

Beata Rozwadowska, Grzegorz Hudzik

## GENOGATUNKI KRĘTKÓW *BORRELIA BURGdorFERI* WYKRYTE NA TERENIE WOJEWÓDZTWA ŚLĄSKIEGO W LATACH 2010-2012

*BORRELIA BURGdorFERI* GENOSTRAINS DETECTED  
IN THE SILESIAN VOIVODESHIP IN YEARS 2010-2012

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

### STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy była ocena występowania genogatunków krętków *Borrelia burgdorferi* na terenie województwa śląskiego w latach 2010 – 2011 oraz w pierwszej połowie 2012 roku.

**MATERIAŁ I METODY.** Badano próbki krwi osób ukłutych przez kleszcze oraz kleszcze dostarczone do Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Katowicach przez pacjentów. Materiał do badań przeanalizowano pod kątem obecności trzech genogatunków *Borrelia burgdorferi*: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* oraz *Borrelia garinii* z wykorzystaniem metody real-time PCR.

**WYNIKI.** W badanych próbkach wykazano obecność materiału genetycznego dwóch genogatunków *Borrelia burgdorferi* tj. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto i *Borrelia afzelii*. Nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *Borrelia garinii*.

**WNIOSKI.** Badania dotyczące występowania poszczególnych genogatunków *Borrelia burgdorferi* mają duże znaczenie przy ocenie ryzyka zakażenia krętkami mieszkańców województwa śląskiego i osób przebywających tam okresowo.

**SŁOWA KLUCZOWE:** *Borrelia burgdorferi*, reakcja łańcuchowa polimerazy, genogatunek, województwo śląskie.

### ABSTRACT

The aim of this study was to analyze *Borrelia burgdorferi* genostrains appearing in the Silesian voivodeship in years 2010-2011 and the first half of 2012.

**MATERIAL AND METHODS.** The analysis was conducted on blood samples of persons bitten by ticks and ticks provided to The Provincial Sanitary Epidemiological Station in Katowice from patients. The material was examined under the angle of three genostrains of *Borrelia burgdorferi*: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* with using real-time PCR method.

**RESULTS.** It was shown that only two genostrains of *Borrelia burgdorferi* were detected in the nucleic acid extracts from samples i.e.: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii*. *Borrelia garinii* wasn't detected in the nucleic acid extracts.

**CONCLUSIONS.** Study on the prevalence of individual *Borrelia burgdorferi* genostrains are important in assessing the risk of infection spirochetes inhabitants of The Silesian province and persons staying there temporarily.

**KEY WORDS:** *Borrelia burgdorferi*, Polymerase Chain Reaction (PCR), genostrain, The Silesian voivodeship.

## WSTĘP

Krętki *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) są to Gram-ujemne bakterie będące czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme. Jest to choroba odzwierzęca przenoszona przez kleszcze z rodzaju *Ixodes* (1, 2). Zakażenia krętkami *Borrelia* spp. stanowią poważny problem diagnostyczny, m. in. ze względu na heterogenność antygenową krętków. Rutynowa diagnostyka boreliozy oparta jest na zastosowaniu komercyjnych testów serologicznych ELISA (z ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) i Western blot. Większość z tych testów wykorzystuje antygeny patogennych genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato tj. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* (*B. garinii*), *Borrelia afzelii* (*B. afzelii*) oraz ostatnio opisana *Borrelia spielmanii* (*B. spielmanii*) i *Borrelia bavariensis* (*B. bavariensis*) (3,4).

Diagnostyka serologiczna boreliozy sprawia duże trudności interpretacyjne, ponieważ odpowiedź immunologiczna może przebiegać odmiennie od typowego schematu opisywanego w przypadku innych chorób infekcyjnych. Główne problemy, jakie napotykamy w diagnostyce laboratoryjnej boreliozy, są wynikiem różnorodnych strategii życiowych krętków *B. burgdorferi*, które są związane z ich zmiennością morfologiczną w odpowiedzi na stres środowiskowy, zmiennością antygenową będącą wyrazem adaptacji do różnych warunków środowiskowych oraz wewnątrzkomórkowym przebywaniem i ukrywaniem się w obszarach immunologicznie uprzywilejowanych (5, 6).

Konsekwencją trudności diagnostycznych zakażeń *Borrelia* spp. może być uzyskiwanie w laboratoriach wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Wyniki fałszywie dodatnie uzyskiwane są w laboratoriach bardzo często w oparciu tylko o wynik testu skriningowego ELISA, który jest testem nadczułym. Wyniki pozytywne i wątpliwe uzyskane testem ELISA zawsze powinny być potwierdzone metodą Western-blot (7). Trudności diagnostyczne zakażeń krętkami związane są ze zbyt niską swoistością testów diagnostycznych, słabą korelacją zastosowanych antygenów z genogatunkami wywołującymi zakażenia oraz brakiem związku pomiędzy stężeniem przeciwciał a stanem klinicznym pacjenta (6).

Reakcja łańcuchowa polimerazy z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (z ang. *real-time PCR*) jest metodą diagnostyczną, mającą zastosowanie w najwcześniejszym etapie zakażenia krętkami. Jest to najczulsza ze znanych obecnie metod diagnostycznych, która posiada szereg zalet, ale i wad (7). Dzięki niej możliwe jest wykrycie materiału genetycznego oraz oznaczenie ilości kopii genomowego DNA komórek bakterii *B. burgdorferi*. Badanie metodą real-time PCR

pozwała na zdiagnozowanie infekcji już w ciągu kilkunastu godzin od zakażenia, tj. na długo przed pojawieniem się odpowiedzi immunologicznej organizmu, co ma kluczowe znaczenie dla efektywności leczenia. Materiał do badań diagnostycznych w/w metodą stanowi: krew pełna, płyn stawowy, płyn mózgowo-rdzeniowy (PMR) oraz biopaty ze zmian skórnych (8). Metoda real-time PCR wykorzystywana jest także do wykrywania materiału genetycznego krętków *B. burgdorferi* wyizolowanego z kleszczy będących ich rezerwuarem. Pozwala to na monitorowanie zasięgu występowania geograficznego zakażonych kleszczy oraz korelujących z nim zakażeń krętkami u pacjentów (9).

Celem pracy była ocena występowania krętków *Borrelia burgdorferi* na terenie województwa śląskiego w latach 2010-2011 oraz w pierwszej połowie 2012 roku z uwzględnieniem genogatunku na podstawie badania próbek krwi pacjentów i kleszczy. Analizę przeprowadzono na podstawie materiału badawczego zleconego do badania przez pacjentów.

## MATERIAŁ I METODY

Badano na obecność materiału genetycznego *Borrelia* spp. 46 próbek krwi od pacjentów oraz 63 kleszcze. Badanie wykonano metodą real-time PCR. Izolowany materiał genetyczny zbadano na obecność trzech genogatunków *B. burgdorferi*: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii* oraz *Borrelia garinii*.

Próbki do badań stanowiły próbki krwi pobrane na EDTA oraz żywe kleszcze odpowiednio zabezpieczone w probówkach lub kleszcze zalane roztworem 70% alkoholu etylowego. Krew do badań została pobrana w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Katowicach od pacjentów, którzy zostali ukłuci przez kleszcza w ciągu ostatnich kilku dni lub podejrzewają u siebie boreliozę, której nie potwierdziły metody serologiczne. Natomiast kleszcze zostały dostarczone do badań bezpośrednio przez pacjentów do Interdyscyplinarnej Pracowni Diagnostyki Molekularnej WSSE w Katowicach.

**Izolacja materiału genetycznego.** Izolację materiału genetycznego z krwi oraz kleszczy przeprowadzono na zestawach kolumnkowych „High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Do izolacji materiału genetycznego z pełnej krwi pobranej na EDTA zastosowano odpowiednią procedurę izolacji, zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Natomiast do izolacji DNA bakterii z kleszczy zastosowano protokół do izolacji materiału genetycznego z materiału tkankowego. Kleszcze przed inkubacją z buforem lizującym były macerowane w probówce. W obu protokołach izolacji zmodyfikowano etap wyflukiwania DNA z kolumnek, minimalizując

objętość buforu do elucji z 200 µl do 50 µl. Czynność wypłukiwania DNA z kolumnienki została powtórzona w celu uzyskania większego stężenia DNA w izolacie.

**Wykrywanie krętków *Borrelia* spp.** Wykrywanie krętków *Borrelia* spp. przeprowadzono stosując termocykler LightCycler 2,0 firmy Roche. Reakcję amplifikacji w czasie rzeczywistym przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu do wykrywania „LightMix Kit for the detection of *Borrelia* spp.” (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) oraz “LightCycler FastStart DNA Master HybProbe” (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Reakcja amplifikacji była oparta na przyłączeniu komplementarnych starterów do specyficznego fragmentu genomu *Borrelia* spp. o długości 157 par zasad. Natomiast do detekcji zastosowano wyznaczone sondy hybrydujące HybProbe. Produkty reakcji amplifikacji były identyfikowane na podstawie temperatury topnienia produktów (Tm) tj. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto – 62,4°C; *Borrelia afzelii* – 71,9°C; *Borrelia garinii* – 67,1°C. Reakcję detekcji przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producentów ww. zestawów.

## WYNIKI

Łącznie zbadano 109 próbek w kierunku wykrycia obecności materiału genetycznego *Borrelia* spp. metodą real-time PCR. W badanym materiale stwierdzono obecność materiału genetycznego *Borrelia* spp. w 12 izolatach, co stanowiło 11% (tab. I).

Tabela I. Wyniki badania próbek krwi i kleszczy w kierunku obecności materiału genetycznego *B. burgdorferi* metodą real-time PCR

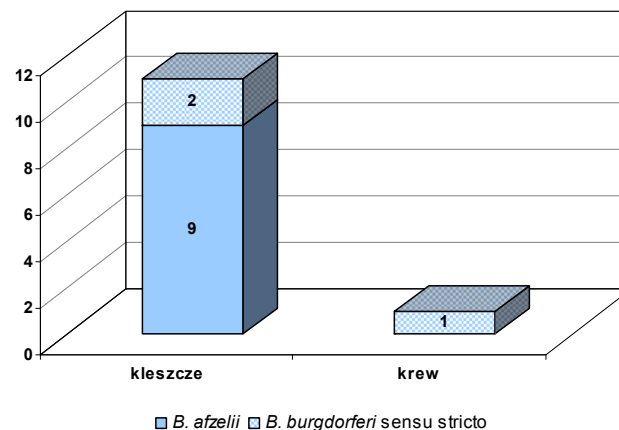
Table I. The results of the samples blood and ticks examined towards detecting the nucleic acid extract from *B. burgdorferi* with use real-time PCR method

Materiał badawczy	Liczba próbek badanych	Liczba próbek dodatnich (%)	Liczba próbek ujemnych (%)
Kleszcze	63	11 (17,5)	52 (82,5)
Krew	46	1 (2,2)	45 (97,8)
Razem	109	12 (11,0)	97 (89,0)

Spośród 12 próbek, które cechowały się logarytmicznym przyrostem fluorescencji, 11 wyników pozytywnych uzyskano z materiału wyizolowanego z kleszczy, natomiast tylko 1 wynik pozytywny uzyskano z izolatu z krwi (ryc. I). Analiza wykazała, że aż 17,5% przebadanych kleszczy z terenu województwa śląskiego jest rezerwuarem krętków *Borrelia burgdorferi* (tab. I).

W materiale genetycznym wyizolowanym z kleszczy stwierdzono obecność dwóch genogatunków *B. burgdorferi*: *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto,

z czego w 9 próbkach wykryto *B. afzelii*, a w 2 próbkach wykryto *B. burgdorferi* sensu stricto. Natomiast w badanych próbkach krwi wykryto obecność DNA krętków *B. burgdorferi* sensu stricto (ryc. I). W żadnej z próbek nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *B. garinii* i nie zaobserwowano koinfekcji dwoma genogatunkami *B. burgdorferi*.



Ryc. I. Genogatunki *B. burgdorferi* wykryte na terenie województwa śląskiego metodą real-time PCR w latach 2010-2012

Fig. I. *B. burgdorferi* genotypes appearing in the Silesian voivodeship detected by real-time PCR method in years 2010-2012

## DYSKUSJA

Badanie wykazało, że na terenie województwa śląskiego występują dwa genogatunki *B. burgdorferi*. Jest to *B. afzelii* i *B. burgdorferi* sensu stricto, a genogatunkiem dominującym jest *B. afzelii*. Uzyskany wynik różni się od wyników badania z terenu Lubelszczyzny, gdzie w latach 2005-2006 genogatunkiem dominującym była *B. burgdorferi* sensu stricto (10).

Ponadto, stwierdzono, iż jest większe prawdopodobieństwo wykrycia DNA *B. burgdorferi* wyizolowanego z kleszczy niż z krwi pacjentów. Przyczyną tego jest zapewne fakt, iż obecność krętków we krwi może być krótkotrwała, a ilość drobnoustrojów niewielka (11). Jednak niestety wykrycie obecności DNA bakterii izolowanych z kleszczy nie jest bezpośrednim dowodem na zakażenie krętkami ukłutego przez nie człowieka. Może świadczyć jedynie o tym, że mogło dojść do zakażenia, ale na pewno go nie potwierdza. Jednak wynik ten może sugerować odpowiednie leczenie w celu zminimalizowania ryzyka rozwoju choroby.

Istotne jest również to, że wykrycie materiału genetycznego krętków *Borrelia* w krwi nie pozwala na odróżnienie aktualnego zakażenia od przebytego w przeszłości (11). Uzyskanie wyniku dodatniego we krwi jest pomocne przy wdrożeniu leczenia odpo-

wiednio wcześniej, jeszcze przed rozwojem choroby, której objawy mogą być wysoce niespecyficzne lub jej przebieg może być skąpoobjawowy. Zakażenie konkretnym genogatunkiem jest skorelowane z występowaniem specyficznych objawów chorobowych, gdyż różne patogenne genogatunki *Borrelia* determinują różne powinowactwo do układów i narządów. I tak *B. burgdorferi* sensu stricto powoduje głównie zmiany w układzie stawowym, natomiast *B. afzelii* jest przyczyną występowania objawów dermatologicznych. Dlatego też, wiedza z tego zakresu może ułatwić i bardziej skutecznie terapię lekową (12, 13). W uzyskanych wynikach nie stwierdzono koinfekcji kilkoma genogatunkami *B. burgdorferi*.

#### PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

- Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono w latach 2010-2012 występowanie dwóch genogatunków *Borrelia* spp. na terenie województwa śląskiego.
- Znajomość czynnika etiologicznego boreliozy i jego rozprzestrzeniania może być wykorzystana w zapobieganiu zakażeniu i szybkemu wdrożeniu skutecznego leczenia.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanowska S. Występowanie przeciwciał swoistych dla *Borrelia burgdorferi* u ludzi zdrowych na terenie Polski. *Przegl Epidemiol* 2002; 56:33-8.
2. Chmielewski T, Andrzejewski K, Mączka I, i in. Kleszcze zakażone bakteriami chorobotwórczymi dla człowieka na terenach parków miejskich warszawy. *Przegl Epidemiol* 2011; 65: 577-581.
3. Biesiada G, Czepiel J, Salamon D, i in. Analiza genotypów krętków *Borrelia burgdorferi* w grupie chorych na boreliozę. *Przegl Lek* 2009; 66 (9): 511-512.

4. Stanek G, Wormser GP, Gray J, i in. Lyme borreliosis. 2011. [www.aldf.com/pdf/Lancet\\_Seminar\\_on\\_Lyme\\_Borreliosis\\_2011.pdf](http://www.aldf.com/pdf/Lancet_Seminar_on_Lyme_Borreliosis_2011.pdf). (02.04.2012).
5. Anguita J, Hedrick MN, Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27: 493-504.
6. Witecka-Knysz E, Klimczak M, Lakwa K, i in. Borelioza: dlaczego diagnostyka jest tak trudna? *Diagnosta laboratoryjny* 2007; 1 (13): 11-13.
7. Chmielewski T, Tylewska-Wierzbanowska S. Borelioza z Lyme, laboratoryjne metody rozpoznania zakażenia. *Diagnosta laboratoryjny* 2007; 2(14): 5-7.
8. Zajkowska J, Pancewicz SA, Grygorczuk S, i in. Neuroborelioza – wybrane aspekty patogenezy, diagnostyki i leczenia. *Pol Merk Lek* 2008; 24 (143): 453-457.
9. Mączka I, Tylewska-Wierzbanowska S. Cykl krążenia krętków *Borrelia burgdorferi* w środowisku. *Post Mikrobiol* 2010; 49,1:25-32.
10. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Strojek NM, i in. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (Eastern Poland). *Ann Ggric Environ Med* 2006; 13: 301-306.
11. Dunaj J. Znaczenie badań PCR w diagnostyce boreliozy z Lyme. W: *Neuroinfekcje, streszczenia. VII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, 13-15 października 2011 r.* Białystok. Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Polska 2011: 15.
12. Shapiro ED, Gerber MA. Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 533-42.
13. Zajkowska J, Hermanowska-Szpakowicz T, Pancewicz S. Borelioza z Lyme- zasady skutecznego leczenia. *Zakażenia* 2007; 4: 2-7.

Otrzymano: 13.07.2012 r.

Zaakceptowano do druku: 28.09.2012 r.

#### Adres do korespondencji:

Lek. med. Grzegorz Hudzik

Mgr Beata Rozwadowska

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

ul. Raciborska 39, 40-957 Katowice

tel. 32 351 23 00

e-mail: [katowice@pis.gov.pl](mailto:katowice@pis.gov.pl)