

Agata Makówka¹, Włodzimierz Gut¹, Paweł Stefanoff²

OBECNOŚĆ RNA WIRUSA KLESZCZOWEGO ZAPALENIA MÓZGU W KLESZCZACH *Ixodes ricinus* JAKO NARZĘDZIE OCENY ZASIĘGU OBSZARÓW ENDEMICZNYCH I CZUŁOŚCI NADZORU NAD ZACHOROWANIAM I NA KZM

DETECTION OF TBEV RNA IN TICKS AS A TOOL FOR VALUATION OF ENDEMIC AREA AND SENSITIVITY OF TBE SURVEILLANCE

¹Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

²Zakład Epidemiologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny

STRESZCZENIE

Celem pracy było zastosowanie metody molekularnej do detekcji materiału genetycznego wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach *Ixodes ricinus* z pominięciem etapu namnażania wirusa w hodowli komórkowej czy oseskach mysich oraz porównanie wyników innych stosowanych narzędzi oceny obszarów endemicznych.

W metodzie nested RT-PCR został powielony odcinek wirusowego RNA w obrębie genu kodującego białko NS5, w wyniku czego powstał produkt o wielkości 252 par zasad. Spośród przebadanych 177 puli kleszczy materiał genetyczny wirusa kleszczowego zapalenia mózgu wykryto w 14 próbach, co stanowi 7,9% całości. Otrzymane wyniki wskazują na występowanie RNA wirusa k.z.m. w próbach kleszczy pochodzących z terenów, które na podstawie systemu nadzoru nad zachorowaniami na k.z.m. uważanych za nieendemiczne.

Z przeprowadzonych badań wynika, że metoda nested RT-PCR może być efektywnym narzędziem oceny zasięgu występowania tego patogenu i uzupełnieniem czułości nadzoru nad zachorowaniami na kleszczowe zapalenie mózgu.

Słowa kluczowe: wirus kleszczowego zapalenia mózgu (wirus k.z.m.), wykrywanie materiału genetycznego, nadzór epidemiologiczny, Polska

ABSTRACT

In this study we present the nested RT-PCR strategy designed for detection of TBEV RNA in ticks *Ixodes ricinus*. The presented nested RT-PCR method using 2 different primer pairs specific primers for NS5 gene provides specific TBEV cDNA detectable by electroforesis in agarose gel. Of the 177 pools of ticks investigated, TBEV RNA was detected in 14, which accounts for 7,9% of all pools.

We confront the PCR results of tested ticks to routine surveillance data. The obtained results showed that the TBEV RNA is detectable in ticks collected in areas in Poland, which are defined as a non-endemic. The nested RT-PCR method can be used as a tool of epidemiological surveillance as well as for screening of occurrence of circulating TBEV.

Key words: tick-borne encephalitis virus (TBEV), nucleic acid detection, epidemiological surveillance, Poland

WSTĘP

Kleszczowe zapalenie mózgu (kzm) jest chorobą neurologiczną wywoływaną przez wirusa należącego do rodziny *Flaviviridae*. Do tej rodziny zaliczamy również takie patogeny człowieka jak: wirus żółtej gorączki, wirus Dengue, wirus japońskiego zapalenia mózgu oraz wirus zapalenia wątroby typu C. Genom

wirusa kzm stanowi pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności i wielkości 11 par zasad, która koduje polipeptydową białkową proteolitycznie na 3 białka strukturalne i 7 niestrukturalnych (1).

Znane są trzy podtypy wirusa kzm.: dalekowschodni, środkowoeuropejski oraz syberyjski. Wektorem subtymu środkowoeuropejskiego wirusa kzm są kleszcze z rodzaju *Ixodes ricinus*, natomiast dalekowschodniego

i syberyjskiego *Ixodes persulcatus*. Kleszcz pospolity uczestniczy również w rozpowszechnieniu innych chorób takich jak: borelioza z Lyme, anaplazmoza czy babeszjoza.

Rezerwuarem wirusa kzm są drobne gryzonie, średnie i duże ssaki oraz ludzie i zwierzęta gospodarcze. Zwierzęta po zakażeniu wirusem nie chorują, natomiast u człowieka mogą wystąpić objawy zapalenia opon mózgowych, zapalenia mózgu lub objawy mózgowo-rdzeniowe. Zakażenie odbywa się podczas ukąszenia przez kleszcza a także przez spożywanie niepasteryzowanego mleka owiec i kóz będących w okresie wiremii oraz surowych produktów mlecznych (2). Zachorowania na kzm związane są z występowaniem na danym obszarze zakażonych kleszczy oraz obecnością nie- uodpornionych osób. Na podstawie wielu badań oceniających rozpowszechnienie wirusa kzm stwierdzono, że Polska należy do krajów, w których istnieje endemiczne występowanie tego patogenu.

Większość prowadzonych badań nad zasięgiem występowania zachorowań na kzm opierała się dotychczas na rutynowo rejestrowanych przypadkach zachorowań w ramach nadzoru epidemiologicznego. Problemem jest jednak niedoskonałość systemu rejestracji zachorowań oraz ograniczanie się tylko do przypadków hospitalizowanych kzm. Pewnym wskaźnikiem występowania wirusa kzm na określonych terenach mogą być przeglądy serologiczne zarówno ogólnej populacji ludzi zdrowych, jak i grup ryzyka (n.p. leśników). Badania serologiczne obarczone są jednak szeregiem ograniczeń wynikających zarówno z obecności przeciwciał przeciwko wirusowi kzm powstałych w wyniku szczepienia, jak również krzyżowych reakcji po zakażeniu różnymi flawiwirusami jak i samą ruchliwością populacji ludzi. Najpewniejszą metodą stwierdzenia występowania wirusa kzm na danym terenie jest badanie jego obecności w wektorze (kleszczu). Pierwotna metoda, polegająca na izolacji żywego wirusa po domózgowym zakażeniu osesków mysich, była zarówno czasochłonna i pracochłonna, jak i niekiedy zawodna (możliwość interferencji czynników obecnych u myszy, konieczność pulowania dużych ilości kleszczy, metoda odczytu objawów patogennych u osesków mysich). Zastosowana w latach 90. metoda wykrywania antygenów wirusa kzm w mózгах zakażonych myszy wykazała szereg rozbieżności wyników z metodą izolacji opartą o obserwację objawów klinicznych u myszy (3).

Celem niniejszej pracy było zastosowanie metody molekularnej do detekcji materiału genetycznego wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach z pominięciem etapu namnażania wirusa w hodowli komórkowej czy oseskach mysich oraz porównanie wyników innych stosowanych narzędzi oceny obszarów endemicznych.

MATERIAŁY I METODY

Wirus. Do oznaczeń używano szczepu wirusa kleszczowego zapalenia mózgu wyizolowanego w mózгах mysich z zakażonych kleszczy, zebranych w okolicach Braniewa w 1973 roku. RNA wirusa tego szczepu posłużył jako kontrola dodatnia w badaniu nested RT-PCR.

Materiał biologiczny. Wiosną i jesienią 2008 roku zebrano 2383 kleszczy z rodzaju *Ixodes ricinus* (osobniki dorosłe oraz nimfy), które łączono średnio po około 20 osobników z jednego pola łownego w jednej próbie. Uzyskano 177 pul kleszczy. Były to kleszcze zebrane z czterech powiatów w Polsce: dwa w województwie wielkopolskim, po jednym w województwie zachodniopomorskim i w pomorskim. Wytypowano te rejony, gdzie stwierdzono rozpowszechnienie przeciwciał przeciwko wirusowi kzm wśród mieszkańców przy jednoczesnym braku zgłoszeń potwierdzonych zachorowań na kzm.

Izolacja materiału genetycznego. Kleszcze w pulach zostały mechanicznie rozdrobnione za pomocą końcówki pipety automatycznej i zawieszono w buforze do izolacji. Następnie użyto kolumnienek do homogenizacji QIAshredder (Qiagen) oraz zestawu do izolacji RNA RNeasy mini kit (Qiagen) zgodnie z instrukcjami producenta (4). W przypadku izolowania RNA wirusa kzm z liofilizatu mózgov mysich użyto zestawu Viral RNA Kit (Qiagen).

Reakcja nested RT-PCR. W metodzie RT-PCR odcinek wirusowego RNA w obrębie genu kodującego białko NS5 został przepisywany za pomocą odwrotnej transkryptazy na cDNA, które z kolei było dwukrotnie amplifikowane a reakcji PCR przy udziale polimerazy DNA. Do reakcji użyto 2 pary starterów o sekwencjach:

FSM-1: 5'GGAGGCTGAACAACACTGCAC 3',
FSM-2: 5' GAACACGTCCATTCCTGATCT 3',
FSM-1i: 5'ACGGAACGTGACAAGGCTAG 3',
FSM-2i: 5' GCTTGTTACCATCTTTGGAG5'.

Produkt o wielkości 252 par zasad analizowano w 1,5% żelu agarozowym. Reakcję nested RT-PCR przeprowadzono według opisanych procedur (5,6).

WYNIKI

Spośród przebadanych 177 puli kleszczy materiał genetyczny wirusa kleszczowego zapalenia mózgu wykryto w 14 próbach, co stanowi 7,9% całości. Największy odsetek pozytywnych wyników RT-PCR otrzymano w przypadku puli kleszczy zebranych w powiecie starogardzkim w województwie pomorskim (12,2 %), natomiast najmniej (4,3%) w powiecie nowotomyskim w województwie wielkopolskim. (tabela I)

Wirusowe RNA wykryto w próbach kleszczy pochodzących z terenów, które na podstawie systemu nadzoru nad zachorowaniami na kzm uważane były za nieendemiczne. (rys. 1)

Tabela I. Wyniki wykrywania RNA wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach na terenie powiatów
Table I. Results of TBEV RNA detection in ticks, by district.

Województwo	Powiat	Liczba pul i odsetek wyników pozytywnych
Wielkopolskie	nowotomyski	47 (4,3%)
Wielkopolskie	obornicki	45 (6,7%)
Zachodniopomorskie	policki	44 (9,1%)
Pomorskie	starogardzki	41 (12,2%)
ogółem		177 (7,9%)



Procent dodatnich prób

Ryc. 1. Wyniki wykrywania RNA wirusa kzm w kleszczach

Fig. 1. Results of TBEV RNA in ticks.

DYSKUSJA I WNIOSKI

Prowadzony obecnie nadzór epidemiologiczny nad zachorowaniami na kleszczowe zapalenie mózgu, wskazuje na wysoką zapadalność występującą w północno-wschodniej Polsce. Potwierdziły to badania serologiczne przeprowadzone w latach 1965-1972, w których testem zahamowania hemaglutynacji wykryto przeciwciała przeciwko wirusowi kzm u ludzi zamieszkujących omawiane uprzednio regiony geograficzne Polski (7). Przeprowadzono również ocenę występowania przeciwciał przeciwko wirusowi kzm – badano testem ELISA w losowo wybrane surowice zebrane w latach 1995-2005 od ludzi z obszarów endemicznych

i nieendemicznych. Wyniki potwierdzają seroprewalencję na obszarach województwa podlaskiego, a także kujawsko-pomorskiego i pomorskiego (8). Cenne informacje na temat obecności wirusa kzm na danym terenie można uzyskać badając zwierzęta. Wyniki badań materiałów pobranych od kóz sugerują, że w Polsce są obecne dotychczas nieodkryte obszary endemiczne. Na lokalne krążenie wirusa kzm wskazuje obecność przeciwciał u kóz hodowanych w 2 powiatach, z których w ciągu 15 lat nie zgłoszono żadnego zachorowania na kleszczowe zapalenie mózgu (8).

Inną metodą oceny zasięgu występowania wirusa kzm jest oznaczanie jego obecności w kleszczach *Ixodes ricinus*. W Polsce w latach 80. podejmowano próby izolacji wirusa z zakażonych kleszczy oraz gryzoni w pierwotnej hodowli komórkowej oraz w oseskach mysich. W wielu wypadkach próby izolacji z naturalnego gospodarza stawonoga zakończyły się niepowodzeniem (9).

W celu identyfikacji i oceny rozpowszechnienia wirusa kzm na danym terenie może być stosowana metoda nested RT-PCR. Główną zaletą odwrotnej transkrypcji i amplifikacji RNA wirusa kzm jest jej wysoka czułość. Technika ta wykrywa 100-1000 kopii genomu w badanej próbce (5), daje pozytywny wynik przy rozcieńczeniu 10^{-8} wirusa izolowanego z zakażonych mysich mózgow (10), a nawet pozwala na wykrycie RNA w pojedynczym kleszczu (11).

Uzyskane wyniki potwierdzają użyteczność metod amplifikacji genomu wirusa k.z.m do wykrywania jego obecności w kleszczach. Zastosowanie komercyjnych zestawów do homogenizacji kleszczy i izolacji RNA pozwoliło na otrzymanie wysoce oczyszczonego produktu, który posłużył w późniejszym etapie do amplifikacji. Dodatkową zaletą zastosowanej metody jest wprowadzenie reakcji typu nested z użyciem 2 par starterów, zwiększającej w znacznym stopniu czułość badania.

Z przeprowadzonych badań wynika, że metoda nested RT-PCR może być stosowana w celu wykrywania wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach *Ixodes ricinus* w zastępstwie izolacji wirusa w hodowli komórkowej lub oseskach mysich. Ponadto, ze względu na wysoką czułość może być efektywnym narzędziem oceny zasięgu występowania tego patogenu i uzupełnieniem czułości nadzoru nad zachorowaniami na kleszczowe zapalenie mózgu.

PISMIENNICTWO

1. Kańtoch M. Flaviviridae. W: Kańtoch M. Wirusologia lekarska. Wyd 1. Warszawa: PZWL;1998:380-392.
2. Kerbo N, Donchenko I, Kutsar K, Vasilenko V. Tickborne encephalitis outbreak in Estonia linked to raw goat milk.

- Euro Surveil, 2005;10 E050623.2. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2005/050623.asp2S>.
3. Gut W, Kowalewska A, Kańtoch M: TBE virus strains: molecular and biological studies on differentiation in virulence. Int. Potsdam. Symp. 4th on tick – borne diseases. Eds. Süss J., Kahl O. Berlin Feb. 21-22, 1997.
 4. Schrader C, Süss J. A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. Zbl. Bakteriol. 1999;289:319-328.
 5. Puchhammer-Stöckl E, Mandl CW, Heinz FX. Identification of tick-borne encephalitis virus ribonucleic acid in tick suspensions and in clinical specimens by a reverse transcription-nested polymerase chain reaction assay. Clin Diag Virol 1995;4:321-326.
 6. Jääskeläinen AE, Tikkakoski T, Uzcátegui NY, Alekseev AN, Vaheri A, Vapalahti O. Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. Emerg Infect Dis. 2006;12:1568-71.
 7. Wróblewska Z, Dobrzyński L, Olkowska D, Magdzik W, Zaleska H. A serologic survey of the healthy population of Poland for encephalitis arboviruses in the years 1966-67. Przegl Epidemiol. 1968;22:293-307.
 8. Stefanoff P, Siennicka J, Kaba J, Nowicki M, Ferenczi E, Gut W. Identification of new endemic tick-borne encephalitis foci in Poland – apilot seroprevalence in selected regions. Int J Med Microbiol 2008;S1:102-107.
 9. Bednarz K, Nawrocka E, Sadowski W, Żukowski K. Izolacja nowych szczepów wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w Puszczy Białowieskiej. Przegl Epidemiol. 1984;38:2-10.
 10. Ramelow C, Süss J, Berndt D, Roggendorf M, Schreier E. Detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in several Federal “Länder: of germany by means of the polymerase chain reaction (PCR)-Characterization of the virus. Infection 1996;24:403-404
 11. Khal O, Süss J. Der Mongolische gerbil: ein Tiermodell zur Analyse der Zirkulation des FSME-Virus zwischen Reservoirwirt und Vector. In Durch Zecken übertragbare Erkrankungen FSME und Lyme-Borreliose. (3. Potsdamer Symposium);1995:92-101

Otrzymano: 26.05.2009 r.

Zakwalifikowano do druku: 2.07.2009 r.

Adres do korespondencji:

Agata Makówka,

Zakład Wirusologii

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

tel. 22 54 21 283

mail: amakowka@pzh.gov.pl