

UDZIAŁ STADIÓW ROZWOJOWYCH *IXODES RICINUS* W PRZENOSZENIU *ANAPLASMA (EHRlichIA) PHAGOCYTOPHILA*¹

ANNA RYMASZEWSKA I MAŁGORZATA ADAMSKA

Katedra Genetyki, Uniwersytet Szczeciński, Al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin;
Tel/Fax +48 91 444 27 80; E-mail: ankas@univ.szczecin .pl

ABSTRACT: Participation of *Ixodes ricinus* developmental stages in transmission of *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*. The present study constitutes a survey on the prevalence of human granulocytic ehrlichiosis agent, *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*, infecting ticks, *Ixodes ricinus*. *I. ricinus* were collected in the spring and autumn of the years 2000-2002 in western Pomerania (Poland), on vegetation using cloth drags. In all, 3340 individuals of *I. ricinus* were collected from the sampling sites. This total comprised of 511 females, 525 males, and 1998 nymphs. The prevalence of this pathogen in ticks was assessed using the PCR technique (a fragment of 16S rDNA gene amplified with EHR 521 and EHR 747 primers). The overall prevalence of *A. phagocytophila* in *I. ricinus* was 3 % in adults but only 1.6% in nymphs.

Key words: *Anaplasma (Ehrlichia) phagocytophila*, DNA detection, epidemiology, *Ixodes ricinus*.

WSTĘP

Ehrlichie są patogenami ludzi i zwierząt, wywołującymi jednostkę chorobową określaną jako ehrlichioza. Na kontynencie europejskim wektorem dla tych bakterii są kleszcze z rodzaju *Ixodes*, przede wszystkim kleszcz pospolity *I. ricinus*, o szerokim zasięgu występowania (Petrovec i wsp. 1997, Parola i wsp. 1998, Skotarczak i Rymaszewska 2001).

Ehrlichiozę od dawna opisywano jako gorączkę odkleszczową, występującą u zwierząt hodowlanych: owiec, bydła, kóz, a także psów. W 1987 roku, w USA opisano przypadek ludzkiej ehrlichiozy monocytarnej (human monocytic ehrlichiosis – HME), wywołanej przez patogen nazwany *Ehrlichia chaffeensis* (Maeda i wsp. 1987), natomiast w 1994 roku, także w USA, stwierdzono po raz pierwszy ludzką ehrlichiozę granulocytarną, wywołaną przez czynnik ludzkiej ehrlichiozy granulocytarnej – human granulocytic ehrlichiosis agent – HGE agent (Parola i wsp. 1998). Obecnie czynnik HGE oraz bakterie spokrewnione *E. phagocytophila* i *E. equi* uznano za jeden gatunek *Anaplasma phagocytophila* (Dumler i wsp. 2001).

¹ Praca została wykonana w ramach projektu nr 3PO4C 103 22, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych

W 1997 roku ehrlichiozę granulocytarną rozpoznano także w Europie, w Słowenii (Petrovec i wsp. 1997), a w 2001 roku doniesiono o pierwszych przypadkach zachorowań w Polsce (Tylewska -Wierzbanowska i wsp. 2001).

Cykl rozwojowy kleszcza *I. ricinus*, należącego do pasożytów pozagniazdowych, obejmuje stadia: larwę, nimfę oraz postacie dorosłe (imago). Kleszcze te cechuje sezonowość, czyli zależność aktywności i przebiegu poszczególnych cykli od pór roku, charakterystycznych dla klimatu umiarkowanego (Siuda 1991, Buczek 1999). Przeobrażenie larwa-nimfa, czy też nimfa-imago wymaga od poszczególnych osobników zgromadzenia pokarmu niezbędnego do histogenezy. *I. ricinus* jest kleszczem trzyżywielowym, tzn. każde z aktywnych stadiów rozwojowych ma odrębnego żywiciela. Najmniej agresywną postacią *I. ricinus* są samce, które odżywiają się rzadko i przez krótki okres czasu. Pozostałe stadia *I. ricinus* żerują powoli, długo i odżywiają się krwią, limfą oraz rozpuszczonymi tkankami kręgowca-żywiciela (Siuda 1991, Prokopowicz 1995). Podczas ssania krwi kleszcze wydzielają do ciała żywiciela ślinę zawierającą składniki zapobiegające krzepnięciu krwi oraz prawdopodobnie wywołujące rozpad tkanek żywiciela. W tym momencie może też dojść do zakażenia organizmu żywiciela czynnikami chorobotwórczymi (Siuda 1991, Prokopowicz 1995).

Przebudowa histologiczna u *I. ricinus* następująca u stadiów młodocianych w trakcie każdego linienia związana jest głównie z narządami i strukturami pochodzenia ektodermalnego, natomiast tkanki środowiska wewnętrznego oraz jelito środkowe czy cewki Malpighiego pozostają niemal niezmienione. Prawdopodobnie właśnie to pozwala na przekazywanie transstadialne (larwa – nimfa – imago) drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt. Patogeny w populacji kleszczy mogą utrzymywać się także dzięki przekazowi transowarialnemu (zakazona samica – jaja; Siuda 1991).

Na Pomorzu Zachodnim (Polska) od wielu lat prowadzone są badania o znaczeniu epidemiologicznym, mające na celu ustalić, czy kleszcze *I. ricinus* na tych terenach są zakażone patogenami chorobotwórczymi dla ludzi i zwierząt, jak np. *B. burgdorferi*, *A. phagocytophila* czy *Babesia* sp. W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki badań nad oszacowaniem stopnia zakażenia kleszczy przez czynnik ludzkiej ehrlichiozy granulocytarnej i próbę ustalenia, które ze stadiów *I. ricinus* stanowi największe zagrożenie dla człowieka i zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił DNA ehrlichii izolowany z nimf i imago kleszcza pospolitego – *I. ricinus*. Kleszcze odławiano z roślinności za pomocą flandowej flagi na sześciu stanowiskach wyznaczonych na terenie Pomorza Zachodniego (Szczecin i okolice). Zbiór kleszczy poddanych badaniom pochodził z lat 2000-2002, przy czym corocznie odławiano kleszcze w dwóch sezonach: „wiosennym”

(maj-czerwiec) oraz „jesiennym” (sierpień-październik), co jest zgodne z sezonową aktywnością tych pajęczaków.

DNA ehrlichii izolowano z kleszczy metodą opisaną przez Guy i Stanek (1991). Markerem zastosowanym do wykrywania DNA *A. phagocytophila* w kleszczach był fragment genu kodującego 16S rRNA dla małej podjednostki rybosomu, wyznaczony przez parę starterów EHR 521 i EHR 747 (Pancholi i wsp. 1995).

Mieszanka reakcyjna, o objętości 10 μ l zawierała bufor reakcyjny 1x stężony, 0,025 mM każdego z trójfosforanów deoksynukleotydów, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,25 U polimerazy (MBI Fermentas, Lithuania). Matrycę stanowiło DNA wyizolowane z każdego kleszcza indywidualnie, w objętości 1 μ l. Reakcję amplifikacji wykonywano każdorazowo w obecności próby dodatniej (wzorzec) oraz próby ujemnej (bez DNA). DNA czynnika HGE do kontroli dodatniej pracownia molekularna Katedry Genetyki US otrzymała od profesor Yasuko Rikihisa z Department of Veterinary Biosciences, The Ohio State University (USA).

Reakcję amplifikacji DNA ehrlichii przeprowadzono w termocyklerach bezolejowych: T-gradient (Biometra, Niemcy) i Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research, USA). Profil termiczny PCR dla fragmentu genu 16S rDNA składał się z denaturacji wstępnej: 94°C – 1 min. oraz 35 cykli obejmujących denaturację właściwą w 92°C – 30 sek., hybrydyzację primerów 60°C – 30 sek., wydłużanie 72°C – 40 sek.

Produkty PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym (ICN, USA) wybarwionym bromkiem etydyny (Sigma-Aldrich, Niemcy), a oceny wielkości produktu reakcji PCR dokonywano w oparciu o marker masowy MW 501 (Pogen, Łódź).

Analizy statystycznej porównań częstości występowania DNA *A. phagocytophila* w kleszczach *I. ricinus* dokonano stosując nieparametryczny test istotności chi kwadrat. Dopuszczalne prawdopodobieństwo „p” błędu pierwszego rodzaju przyjęto na poziomie 0,05.

WYNIKI

Ogółem w ciągu trzech badanych lat odłowiono 3034 osobniki *I. ricinus*, rozkład udziału stadiów w poszczególnych latach przedstawiono w Tabeli 1.

Zakażenie kleszczy *I. ricinus* w kolejnych latach było porównywalne i wynosiło 2,38% w 2000 r. (22/1007), 2,08% w 2001 r. (22/1056) i 1,75% w 2002 r. (17/971), przy czym różnice są nieistotne statystycznie (test χ^2 , $p = 0,05$).

Szczegółowy wykaz zakażenia imago i nimf *I. ricinus* przez czynnik ludzkiej ehrlichiozy granulocytarnej (*A. phagocytophila*) w kolejnych, analizowanych latach 2000-2002 przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 1. Udział samic, samców i nimf w kolekcji kleszczy *I. ricinus* ze zbiorów w latach 2000-2002

Rok	Samice	Stadia		Razem
		Samce	Nimfy	
2000	159	176	672	1007
2001	213	222	621	1056
2002	139	127	705	971
Łącznie	511	525	1998	3034

Tabela 2. Występowanie DNA *A. phagocytophila* (PCR+/N) w kleszczach *I. ricinus* wiosną i jesienią w latach 2000-2002

	Wiosna		Jesień	
	PCR+/N	%	PCR+/N	%
2000				
Samice	5/82	6,1	1/77	1,3
Samce	6/114	5,3	1/62	1,6
Nimfy	11/367	3	0/305	0
Razem	22/563	3,9	2/444	0,5
2001				
Samice	1/106	0,9	0/107	0
Samce	4/114	3,5	6/108	5,5
Nimfy	6/342	1,8	4/279	1,43
Razem	11/562	2	10/494	2
2002				
Samice	4/98	4,1	1/41	2,44
Samce	1/89	1,1	0/38	0
Nimfy	8/429	1,9	3/279	1,1
Razem	13/613	2,1	4/358	1,1

DYSKUSJA

Do badań, których celem było wykrywanie obecności DNA ehrlichii w kleszczach, wykorzystywano imago i nimfy *I. ricinus*. Wcześniejsze analizy własne (Rymaszewska 2000, Skotarczak i Rymaszewska 2001), jak i prace innych autorów (Ogden i wsp. 1998, Liz i wsp. 2000, Walker i wsp. 2001) wskazują, że larwy nie stanowią zagrożenia, gdyż w przypadku ehrlichii, nie dochodzi do przekazu transowarialnego, tj. zakażona samica – jaja. W kolekcji *I. ricinus* dominowały nimfy (1998 osobników; Tabela 1), a więc to one mogą potencjalnie stanowić główne źródło zagrożenia dla człowieka czy zwierząt. Udział samców i samic jest w każdym z analizowanych lat porównywalny (łącznie z trzech lat 511 samic i 525 samców; Tabela 1). Wśród imago większe zagrożenie stanowią samice, ponieważ to one są bezwzględnie pasożytami zewnętrznymi, natomiast samce pobierają krew

raczej rzadko, stąd nie odgrywają tak istotnej roli w krążeniu patogenów w środowisku. Analiza zakażenia poszczególnych stadiów kleszczy może zobrazować zagrożenie, jakie stanowią one na danym terenie.

Ogólne zakażenie *I. ricinus* ehrlichia na Pomorzu Zachodnim jest stosunkowo niskie i wynosi 2,38% w 2000 r., 2,08% w 2001 r. oraz 1,75% w 2002 r. Podobnie niskie zakażenie notowano w wielu krajach europejskich (von Stendingk i wsp. 1997, Alberdi i wsp. 1998, Parola i wsp. 1998, Pusterla i wsp. 1998, Ogden i wsp. 1998, Baumgarten i wsp. 1999, Fingerle i wsp. 1999, Leutengger i wsp. 1999, Petrovec i wsp. 1999, Liz i wsp. 2000, Wicki i wsp. 2000, Alekseev i wsp. 2001).

Na podstawie badań różnych autorów możliwość ustalenia, które ze stadiów stanowi największe zagrożenie, wydaje się niezmiernie trudne. Jenkins i wsp. (2001) wykazali najwyższe zakażenie ehrlichia u nimf i samic, po 13%, natomiast u samców tylko 3%. Wśród kleszczy przebadanych przez Petroveca i wsp. (1999) zakażenie stwierdzono tylko u imago, również Pusterla i wsp. (1998) wykryli DNA ehrlichii tylko u osobników dorosłych. Ogden i wsp. (1998) na jednym z analizowanych stanowisk wykazali porównywalne zakażenie nimf i imago, po 1,4%. Na drugim stanowisku zdecydowanie mniejsze zakażenie wykryto u nimf (6%), niż u osobników dorosłych (9%). Podobnie Christova i wsp. (2001), otrzymali aż 34% dodatnich imago i tylko 2% pozytywnych wyników dla nimf, natomiast wszystkie dodatnie próby Cinco i wsp. (1997) pochodziły z izolatów z nimf (24,4%). Bardzo dużą rozbieżność w wynikach badań zakażenia osobników dorosłych i nimf stwierdzono w USA. Schwartz i wsp. (1997) podają, że DNA czynnika HGE wykryto aż u 53% imago i tylko u 15% nimf.

Z prezentowanych tu badań przeprowadzonych na Pomorzu Zachodnim w latach 2000-2002 wynika, że większość zakażonych osobników to imago. Potwierdza to nasze wcześniejsze wyniki badań na tych samych terenach (Rymaszewska 2000, Skotarczak i Rymaszewska 2001). Również badania z Północno-Wschodniej Polski wskazują na wyższe zakażenie wśród osobników dorosłych (19,5%) niż wśród nimf (1,4%; Grzeszczuk i wsp. 2002).

Na podstawie przytoczonych powyżej wyników badań własnych oraz innych autorów można stwierdzić, że zarówno stopień zakażenia kleszczy przez *A. phagocytophila*, jak i częstość występowania tego patogenu w różnych stadiach *I. ricinus* są bardzo zróżnicowane i parametry te są określane dla poszczególnych, lokalnych populacji kleszczy, stanowiąc charakterystykę badanego regionu w zakresie epidemiologii ehrlichiozy.

Wyniki przedstawione w powyższej pracy są jednym z elementów składających się na obraz epidemiologiczny *A. phagocytophila* Pomorza Zachodniego. Wykazano, że bakteria ta jest obecna na Pomorzu Zachodnim, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Brak informacji o zachorowaniach wśród ludzi może być konsekwencją niedoinformowania i błędnej diagnostyki, na co wszyscy badacze zajmujący się tym problemem zwracają uwagę.

LITERATURA

- Alberdi M.P., Walker A.R., Paaxton E.A., Sumption K.J. 1998. Natural prevalence of infection with *Ehrlichia (Cytoecetes) phagocytophila* of *Ixodes ricinus* ticks in Scotland. *Veterinary Parasitology* 78: 203-213.
- Alekseev A.N., Dubinina H.V., van de Pol I., Schouls L.M. 2001. Identification of *Ehrlichia* spp. and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks in the Baltic regions of Russia. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2237-2242.
- Baumgarten B.U., Rollinghoff B.C. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and granulocytic and monocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3448-3451.
- Buczek A. 1999. Fizjologia kleszczy (Ixodida) w niepasżytniczej fazie cyklu życiowego. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 51-159.
- Christova I.S., Schouls L., van de Pol I., Park J., Panayotov S., Lefterova V., Kantardjiev T., Dumler J.S. 2001. High prevalence of granulocytic ehrlichiae and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Bulgaria. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 4172-4174.
- Cinco M., Padovan D., Murgia R., Maroli M., Frusteri L., Heldtander M., Johansson K.E., Olsson-Engvall E. 1997. Coexistence of *Ehrlichia phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from Italy as determined by 16S r RNA gene sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 3365-3366.
- Dumler J.S., Barbet A.F., Bekker C.P., Dasch G.A., Palmer G.H., Ray S.C., Rikihisia Y., Rutangirwa F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowardia* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2145-65.
- Fingerle V., Munderloh U.G., Liegl G., Wilske B. 1999. Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophila group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Medical Microbiology and Immunology* 188: 145-149.
- 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 Infectious Diseases* 21: 6-11.
- Guy E.C., Stanek G. 1991. Detection of *Borellia burgdorferi* in patient with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology* 44: 610-611.
- Jenkins A., Kristiansen B.E., Allum A.G., Aakre R.K., Strand L., Kleveland E.J., van de Pol I., Schouls L. 2001. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in ixodes ticks from southern Norway. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3666-3671.
- Leutenegger C.M., Pusterla N., Mislin C.N., Weber R., Lutz H. 1999. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and the human granulocytic ehrlichiosis agent in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3390-3391.
- Liz J.S., Anderes L., Sumner J.W., Massung R.F., Gern L., Rutti B., Brossard M. 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1002-1007.
- Maeda K., Markowitz N., Hawley R.C., Ristic M., Cox D., McDade J.E. 1987. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic *Rickettsia*. *New England Journal of Medicine* 316: 853-856.
- Ogden N.H., Bown K., Horrocks B.K., Woldehiwet Z., Bennett M. 1998. Granulocytic *Ehrlichia* infection in Ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U. K. *Medical and Veterinary Entomology* 12: 423-429.
- Pancholi P., Kolbert C.P., Mitchell P.D., Reed K.D., Dumler J.S., Bakken J.S., Telford III S.R., Persing D.H. 1995. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *Journal*

- of Infectious Diseases* 172: 1007-1012.
- Parola P., Beati L., Cambon M., Brouqui P., Raoult D. 1998. Ehrlichial DNA amplified from *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in France. *Journal of Medical Entomology* 35: 180-183.
- Petrovec M., Furlan S.L., Zupanc T.A., Strle F., Brouqui Ph., Roux V., Dumler J.S. 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 1556-1559.
- Petrovec M., Sumner J.W., Nicholson W.L., Childs J.E., Strle F., Barlic J., Lotric-Furlan S., Avsic-Zupanc T. 1999. Identity of ehrlichial DNA sequences derived from *Ixodes ricinus* ticks with those obtained from patients with human granulocytic ehrlichiosis in Slovenia. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 209-210.
- Prokopowicz D. 1995. Choroby przenoszone przez kleszcze. Wydawnictwo Büchera, Warszawa.
- Pusterla N., Huder J.B., Lutz H., Braun U. 1998. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* ticks from areas in Switzerland where tick-borne fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2735-2736.
- Rymaszewka A. 2000. Ehrlichioza – nowe zagrożenie ze strony kleszczy. *Postępy Mikrobiologii* 39: 189-198.
- Schwartz I., Fish D., Daniels T.J. 1997. Prevalence of the rickettsial agent of human granulocytic ehrlichiosis in ticks from a hyperendemic focus of Lyme disease. *New England Journal of Medicine* 337: 49-50.
- Siuda K. 1991. Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. cz. I. Zagadnienia ogólne. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa. Wrocław.
- Skotarczak B., Rymaszewska A. 2001. Wstępne badania czynnika etiologicznego ludzkiej ehrlichiozy (HGE) w kleszczach z zachodnio-północnej Polski. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 95-101.
- 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 Infectious Diseases* 20: 196-198.
- von Stedingk L.V., Gurtelschmid M., Hanson H.S., Gustafson R., Dotevall L., Engvall E.O., Granstrom M. 1997. The human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agent in Swedish ticks. *Clinical Microbiology and Infection* 3: 573-574.
- Walker A.R., Alberdi M.P., Urquhart K.A. 2001. Risk factors in habitats of the tick *Ixodes ricinus* influencing human exposure to *Ehrlichia phagocytophila* bacteria. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 40-49.
- Wicki R., Sauter P., Mettler C., Natsch A., Enzler T., Pusterla N., Kuhnert P., Egli G., Bernasconi M., Lienhard R., Lutz H., Leutenegger C. M. 2000. Swiss army survey in Switzerland to determine the prevalence of *Francisella tularensis*, members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogrup, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and tick-borne encephalitis virus in ticks. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 19: 427-432.