

*Edward Siński, Sjoerd G.T. Rijpkema*

WYSTĘPOWANIE ZAKAŻEŃ *BORRELIA BURGdorFERI S.L.*  
U KLESZCZY *IXODES RICINUS*  
W MIEJSKIM I PODMIEJSKIM BIOTOPIE LEŚNYM\*

Zakład Parazytologii Instytutu Zoologii, Uniwersytet Warszawski

Kierownik: prof. dr hab. *E. Siński*

Laboratory of Bacteriology and Antimicrobial Agents,

National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, Holandia

Kierownik: *dr S.G.T. Rijpkema*

*W związku z narastającym problemem zachorowań ludzi na boreliozę (chorobę z Lyme) podjęto próbę oceny zakażenia kleszczy *Ixodes ricinus* przez *Borrelia burgdorferi s.l.* w dwóch różnych biotopach leśnych. Badania prowadzono wiosną i latem 1996 roku w Lasku Bielańskim w Warszawie i w Dziekanowie Leśnym k. Warszawy. Zbadano łącznie 162 kleszcze metodą immunofluorescencji pośredniej (IFA). Zakażenie kleszczy *Borrelia burgdorferi s.l.* wynosiło średnio 19,2% w Lasku Bielańskim oraz 31% w Dziekanowie Leśnym. W próbach DNA izolowanego z pojedynczych kleszczy wykazano zakażenie 4 gatunkami *Borrelia*: *B. burgdorferi s.s.*, *B. afzelii*, *B. garinii* oraz grupą krętków VS116. Przedstawione wyniki wskazują na wysokie ryzyko zakażenia *B. burgdorferi s.l.* w parkach i lasach podmiejskich, gdzie endemicznie występują kleszcze *I. ricinus*.*

*Borrelia burgdorferi*, krętek z grupy *Spirochetae* jest etiologicznym czynnikiem boreliozy (choroby z Lyme) u ludzi. Krętki te są przenoszone przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W Europie głównym wektorem dla *B. burgdorferi* jest dość powszechnie występujący *Ixodes ricinus* (2). Z wcześniejszych badań prowadzonych w Polsce wynika, że w rejonach endemicznych dla *I. ricinus* od 15 do 20% badanych kleszczy jest zakażonych *B. burgdorferi* (10, 12, 15).

W Polsce, mimo iż w ostatnich latach zauważa się stały wzrost zachorowań ludzi na boreliozę, nie dokonuje się właściwej oceny środowiskowych uwarunkowań pojawiania się tej choroby. Nie są objęte dokładnymi badaniami biotopy leśne i parki, atrakcyjne tereny rekreacyjne i turystyczne, często odwiedzane przez ludzi. Nie jest również poznany stopień zakażenia kleszczy i ich udział w transmisji tego patogenu w tych środowiskach. W związku z tym, podjęto próbę oceny ekstensywności zakażenia *B. burgdorferi sensu lato* (s.l.) oraz określenie genogatunków *Borrelia* w wybranych populacjach kleszczy *I. ricinus* występujących w Warszawie, w Lasku Bielańskim oraz w otulinie Kampinoskiego Parku Narodowego, w Dziekanowie Leśnym.

\* Praca była częściowo finansowana z grantu KBN Nr 6PO4CO4713.

## MATERIAŁ I METODY

Kleszcze *I. ricinus* odławiano metodą flagowania w okresie wiosennym i letnim 1996 roku, w dwóch wybranych leśnych biotopach w Dziekanowie Leśnym k. Warszawy i w Lasku Bielańskim w Warszawie. W każdym z tych biotopów flagowano po 3 powierzchnie stanowiące ok. 100 m<sup>2</sup>. W celu określenia ekstensywności zakażenia kleszczy *B. burgdorferi* s.l. stosowano metodę immunofluorescencji pośredniej (IFA) z wykorzystaniem swoistych przeciwciał króliczych anty B-31. Preparaty do badań IFA sporządzano z żywych nienapitych kleszczy. Robiono rozmazy z kleszczy rozgniatanych pojedynczo w dołkach na szkiełkach do immunofluorescencji. Rozmazy utrwalano w acetonie przez 20 min. Pierwsze przeciwciało (surowicę króliczą anty B-31) rozcieńczano 1 : 100, drugie przeciwciało znakowane FITC (surowicę kozy anty królicze IgG) rozcieńczano 1 : 150. Inkubacje prowadzono w komorze wilgotnej; pierwszą przez 20 min, drugą przez 30 min w ciemności. Preparaty płukano w PBS pH 7,3. Preparaty przeglądano w mikroskopie Olympus AX70, pod immersją, przy powiększeniu 400 X, używając filtru 490 μm. Każdorazowo prowadzono badania kontrolne z surowicą dodatnią (królik anty B-31) oraz z surowicą króliczą ujemną w kolejnych rozcieńczeniach od 40 do 1280, używając wzorcowy antygen Lyme-Spot IF firmy bioMerieux, Francja. Przy użyciu tej metody zbadano łącznie 162 kleszcze, w tym: 56 nimf, 57 samic i 49 samców.

Metodą łańcuchowej reakcji polimerazowej (nested PCR) wg Rijpkema i wsp. (7) badano 20 samic *I. ricinus* zebranych w Dziekanowie Leśnym w maju 1996 r. Kleszcze przeznaczone do badań metodą PCR przechowywano w 70% alkoholu etylowym. W celu określenia genogatunków *Borrelia* zmienny region pomiędzy 5S rRNA i 23S RNA (Schwartz i wsp. (9)) był amplifikowany w PCR (Saiki i wsp. (8)) i fragmentowany przy użyciu *DraI*. W skrócie, reakcję PCR prowadzono w objętości 25 μl: 0,625 jednostki polimerazy *Taq* DNA (Amplitaq, Perkin Elmer, Roche Molecular System, New Jersey), bufor Saiki z dodatkiem 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM neukleotydów (dATP, dCTP, dGTP i dTTP), po 5 pmol startera 5S (5'-GGG AGA GTA GGT TAT TGC CAG GG-3') i 23S (5'-CCA TAG ACT CTT ATT ACT TTG ACC-3') oraz 10 ng genomowego DNA. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze Hybaid Omnigene TR3 SM2, Biozym (Holandia). Wstępną denaturację prowadzono przez 3 min w 94°C, po której następowało 25 cykli w temperaturach: 94°C przez 1 min., 57°C przez 1 min., 72°C przez 1 min. Produkt PCR był precypitowany w etanolu i trawiony z *DraI* (Boehringer Mannheim, Niemcy). Fragmenty DNA były analizowane w 4% żelu agarozowym (FMC Bioproducts, Maine).

## WYNIKI

Liczbę kleszczy odławianych i badanych oraz średnie wartości zakażenia kleszczy *B. burgdorferi* s.l. w poszczególnych miesiącach, w obu badanych biotopach leśnych, obrazują tabele I i II. Dane te wskazują, że zakażenie kleszczy z Dziekanowa Leśnego średnio wynosiło 31%, natomiast z Lasku Bielańskiego 19,2%. Kleszcze pochodzące z Dziekanowa Leśnego były znacznie częściej zainfekowane *B. burgdorferi* s.l. niż kleszcze pochodzące z Lasku Bielańskiego. Natomiast na terenie Lasku Bielańskiego

Tabela I. Liczba kleszczy *Ixodes ricinus* badanych i zakażonych przez *B. burgdorferi* s.l. w dwóch różnych biotopach leśnych.

	Dzieskanów Leśny			Lasek Bielański		
	nimfy	samice	samce	nimfy	samice	samce
Maj	6/3	6/2	nb	nb	nb	nb
Czerwiec	5/1	7/3	6/2	18/3	19/3	15/3
Lipiec	2/0	3/0	3/1	18/2	13/4	16/2
Sierpień	1/0	nb	3/1	6/1	9/4	6/0
Razem	14/4	16/5	12/4	42/6	41/11	37/5

licznik: liczba kleszczy badanych, mianownik: liczba kleszczy zakażonych, nb = nie badano

Tabela II. Odsetek kleszczy *I. ricinus* zakażonych przez *B. burgdorferi* s.l. w dwóch badanych biotopach leśnych\*

	Dzieskanów Leśny		Lasek Bielański	
	badane/zakażone	(%)	badane/zakażone	(%)
Maj	12/5	41,7	nb	
Czerwiec	18/6	33,3	52/10	19,2
Lipiec	8/1	12,5	47/8	17,0
Sierpień	4/1	25,0	21/5	23,8
Średnia	42/13	31,0	120/23	19,2

\* średnie wartości dla wszystkich form badanych kleszczy nb = nie badano

Tabela III. Porównanie zakażenia *I. ricinus* przez *B. burgdorferi* s.l. w jednym biotopie leśnym przy użyciu IFA i PCR oraz zróżnicowanie na genogatunki.

	Kleszcze badane/zakażone	(%)	Genogatunki	(%)
IFA	16/5	31,3	<i>B. burgdorferi</i> s.l. <i>B. burgdorferi</i> s.s.	(100) (14,2)
PCR	20/7	35,0	<i>B. garinii</i> <i>B. afzelii</i> VS116	(28,6) (14,2) (42,8)

\* Dzieskanów Leśny k. Warszawy (maj 1996)

odławiano trzykrotnie więcej (łącznie 120 sztuk wszystkich form rozwojowych) kleszczy w porównaniu z Dzieskanowem Leśnym (42 sztuki).

Porównanie wyników zakażenia kleszczy *B. burgdorferi* s.l. wykrywanych metodami IFA i PCR, jak również procent identyfikowanych genogatunków przedstawia tabela III. Przy użyciu metody IFA wykazano zakażenie u 5 na 16 (31,2%) badanych kleszczy, natomiast w PCR u 7 na 20 (35%) badanych kleszczy. Metodą PCR wykazano w badanych próbach DNA obecność 4 genogatunków *Borrelia*: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* oraz grupę krętków VS116. W próbach DNA dominowały sekwencje genomu charakterystyczne dla *B. garinii* i VS116 (28,6% i 42,8%).

## DYSKUSJA

Rozprzestrzenienie i ekologia *I. ricinus*, najbardziej pospolitego kleszcza w Polsce, jest znana od szeregu lat (11). Również dobrze wiadomo, że ten gatunek kleszcza może występować w parkach miejskich oraz innych biotopach leśnych na obrzeżach wielkich miast. Jednakże, do tej pory mało jest danych dotyczących oceny stopnia ryzyka zakażenia przez *B. burgdorferi* s.l. w tych biotopach często uczęszczanych przez ludzi. Stosunek kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* s.l. do badanych w obu biotopach leśnych był wysoki i wynosił średnio 19,2% dla Lasku Bielańskiego i 31% dla Dziekanowa Leśnego. Wyniki te, jak i inne wcześniejsze badania (9, 14) wskazują na to, że *I. ricinus*, najczęściej występujący w Polsce gatunek kleszcza z rodzaju *Ixodes*, może mieć istotne znaczenie w szerzeniu się zakażeń *B. burgdorferi*.

Mało poznane było dotychczas różnicowanie krętków *B. burgdorferi* s.l. na gatunki typowe dla ptaków (*B. garinii*) i gryzoni (*B. afzelii*) u kleszczy w badanych biotopach leśnych. Dotychczas przy użyciu technik molekularnych scharakteryzowano w Europie trzy odrębne genogatunki, tj. *B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.) *B. garinii* i *B. afzelii* (1). *Strle* i wsp. (13) określają te organizmy jako odrębne gatunki. Wymienione gatunki są traktowane łącznie jako *B. burgdorferi* s.l., a liczne gatunki dzikożyjących ssaków i ptaków są naturalnym rezerwuarem dla tych bakterii. *B. afzelii* jest gatunkiem stwierdzanym u gryzoni (*Rodentia*), a wśród nich u leśnych myszowatych (*Muridae*) (4). *B. garinii* w Europie występuje u ptaków z rodziny drozdowatych (*Turdidae*) i trznadłowatych (*Emberizidae*) (3).

Przedstawione badania PCR wskazują na występowanie w biotopie leśnym odrębnych gatunków *Borrelia* w obrębie *B. burgdorferi* s.l. Analiza taka może mieć istotne znaczenie, gdyż bardzo zróżnicowane objawy kliniczne boreliozy coraz częściej przypisuje się poszczególnym gatunkom *B. burgdorferi* s.l. (3, 6, 14). Dlatego, w celu należytej oceny epidemiologii boreliozy istnieje potrzeba dalszych badań nad zoonotycznym rezerwuarem poszczególnych gatunków *B. burgdorferi* s.l., które jak wiadomo mogą być przyczyną różnej patogenezы tej choroby u ludzi.

Zbyt mała liczba przebadanych kleszczy nie pozwala na ocenę właściwej ekstenzywności zakażenia *B. burgdorferi* w badanych biotopach. Jednakże, przedstawione wyniki wskazują na to, iż kleszcze *I. ricinus* występujące w parkach i lasach podmiejskich, które ze względu na swoje walory rekreacyjne są często uczęszczane przez ludzi, mogą być źródłem zakażeń *B. burgdorferi* s.l.

E. Siński, S.G.T. Rijpkema

PREVALENCE OF *BORRELIA BURGDORFERI* S.L. INFECTION IN *IXODES RICINUS*  
AT URBAN AND SUBURBAN FOREST HABITATS

## SUMMARY

The aim of this preliminary study was to estimate the risk of infection of *Ixodes ricinus* ticks by the agent of Lyme disease – *Borrelia burgdorferi* s.l. (Acari: *Ixodidae*). Ticks were collected from the vegetation during May – August 1996 at two different forest habitats: Dziekanów Leśny near Warsaw and Lasek Bielański in Warsaw. Prevalence of *B. burgdorferi* infection of the nymphs and

adults ticks was assessed by indirect immunofluorescence and polymerase chain reaction (PCR). Tick occurrence during time of sampling was greater in Lasek Bielański than in Dziekanów Leśny. In both forest habitats ticks were infected with *B. burgdorferi* s.l., and prevalence of infection ranged from 19,2% in Lasek Bielański to 31% in Dziekanów Leśny. Four species of *B. burgdorferi* s.l. were identified in the ticks: *B. burgdorferi* s.l., *B. garinii*, *B. afzelii* and group VS116. This study shows that suburban forest and urban park habitats where *I. ricinus* is present are risk areas of human infection with Lyme disease spirochaetes.

## PIŚMIENNICTWO

1. Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J.C., Assous M., Grimont P.A.D.: Int. J. Syst. Bacteriol., 1992, 42, 378. – 2. Gray J.S.: Rev. Med. Vet. Entomol., 1991, 79, 323. – 3. Marin Canica M., Nato F., du Merle L., Mazie J.C., Baranton G., Postic D.: Scand. J. Infect. Dis., 1993, 441. – 4. Nakao M., Miyamoto K.: J. Clin. Microbiol., 1995, 490. – 5. Olsen B., Jaenson T.G.T., Bergstrom S.: APP. Environ. Microbiol., 1995, 3082. – 6. Picken R.N., Cheng Y., Strle F., Cimperman J., Maraspin V., Lotric-Furlan S., Ruzic-Sabljic E., Han D., Nelson J.A., Picken M.M., Trenholme G.M.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1966, 15, 313. – 7. Rijpkema S., Nieuwenhuijs J., Franssen F.F.J., Jongejan F.: Exp. Appl. Acarol., 1994, 18, 531. – 8. Saiki R.K., Gelfland D.H., Stoffler S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Ehrlich H.A.: Science, 1988, 239, 487. – 9. Schwartz J.J., Gazumyan A., Schwartz I.: J. Bacteriol., 1992, 174, 3757. – 10. Siński E., Karbowski G., Siuda K., Buczek A., Jongejan F.: Przeg. Epid., 1994, 48, 461.
11. Siuda K.: Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. PWN, 1991, Warszawa-Wrocław. – 12. Stańczak J., Picken R.N., Wegner Z., Kubica-Biernat B., Picken M.M.: VII International Congress on Lyme Borreliosis, San Francisco, California, June 16–21, 1996, 102. – 13. Strle F., Cheng Y., Nelson J.A., Picken M.M., Bouseman J.K., Picken R.N.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1995, 14, 994. – 14. van Dam A.P., Kuiper H., Vos K., Widjojokusumo A., de Jongh B.M., Spanjaard L., Ramselaar A.C., Kramer M.D., Dankert J.: Clin. Infect. Dis., 1993, 17, 708. – 15. Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B.: Biuletyn Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdynia, 1994, 27, 68.

Adres: Zakład Parazytologii Instytutu Zoologii, Uniwersytet Warszawski,  
00-927 Warszawa, ul. Krakowskie Przedmieście 26/28.