

Jacek Jenek¹, Adam Głazaczow²

OCENA WYSTĘPOWANIA KRĘTKÓW *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* W KLESZCZACH *IXODES RICINUS* W WYBRANYCH REJONACH WIELKOPOLSKI METODĄ ŁAŃCUCHOWEJ REAKCJI POLIMERAZY (PCR)*

¹ Zakład Mikrobiologii Instytutu Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych, Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
p.o. Kierownik: dr hab. med. A. Szkaradkiewicz

² Zakład Zoologii Systematycznej, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. K. Bartkowska

Oceniono metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) występowanie czynnika etiologicznego choroby z Lyme – krętków Borrelia burgdorferi sensu lato – w 298 kleszczach Ixodes ricinus odłowionych z 7 stanowisk na terenie Wielkopolski. Obecność krętków stwierdzono w 73 (24,5%) kleszczach.

Kleszcze *I. ricinus* jako wektor i rezerwuar krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato*, czynnika etiologicznego krętkowicy kleszczowej (boreliozy z Lyme, choroby z Lyme), wielonarządowej, przewlekłej, o fazowym przebiegu choroby u ludzi, odgrywają kluczową rolę w epidemiologii tej choroby (5, 14). Są one w Polsce pospolite i szeroko rozpowszechnione (13). Również na terenie Wielkopolski znane są liczne stanowiska kleszczy tego gatunku (13).

Ocena obecności krętków *B. burgdorferi* w kleszczach odłowionych na określonym terenie jest bardzo ważna (5). Daje bowiem podstawę do uznania tego obszaru, w razie wykrycia krętków wywołujących chorobę z Lyme w kleszczach, za region endemiczny (17). Równie ważne jest określenie odsetka zakażonych kleszczy, jednego z parametrów indeksu ekologicznego pozwalającego określić ryzyko nabycia infekcji na danym terenie (11). Krętki *B. burgdorferi* można wykrywać w kleszczach techniką immunofluorescencji pośredniej (6), jak również przy użyciu czulej i swoistej metody – łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) (4, 7, 8).

Ponieważ borelioza staje się narastającym problemem zdrowotnym i epidemiologicznym, dotyczącym również Wielkopolski, podjęto próbę wstępnej oceny zakażenia na tym terenie kleszczy *I. ricinus* krętkami *B. burgdorferi sensu lato*, wykorzystując test PCR (4) oparty na amplifikacji swoistej dla krętków *B. burgdorferi* chromosomalnej sekwencji DNA (9, 10), połączony z hybrydyzacją ze swoistą sondą DNA wyznakowaną digoksygeniną (4).

* Praca częściowo finansowana przez Komitet Badań Naukowych

MATERIAŁ I METODY

Nimfy i postaci dorosłe kleszczy z gatunku *I. ricinus* (Linnaeus, 1758) zbierano przy pomocy flanelowej płachty w okresie od maja do września w latach 1994–1995. Lokalizację stanowisk z których zebrano kleszcze oraz liczebność poszczególnych grup podano w tabeli. Po oznaczeniach systematycznych kleszcze przechowywano w temp. suchego lodu do momentu badania.

Tabela 1. Częstość występowania krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* w kleszczach *Ixodes ricinus* zebranych z różnych stanowisk na terenie Wielkopolski

Lokalizacja	Woje- wództwo	Nimfy		Samice		Samce		Razem		%
		n	PCR +	n	PCR +	n	PCR +	n	PCR +	
Kazimierz Biskupi	konińskie	–	–	19	9	9	4	28	13	46,4
Międzychód	gorzowskie	–	–	10	2	16	1	26	3	11,5
Oborniki	poznańskie	–	–	17	6	12	4	29	10	34,5
Obrzycko	poznańskie	–	–	23	2	15	3	38	5	13,2
Poznań*	poznańskie	3	0	50	11	29	7	82	18	20,7
Sieraków	poznańskie	5	0	18	9	20	4	43	13	30,2
Wronki	piłskie	16	2	19	6	17	3	52	11	21,2
Razem		24	2 (8,3%)	156	45 (28,8%)	112	26 (22,0%)	298	73	24,5

* 5 różnych stanowisk w lasach komunalnych miasta

DNA z kleszczy izolowano po uprzednim rozgnieceniu kleszcza w 20 μ l jałowej wody dest. przy użyciu 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') (4). 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 (dezoksyadenozynotrójfosforan, 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°C – 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 (Dig). Sondę otrzymano metodą „gniazdowego PCR” (nested PCR) na matrycy DNA wyizolowanego ze szczepu *B. burgdorferi* B31, używając dwóch par starterów i mieszaniny znakującej zawierającej dUTP-Dig (4). 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 298 kleszczy, w tym 24 nimfy, 156 samic i 122 samców, zebranych z 7 stanowisk (jedno z tych stanowisk – Poznań – obejmowało faktycznie 5 różnych lokalizacji w lasach komunalnych w granicach administracyjnych miasta). Obecność DNA *B. burgdorferi* stwierdzono w 73 (tj. 24,5%) przebadanych kleszczach. Spośród 24 nimf tylko 2 (8,3%) było zakażonych krętkami. Natomiast obecność *B. burgdorferi* stwierdzono u 28,8% samic i 22,0% samców. Częstość zakażenia poszczególnych populacji była różna i wahała się od 11,5% do 46,8%.

OMÓWIENIE

Badania obecności krętków *B. burgdorferi sensu lato* w kleszczach *Ixodes ricinus* prowadzone są w wielu krajach (3), również w Polsce (12, 15, 16). Z badań Wegner i wsp. (15) z zastosowaniem metody immunofluorescencji pośredniej wynika, że częstość zakażenia kleszczy krętkiem *B. burgdorferi* w woj. olsztyńskim w roku 1993 wynosiła 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 (16). Natomiast w badaniach Sińskiego i wsp. (12) 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 (12).

Częstość występowania zakażonych przez *B. burgdorferi* kleszczy w innych krajach europejskich jest zróżnicowana: zakażonych jest 11–34% postaci dojrzałych w różnych rejonach Niemiec, 5–34% w Szwajcarii, 3–23% w Szwecji, 9–12% na Litwie (3).

Zastosowana w niniejszej pracy metoda pozwala na wykrycie 50 do 100 krętków przy analizie reakcji w żelu agarozowym i 5 do 10 krętków przez hybrydyzację ze swoistą sondą znakowaną digoksygeniną (4). Degeilh i wsp. (2) analizując tę samą populację kleszczy odłowionych w pln.-zach. Francji (Bretania) metodą immunofluorescencji pośredniej i metodą PCR stosowaną w tej pracy, stwierdzili większą czułość PCR w wykrywaniu *B. burgdorferi* w kleszczach. Mimo to otrzymane wyniki są porównywalne z wynikami cytowanymi powyżej i wskazują na taką samą częstość zakażenia kleszczy krętkami *B. burgdorferi* na obszarze Wielkopolski jak w innych rejonach Polski.

Ze względu na brak dokładnego rozeznania sytuacji epidemiologicznej boreliozy z Lyme w Polsce, dla jej właściwej oceny niezbędne są dalsze badania. W najbliższej przyszłości przedstawione powyżej wyniki uzupełnione zostaną o analizę częstości występowania poszczególnych gatunków krętków wywołujących chorobę z Lyme w kleszczach *I. ricinus*.

Panu doc. dr hab. Andrzejowi Szkaradkiewiczowi dziękujemy za dyskusję nad maszynopisem niniejszej pracy.

J. Jenek, A. Głazaczow

AN EVALUATION OF *BORRELIA BURGENDORFERI SENSU LATO*
SPIROCHAETES DISTRIBUTION IN *IXODES RICINUS* TICKS COLLECTED
IN SELECTED REGIONS OF WIELKOPOLSKA MACROREGION
BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) METHOD

SUMMARY

Ixodes ricinus ticks (total n=298: 24 nymphs, 156 females and 112 males) collected from vegetation at 7 different sites 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 evident in 73 (24,5%) examined ticks. Females were infected in 28,8%, males in 22,0% and nymphs in 8,3%. Infection rate in tick population in particular investigated sites differed, however. The highest one – 46,4% – was calculated for ticks collected in Konin province and the lowest one – 11,5% – for ticks collected at site in Gorzów province.

PIŚMIENNICTWO

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. Degeilh B., Jenek J., Gilot B., André P.M., Avril J., L. Guigen C.: (w przygotowaniu) – 3. Flisiak R., Żabicka J.: Przeg. Epid., 1995, 49, 373. – 4. Jenek J., Andre P.M., Degeilh B., Gilot B., Guigen C., Avril J.L.: Res. Microbiol., (przesłane do druku) – 5. Kocięcka W.: Borelioza – choroba z Lyme. Mat. Polsko-Litewskiej Konferencji Naukowej, Poznań, 1993. – 6. Magnarelli: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2798. – 7. Persing D.H., Telford III S.R., Rys P.N., Dodge D.E., White T.J., Malawista S.E., Spielman A.: Science, 1990, 249, 1420. – 8. Persing D.H., Telford III S.R., Spielman A., Barthold S.W.: J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 566. – 9. Rosa P.A., Hogany D., Schwan T.G.: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 524. – 10. Rosa P.A., Schwan T.G.: J. Infect. Dis., 1989, 160, 1018.
- 11. Schulze T.L., Taylor R.C., Taylor G.C., Bosler E.M.: Am. J. Publ. Health, 1991, 81, 714.
- 12. Siński E., Karbowski G., Siuda K., Buczek A., Jongejan F.: Przeg. Epid., 1994, XLVIII, 461.
- 13. Siuda K.: Kleszcze Polski (Acari: Ixodidia). Cz. II. Systematyka i rozmieszczenie. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, Warszawa, 1993. – 14. Wegner Z., Stańczak J.: Przeg. Epid., 1995, 49, 245. – 15. Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kurminis-Łozowska W., Kubica-Biernat B.: Bull. Inst. Mar. Trop. Med., Gdynia, 1993/1994, 44/45, 51. – 16. 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. – 17. Żabicka J.: Nowa Medycyna, 1995, 2, 20.

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