

Joanna Katarzyna Strzelczyk, Andrzej Wiczkowski, Grażyna Spausta,  
Jolanta Ciarkowska, Marzena Zalewska-Ziob, Grażyna Izdebska-Straszak,  
Janusz Strzelczyk\*, Janusz Kasperczyk \*\*

## OBECNOŚĆ KRĘTKÓW *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO U KLESZCZY *IXODES RICINUS* NA TERENACH REKREACYJNYCH OKOLIC TARNOWSKICH GÓR I ZABRZA W LATACH 2001-2003

Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej ŚAM w Zabrze

Kierownik: Andrzej Wiczkowski

\*Katedra Patofizjologii i Endokrynologii, Klinika Endokrynologii ŚAM w Zabrze

Kierownik: Beata Kos-Kudła

\*\*Katedra Medycyny i Epidemiologii Środowiskowej ŚAM w Zabrze

Kierownik: Jadwiga Joško

*Metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) dokonano oceny zainfekowania krętkami *Borrelia burgdorferi sensu lato* w populacji 233 kleszczy *Ixodes ricinus* odłowionych z terenów rekreacyjnych województwa śląskiego (okolice Tarnowskich Gór i Zabrze) w latach 2001-2003. Obecność *B. burgdorferi* s.l. wykryto w 33 (14,2%) kleszczach.*

*Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, borelioza, *Ixodes ricinus*, PCR*

*Key words: *Borrelia burgdorferi sensu lato*, borreliosis, *Ixodes ricinus*, PCR*

### WSTĘP

Czynnikiem etiologicznym boreliozy z Lyme są krętki *Borrelia burgdorferi* – mikroaerofilne Gram-ujemne bakterie z rodziny *Spirochetaceae* (1). Rezerwuarem tych bakterii są różne gatunki ssaków i ptaków. Przenoszone są przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Na terenie Polski głównym wektorem jest kleszcz pospolity *Ixodes ricinus* (L.) (2). Człowiek ulega zakażeniu przez ukłucie zakażonego kleszcza, jeżeli kleszcz przyklejony jest do skóry przez okres 24-48 godzin (3).

Stwierdzenie obecności bakterii w organizmie człowieka zakażonego jest możliwe dzięki zastosowaniu badania PCR (z ang. *Polymerase Chain Reaction* – reakcja łańcuchowa polimerazy). Technika ta znalazła także zastosowanie do wykrycia *B. burgdorferi sensu lato* w kleszczach (4). Do charakterystyki *B. burgdorferi* oprócz w/w metody stosowane są również inne techniki z zakresu biologii molekularnej, takie jak, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych) (5), reakcja RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – losowa amplifikacja polimorficznych fragmentów DNA) (6), PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) – elektroforeza w zmien-

nym polu elektrycznym (7), sekwencjonowanie DNA (8), jak również analiza profili plazmidowych (9) oraz hybrydyzacja (10). Metody te znajdują coraz szersze zastosowanie w diagnostyce i genotypowaniu szczepów *B. burgdorferi* ze względu na ich wysoką czułość, swoistość oraz krótki czas wykonania. Mają one przewagę nad badaniami serologicznymi, których standaryzacja jest trudna, ponieważ stosowane testy mogą być przygotowywane w oparciu o różne genogatunki *B. burgdorferi*.

W Polsce w ostatnich latach wzrosło zainteresowanie chorobami przenoszonymi przez kleszcze. Wykrycie obecności krętków *B. burgdorferi* w kleszczach odłowionych z określonego terenu jest o tyle ważne, że na tej podstawie można uznać ten obszar za region endemiczny. Ponadto istotne jest również określenie odsetka zakażonych kleszczy – jednego z parametrów indeksu ekologicznego. Umożliwia to oszacowanie ryzyka zakażenia na danym terenie (11). W Polsce odsetek zakażonych kleszczy wynosi od 0,77% do 58% (12, 13). Jednak na wielu rekreacyjno-turystycznych terenach brakuje oceny stopnia ryzyka zakażenia przez *B. burgdorferi* s.l. Dlatego też w niniejszej pracy dokonano oceny zakażenia *B. burgdorferi* s.l. w populacjach kleszczy *Ixodes ricinus* pochodzących z różnych terenów rekreacyjnych wybranych regionów województwa śląskiego w latach 2001-2003.

## MATERIAŁ I METODY

Zbadano łącznie 233 kleszcze, które zebrano metodą flagowania w okresie wiosenno-letnim w latach 2001-2003. Za teren badań obrano osiem fragmentów obszarów leśnych (las liściasty i mieszany) województwa śląskiego o powierzchni ok. 1000 m<sup>2</sup> należących do powiatu tarnogórskiego (Krupski Młyn, Zielona, Lubliniec, Tarnowskie Góry, Świerklaniec, Tworóg, Zbrosławice) i kompleksu leśnego Gliwice. W roku 2001 przebadano 85 kleszczy (14), w 2002 – 114, a w roku 2003 – 34 kleszcze (tab. I).

Do izolacji bakteryjnego DNA z kleszczy zebranych w latach 2002-2003 użyto zestawu Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Proces izolacji przeprowadzono zgodnie z załączonym protokołem. Do detekcji krętków *B. burgdorferi* s.l. zastosowano metodę PCR. Amplifikowano fragment genu *fla*, kodującego białko rzęskowe flagelinę. Startery zastosowane do reakcji, BFL1: 5'- GCT CAA TAT AAC CAA ATG CAC ATG -3' oraz BFL2: 5'-CAA GTC TAT TTT GGA AAG CAC CTA A- 3', Pracownia Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie (15), były komplementarne do wszystkich znanych sekwencji genu *fla* *B. burgdorferi* s.l.

W skład mieszaniny reakcyjnej przygotowywanej w objętości 25 µl wchodziły: 12,5 µl PCR Master Mix, 2-krotnie stężony (Promega, USA); 2,5 µl każdego ze starterów o stężeniu 10 µM; 5 µl DNA; 2,5 µl sterylnej, dejonizowanej wody (Eppendorf, Niemcy). Reakcja PCR odbywała się w termocyklerze typu Mastercycler Personal (Eppendorf, Niemcy) i składała się z następujących etapów: denaturacja wstępna w 94°C przez 2 min, następnie 40 cykli obejmujących denaturację w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 60°C przez 60 sekund, wydłużanie w 72°C przez 60 sekund; Końcowe wydłużanie w 72°C przez 60 sekund.

Jako kontrolę dodatnią zastosowano wzorcowy DNA *B. burgdorferi* s.l. (DNA – Gdańsk, Polska), z kolei kontrolą ujemną była mieszanina reakcyjna, do której zamiast DNA dodawano sterylną, dejonizowaną wodę (Eppendorf, Niemcy). Produkty reakcji PCR rozdzielano na 2% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (1%, Serva, Niemcy)

przy napięciu 100V przez około 1,5 h (Sigma Maxi Horizontal Gel Electrophoresis model SHU 20, Sigma – Aldrich, Niemcy). Wielkość amplifikowanego fragmentu wynosiła 442 pary zasad. Jako wzorca mas cząsteczkowych użyto markera wielkości DNA M1 (pUC19/*Msp*I) (DNA – Gdańsk, Polska). Żele analizowano w promieniach światła UV przy użyciu transiluminatora (BTX-20M, CBS Scientific, USA), a następnie fotografowano (Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software, Eastman Kodak, USA).

### WYNIKI

W badaniach prowadzonych na terenie powiatu tarnogórskiego i kompleksu leśnego Gliwice w latach 2001-2003 na 233 badanych kleszczy *I. ricinus* u 14,2% wykryto obecność DNA *B. burgdorferi* s.l (tab. I).

W roku 2001 na 85 badanych kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* było 14 (16,5%), w 2002 na 114 zakażonych było 15 (13,2%), a w 2003 na 34 kleszcze zakażenie stwierdzono u 4 (11,8%). W badanym okresie zebrano łącznie 129 samic, 76 samców oraz 28 nimf. Odsetek zakażonych poszczególnych stadiów rozwojowych *I. ricinus* kształtował się następująco: w 2001 r. stwierdzono 26,8% zakażonych samic, 22,2% samców i 5,6% nimf; w 2002 r.: 14,7% samic, 9,7% samców i aż 12,5% nimf; a w 2003 r.: 21,4% samic, 5,6% samców oraz 0% nimf.

Porównując trzyletni okres badań, najwyższy odsetek kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* s.l. stwierdzono wśród samic (16,3%), nieco niższy u samców (13,2%), a wyraźnie najniższy u nimf (7,1%). W 2002 r. obserwowano znacznie niższy procent zakażonych samic, natomiast nimfy zakażone były w wyższym procencie niż w pozostałych latach.

Tabela I. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w różnych stadiach rozwojowych kleszczy *Ixodes ricinus* w latach 2001-2003

Table I. Occurrence of spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato in different development stages in *Ixodes ricinus* ticks in 2001-2003

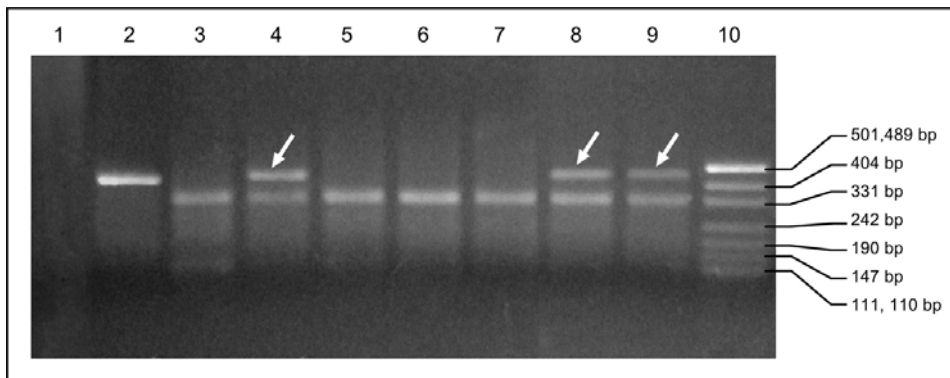
Lata	Stadium rozwojowe						Ogółem	
	samice		samce		nimfy			
	n	K %	n	K %	n	K %	n	K %
2001	40	7 26,8%	27	6 22,2%	18	1 5,6%	85	14 16,5%
2002	75	11 14,7%	31	3 9,7%	8	1 12,5%	114	15 13,2%
2003	14	3 21,4%	18	1 5,6%	2	0 0%	34	4 11,8%
Razem	129	21 16,3%	76	10 13,2%	28	2 7,1%	233	33 14,2%

n – liczba zebranych kleszczy

K/% – liczba i odsetek zakażonych kleszczy

n – number of collected ticks

K/% – number and percentage of infected ticks



Ścieżka 1 – kontrola negatywna

Ścieżka 2 – kontrola pozytywna

Ścieżka 4, 8, 9 – produkty amplifikacji fragmentu genu *fla* (strzałki wskazują produkty wielkości 442 par zasad)

Ścieżka 3, 5, 6, 7 – brak produktu amplifikacji fragmentu genu *fla*

Ścieżka 10 – wzorec wielkości DNA - M1

Lane 1 – negative control

Lane 2 – positive control

Lane 4, 8, 9 – amplification products of *fla* gene fragment (arrow indicates products of 442 bp size)

Lane 3, 5, 6, 7 – absence of amplification products of *fla* gene fragment

Lane 10 – DNA - M1 size marker

Ryc. 1. Żel agarozowy z rozdzielonymi produktami amplifikacji fragmentu genu *fla*

Fig. 1. Agarose gel with separated amplification products of *fla* gene fragment

Na wszystkich badanych terenach stwierdzono kleszcze zakażone krętkami *B. burgdorferi*. Wyjątkowo wysoką ekstensywnością zakażenia *I. ricinus* charakteryzowały się tereny rekreacyjne w Świerkłańcu (45%) oraz tereny leśne w okolicach Zielonej (37%). Natomiast najniższy stopień zainfekowanych kleszczy stwierdzono w Tarnowskich Górach (5,7%).

Rycina 1 przedstawia rozdzielony elektroforetyczny na żelu agarozowym produktów amplifikacji DNA izolowanego z kleszczy. Obecność w żelu produktu reakcji PCR wielkości 442 par zasad świadczy o pozytywnym wyniku testu (próbki 4, 8, 9).

## DYSKUSJA

W związku z narastającym problemem epidemiologicznym, jaki stanowi borelioza z Lyme, dużego znaczenia nabiera ocena środowiskowych uwarunkowań pojawiania się tej choroby w różnych regionach kraju.

Na terenie Polski kleszcze *I. ricinus* wykazują zróżnicowany stopień zakażenia *B. burgdorferi*, wahający się w szerokich granicach 0,77-58% (12,13). Najniższą ekstensywność zakażenia *I. ricinus* wynoszącą tylko 0,77% (koszalińskie, krośnieńskie, suwalskie) podała Tylewska-Wierzbanowska i wsp. (12). W województwie olsztyńskim stopień zakażenia klesz-

czy *B. burgdorferi* oceniono na 11-35% (16). Natomiast na terenach rekreacyjnych Trójmiasta stwierdzono 10,5% zakażenia. Najwyższy poziom infekcji obserwowano u samców 18,9%, niższy u samic 14,9%, a najniższy u nimf 8,2% (17). Badania nad prevalencją zakażenia kleszczy *I. ricinus* krętkami *B. burgdorferi* s.l. w latach 1998-2001 na Pojezierzu Mazurskim wykazały sezonową różnicę zainfekowania kleszczy: 11,7% wiosną, a 2,6% jesienią. Najwyższy odsetek zakażonych kleszczy (22,8%) stwierdzono wśród samic, a odsetek zarażonych samców wynosił 13%, nimf 10,5%, a larw 7,4% (18). Badania *Wódeckiej* i *Sawczuk* (19) prowadzone w latach 1998-2001 (metodą PCR) i *Humczewskiej* i wsp. (20) w latach 1996-1998 (metodą IFA), w północno-zachodniej Polsce wykazały w badanych populacjach kleszczy zakażenie *B. burgdorferi* wynoszące 4,4% oraz 10-19%. *Michalik* i *Rejmenciak* (21) wykazali w okolicach Poznania (metodą IFA) średnią ekstenzywność zakażenia kleszczy wynoszącą 22% (20,5% nimf, 23,8% samców i 31,0% samic).

Dane z południowo-wschodnich regionów Polski (województwo zamojskie, krakowskie, suwalskie i katowickie) wykazały, że odsetek postaci dojrzałych kleszczy zakażonych krętkami wynosił około 4%, a larw aż do 58,3% (13). Badania prowadzone w 1996 roku na Śląsku wykazały najwyższy odsetek zakażonych kleszczy w lasach koło Mikołowa (17,8% samców i 12,7% samic) i najniższy na obszarze Wojewódzkiego Parku Kultury i Wypoczynku w Katowicach (5% samców i 2,9% samic) (22). W późniejszym doniesieniu *Petko* (23) podaje, że liczba zakażonych kleszczy wahała się od 4,0-15,0%. W naszych badaniach uzyskaliśmy podobny stopień zakażenia kleszczy, wynoszący 14,2%. Natomiast badania *Stańczak* i wsp. (24), prowadzone również na terenie Katowic, wykazały bardzo wysoki procent (37,5%) zainfekowanych kleszczy.

## WNIOSKI

Wilgotne lasy liściaste i mieszane o bogatym poszyciu występujące na badanych przez nas terenach rekreacyjnych województwa śląskiego tworzą ekosystem, który zapewnia dogodne warunki siedliskowe dla rozwoju kleszczy *I. ricinus*. Częstotliwość kontaktów ludzi z kleszczami na tych terenach jest znaczna, a stwierdzony przez nas stopień zainfekowania kleszczy pozwala wysunąć wniosek, że istnieje zwiększone ryzyko zakażenia krętkami *Borrelia*.

*JK Strzelczyk, A Wiczkowski, G Spausta, J Ciarkowska, M Zalewska-Ziob,  
G Izdebska-Straszak, J Strzelczyk\*, J Kasperczyk \*\**

PRESENCE OF SPIROCHETES OF *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO  
IN *IXODES RICINUS* TICKS IN THE RECREATIONAL AREA  
OF TARNOWSKIE GÓRY AND ZABRZE DISTRICTS IN 2001-2003

## SUMMARY

*Borrelia burgdorferi* sensu lato is an aetiological factor of borreliosis. *Borrelia* spirochete is transmitted to humans by ticks. The aim of the study was to estimate the spirochetes *B. burgdorferi* s.l. infection in *Ixodes ricinus* ticks by using PCR analysis of the flagellin gene fragment. The study was carried out in 2001-2003 in recreational areas of the Silesian Region in Poland (Tarnowskie

Góry and Zabrze administrative districts). In the 233 ticks analysed the DNA of *B. burgdorferi* s.l. was detected in 33 (14,2%) cases. Further comparison of spirochetes infection percentages in ticks during the three consecutive vegetation seasons was made.

The investigation of *B. burgdorferi* s.l. detection in tick populations of recreational and endemic areas is important for the evaluation of the risk of infection.

#### PISMIENNICTWO

1. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, i in. Lyme disease - a tick - borne spirochetosis? Science 1982;216:1317-9.
2. Prokopowicz D. Choroby przenoszone przez kleszcze. Warszawa: Wydawnictwo Fundacji Buchnera; 1995.
3. Pancewicz SA, Kondrusik M, Zajkowska J, i in. Epidemiologia choroby z Lyme. Med Prakt 1999;50:315-20.
4. Danielova V, Daniel M, Rudenko N, i in. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in host-seeking *Ixodes ricinus* tick in selected South Bohemian locations (Czech Republic). Cent Eur J Publ Health 2004;12:151-6.
5. Quessada T, Martial-Convert F, Arnaud S, i in. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* species and identification of *Borrelia valaisiana* in Questing *Ixodes ricinus* in the Lyon Region of France as determined by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003;22:165-73.
6. Wang G, Van DA, Spanjaard L, i in. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting analysis. J Clin Microbiol 1998;36:768-776.
7. Busch U, Hizo-Teufel C, Boehmer R, i in. Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed - field gel electrophoresis and PCR. J Clin Microbiol 1996;43:1072-8.
8. Casati S, Bernasconi MV, Gern L, i in. Diversity within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in Switzerland by *recA* gene sequence. FEMS Microbiol Lett 2004;238:115-23.
9. Xu Y, Johnson RC. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. J Clin Microbiol 1995;33:2679-85.
10. Schouls LM, van de Pol I, Rijpkema SGT, i in. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. J Clin Microbiol 1999;37:2215-22.
11. Schulze TL, Taylor RC, Taylor GC, i in. Lyme disease: a proposed ecological index to assess areas of risk in the northeastern United States. Am J Publ Health 1991;81: 714-8.
12. Tylewska-Wierzbanowska S, Kruszevska D, Chmielewski T, i in. Kleszcze jako rezerwuwar *Borrelia burgdorferi* i *Coxiella burnetii* na terenie Polski. Przegl Epidemiol 1996;50:245-51.
13. Siński E, Karbowski G, Siuda K, i in. Zakażenie kleszczy *Borrelia burgdorferi* w wybranych rejonach Polski. Przegl Epidemiol 1994;48:461-5.
14. Spausta G, Wiczkowski A, Ciarkowska J, i in. Częstość występowania *Borrelia burgdorferi* sensu lato u kleszczy *Ixodes ricinus* z okolic Tarnowskich Gór. Wiad Parazytol 2003;49:39-45.
15. Stańczak J, Kubica-Biernat B, Burkiewicz A, i in. Wstępne badania nad zastosowaniem techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do wykrywania krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* (*Acari, Ixodidae*). Problemy Hig 1997;54:122-6.
16. Wegner Z, Stańczak J, Racewicz M, i in. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* w kleszczach *Ixodes ricinus* na terenie województwa białostockiego. W: Międzynarodowe Symozjum „Borelioza z Lyme i inne zakażenia przenoszone przez kleszcze”. Białowieża. Streszczenia 1995:51-2.

17. Wegner Z, Racewicz M, Kubica-Biernat B, i in. Występowanie kleszczy *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na zalesionych obszarach Trójmiasta i ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi*. Przegl Epidemiol 1997;51:11-20.
18. Pawełczyk A, Siński E. Prewalencja zakażenia kleszczy *I. ricinus* krętkami *Borrelia burgdorferi* s.l.: sezonowe i roczne zmiany. Wiad Parazytol 2004;50:253-8.
19. Wodecka B, Sawczuk M. Występowanie chorobotwórczych genogatunków z obrębu *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* odławianych z północno-zachodniej Polski. Wiad Parazytol 2004;50:545-53.
20. Humczewska M, Kuźna-Grygiel W, Kołodziejczyk L, i in. Ekstensywność zakażenia populacji *Ixodes ricinus* krętkami *Borrelia burgdorferi* sensu lato w lasach północno-zachodniej Polski. Wiad Parazytol 2003;49:255-71.
21. Michalik J, Rejmenciak A. Occurrence of *Ixodes ricinus* in different types of forest habitats of the city of Poznań and their infection rate with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Wiad Parazytol 1998;44:388.
22. Petko B, Siuda K, Stanko M, i in. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the *Ixodes ricinus* ticks in southern Poland. Ann Agric and Environ Med 1997;4:263-9.
23. Petko B. Lyme borreliosis in carpathian region of central Europe – ecological aspect of diagnostics. W: Buczek A, Błaszak C, red. Stawonogi w medycynie. Lublin: Liber, 2002:93-104.
24. Stańczak J, Racewicz M, Kubica-Biernat B, i in. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. Ann Agric Environ Med 1999;6:127-32.

Otrzymano 6.03.2006 r.

**Adres autora:**

Joanna Katarzyna Strzelczyk  
Katedra i Zakład Ogólnej Biologii Lekarskiej  
Śląskiej Akademii Medycznej w Zabrze  
ul. Jordana 19, 41-808 Zabrze  
tel. (32) 272 21 71, e-mail: biolmedzab@slam.katowice.pl