

Stanisława Tylewska-Wierzbanowska¹, Danuta Kruszewska¹, Tomasz Chmielewski¹,
Kazimierz Żukowski², Jadwiga Żabicka³

KLESZCZE JAKO REZERWUAR *BORRELIA BURGENDORFERI* I *COXIELLA BURNETII* NA TERENIE POLSKI*

¹ Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. S. Kalużewski

² Zakład Zwalczania Skażeń Biologicznych
Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: dr H. Krzywicka

³ Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. med. W. Magdzik

Zbadano 1580 kleszczy pochodzących z terenu całej Polski, w kierunku zakażenia *Borrelia burgdorferi* i *Coxiella burnetii*. Kleszcze te należały do gatunków: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Argas reflexus* i zostały zebrane z roślin bądź zdjęte ze skóry ludzi i zwierząt. Stosując test łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) wykryto obecność *B. burgdorferi* w 12 kleszczach *I. ricinus* (0,77%) pochodzących z województw: koszalińskiego, krośnieńskiego i suwalskiego i zakażenie *C. burnetii* w 3 kleszczach tego samego gatunku (0,19%) w województwie kieleckim i tarnobrzesckim.

Rozprzestrzenienie kleszczy zakażonych *Borrelia burgdorferi* i *Coxiella burnetii* jako rezerwuaru i wektora gorączki Q oraz boreliozy z Lyme na terenie Polski nie jest znane. W ostatnich latach rozpoczęto w niektórych rejonach kraju badania oceniające częstość występowania wśród kleszczy zakażenia krętkami *B. burgdorferi*. Na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że odsetek zakażonych kleszczy na terenie województwa olsztyńskiego wynosi 11,5%–33,0%, w województwie białostockim 4,0%–19,6%, a w południowej Polsce, w rejonie Zamościa, Krakowa, Katowic dochodzi do 58,3% (2, 7, 10). Przedmiot tych badań stanowiły głównie kleszcze odłowione z roślin. Natomiast wśród osobników pasożytujących na dzikich zwierzętach, w województwie suwalskim stwierdzono zakażenie u 3,5% larw kleszczy żerujących na gryzoniach i u 3,2% kleszczy usuniętych ze skóry jeleni i dzików (9).

Obecność ognisk naturalnych gorączki Q, występowanie zakażonych gryzoni i kleszczy stwierdzano w województwie olsztyńskim, białostockim, suwalskim (1). Szczepy *C. burnetii* wyizolowano z kleszczy pochodzących z województwa leszczyńskiego, odłowionych w bliskim sąsiedztwie fermy bydła, w której stwierdzono masowe zakażenia wśród zwierząt (8).

MATERIAŁ I METODY

Kleszcze zbierano w różnych rejonach kraju w następujący sposób:

– z roślin: traw, krzewów, mechanicznie zdejmując je przy pomocy szorstkiego materiału;

– ogłoszono w wydawanych przez Zakład Epidemiologii PZH „Meldunkach o zgłoszonych zachorowaniach” apel do pracowników Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych i lekarzy o przesyłanie za pośrednictwem Wojewódzkich Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych do Państwowego Zakładu Higieny, kleszczy wyjętych ze skóry ludzi i zwierząt, podając dokładną datę, miejsce (miejscowość, gmina, krótki opis terenu) oraz okoliczności ich znalezienia.

Określano gatunek i stadium rozwojowe odłowionych kleszczy. Każdego z nich przecinano wzdłuż na dwie części. Pierwszą z nich rozcierano i otrzymany materiał stosowano do testów: immunofluorescencji pośredniej i łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Drugą część zamrażano w -30°C do dalszych badań.

Test immunofluorescencji pośredniej. Materiał otrzymany po roztarciu kleszcza stosowano jako antygen. Po naniesieniu na szkiełko podstawowe i utrwaleniu w acetonie, inkubowano z ludzką surowicą zawierającą przeciwciała dla *B. burgdorferi*, a następnie z immunosurowicą przeciw ludzkim immunoglobulinom, znakowaną izotiocyjanianem 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) (6, 12). 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 μl otrzymanego ekstraktu dodając po 5 pmol odpowiednich starterów, 100 mM dATP, dCTP, dGTP i dTTP (Behringer Mannheim Biochemicals), 3 μl MgCl_2 i 5 μl 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:

– w celu wykrycia zakażenia *B. burgdorferi* – 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.

– w celu wykrycia zakażenia *Coxiella burnetii* – 35 cykli z denaturacją w 95°C przez 35 sekund, przyłączeniem starterów w 50°C przez 60 sekund i polimeryzacją w 72°C przez 120 sekund. Poszukiwano sekwencji DNA charakterystycznej dla genu SOD *C. burnetii*;

Produkty amplifikacji identyfikowano przeprowadzając elektroforezę w 1% żelu agarozowym.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Od 1993 do 1995 roku zebrano z terenu całej Polski 1580 sztuk kleszczy. W tym: 144 sztuk kleszczy odłowiono z roślin na wybranych stanowiskach (tabela I), pozostałe 1388 zebrano od ludzi i zwierząt i przesłano do naszej pracowni. Należały one do gatunku *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* i *Argas reflexus*. Kleszcze pierwszego z w/w gatunków pochodziły z całego terenu Polski, drugi znaleziono w województwach ciechanowskim, olsztyńskim oraz suwalskim i trzeci gatunek w województwie tarnowskim.

Wśród kleszczy gatunku *I. ricinus* zebrano 1346 sztuk postaci dojrzałych, w tym 931 samic i 360 samców oraz 279 nimf, z gatunku *D. reticulatus* – 5 dojrzałych samic i 5 samców oraz 1 dojrzałą samicę z gatunku *A. reflexus*.

Tabela I. Liczba kleszczy odłowionych z roślin.

Województwo	Miejscowość	Teren	Liczba odłowionych kleszczy			
			F	M	N	Ogółem
Bydgoskie	Przyłubie gm. Solec Kuj.	Las	5	7	4	16
Koszalińskie	Karlino	Las	5	2	6	13
	Kołobrzeg	Las	5	8	37	50
Piłskie	Walcz	Park miejski	15	5	6	26
Płockie	Sierpc	Las	3	1	1	5
Warszawskie	Dziekanów gm. Łomianki	Puszcza Kampinoska	13	20	1	34
Razem:			46	43	55	144

Wszystkie kleszcze należały do gatunku *Ixodes ricinus*

F – dojrzała samica

M – dojrzały samiec

N – nimfa

Liczbę odłowionych kleszczy (powyżej 10 sztuk) w poszczególnych województwach przedstawia tabela II. Ponadto pojedyncze kleszcze (razem 48 sztuk), należące do gatunku *Ixodes ricinus*, pochodziły z województwa bielskiego (1 sztuka), elbląskiego (6 szt.), gdańskiego (1 szt.), gorzowskiego (5 szt.), piotrkowskiego (5 szt.), przemyskiego (3 szt.), rzeszowskiego (4 szt.), sieradzkiego (1 szt.), tarnobrzeskiego (5 szt.), toruńskiego (4 szt.), wrocławskiego (3 szt.), wrocławskiego (8 szt.) i zielonogórskiego (2 szt.).

Test immunofluorescencji pośredniej (IF) stosowano początkowo jako badanie wstępne. Stosując ten test zbadano 32 kleszcze. Wynik dodatni reakcji immunofluorescencji uzyskano z materiałem pochodzącym od 27 sztuk. Jednocześnie, dodatnią reakcję stwierdzono również w badaniach kontrolnych, z surowicą normalną w 24 próbkach. Żaden wynik dodatni IF nie został potwierdzony dodatnim wynikiem PCR. W związku z tym, w dalszych badaniach zaniechano stosowania tego testu jako badania przesiewowego.

Tabela II. Liczba kleszczy zebranych od ludzi i zwierząt w poszczególnych województwach.

L.p.	Województwo	Liczba badanych kleszczy			
		Ogółem	F	M	N
1	Białostockie	31	12	19	0
2	Bydgoskie	77	32	16	29
3	Ciechanowskie	15	3	1	4
			4*	3*	
4	Częstochowskie	41	23	9	9
5	Katowickie	84	60	23	1
6	Kieleckie	54	39	8	7
7	Konińskie	12	7	5	
8	Koszalińskie	125	37	22	60
9	Krośnieńskie	217	138	53	26
10	Lubelskie	49	37	6	6
11	Olsztyńskie	141	92	42	6
				1*	
12	Opolskie	21	11		10
13	Piłskie	72	58	8	6
14	Płockie	27	21	3	3
15	Poznańskie	47	19	10	18
16	Radomskie	18	14		4
17	Słupskie	32	14	7	11
18	Suwalskie	148	118	25	4
			1*		
19	Szczecińskie	49	29	18	2
20	Tarnowskie	43	22	10	10
			1**		
21	Wałbrzyskie	19	11	4	4
22	Warszawskie	56	27	28	1
23	Zamojskie	23	12	6	5
RAZEM:		1388	853	319	216

Wszystkie badane kleszcze należały do gatunku *Ixodes ricinus*, z wyjątkiem:

* *Dermacentor reticulatus*

** *Argas reflexus*

F – dojrzała samica

M – dojrzały samiec

N – nimfa

Zakażenie kleszczy *B. burgdorferi*. Na 1580 zbadanych kleszczy, wynik dodatni testu PCR uzyskano z materiałem pochodzącym z 12 kleszczy. Obecność DNA *B. burgdorferi* stwierdzono tylko w kleszczach *Ixodes ricinus*, w tym w 10 dojrzałych samicach i 2 samcach. Pochodziły one z województwa krośnieńskiego, koszalińskiego i suwalskiego. Zakażone kleszcze zostały usunięte ze skóry ludzi, zwierząt domowych i dzikich (tab. III, IV, V). Nie stwierdzono zakażenia *B. burgdorferi* w kleszczach *D. reticulatus*. Nie wykryto również zakażenia *B. burgdorferi* w kleszczach *I. ricinus* odłowionych z roślin.

Tabela III. Kleszcze *Ixodes ricinus* zakażone *Borrelia burgdorferi* w województwie koszalińskim.

L.p.	Miejscowość	Teren	Liczba zbadanych kleszczy			Liczba zakażonych kleszczy		
			F	M	N	F	M	N
1	Szeligowo	dzikie zwierzęta*	8	8	12	2	0	0

* kleszcze zebrane ze skóry upolowanej zwierzyny płowej

F – dojrzała samica

M – dojrzały samiec

N – nimfa

Tabela IV. Kleszcze *Ixodes ricinus* zakażone *B. burgdorferi* w województwie krośnieńskim.

L.p.	Teren	Żywiciel	Stadium
1	Wola Michowa gm. Komańcza	Pies	F
2	" "	"	F
3	" "	"	F
4	" "	"	F
5	" "	"	F
6	" "	"	M
7	" "	"	M
8	Uherce gm. Olszanica	Człowiek	F
Razem:			8

F – dojrzała samica

M – dojrzały samiec

Tabela V. Kleszcze *Ixodes ricinus* zakażone *B. burgdorferi* na terenie województwa suwalskiego.

Lp.	Miejscowość	Teren	Żywiciel	Stadium
1	Krukłanki	Puszcza Borecka	Człowiek, skóra	F
2	Jakunówka gm. Posezone	Las	Człowiek, ubranie	F
Razem:				2

F – dojrzała samica

Zakażenie kleszczy *Coxiella burnetii*. Na podstawie dodatniej reakcji PCR zakażenie *C. burnetii* stwierdzono w 3 z 1580 zbadanych kleszczy należących do gatunku *I. ricinus*. Pochodziły one z województwa kieleckiego i tarnobrzeskiego (tab. VI). W województwie kieleckim zakażony kleszcz został wyjęty ze skóry człowieka, który wcześniej przebywał na terenie miejskiego cmentarza w Kielcach. Wszystkie kleszcze pochodzące z województwa tarnobrzeskiego (5 sztuk) wyjęte zostały ze skóry psa. W dwóch z nich stwierdzono obecność *C. burnetii*.

Kleszcze zakażone *B. burgdorferi* znaleziono w województwie koszalińskim, z którego pochodziły pierwsze w pełni udokumentowane przypadki boreliozy z Lyme (3) oraz z terenów gdzie wcześniej stwierdzano obecność zakażonych kleszczy (województwo

Tabela VI. Liczba kleszczy *Ixodes ricinus* zakażonych *Coxiella burnetii*.

L.p.	Województwo	Miejscowość	Żywiciel	Stadium kleszcza
1.	Kieleckie	Kielce	Człowiek	F
2.	Tarnobrzeskie	Golejów gm. Staszów	Pies	F F
Razem:				3

F – dojrzała samica

suwalskie) (10), jak również z terenu Bieszczad gdzie u pracowników leśnych stwierdzano znamienne poziomy przeciwciał swoistych dla *B. burgdorferi* (4). Wśród zbadanych 1580 kleszczy, zakażenie *B. burgdorferi* stwierdzono w 12 (0,77%) i *C. burnetii* w 3 kleszczach (0,19%).

W świetle wyników wcześniejszych badań prowadzonych na terenie Polski przez innych autorów zwraca uwagę stwierdzany przez nas niski odsetek zakażonych kleszczy. Różnica ta wiąże się prawdopodobnie z inną niż dotychczas stosowano, metodą zbierania kleszczy, a w przypadku poszukiwania *B. burgdorferi* również innymi metodami wykrywania zakażenia. W naszych badaniach, w kleszczach zebranych z różnych rejonów kraju, a w poszczególnych województwach z wielu gmin, jako metodę stwierdzenia zakażenia zastosowano technikę PCR wykrywającą materiał genetyczny *B. burgdorferi* i *C. burnetii*.

Kleszcze zbierane przez indywidualnych badaczy pochodzą zwykle z ograniczonego terenu, którego powierzchnia uzależniona jest w dużym stopniu od indywidualnych predyspozycji i możliwości fizycznych zbierającego i odłowione osobniki stanowią ograniczoną populację. W związku z tym, w takich przypadkach, znalezienie zakażonych kleszczy może świadczyć raczej o wykryciu ogniska i nie może być podstawą do oceny częstości występowania zakażenia na terenie danego województwa czy gminy.

Cytowane na wstępie dane dotyczące odsetka kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* wykorzystywały wyniki testu immunofluorescencji (IF) zastosowanego do wykrycia w badanym materiale komórek bakteryjnych i w niektórych przypadkach oparte były na wynikach badań przeprowadzonych na 3–12 kleszczach (7, 11). Jak wynika z naszych badań, test IF jest bardzo mało swoisty i nie może być podstawą do oceny zakażenia *B. burgdorferi*.

Kleszcze zakażone *C. burnetii* pochodziły z województw, w których dotychczas nie były odnotowane przypadki gorączki Q u ludzi i zwierząt domowych. W Kielcach zakażony kleszcz znaleziony został na terenie miasta. Natomiast u żadnego kleszcza pochodzącego z terenu, na którym rejestrowano epidemie lub ogniska gorączki Q u ludzi i bydła nie wykryto obecności *C. burnetii* (8, 9). Obecnie, coraz częściej badacze w wielu krajach zwracają uwagę na niewielkie znaczenie kleszczy jako rezerwuaru i źródła zakażenia *C. burnetii* zwierząt domowych i ludzi (5). Uważa się, że krążenie tego drobnoustroju w środowisku może występować niezależnie od obecności kleszczy.

Kleszcze jako wektor i rezerwuar *B. burgdorferi* i *C. burnetii* mogą zakażać zwierzęta i ludzi jak i ulec zakażeniu pijąc krew zakażonych zwierząt. Przykładem jednego i drugiego kierunku krążenia zakażenia są kleszcze zdjęte z psów w tarnobrzskim i krośnieńskim. W pierwszym przypadku wśród 5 kleszczy pasożytujących na psie

tylko u dwu z nich stwierdzono zakażenie *C. burnetii*. W drugim przypadku, wszystkie 7 kleszczy wyjętych ze skóry psa było zakażonych *B. burgdorferi*, co może wskazywać, że źródłem ich zakażenia był pies.

WNIOSKI

1. W celu przeprowadzenia systematycznych badań oceniających częstość występowania kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* konieczna jest standaryzacja metod badawczych.

2. Zakażone *B. burgdorferi* kleszcze występują na terenie Polski (województwa: koszalińskie, krośnieńskie i suwalskie) i mogą być źródłem zakażenia dla ludzi i zwierząt.

3. Występowanie kleszczy zakażonych *C. burnetii* na terenach, na których nie rejestruje się zachorowań na gorączkę Q może wskazywać na niewielką rolę tych stawonogów jako rezerwuaru i wektora tego zakażenia.

S. Tylewska-Wierzbanowska, D. Kruszewska, T. Chmielewski, K. Żukowski, J. Żabicka

TICKS AS A RESERVOIR OF *COXIELLA BURNETII* AND *BORRELIA BURGDORFERI* IN POLAND

SUMMARY

The aim of performed studies was to recognize the distribution of *Coxiella burnetii* and *Borrelia burgdorferi* infected ticks in Poland. The 1580 ticks infesting animals and humans were collected in different parts of the country. They belonged to *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Argas reflexus* species. Presence of *B. burgdorferi* and *C. burnetii* DNA in ticks has been sought with polymerase chain reaction test (PCR). *B. burgdorferi* bacteria have been detected in 12 *I. ricinus* ticks (0,77%). Infected ticks were collected in Koszalin, Krosno and Suwałki voivodships. *C. burnetii* bacteria were found in 3 ticks from Kielce and Tarnobrzeg voivodships (0,19%). Obtained results indicate existence of natural reservoirs and vectors of *C. burnetii* and *B. burgdorferi* in Poland. Since Q fever have not been recognized in central Poland until recently it can suggest diffusion of the *C. burnetii* reservoir to new regions. Presence of infected ticks in distant regions reflects wide distribution of these microorganisms all over the country.

PIŚMIENNICTWO

1. Anusz Z. i wsp.: Materiały z VI Międzynarodowego Sympozjum nt.: Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Pieszczy 1–6.10.1990 r. – 2. Dąbrowski J. i wsp.: Bull. Inst. Mar. Trop. Med. Gdynia., 1993/1994, 44/45, 61. – 3. Januszkiewicz J. i wsp.: Przeg. Epid., 1987, 41, 324. – 4. Knap J. i wsp.: Pneum. Alergol. Pol., 1991, supl. 1–2, 69. – 5. Raoult D.: Rev. Med. Microbiol., 1991, 2, 115. – 6. Stein A. i wsp.: J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 2462. – 7. Siński E. i wsp.: Przeg. Epid., 1994, 48, 463. – 8. Tylewska-Wierzbanowska S. i wsp.: Materiały Międzynarodowego Sympozjum nt.: Borelioza z Lyme i inne choroby przenoszone przez kleszcze. Białowieża 28–29.04.1995 r. – 9. Tylewska-Wierzbanowska S. i wsp.: Eur. J. Epidemiol., 1991, 7, 307. – 10. Wegner Z., i wsp.: J. Bacteriol., 1991, 173, 2, 693.

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