

Stanisława Tylewska-Wierzbanowska, Danuta Kruszevska, Tomasz Chmielewski

ZASTOSOWANIE ODCZYNU IMMUNOFLUORESCENCJI POŚREDNIEJ I ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR) DO WYKRYWANIA KRĘTKÓW *BORRELIA BURGdorFERI* W KLESZCZACH*

Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. S. Kałużewski

Zbadano 40 kleszczy, w tym 30 z gatunku *Ixodes ricinus* i 10 *Dermacentor reticulatus*, w kierunku zakażenia *Borrelia burgdorferi*, stosując równolegle odczyn immunofluorescencji pośredniej (IF) i test łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Obecność DNA (16S rDNA) *B. burgdorferi* wykryto w materiale z 10 kleszczy *Ixodes ricinus*. Określono czułość PCR i stwierdzono, że w stosowanych przez nas warunkach reakcji można wykryć DNA z 50 komórek *B. burgdorferi* w zawiesinie i 100 w materiale izolowanym z kleszcza. Fluorescencję (IF) obserwowano w 32 próbkach pochodzących od 22 kleszczy *I. ricinus* i 10 *D. reticulatus*, zarówno z surowicą odpornościową jak i z surowicą człowieka zdrowego (bez przeciwciał dla *B. burgdorferi*). Ze względu na bardzo małą swoistość IF nie powinien być stosowany w badaniach nad rozprzestrzenieniem kleszczy zakażonych *B. burgdorferi*.

Od czasu wykrycia i opisanie po raz pierwszy krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach *Ixodes dammini* (1, 6) prowadzone są intensywne badania mające na celu między innymi określenie częstości występowania kleszczy zakażonych tymi drobnoustrojami w różnych rejonach świata (4, 5). Również w Polsce w kilku ośrodkach naukowych prowadzi się badania na ten temat. Ich wyniki wskazują, że odsetek zakażonych *B. burgdorferi* kleszczy waha się od 0,77% (8) do 58,6% (3). Stwierdzane przez różnych autorów różnice w ocenie stopnia zakażenia są prawdopodobnie związane z jednej strony z rejonem kraju, z którego pochodziły badane kleszcze, z drugiej strony wynikać mogą z posługiwania się odmiennymi metodami do wykrywania krętków. W badaniach, w których uzyskiwano najwyższy odsetek zakażonych kleszczy stosowano metodę immunofluorescencji pośredniej (2, 3, 9, 10), a najmniejszą liczbę wykrywano testem łańcuchowej reakcji polimerazy PCR (8).

W związku z tym podjęliśmy próbę porównania czułości i swoistości tych dwóch testów w wykrywaniu krętków *B. burgdorferi* w materiale pochodzącym z kleszczy.

* Badania finansowane z grantu KBN nr 660259203

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 40 kleszczy odłowionych z roślin lub zdjętych ze skóry ludzi i zwierząt. Należały one do gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*. Każdego kleszcza dzielono wzdłuż na dwie części, z których każda stanowiła materiał do dalszych, prowadzonych równolegle badań.

Test immunofluorescencji pośredniej. W badaniu jako antygen stosowano materiał ze zhomogenizowanego kleszcza. Po naniesieniu na szkiełko podstawowe, wysuszeniu i utrwaleniu w acetonie, inkubowano go z ludzką surowicą zawierającą przeciwciała dla *B. burgdorferi*, a następnie z immunosurowicą przeciw ludzkim immunoglobulinom, znakowaną izotiocyanianem fluoresceiny (DAKO, Dania). Jako kontrolę swoistości reakcji przeprowadzano równolegle inkubację materiału z każdego badanego kleszcza z ludzką surowicą normalną, nie zawierającą przeciwciał dla *B. burgdorferi*.

Test łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (11). DNA z badanego materiału izolowano w środowisku zasadowym stosując substancje chelatujące (Chelex R 100). Badane próbki gotowano przez 20 min w 20% roztworze tego odczynnika. Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzano w 5 μ l otrzymanego ekstraktu dodając po 5 pmol odpowiednich starterów, 100 mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Behringer Mannheim Biochemicals), 3 μ l $MgCl_2$ i 5 μ l buforu Taq (Perkin Elmer) oraz 0,7 U Ampli Taq polimerazy (Perkin Elmer). Do każdej serii badań włączano kontrolę ujemną i dodatnią. Reakcję amplifikacji przeprowadzano w następujących warunkach: 30 cykli z denaturacją DNA w 95°C przez 30 sekund, przyłączeniem starterów w 55°C przez 30 sekund i wydłużeniem w 72°C przez 60 sekund. Poszukiwano fragmentu DNA *B. burgdorferi* kodującego 16S rRNA. Produkt amplifikacji uwidaczniano po 30 minutowym rozdziale elektroforetycznym w 1% żelu agarozowym, stosując prąd o napięciu 100 V. Do każdej serii badań włączano odpowiednie kontrole ujemne i dodatnią.

Hodowla *B. burgdorferi*. Szczep B19 izolowany w Szwecji otrzymano od prof. *Marty Grandstrom* ze szpitala Karolinska w Sztokholmie. Hodowlę prowadzono w podłożu BSK (Sigma) wzbogaconym surowicą królika. Plastikowe naczynia o pojemności 25 ml ze szczelnie zakręcanym korkiem napełniano 20 ml podłoża i po dodaniu 0,1 ml zawiesiny bakterii inkubowano w 30°C do chwili zmiany barwy podłoża z czerwonej na łososiową, tj. około 5–7 dni. Hodowlę wirowano, zbierano osad i przemywano w fizjologicznym roztworze soli. Gęstość zawiesiny bakterii określano licząc komórki bakteryjne w komorze Thoma.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Wykrycie krętków *Borrelia burgdorferi* przy pomocy odczynu immunofluorescencji pośredniej (IF). Zbadano 30 kleszczy należących do gatunku *Ixodes ricinus* i 10 gatunku *Dermacentor reticulatus*. Wynik dodatni uzyskano z materiałem pochodzącym z 32 kleszczy należących do obu gatunków. Jednocześnie obserwowano dodatnią reakcję surowicy ludzkiej nie zawierającej przeciwciał dla *B. burgdorferi* z materiałem z 30 kleszczy (tab. I).

W obrazie mikroskopowym obserwowano silnie fluoryzujące bezpostaciowe masy oraz formy morfologicznie przypominające grzybnię i nitkowate elementy, które

Tabela I. Porównanie wyników testu IF i PCR wykrywających zakażenie *B. burgdorferi* w kleszczach.

Liczba próbek	Odczyn IF z surowicą		PCR
	odpornościową	normalną	
6	-	-	-
1	+	-	+
3	+	-	-
2	-	+	+
21*	+	+	-
7	+	+	+

* w skład tej grupy wchodziło 10 próbek pochodzących z kleszczy *D. reticulatus*

mogły być uznane za krętki (ryc. 1). Jednak wszystkie te struktury były obecne zarówno w preparatach inkubowanych z surowicą zawierającą przeciwciała dla *B. burgdorferi* jak i z ujemną surowicą kontrolną.

Wykrycie DNA *B. burgdorferi* metodą PCR. Czulość testu PCR określono badając kolejne rozcieńczenia zawiesiny komórek *B. burgdorferi*. Stwierdzono, że w wyżej podanych warunkach przeprowadzania poszczególnych etapów reakcji amplifikacji, wykrywano DNA w próbkach zawierających 50 komórek bakteryjnych (ryc. 2). Po dodaniu do badanego materiału ekstraktu z kleszcza, w którym wcześniej nie stwierdzono obecności *B. burgdorferi*, produkt amplifikacji można było wykryć w próbkach zawierających nie mniej niż 100 komórek bakteryjnych.

Z 40 zbadanych kleszczy materiał genetyczny *B. burgdorferi* wykryto w 10 kleszczach należących do gatunku *I. ricinus*.

Dostępne obecnie metody wykrywania zakażenia krętkami *B. burgdorferi* stwarzają wiele problemów, zarówno w rutynowej diagnostyce dla celów klinicznych jak i w badaniach epidemiologicznych. Jak wiadomo, podstawą stwierdzenia zakażenia jest izolacja czynnika etiologicznego. Jednak w przypadku *B. burgdorferi* takie postępowanie nie jest praktycznie możliwe. Bez względu na rodzaj badanej próbki, hodowla z niej krętków rzadko kończy się powodzeniem. Z materiału klinicznego, pochodzącego od ludzi z objawami boreliozy z Lyme najczęściej izolowane są bakterie z wycinków skóry objętych rumieniem wędrującym (ok. 70% wyhodowań); natomiast w przypadku neuroboreliozy czy zmian stawowych powstałych na tle tego zakażenia częstość izolacji czynnika etiologicznego spada do 10–20% (7). Z tych samych powodów, nie stosuje się również metody hodowli w badaniach epidemiologicznych dotyczących rozprzestrzenienia wektora *B. burgdorferi*, jakim są zakażone nimi kleszcze *I. ricinus*. W takich przypadkach najczęściej wykorzystywano immunologiczne metody barwienia preparatu bezpośredniego sporządzonego z badanego kleszcza. Test immunofluorescencji pośredniej lub bezpośredniej z użyciem swoistych przeciwciał poli- lub monoklonalnych pozwala na wykrycie bakterii w materiale tkankowym. Zastosowanie pierwszych z wymienionych przeciwciał może jednak indukować świecenie w wyniku nieswoiście przebiegających reakcji, natomiast użycie przeciwciał monoklonalnych wiązać się może z otrzymaniem fałszywie ujemnych wyników. Stosując ten test diagnostyczny oraz wykrywając krętki w preparacie



a



b

Ryc. 1. Odczyn immunofluorescencji po inkubacji materiału pochodzącego (a) z kleszcza *Ixodes ricinus* i (b) *Dermacentor reticulatus* z surowicą nie zawierającą przeciwciał dla *Borrelia burgdorferi*



Ryc. 2. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów amplifikacji (PCR); ścieżka 1 i 20 – wzorzec fragmentów DNA zawierających od 79 do 1057 pb (par zasad); 2 – zawiesina hodowli zawierająca 50 komórek *B. burgdorferi*; 3 – zawiesina hodowli zawierająca 100 komórek bakteryjnych; 4 – zawiesina hodowli zawierająca 100 komórek bakteryjnych i 5 μ l ekstraktu z kleszcza; 5–19 kleszcze badane

mikroskopowym należy brać pod uwagę także zmiany charakterystycznej morfologii tych bakterii powstałe podczas przygotowywania preparatu, szczególnie w trakcie jego utrwalania i wówczas widoczne liczne artefakty dodatkowo utrudniają właściwą interpretację wyników.

W ostatnich latach do badań krętków *B. burgdorferi* wprowadzono metody biologii molekularnej, w tym, w celu wykrycia zakażeń test PCR. Stosowane są różne układy wykrywające fragmenty DNA genów kodujących np. flagelinę, białko A błony zewnętrznej lub 16S rRNA. Nie stwierdzono nieswoistych produktów amplifikacji w układzie wykrywającym 16S rDNA, które mogą występować przy amplifikacji innych fragmentów DNA. Różna zawartość DNA i właściwości fizyczne badanej próbki wymagają jednak indywidualnego traktowania każdego rodzaju materiału, tak aby otrzymać wystarczającą ilość matrycowego-DNA, wolnego jednocześnie od inhibitorów (11).

Trudności w hodowli krętków *B. burgdorferi* są również przyczyną braku właściwej oceny czułości i swoistości stosowanych metod. Z tego powodu o swoistości dodatnich wyników można wnioskować jedynie pośrednio. Otrzymane przez nas wyniki badań przeprowadzonych metodą PCR są zgodne z obserwacjami innych badaczy stwierdzającymi, że wektorem *B. burgdorferi* są jedynie kleszcze z rodzaju *Ixodes* (1, 4, 5, 6). Stosując test IF obserwowaliśmy fluorescencję w materiale pochodzącym z kleszczy *D. reticulatus*, w których to zakażenie nie występuje, jak

również dodatnią reakcją badanego materiału z surowicą zdrowego człowieka. Test IF zastosowany do wykrywania zakażenia w kleszczach wykazywał reakcje nieswoiste w większości badanych próbek (tab. I). W badanym materiale fluorescencja widoczna była w 30 próbkach inkubowanych z surowicą nie zawierającą przeciwciał dla *B. burgdorferi* i 29 z surowicą odpornościową.

Ze względu na wysoką nieswoistość reakcji w odczynie IF porównanie wyników badań przeprowadzonych równoległe metodą IF i PCR jest niemożliwe i wydaje się, że reakcja immunofluorescencji nie może być stosowana do wykrywania antygenów w tego rodzaju materiale.

S. Tylewska-Wierzbanowska, D. Kruszewska, T. Chmielewski

THE COMPARISON OF INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE ASSAY
AND POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)
FOR DETECTION OF *BORRELIA BURGDORFERI* IN TICKS

SUMMARY

Material samples from 40 ticks, including 30 *Ixodes ricinus* and 10 *Dermacentor reticulatus* ticks were tested for presence of *Borrelia burgdorferi* infection with indirect immunofluorescence assay (IF) and polymerase chain reaction (PCR). Sensitivity of PCR in terms of minimum detectable number of *in vitro* cultivated spirochetes was a reproducible amplification when 50 spirochetes were added to the PCR mixture. The assay sensitivity was lower for *B. burgdorferi* in ticks and it was estimated on minimum 100 bacterial cells. *B. burgdorferi* DNA (16S rDNA) has been found in 10 *I. ricinus* ticks. Immunofluorescence has been observed in 32 samples derived from 22 *I. ricinus* and 10 *D. reticulatus* ticks both incubated with immune serum for *B. burgdorferi* as well as with normal serum. Our results indicate that due to very low specificity IF is not a useful method for testing of tick material.

PIŚMIENNICTWO

1. *Burgdorfer W.* i wsp.: Science., 1982, 216, 1317. – 2. *Dąbrowski J.* i wsp.: Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia, 1993/1994, 44/45, 61. – 3. *Siński E.* i wsp.: Przeg. Epid. 1994, 48, 463. – 4. *Stanek G.* i wsp.: Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. A, 1986, 263, 1. – 5. *Stanek G.* i wsp.: Zentralbl. Bakteriolog. (Suppl), 1989, 18, 1. – 6. *Steere A.C.* i wsp.: Ann Intern Med, 1979, 91 730. – 7. *Tylewska-Wierzbanowska S., Kruszewska D.*: Nowa Medycyna., 1995, 2, 7. – 8. *Tylewska-Wierzbanowska S.* i wsp.: Przeg. Epid., 1996, 50, 245. – 9. *Wegner Z.* i wsp.: Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia, 1993/1994, 44/45, 51. – 10. *Wegner Z.* i współ.: Materiały Międzynarodowego Sympozjum nt.: Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze. Białowieża, 28–29. 04. 1995 r.
- 11. *Weisburg W.G.* i wsp.: J. Bacteriol., 1991, 173, 693.

Adres: Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24