

Jacek Jenek¹, Krzysztof Siuda²

WYSTĘPOWANIE KRĘTKÓW *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO*
W KLESZCZACH *IXODES RICINUS*
Z MUZEALNEJ KOLEKCJI KLESZCZY OCENIONE
METODĄ ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR)*

¹ Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych,
Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
p.o. Kierownik: dr hab. med. A. Szkaradkiewicz

² Katedra Biologii i Parazytologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. A. Deryło

*Oceniono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) występowanie czynnika etiologicznego choroby z Lyme – krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* – w 51 kleszczach *Ixodes ricinus* odłowionych z 21 stanowisk – głównie na terenie Wielkopolski – w latach 1948–1987. Obecność krętków stwierdzono w 3 (5,56%) kleszczach.*

*Kleszcze *I. ricinus* jako wektor i rezerwuar krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato*, czynnika etiologicznego krętkowicy kleszczowej (boreliozy z Lyme, choroby z Lyme), często wielonarządowej, przewlekłej, o fazowym przebiegu i nie do końca rozpoznanej etiopatogenezie (8) choroby u ludzi, odgrywają kluczową rolę w epidemiologii tej choroby (4, 10). Są one w Polsce pospolite i szeroko rozpowszechnione (7). Również na terenie Wielkopolski znane są liczne stanowiska kleszczy tego gatunku (7).*

Wstępna ocena zakażenia krętkami *B. burgdorferi sensu lato* kleszczy *I. ricinus* na tym terenie, dokonana w oparciu o metodę PCR z wykorzystaniem oligonukleotydowych starterów rozpoznających chromosomalną sekwencję swoistą dla krętków *B. burgdorferi sensu lato* wykazała, że od 11,5 do 46,8% kleszczy jest zakażonych krętkami (3).

W niniejszej pracy dokonano analizy obecności DNA krętków *B. burgdorferi sensu lato* w kleszczach ze znajdującej się obecnie w posiadaniu katedry Biologii i Parazytologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach muzealnej kolekcji kleszczy zebranych głównie na terenie Wielkopolski w latach 1948–1987 przez prof. Jana Rafalskiego z Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu.

* Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych.

MATERIAŁ I METODY

Analizowana kolekcja liczyła 58 kleszczy: 14 larw, 16 nimf i 28 postaci dorosłych (17 samic, 11 samców) z gatunku *I. ricinus* (Linnaeus, 1758) zebranych w latach 1948–1987 w 21 miejscach, których lokalizację podano w tabeli I. Kleszcze przechowywano w alkoholu. Do badań metodą PCR wykorzystano 51 kleszczy; odrzucono 7 samic ze względu na nadmierne opicie krwią.

Tabela I. Występowanie krętków *B. burgdorferi sensu lato* w kleszczach *I. ricinus* z kolekcji muzealnej

Lp.	Data	Miejsce	Województwo	Liczebność			
				Larwy	Nimfy	Samice	Samce
1	27.05.1983	Kórnik k. Poznania	poznańskie		1		
2	15.10.1965	Wieleń	piłskie			1*	1
3	07.1983	Poznań-Sołacz	poznańskie			2*	2
4	12.09.1968	Poznań	poznańskie			1	1
5	15.06.1981	Poznań	poznańskie			1	
6	03.1951	Rabczyn	kaliskie			1	
7	29.04.1973	Gogolewo	leszczyńskie	2			
8	26.04.1976	Potasze				1	
9	16.07.1986	Górzyca	gorzowskie			2*	2
10	07.07.1985	Głębokie k. Międzyrzecza	gorzowskie			2*	2
11	06.1952	Poznań-Gołącin	poznańskie	3	7		
12	06.1987	Poznań	poznańskie			1	
13	23.08.1987	Poznań-Gołącin	poznańskie		2		
14	17.09.1967	Starczanowo k. Obornik	poznańskie			1	
15	13.09.1951	Starczanowo k. Obornik	poznańskie		4	1	
16	3/4.06.1955	Piaski k. Ostrowa Wlkp.	kaliskie	7			
17	07.08.1951	Wielkopolski Park Narodowy	poznańskie			1	1
18	1948	Sulęcín	gorzowskie			1	
19	15.10.1965	Wieleń	piłskie			1	
20	03.09.1971	Rezerwat Nowa Wieś	sieradzkie	2	2		1
21	17.10.1967	Radzim k. Obornik	poznańskie			1	

* kleszcze nie badane

DNA z kleszczy izolowano po uprzednim rozgnieceniu kleszcza w 20 μ l jałowej wody dest. przy życiu rodanku guanidyny w obecności krzemionki (1).

Reakcję amplifikacji prowadzono w termocyklerze Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Niemcy) używając starterów BOR1 i BOR2 (BOR1: 5'-CCA ACT TTA TCA AAT TCT GC-3'; BOR2: 5'-CCA AAT ACA GAA AAA TCG CTT-3'). Piętnaście μ l ekstraktu DNA z badanej próbki dodawano do 10 μ l mieszaniny odczynników. Stężenie końcowe odczynników użytych w reakcji amplifikacji było następujące: 200 μ M każdego z czterech dezoksyrybonukleotydtrójfosforanów (dezoksyadenzynotrójfosforan, dezoksytymidynotrójfosforan, dezoksyguanozynotrójfosforan i dezoksycytozynotrójfosforan); 1 μ M każdego ze starterów; 10 mM Tris-HCl pH 8.4;

50 mM KCl; 2 mM MgCl₂; 0.001% w/v żelatyna; 20 U/ml polimeraza DNA (AmpliTaq, Perkin Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA). Reakcja obejmowała, po wstępnej denaturacji przez 5 min., 35 cykli: temp. 92°C – 15 sek., temp. 55° – 1 min. 15 sek., temp. 72°C – 1 min. 15 sek. oraz końcową syntezę w 72°C przez 10 min. Produkt PCR rozdzielano elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym z bromkiem etydydy oraz po przeniesieniu na błonę Hybond (*Southern-blot*) hybrydyzowano z sondą DNA wyznakowaną digoksygeniną. Każda seria reakcji obejmowała oprócz prób badanych kontrolę dodatnią (amplifikacja DNA wyizolowanego ze szczepu *B. burgdorferi* B31) oraz kontrolę ujemną (zamiast DNA dodawano wodę).

WYNIKI

Badaniom poddano 51 kleszczy, w tym 14 larw, 16 nimf i 28 postaci dorosłych (17 samic, 11 samców) zebranych z 21 stanowisk. Obecność DNA *B. burgdorferi* stwierdzono w 3 (tj. 3,56%) przebadanych kleszczach. Wszystkie trzy zakażone kleszcze, w stadium nimfy, pochodziły z tego samego miejsca – terenów rekreacyjnych na Gołęczynie w Poznaniu. Dwie zakażone krętkami nimfy zebrane zostały w czerwcu 1952 roku (zebrano 3 larwy i 7 nimf), jedna w sierpniu 1987 (zebrano 2 nimfy).

OMÓWIENIE

Badania obecności krętków *B. burgdorferi sensu lato* w kleszczach *Ixodes ricinus* prowadzone w Polsce (3, 5, 6, 11, 12) i innych krajach (2), wskazują, że częstość występowania zakażonych kleszczy jest zróżnicowana. W różnych rejonach Niemiec zakażonych jest od 11 do 34% postaci dojrzałych, w Szwajcarii – 5–34%, w Szwecji – 3–23%, na Litwie – 9–12% (4). Z badań *Wegner* i wsp. (11) prowadzonych metodą immunofluorescencji pośredniej wynika, że częstość zakażenia kleszczy krętkiem *B. burgdorferi* w woj. olsztyńskim w roku 1993 wynosiła średnio 11,5%, a na niektórych stanowiskach dochodziła do 35,7%. Prowadzone przez ten sam zespół i taką samą metodą badania na terenie woj. białostockiego w roku 1994 wykazały obecność krętków u 8,8% kleszczy (12). Natomiast w badaniach *Sińskiego* i wsp. (6) prowadzonych tą samą techniką na kleszczach zebranych na wielu stanowiskach w woj. woj. zamojskim, krakowskim, suwalskim i katowickim, odsetek zakażonych kleszczy wahał się od 4 do 58,3%. Ogółem u przebadanych 191 kleszczy, *B. burgdorferi* stwierdzono w 15,1% przypadków (6). *Pet'ko* i wsp. (5) stwierdzili na terenie Katowic i Mikołowa (Górny Śląsk) oraz w północno-zachodniej części województwa tarnowskiego, że liczba zakażonych krętkami dorosłych kleszczy wahała się od 4,0 do 15,0% z 791 zbadanych okazów. *Tylewska-Wierzbanowska* i wsp. (9) analizując metodą PCR obecność krętków *B. burgdorferi* w 1580 kleszczach zebranych na terenie całej Polski stwierdzili obecność krętków tylko w 12 (0,77%) kleszczach. Przyczyną znalezienia krętków *Bb* w tak małej liczbie kleszczy może być ograniczenie analizy produktu PCR tylko do techniki elektroforetycznej. Jak wynika z obserwacji własnych, produkt PCR nie zawsze występuje w ilościach dających się uwidocznić w żelu agarozowym i niezbędna jest jego detekcja przez hybrydyzację ze swoistą

sondą. Nie bez znaczenia wydaje się też metoda pozyskiwania kleszczy do badań (w większości były to pojedyncze kleszcze przesyłane do PZH).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki otrzymano badając kleszcze zebrane w sposób podobny jak kleszcze analizowane przez *Wierzbanowską* i wsp. (9). Z reguły były to pojedyncze okazy. Tylko w 7 przypadkach liczebność zebranych na jednym stanowisku kleszczy była większa niż 3 okazy. Z wcześniejszych badań wynika, że średnio ok. 25% kleszczy może być na terenie Wielkopolski zainfekowanych krętkami wywołującymi boreliozę z Lyme (3). Zdecydowanie niższy odsetek zakażonych kleszczy z kolekcji muzealnej nie jest w naszej opinii odbiciem rzeczywistej częstości występowania krętków *Bb* w kleszczach.

J. Jenek, K. Siuda

OCCURENCE OF *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* SPIROCHAETES
IN *IXODES RICINUS* TICKS FROM MUSEUM COLLECTION EVALUATED
BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHODS

SUMMARY

Ixodes ricinus ticks (total n=51:14 larvae, 16 nymphs, 17 females and 11 males) collected at 21 different sites during 1948–1987 were examined individually for the presence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* spirochaetes. Detection of spirochaetes was carried out by polymerase chain reaction (PCR) using primers complementary to chromosomal sequence. Borreliae were found in 3 (3,56%) examined ticks (nymphs) collected at the same site (two in June, 1952 and one in August, 1987). The low number of infected ticks found in this investigation do not reflects real infection rate in tick population.

PIŚMIENICTWO

1. *Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim P.M.E., Van-Der-Noorda J.*: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 495. – 2. *Flisiak R., Żabicka J.*: Przeg. Epid. 1995, 49, 373. – 3. *Jenek J., Głazaczow A.*: Przeg. Epid., 1996, 50, 383. – 4. *Kocięcka W.*: Borelioza – Choroba z Lyme. Mat. Polsko-Litewskiej Konferencji Naukowej, Poznań, 1993. – 5. *Pet'ko B., Siuda K., Stanko M., Tresova G., Karbowski G., Fričowa J.*: Ann. Agricult. Environ. Med., w druku. – 6. *Siński E., Karbowski G., Siuda K., Buczek A., Jongejan F.*: Przeg. Epid., 1994, 48, 461. – 7. *Siuda K.*: Kleszcze Polski (Acari: Ixodidia). Cz. II. Systematyka i rozmieszczenie. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa, 1993. – 8. *Szkaradkiewicz A.*: Polsko-Litewska Konferencja Naukowa, Poznań, 13 listopada 1993, 1993. – 9. *Tylewska-Wierzbanowska S.*: Przeg. Epid., 1996, 50. – 10. *Wegner Z., Stańczak J.*: Przeg. Epid., 1995, 49, 245.
- 11. *Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kurminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B.*: Bull. Inst. Mar. Trop. Med., Gdynia, 1993/1994, 44/45, 51. – 12. *Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kurminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B.*: Międzynar. Symp.: Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze, Białystok, 1995.

Adres: Zakład Mikrobiologii Lekarskiej AM
ul. Wienawskiego 3, 61-712 Poznań