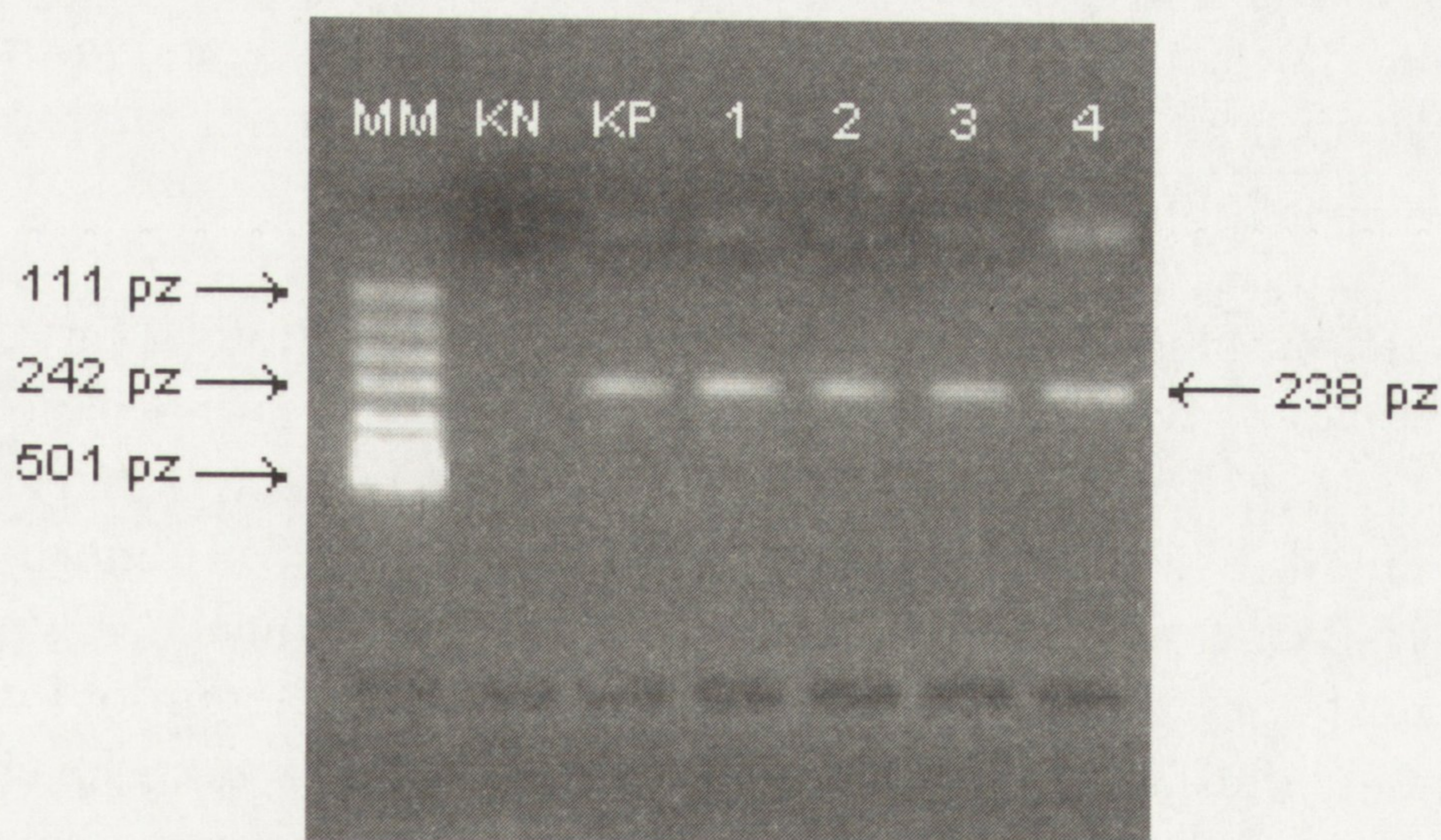
W niniejszej pracy przebadano grupę kleszczy *I. ricinus* na obecność DNA *B. microti*. Oszacowano ilościowy i procentowy stopień zarażenia poszczególnych stadiów rozwojowych *I. ricinus* przez *B. microti* w dwu kolejnych latach z podziałem na dwa sezony i na dwóch wybranych terenach w województwie zachodniopomorskim, jako kontynuację wcześniejszych naszych badań (Skotarczak i Cichocka 2001a, b; Skotarczak i wsp. 2002).

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były kleszcze z lat 1999 i 2000, uzyskane z zalesionych terenów w północno-zachodniej części Polski, tj. z Puszczy Goleniowskiej i Pobierowa. Miejsca te są uznawane za rekreacyjne, często odwiedzane przez turystów i zbieraczy runa leśnego. Odłowu *I. ricinus* dokonywano w okresie dwóch szczy-

tów sezonowej aktywności tych kleszczy: wiosenno-letnim (maj-lipiec) i letnio-jeziennym (sierpień-październik). Kleszcze zbierano w ich naturalnym środowisku metodą flagowania. U zebranych osobników określono płeć i stadia rozwojowe. Wyniki odłowu kleszczy z obu lat z uwzględnieniem miejsca, okresu zbioru, płci i stadiów rozwojowych zamieszczono w Tabelach 1 i 2.

Izolację DNA *B. microti* przeprowadzono metodą amoniakalną według Guy i Stanek (1991). Markerem genetycznym zastosowanym w wykrywaniu DNA tego pasożyta metodą PCR był fragment genu 18S rDNA, kodujący rRNA dla małej podjednostki rybosomu. Użyto primerów Bab1 i Bab4 (oczekiwana długość produktu powinna wynieść 238 pz; Persing i wsp. 1992, Persing 1993). Warunki PCR opisaliśmy we wcześniejszych pracach (Skotarczak i Cichocka 2001a; Skotarczak i wsp. 2002, 2003). Jako kontrolę pozytywną zastosowano DNA *B. microti* izolowanego z merozoitów uzyskanych z krwi mysiej, dzięki uprzejmości profesora E. Sińskiego z Uniwersytetu Warszawskiego. W reakcji PCR uwzględniono także kontrolę ujemną. Produkty łańcuchowej reakcji polimerazy rozdzielano w czasie elektroforezy w 2,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny i uwidaczano w świetle UV.



Rys.1. Żel agarozowy barwiony bromkiem etydyny pokazuje DNA *B. microti* o długości około 238 pz zamplifikowany w reakcji PCR. MM – marker mas cząsteczkowych DNA, KN – kontrola ujemna, KP – kontrola dodatnia, 1-4 – DNA *B. microti* izolowany z z kleszczy

WYNIKI

W roku 1999 zebrano łącznie z obu miejsc 716 kleszczy *I. ricinus*, w tym 464 z terenów Puszczy Goleniowskiej i 252 z Pobierowa. DNA *B. microti* (fragmenty długości około 238 pz; Rys. 1) wykryto u 59 (12,7%) z 464 *I. ricinus* z okolic Goleniowa. Najwyższy odsetek zarażenia *B. microti* na tym obszarze stwierdzono u samic (40,4%), a najmniejszy u larw (5,7%). W Pobierowie odsetek infekcji wyniósł 5,6% (14 z 252). Najwięcej było zarażonych samców (24,2%), a najmniej nimf (3,7%). Ogólny odsetek zarażenia z dwóch miejsc wynosił 10,2% (Tabela 1).

W roku 2000 zebrano z dwóch terenów 419 osobników *I. ricinus*. Na 209 kleszczy odłowionych z terenów Goleniowa żaden nie okazał się nosicielem *B. microti*. Natomiast wśród 210 *I. ricinus* zebranych w okolicach Pobierowa odsetek zarażenia wyniósł 1,4% (3 osobniki zarażone). Ogólny procent infekcji *I. ricinus* z obu terenów w roku 2000 wyniósł 0,7% (Tabela 2).

DYSKUSJA

Rezerwuarem *B. microti* w Europie w środowisku naturalnym są gryzonie, między innymi nornica ruda *Clethrionomys glareolus* i mysz leśna *Apodemus flavicollis* (Siński 1999). Natomiast dla *B. divergens* rezerwuarem jest bydło rogate. Wspólnymi wektorami dla obu gatunków *Babesia* jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus* (Prokopowicz 1995, Pruthi i wsp. 1995, Gorenflot i wsp. 1998).

W USA większość przypadków ludzkiej babesiozy jest wywoływana przez *B. microti* (Gorenflot i wsp. 1998, Varde i wsp. 1998, Homer i wsp. 2000). Tylko w samym stanie Nowy Jork w okresie od 1982-1993 zanotowano 139 klinicznych przypadków tej jednostki (White i wsp. 1998). Ostatnio notuje się zarażenia gatunkami podobnymi do *B. microti* tj. WA1, CA1 i MO1 (zgodność genetyczna 99,8%; Krause i wsp. 1998). W USA wektorem piroplazm są kleszcze *I. scapularis* i *I. pacificus*, a rezerwuarem biała mysz *Peromyscus leucopus* i norniki *Microtus montanus* oraz *M. pennsylvanicus* (Herwaldt i wsp. 1995, Krause i wsp. 1998). W Europie odnotowano dotychczas 29 infekcji spowodowanych głównie przez *B. divergens*. Sądzi się, że skala problemu jest zdecydowanie większa, a choroba jest diagnozowana tylko w bardzo małym stopniu. Większość przypadków europejskich odnotowano we Francji – 10, na Wyspach Brytyjskich – 6, a także w Hiszpanii, Szwecji, Szwajcarii, Belgii, byłej Jugosławii (Gorenflot i wsp. 1998, Homer i wsp. 2000). Zarażenia piroplazmami *Babesia* stwierdza się także w Chinach, Egipcie, Meksyku, Południowej Afryce i na Tajwanie (Shih i wsp. 1997, Gorenflot i wsp. 1998).

Parametrami określającymi sytuację epidemiologiczną w zakresie chorób odkleszczowych jest stopień zakażenia kleszczy oraz występowanie przeciwciał w grupie osób tzw. zwiększonego ryzyka. W Polsce próby oceny sytuacji epidemiologicznej w zakresie babesiozy polegające na wykrywaniu *Babesia* w kleszczach *I. ricinus*, głównych wektorów tych patogenów w Europie, są prowadzone od kilku lat. Takie badania, wykonywane w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego (Skotarczak i Cichocka 2001a, b; Skotarczak i wsp. 2002, 2003,) oraz w Katedrze Biologii i Parazytologii Lekarskiej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie (Kuźna-Grygiel i wsp. 2002) wykazały, że Pomorze Zachodnie jest terenem endemicznym dla *Babesia* jak również dla *Borrelia burgdorferi* sensu lato i *Ehrlichia* (Skotarczak i Wodecka 1998, Skotarczak 2000, Wodecka i Skotarczak 2000, Skotarczak i Rymaszewska 2001).

W prezentowanej pracy starano się oszacować występowanie pasożytniczych pierwotniaków *B. microti* we wszystkich stadiach rozwojowych kleszczy *I. ricinus* w dwóch sezonach, w których wykazują one największą aktywność. Badania przeprowadzono na reprezentatywnej próbie kleszczy i pod uwagę brano wszystkie stadia rozwojowe *I. ricinus*. Badania z roku 1999 wykazały ogólne zarażenie kleszczy przez *B. microti* rzędu 10,7%. Było ono wyższe na terenie Puszczy Goleniowskiej (12,7%), niż na terenie Pobierowa (5,6%). Poziom zarażenia był wyższy wiosną (15,5% w Goleniowie i 9,8% w Pobierowie) niż jesienią (odpowiednio 8,1% i 2,1%). Z literatury wynika, że zarażenie kleszczy pierwotniakami z rodzaju *Babesia* może się wahać od 5% do 20% (Melendez i Forlano 1996, Armstrong i wsp. 1998, Cen-Aguilar i wsp. 1998, Duh i wsp. 2001). Wcześniejsze badania kleszczy (Skotarczak i Cichocka 2001a), zebranych z miejskich zalesionych terenów miasta Szczecina wykazały podobne zarażenie, które wynosiło 13,3%. Duh i wsp. (2001) podają, że na 135 przebadanych kleszczy (dorosłe i nimfy), 13 (10,3%) zawierało materiał genetyczny *Babesia* sp. Armstrong i wsp. (1998) podają zarażenie kleszczy rzędu 14,4%.

W naszych badaniach, wyniki zakażenia kleszczy z roku 2000 są słabo porównywalne z wynikami z roku poprzedniego, gdyż łączne zarażenie wyniosło 0,7%, i było znacznie niższe niż w roku poprzednim. Na 419 przebadanych osobników *I. ricinus*, tylko u trzech wykryto DNA *B. microti*. Niższe zarażenie *I. ricinus* przez *B. microti* można tłumaczyć rzeczywistym mniejszym występowaniem pierwotniaków w kleszczach.

Rozpoznanie kliniczne pacjentów zarażonych pierwotniakami z rodzaju *Babesia* często nastrocza wiele trudności (Cichocka i Skotarczak 2001). Jednym z podstawowych badań jest obserwacja mikroskopowa rozmazu krwi obwodowej barwionej metodą Giemsy. W obrazie mikroskopowym pierwotniaki te obserwuje się jako formy gruszkowatego kształtu wielkości 1-2,5 μm często układające się w zarażonych erytrocytach w tzw. krzyż maltański. Merozoity obserwuje się także poza krwinkami (Kadłubowski i Kurnatowska 1999). Nie jest to jednak metoda zbyt dokładna. Wewnątrzkomórkowe formy *Babesia* mogą być mylone z pierwotniakami z rodzaju *Plasmodium*, a przy niskim poziomie parazytemii mogą po prostu zostać przeoczone i dać wynik fałszywie ujemny. W diagnostyce serologicznej najczęściej stosuje się test immunofluorescencji pośredniej (IFA). Uzyskanie miana równego lub wyższego od 1:64 uznaje się za seropozytywność, a miano równe lub wyższe niż 1:256 wskazuje na ostrą postać choroby. Wadami metody są brak szybkiego wykrycia patogenu u pacjenta (wtedy, gdy występuje tzw. cisza immunologiczna – brak przeciwciał w pierwszych dniach po zarażeniu) oraz niemożność określenia czy przeciwciała są wynikiem niedawnego kontaktu z pierwotniakami, czy dużo wcześniejszego (Homer i wsp. 2000). Wydaje się, że metoda łańcuchowej reakcji polimerazy rozwiąże wszystkie problemy w diagnostyce babesiozy.

WNIOSKI

- (1) Badane tereny Pomorza Zachodniego (Puszcza Goleniowska i lasy w okolicach Pobierowa) są endemiczne dla *B. microti*.
- (2) Ryzyko zarażenia *B. microti* na badanych terenach jest wyższe wiosną niż jesienią.
- (3) Największe ryzyko zarażenia stwarza kontakt z samicami *I. ricinus*.

LITERATURA

- Armstrong P.M., Katavolos P., Caporale D.A., Smith R.P., Spielman A., Telford S.R. III. 1998. Diversity of *Babesia* infecting deer ticks (*Ixodes dammini*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 739-742.
- Boustani M.R., Gelfand J.A. 1996. Babesiosis. *Clinical Infectious Diseases* 22: 611-615.
- Cen-Aguilar J.F., Rodriguez-Vivas R.I., Dominguez-Alpizar J.L., Wagner G.G. 1998. Studies on the effect of infection by *Babesia* sp. on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 78: 253-257.
- Cichocka A., Skotarczak B. 2001. Babesioza – trudności diagnostyczne. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 527-533.
- Duh D., Petrovec M., Avsic-Zupanc T. 2001. Diversity of *Babesia* infecting european sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3395-3397.
- Gorenflot A., Moubri K., Precigout E., Carcy B., Schetters T.P. M. 1998. Human Babesiosis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 92: 489-501.
- Guy E.C., Stanek G. 1991. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* 44: 103-110.
- Herwaldt B.L., Springs F.E., Roberts P.P., Eberhard M.L., Case K., Persing D.H., Agger W.A. 1995. Babesiosis in Wisconsin: a potentially fatal disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53: 146-151.
- Homer M.J., Aguilar-Delfin I., Telford S.R. III, Krause P.J., Persing D.H. 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13: 451-469.
- Humiczewska M., Kuźna-Grygiel W. 1997. Przypadek importowanej ludzkiej babesiozy w Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne* 43: 227-229.
- Kadłubowski R., Kurnatowska A. Zarys parazytologii lekarskiej. Wydawnictwa Lekarskie PZWL. Warszawa 1999.
- Karbowiak G., Siński E. 1994. Rola kleszczy i drobnych ssaków w szerzeniu się zakażeń *Borrelia burgdorferi* i *Babesia microti*. *Przegląd Epidemiologiczny* 48: 219-224.
- Karbowiak G., Stanko M., Rychlik L., Nowakowski W., Siuda K. 1999. The new data about zoonotic reservoir of *Babesia microti* in small mammals in Poland. *Acta Parasitologica* 44: 142-144.
- Krause P.J., Spielman A., Telford S.R. III, Sikand V.K., McKay K., Christianson D., Pollack R.J., Brassard P., Magera J., Ryan R., Persing D.H. 1998. Persistent parasitemia after acute babesiosis. *New England Journal of Medicine* 339: 160-165.
- Kuźna-Grygiel W., Bukowska K., Cichocka A., Kosik-Bogacka D., Skotarczak B. 2002. The prevalence of piroplasms in a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) from north-western Poland. *Annals of Agricultural Environmental Medicine* 9: 175-178.
- Melendez R.D., Forlano M. 1996. Incidence and intensity of *Babesia* spp. sporokinetes in engorged *Boophilus microplus* from a dairy herd in Venezuela. *Annals of New York Academy of Science* 791: 148-156.
- Persing D.H. 1993. PCR Detection of *Babesia microti*. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications*. American Society for Microbiology Protocol 4.5: 475-479.

- Persing D.H., Mathiesen D., Marshall W.F., Telford S.R., Spielman A., Thomford J.W., Conrad P.A. 1992. Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2097-2103.
- Prokopowicz D. 1995. Choroby przenoszone przez kleszcze. Wydawnictwa Fundacji Büchnera. Warszawa.
- Pruthi R.K., Marshall W.F., Wiltsie J.C., Persing D.H. 1995. Subspecialty clinics: infectious diseases. human babesiosis. *Mayo Clinic Proceedings* 70: 853-862.
- Shih C.M., Liu L.P., Chung W.C., Ong S.J., Wang C.C. 1997. Human babesiosis in Tajwan: Asymptomatic infection with a *Babesia microti*-like organism in Taiwanese woman. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 450-454.
- Siński E. 1999. Enzootyczne źródła nowych infekcji przenoszonych przez kleszcze *Ixodes ricinus*. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 135-142.
- Skotarczak B., 2000. *Borrelia burgdorferi* sensu lato occurrence in ticks *Ixodes ricinus* by polymerase chain reaction (PCR). *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 93-99.
- Skotarczak B., Cichočka A. 2001a. The occurrence DNA of *Babesia microti* in ticks *Ixodes ricinus* in the forest areas of Szczecin. *Folia Biologica* 49: 247-250.
- Skoraczak B., Cichočka A. 2001b. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 8: 187-189.
- Skotarczak B., Rymaszewska A. 2001. Wstępne badania czynnika etiologicznego ludzkiej ehrlichiozy (HGE) w kleszczach z zachodniopółnocnej Polski. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 95-101.
- Skotarczak B., Wodecka B. 1998. Occurrence of spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks *Ixodes ricinus* in the forest of Szczecin province. *Wiadomości Parazytologiczne* 44: 227-232.
- Skotarczak B., Wodecka B., Cichočka A. 2002. Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 9: 25-28.
- Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M. 2003. Molecular evidence of co-infection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from North-Western Poland. *Journal of Parasitology* 89: 194-196.
- Varde S., Beckley J., Schwartz I. 1998. Prevalence of tick-borne pathogens in *Ixodes scapularis* in rural New Jersey County. *Emerging Infectious Diseases* 4: 97-99.
- White D.J., Talarico J., Chang H.G., Birkhead G.S., Heimberger T., Morse D.L. 1998. Human babesiosis in New York State, review of 139 hospitalized cases and analysis of prognostic factors. *Archives of Internal Medicine* 158: 2149-2154.
- Wodecka B., Skotarczak B. 2000. Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi* s. l. u kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w północnozachodniej Polsce. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 475-485.

Zaakceptowano do druku 30 lipca 2003