



Gdański Uniwersytet Medyczny



Stella Cieniuch

**Zastosowanie Real-Time PCR do detekcji i ilościowego oszacowania
Borrelia burgdorferi sensu lato i *Anaplasma phagocytophilum*
w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae)**

Praca wykonana w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej
Katedry Medycyny Tropikalnej i Parazytologii
Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa
i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem dr hab. med. Joanna Stańczak, prof. nadzw.

Gdynia, 2016

*Składam serdeczne podziękowania mojej promotor
Pani prof. nadzw. dr hab. med. JOANNIE STAŃCZAK
za poświęcony czas i pomoc oraz za zaufanie i cierpliwość
okazaną podczas pisania pracy*

*Dziękuję rodzicom i bliskim
za wsparcie i wiarę we mnie*

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	5
1. Wstęp	7
1.1. Rozwijające się choroby zakaźne	7
1.2. Charakterystyka kleszczy <i>Ixodes ricinus</i>	11
1.2.1 Morfologia kleszczy <i>Ixodes ricinus</i>	11
1.2.2 Cykl życiowy kleszczy <i>Ixodes ricinus</i>	12
1.2.3 Występowanie kleszczy <i>Ixodes ricinus</i>	13
1.2.4 Kleszcze <i>Ixodes ricinus</i> jako wektory mikroorganizmów chorobotwórczych	14
1.2.5 Żywiciele kleszczy <i>Ixodes ricinus</i> oraz ich rola w krążeniu patogenów	16
1.3. Charakterystyka bakterii <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	18
1.3.1 Objawy kliniczne ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej	18
1.3.2 Patogeneza ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej	19
1.4. Charakterystyka bakterii <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	22
1.4.1 Objawy kliniczne boreliozy	22
1.4.2 Patogeneza boreliozy	26
2. Cel pracy	29
3. Materiały i metody	30
3.1 Teren badań	30
3.2 Zbiór kleszczy	32
3.3 Izolacja DNA z kleszczy	32
3.4 Technika Real-Time PCR	32
3.4.1 Kontrole reakcji PCR	32
3.4.2 Detekcja <i>Anaplasma phagocytophilum</i> i <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	34
3.4.3 Ilościowe oznaczanie patogenów	35
3.5 Analiza restrykcyjna	36
3.6 Sekwencjonowanie	36
3.7 Analiza statystyczna	36
3.8 Oprogramowanie	37
4. Wyniki	38
4.1. Duplex Real-Time PCR w detekcji patogenów w kleszczach	38
4.1.1 Cele molekularne	38
4.1.2 Startery i sondy	39
4.1.3 Optymalizacja reakcji Real-Time PCR	40
4.2. Sezonowa aktywność <i>Ixodes ricinus</i>	43
4.3. Detekcja <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	45
4.3.1 Występowanie <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w zależności od stadium rozwojowego kleszcza	45
4.3.2 Występowanie <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w kleszczach w czasie i przestrzeni	46
4.3.3 Występowanie <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w kleszczach zależności od terenu odłowu	47
4.3.4 Genogatunki kompleksu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato występujące w kleszczach	48
4.4. Ilościowe oznaczanie <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	54

4.4.1 Intensywność zakażenia <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w zależności od stadium rozwojowego kleszcza	57
4.4.2 Intensywność zakażenia kleszczy krętkami <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w czasie i przestrzeni.....	59
4.4.3 Intensywność zakażenia kleszczy krętkami <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w zależności od terenu odłowu.....	61
4.4.4 Intensywność zakażenia kleszczy w zależności od genogatunków kompleksu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	62
4.5. Detekcja <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	65
4.5.1 Zakażenie <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w zależności od stadium rozwojowego kleszcza ..	65
4.5.2 Zakażenie kleszczy <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w czasie	65
4.5.3 Zakażenie <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w zależności od terenu występowania kleszczy ..	67
4.5.4 Sekwencjonowanie fragmentu 16S rRNA <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	68
4.6. Ilościowe oznaczanie <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	70
5. Dyskusja.....	72
5.1. Metody molekularne w epidemiologii rozwijających się chorób zakaźnych	72
5.1.1 Techniki wykorzystujące sondy molekularne	73
5.1.2 Techniki oparte na amplifikacji kwasów nukleinowych	74
5.1.3 Technika qPCR w badaniach patogenów w kleszczach.....	77
5.1.4 Wpływ postaci DNA na wydajność reakcji qPCR	78
5.1.5 Różnice w ilościowym oznaczaniu patogenów w zależności od zastosowanej metody	80
5.2. Aktywność kleszczy <i>Ixodes ricinus</i>	83
5.2.1 Zmiany w występowaniu kleszczy i ich wpływ na epidemiologię chorób odkleszczowych ..	83
5.2.2 Występowanie kleszczy <i>Ixodes ricinus</i> w Polsce	87
5.3. Epidemiologia boreliozy z Lyme i biologia krętków <i>Borrelia</i>	89
5.3.1 Sytuacja epidemiologiczna boreliozy z Lyme	89
5.3.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato w Polsce	92
5.3.3 Różnorodność genetyczna krętków <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	97
5.4. Epidemiologia anaplazmozy i biologia bakterii <i>Anaplasma</i> spp.....	100
5.4.1 Sytuacja epidemiologiczna ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej	100
5.4.2 <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w Polsce	101
5.4.3 Warianty genetyczne <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	105
5.5. Koinfekcje w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i>	107
5.6. Profilaktyka chorób odkleszczowych i zwalczanie kleszczy.....	109
6. Wnioski.....	111
7. Literatura	114
8. Ryciny.....	126
9. Tabele	129
10. Aneks.....	130

WYKAZ SKRÓTÓW

ACA	Przewlekłe zanikowe zapalenie skóry (ang. <i>acrodermatitis chronica atrophicans</i>)
ANOVA	Analiza wariancji (ang. <i>analysis of variance</i>)
bDNA	Rozgałęzione DNA (ang. <i>branched DNA</i>)
BSA	Albumina bydlęca (ang. <i>bovine serum albumin</i>)
CD	Antygen różnicowania komórkowego (ang. <i>cluster of differentiation</i>)
CDC	Centrum Zwalczenia i Zapobiegania Chorobom (ang. <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CSF	Płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. <i>cerebrospinal fluid</i>)
C _t	Cykl progowy (ang. <i>threshold cycle</i>)
DFM	Mikroskopia w ciemnym polu widzenia (ang. <i>dark field microscopy</i>)
E	Wydajność reakcji Real-Time PCR (ang. <i>efficiency</i>)
EID	Rozwijająca się choroba zakaźna (ang. <i>emerging infectious disease</i>)
ELISA	Test immunoenzymatyczny, ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Rumień wędrujący (ang. <i>erythema migrans</i>)
FISH	Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (ang. <i>fluorescence in situ hybridization</i>)
FRET	Zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencyjnego (ang. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)
F _t	Wartość progowa fluorescencji (ang. <i>fluorescence treshold</i>)
HGA	Ludzka anaplazmoza granulocytarna, ang. <i>human granulocytic anaplasmosis</i>
HIV	Ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
IFA	Test immunofluorescencji pośredniej (ang. <i>indirect immunofluorescent antibody</i>)
IQR	Rozstęp ćwiartkowy (ang. <i>interquartile range</i>)
LB	Bulion Lizogenny (ang. <i>Lysogeny Broth</i>)
MLST	Metoda typowania wewnątrzgatunkowego (ang. <i>multi locus sequence typing</i>)
MRI	Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. <i>magnetic resonance imaging</i>)
NCBI	Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej (ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
Osp	Białko powierzchniowe (ang. <i>outer surface protein</i>)
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy, ang. <i>polymerase chain reaction</i>
PNA	Peptydowe kwasy nukleinowe (ang. <i>peptide nucleic acids</i>)
pz	para zasad
qPCR	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative PCR</i>)
R ²	Współczynnik korelacji
RFLP	Analiza długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
s.l.	w szerokim znaczeniu (łac. <i>sensu lato</i>)

s.s.	w ścisłym znaczeniu (łac. <i>sensu stricto</i>)
SARS	Zespół ostrej ciężkiej niewydolności oddechowej (ang. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>)
SD	Odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SDA	amplifikacja przemieszczającej się nici (ang. <i>strand displacement amplification</i>)
TBEV	Wirus kleszczowego zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych
TBF	Gorączka odkleszczowa, ang. <i>tick borne fever</i>
T _m	Temperatura topnienia (ang. <i>melting temperature</i>)
TMA	Amplifikacja oparta o transkrypcję (ang. <i>transcription mediated amplification</i>)
USA	Stany Zjednoczone Ameryki (ang. <i>United States of America</i>)
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. <i>High-performance liquid chromatography</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

1. WSTĘP

1.1. ROZWIJAJĄCE SIĘ CHOROBY ZAKAŻNE

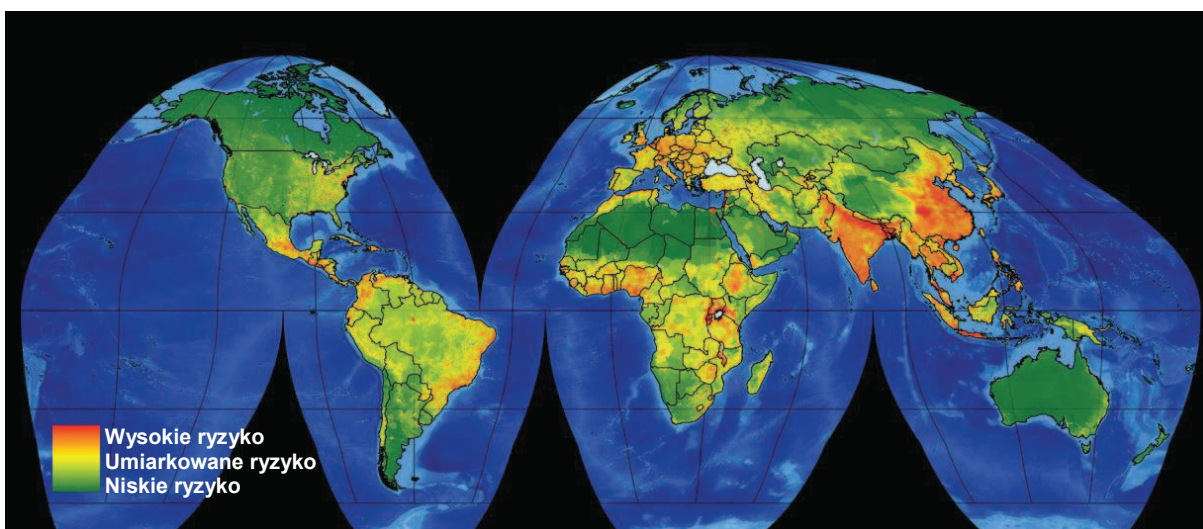
Wraz ze zmianami ewolucyjnymi oraz zmianami zachowania człowieka wobec środowiska naturalnego zmianom ulega również zakres patogenów człowieka oraz chorób zakaźnych przez nie wywoływanych. Źródłem nowych patogenów u ludzi jest zazwyczaj rezerwar zwierzęcy. Rozwijające się choroby infekcyjne i inwazyjne (ang. *emerging infectious diseases*, EIDs) to choroby, których zapadalność u ludzi wzrosła w przeciągu ostatnich dwóch dekad lub istnieje zagrożenie jej wzrostu w najbliższej przyszłości. Pojawienie się choroby może być związane z rozprzestrzenieniem się nowego czynnika zakaźnego, rozpoznaniem infekcji już obecnej w populacji, ale do tej pory nieznaną lub odkryciem, iż opisana choroba ma infekcyjny charakter. Możliwe jest również ponowne pojawienie się choroby po okresie zmniejszonej zapadalności (van Doorn 2014 [152]).

Dotychczas zidentyfikowano około 1 400 patogenów człowieka. Większość z nich (60%) to czynniki etiologiczne zoonoz, których przetrwanie zależne jest od zwierzęcego rezerwaru. Dodatkowe 5-10% patogenów przenoszonych jest przez czynniki środowiskowe. Pozostałe mogą ulegać transmisji wyłącznie wśród ludzi. Pośród rozwijających się chorób zakaźnych odsetek zoonoz jest nawet wyższy (73%), co wskazuje, że interakcje między człowiekiem a zwierzęciem stanowią szczególne ryzyko. Ponadto, większość współczesnych patogenów to patogeny występujące w przeszłości u zwierząt, które z biegiem czasu przystosowały się do nowego gospodarza, jakim jest człowiek (Taylor 2001 [144]).

Ze względu na to, że dla większości patogenów rezerwar środowiskowy lub zwierzęcy jest niezbędny do przetrwania, interakcje pomiędzy populacją ludzi a otaczającym ekosystemem determinują różnorodność występujących lokalnie mikroorganizmów chorobotwórczych. Ingerencja człowieka w środowisko naturalne, globalizacja działalności ekonomicznej i kulturowej, powszechne kontakty międzyludzkie i postępująca urbanizacja zmieniają oblicze wzajemnych relacji pomiędzy patogenami a człowiekiem (Morse 2012 [90]). Otwarcie nowych obszarów dla turystyki (podróże przyrodnicze, wyjazdy przygodowe, trekking, polowania) prowadzi do wzrostu narażenia człowieka na różne choroby, m.in. przenoszone przez kleszcze (Holzer 2005 [58]). Na podstawie danych zbieranych przez ostatnie dziesięciolecie stworzona została mapa obrazująca ryzyko pojawienia się nowych zoonoz, biorąca pod uwagę możliwość transmisji patogenów ze zwierząt udomowianych oraz dzikich, a także możliwość pojawienia się nowych szczepów lekoopornych i transmisję mikroorganizmów przez wektory (Ryc. 1). Obszar Polski i innych państw Europy środkowej i zachodniej charakteryzuje się umiarkowanym ryzykiem (Morse 2012 [90]).

Czynnikami etiologicznymi chorób przenoszonych przez wektory (ang. *vector-borne diseases*) mogą być pasożyty, bakterie i wirusy. Transmisja następuje przez ukłucie odżywiających się krwią stawonogów (głównie kleszczy i komarów). W ciągu ostatnich kilku lat odnotowano pojawienie się nowych chorób lub ponowne pojawienie się chorób już wcześniej występujących,

którym zwykle towarzyszą zmiany epidemiologiczne (np. rozmieszczenie geograficzne, częstość występowania oraz chorobotwórczość). Częstotliwość niektórych transmisyjnych chorób zwierząt domowych w Europie wzrasta, np. babeszjoza psów, anaplazmoza granulocytarna, erlichioza monocytarna psów, anaplazmoza trombocytarna, leiszmanioza. Z wyjątkiem ostatniego schorzenia, wymienione choroby są przenoszone przez kleszcze. Zarówno rozmieszczenie jak i liczebność trzech głównych gatunków kleszczy o znaczeniu medycznym i weterynaryjnym, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus* i *Ixodes ricinus* ulegają ciągłym zmianom. Przyczyny tych zmian związane są głównie z czynnikiem ludzkim (podróże ze zwierzętami, zmiany miejsc zamieszkałych przez ludzi, aktywność społeczna i rekreacyjna), ale zmiany klimatu również mają bezpośredni wpływ na stawonogi (liczebność, rozmieszczenie geograficzne i pojemność wektorowa). Na uwagę zasługuje również wzrastająca liczba przypadków odkleszczowego zapalenia mózgu w Europie Zachodniej, a także riketsjozy przenoszone przez pchły (Beugnet 2009 [8]).



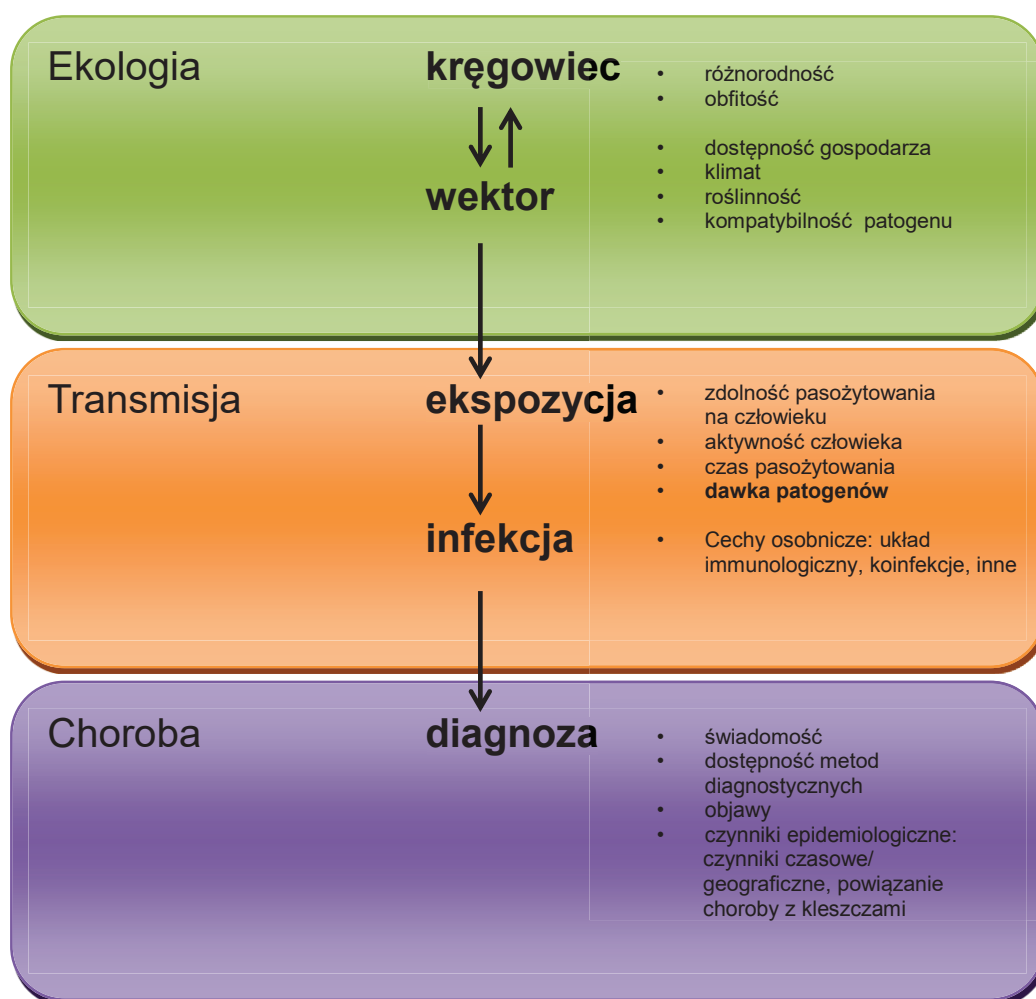
Ryc. 1 Mapa obrazująca ryzyko pojawienia się nowych zoonoz (Morse 2012 [90]).

Znaczny ekonomiczny wpływ chorób przenoszonych przez kleszcze na sektor rolniczy oraz weterynaryjny znany jest od wielu lat. Jednak w ciągu ostatnich trzydziestu lat wzrosło zainteresowanie chorobami odkleszczowymi także wśród środowiska medycznego i społeczeństwa. W Europie choroby wywoływane przez mikroorganizmy przenoszone przez kleszcze często pozostają albo błędnie diagnozowane lub też są łączone jedynie ze specjalnymi grupami zawodowymi (Holzer 2005 [58]).

Wśród rozwijających się chorób zakaźnych i inwazyjnych człowieka o największym znaczeniu medycznym i ich czynników etiologicznych, które mogą być przenoszone przez kleszcze *I. ricinus* są: kleszczowe zapalenie mózgu (wirusy z rodziny *Flaviviridae*), choroby z grupy gorączek plamistych (*Rickettsia raoultii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia slovaca*), ludzka erlichioza granulocytarna (*Anaplasma phagocytophilum*), tularemia (*Francisella tularensis*), borelioza (*Borrelia burgdorferi* s.l.), babeszjoza (*Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Babesia venatorum* (dawniej *Babesia* sp. EU1)) (Amiel 2004 [2]; Vannier 2008 [153]; Parola 2004 [101]; Parola 2005

[99]; Parola 2013 [100]; Vorou 2007 [154]). Większość wymienionych chorób odkleszczowych identyfikowana była początkowo u człowieka, a dopiero później ich czynnik etiologiczny w kleszczach. Wraz z rozwojem metod molekularnych coraz częściej czynniki chorobotwórcze są identyfikowane najpierw w wektorze bezkręgowym, a następnie stwierdzany jest związek z zachorowaniami u człowieka (Tijssse-Klasen 2014 [147]). Taka sytuacja miała miejsce w przypadku *R. helvetica*, gatunku riketsji, którego związek z chorobą u człowieka został potwierdzony w 1999 r. (Nilsson 1999 [95]). W przypadku dwóch innych patogenów – *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* oraz *Borrelia miyamotoi* pierwsze przypadki zachorowań u ludzi zostały opisane niedawno, odpowiednio w latach 2010 i 2011 (Welinder-Olsson 2010 [161]; Platonov 2011 [104]). Występowanie obu powyższych patogenów w kleszczach *I. ricinus* na terenie Polski zostało potwierdzone metodami molekularnymi (Welc-Fałęciak 2014 [159]; Wodecka 2010 [162]).

Na występowanie, transmisję i diagnostykę chorób odkleszczowych wpływa wiele czynników (Ryc. 2).



Ryc. 2 Czynniki wpływające na występowanie, transmisję i diagnostykę chorób przenoszonych przez kleszcze (Tijssse-Klasen 2014 [147]).

Poszerzenie wiedzy z zakresu ich ekologii, a także pozyskanie informacji o ich wektorach i rezerwuarach może pomóc oszacować ryzyko dla populacji ludzi, jak również, w razie

konieczności, podjąć odpowiednie działania prewencyjne. Dane na temat epidemiologii chorób pozwalają określić w jakich okresach ryzyko zachorowania jest największe, oszacować częstość zachorowań i ogólny wpływ na zdrowie publiczne. Informacje takie pozwalają na łatwiejsze rozpoznawanie nowych przypadków zachorowań, co ułatwia opracowywanie metod diagnostycznych, które umożliwiają w konsekwencji łatwiejsze zbieranie danych epidemiologicznych (Tijssen-Klasen 2014 [147]). Z tego względu badania nad występowaniem patogenów w środowisku naturalnym stanowią istotny wkład w ochronę zdrowia publicznego.

1.2. CHARAKTERYSTYKA KLESZCZY *IXODES RICINUS*

Kleszcze (Ixodida) to pajęczaki z podgromady roztoczy (Acari). Są to zewnętrzne, okresowe pasożyty kręgowców lądowych. Opisano ok. 900 gatunków kleszczy, z czego 21 występuje w Polsce. Większość gatunków kleszczy bytuje w klimacie tropikalnym, część to organizmy kosmopolityczne. Do rodziny Ixodidae należy około 650 gatunków kleszczy. Do rodzaju *Ixodes* należy 245 gatunków tych pasożytów, z których cztery (*I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. ricinus* oraz *I. persulcatus*) są wektorami czynników etiologicznych większości chorób odkleszczowych. *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), inaczej kleszcz pospolity lub kleszcz europejski leśny występuje obficie w Polsce i stanowi dogodny wektor dla wielu patogenów zwierząt i człowieka, w tym krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato oraz riketsji *Anaplasma phagocytophilum*. Systematykę tego kleszcza pokazano w Tabeli 1.

Tab. 1 Systematyka *Ixodes ricinus* (wg. Siudy 1993 [127]).

Typ: Arthropoda Latreille, 1829

Podtyp: Chelicerata Heymons, 1901

Gromada: Arachnida Lamarck, 1801

Podgromada: Acari Latreille, 1795

Nadrząd: Anactinotrichida (Grendjean, 1935) Van Der Hammen, 1968

Rząd: Ixodida (Sundevall, 1833) Van Der Hammen, 1968

Podrząd: Ixodina (Murray, 1877) Van Der Hammen, 1968

Rodzina: Ixodidae Murray, 1877

Podrodzina: Ixodinae Murray, 1877

Rodzaj: *Ixodes* Latreille, 1795

Gatunek: *Ixodes ricinus* Linnaeus, 1758

1.2.1 MORFOLOGIA KLESZCZY *IXODES RICINUS*

Kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* zaliczane są do kleszczy twardych, o czym świadczy obecność tarczki grzbietowej. Ciało kleszczy podzielone jest na gnatosomę (narząd gębowy - homolog głowotułowia) i idiosomę (pozostała część ciała kleszcza). Gnatosoma zbudowana jest z pary nogogłaszczków, pary szczęk oraz hypostomu i służy do utwierdzenia kleszcza na powierzchni ciała żywiciela i pobierania pokarmu (Siuda 1991 [126]). W cyklu rozwojowym występują cztery stadia rozwojowe: jajo, larwa, nimfa oraz postać dorosła (*imago*), różniące się budową ciała (Ryc. 3).

Kleszcze posiadają ciało owalne, spłaszczone grzbieto-brzusznie. Największe rozmiary osiągają samice, ok. 2,9-3,5 mm długości (okazy głodne). Po posiłku długość ciała może wzrosnąć nawet czterokrotnie. Silnie zesklekotyzowane części ciała samicy zabarwione są brązowo i ciemnobrązowo, przytarcie jest czerwonawe. Ciało najedzonej samicy przybiera barwę od białawej do ciemnobrązowej. Tarczka grzbietowa pokrywa przednią część powierzchni idiosomy. Samiec jest mniejszy od samicy, długość ciała osiąga ok. 2,3 – 2,7 mm. Tarczka grzbietowa u samców jest gładka, koloru od jasnobrązowej do ciemnobrunatnej i pokrywa niemal całą idiosomę. Nimfa jest morfologicznie podobna do samicy, jednak zdecydowanie mniejsza (długość ciała głodnej nimfy to 1,2-1,4). Nie posiada ona wykształconego otworu płciowego. Larwa przypomina nimfę, ale jest drobniejsza (długość ciała wynosi ok. 0,7-0,9 mm) i posiada jedynie trzy pary odnóży kroczy (Deryło 2002 [33]).



Ryc. 3 Stadia rozwojowe kleszczy twardych. Od lewej: larwa, nimfa, samiec i samica (<http://itg.content-e.eu>).

Ixodes ricinus posiada komórki światłoczułe po stronie grzbietowej, a także narząd zmysłu – narząd Hallera, na pierwszej parze odnóży. Umożliwia on wykrywanie zmian w środowisku, takich jak zmiany natężenia światła, temperatury, poziomu dwutlenku węgla, wilgotności i drgań, co ułatwia poszukiwanie żywiciela (Medlock 2013 [86]).

1.2.2 CYKL ŻYCIOWY KLESZCZY *IXODES RICINUS*

Ixodes ricinus są kleszczami pozagniazdowymi, polifagicznymi, euryksenicznymi, o trójżywieliowym cyklu rozwojowym. Mają szeroki krąg żywicieli. Mogą żerować na gadach, ptakach jak i ssakach (łącznie kilkaset gatunków zwierząt), preferują jednak zwierzęta stałocieplne (Kiewra 2012 [68]). Larwy i nimfy wybierają małe i średniej wielkości ssaki, można je spotkać również na ptakach i gadach. Dorosłe osobniki atakują średnie i duże ssaki (jeleń, sarna, dzik) (Karbowski 2001 [67]). *Ixodes ricinus* to w Polsce gatunek kleszczy najczęściej żerujący na człowieku, który jest atakowany głównie przez nimfy i samice.

Z jaj złożonych przez samicę wykluwają się larwy, które atakują pierwszego żywiciela. Po najedzeniu larwy odczepiają się od niego i opadają na podłoże, gdzie przekształcają się w kolejne

stadium rozwojowe – nimfy, które atakują kolejnego żywiciela, pobierają pokarm i na podłożu przekształcają się w postaci dorosłe. Po osiągnięciu odpowiedniego stopnia rozwoju samce oraz samice atakują trzeciego żywiciela. Po najedzeniu, zaplemnione samice opadają na podłoże gdzie składają jaja. Cykl rozwojowy kleszcza pospolitego trwa 2-3 lata (Deryło 2002 [33]).

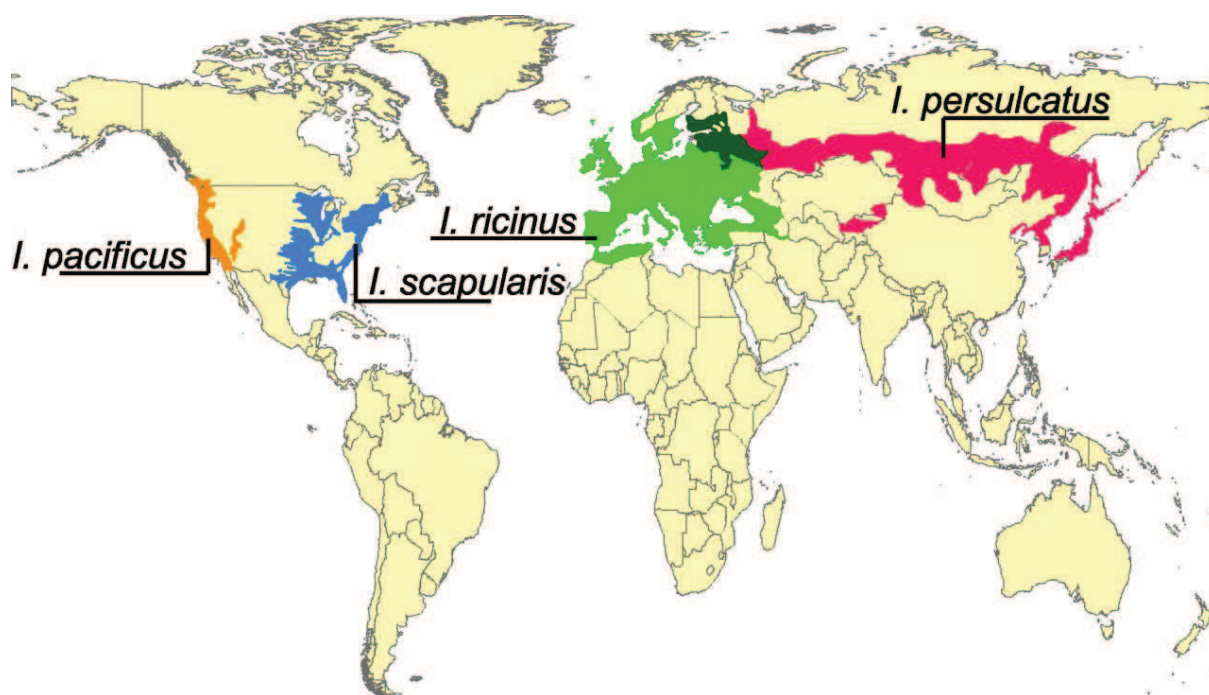
Larwy kleszczy nie poruszają się poziomo na duże odległości, często pozostają połączone w skupiska czekając na żywiciela. Ruch gospodarza, podczas żerowania larw sprzyja ich rozpraszaniu. Przenoszenie kleszczy podczas pobierania pokarmu, zwłaszcza przez ptaki i duże ssaki, ma zatem kluczowe znaczenie dla rozprzestrzeniania się tych pajęczaków. Wszystkie stadia rozwojowe kleszczy *I. ricinus* szukają żywiciela za pomocą techniki tzw. "zasadki", wspinając się na roślinność i oczekując na przechodzące zwierzę. Podczas oczekiwania kleszcz traci wilgoć, w związku z czym musi schodzić niżej, do warstwy ściółki/runa leśnego w celu nawodnienia, przez co zmniejsza się prawdopodobieństwo zetknięcia kleszcza z żywicielem, a pajęczak traci zapasy energii. W konsekwencji zmniejsza się również szansa przeżycia kleszcza. Właściwości przyziemnej roślinności, zwłaszcza stopień wilgotności, mają kluczowe znaczenie w przeżyciu kleszczy (Medlock 2013 [86]).

Ponieważ dorosłe osobniki *I. ricinus* żerują głównie na dużych ssakach, ich dostępność na danym terenie wpływa na populację kleszczy (Medlock 2013 [86]). Poznanie ekologii kleszczy i ich związków z żywicielami w środowisku zurbanizowanym jest konieczne do określenia parametrów niezbędnych do oceny ryzyka i planowania strategii zdrowia publicznego w zakresie kontroli i prewencji chorób przenoszonych przez te stawonogi (Rizzoli 2014 [116]).

1.2.3 WYSTĘPOWANIE KLESZCZY IxODES RICINUS

Cztery najważniejsze z medycznego punktu widzenia gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes* są szeroko rozpowszechnione (Ryc. 4). Zasięg występowania *I. ricinus* obejmuje szeroki obszar geograficzny w Europie od Portugalii i Irlandii na zachodzie do Rosji (Ural) na wschodzie i od Skandynawii na północy po Afrykę Północną na południu (Medlock 2013 [86]).

W Polsce kleszcze pospolite występują na terenie całego kraju, zlokalizowane zostały setki siedlisk (Nowak-Chmura 2013 [96]). Bytują w miejscach wilgotnych o wilgotności względnej powietrza 80-100%. Zasiedlają głównie lasy liściaste i mieszane. Sporadycznie spotykane są na terenach suchych, bez podszycia oraz na terenach podmokłych i odsłoniętych, np. polany, pastwiska, na których występują jedynie w pasie brzeżnym, zacienionym przez las. Rozmieszczenie kleszczy ma charakter mozaikowy. Skupiają się wzdłuż dróg i ścieżek oraz szlaków zwierząt, gdzie mają największą szansę znaleźć żywiciela. Ich występowanie zależy od wielu czynników, m. in. warunków klimatycznych (wilgotność, nieprzewiewność, małe skoki temperatury), czy dostępności żywicieli. Kleszcze pospolite wykazują aktywność sezonową. W Polsce aktywne są od wiosny do jesieni, z pierwszym większym szczytem aktywności na przełomie wiosny i lata oraz drugim mniejszym na przełomie lata i jesieni (Deryło 2002 [33]).



Ryc. 4 Rozprzestrzenienie geograficzne ważnych medycznie gatunków kleszczy należących do rodzaju *Ixodes* (Swanson 2006 [139]).

Poznanie występowania kleszczy, stanowiących potencjalne wektory i rezerwuary wielu czynników chorobotwórczych ma duże znaczenie dla oceny zagrożenia dla zdrowia publicznego.

1.2.4 KLESZCZE *IXODES RICINUS* JAKO WEKTORY MIKROORGANIZMÓW CHOROBOTWÓRCZYCH

Kleszcze *I. ricinus* mają ogromne znaczenie medyczne jako wektory i rezerwuary wielu czynników chorobotwórczych (Tab. 2). Mogą także powodować paraliż kleszczowy (Nowak-Chmura 2013 [96]).

Tab. 2 Mikroorganizmy przenoszone przez kleszcze *I. ricinus* (na podstawie Nowak-Chmura 2013 [96]).

Patogeny wykryte w kleszczach <i>I. ricinus</i>	
Wirusy	wirus kleszczowego zapalenia mózgu, wirus szetlandzkiego zapalenia mózgu, wirus gorączki krwotocznej krymsko-kongijskiej, wirusy z grupy Uukuniemi, wirus Kemerovo (Koliba, Lipovnik, Tribec), wirus skokowej choroby owiec
Bakterie	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., <i>Rickettsia slovaca</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. monacensis</i> , <i>R. conorii</i> , <i>R. aeschilmannii</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>A. marginale</i> , <i>A. centrale</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Francisella tularensis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Bartonella vinsonii</i> , <i>B. henselae</i>
Pierwotniaki	<i>Theileria mutans</i> , <i>T. sergenti</i> , <i>Babesia divergens</i> , <i>B. microti</i> , <i>B. caballi</i> , <i>B. bigemina</i> , <i>B. ovis</i> , <i>B. bovis</i> , <i>B. major</i> , <i>B. canis</i> , <i>B. capreoli</i> , <i>B. motasi</i> , <i>B. venatorum</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>

Ze względu na dużą liczbę mikroorganizmów, jakie mogą być przenoszone przez *I. ricinus*, nierzadko spotykane są koinfekcje dwoma lub wieloma patogenami. Kleszcze *Ixodes* stwierdzano często na terenach, gdzie choroby odkleszczowe nie występowały endemicznie. Różnice pomiędzy występowaniem chorób, a ich wektorów i rezerwuarów nie są dobrze poznane (Swanson 2006 [139]).

Kleszcze *I. ricinus* stanowią dogodny wektor dla chorobotwórczych mikroorganizmów, na co wpływa między innymi przystosowanie ciała kleszczy do wektorowania szerokiego zakresu patogenów, zachowanie kleszczy wobec żywicieli, a także ich sposób żerowania. Dzięki szerokiemu zakresowi żywicieli, a także kilkukrotnej zmianie żywicieli w cyklu rozwojowym, *I. ricinus* wpływają na utrzymanie krążenia mikroorganizmów w przyrodzie. Kleszcze te przebywają na żywicielu przez długi okres (nawet do kilku dni w przypadku osobników dorosłych i pochłaniają w tym czasie znaczną objętość krwi, co ułatwia transmisję patogenów z żywiciela na kleszcza. Duże znaczenie ma również długowieczność kleszczy oraz możliwość transstadialnego, transowarialnego i płciowego przekazania patogenów. Ponadto, kleszcze mogą wraz z żywicielami wędrować na znaczne odległości, co ułatwia geograficzne rozprzestrzenianie się chorób (Siuda 1991 [126]).

W krążeniu patogenów odkleszczowych w przyrodzie dużą rolę odgrywają zwierzęta lądowe, które stanowią zarówno źródło pokarmu dla samych kleszczy, jak również rezerwuar wielu czynników chorobotwórczych. Aby dany gatunek kręgowca został uznany za rezerwuar dla danego mikroorganizmu, spełnione muszą być następujące kryteria: (i) musi być on żywicielem kleszczy, (ii) musi pobierać odpowiednią liczbę patogenów podczas żerowania kleszcza, (iii) patogeny muszą namnażać się w żywicielu i mieć zdolność przetrwania w co najmniej jednej części jego ciała, (iv) patogeny muszą być przekazywane kolejnemu kleszczowi. Dlatego też wykrycie DNA czynnika chorobotwórczego w danym żywicielu nie jest wystarczające do stwierdzenia, że pełni on rolę rezerwuaru. W tym celu niezbędne jest wykonanie badań eksperymentalnych (Rizzoli 2014 [116]). Dotychczas jedynie w przypadku kilku gatunków udało się potwierdzić, że spełniają wszystkie ww. kryteria, a tym samym stanowią rezerwuar dla czynników chorobotwórczych (Tab. 3).

Krążeniu patogenów w przyrodzie sprzyja adaptacja zwierząt dziko żyjących do środowiska zurbanizowanego, w którym występuje mniej drapieżników, a zwierzęta mogą łatwo znaleźć pożywienie oraz schronienie.

Tab. 3 Wybrane patogeny oraz gatunki zwierząt będące rezerwuarami dla patogenów (potwierdzone eksperymentalnie) (Rizzoli 2014 [116]; Heylen 2015 [56]).

Patogen	Gatunek będący żywicielem kleszczy
TBEV	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Apodemus sylvaticus</i> (mysz zaroślowa), <i>Myodes glareolus</i> (nornica ruda), <i>Microtus agrestis</i> (nornik bury), <i>Glis glis</i> (popielica), <i>Sciurus vulgaris</i> (wiewiórka pospolita), <i>Sorex araneus</i> (ryjówka aksamitna), <i>Erinaceus roumanicus</i> (jeż wschodni)
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Apodemus sylvaticus</i> (mysz zaroślowa), <i>Myodes glareolus</i> (nornica ruda)
<i>Borrelia afzelii</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Apodemus sylvaticus</i> (mysz zaroślowa), <i>Apodemus agrarius</i> (mysz polna), <i>Myodes glareolus</i> (nornica ruda), <i>Rattus norvegicus</i> (szczur wędrowny), <i>Sciurus carolinensis</i> (wiewiórka szara)
<i>Borrelia garinii</i>	<i>Parus major</i> (bogotka zwyczajna)
<i>Borrelia spielmanii</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Apodemus sylvaticus</i> (mysz zaroślowa), <i>Rattus norvegicus</i> (szczur wędrowny), <i>Eliomys quercinus</i> (żołędnicza), <i>Muscardinus avellanarius</i> (orzysznicza)
<i>Borrelia miyamotoi</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Myodes glareolus</i> (nornica ruda)
<i>Cand. N. mikurensis</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (mysz leśna), <i>Apodemus sylvaticus</i> (mysz zaroślowa), <i>Apodemus agrarius</i> (mysz polna), <i>Myodes glareolus</i> (nornica ruda)
<i>Babesia microti</i>	<i>Apodemus agrarius</i> (mysz polna)

1.2.5 ŻYWICIELE KLESZCZY *IXODES RICINUS* ORAZ ICH ROLA W KRAŻENIU PATOGENÓW

Kleszcze *I. ricinus* mogą żerować szerokim na spektrum żywicieli, co sprzyja rozprzestrzenianiu się tych pajęczaków. Niektóre zwierzęta pełnią istotną rolę, zarówno w podtrzymywaniu populacji kleszczy, jak i przenoszonych przez nie patogenów, nie koniecznie jako kompetentne rezerwuary.

Ssaki. Gryzonie (myszy, szczury, nornice, popielice, wiewiórki, burunduki) są głównymi żywicielami dla larw i nimf kleszczy. Szeroko rozpowszechnione gatunki synantropijne gryzoni, które tolerują duże zagęszczenie i charakteryzują się krótkim cyklem rozrodczym, stanowią dogodny rezerwuuar dla patogenów. Duża populacja gryzoni w miastach oraz łatwość migracji tych zwierząt między terenami zurbanizowanymi a niezurbanizowanymi ułatwia rozprzestrzenianie się zainfekowanych kleszczy na tereny miejskie. Fluktuacje w populacji tych zwierząt mają duże znaczenie w określaniu ryzyka związanego z chorobami odkleszczowymi. Ponadto, ze względu na fakt, iż gryzonie są żywicielami wielu gatunków kleszczy, mogą umożliwiać transmisję patogenów pomiędzy różnymi ich gatunkami (Rizzoli 2014 [116]). Dzięki temu, że gryzonie często stanowią źródło pokarmu jednocześnie dla larw oraz nimf są one ważnym czynnikiem, który przyczynia się do utrzymywania krążenia niektórych patogenów w środowisku, np. TBEV, który utrzymuje się w krążeniu ogólnym przez krótki okres czasu (Mihalca 2013 [89]).

Wśród innych małych ssaków, będących żywicielami kleszczy *I. ricinus* wymienić można jeże, charakteryzujące się dłuższym życiem niż gryzonie. Ponadto jeże mogą być żywicielami nie tylko larw i nimf, ale również osobników dorosłych, dlatego mogą utrzymywać stabilną populację

kleszczy na terenach zurbanizowanych. Zającowate (zające, króliki) również stanowią dogodny źródło pożywienia dla kleszczy na terenach zamieszkałych przez ludzi. Podobnie jak jeże, zajączaki są żywicielami zarówno larw, nimf jak i postaci dorosłych kleszczy i mogą utrzymywać pełny cykl życiowy pajęczaków, na terenach, na których duże ssaki nie występują. Również nietoperze, np. przystosowane do środowiska zurbanizowanego podkowiec mały (*Rhinolophus hipposideros*), czy nocek duży (*Myotis myotis*) są żywicielami różnych stadiów rozwojowych kleszczy. Udział nietoperzy w krążeniu patogenów odkleszczowych jest jednak słabo poznany. Wyniki niedawno przeprowadzonych badań wykazały, że *I. ricinus* pasożytujące na nietoperzach mogą być nosicielami *B. garinii* i *R. helvetica* (Piksa 2016 [103]; Sevcik [119]).

Wśród większych zwierząt odgrywających istotną rolę w podtrzymywaniu populacji kleszczy na terenach miejskich i podmiejskich wymienić można sarnę europejską (*Capreolus capreolus*), dzika (*Sus scrofa*) oraz lisa pospolitego (*Vulpes vulpes*). Zwierzęta te są żywicielami dla wszystkich trzech aktywnych stadiów rozwojowych *I. ricinus* (Handeland 2013 [54]; Wodecka 2014 [163]; Meyer-Kayser 2012 [87]). Ponadto ich gęstość może być wykorzystywana w przewidywaniu zagęszczenia samych kleszczy. Sarny mogą także rozprzestrzeniać kleszcze na duże odległości (nawet powyżej 100 km) przenosząc na swym ciele jednocześnie wiele osobników.

Oprócz dzikich zwierząt, w utrzymywaniu populacji kleszczy w miastach biorą również udział zwierzęta towarzyszące, w tym także bezpańskie. Populacja psów w Europie sięga 100 mln. Szczególnie dużą rolę odgrywają bezpańskie psy, które żyją na dużych obszarach pomiędzy terenami miejskimi a niezurbanizowanymi ze względu na to, że nie są one zabezpieczone przed atakami kleszczy, jak psy domowe. Rola psów jako rezerwuarów patogenów nie jest jeszcze do końca poznana (Uspensky 2016 [151]).

Ptaki. Ta gromada zwierząt odgrywa istotną rolę w przenoszeniu kleszczy i związanych z nimi czynników chorobotwórczych na tereny zurbanizowane. Ptaki, szczególnie gatunki żerujące przy gruncie są ważnymi żywicielami larw i nimf kleszcza pospolitego. Pospolite gatunki ptaków miejskich żerujące głównie na ziemi i niskich krzewach, takie jak kos zwyczajny (*Turdus merula*), drozd śpiewak (*Turdus philomelos*) i rudzik (*Erithacus rubecula*) często są zainfestowane przez *I. ricinus*. Wykazano również, że ptaki migrujące mogą przenosić kleszcze i patogeny z nimi związane na znaczne odległości (Taragelová 2005 [143]).

Gady. Zwierzęta te są żywicielami młodocianych postaci kleszczy, szczególnie nimf. Ponadto gady często żyją na terenach zurbanizowanych. Jaszczurka zwinka (*Lacerta agilis*), jaszczurka murowa (*Podarcis muralis*) i jaszczurka zielona (*Lacerta viridis*) to najbardziej popularne gatunki, które mogą przyczyniać się do utrzymania miejskiej populacji *I. ricinus*. W próbkach skóry pobranych od wolnożyjących osobników *Lacerta agilis* wykryto DNA *B. lusitaniae* (Ekner 2011 [42]). Rola jaszczurek w utrzymywaniu krążenia patogenów przenoszonych przez kleszcze w środowisku nie jest jeszcze dostatecznie poznana.

1.3. CHARAKTERYSTYKA BAKTERII *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

Bakterie *Anaplasma phagocytophilum* są znanymi od dziesięcioleci patogenami przeżuwaczy domowych (Europa) oraz koni (USA). Niedawno zostały opisane przypadki zakażenia tymi mikroorganizmami u innych ssaków, w tym także u człowieka na terenach, gdzie kleszcze z rodzaju *Ixodes* występują endemicznie. Charakteryzują się mnogością wariantów genetycznych, a subpopulacje tych patogenów są aktualnie badane (Stuen 2013 [137]). Choroba wywoływana przez te patogeny nosi nazwę ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej (ang. *human granulocytic anaplasmosis*, HGA).

Po raz pierwszy infekcja wywoływana przez *A. phagocytophilum* została opisana podczas badań nad chorobą skokową owiec w Szkocji pod koniec XX wieku. Zauważono, że zwierzęta przebywające na pastwiskach, na których znajdowano również kleszcze, cierpią gorączkę o nieznannej etiologii. Chorobę nazwano tymczasowo gorączką odkleszczową (ang. *tick-borne fever*, TBF). Czynniki etiologiczne TBF zaklasyfikowany został jako *Rickettsia phagocytophila*, jednak ze względu na podobieństwo morfologiczne do *Cytoecetes microti* zyskał z czasem nazwę *Cytoecetes phagocytophila*. W roku 1974 patogen został przemianowany na *Ehrlichia phagocytophila*. Odkrycie czynników etiologicznych ludzkiej erlichiozy monocytarnej w 1986 r. oraz ludzkiej erlichiozy granulocytarnej w 1994 r. zapoczątkowało badania nad związkiem żywiciel – patogen, taksonomią, i epidemiologią bakterii z rodzaju *Ehrlichia* (Chen 1994 [20]; Stuen 2013 [137]; Bakken 2006 [5]). Rodzaj ten podzielono na trzy grupy, z czego grupa granulocyta zawierała *E. phagocytophilum* oraz *E. equi* (patogen koni). Na skutek późniejszej reklasyfikacji na bazie badań filogenetycznych nazwa *E. phagocytophilum* została zmieniona na *Anaplasma phagocytophilum*. Obecnie toczy się dyskusja, czy aktualna klasyfikacja nie powinna zostać po raz kolejny zmieniona, a *A. phagocytophilum* ponownie zaklasyfikowana do rodzaju *Cytoecetes* (Stuen 2013 [137]).

1.3.1 OBJAWY KLINICZNE LUDZKIEJ ANAPLAZMOZY GRANULOCYTARNEJ

Przypadki infekcji *A. phagocytophilum* odnotowano u człowieka i różnych domowych oraz wolno żyjących zwierząt. Przypadki śmiertelne opisano u owiec, bydła, koni, reniferów, saren, łosi, psów i ludzi (Stuen 2013 [137]). Choroba wywoływana przez te mikroorganizmy dotyka głównie młode zwierzęta oraz osobniki przeniesione z pastwisk wolnych od kleszczy na pastwiska, na których bytują te krwio pijne pasożyty. Najbardziej charakterystycznymi jej objawami u domowych przeżuwaczy są wysoka gorączka, anoreksja, otępienie i zmniejszenie ilości mleka. Nasilenie objawów zależy od takich czynników jak wiek, stan zdrowia zwierzęcia oraz odmiana (wariant) *A. phagocytophilum*. U owiec odnotowano także przypadki spontanicznych poronień oraz redukcję płodności. Ponadto u byków i jagniąt obserwowano przypadki utraty masy ciała.

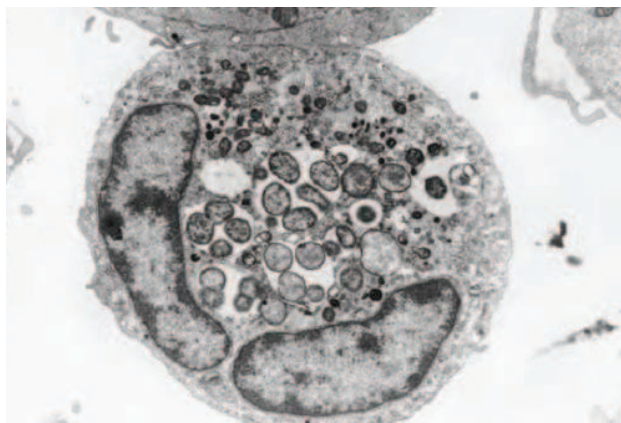
Szerokie spektrum objawów klinicznych odnotowano również u innych ssaków. Były to gorączka, anoreksja, depresja, apatia, obrzęki kończyn, niechęć do poruszania się, krwawe wybroczyny u koni, podczas gdy u psów odnotowano gorączkę, depresję, utykanie i jadłowstręt. U

kotów głównymi objawami są anoreksja, ospałość, przeczulica, zapalenie spojówek, bóle mięśni i stawów, utykanie i utrata koordynacji.

U ludzi przebieg choroby może być łagodny, ograniczony do przemijającej choroby gorączkowej, jednak zdarzają się przypadki ciężkie do śmiertelnych. Istnieje ponadto korelacja pomiędzy wiekiem pacjenta/współwystępującymi schorzeniami a nasileniem HGA. Zwykle pacjenci skarżą się na niespecyficzne objawy grypopodobne z gorączką, bólami głowy i mięśni oraz złe samopoczucie. U większości pacjentów, u których obserwowane są objawy infekcji, potwierdzono ukłucie przez kleszcza 1-2 tygodnie wcześniej (Bakken 2006 [5]). Średnia wieku pacjentów wynosi około 50 lat, częściej infekcje obserwuje się u mężczyzn niż u kobiet (Dumler 2007 [38]). W przebiegu choroby odnotowywano takie symptomy jak trombocytopenia, leukopenia, anemia, podwyższona aktywność aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej. Ponadto może dojść do komplikacji, takich jak zespół wstrząsu toksycznego lub septycznego, niewydolność oddechowa, oportunistyczne infekcje wirusowe i grzybicze, rabdomioliza, zapalenie serca, ostra niewydolność nerek, krwawienia. Innymi komplikacjami są dysfunkcje neurologiczne (demyelinizacyjna polineuropatia, dystonia szyjna, porażenie nerwów czaszkowych i twarzowych), których przyczynę upatruje się w koinfekcjach z innymi patogenami, np. *Borrelia burgdorferi*. (Bakken 2006 [5], Ismail 2010 [63]). Jednakże, większość infekcji u ludzi prawdopodobnie przebiega z niewielkimi lub bez objawów klinicznych. Dane z USA wskazują, że wskaźnik hospitalizacji dla ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej wynosi 36%, z czego 7% to przypadki wymagające intensywnej terapii, podczas gdy śmiertelność wynosi mniej niż 1% (Dumler 2012 [40]). Jednakże doniesienia z Chin sugerują znacznie wyższą śmiertelność, wynoszącą aż 26,5% u pacjentów hospitalizowanych (Stuen 2013 [137]). Ponadto wydaje się, że przypadki infekcji w Europie są mniej groźne niż w USA (Blanco 2002 [11]) (por. sekcja 5.4).

1.3.2 PATOGENEZA LUDZKIEJ ANAPLAZMOZY GRANULOCYTARNEJ

Mikroorganizmy należące do rodzaju *Anaplasma* to małe (0,2 – 1,0 µm średnicy), wewnątrzkomórkowe Gram-ujemne bakterie, które jednak nie wytwarzają lipopolisacharydu (Dumler 2005a [37]). W następstwie ukłucia przez kleszcza przedostają się do krwiobiegu, gdzie namnażają się w leukocytach wielojądrzastych (Ismail 2010 [63]). Zajmują endosomy wczesne, skąd pobierają składniki odżywcze i tworzą charakterystyczne skupiska, zwane morulami (Ryc. 5). *Anaplasma phagocytofilum* wiąże się z białkami powierzchniowymi neutrofilii i granulocytów. Po wnikięciu do komórki bakterie dzielą się do czasu, aż nastąpi jej liza lub patogeny zostaną wydalone w celu zainfekowania kolejnych komórek.



Ryc. 5 Bakterie *Anaplasma phagocytophilum* w neutrofilu pobranym z krwi obwodowej człowieka (Dumler 2005a [37]).

Wykorzystując różne mechanizmy *A. phagocytophilum* unikają wybuchowi tlenowemu neutrofilii (Ismail 2010 [63]; Mayer-Scholl 2004 [85]; Rikihisa 2006 [114]; Rikihisa 2011 [115], Woldehiwet 2008 [166]). Patogeny nie pozwalają na indukując apoptozy neutrofilii. Ponadto, ich obecność przedłuża żywotność komórek gospodarza przez zaburzenie ekspresji genów, co potencjalnie zwiększa szanse przeżycia i rozpowszechniania w organizmie (Carlyon 2006 [17]). Białko Msp2 jest białkiem występującym u *A. phagocytophilum* w największej ilości. Jest ono kodowane przez rodzinę multigenową, w której zidentyfikowano kilkadziesiąt paralogów w różnych szczepach bakterii (Dumler 2005a [37]). Różnorodność antygenowa szczepów *A. phagocytophilum* jest wzmacniana przez konwersję genu *msp2*. Różnorodność ta ma prawdopodobnie związek z immunoselekcją i może odgrywać ważną rolę w zdolności przetrwania patogenów w organizmach rezerwuarnych. Innym charakterystycznym białkiem jest białko kodowane przez gen *AnkA*, dla którego nie odkryto homologów. Sekwencja genu *AnkA* zależna jest od rejonu geograficznego, jest ona względnie zakonserwowana u szczepów występujących w Ameryce Północnej, zaś w Europie cechuje się większym zróżnicowaniem. Nie wiadomo, czy białko AnkA bierze udział w patogenezie, jest jednak ono jedynym białkiem, jakie jest wydzielane przez *A. phagocytophilum* na zewnątrz (Dumler 2005a [37]).

Bakterie te posiadają powinowactwo do komórek fagocytarnych i jako jedne z nielicznych posiadają zdolność przetrwania i replikacji w neutrofilach. Podczas żerowania kleszcze wytwarzają wydzielinę, która pobudza reakcję zapalną organizmu związaną z neutrofilami. Interakcje patogenów z komórkami systemu immunologicznego wydają się dodatkowo wzmacniać infekcję, zamiast ją ograniczać. W konsekwencji rośnie liczba zainfekowanych komórek w układzie krwionośnym i miejscu przyczepu kleszcza. (Stuen 2013 [137]; Severo 2012 [120]).

W badaniach diagnostycznych zakażonych tkanek obserwuje się zmiany zapalne bogate w makrofagi i histiocyty. Obecność hemofagocytozy w szpiku kostnym i węzłach chłonnych sugeruje zwiększoną aktywność makrofagów. Szpik kostny jest zwykle normokomórkowy lub bogatokomórkowy z prawidłową ilością elementów hematopoetycznych. Zmiany w wątrobie

rozciągają się od pojedynczych ognisk apoptozy do zrazikowego zapalenia wątroby i nekrozy. Obserwuje się również zmiany w płucach. Najczęściej jest to łagodne śródmiąższowe zapalenie płuc, rzadko ogniskowe lub rozlane uszkodzenie pęcherzyków płucnych (Dumler 2005b [39]). Ze względu na obserwowaną aktywność makrofagów/zespół hemofagocytary sugeruje się, że HGA jest schorzeniem immunopatogenicznym (Dumler 2012 [40]).

W leczeniu HGA stosuje się antybiotykoterapię. Anaplazmoza w większości przypadków przebiega łagodnie, jednak kilka czynników może mieć wpływ na cięższy przebieg: podeszły wiek, terapia immunosupresyjna, przewlekłe stany zapalne, towarzyszące poważne schorzenia (Bakken 2006 [5]).

1.4. CHARAKTERYSTYKA BAKTERII *BORRELIA BURGdorFERI* SENSU LATO

Bakterie z rodzaju *Borrelia* należą do typu *Spirochaetes* (krętki). Obecnie wyodrębnionych zostało ponad 30 gatunków, opisanych jest także wiele szczepów, które nie posiadają jeszcze swoich nazw gatunkowych. Wśród tych mikroorganizmów odrębną grupę stanowią krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato, czynnik etiologiczny boreliozy, zwanej również chorobą z Lyme. Do tej pory nazwanych i opisanych zostało 19 gatunków w obrębie tej grupy, pozostałe szczepy posiadają jedynie nazwy tymczasowe (według bazy NCBI Taxonomy, 2015), nie wszystkie gatunki jednak uważane są za patogeniczne dla człowieka (Brouqui 2004 [13]). Borelioza jest najczęściej występującą chorobą przenoszoną przez wektory w Stanach Zjednoczonych, należy też do chorób endemicznych w Europie i Azji (Marques 2010 [80]).

Borelioza jest wielonarządową chorobą odzwierzęcą. Krętki przenoszone są w Europie przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus*. Wyizolowano je również z pcheł, komarów i much, ale te stawonogi nie odgrywają istotnej roli w przenoszeniu zakażenia na ludzi. Rezerwuarem mikroorganizmów są gryzonie i sarny (Biesiada 2010 [10]).

Objawy boreliozy były obserwowane w Europie już na początku XX wieku, jednak po raz pierwszy choroba została opisana w latach 70-tych XX wieku podczas badania nietypowej epidemii, jaka wystąpiła w miejscowości Lyme (Connecticut, USA). Jej symptomy przypominały młodzieńcze reumatoidalne zapalenie stawów, lecz choroba miała charakter epidemiczny i występowała we wschodniej części stanu Connecticut co najmniej od roku 1972, ze szczytem zapadalności notowanym w lecie i wczesną jesienią (Steere 1977 [133]). Identyfikacja choroby była możliwa dzięki jej występowaniu na ściśle ograniczonym terenie oraz obserwacji charakterystycznych zmian skórnych u niektórych pacjentów. Autorzy zbadali 51 przypadków u 39 dzieci i 12 dorosłych osób, u których wystąpiły następujące objawy: nawracający asymetryczny obrzęk i ból dużych stawów, zwłaszcza kolanowych. Na podstawie epidemiologii choroby autorzy zasugerowali, iż może być ona przenoszona przez stawonogi. Czynnikiem etiologicznym choroby wyizolowano z kleszczy z gatunku *Ixodes dammini* w 1982 roku, co dało początek nowej erze w rozumieniu choroby z Lyme (Burgdorfer 1982 [15]).

1.4.1 OBJAWY KLINICZNE BORELIOZY

W Europie borelioza z Lyme jest wywoływana głównie przez trzy genogatunki: *B. garinii*, która najprawdopodobniej powoduje neuroboreliozę, *B. afzelii* – odpowiedzialną za przewlekłe zanikowe zapalenie skóry oraz *B. burgdorferi* sensu stricto, związaną z zapaleniem stawów (Murray 2010 [92]). Najnowsze doniesienia wskazują, że w Europie patogenicznymi szczepami są także m.in. *B. spielmani*, *B. bavariensis*, *B. lusitaniae* i *B. valaisiana* (Biesiada 2010 [10]).

Według europejskiej definicji przyjętej na konferencji WHO w 1995 r., borelioza rozpoznawana jest u pacjenta, który był narażony na kontakt z kleszczem i u którego rozwinęły się następnie typowe oznaki i objawy związane z chorobą z Lyme, dotyczące skóry, układu

nerwowego, narządu ruchu i serca. Klasyfikacja wg Asbrink i Hovmark definiuje dwie fazy choroby - wczesną i późną, a objawy można podzielić na miejscowe oraz uogólnione (Asbrink 1993 [3]; Nau 2009 [93]).

U około połowy pacjentów z wczesną boreliozą występuje charakterystyczna ograniczona zmiana skórna – rumień wędrujący (ang. *erythema migrans*, EM), będący patognomonicznym objawem choroby z Lyme. EM pojawia się zazwyczaj w ciągu 3 do 30 dni po ukłuciu kleszcza, nie później niż w ciągu 3 miesięcy, najczęściej na kończynach dolnych i tułowia. Zmiana chorobowa stopniowo rozszerza się, tworząc przejaśnienie w środku i osiągając ponad 5 cm średnicy. Niestety, ta istotna z diagnostycznego punktu widzenia oznaka infekcji nie występuje u niektórych pacjentów. Innym, bardzo rzadko występującym objawem boreliozy i tylko na terenie Europy, jest chłoniak limfocytarny. Niebiesko-czerwony guzek pojawia się zazwyczaj na płatku ucha lub brodawce w ciągu miesięcy lub lat od zakażenia. Skórne objawy boreliozy przedstawia Ryc. 6d. W przypadkach, gdy pacjent nie jest leczony w fazie EM, leczenie jest znacznie opóźnione lub gdy EM był nieobecny, choroba może rozwinąć się do fazy rozsianej, w której mogą zostać zajęte inne organy. Ponadto może rozwinąć się wiele EM, w których zmiany skórne są mniejsze, a ich liczba waha się od dwóch do kilkudziesięciu (rumień wędrujący mnogi) (Biesiada 2010 [10]).

Borelioza z Lyme na ogół daje objawy ze strony układu mięśniowo-szkieletowego. Ta forma boreliozy rozwija się od kilku tygodni do roku po ukłuciu kleszcza, zwykle po 6 miesiącach. W ciągu pierwszych kilku tygodni od zakażenia u około 60% objawy ograniczają się do migrującego bólu mięśni, bólu dużych stawów i kości. Typową cechą jest wysiękowe zapalenie w obrębie dużych stawów (bardzo często stawu kolanowego). Objaw ten występuje zazwyczaj asymetrycznie i towarzyszy mu obrzęk stawów bez rumienia (Ryc. 7d). Często obserwuje się kilku tygodniowe okresy remisji i nawrotów choroby (Murray 2010 [92]; Stanek 2012 [132]).

Gdy patogeny atakują ośrodkowy układ nerwowy (OUN) objawy rozwijają się szybciej, nawet gdy EM jest jeszcze obecny. Objawy neurologiczne są wysoce zmienne. Zazwyczaj pojawiają się one w czasie od kilku miesięcy do kilka lat od zakażenia. W Europie 70% chorych z zajęтым OUN rozwija tzw. zespół Bannwartha, obejmujący limfocytarne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, porażenie nerwów czaszkowych i bolesny zespół wielokorzeniowy (Ryc. 7a-c).

U dzieci występuje często ostre porażenie nerwu twarzowego, zwykle związane z pleocytozą w płynie mózgowo-rdzeniowym, albo limfocytarne zapalenie opon mózgowych bez objawów neurologicznych. Bóle korzeniowe wynikają z bezpośredniej inwazji krętków w obrębie korzeni nerwowych. Mogą one stanowić jedyny objaw zespołu Bannwartha. W ciągu kilku dni lub tygodni, u nieleczonych pacjentów z takim przebiegiem boreliozy, może rozwinąć się wiotkie porażenie mięśni i zaburzenia sensoryczne. Rzadszą formą neuroboreliozy jest zapalenie mózgu i/lub rdzenia kręgowego. Przejawia się ono niedowładem kończyn, zaburzeniami mowy, objawami mózdkowymi, zaburzeniami pola widzenia, drgawkami, śpiączką i postępującą demencją. Neuroborelioza w Europie, zarówno występująca samodzielnie jak i w połączeniu z objawami

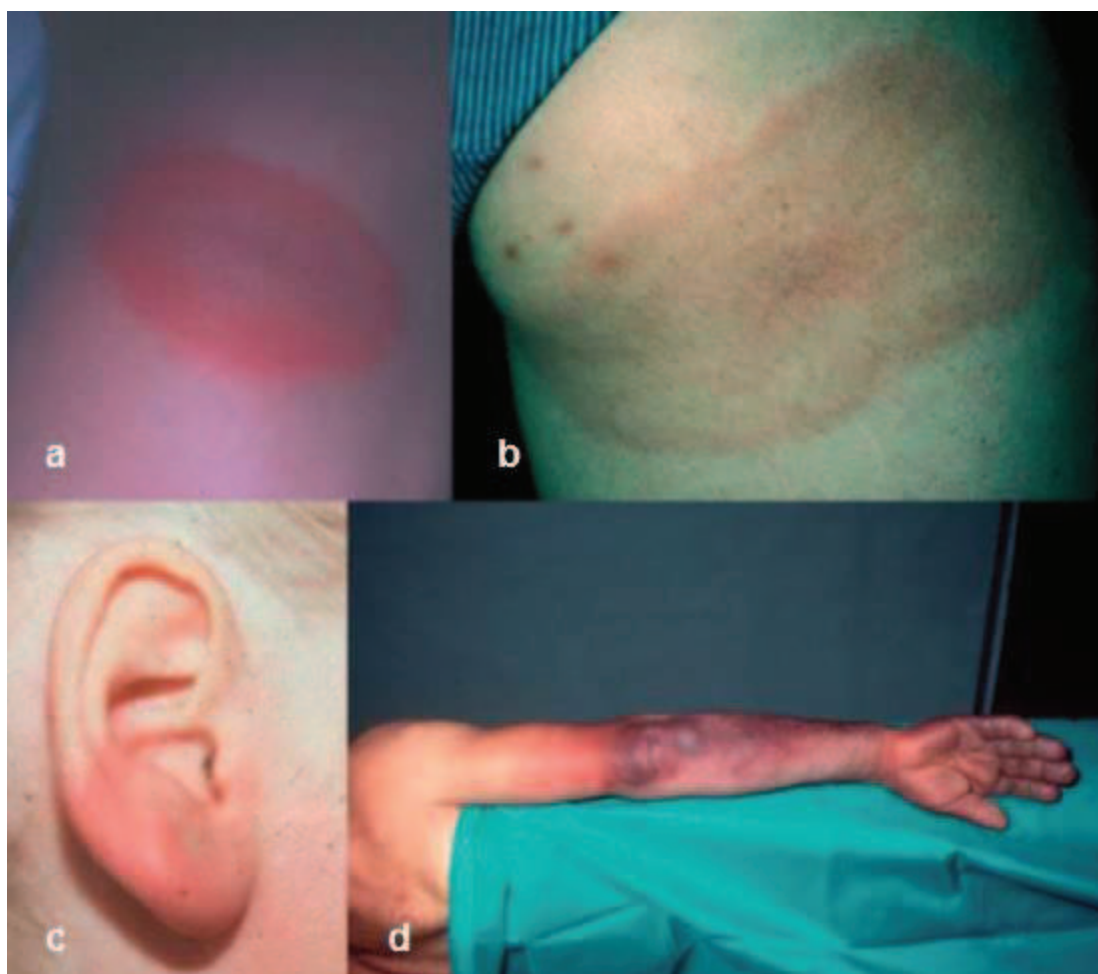
stawowymi, jest spotykana częściej niż w USA. Wynika to z różnic w geograficznej dystrybucji genogatunku *B. garinii* (Murray 2010 [92]; Kmieciak 2016 [70]).

U około 4 – 8% zakażonych pacjentów występują objawy ze strony serca, pojawiające się w ciągu kilku tygodni po zakażeniu. Przyjmują one zazwyczaj formę zaburzeń czynności przewodnictwa, w szczególności bloków przedsionkowo-komorowych o różnym nasileniu, które ustępują samoistnie u 95% pacjentów. Opisane zostały również przypadki zapalenia serca, wysiękowego zapalenia osierdzia i (bardzo rzadko) zapalenia całego serca (Wormser 2006 [170]).

Kiedy neurologiczne, reumatyczne i inne zmiany narządowe utrzymują się długi okres czasu, diagnozowana jest druga faza choroby, tzw. borelioza przewlekła (późna). Przewlekła choroba z Lyme jest jednak terminem mylącym, używanym przez autorów do oznaczenia bardzo różnych populacji pacjentów, w tym pacjentów z późną boreliozą, osób z zespołem poboreliozowym oraz tych, u których objawy choroby w ogóle się nie rozwinęły (Marques 2010 [80]).

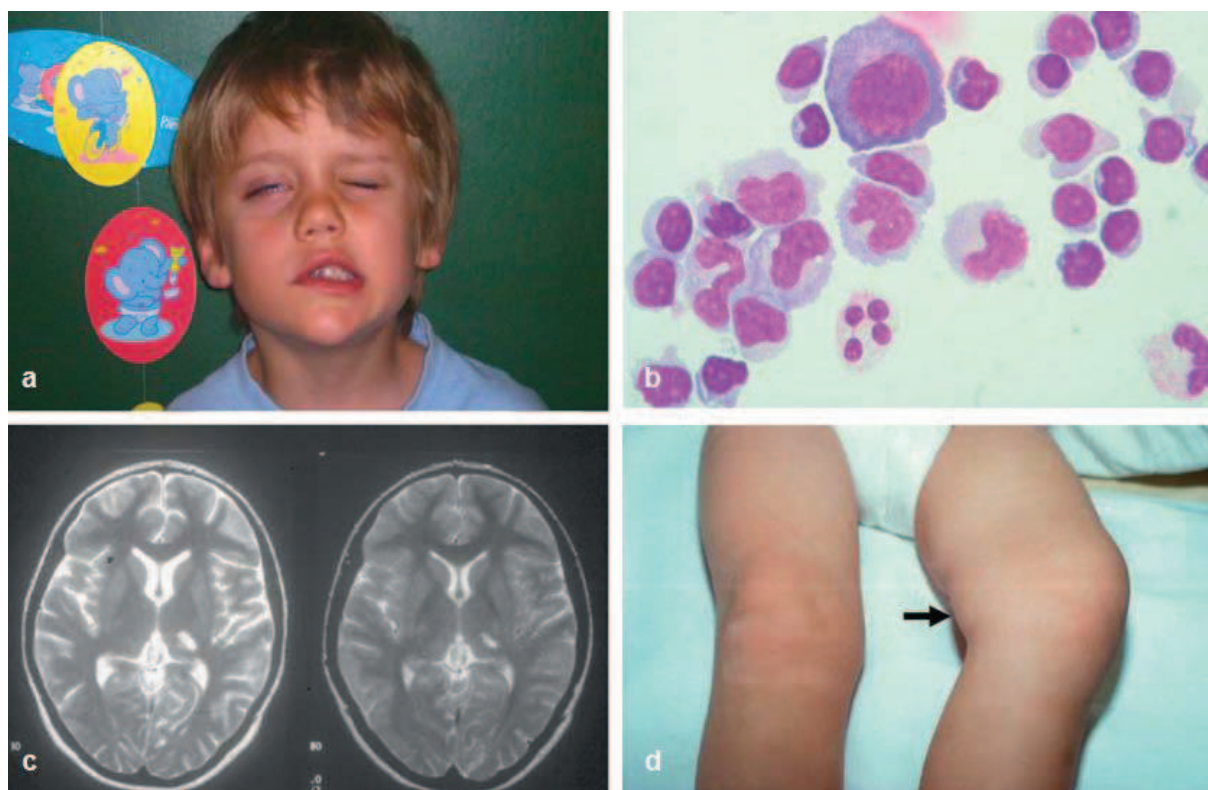
Przewlekłe zanikowe zapalenie skóry (ang. *acrodermatitis chronica atrophicans*, ACA) jest szczególną formą późnej boreliozy, rozwijającą się u pacjentów zakażonych genogatunkiem *B. afzelii* (Ryc. 6). ACA pojawia się wiele lat po zakażeniu, zwykle u osób w podeszłym wieku. Powoli postępujące zmiany są zlokalizowane są na kończynach dolnych. ACA może rozwijać mimo braku jakichkolwiek wcześniejszych oznak i objawów choroby. Początkowa faza zapalna charakteryzuje się niebieskavo-czerwonymi odbarwieniami skóry z ogniskowo występującymi przebarwieniami i obrzękami, zwykle zlokalizowanymi w dystalnych częściach kończyn. Nielezione ACA przechodzi do etapu zanikowego, który charakteryzuje się ścieńczeniem naskórka, uwidaczniającym rozszerzone naczynia krwionośne. Ponadto rozwijać się może neuropatia obwodowa oraz degeneracyjne i zapalne zmiany sąsiednich stawów (Flisiak 2008 [46]; Murray 2010 [92]).

Przewlekła postać boreliozy przebiegającej z zapaleniem stawów charakteryzuje się przetrwałym obrzękiem stawów lub nawracającymi epizodami zapalnymi. Procesy immunologiczne oraz predyspozycje genetyczne odgrywają także ważną rolę w patogenezie tej fazy. Utrzymywanie się zapalenia stawów jest obserwowane pomimo zwalczenia patogenów. Przewlekła neuroborelioza charakteryzuje się przewlekłym postępującym zapaleniem mózgu i rdzenia (częstsze w Europie), zaburzeniami poznawczymi i zaburzeniami pamięci (częstsze w USA) i przewlekłą neuropatią obwodową. W przypadkach wystąpienia zmian w rdzeniu, obserwowany może być niedowład czterokończynowy i / lub kończyn dolnych. Typowe dla boreliozy jest porażenie nerwów mózgowych (dotyczące nerwów VII, VIII i IX-XII). Upośledzenie funkcji poznawczych i pamięci charakteryzuje się zaburzeniem koncentracji i pamięci. Rozwija się ono powoli i może mu towarzyszyć polineuropatia (Biesiada 2010 [10]).



Ryc. 6 Objawy skórne boreliozy: a, b – różne postacie rumienia wędrującego, c – chłoniak limfocytarny, d – zanikowe zapalenie skóry (Nau 2009 [93]).

O zespole poboreliozowym mówimy, gdy objawy utrzymują się dłużej niż 6 miesięcy przebytej terapii choroby. W większości przypadków występują bóle korzeniowe lub układu mięśniowo-szkieletowego, zaburzenia czucia, zaburzenia snu, zaburzenia funkcji neuropoznawczych i chroniczne zmęczenie. Patogeneza zespołu poboreliozowego jest niejasna, niektórzy lekarze kwestionują jego istnienie i sugerują diagnostykę w kierunku zaburzeń psychicznych. Najnowsze badania kontrolowane nie potwierdzają skuteczności antybiotykoterapii w tym przypadku i zalecają leczenie objawowe. U pacjentów z zespołem poboreliozowym obserwowano znaczny efekt placebo (Kaplan 2003 [66]; Marques 2010 [80]).



Ryc. 7 Objawy boreliozy: a – porażenie nerwu twarzonego, b – pleocytoza w płynie mózgowo rdzeniowym, aktywowane limfocyty, monocyty, komórki plazmatyczne i rzadziej neutrofile, c – zapalenie naczyń w mózgu, badanie MRI, obraz T2-zależny, przekrój osiowy mózgu 14-letniej dziewczynki z podostrym niedowładem połowicznym prawostronnym dotyczącym głównie kończyny górnej, pleocytozą płynu mózgowo-rdzeniowego i syntezą przeciwciał przeciwko *Borrelia burgdorferi* w OUN, całkowite ustąpienie objawów po pozajelitowej antybiotykoterapii, MRI w fazie ostrej (prawa strona) oraz kilka miesięcy później (lewa strona), d –zapalenie stawu kolanowego (Nau 2009 [93]).

1.4.2 PATOGENEZA BORELIOZY

Informacje na temat patogenezy boreliozy pochodzą zarówno z badań na zwierzętach jak i badań prowadzonych z udziałem ludzi. Bakterie *B. burgdorferi* wytwarzają białka powierzchniowe (białka Osp), niezbędne do przeżycia krętków w kleszczu oraz w procesie zakażenia u ludzi. Białko OspA, główna lipoproteina bakterii, niezbędne jest do przetrwania krętków w jelicie środkowym przenosiiciela (Czubasiewicz 2013 [31]). Ekspresja tego białka spada w trakcie pobierania pokarmu przez kleszcza, podczas gdy patogeny opuszczają jelita i wędrują do gruczołów ślinowych, a następnie są przekazywane żywicielowi kleszcza. Podczas tego okresu, wzrasta ekspresja białka OspC; sugerowano, że białko OspC może odgrywać rolę w migracji mikroorganizmów i procesie zakażenia. Białko OspC może ułatwiać przenikanie krętków przez skórę i inne tkanki poprzez wiązanie z plazminogenem. Krętki, które krążą wraz z krwią w organizmie żywiciela są odpowiedzialne za obraz kliniczny wczesnej boreliozy (Murray 2010 [80]).

U ludzi z rumieniem wędrującym, nacieki makrofagów i limfocytów T wytwarzają zarówno cytokiny zapalne i przeciwzapalne. Istnieją również dowody na to, że w fazie infekcji rozsianej odpowiedź swoista limfocytów T i B prowadzi do powstawania w węzłach chłonnych przeciwciał rozpoznających wiele różnych komponentów krętka. Podczas rozprzestrzeniania się wewnątrz

ciała człowieka, bakterie przyłączają się do niektórych integryn gospodarza, wywołując odpowiedź prozapalną, która obejmuje produkcję glikozaminoglikanów oraz białek macierzy pozakomórkowej, co może tłumaczyć tropizm patogenów do określonych tkanek (na przykład, włókien kolagenu w macierzy zewnątrzkomórkowej serca, układu nerwowego i stawów) (Guo 1998 [52]).

Badania na modelach zwierzęcych dostarczyły informacji na temat objawów klinicznych i odpowiedzi immunologicznej podczas wczesnej, rozsianej fazy choroby, w tym neuroboreliozy i zapalenia serca. Badania na myszach wykazały, że wrodzona odpowiedź immunologiczna odgrywa ważną rolę w ograniczaniu wczesnej boreliozy. U myszy z deficytami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej (brak ekspresji receptora toll-podobnego 2 lub białka adaptorowego receptora toll-podobnego), po zakażeniu krętkami *B. burgdorferi*, zaobserwowano wyższy poziom bakteriemii oraz cięższy przebieg zapalenia stawów w porównaniu z myszami typu dzikiego (Wooten 2002 [168]). Rola układu dopełniacza w kontrolowaniu zakażenia także została dobrze opisana. U myszy, u których brak składnika C3 liczba krętków po zakażeniu była podwyższona. Ponadto bakterie *B. burgdorferi* wytwarzają specyficzne białka, które hamują aktywność układu dopełniacza, co ułatwia infekcję. W modelowym szczepie myszy z boreliozowym zapaleniem serca, nacieki zarówno makrofagów jak i limfocytów T w sercu wytwarzały cytokiny zapalne. W ograniczaniu infekcji u tych zwierząt, dominujące okazały się komórkowe mechanizmy odpornościowe (Barthold 1997 [6]).

Model zwierzęcy wykorzystujący małpy naczelne został opracowany w celu lepszego opisanie rozwoju infekcji w obrębie układu nerwowego. U małp z immunosupresją poddanych zakażeniu, bakterie *B. burgdorferi* przenikały opony mózgowo-rdzeniowe, włókna ruchowe i czuciowe korzeni nerwowych i brzuszne korzenie nerwowe, ale nie miąższ mózgu. *B. burgdorferi* przenikały również onerwie (tkanka łączna otaczająca pojedyncze pęczki włókien) w obwodowym układzie nerwowym tych małp (Cadavid 2000 [16]).

Badania z udziałem pacjentów z klinicznymi objawami późnej boreliozy, szczególnie zapaleniem stawów potwierdzają obserwacje u zwierząt, że odpowiedź immunologiczna gospodarza odgrywa ważną rolę w patogenezie choroby. Tkanka maziowa pacjentów z boreliozowym zapaleniem stawów zwykle wykazuje przerost błony maziowej, rozrost naczyń krwionośnych i znaczny nacieki komórek jednojądrzastych. Czasami obecne są grudki pseudo-limfatyczne, które przypominają obwodowe węzły chłonne. Podczas ostrego zapalenia stawów w przebiegu boreliozy obserwuje się wrodzoną odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko lipoproteinom *B. burgdorferi*, jak również znaczną swoistą odpowiedź odpornościową. W płynie stawowym obecne są zarówno cytokiny Th1 jak i Th2. Ponadto, u pacjentów z boreliozowym zapaleniem stawów notuje się wyższe miana specyficznych przeciwciał niż u pacjentów z innymi objawami choroby z Lyme. U niektórych dorosłych pacjentów, szczególnie u osób z allelami HLA-DRB1, rozwija się przewlekła, antybiotykooporna postać autoimmunologicznego zapalenia stawów (Murray 2010 [92]).

Podstawową metodą profilaktyki boreliozy jest zmniejszenie ryzyka ukłucia przez kleszcza (sekcja 5.6, *Profilaktyka chorób odkleszczowych i zwalczanie kleszczy*). W przypadku krętków *B. burgdorferi* s.l. kleszcz musi być przyczepiony do skóry żywiciela przez co najmniej 24 godziny, aby nastąpiła efektywna transmisja patogenów. Ryzyko zakażenia zwiększa się wraz z długością czasu ekspozycji człowieka na kleszcza, osiągając w trzecim dniu 100%. Z tego powodu szybkie usunięcie pasożyta jest najlepszą metodą profilaktyki choroby z Lyme (Biesiada 2010 [10]). Szczepionka przeciwko chorobie z Lyme nie jest obecnie dostępna (Murray 2010 [92]).

W większości przypadków borelioza może być skutecznie leczona za pomocą antybiotykoterapii.

2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy była detekcja krętków *B. burgdorferi* s.l. i riketsji *A. phagocytophilum* w kleszczach *I. ricinus*, występujących na terenie województwa pomorskiego (Trójmiasto i okolice). Ponadto, w ramach pracy także ich ilościowe oszacowanie w zakażonych osobnikach przy zastosowaniu metody Real-Time PCR, w zależności od następujących czynników:

- stadium rozwojowego kleszcza;
- sezonowej aktywności kleszczy;
- terenu występowania kleszczy (środowisko o dużej i małej antropopresji);
- rodzaju infekcji (pojedyncza – jednym gatunkiem patogenu lub mieszana – dwoma gatunkami patogenów jednocześnie).

Hipotezą przyjętą w pracy i poddaną weryfikacji był brak zależności pomiędzy odsetkiem zakażonych osobników/intensywnością zakażenia a badanymi czynnikami. Weryfikację hipotezy przeprowadzono za pomocą testów statystycznych parametrycznych i nieparametrycznych.

Uzyskane wyniki pozwoliły na lepsze poznanie epidemiologii boreliozy z Lyme oraz ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej w Polsce.

Dodatkowym celem pracy było opracowanie takiej metody detekcji *B. burgdorferi* s.l. i *A. phagocytophilum* za pomocą techniki duplex Real-Time PCR, która mogłaby być rozszerzona na inne patogeny wektorowane przez kleszcze (tzw. multiplex Real-Time PCR).

3. MATERIAŁY I METODY

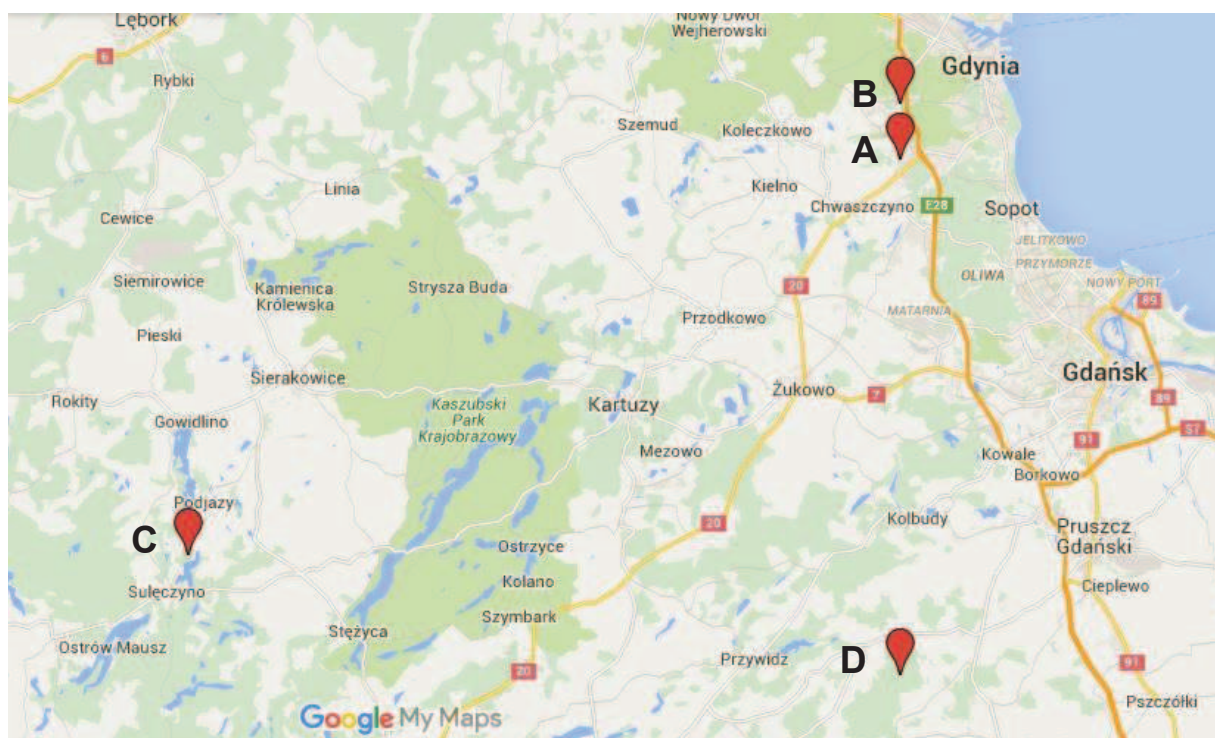
3.1 TEREN BADAŃ

Zbiór kleszczy odbywał się w czterech lokalizacjach o różnej charakterystyce. Dwie lokalizacje znajdowały się na terenie zurbanizowanym w obrębie aglomeracji Trójmiasta na skraju Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego (Gdynia Kolibki oraz Gdynia Chwarzno), dwie pozostałe to tereny wiejskie (Sulęczyno oraz Kleszczewo). Lokalizacje różniły się między sobą zagęszczeniem kleszczy oraz antropopresją. Charakterystyka miejsc zbioru materiału biologicznego podano w Tab. 4.

Tab. 4 Charakterystyka stanowisk zbioru kleszczy.

Lokalizacja	Położenie geograficzne	Okres zbioru	Stopień antropopresji	Charakterystyka stanowiska
Gdynia Kolibki (1)	54°28'5,92" N 18°27'18,98" E	kwiecień – wrzesień 2008/ kwiecień – wrzesień 2009	Wysoki (miejsce zbioru graniczy z torem motocrossowym oraz ogrodami działkowymi, a dalej również osiedlami mieszkalnymi).	Miejsce zbioru kleszczy położone na terenie miasta Gdynia, na obrzeżu mieszanego zagajnika leśnego (głównie sosny i świerki). Zagajnik graniczy z łąką porośniętą trawami i krzewami. Kleszcze były zbierane wzdłuż drogi przylegającej do zagajnika oraz na terenie łąki.
Gdynia Chwarzno (2)	54°29'55,09" N 18°27'18,98" E	maj – wrzesień 2008/ kwiecień – wrzesień 2009	Średni (w pobliżu znajdują się zabudowania, obecność spacerowiczów).	Miejsce zbioru kleszczy położone na obrzeżach miasta Gdynia, wzdłuż drogi gruntowej biegnącej skrajem lasu mieszanego (głównie sosny). Podszyt i runo stosunkowo skąpe.
Sulęczyno (3)	54°15'08,01" N 17° 47'31,67" E	kwiecień – wrzesień 2009	Bardzo wysoki (obecność wczasowiczów, zbieraczy runa leśnego, użytkowników domków letniskowych).	Okolice jeziora Węgorzyno; młodnik mieszany (modrzewie, sosny, brzozy, klony, dęby) z przylegającą drogą dojazdową.
Kleszczewo (4)	54°11'11,37" N 18°27'18" E	kwiecień – wrzesień 2009	Niski (pracownicy leśni, grzybiarze).	Krawędź lasu mieszanego z (głównie świerki), przylegający do asfaltowej szosy oraz pobocza.

Powierzchnia zbioru kleszczy zależała od ukształtowania terenu. W większości stanowisk kleszcze zbierane były wzdłuż dróg lub ścieżek, z wyjątkiem lokalizacji Gdynia Kolibki, która obejmowała również teren łąki położonej na zboczu niewielkiego wzniesienia. Powierzchnia zbioru kleszczy wynosiła ok. 200 – 500 m². Orientacyjne położenie geograficzne poszczególnych miejsc odłowu przedstawiono na mapie (Ryc. 8).



Ryc. 8 Lokalizacja miejsc zbioru kleszczy (czerwone znaczniki) na tle województwa pomorskiego (źródło mapy: www.google.pl/maps).

Poszczególne stanowiska pokazano na poniższych zdjęciach.



Ryc. 9 Dokumentacja fotograficzna miejsc odłowu kleszczy: A – Gdynia Kolibki, B – Gdynia Chwarzno, C - Sulęczyne, D – Kleszczewo (fot. Jan Stańczak).

3.2 ZBIÓR KLESZCZY

Kleszcze zbierano metodą flagowania. Flagę, którą stanowił jasny flanelowy materiał o wymiarach ok. 50-70 cm przymocowany do trzonka, przeciągano po trawie i niskiej roślinności, wzdłuż dróg i wydeptanych ścieżek. Przyczepione do materiału kleszcze ściągano za pomocą pęsety i umieszczano w polipropylenowych probówkach. W laboratorium, kleszcze były uśmiercane przez zanurzenie w gorącej wodzie, a następnie umieszczane osobno w probówkach w roztworze 70% alkoholu etylowego. Przynależność do gatunku i stadium rozwojowe określano na podstawie morfologii kleszcza wg kucza taksonomicznego (Siuda 1993 [127]).

W celu określenia aktywności kleszczy mierzono czas ich odłowu. Sezonową aktywność określano w oparciu o średnią liczbę osobników odłowionych na danym stanowisku w przeliczeniu na jedną osobę w czasie jednej godziny.

3.3 IZOLACJA DNA Z KLESZCZY

Całkowite DNA z kleszczy *I. ricinus* izolowano metodą lizy alkalicznej (Rijpkema 1993 [113]). Kleszcze były osuszane z alkoholu i umieszczane w 1,5 mL probówce typu Eppendorf. Do próbówki dodawano 100 μ L roztworu wodnego amoniaku (0,7 M) a następnie kleszcze były rozgniatane końcówkami do pipet. Zamknięte szczelnie probówki ogrzewano w temp. 100°C przez 15-20 minut w bloku grzewczym. Po tym czasie probówki były otwierane w celu odparowania amoniaku i redukcji objętości. 50 μ L supernatantu przenoszono do nowej próbówki i przechowywano w temp. -20°C w celu dalszej analizy.

Jakość wyizolowanego DNA potwierdzona była metodą PCR przy zastosowaniu starterów 28SF (5'-GACTCTAGTCTGACTCTGTG-3') i 28SR (5'-GCCACAAGCCAGTTATCCC-3') amplifikujących fragment genu 28SrRNA o długości 449 pz (Inokuma 2003 [62]).

3.4 TECHNIKA REAL-TIME PCR

Wszystkie reakcje techniką Real-Time PCR oraz qPCR przeprowadzone były za pomocą urządzenia Mx3005P Real-Time QPCR System (Stratagene, USA). Urządzenie wyposażone zostało w 5 różnych filtrów i pozwala na prowadzenie reakcji w formacie multiplex. W reakcji Real-Time PCR stosowano odczynniki (mieszanki reakcyjne dedykowane do reakcji Real-Time PCR, tzw. MasterMix) firmy A&A Biotechnology (Gdynia) oraz Stratagene (na etapie optymalizacji). Najważniejsze pojęcia stosowane przy analizie danych uzyskiwanych w technice Real-Time PCR opisano w Aneksie do niniejszej pracy.

3.4.1 KONTROLE REAKCJI PCR

Kontrole pozytywne reakcji Real-Time PCR stanowiły plazmidy zawierające powielane fragmenty genów (jedna kopia na plazmidzie).

Wykorzystano komercyjnie dostępnego systemu opartego na plazmidzie pJet 1.1 (Fermentas, USA). System umożliwia bezpośrednie klonowanie produktu reakcji PCR. Docelowe fragmenty genów klonowane były do plazmidu, a następnie komórki *Escherichia coli* TOP10F' (Invitrogen) były transformowane powstałymi konstrukcjami. Selekcja plazmidów z poprawnie wklonowanym fragmentem DNA możliwa jest dzięki obecności na plazmidzie sekwencji kodującej enzym restrykcyjny, który jest letalny dla komórek bakteryjnych. Klonowany fragment przerywa sekwencję genu kodującego enzym, dlatego tylko komórki zawierające prawidłowy konstrukt mogą przeżyć. Ponadto na plazmidzie znajduje się gen odpowiedzialny za odporność na ampicylinę, dlatego selekcja szczepów zawierających docelowy plazmid odbywa się na podłożu z tym antybiotykiem. Proces klonowania był przeprowadzony za pomocą protokołu z wykorzystaniem „lepkich końców” (Manual JET system [78]). W protokole tym klonowany fragment DNA powielany jest za pomocą polimerazy *Taq*, która pozostawia powtórzenia adenozyliny na końcach 3' syntezowanych nici.

Komórki kompetentne przygotowano wg protokołu z użyciem chlorku wapnia. Całonocną hodowlę komórek *E. coli* odmładzano przez dodanie 0,5 mL nocnej hodowli bakterii do 50 mL jałowej pożywki LB. Bakterie hodowano w temperaturze 37 °C do uzyskania odpowiedniej gęstości (ok. 2 godziny). Następnie hodowlę odwirowywano (4000 obr./min., temp. 4 °C, 10 min). Osad bakteryjny zawieszano w 10 mL schłodzonego, jałowego roztworu 0,05 M CaCl₂. Całość inkubowano w łaźni lodowej przez 30 minut, ponownie wirowano i zawieszano w 1 mL zimnego roztworu chlorku wapnia.

Plazmidy były izolowane z hodowli bakteryjnych przy użyciu komercyjnego zestawu Plasmid Mini (A&A Biotechnology, Gdynia). Zestaw ten wykorzystuje zdolność wiązania się DNA do złoża krzemionkowego w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Genomowe DNA oraz białka zostają oddzielone od DNA plazmidowego w procesie precypitacji. W przypadku reakcji qPCR jako standardy posłużyły plazmidy linearyzowane za pomocą enzymów restrykcyjnych.

Liczba kopii DNA w kontrolach pozytywnych oznaczana była na podstawie pomiaru ilości DNA metodą spektrofotometryczną (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Oznaczana była również jakość izolowanego DNA na podstawie stosunku absorpcji badanej próbki DNA przy długości fali 260/280 nm.

Liczba kopii dwuniciowego DNA wyznaczana była na podstawie wzoru:

$$\text{liczba kopii plazmidu} = \frac{\text{ilość DNA [ng]} * 6,0221 \times 10^{23} \text{ [cząsteczek/mol]}}{(\text{długość cząsteczki DNA} * 660 \text{ [g/mol]}) * 1 \times 10^9 \text{ [ng/g]}}$$

Kontrole ujemne i pozytywne były przygotowywane razem z próbkami testowanymi i badane podczas każdego eksperymentu. W przypadku detekcji patogenów stosowano pojedyncze kontrole dodatnie, w przypadku ilościowego oznaczania patogenów na bazie kontroli pozytywnych sporządzano krzywą standardową w trzech powtórzeniach na każdej płytce 96-dołkowej.

W przypadku kontroli negatywnych, zamiast izolowanego DNA wykorzystywano dodawano do próbki wodę.

3.4.2 DETEKCJA ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM / BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO

Detekcję patogenów w próbkach kleszczy wykonywano za pomocą techniki Real-Time PCR. Stosowano dwie metody, które pozwalają na jednoczesną detekcję obu gatunków mikroorganizmów w jednej mieszaninie reakcyjnej (tzw. Duplex Real-Time PCR). Stosowane oligonukleotydy były oczyszczane metodą HPLC. Reakcje przygotowano w probówkach o objętości 200 μ L. Stosowano standardowe warunki temperaturowe dla technik opartych o startery typu TaqMan: 10 min – 95°C (denaturacja wstępna), a następnie 40 cykli: 15 s – 95°C + 60 s – 60°C (przyłączanie starterów i wydłużanie).

Pierwsza metoda została opracowana przez Courtney i wsp. (2004) [29]. Użyto sondy typu TaqMan znakowane barwnikami fluorescencyjnymi. Amplifikowano fragment genu 23S rRNA *B. burgdorferi* s.l. o długości 75 pz, za pomocą starterów Bb23Sf 5'-CGAGTCTTAAAAGGGCGATTTAGT-3' oraz Bb23Sr 5'-GCTTCAGCCTGGCCATAAATAG-3', sekwencja sondy Bb23Sp-FAM 5'-FAM-AGATGTGGTAGACCCGAAGCCGAGTG-TAMRA-3' oraz fragment genu *msp2* *A. phagocytophilum* o długości 77 pz za pomocą starterów ApMSP2f 5'-ATGGAAGGTAGTGTGGTTATGGTATT-3' oraz ApMSP2r 5'-TTGGTCTTGAAGCGCTCGTA-3', sekwencja sondy ApMSP2p-HEX 5'-HEX-TGGTGCCAGGGTTGAGCTTGAGATTG-TAMRA-3'.

Druga metoda została opracowana na potrzeby tej pracy. Opracowano zestaw starterów oraz sond typu TaqMan, które pozwalają na detekcję *A. phagocytophilum* oraz *B. burgdorferi* s.l. a także *B. miyamotoi* próbkach DNA izolowanych z kleszczy. Opracowanie metody składało się z kilku etapów.

Pierwszym etapem był wybór odpowiednich genów jako celów molekularnych. Pod uwagę wzięto zarówno opisane dotychczas w literaturze metody detekcji patogenów należących do gatunku *A. phagocytophilum* i *B. burgdorferi*, jak i sekwencje różnych genów zdeponowane w banku genów GenBank. Podczas projektowania starterów i sond przeznaczonych do wykrywania poszczególnych patogenów w kleszczach brano pod uwagę fragmenty genów, które umożliwiały detekcję danego gatunku lub grupy gatunków o wysokim stopniu zakonserwowania, dzięki czemu możliwa jest detekcja danego mikroorganizmu bez względu na zmienność w obrębie jednego gatunku.

Kolejnym etapem było zaprojektowanie odpowiednich starterów i sond, przy użyciu programu Beacon Designer™, który umożliwia wybór oligonukleotydów o optymalnych parametrach fizykochemicznych (odpowiednie temperatury topnienia, minimalny potencjał tworzenia struktur drugorzędowych). W celu wykrywania obu badanych patogenów w próbce jednocześnie opracowano układ umożliwiający detekcję *Borrelia* spp. i *A. phagocytophilum*, który mógłby być następnie rozszerzony o kolejne cele molekularne - *Rickettsia* spp. oraz *Babesia* spp. (por. Aneks). Amplifikowano fragment genu 23S rRNA *B. burgdorferi* s.l. o długości 123 pz, za pomocą starterów

Bb23S-f, Bb23S-r i sondy Bb23S-p oraz fragment genu 16SrRNA *A. phagocytophilum* o długości 97 pz za pomocą starterów Aph16S-f, Aph16S-r i sondy Aph16S-p (Tab. 5).

Tab. 5 Sekwencje starterów oraz sond umożliwiających detekcję *Borrelia* spp. i *A. phagocytophilum*.

Patogen/ amplifikowany gen	Nazwa startera/sondy	Sekwencja 5'→3'	Długość amplikonu
<i>A. phagocytophilum</i> 16S rRNA	Aph16S-f	CGGGAGAGGATAGCGGAATTC (21 pz)	97 pz
	Aph16S-r	CGTCAGTACCGGACCAGATAG (21 pz)	
	Aph16S-p	CY5-CGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC-BHQ3 (24 pz)	
<i>Borrelia</i> spp. 23S rRNA	Bb23S-f	ACTTTTCAGCTTTGCCTTAGGG (22 pz)	123 pz
	Bb23S-r	GTGAGAATGCAGGTATGAGTAACG (24 pz)	
	Bb23S-p	ROX-CCGACTAACCTGGGAAGACGACCTTTAC-BHQ2 (29 pz)	

Dla powielanych fragmentów przeprowadzono analizę możliwych reakcji krzyżowych z pozostałymi badanymi patogenami oraz innymi potencjalnie mogącymi wystąpić w badanych próbkach mikroorganizmami.

Metoda została zoptymalizowana pod względem stężeń poszczególnych oligonukleotydów. W celu wyboru odpowiednich optymalnych odczynników porównano przebieg reakcji Real-Time PCR przygotowanych za pomocą odczynników firmy A&A Biotechnology oraz Stratagene na wybranych próbkach (izolaty kleszczy *I. ricinus*).

Stosowano standardowe warunki temperaturowe dla technik opartych o startery typu TaqMan: 10 min – 95°C (denaturacja wstępna), a następnie 40 cykli: 15 s – 95°C + 60 s – 60°C (przyłączenie starterów i wydłużanie).

3.4.3 ILOŚCIOWE OZNACZANIE PATOGENÓW

Za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative PCR*, qPCR) można oszacować wyjściową liczbę kopii powielanego fragmentu DNA w badanej próbce (Tyburski 2008 [149]). W pracy wykorzystano metodę z wykorzystaniem krzywej standardowej. Krzywe standardowe przygotowano korzystając z seryjnych rozcieńczeń kontroli pozytywnych. Reakcje ilościowego oznaczania patogenów w próbce wykonywano osobno dla krętków *Borrelia* spp. oraz riketsji *A. phagocytophilum*.

W przypadku krętków *Borrelia* użyte zostały startery opisane przez Courtney i wsp. (2004) [29] (sekcja 3.4.2), amplifikujące fragment genu 23S rRNA, który występuje na genomie w dwóch kopiach. W ramach dodatkowych analiz przeprowadzono badania ilościowe we współpracy z niezależnym laboratorium za pomocą zaprojektowanych starterów Bb23S-f, Bb23S-r, Bb23S-p i porównano z wynikami uzyskanymi za pomocą starterów opisanych w piśmiennictwie.

W przypadku oznaczania liczby *A. phagocytophilum* użyto zaprojektowane startery i sondę Aph16S-f, Aph16S-r i Aph16S-p, ze względu na fakt, że w przeciwieństwie do genu *msp2*, liczba kopii genu 16S rRNA jest znana (pojedyncza kopia na genomie). Krzywe standardowe były liniowe w zakresie minimum 5 rzędów rozcieńczeń.

3.5 ANALIZA RESTRYKCYJNA

Analiza długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) jest metodą inżynierii genetycznej, w której fragment DNA trawi się za pomocą jednego lub kilku enzymów restrykcyjnych, a następnie rozdziela za pomocą elektroforezy. W zależności od sekwencji fragmentu DNA uzyskuje się różny układ prążków. Część uzyskanych dodatnich próbek, wykazujących obecność DNA krętków *Borrelia* poddana została amplifikacji ze starterami zewnętrznymi 132f i 905r, a następnie wewnętrznymi 220f i 824r, specyficznymi dla fragmentu genu *fla*. Następnie wykonana została analiza restrykcyjna uzyskanego fragmentu o długości 605 pz (Wodecka 2007 [164]). W reakcji RFLP wykorzystany został enzym restrykcyjny *DdeI* (Promega), stężenie 10U/μl, 10x stężony bufor D oraz albumina bydlęca (BSA).

Miejsce cięcia dla enzymu *DdeI*:

5'...C ^ T N A G...3'

3'...G A N T ^ C...5'

3.6 SEKWENCJONOWANIE

Wybrane fragmenty genu *fla* *Borrelia* spp., flankowane za pomocą starterów 220f i 824r (sekcja 3.5) oraz fragment genu 16S rRNA *A. phagocytophilum*, flankowane starterami ge9f i ge2 (Massung 1998 [82]), były sekwencjonowane metodą kontrolowanej terminacji łańcucha (metoda Sanger) przy użyciu sekwenatora ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), zgodnie z protokołem producenta. Uzyskane sekwencje były analizowane za pomocą narzędzia BLAST (sekcja 3.8).

3.7 ANALIZA STATYSTYCZNA

Analiza statystyczna wyników przeprowadzona została z wykorzystaniem Microsoft Excel z pakietu Microsoft Office 2010 oraz narzędzi dostępnych on-line (programy wymienione w sekcji 3.8 Oprogramowanie).

Do oceny wyników jakościowych posłużono się testem X^2 . W przypadku małych liczebności obserwowanych (< 10) stosowano poprawkę Yatesa.

W przypadku wyników ilościowych uzyskane wyniki poddano transformacji logarytmicznej, w celu spełnienia założeń dla testów parametrycznych (rozkład, jednorodność wariancji). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z analizą *post hoc* (dwustronny test t dla prób

zakładający równe wariancje), w przypadku wykazania różnic pomiędzy grupami. W analizie *post hoc*, w celu minimalizacji ryzyka otrzymania wyników fałszywie pozytywnych wykorzystano poprawkę Bonferroniego.

Dla danych, które nie spełniały założeń dla testów parametrycznych posłużono się testem Kruskala-Wallisa lub testem U Manna-Whitneya.

Wartości $p \leq 0,05$ były uznawane za istotne statystycznie.

3.8 OPROGRAMOWANIE

W pracy użyte zostało następujące oprogramowanie:

Finch TV, wersja 1.4.0. (Geospiza Inc.) – oprogramowanie umożliwiające wyświetlanie chromatogramów powstałych w wyniku sekwencjonowania DNA (darmowa licencja) <http://www.geospiza.com/ftvdlinfo.html>.

BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) – narzędzie bioinformatyczne służące do przyrównywania sekwencji nukleotydów DNA z sekwencjami zdeponowanymi w banku genów GenBank narzędzie dostępne on-line: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

BankIt – narzędzie on-line bioinformatyczne służące do zamieszczania uzyskanych sekwencji DNA w banku genów GenBank.

Beacon Designer™ - oprogramowanie umożliwiające projektowanie starterów oraz sond molekularnych do reakcji PCR (Premier Biosoft) <http://www.premierbiosoft.com>.

CodonCode Aligner – program umożliwiający między innymi dopasowanie sekwencji DNA, edycję, i wykrywanie mutacji, wersja demo (<http://www.codoncode.com/aligner/>).

CLC Sequence Viewer 7.6.1. – generowanie filogramów, wersja darmowa.

Narzędzia analizy statystycznej dostępne on-line:

Kalkulator χ^2 - Calculation for the Chi-Square Test – narzędzie online do analizy statystycznej za pomocą testu χ^2 (<http://www.quantpsy.org/chisq/chisq.htm>) (Preacher 2001 [105]).

Kalkulator rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka), dostępny na stronie: <http://scistatcalc.blogspot.com>.

Kalkulatory testów nieparametrycznych dostępne na stronach <http://www.socscistatistics.com> oraz <http://www.mathcracker.com>.

W pracy korzystano również z pakietu programu Microsoft Excel z pakietu Microsoft Office 2010 (ANOVA, test t), również w celu sporządzania wykresów.

4. WYNIKI

4.1. DUPLEX REAL-TIME PCR W DETEKCY PATOGENÓW W KLESZCZACH

W piśmiennictwie naukowym opisano wiele technik umożliwiających detekcję patogenów wektorowanych przez kleszcze *I. ricinus*, a wraz z rozwojem technik molekularnych opisywane są nowe metody o wyższej czułości i selektywności. Jednym z celów pracy było zaproponowanie metod opartych na technice Real-Time PCR do detekcji wybranych patogenów w stawonogach. Na podstawie dostępnych danych zaprojektowano układy umożliwiające detekcję poszczególnych mikroorganizmów w kleszczach za pomocą techniki Real-Time PCR.

4.1.1 CELE MOLEKULARNE

Wybrane geny, które mogłyby posłużyć jako cele molekularne wraz ze stopniem pokrewieństwa wśród blisko wybranych gatunków w obrębie danego rodzaju zestawiono w Tab. 6.

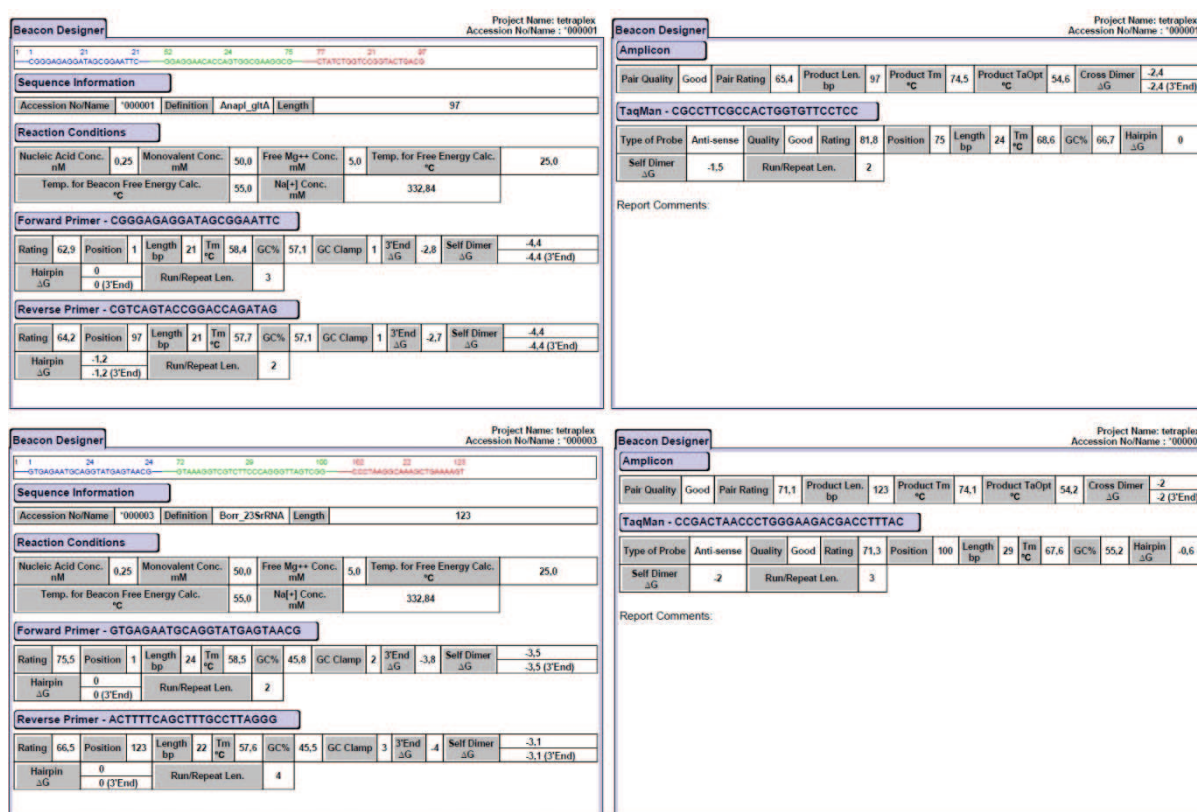
Tab. 6 Porównanie sekwencji genów w obrębie wybranych gatunków. Brak podobieństw – nałożenie sekwencji (ang. query coverage) < 25%, *w przypadku danego gatunku podano zakres podobieństwa na podstawie sekwencji zdeponowanych w banku genów GenBank.

Gen Gatunek	16SrRNA	groEL	p44/msp2	AnkA
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> *	98-100%	95-100%	70-100%	93-100%
<i>Anaplasma marginale</i>	96%	78%	76%	brak podobieństw
<i>Anaplasma centrale</i>	96%	77%	76%	brak podobieństw
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	93%	75%	brak podobieństw	brak podobieństw
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	85%	65%	-	brak podobieństw
<i>Neorickettsia risticii</i>	85%	66%	-	brak podobieństw
Gen Gatunek	16S rRNA	23S rRNA	fla	OspA
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	100%	100%	100%	100%
<i>Borrelia afzelii</i>	99%	99%	95%	Nie znaleziono
<i>Borrelia garinii</i>	99%	99%	94%	87%
<i>Borrelia valaisiana</i>	99%	99%	94%	86%
<i>Borrelia lusitaniae</i>	99%	95%	95%	Nie znaleziono
<i>Borrelia miamotoi</i>	96%	95%	84%	Nie znaleziono
<i>Borrelia recurrentis</i>	97%	95%	85%	Nie znaleziono
<i>Borrelia duttoni</i>	97%	95%	85%	Nie znaleziono

Biorąc pod uwagę powyższe zestawienie można stwierdzić, że najbardziej zakonserwowane są geny kodujące cząsteczki rRNA. Geny te są także często wykorzystywane w badaniach molekularnych i sekwencjonowane. Dla zaproponowanego układu wybrano gen 23S rRNA (*B. burgdorferi* s.l.) oraz gen 16SrRNA dla *A. phagocytophilum*. W przypadku kompleksu *B. burgdorferi* s.l. rozważano także gen *fla* również wysoko zakonserwowany w obrębie rodzaju *Borrelia*, jednak ostatecznie lepsze parametry oligonukleotydów uzyskano w przypadku genu 23S rRNA.

4.1.2 STARTERY I SONDY

Zaprojektowane startery oraz sondy przedstawione są na Ryc. 10.



Ryc. 10 Sekwencje oraz właściwości fizyko-chemiczne starterów oraz sond molekularnych użytych w celu detekcji *Anaplasma phagocytophilum* i *Borrelia burgdorferi* s.l. w kleszczach *Ixodes ricinus*.

Zbadano możliwość krzyżowych reakcji z DNA kleszczy *Ixodes ricinus*, a także DNA mikroorganizmów z rodzaju *Coxiella*, *Salmonella*, *Francisella*, *Listeria*, *Bartonella* i *Theileria*, które były wykrywane w kleszczach. Zbadano również możliwość reakcji krzyżowych z bakteriami należącymi do rodzaju *Escherichia* i *Staphylococcus*, które mogłyby stanowić zanieczyszczenie próbek pochodzące ze środowiska. Wyniki analizy przedstawiono w Tab. 7.

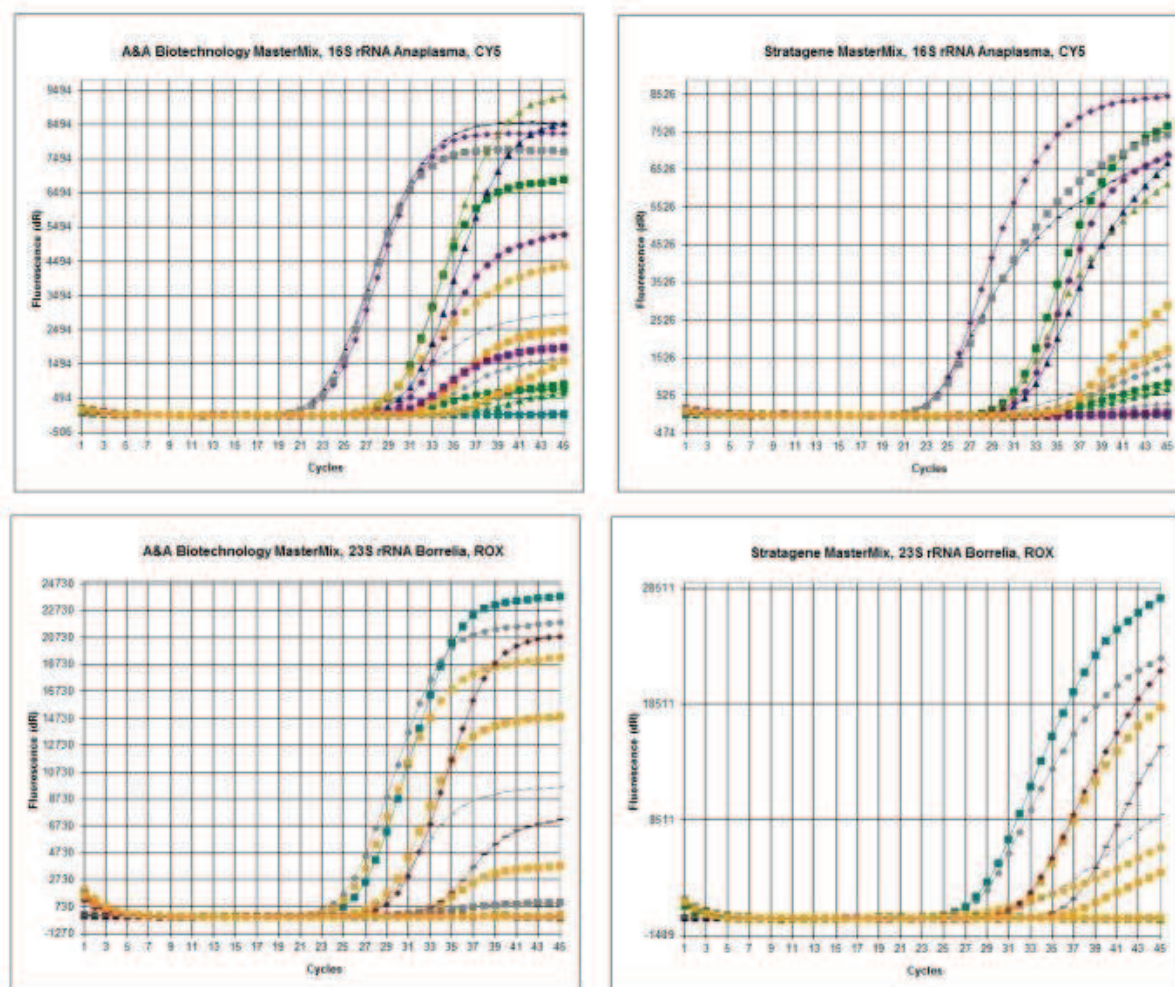
Tab. 7 Analiza reakcji krzyżowych wybranych fragmentów genów z wybranymi mikroorganizmami, procent podobieństwa sekwencji (*Anaplasma* i *Borrelia*).

Rodzaj	Aph16S-p	Bb23S-p
<i>Ixodes ricinus</i> (taxid:34613)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Coxiella burnetti</i> (taxid:777)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Salmonella enteritidis</i> (taxid:149539)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Francisella tularensis</i> (taxid:263)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Listeria monocytogenes</i> (taxid: 1639)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Theileria mutans</i> (taxid: 27991)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Bartonella vinsonii</i> (taxid: 33047)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Escherichia coli</i> (taxid: 562)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (taxid: 1282)	Nie znaleziono	Nie znaleziono

Przedstawione powyżej wyniki wykazały, że ryzyko reakcji krzyżowych jest niskie.

4.1.3 OPTIMALIZACJA REAKCJI REAL-TIME PCR

Dla reakcji Real-Time PCR, dostępne są komercyjnie odczynniki typu, tzw. MasterMix, zawierające niezbędne składniki reakcji PCR, łącznie z buforem, nukleotydami oraz polimerazą. Mieszanki MasterMix wymagają zwykle dodania jedynie starterów oraz sond molekularnych i rozcieńczenia jałową wodą do odpowiedniej objętości. Porównanie dwóch komercyjnie dostępnych odczynników przedstawione jest na wykresach (Ryc. 11). W przypadku odczynników A&A Biotechnology obserwowano niższe wartości C_t dla tych samych próbek oraz szybszy wzrost fluorescencji, co sugeruje, że reakcja przebiegała w tym przypadku z wyższą wydajnością. W związku z powyższym, do wykonywanych oznaczeń wybrano odczynniki tej firmy.



Ryc. 11 Porównanie mieszanin MasterMix A&A Biotechnology (lewa kolumna) oraz Stratagene (prawa kolumna) (*Anaplasma* i *Borrelia*).

Sprawdzano również wpływ stężeń stosowanych nukleotydów na przebieg reakcji Real-Time PCR. Wraz ze wzrostem stężenia sond obserwowano wyższe wartości fluorescencji, jednak nie obserwowano wpływu na wartość C_t . Nie zaobserwowano wyraźnego wpływu stężenia starterów na przebieg reakcji Real-Time PCR. Do analiz wybrano objętości starterów 0,4 μ L oraz objętości sond 0,2 μ L o stężeniu 10 μ M.

Stosowanie starterów i sond łącznie nie miało wpływu na przebieg reakcji Real-Time PCR, w stosunku do amplifikacji poszczególnych fragmentów genów oddzielnie. Współczynniki korelacji R^2 dla otrzymywanych krzywych standardowych wynosiły >0,95. Wartości średnie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych celów molekularnych zestawiono w Tab. 8.

Tab. 8 Porównanie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych starterów i sond.

	Anaplasma, 16S rRNA	Borrelia, 23S rRNA
Czułość reakcji PCR	5,4 kopie	2,3 kopii
Wydajność reakcji (E)	105,5%	92,3%

Powyższe wyniki potwierdzają przydatność zaprojektowanych starterów oraz sond w detekcji oraz ilościowym oznaczaniu patogenów w kleszczach *Ixodes ricinus*. Podczas optymalizacji reakcji PCR korzystano z plazmidów nie poddanych linearyzacji. Informacje na temat wpływu postaci matrycy DNA na wydajność reakcji znajduje się w sekcji 5.1.

4.2. SEZONOWA AKTYWNOŚĆ *IXODES RICINUS*

W okresie od 2008 do 2009 r., w czterech lokalizacjach zebrano łącznie 2 555 kleszcze. Wszystkie należały do gatunku *I. ricinus*. Liczby odłowionych osobników na poszczególnych stanowiskach przedstawiono w Tab. 9.

Tab. 9 Liczby kleszczy zebranych w poszczególnych stanowiskach i latach. W nawiasach podano procentowy udział poszczególnych stadiów rozwojowych w odłowionych kleszczach na danym stanowisku.

Rok	Stadium rozwojowe	Stanowisko				Łącznie
		Kolibki	Chwarzno	Sulęczyno	Kleszczewo	
2008	Samice	209 (37,2%)	176 (42,7%)			385 (39,6%)
	Samce	213 (38,0%)	180 (43,7%)			393 (40,4%)
	Nimfy	139 (24,8%)	56 (13,6%)			195 (20,0%)
	Larwy	0	0			0 (0%)
Łącznie rok 2008		561	412			973
2009	Samice	204 (29,5%)	46 (26,0%)	144 (34,2%)	72 (24,7%)	466 (29,5%)
	Samce	239 (34,5%)	35 (19,8%)	119 (28,3%)	65 (22,3%)	458 (29,0%)
	Nimfy	214 (30,9%)	79 (44,6%)	158 (37,6%)	138 (47,3%)	589 (37,2%)
	Larwy	35 (5,1%)	17 (9,6%)	0 (0%)	17 (5,8%)	69 (4,4%)
Łącznie rok 2009		692	177	421	292	1582
2008 - 2009	Samice	413 (33,0%)	222 (37,7%)	144 (34,2%)	72 (24,7%)	851 (33,3%)
	Samce	452 (36,1%)	215 (36,5%)	119 (28,3%)	65 (22,3%)	851 (33,3%)
	Nimfy	353 (28,2%)	135 (22,9%)	158 (37,6%)	138 (47,3%)	784 (30,7%)
	Larwy	35 (2,8%)	17 (2,9%)	0 (0%)	17 (5,8%)	69 (2,7%)
Łącznie lata 2008-2009		1253	589	421	292	2 555

Liczby odłowionych samców oraz samic były jednakowe. Postacie dorosłe stanowiły 66,6% wszystkich kleszczy. Nimfy stanowiły 30,1% zbioru, natomiast larwy jedynie 2,7% ogółu odłowionych osobników.

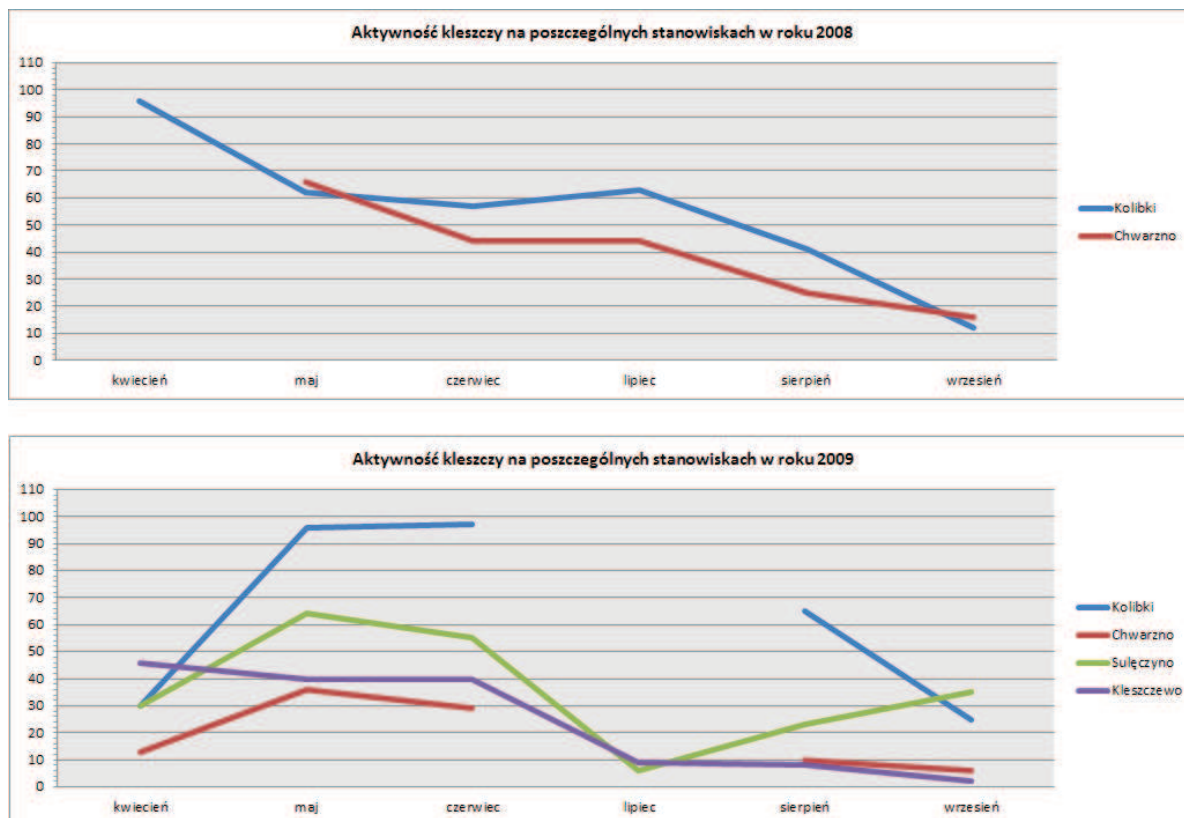
Na podstawie liczby zebranych kleszczy oznaczano ich sezonową aktywność, która stanowi pośredni wskaźnik zagrożenia atakiem kleszcza na danym terenie. Zbiorcze dane liczby zebranych osobników w danym stanowisku wraz z czasem zbioru podano w Tabeli 10.

Tab. 10 Aktywność kleszczy *Ixodes ricinus* na poszczególnych stanowiskach.

Rok	Liczba zebranych kleszczy/czas/osobę			
	Stanowisko			
	Kolibki	Chwarzno	Sulęczyno	Kleszczewo
2008	56/h/osobę	41/h/osobę	46/h/osobę	30/h/osobę
2009	63/h/osobę	24/h/osobę		

Aktywność kleszczy w poszczególnych miesiącach przedstawiono na Ryc. 12.

Przy ocenie względnej aktywności kleszczy na danym terenie posłużono się 5-cio stopniową skalą zaproponowaną przez Supergan (2009) [138], wg której zagrożenie atakami kleszczy definiowane jest jako: bardzo wysokie (>50 kleszczy/h), wysokie (26 -50 kleszczy/h), średnie (11 – 25 kleszczy/h), ograniczone (4 – 10 kleszczy/h) oraz niskie (1 – 3 kleszczy/h).



Ryc. 12 Aktywność kleszczy na poszczególnych stanowiskach od kwietnia do września. Oś Y – liczba odłowionych kleszczy/godzinę/osobę.

Średnia liczba odłowionych stawonogów w jednostce czasu zależała zarówno od miejsca zbioru (charakteru siedliska), jak i pory roku. Zagrożenie atakami kleszczy wahało się od średniego do wysokiego. Najwyższe było w miesiącach kwiecień-maj (rok 2008) oraz maj-czerwiec (rok 2009) i utrzymywało się na wysokim poziomie zwykle aż do sierpnia. W 2009 r. odnotowano wyraźny spadek aktywności kleszczy w lipcu, który związany był z warunkami atmosferycznymi (wysokie temperatury, niska wilgotność). W większości przypadków w sierpniu aktywność kleszczy zaczynała spadać w stosunku do poprzednich miesięcy, aby we wrześniu osiągnąć najniższy poziom. Oprócz stanowiska w Sulęczyńnie, nie obserwowano kolejnego pików aktywności kleszczy we wrześniu.

4.3. DETEKcja *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO*

Krętki *B. burgdorferi* s.l. stwierdzono ogółem u 28,5% odłowionych i zbadanych kleszczy. Poziom zakażenia *I. ricinus* ulegał zmianom w zależności od stanowiska zbioru, jak i stadium rozwojowego kleszcza (Tab. 11).

Tab. 11 Zakażenie kleszczy *I. ricinus* krętkami *Borrelia* na poszczególnych stanowiskach odłowu.

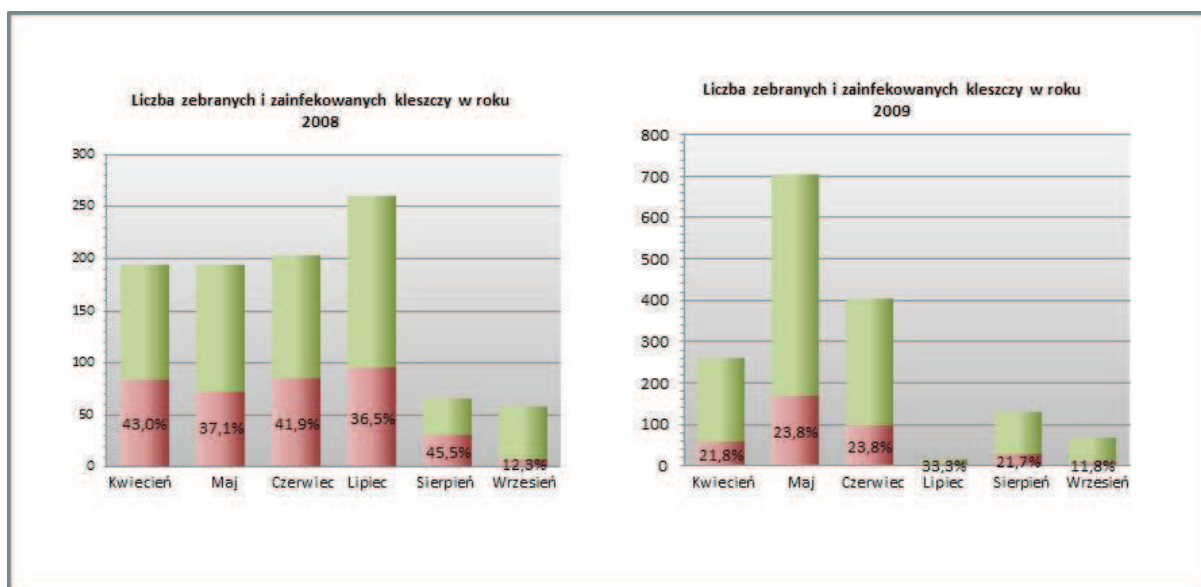
Rok	Stadium rozwojowe	Bezwzględna liczba zainfekowanych kleszczy (% odłowionych osobników)				Łącznie
		Stanowisko				
		Kolibki	Chwarzno	Sulęcyno	Kleszczewo	
2008	Samice	102 (48,8%)	66 (37,5%)			168 (43,6%)
	Samce	94 (44,1%)	70 (38,9%)			164 (41,7%)
	Nimfy	30 (21,6%)	10 (17,9%)			40 (20,5%)
	Larwy					
Łącznie rok 2008		226 (40,3%)	146 (35,4%)			372 (38,2%)
2009	Samice	73 (35,8%)	16 (34,8%)	18 (12,5%)	18 (25,0%)	125 (26,8%)
	Samce	99 (41,4%)	12 (34,3%)	20 (16,8%)	12 (18,5%)	143 (31,2%)
	Nimfy	30 (14,0%)	19 (24,1%)	24 (15,2%)	21 (15,2%)	94 (16,0%)
	Larwy	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)
Łącznie rok 2009		202 (29,2%)	47 (26,6%)	62 (14,7%)	51 (17,5%)	362 (22,9%)
2008 - 2009	Samice	175 (42,4%)	82 (36,9%)	18 (12,5%)	18 (25,0%)	293 (34,4%)
	Samce	193 (42,7%)	82 (38,1%)	20 (16,8%)	12 (18,5%)	307 (36,1%)
	Nimfy	60 (17,0%)	29 (21,5%)	24 (15,2%)	21 (15,2%)	134 (17,1%)
	Larwy	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)
Łącznie lata 2008-2009		428 (34,2%)	193 (32,8%)	62 (14,7%)	51 (17,5%)	734 (28,7%)

4.3.1 WYSTĘPOWANIE *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* W ZALEŻNOŚCI OD STADIUM ROZWOJOWEGO KLESZCZA

Wśród ogólnej liczby odłowionych kleszczy znajdowało się ponad dwa razy więcej osobników dorosłych (851 samic i 851 samców) niż nimf (784 osobniki). Ponadto zebrano 69 larw. Poziom zakażenia krętkami *Borrelia* u postaci dorosłych (35,3%) był znacząco wyższy niż u nimf (17,1%), $p < 0.01$. Podobny rozkład zakażeń był obserwowany w większości stanowisk, z wyjątkiem Sulęcyna, gdzie nie obserwowano różnicy w odsetku zakażonych osobników dorosłych (21,9%) oraz nimf (15,2%), $p = 0,15$. Nie zidentyfikowano infekcji wśród larw.

4.3.2 WYSTĘPOWANIE *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* W KLESZCZACH W CZASIE I PRZESTRZENI

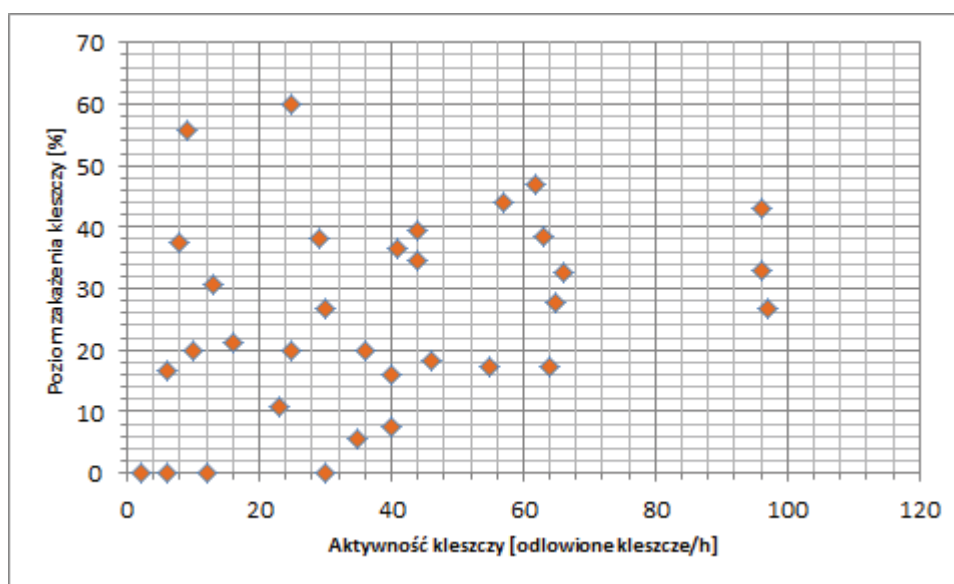
Na wykresie poniżej (Ryc. 13) przedstawiono poziom zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* na przestrzeni lat 2008 i 2009, od kwietnia do września, na tle liczby odłowionych osobników.



Ryc. 13 Liczba kleszczy *I. ricinus* niezainfekowanych (zielony) i zakażonych krętkami *Borrelia sp.* (czerwony) w latach 2008 i 2009. Na wykresach podano odsetek zainfekowanych kleszczy.

W okresie kwiecień – sierpień ogólny poziom zakażenia kleszczy utrzymywał się na podobnym poziomie, tj. w zakresie 36,5% - 45,5% w 2008 r. oraz 21,7% - 33,3% w 2009 r. (brak istotnych różnic pomiędzy odsetkiem zakażonych kleszczy w poszczególnych miesiącach, $p > 0,4$). W obu latach zauważono tendencję spadkową pod koniec okresu zbioru kleszczy (wrzesień), kiedy odsetek zakażonych osobników osiągnął najniższy poziom, odpowiednio 12,8% i 11,8% (różnice istotne statystycznie jedynie w roku 2008, $p < 0,01$, różnice nieistotne statystycznie w roku 2009, $p = 0,26$).

Analiza korelacji pomiędzy aktywnością kleszczy a odsetkiem osobników zainfekowanych krętkami *Borrelia* nie wykazała istotnych statystycznie zależności. Na Ryc. 14 zestawiono aktywność kleszczy w poszczególnych miesiącach z podziałem na stanowiska wraz z odsetkiem zainfekowanych kleszczy, które zostały odłowione w danym miejscu i czasie ($R^2 < 0,1$). Analiza korelacji Pearsona przeprowadzono zbiorczo dla średnich aktywności kleszczy w ciągu roku na poszczególnych stanowiskach również nie wykazała zależności pomiędzy aktywnością kleszczy a poziomem zakażenia pajęczaków ($R^2 < 0,2$).

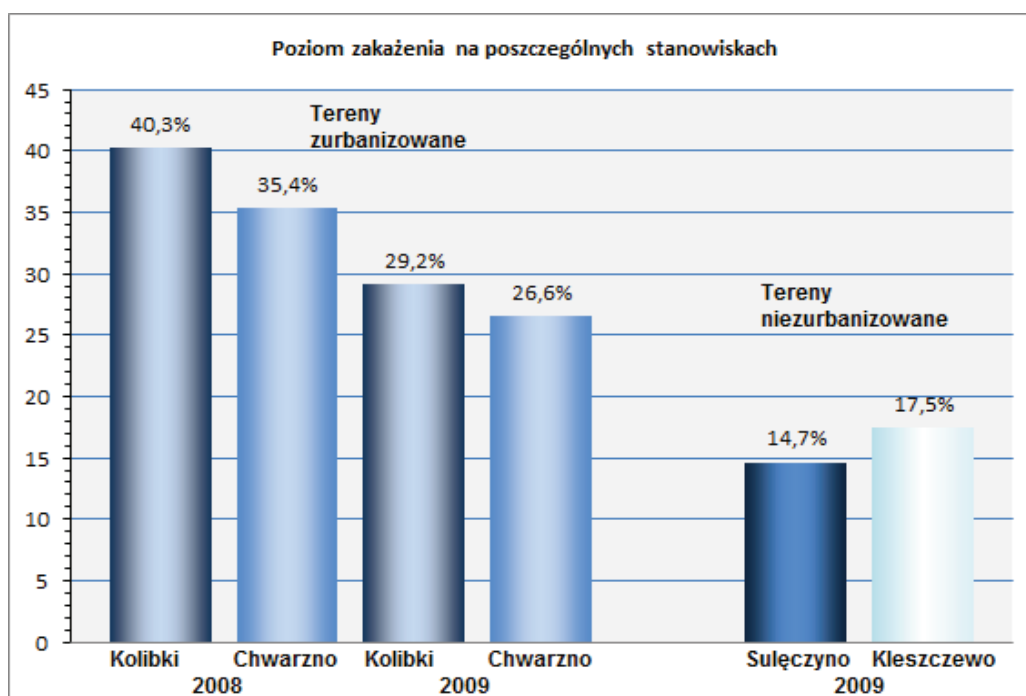


Ryc. 14 Zależności pomiędzy aktywnością kleszczy (oś X) i poziomem zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* spp.(oś Y).

4.3.3 WYSTĘPOWANIE *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* W KLESZCZACH ZALEŻNOŚCI OD TERENU ODŁOWU

Szczegółową charakterystykę miejsc zbioru kleszczy podano w sekcji 3.1, *Teren badań*. Wszystkie stanowiska położone były na terenie województwa pomorskiego. Poszczególne stanowiska zbioru różniły się pomiędzy sobą zarówno charakterem (tereny miejskie – Gdynia Kolibki, Gdynia Chwarzno oraz tereny wiejskie/leśne – Sulęczytno, Kleszczewo). Stanowiska różniły się również stopniem antropopresji. Stanowiska o najwyższym stopniu antropopresji to Sulęczytno i Gdynia Kolibki, średni stopień antropopresji można zaobserwować w Gdyni Chwarznie, a najniższy na stanowisku w Kleszczewie. Odsetek zakażonych kleszczy w poszczególnych stanowiskach przedstawiono na wykresie (Ryc. 15).

Najwyższy odsetek zainfekowanych *I. ricinus* zaobserwowano na stanowisku Kolibki (40,3%) i Chwarzno (35,4%) w roku 2008. Jednocześnie poziom zakażenia na obu tych stanowiskach był istotnie wyższy niż w roku 2009 r. ($p < 0,05$).



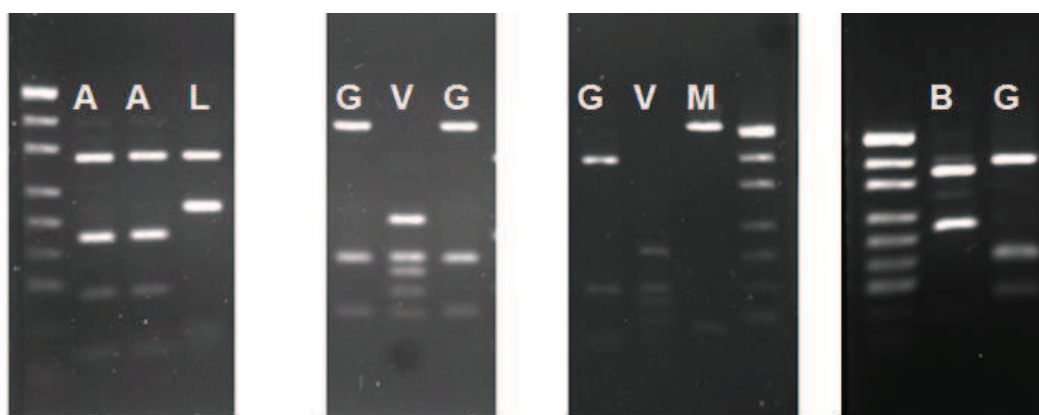
Ryc. 15 Odsetek zainfekowanych kleszczy krętkami *Borrelia* spp. na poszczególnych stanowiskach zbioru. Intensywność barwy odzwierciedla stopień antropopresji (w kolejności od najwyższego do najniższego: Sulęcyno, Kolibki, Chwarzno, Kleszczewo).

Porównując stanowiska o największych różnicach w poziomie antropopresji (Sulęcyno i Kleszczewo) nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomie zakażenia kleszczy ($p > 0,3$). Istnieją natomiast istotne różnice w poziomie zakażenia kleszczy w zależności od typu stanowiska. W roku 2009 na terenach zurbanizowanych (Kolibki – 29,2%, Chwarzno – 26,6%) odsetki zainfekowanych kleszczy były istotnie wyższe niż na terenach wiejskich i leśnych (Sulęcyno – 14,7%, Kleszczewo – 17,5%) ($p < 0,01$).

4.3.4 GENOGATUNKI KOMPLEKSU *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO WYSTĘPUJĄCE W KLESZCZACH*

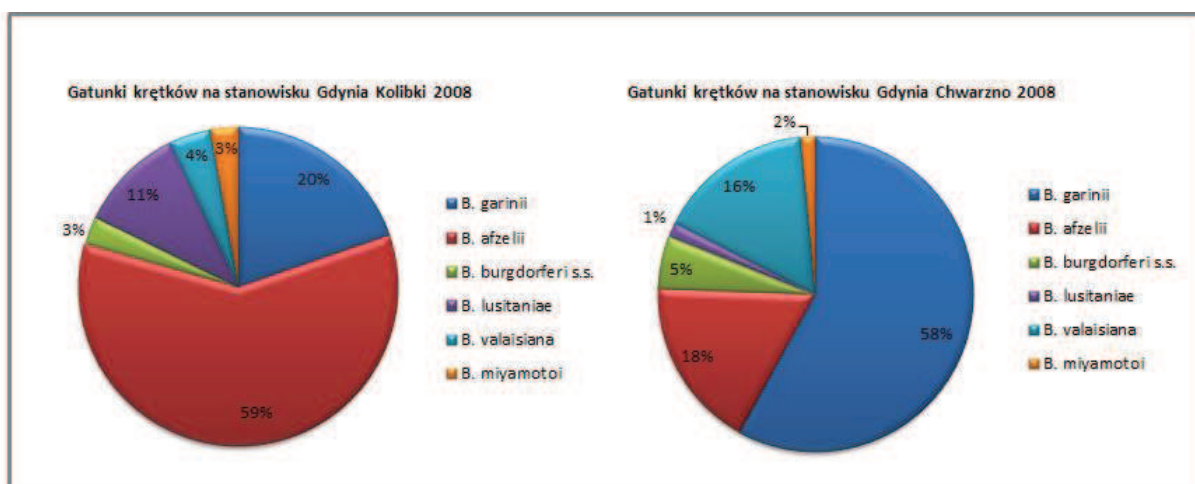
Dla dodatknych prób kleszczy z roku 2008, w celu oznaczenia genogatunków *B. burgdorferi* s.l., przeprowadzono analizę za pomocą techniki PCR-RFLP. Uzyskane wzory restrykcyjne wskazywały na zakażenie następującymi genogatunkami: *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. lusitaniae* i *B. valaisiana*. Ponadto część kleszczy zakażona była krętkami z gatunku *B. miyamotoi* (Ryc. 16).

Ogółem oznaczono gatunki w 344 próbach (131 kleszczy ze stanowiska w Gdyni Chwarznie oraz 213 kleszczy ze stanowiska Gdynia Kolibki). Najliczniej reprezentowane były gatunki *B. afzelii* (43,6%) oraz *B. garinii* (34,3%). Mniej licznie występowały *B. valaisiana* (8,7%) oraz *B. lusitaniae* (7,3%), a *B. burgdorferi* s.s. stwierdzono jedynie u 3,8% badanych kleszczy. *Borrelia miyamotoi* zidentyfikowano w 2,3% badanych prób.



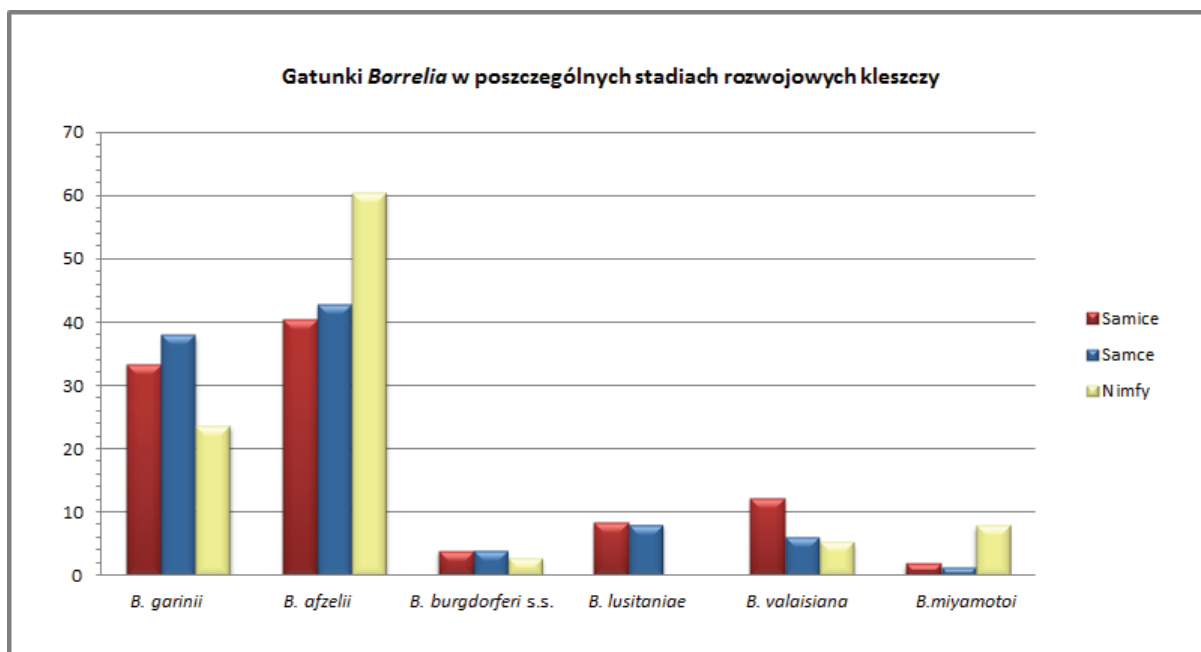
Ryc. 16 Analiza restrykcyjna fragmentu genu *fla*. Oznaczenia poszczególnych genogatunków: A – *Borrelia afzelii*, G – *Borrelia garinii*, V – *Borrelia valaisiana*, L – *Borrelia lusitaniae*, B – *Borrelia burgdorferi* s.s., M – *Borrelia miyamotoi*.

Na Ryc. 17 przedstawiono procentowy rozkład poszczególnych gatunków *Borrelia* na dwóch badanych stanowiskach – Gdynia Chwarzno oraz Gdynia Kolibki w 2008 r. Około 80% wszystkich zidentyfikowanych gatunków stanowiły *B. afzelii* i *B. garinii*, przy czym na stanowisku Gdynia Kolibki przeważała *B. afzelii*, a na stanowisku Gdynia Chwarzno większość kleszczy zainfekowana była krętkami z gatunku *B. garinii*.



Ryc. 17 Rozkład zidentyfikowanych gatunków *Borrelia* na stanowiskach Gdynia Kolibki i Gdynia Chwarzno.

Porównano również obecność poszczególnych gatunków krętków w zależności od stadium rozwojowego *I. ricinus*. We wszystkich stadiach rozwojowych przeważała *B. afzelii* (60,5% u nimf i 41,5% u osobników dorosłych), a następnie *B. garinii* (23,7% u nimf i 35,6% u osobników dorosłych). Odsetek nimf zainfekowanych *B. afzelii* był statystycznie istotnie wyższy niż odsetek osobników dorosłych zainfekowanych tym genogatunkiem ($p=0,03$). W przypadku pozostałych gatunków nie było statystycznie istotnych różnic pomiędzy stopniem zakażenia poszczególnych stadiów rozwojowych kleszczy (Ryc. 18).



Ryc. 18 Procentowy odsetek poszczególnych gatunków *Borrelia* w zależności od stadium rozwojowego.

W celu potwierdzenia wyników analizy restrykcyjnej wykonano sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA (uzyskanych w reakcji PCR). Sekwencjonowaniu poddano fragment genu *fla* o długości od 605 (gatunki należące do kompleksu *B. burgdorferi s.l.*) do 611 pz (*B. miyamotoi*). Ogółem przebadano 28 prób, w tym 17 ze stanowiska Kolibki oraz 11 z Chwarzna.

W wyniku sekwencjonowania uzyskano 9 różnych typów sekwencji, które porównano z sekwencjami zdeponowanymi w banku genów GenBank za pomocą narzędzia BLAST. Sekwencje odpowiadały 6 gatunkom krętków:

- jeden typ sekwencji dla *Borrelia afzelii* (łącznie 11 próbek),
- jeden typ sekwencji dla *Borrelia valaisiana* (1 próbka),
- jeden typ sekwencji dla *Borrelia lusitaniae* (3 próbki),
- trzy typy sekwencji *Borrelia garinii* (5 próbek),
- dwa typy sekwencji *Borrelia burgdorferi s.s.* (6 próbek),
- jeden typ sekwencji *Borrelia miyamotoi* (2 próbki).

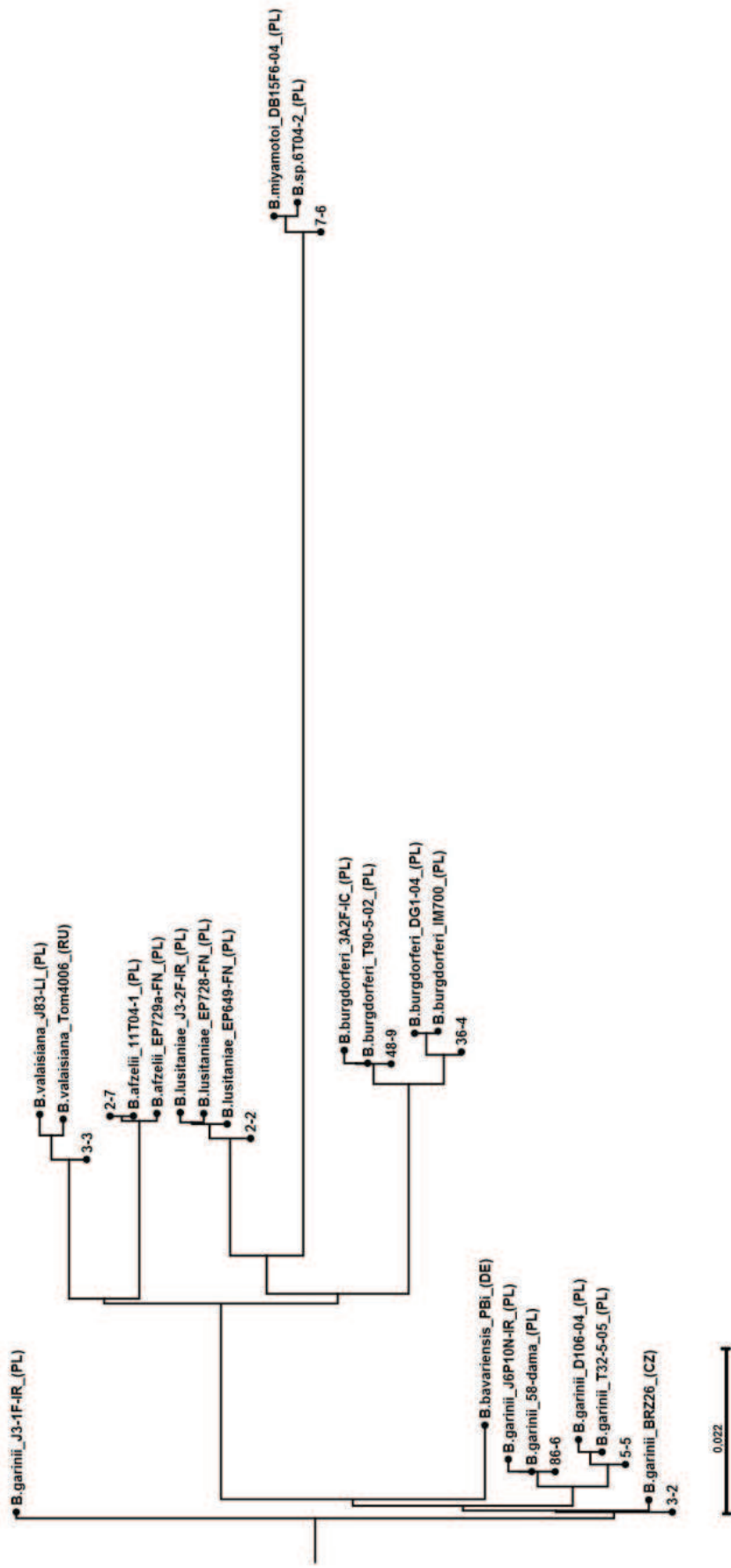
Uzyskane sekwencje fragmentu genu *fla* porównano z sekwencjami zdeponowanymi w GenBank za pomocą narzędzia BLAST, a następnie wprowadzono do ww. banku genów za pomocą narzędzia BankIt (numery akcesyjne umieszczono poniżej w nawiasach obok numerów izolatów).

Wyniki przeszukiwania zamieszczono poniżej oraz przedstawione na rycinie poniżej (Ryc. 20).

- Izolat 2-2 (KX646194) – sekwencja w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla* *B. lusitaniae* klony EP649-FN (KR782242), EP728-FN (KR782243), J3-2F-IR (KF422804) z kleszczy *I. ricinus* z terenu Polski.

- Izolat 2-7 (KX646195) – sekwencja w 100% identyczna z sekwencją fragmentu genu *fla B. afzelii* klon EP729a-FN (KR782211) oraz w 99% podobna do sekwencji *B. afzelii* izolat 11T04-1 (DQ016619), z kleszczy *I. ricinus* z terenu Polski.
- Izolat 3-2 (KX646196) – sekwencja w 99% zgodna z sekwencją fragmentu genu *fla B. garinii* szczep J3-1F-IR f (JF732875) oraz szczep BRZ26 (JN828685), z kleszczy *I. ricinus* z terenu Czech i Polski, odpowiednio.
- Izolat 3-3 (KX646197) – sekwencja w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla B. valaisiana* szczep J83-LI (JF732880) z wątroby jenoty (*Nyctereutes procyonoides* z Polski). Sekwencja w 99% podobna do genu *fla B. valaisiana* wyizolowanego z kleszcza *I. persulcatus* (Rosja).
- Izolat 5-5 (KX646198) – sekwencja w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla B. garinii* szczep T32-5-05 (DQ650336) i izolat D106-04 (DQ016621), z kleszczy *I. ricinus* z Polski.
- Izolat 7-6 (KX646199) – sekwencja w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla B. miyamotoi* DB15F6-04 (DQ650332) oraz *Borrelia* sp. 6T04-2 (DQ016626) z kleszczy *I. ricinus* (Polska).
- Izolat 36-4 (KX646200) – sekwencja w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla B. burgdorferi* izolat DG1-04 (DQ016625) z krwi psa (*Canis familiaris*), Polska oraz w 99% podobna do sekwencji fragmentu genu *fla B. burgdorferi* klon IM700 (KR7822180), wyizolowanego *I. ricinus*, Polska.
- Izolat 48-9 (KX646201) – sekwencja w 100% identyczna z sekwencją fragmentu genu *fla B. burgdorferi* szczep T90-5-02 (HM345911) z *I. ricinus*, Polska oraz w 99% podobna do fragmentu sekwencji genu *fla B. burgdorferi* szczep 3A2F-IC (HM802191) pochodzącej z kleszcza *I. canisuga*, Polska.
- Izolat 86-6 (KX646202) – sekwencja w 100% identyczna z sekwencją fragmentu genu *fla B. garinii* szczep 58-dama (KF422816) wyizolowanej z kleszcza *I. ricinus*, Polska oraz w 99% podobna do fragmentu sekwencji genu *fla B. garinii* szczep J6P10N-IR (KF422819) wyizolowanej z kleszcza *I. ricinus*, Polska.

Otrzymane typy sekwencji dopasowano za pomocą programu CodonCode Aligner (Ryc. 19). Powyższe wyniki wskazują na znaczną zmienność, szczególnie w obrębie gatunku *B. garinii* i *B. burgdorferi* s.s. oraz małą zmienność w obrębie *B. afzelii*.

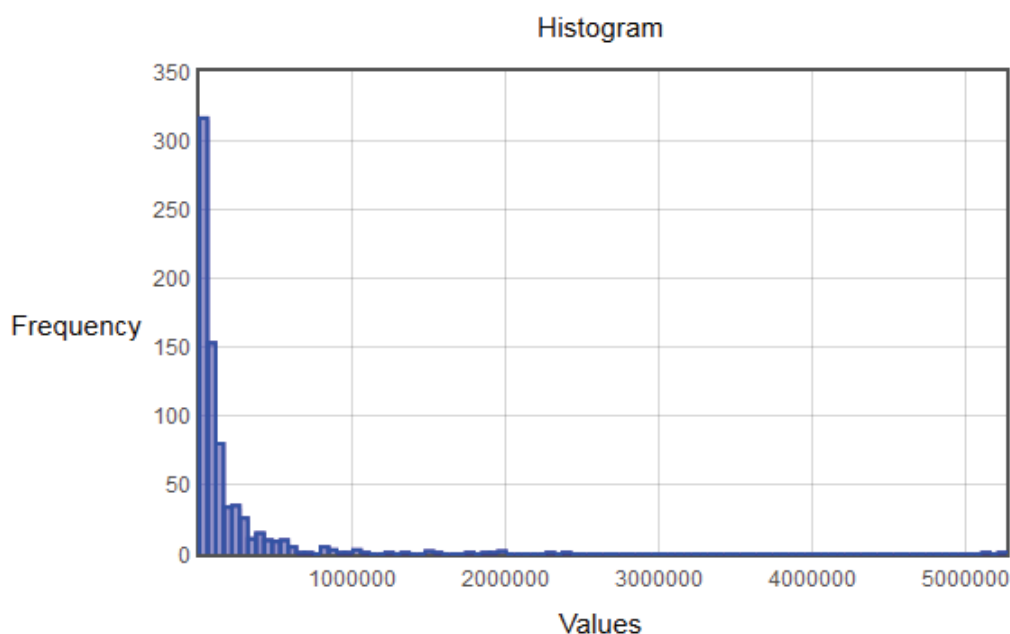


Ryc. 20 Filogram obrazujący zależności genetyczne pomiędzy poszczególnymi sekwencjami otrzymanymi w ramach pracy oraz sekwencjami zdeponowanymi w banku genów. Podziałka obrazuje odległość genetyczną pomiędzy sekwencjami (różnice 2.2 na 100 nukleotydów). Filogram został wygenerowany za pomocą narzędzia CLC Sequence Viewer (7.6.1), metoda Neighbor-Joining.

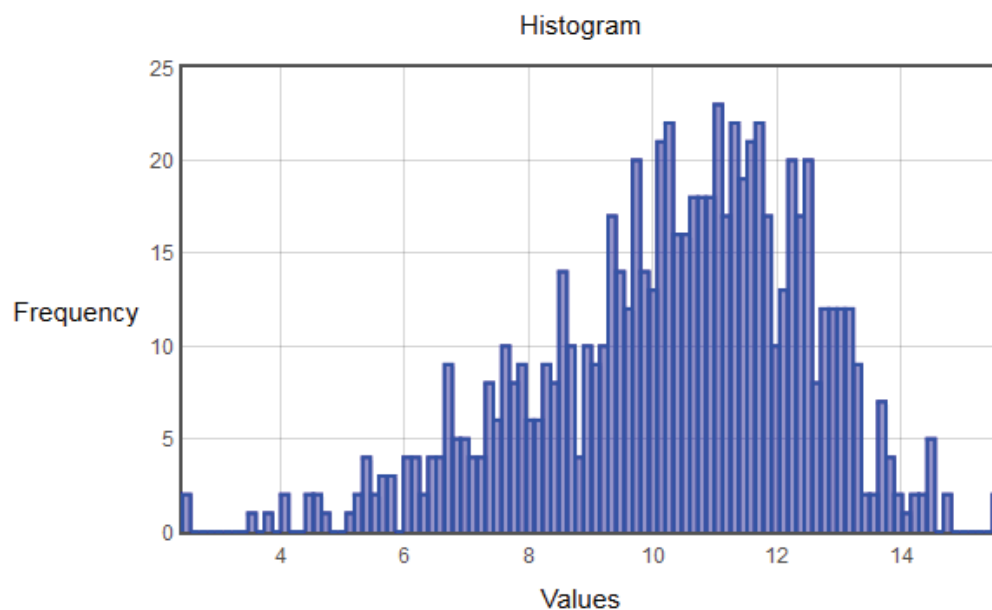
4.4. ILOŚCIOWE OZNACZANIE *BORRELIA BURGENDORFERI* SENSU LATO

Wszystkie lizaty z kleszczy, w których za pomocą Real-Time PCR wykryto *Borrelia* spp., poddano następnie analizie ilościowej. Średnia liczba krętków w kleszczach wynosiła $1,47 \cdot 10^5$. Wartości wahały się w szerokim zakresie, od 11 do ponad 5 mln kopii w kleszczu. Najwyższe wartości obserwowano w stosunkowo niewielkiej liczbie kleszczy (Ryc. 21). Jedynie w niewielkiej liczbie kleszczy (23 izolaty, co stanowi 3,1% ogółu zakażonych kleszczy) uzyskano wartości poniżej 300 bakterii.

Ponieważ wyniki analizy ilościowej nie spełniały założeń rozkładu normalnego poddano je transformacji logarytmicznej (Ryc. 22). Wyniki po przekształceniu spełniały założenia zarówno rozkładu normalnego, jak i równości wariancji w analizowanych podgrupach, pozwalając na zastosowanie parametrycznego testu ANOVA.



Ryc. 21 Rozkład uzyskanych wartości liczby krętków *Borrelia* spp. w kleszczach *Ixodes ricinus* (<http://scistatcalc.blogspot.com>), statystyka $W <$ wartość krytyczna, hipoteza zerowa odrzucona, rozkład nie spełnia założeń rozkładu normalnego.



Ryc. 22 Rozkład uzyskanych wartości liczby krętków *Borrelia* spp. w kleszczach *Ixodes ricinus* (<http://scistatcalc.blogspot.com>) po transformacji logarytmicznej, statystyka $W >$ wartość krytyczna, hipoteza zarówno nie została odrzucona, rozkład spełnia założenia rozkładu normalnego.

Uzyskane średnie liczby patogenów w kleszczach wraz z odchyleniem standardowym [SD] z podziałem na stanowisko, okres zbioru i stadium rozwojowe przedstawiono w

Tab. 12.

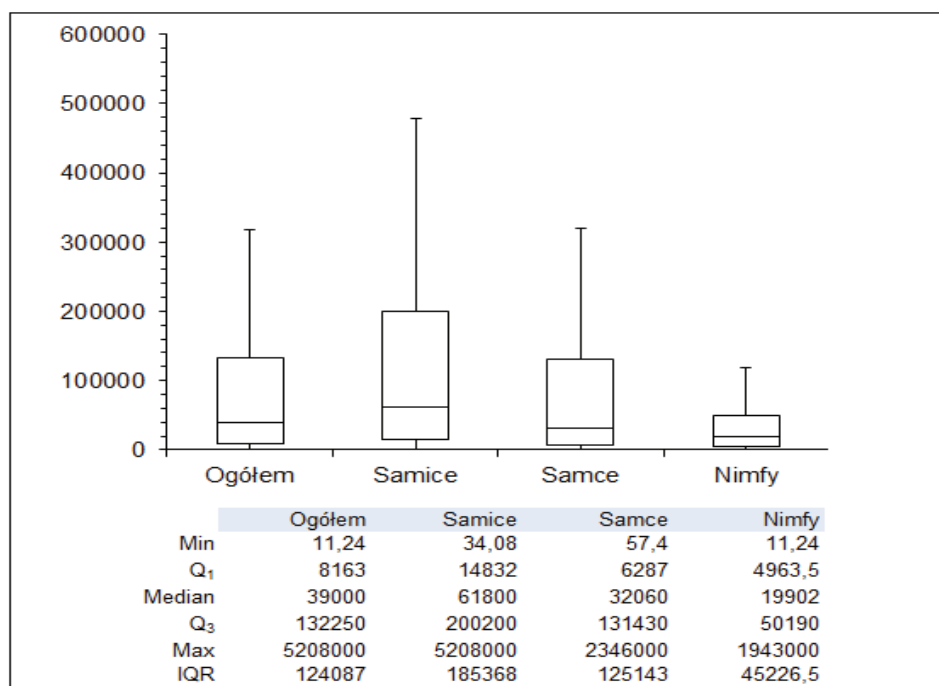
Wyniki ilościowego oznaczania wskazują w przypadku części izolatów kleszczy na bardzo wysoką liczbę krętków *Borrelia*, przy czym wartość odchylenia standardowego świadczy o dużej zmienności uzyskanych wartości. Przyczyny przeszacowania liczby patogenów omówiono w Dyskusji, sekcja 5.1.

Tab. 12. Ładunek krętków *Borrelia* w kleszczach *I. ricinus* na poszczególnych stanowiskach, średnie i odchylenia standardowe.

Rok	Stadium rozwojowe	Średnia liczebność krętków [SD]				Łącznie
		Stanowisko				
		Kolibki	Chwarzno	Sulęczyno	Kleszczewo	
2008	Samice	1,38*10 ⁵ [2,89*10 ⁵]	1,35*10 ⁵ [2,55*10 ⁵]	/	/	1,37*10 ⁵ [2,76*10 ⁵]
	Samce	7,19*10 ⁴ [1,24*10 ⁵]	7,19*10 ⁴ [1,24*10 ⁵]			7,19*10 ⁴ [1,23*10 ⁵]
	Nimfy	7,59*10 ⁴ [1,20*10 ⁵]	1,12*10 ⁴ [1,58*10 ⁴]			5,97*10 ⁴ [1,07*10 ⁵]
	Larwy					
Łącznie rok 2008		1,02*10 ⁵ [2,16*10 ⁵]	9,64*10 ⁴ [1,95*10 ⁵]			1,00*10 ⁵ [2,08*10 ⁵]
2009	Samice	2,37*10 ⁵ [3,36*10 ⁵]	4,84*10 ⁵ [1,27*10 ⁶]	6,67*10 ⁵ [1,28*10 ⁶]	1,01*10 ⁵ [1,26*10 ⁵]	3,11*10 ⁵ [7,21*10 ⁵]
	Samce	1,50*10 ⁵ [2,93*10 ⁵]	2,50*10 ⁵ [4,23*10 ⁵]	2,55*10 ⁵ [3,42*10 ⁵]	7,35*10 ⁴ [9,4*10 ⁴]	1,67*10 ⁵ [3,04*10 ⁵]
	Nimfy	3,38*10 ⁴ [6,18*10 ⁴]	1,37*10 ⁵ [2,40*10 ⁵]	5,60*10 ⁴ [6,81*10 ⁴]	1,42*10 ⁵ [4,45*10 ⁵]	8,47*10 ⁴ [2,42*10 ⁵]
	Larwy	Brak dodatknych próbek	Brak dodatknych próbek	/	Brak dodatknych próbek	-
Łącznie rok 2009		1,64*10 ⁵ [2,96*10 ⁵]	2,84*10 ⁵ [7,84*10 ⁵]	2,97*10 ⁵ [7,49*10 ⁵]	1,11*10 ⁵ [2,95*10 ⁵]	1,95*10 ⁵ [4,88*10 ⁵]
2008 - 2009	Samice	1,79*10 ⁵ [3,12*10 ⁵]	2,03*10 ⁵ [6,08*10 ⁵]	6,67*10 ⁵ [1,28*10 ⁶]	1,01*10 ⁵ [1,26*10 ⁵]	2,11*10 ⁵ [5,21*10 ⁵]
	Samce	1,12*10 ⁵ [2,30*10 ⁵]	9,80*10 ⁴ [2,03*10 ⁵]	2,55*10 ⁵ [3,42*10 ⁵]	7,35*10 ⁴ [9,49*10 ⁴]	1,16*10 ⁵ [2,30*10 ⁵]
	Nimfy	5,48*10 ⁴ [9,71*10 ⁴]	9,41*10 ⁴ [2,02*10 ⁵]	5,60*10 ⁴ [6,81*10 ⁴]	1,42*10 ⁵ [4,45*10 ⁵]	7,72*10 ⁴ [2,10*10 ⁵]
	Larwy	Brak dodatknych próbek	Brak dodatknych próbek	/	Brak dodatknych próbek	-
Łącznie lata 2008-2009		1,31*10 ⁵ [2,58*10 ⁵]	1,42*10 ⁵ [4,27*10 ⁵]	2,97*10 ⁵ [7,49*10 ⁵]	1,11*10 ⁵ [2,95*10 ⁵]	1,47*10 ⁵ [3,76*10 ⁵]

4.4.1 INTENSYWNOŚĆ ZAKAŻENIA BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO W ZALEŻNOŚCI OD STADIUM ROZWOJOWEGO KLESZCZA

Na Ryc. 23 przedstawiono relacje pomiędzy stadium rozwojowym a liczebnością krętków w kleszczach, łącznie na wszystkich stanowiskach, na przestrzeni roku 2008 i 2009. Widoczne są różnice w liczebności. Najwyższą zanotowano w samicach, średnia arytmetyczna 2,11*10⁵ krętków, mediana – 6,18*10⁴ krętków, niższy w samcach – średnia 1,16*10⁵ krętków, mediana – 3,21*10⁴ i najniższy w nimfach – średnio 7,73*10⁴ krętków (mediana – 1,99*10⁴ krętków).



Ryc. 23 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stadium rozwojowym a liczebnością krętków *Borrelia* w kleszczach.

Za pomocą testu ANOVA, przeprowadzonego na wynikach poddanych transformacji logarytmicznej analizowano, czy różnice pomiędzy średnimi są istotne statystycznie. Podsumowanie przedstawiono w Tabeli 13.

Tab. 13 Podsumowanie testu ANOVA dla wyników ilościowych krętków *Borrelia* w zależności od stadium rozwojowego kleszcza. F> wartość krytyczna, istnieją różnice między średnimi.

PODSUMOWANIE

Grupy	Licznik	Suma	Średnia	Wariancja
Samice	293	3139,24	10,71	4,53
Samce	307	3110,94	10,13	4,50
Nimfy	134	1287,29	9,61	4,46

ANALIZA WARIANCJI

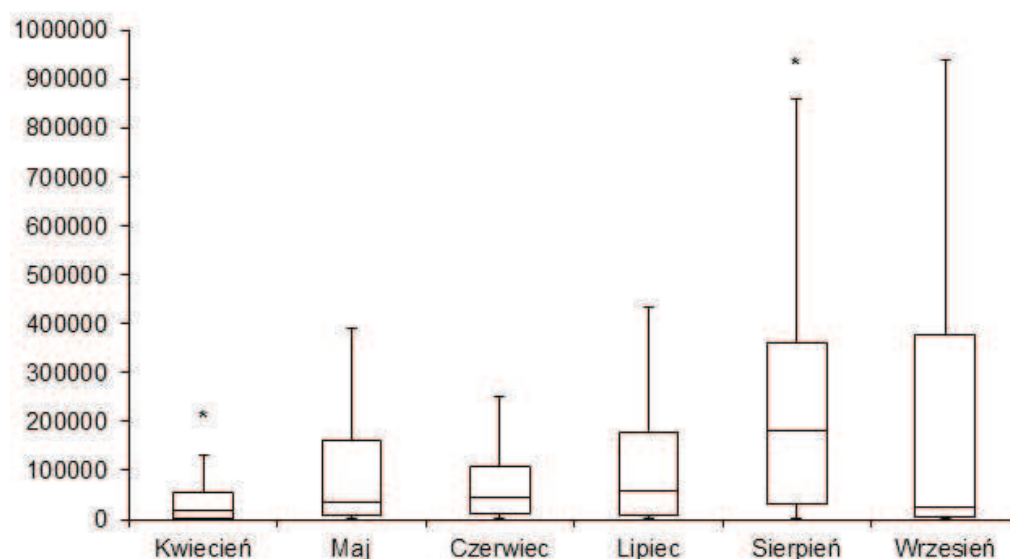
Źródło wariacji	SS	df	WARTOŚĆ			
			MS	F	p	Test F
Pomiędzy grupami	122,50	2	61,25	13,60	1,6*10 ⁻⁶	3,01
W obrębie grup	3293,38	731	4,51			
Razem	3415,88	733				

W celu ustalenia, pomiędzy którymi wartościami istnieją różnice, wykonano dwustronne testy t z uwzględnieniem poprawki Bonferroniego. Analiza wykazała, że średnia liczebność krętków

u samic jest istotnie wyższa niż w przypadku samców i nimf, natomiast nie ma znaczącej różnicy pomiędzy średnią liczebnością *Borrelia* u samców i nimf.

4.4.2 INTENSYWNOŚĆ ZAKAŻENIA KLESZCZY KRĘTKAMI *BORRELIA BURGENDORFERI SENSU LATO* W CZASIE I PRZESTRZENI

Podobne postępowanie zastosowano w przypadku analizy intensywności zakażenia krętkami *Borrelia* w zależności od miesiąca odłowu kleszczy. Średnią intensywność zakażenia w poszczególnych miesiącach, łącznie dla lat 2008-2009, przedstawiono na Ryc. 24.

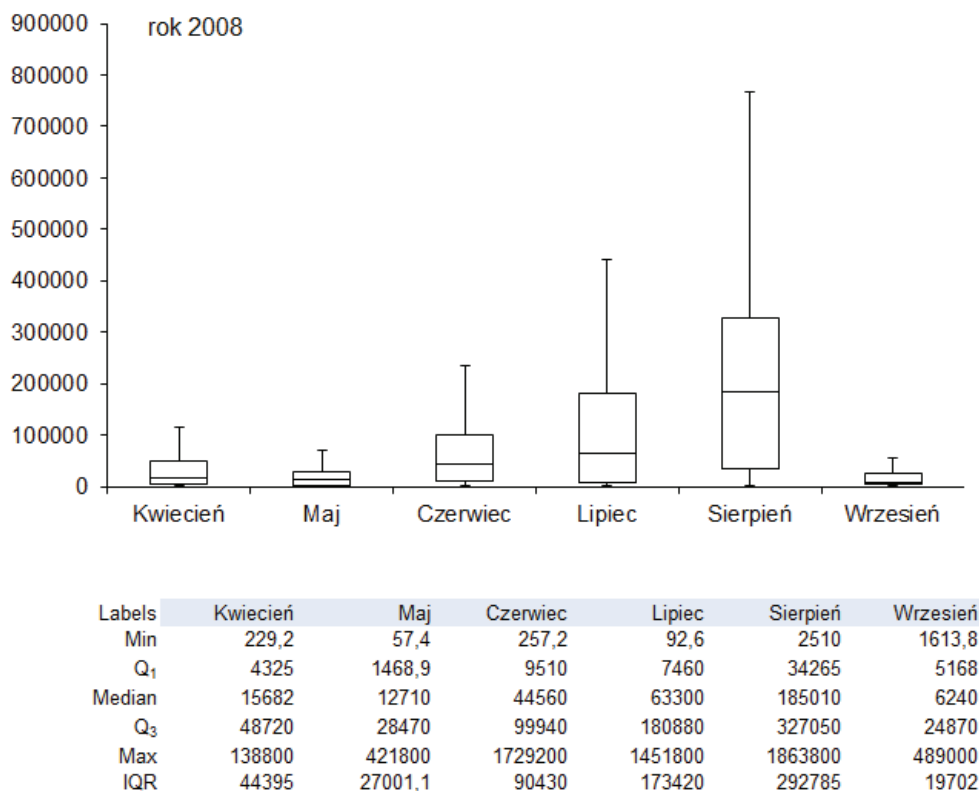


Labels	Kwiecień	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
Min	11	12	257	93	2510	1614
Q ₁	3254,5	8894,5	12198	7137	31150	6110
Median	16787	33810	44980	59670	180710	25700
Q ₃	55065	162140	108260	177975	361600	378700
Max	923000	2278000	5208000	1451800	1953200	5082000
IQR	51810,5	153245,5	96062	170838	330450	372590

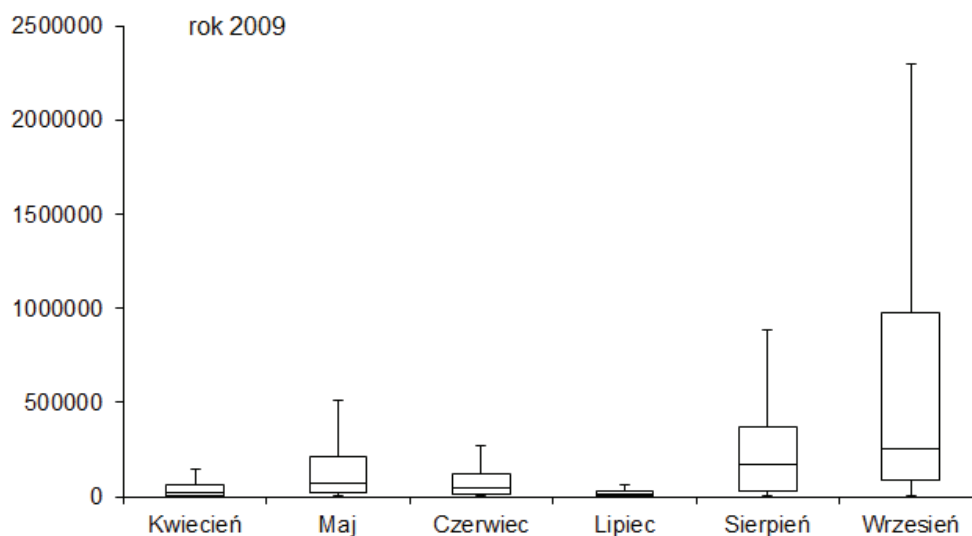
Ryc. 24 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu kleszczy a średnią liczebnością krętków w kleszczach, łącznie dla lat 2008 i 2009.

Analiza za pomocą testów nieparametrycznych (z wyłączeniem września, ze względu na zbyt niską liczbę odłowionych kleszczy w tym miesiącu) wykazała, że intensywność zakażenia jest istotnie statystycznie niższy w kwietniu niż w pozostałych miesiącach ($p < 0,05$). Statystycznie istotne różnice odnotowano również dla sierpnia, gdzie intensywność zakażenia była wyższa niż w poprzednich miesiącach ($p < 0,05$). Wyniki mogą sugerować, że intensywność zakażenia kleszczy krętkami wzrasta na przestrzeni roku, od kwietnia do sierpnia.

Na wykresach poniżej przedstawiono relacje pomiędzy miesiącem odłowu a intensywnością zakażenia kleszczy, oddzielnie na przestrzeni roku 2008 (Ryc. 25) i 2009 (Ryc. 26). Tendencja wzrostowa jest również widoczna.



Ryc. 25 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu a intensywnością zakażenia kleszczy w 2008 r.

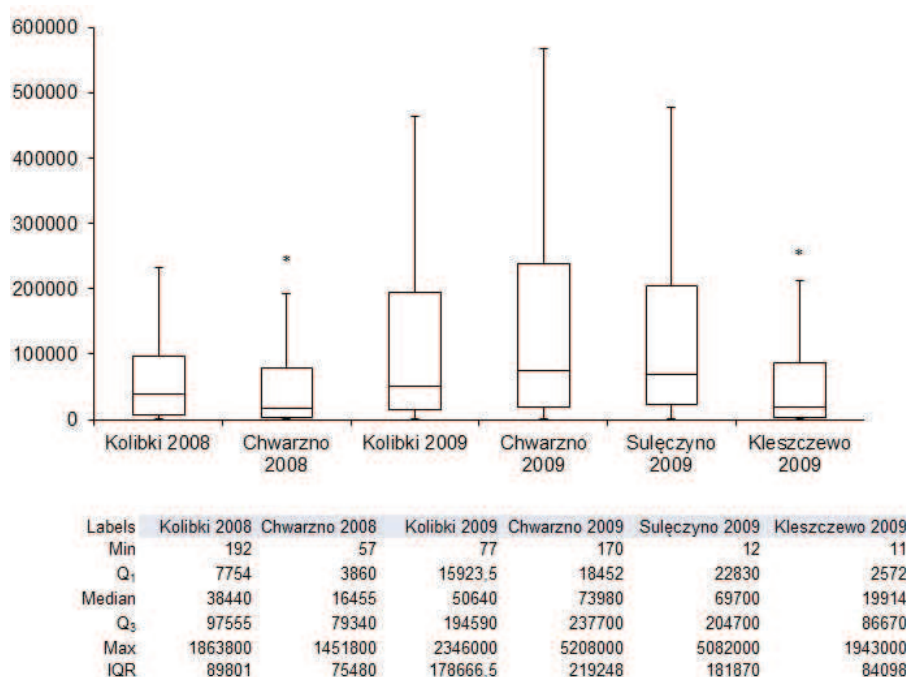


Labels	Kwiecień	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień	Wrzesień
Min	11,24	11,64	447	1880	4854	3960
Q ₁	1995,4	17965,5	14235	2746	29365	90540
Median	19890	71480	45130	7490	173930	253600
Q ₃	58340	213950	116575	27080	370950	973350
Max	923000	2278000	5208000	182400	1953200	5082000
IQR	56344,6	195984,5	102340	24334	341585	882810

Ryc. 26 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu a średnią intensywnością zakażenia kleszczy w 2009 r.

4.4.3 INTENSYWNOŚĆ ZAKAŻENIA KLESZCZY KRĘTKAMI *BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO* W ZALEŻNOŚCI OD TERENU ODŁOWU

Wyniki ilościowe analizowano za pomocą testu ANOVA, przeprowadzonego na wartościach poddanych transformacji logarymicznej. Test ANOVA wykazał różnice pomiędzy intensywnością zakażenia kleszczy pomiędzy poszczególnymi stanowiskami. W celu ustalenia, pomiędzy którymi wartościami istnieją różnice, wykonano dwustronne testy t z uwzględnieniem poprawki Bonferroniego. Wyniki ilościowe z podziałem na poszczególne stanowiska przedstawione są na Ryc. 27.



Ryc. 27 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stanowiskiem odłowu kleszczy a intensywnością zakażenia kleszczy. Gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie.

Analiza statystyczna wykazała, że jedyne istotne różnice występowały pomiędzy intensywnością zakażenia kleszczy w Chwarznie w 2008 roku i Kleszczewie w 2009 roku. Intensywność zakażenia w tych stanowiskach był porównywalny i był istotnie niższy niż w pozostałych stanowiskach.

Ponadto porównując intensywność zakażenia krętkami na przestrzeni dwóch lat na stanowisku Kolibki i Chwarzno zauważalny jest jej wzrost (w przypadku Chwarzna różnice są statystycznie istotne), jednak odsetek zainfekowanych kleszczy spadł na obu stanowiskach (sekcja 4.3.3). Ponadto wzrost intensywności zakażenia na tych stanowiskach był zauważalny, pomimo, że w roku 2009 odsetek stadiów młodocianych (nimf) był wyższy niż w 2008. Intensywność zakażenia krętkami *Borrelia* nie był skorelowany z odsetkiem zakażonych kleszczy również na pozostałych stanowiskach.

4.4.4 INTENSYWNOŚĆ ZAKAŻENIA KLESZCZY W ZALEŻNOŚCI OD GENOGATUNKÓW KOMPLEKSU *BORRELIA BURGdorferi SENSU LATO*

Porównano także intensywność zakażenia kleszczy poszczególnymi genogatunkami. Średnie liczby patogenów w kleszczach były różne dla poszczególnych genogatunków (

Tab. 14).

Tab. 14 Średnie liczby patogenów w poszczególnych stadiach rozwojowych w zależności od genogatunku krętków *Borrelia*.

Gatunek	Ogółem	Samice	Samce	Nimfy
<i>B. garinii</i>	174 480	244 030	124 767	81 970
<i>B. afzelii</i>	75 104	99 654	53 898	66 495
<i>B. lusitaniae</i>	47 916	60 232	34 574	brak
<i>B. burgdorferi s.s.</i>	47 475	37 270	64 306	7 722
<i>B. valaisiana</i>	30 406	42 552	97 54	7 956
<i>B. miyamotoi</i>	346 204	732 753	204 085	54 402

4.5. DETEKcja ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM

Wśród odłowionych kleszczy jedynie 16 osobników było zainfekowanych riketsjami z gatunku *A. phagocytophilum*, co stanowiło 0,6% wszystkich analizowanych kleszczy. Liczba zainfekowanych kleszczy oraz odsetek w zależności od stanowiska oraz stadium rozwojowego przedstawione są w Tab. 15.

Tab. 15 Kleszcze *I. ricinus* zakażone *A. phagocytophilum* na poszczególnych stanowiskach odłowu.

Rok	Stadium rozwojowe	Liczba zainfekowanych kleszczy (%)				Łącznie
		Stanowisko				
		Kolibki	Chwarzno	Sulęczyno	Kleszczewo	
2008	Samice	2 (1,0%)	0 (0%)			2 (0,5%)
	Samce	5 (2,3%)	0 (0%)			5 (1,3%)
	Nimfy	0 (0%)	1 (1,8%)			1 (0,5%)
	Larwy					
Łącznie rok 2008		7 (1,2%)	1 (0,2%)			8 (0,8%)
2009	Samice	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Samce	2 (0,8%)	0 (0%)	4 (3,4%)	0 (0%)	6 (1,3%)
	Nimfy	1 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,7%)	2 (0,3%)
	Larwy	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)
Łącznie rok 2009		3 (0,4%)	0 (0%)	4 (1,0%)	1 (0,3%)	8 (0,5%)
2008 - 2009	Samice	2 (0,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,2%)
	Samce	7 (1,5%)	0 (0%)	4 (3,4%)	0 (0%)	11 (1,3%)
	Nimfy	1 (0,3%)	1 (0,7%)	0 (0%)	1 (0,7%)	3 (0,4%)
	Larwy	0 (0%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)
Łącznie lata 2008-2009		10 (0,8%)	1 (0,2%)	4 (1,0%)	1 (0,3%)	16 (0,6%)

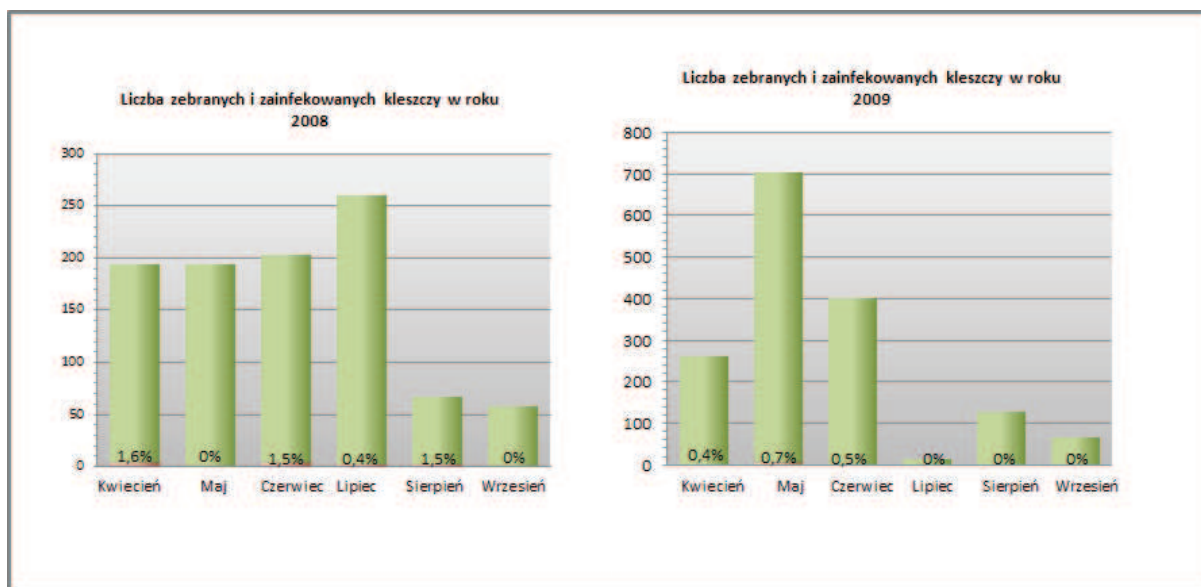
Wśród kleszczy, w których wykryto obecność DNA *A. phagocytophilum*, jedynie dwa (12,5%) były również zainfekowane krętkami *Borrelia*.

4.5.1 ZAKAŻENIE ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM W ZALEŻNOŚCI OD STADIUM ROZWOJOWEGO KLESZCZA

Poziom zakażenia *A. phagocytophilum* był wyższy u samców (1,3%) niż u samic (0,2%) i nimf (0,4%), $p < 0,05$. Nie wykryto infekcji wśród larw.

4.5.2 ZAKAŻENIE KLESZCZY ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM W CZASIE

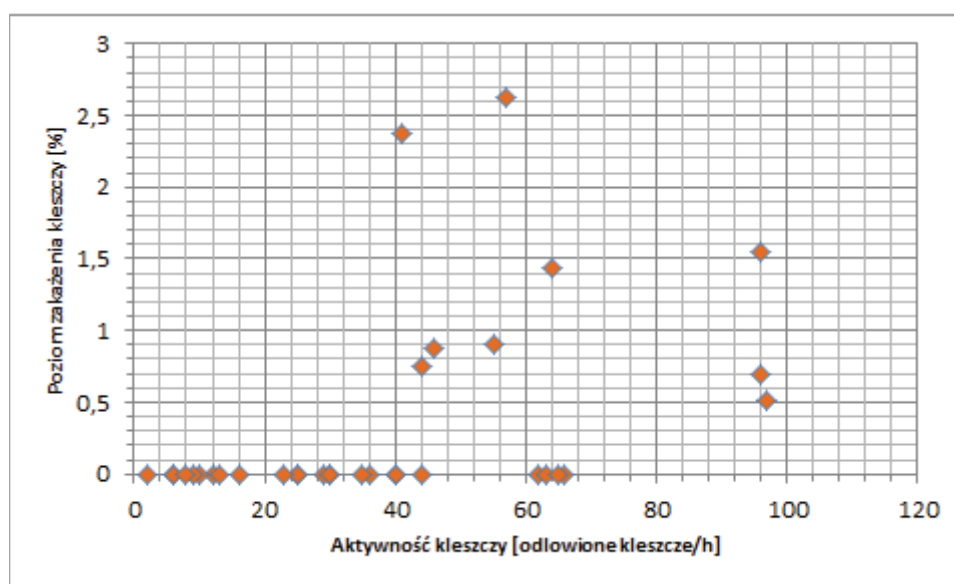
Na wykresie poniżej (Ryc. 28) przedstawiono poziom zakażenia *A. phagocytophilum* na przestrzeni roku 2008 i 2009, od kwietnia do września na tle liczby odłowionych osobników.



Ryc. 28 Liczba kleszczy *I. ricinus* niezainfekowanych (zielony) i zainfekowanych bakteriami *Anaplasma phagocytophilum* (czerwony) w roku 2008 i 2009. Na wykresach podano odsetek zainfekowanych kleszczy.

Ogólny poziom zakażenia kleszczy był bardzo niski i wahał się w granicach 0 – 1,6% w poszczególnych miesiącach. Ze względu na zbyt małą liczbę zainfekowanych kleszczy analiza statystyczna nie została przeprowadzona.

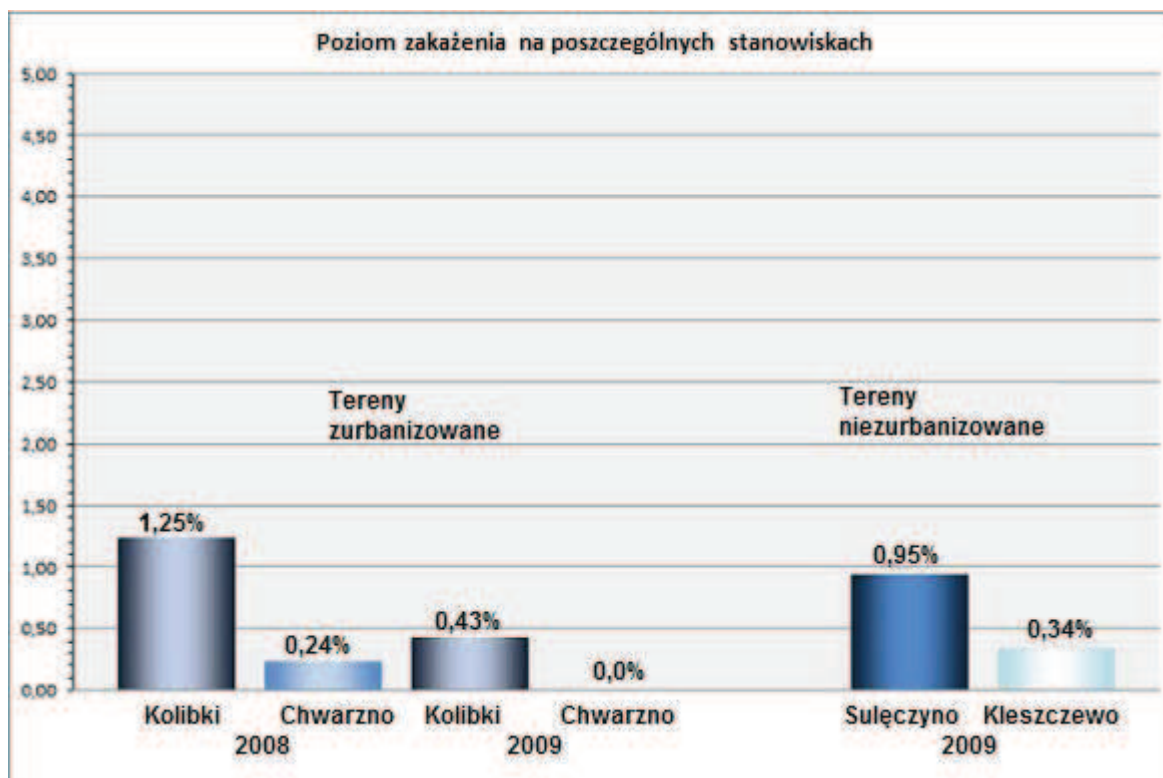
Analiza korelacji pomiędzy aktywnością kleszczy a odsetkiem osobników zainfekowanych *A. phagocytophilum* w poszczególnych miesiącach i stanowiskach nie wykazała istotnych zależności ($R^2=0,2$) (Ryc. 29). Analiza korelacji Pearsona przeprowadzono zbiorczo dla średnich aktywności kleszczy w ciągu roku na poszczególnych stanowiskach również nie wykazała zależności pomiędzy aktywnością kleszczy a poziomem zakażenia pajęczaków ($R^2=0,3$).



Ryc. 29 Zależności pomiędzy aktywnością kleszczy (oś X) i poziomem zakażenia kleszczy bakteriami *A. phagocytophilum* (oś Y).

4.5.3 ZAKAŻENIE ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM W ZALEŻNOŚCI OD TERENU WYSTĘPOWANIA KLESZCZY

Odsetek kleszczy zakażonych *A. phagocytophilum* na poszczególnych stanowiskach przedstawiony jest na wykresie (Ryc. 30). Nie odnotowano statystycznie istotnych różnic w poziomie zainfekowania *I. ricinus*.



Ryc. 30 Odsetek zainfekowanych kleszczy *A. phagocytophilum* na poszczególnych stanowiskach zbioru. Intensywność barwy odzwierciedla stopień antropopresji (w kolejności od najwyższego do najniższego: Sulęczyno, Kolibki, Chwarzno, Kleszczewo).

4.5.4 SEKWENCJONOWANIE FRAGMENTU 16S rRNA ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM

Dla wybranych próbek, w których potwierdzono obecność *A. phagocytophilum* w reakcji PCR przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA. Sekwencjonowaniu poddano fragment o długości 546 pz. Sekwencje udało się uzyskać dla 6 próbek. W wyniku sekwencjonowania uzyskano 3 różne typy sekwencji (pierwszy typ – izolaty 68-5 i 78-4, drugi typ – izolaty 84-9, 149-7 i 178-2, 3 typ – izolat 232-2). Sekwencje wprowadzono do banku genów za pomocą narzędzia BankIt (numery akcesyjne umieszczono poniżej w nawiasach obok numerów izolatów).

Otrzymane sekwencje genu 16S rRNA, przedstawione wykazały 100% podobieństwo do następujących sekwencji zdeponowanych w banku genów GenBank (numery akcesyjne wraz ze źródłem z jakiego DNA patogenów lub patogeny zostały wyizolowane):

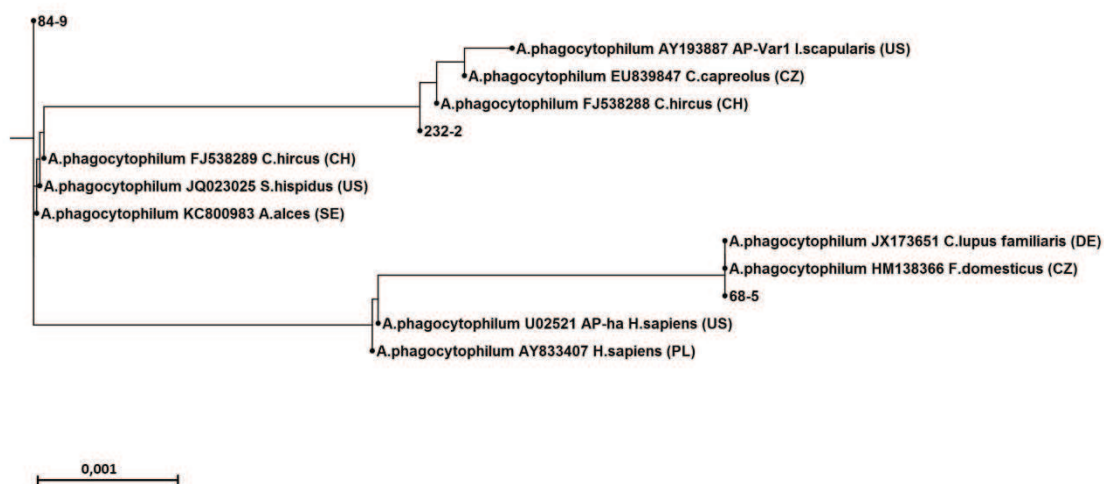
- Izolat 68-5 (KX646191): **AF136712** – *I. ricinus*, Niemcy, **HQ629915** – *I. ricinus*, Białoruś, **HQ629911** – *I. ricinus*, Rosja, **HM138366** – *Felis domesticus* (kot; krew), Czechy, **JN181063** – *D. reticulatus*, Litwa, **JX173651** – *Canis lupus familiaris* (pies; krew), Niemcy;
- Izolat 84-9 (KX646192): **AJ242783** *I. ricinus*, Szwecja, **AF136714** – *I. ricinus*, Niemcy, **FJ538289** – *Capra hircus* (koza domowa), Szwajcaria, **HQ629914** – *I. ricinus*, Białoruś, **JN181069** *I. ricinus*, Litwa, **JQ063022**, **JQ063023**, **JQ063024**, **JQ023025** – *Sigmodon hispidus* (bawelniak szczeniasty; krew), USA, **KC800983** – *Alces alces* (łoś; śledziona), Szwecja;
- Izolat 232-2 (KX646193): **AJ242784** *I. ricinus*, Szwecja, **AF136713** – *I. ricinus*, Niemcy, **AF311343** – *I. scapularis*, Kanada, **EU839847** – *Capreolus capreolus* (sarna; krew), Czechy, **FJ538288** – *Capra hircus* (koza domowa), Szwajcaria, **FJ788511** – *I. ricinus*, Niemcy, **HQ629912** – *I. ricinus*, Rosja, **HQ629923** – *I. ricinus*, Estonia, **JN181070** – *I. ricinus*, Norwegia, **KP245906** – *I. ricinus* (Polska).

Otrzymane typy sekwencji dopasowane za pomocą programu CodonCode Aligner przedstawiono na Ryc. 31.

78-4	AAAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGGATTTGACGCTTAACTTACCGAACCAGGCTACATGCGCTTTACGGCCAATAATCCGAACAACGCTTGGCCCTCGGTATTACGGCCGCTGCTGGCACGGAGTTT	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	1
68-5	AAAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGGATTTGACGCTTAACTTACCGAACCAGGCTACATGCGCTTTACGGCCAATAATCCGAACAACGCTTGGCCCTCGGTATTACGGCCGCTGCTGGCACGGAGTTT													
232-2	TTAACTTACCGAACCAGGCTACATGCGCTTTACGGCCAATAATCCGAACAACGCTTGGCCCTCGGTATTACGGCCGCTGCTGGCACGGAGTTT													
Contigli:	AAAGCAGCTCCAGGGTTAAGCCCTGGGATTTGACGCTTAACTTACCGAACCAGGCTACATGCGCTTTACGGCCAATAATCCGAACAACGCTTGGCCCTCGGTATTACGGCCGCTGCTGGCACGGAGTTT													
78-4	TGCCGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCAATATCTTCCCTACTGAAAAGTTTTACAACCTTAAGGCCCTTCTCACTACGCGGCCATAGCTGGATCAGGTTGGGCCCATTTGCCAATATTCCTCCACTGGC													
66-5	TGCCGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCAATATCTTCCCTACTGAAAAGTTTTACAACCTTAAGGCCCTTCTCACTACGCGGCCATAGCTGGATCAGGTTGGGCCCATTTGCCAATATTCCTCCACTGGC													
232-2	TGCCGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCAATATCTTCCCTACTGAAAAGTTTTACAACCTTAAGGCCCTTCTCACTACGCGGCCATAGCTGGATCAGGTTGGGCCCATTTGCCAATATTCCTCCACTGGC													
Contigli:	TGCCGGACTTCTTCTGTAGGTACCGTCAATATCTTCCCTACTGAAAAGTTTTACAACCTTAAGGCCCTTCTCACTACGCGGCCATAGCTGGATCAGGTTGGGCCCATTTGCCAATATTCCTCCACTGGC	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250
78-4	TGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGTATCTCAGTTCAGTGGTGGTATCATCCTCTCAGACAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGGCTTTACCGTACCAGCTAGCTAACTAACATAGGCTCATCTAA													
66-5	TGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGTATCTCAGTTCAGTGGTGGTATCATCCTCTCAGACAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGGCTTTACCGTACCAGCTAGCTAACTAACATAGGCTCATCTAA													
232-2	TGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGTATCTCAGTTCAGTGGTGGTATCATCCTCTCAGACAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGGCTTTACCGTACCAGCTAGCTAACTAACATAGGCTCATCTAA													
Contigli:	TGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGGTATCTCAGTTCAGTGGTGGTATCATCCTCTCAGACAGCTATAGATCATCGCCTTGGTAGGGCTTTACCGTACCAGCTAGCTAACTAACATAGGCTCATCTAA	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380
78-4	TAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCCATACTACTAGGTAGATTTCTATGCACTTACTGCCCTCTGCCAGTAACTATTCTTCATAGCAAGCTT													
66-5	TAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCCATACTACTAGGTAGATTTCTATGCACTTACTGCCCTCTGCCAGTAACTATTCTTCATAGCAAGCTT													
232-2	TAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCCATACTACTAGGTAGATTTCTATGCACTTACTGCCCTCTGCCAGTAACTATTCTTCATAGCAAGCTT													
Contigli:	TAGCGATAAATCTTCCCGCAGGGATTATACAGTATTACCCACCATTTCTAGTGGCTATCCCATACTACTAGGTAGATTTCTATGCACTTACTGCCCTCTGCCAGTAACTATTCTTCATAGCAAGCTT	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510

Ryc. 31 Dopasowanie uzyskanych sekwencji fragmentu genu 16S rRNA *Anaplasma phagocytophilum* uzyskane przy pomocy programu CodonCode Aligner v 6.0.2.

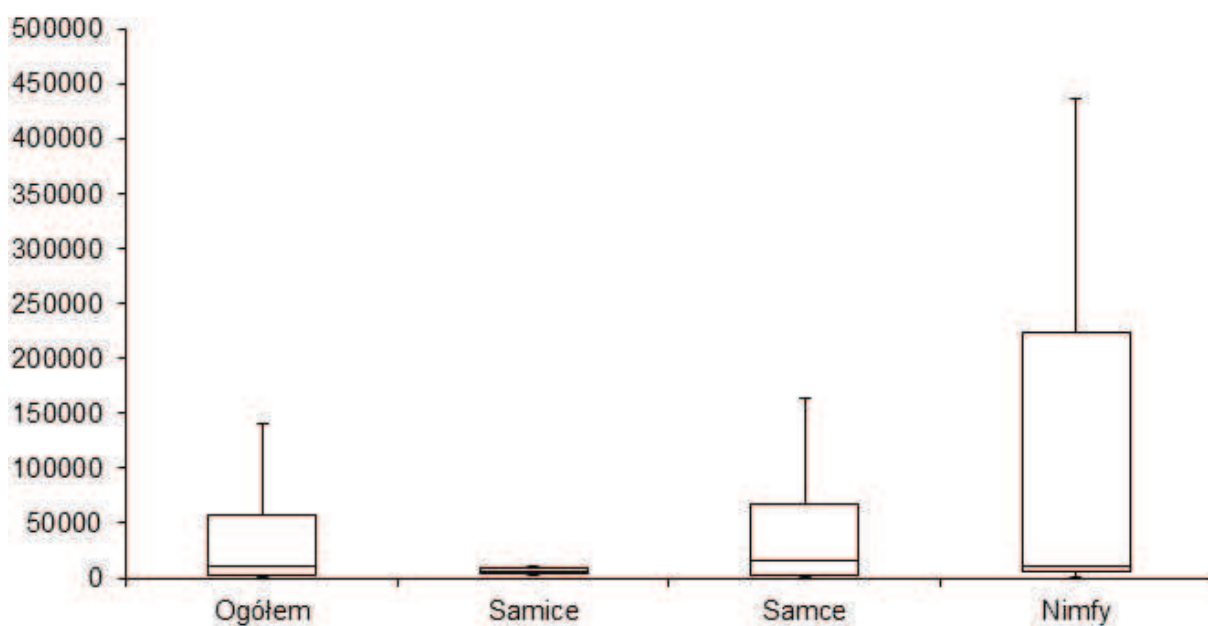
Zależności pomiędzy uzyskanymi sekwencjami, a sekwencjami zdeponowanymi w banku genów GenBank pokazane są na drzewie filogenetycznym (Ryc. 32). Oprócz sekwencji wykazujących 100% homologii z sekwencjami z banku genów, zamieszczono również sekwencję AY193887 (sekwencja wyizolowana z kleszcza *I. scapularis*, USA) charakterystyczną dla niepatogenicznego dla człowieka szczepu *A. phagocytophilum* oraz sekwencje, które są charakterystyczne dla szczepów o potwierdzonej patogeniczności (sekwencja U02521 i AY833407).



Ryc. 32 Filogram obrazujący zależności genetyczne pomiędzy poszczególnymi sekwencjami otrzymanymi w ramach pracy oraz sekwencjami zdeponowanymi w banku genów. Podziałka obrazuje odległość genetyczną pomiędzy sekwencjami (różnice 1 na 1000 nukleotydów). Filogram został wygenerowany za pomocą narzędzia CLC Sequence Viewer (7.6.1), metoda Neighbor-Joining.

4.6. ILOŚCIOWE OZNACZANIE *ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM*

Ze względu na bardzo niski odsetek kleszczy zakażonych *A. phagocytophilum* analiza statystyczna wpływu poszczególnych czynników na intensywność zakażenia kleszczy nie została przeprowadzona. Liczba patogenów w kleszczach wahała się w zakresie od 8 do $7,69 \cdot 10^5$ (średnio $9,89 \cdot 10^4$ patogenów/kleszcza). Na wykresie poniżej (Ryc. 33) przedstawiono relacje pomiędzy stadium rozwojowym a intensywnością zakażenia kleszczy, łącznie na wszystkich stanowiskach, na przestrzeni roku 2008 i 2009.



Labels	Ogółem	Samice	Samce	Nimfy
Min	8	1846	570	8
Q ₁	1709,5	4102,5	2102,5	5756
Median	11188	6359	16060	11504
Q ₃	57260	8615,5	66640	223952
Max	769200	10872	769200	436400
IQR	55550,5	4513	64537,5	218196

Ryc. 33 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stadium rozwojowym a liczebnością *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach.

5. DYSKUSJA

W niniejszym rozdziale przedyskutowano wyniki pracy w kontekście aktualnej wiedzy na temat diagnostyki i epidemiologii chorób odkleszczowych.

5.1. METODY MOLEKULARNE W EPIDEMIOLOGII ROZWIJAJĄCYCH SIĘ CHOROÓB ZAKAŹNYCH

Identyfikacja i charakterystyka rozwijających się chorób infekcyjnych jest procesem czasochłonnym, wymagającym wykorzystania panelu metod, takich jak hodowla komórkowa/bakteryjna, inokulacja zwierząt doświadczalnych, techniki histopatologiczne, mikroskopowe i serologiczne. Odkrywanie patogenów zajmowało dawniej wiele lat czy nawet dziesięcioleci. Dzięki rozwojowi technik molekularnych czas ten uległ znacznemu skróceniu, do kilku miesięcy, a nawet tygodni. Techniki molekularne oferują wiele korzyści w porównaniu do metod konwencjonalnych, m.in. wyższą czułość i specyficzność, szybkość, łatwość standaryzacji i automatyzacji. Pozwalają one na identyfikację patogenów, które są trudne w hodowli *in vitro*, typowanie szczepów w badaniach epidemiologicznych, oznaczanie wrażliwości na antybiotyki, czy diagnostykę różnicową chorób zakaźnych i monitorowanie leczenia przeciwdrobnoustrojowego. Istotny jest również nadzór nad znanymi mikroorganizmami, które mają potencjał, aby nabyć cechy chorobotwórcze u innych żywicieli (Dong 2008 [35]; Morse 2010 [90]). Metody molekularne znacząco zwiększyły liczbę znanych mikroorganizmów przenoszonych przez kleszcze (Tijssen-Klasen 2014 [147]).

Dzięki technikom molekularnym po raz pierwszy dokonano identyfikacji takich patogenów jak wirus Sin Nombre, wirus Nipah, wirus Zachodniego Nilu, wirus SARS i wirus Lujo. Szybkie, ekonomiczne metody pozwalają na badania przesiewowe próbek na dużą skalę, a wczesna identyfikacja patogenów może obecnie wyprzedzić pojawienie się epidemii choroby odzwierzęcej. W ubiegłych dziesięcioleciach, większość działań mających na celu monitorowanie chorób skupiała się na wykrywaniu poszczególnych patogenów w naturalnych rezerwuarach, wektorach lub populacji ludzi i zwierząt o wysokim ryzyku zakażenia/zarażenia (Morse 2012 [90]; Lipkin 2010 [77]). Opracowanie w 1983 roku przez Kary'ego Mullisa reakcji PCR oferowało wiele korzyści dla mikrobiologów klinicznych: szybsze, tańsze, bardziej dokładne wykrywanie i oznaczanie wszystkich organizmów w próbce, bez czekania na wyniki hodowli bakteryjnej (Fairfax 2013 [45]). Początkowo stosowano metody, które pozwalały na wykrywanie pojedynczych patogenów, np. klasyczne techniki PCR, techniki serologiczne. Wraz ze spadkiem kosztów nowych technik molekularnych, takich jak mikromacierze DNA, metody multiplex PCR, czy sekwencjonowanie, zaczęły one być standardowo wykorzystywane w monitorowaniu, a także badaniu bioróżnorodności mikroorganizmów w środowisku. Ze względu na wysoką liczbę gatunków zwierząt, które mogą być potencjalnym źródłem patogenów, w identyfikacji nowych infekcji pomocna okazuje się identyfikacja zwiększonego ryzyka pojawiania się nowych chorób, np. zwiększona częstotliwość kontaktów między zwierzętami a człowiekiem (Morse 2012 [90]).

Technika PCR była stosowana w celu detekcji DNA *B. burgdorferi* s.l. w wycinkach skóry, próbkach krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz mazi stawowej. Najlepsze efekty uzyskiwano stosując metodę u pacjentów z boreliozowym zapaleniem stawów, specyficzne DNA było wykrywane w 85% próbek mazi stawowej. Czulość reakcji PCR w przypadku próbek płynu mózgowo-rdzeniowego była znacznie niższa – patogeny wykrywano w ten sposób w <40% próbek pobranych od pacjentów z neuroboreliozą. Czulość wykrywania *B. burgdorferi* s.l. z wycinków skóry pobranych od pacjentów z EM była porównywalna do metody hodowli bakteryjnej (25% - 90%). Czulość metody PCR w wykrywaniu patogenów w wycinkach skóry pobranych od chorych z zanikowym zapaleniem skóry wahała się od 20% do 90%. Technika PCR, z różnym skutkiem, była również wykorzystywana do wykrywania patogenów w próbkach moczu (Czubasiewicz 2013 [31]; Marques 2010 [80]; Murray 2010 [92]). Konwencjonalny PCR, nested („gniazdowy”) PCR, Real-Time PCR, stosowane są również w diagnostyce HGA, w identyfikacji *A. phagocytophilum* w próbkach krwi i tkanek. Metody te bazują na detekcji sekwencji DNA specyficznych dla tego gatunku, między innymi amplifikowane są fragmenty następujących genów: *16S rRNA*, *groEL* i *p44* (Brouqui 2004 [13]). Różne warianty *A. phagocytophilum* zostały genetycznie scharakteryzowane. Podział gatunku na filogenetyczne subrodziny został dokonany na podstawie hodowli komórkowych, eksperymentalnych infekcji, metod PCR i technik sekwencjonowania. Hodowle *A. phagocytophilum* w liniach komórkowych zostały opisane dla szczepów wyizolowanych od człowieka, konia, psa, sarny i owcy (Stuen 2013 [137]).

5.1.1 TECHNIKI WYKORZYSTUJĄCE SONDY MOLEKULARNE

Metody oparte na hybrydyzacji sond molekularnych są znane od dawna, i są nadal wykorzystywane w laboratoriach badawczych. Największą zaletą tej grupy metod jest możliwość specyficznej identyfikacji danego gatunku mikroorganizmu lub wirusa, a nawet konkretnego szczepu. Przykładem techniki opartej na sondach molekularnych jest technika bDNA (ang. *branched DNA*). Metoda ta oparta jest w przeciwieństwie do reakcji PCR na amplifikacji sygnału, a nie fragmentu kwasów nukleinowych. W metodzie tej kompleks poszukiwanej sekwencji z syntetyczną sondą hybryduje z rozgałęzionymi cząsteczkami DNA (bDNA). Powstały w ten sposób kompleks trójskładnikowy inkubuje się z substratem o właściwościach chemiluminescencyjnych, co umożliwia pomiar sygnału. Technika wymaga przynajmniej 9 godzinnego etapu inkubacji. Metoda ta wykorzystywana była w detekcji takich patogenów jak cytomegalowirus, wirus zapalenia wątroby typu B, HIV. Metoda jest stosunkowo czuła, w przypadku metody wykrywania wirusa HIV, limit detekcji wynosi 73 kopie/ml (Fairfax 2013 [45]).

Inną techniką opartą na wykorzystaniu sond molekularnych jest technika PNA-FISH, która stanowi modyfikację standardowej metody FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*). Wykorzystuje się w niej fluorescencyjnie znakowane sondy PNA (peptydowe kwasy nukleinowe), syntetyczne analogi DNA, które różnią się pod względem chemicznym od sond wykorzystywanych w standardowej metodzie FISH. Sondy PNA to cząsteczki kwasu peptydonukleinowego, w których ujemnie naładowany szkielet fosforanowo-cukrowy występujący w DNA zastąpiono obojętnym

elektrycznie fragmentem poliamidowym lub peptydowym. Sondy te wiążą się z wysokim powinowactwem do wybranych fragmentów DNA/RNA. Technika PNA-FISH znalazła zastosowanie w identyfikacji patogenów w przebiegu sepsy. Ze względu na wysoki koszt syntezy sond PNA, metoda ta ma ograniczone zastosowanie (Fairfax 2013 [45]).

5.1.2 TECHNIKI OPARTE NA AMPLIFIKACJI KWASÓW NUKLEINOWYCH

Wśród metod opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych wymienić można metody izotermalne, takie jak amplifikacja przemieszczającej się nici (SDA, ang. *strand displacement amplification*) oraz amplifikacja oparta o transkrypcję (TMA, ang. *transcription mediated amplification*). Technika SDA wykorzystuje właściwości polimerazy Phi29 izolowanej z faga *Bacillus subtilis*. Technika umożliwia amplifikację dużych kolistych i liniowych cząsteczek DNA. Długość produktu może sięgać 10 – 40 tysięcy zasad. Amplifikację można przeprowadzać bezpośrednio z próbek, bez konieczności wcześniejszej hodowli. Technika TMA polega na wykryciu produktów amplifikacji, przy zastosowaniu starterów ze znacznikami chemiluminescencyjnymi. W technice tej wykorzystuje się polimerazę RNA (transkrypcja RNA) oraz odwrotną transkryptazę (synteza DNA). Metoda jest wykorzystywana do detekcji zarówno RNA jak i DNA. Wielkość sygnału jest proporcjonalna do powstałego RNA. Metoda ta pozwala na zredukowanie ryzyka kontaminacji, ze względu na mniejszą trwałość cząsteczki RNA. Technika TMA wykorzystywana była w bezpośredniej detekcji *Mycobacterium tuberculosis*, HIV, wirusa zapalenia wątroby typu B.

Reakcja Real-Time PCR

Obecnie dąży się do opracowywania metod, które byłyby zarówno czułe jak i specyficzne, przy jednoczesnym obniżeniu kosztów i skróceniu czasu analizy. Najbardziej rozpowszechnioną i najczęściej stosowaną metodą detekcji kwasów nukleinowych jest reakcja PCR. Posiada ona wiele odmian, które różnią się czasem analizy, czułością i przeznaczeniem.

Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) stał się złotym standardem w ilościowym oznaczaniu kwasów nukleinowych, np. liczebności mikroorganizmów (Hou 2010 [59]). W ostatnich latach nastąpił burzliwy rozwój metod qPCR w rutynowej diagnostyce chorób zakaźnych, w szczególności chorób bakteryjnych. Techniki te dobrze nadają się do szybkiego wykrywania bakterii bezpośrednio w próbach klinicznych, co pozwala na czułe i specyficzne potwierdzenia infekcji w krótkim czasie. Techniki te są szczególnie przydatne w diagnostyce zakażeń spowodowanych przez gatunki wymagające specjalnych warunków hodowlanych. Technika Real-Time PCR pozwala również na szybką ocenę obecności genów odporności na antybiotyki oraz intensywności zakażenia pacjenta, co umożliwia optymalizację terapii (Maurin 2012 [84]).

W przypadku techniki Real-Time PCR, detekcja kwasów nukleinowych może być niespecyficzna (z użyciem barwników, takich jak SYBR Green niespecyficznie wiążących się z DNA), jednak jest ona coraz rzadziej stosowana oraz specyficzna z wykorzystaniem znakowanych sond

molekularnych. Wykorzystywane są trzy główne specyficzne systemy detekcji: sondy hybrydazyjne, sondy typu TaqMan oraz Molecular Beacon.

Systemy oparte na sondach hybrydazyjnych wykorzystują zjawisko FRET (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), czyli zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencyjnego. Sondy te zaprojektowane są w sposób umożliwiający im hybrydazję w miejscach w cząsteczce DNA oddalonych od siebie o kilka nukleotydów. Gdy sondy te połączą się z docelową sekwencją zachodzi transfer energii od fluorofora donorowego do akceptorowego i emitowany jest sygnał fluorescencyjny. W przypadku użycia sond hybrydazyjnych możliwy jest pomiar temperatury topnienia (T_m) powstałego kompleksu amplikon-sonda. W przypadku, gdy w obrębie sekwencji występują niesparowane nukleotydy, T_m ulega obniżeniu. Fakt ten wykorzystywany jest w teście diagnostycznym, który odróżnia wirusy *Herpes simplex* typu 1 i 2 (Fairfax 2013 [45]).

Molecular beacons to sondy DNA posiadające strukturę tzw. spinki do włosów. Sekwencja pętli jest komplementarna do specyficznej matrycy, a sekwencje przylegające (10-15 nukleotydów) są komplementarne do siebie nawzajem. Na końcach 5' oraz 3' znajdują się barwniki reporterowy (ang. *reporter dye*) i wygaszający (ang. *quencher*). W roztworze struktura szpilki jest zamknięta i następuje wygaszenie fluorescencji. W obecności sekwencji komplementarnej, sonda rozwija się i hybryduje z matrycą, przez co następuje rozdzielenie barwników i emitowany jest sygnał fluorescencyjny (Ciesielska 2008 [24]).

W systemie TaqMan wykorzystuje się jedną znakowaną fluorescencyjnie sondę o długości 20-30 nukleotydów i T_m o 5-10°C wyższej niż T_m starterów. Na końcu 5' sondy umieszczony jest barwnik reporterowy, którego spektrum emisji tłumione jest przez wygaszacz umieszczony zazwyczaj na końcu 3' sondy. Dzięki zablokowaniu końca 3' sonda nie może być wykorzystywana jako starter. Do barwników reporterowych należą np. FAM, JOE, Cy3, Cy5, ROX, Texas Red, TET i HEX, a do barwników wygaszających np. DABCYL i TAMRA. Podczas reakcji PCR sonda wiąże się z docelową sekwencją DNA, pomiędzy miejscami wiązania starterów. Podczas etapu wydłużania starterów sonda jest degradowana przez polimerazę Taq, dzięki jej aktywności 5' → 3' egzonukleolitycznej. Degradowana sonda uwalnia fluorochrom, przez co następuje wzrost fluorescencji, który ulega kumulacji w kolejnych cyklach. Ze względu na degradację sondy, nie jest możliwy pomiar T_m amplikonu (Ciesielska 2008 [24]). Metody oparte na sondach TaqMan są też stosunkowo łatwo optymalizowane, a dzięki coraz większej popularności urządzeń do prowadzenia reakcji Real-Time PCR, bardzo często metody wykorzystujące sondy TaqMan wykorzystuje się w rutynowych analizach.

Dzięki możliwości zastosowania różnych barwników fluorescencyjnych, w technice Real-Time PCR możliwe jest wykrywanie wielu celów molekularnych w jednej reakcji (tzw. reakcje multiplex). Zastosowanie konwencjonalnych systemów, np. typu TaqMan umożliwia detekcję do 4 – 5 różnych sekwencji w jednej mieszaninie reakcyjnej. W literaturze naukowej opisano wiele metod opartych na technice Real-Time PCR umożliwiających specyficzną detekcję *Borrelia burgdorferi* s.l. (na przykład Briciu 2016 [12]; Wolff 2011 [167]; Wang 2003 [155]; Exner 2003 [44])

i *A. phagocytophilum* (na przykład Stephenson 2015 [135]; Drazenovich 2006 [36]; Reinbold 2010 [109]), jednak niewiele jest metod, które umożliwiałyby jednoczesną detekcję kilku patogenów w próbach. Courtney i wsp. (2004) [29] opisali metodę równoczesnej detekcji *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* za pomocą metody real-time PCR z wykorzystaniem sond typu TaqMan. W powyższej metodzie amplifikowane były fragmenty genu *fla* oraz *msp2*. Metoda, choć czuła i specyficzna, ze względu na wykorzystanie bardzo zmiennego genu w przypadku *A. phagocytophilum* może mieć ograniczone zastosowanie w identyfikacji patogenów z różnych regionów świata. Chan i wsp. (2013) [18] opracowali real-time PCR z zastosowaniem sond typu Molecular Beacon do detekcji trzech patogenów: *B. burgdorferi* s.l., *Babesia microti* i *A. phagocytophilum* w próbach krwi. Metoda ta nie była jednak testowana na izolatach uzyskanych z kleszczy. Autorzy innej pracy (Hojgaard i wsp. 2014 [57]) przedstawili dwie metody real-time PCR do detekcji *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* i *B. microti* tych stawonogach. Podobnie jak w przypadku metody zaprezentowanej przez Courtney i wsp., amplifikowane były między innymi bardzo zmienne geny, dlatego użyteczność tej metody w przypadku szczepów występujących w Europie może być ograniczona. Nie odnaleziono prac, które przedstawiałyby metody detekcji więcej niż trzech patogenów jednocześnie. W niniejszej pracy zaprojektowano układ oparty o sondy typu TaqMan, umożliwiający docelowo detekcję czterech różnych patogenów człowieka w badanych próbkach: *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. z grupy gorączek plamistych (SFG) i tzw. „dużych” *Babesia* spp. (*B. divergens*, *B. venatorum*). Takie podejście skraca czas analizy, a także w dużej mierze ogranicza jej koszty, ze względu na fakt, że można ją wykonać w jednej mieszaninie reakcyjnej. Wykonane na potrzeby niniejszej pracy analizy potwierdziły, że metoda może być stosowana w badaniach środowiskowych. Prawdopodobnie, zaprojektowany układ mógłby być wykorzystywany również do detekcji powyższych patogenów w innych rodzajach materiału, np. materiale klinicznym, jednak takie wykorzystanie wymagałoby dodatkowego etapu walidacji metody.

Sekwencjonowanie

Wraz z rozpowszechnieniem i obniżeniem kosztów metod molekularnych, sekwencjonowanie, z niszowej metody o ograniczonym zastosowaniu, stało się standardem w badaniach mikrobiologicznych, pozwalających na poznanie zależności filogenetycznych. Obecnie, w analizie kwasów nukleinowych w próbach klinicznych i środowiskowych coraz częściej wykorzystuje się szybkie i wydajne techniki, takie jak mikromacierze DNA i sekwencjonowanie typu shotgun (Relman 2011 [111]). Ze względu na wysoką różnorodność genetyczną mikroorganizmów, w tym również *A. phagocytophilum* i *B. burgdorferi* s. l. będących przedmiotem niniejszej pracy, poznanie sekwencji poszczególnych genów w badanym materiale jest często niezbędne dla określenia potencjału patogenicznego danej bakterii czy wirusa (por. sekcje 5.3.3 i 5.4.3). Sekwencjonowanie coraz częściej wykorzystuje się również z rutynowej diagnostyce.

Poznanie sekwencji genetycznych patogenów umożliwia projektowanie i opracowanie czułych i specyficznych testów diagnostycznych. Na podstawie zdeponowanych w banku genów sekwencji można zauważyć, że występowanie wariantów genetycznych danego gatunku bakterii jest zależne

od regionu geograficznego. W projektowaniu metod diagnostycznych opartych na detekcji kwasów nukleinowych należy wziąć powyższy fakt pod uwagę. Wybór zmiennego regionu DNA jako celu molekularnego dla metody może skutkować tym, że metoda będzie cechowała się zbyt wysoką specyficznością, nie pozwalając na detekcję całego zakresu szczepów należących do danego gatunku. W niniejszej pracy zaprojektowano układ oparty o geny silnie zakonserwowane, które umożliwiają detekcję całego spektrum wariantów genetycznych danego gatunku, jednocześnie starano się zminimalizować ryzyko reakcji krzyżowych z patogenami należącymi do innych gatunków (por. sekcja 4.1 oraz Aneks).

5.1.3 TECHNIKA qPCR W BADANIACH PATOGENÓW W KLESZCZACH

Dotychczas opublikowano nieliczne prace, które opisują wykorzystanie techniki qPCR do ilościowego oznaczania patogenów w kleszczach. Wang i wsp. (2003) [155] badali intensywność zakażenia krętkami *B. burgdorferi* w kleszczach *I. scapularis* pozyskanych ze środowiska oraz eksperymentalnie zainfekowanych. W badaniu wykorzystana została metoda z krzywą standardową. Amplifikowany był fragment genu *recA*. Liczba patogenów w kleszczach wahała się pomiędzy 25 do 197 000 (średnio 1 964 krętka w nimfach i 5 351 krętka w osobnikach dorosłych). Autorzy ponadto ocenili, że do efektywnej transmisji patogenów z kleszcza do myszy minimalna bakteremia w kleszczach musi wynosić 300 krętków. W innym badaniu ilościowe oznaczanie krętków w kleszczach *I. scapularis* wykonywano za pomocą techniki qPCR amplifikując fragment genu *flaB* (Wang 2014 [156]). Liczba krętków w kleszczach wahała się od 36 do 390 000 (średnio – 80 bakterii). Najwyższą liczbę mikroorganizmów zanotowano w kleszczu (samiec) znalezionym na skórze psa, z którego zdjęto wcześniej częściowo najedzoną samicę. Piesman i wsp. (2001) [102] badali wzrost liczby krętków w nimfach kleszczy *I. scapularis* podczas pobierania pokarmu. Amplifikowany był gen kodujący flagelinę za pomocą techniki qPCR. Liczba krętków w kleszczach gwałtownie wzrosła (sześciokrotnie) od 998 przed przyłączeniem do żywiciela do 5 884 po 48 godzinach pobierania krwi. W śliniarkach, liczba krętków wzrosła 17-krotnie od wartości 1,2 przed przyłączeniem do 20,8 w 72 godziny po przyłączeniu do żywiciela. Najgwałtowniejszy wzrost liczby krętków w śliniarkach obserwowano między 48 a 60 godziną pobierania pokarmu, co koreluje z największym ryzykiem infekcji. Ornstein i Barbour (2006) [98] oznaczali liczbę krętków w kleszczach *I. scapularis* za pomocą techniki odwrotnej transkrypcji połączonej z real-time PCR z krzywą standardową. Amplifikowano fragment genu 16S rRNA. Średnia liczba kleszczy w głodnych nimfach wynosiła 2 240, natomiast w kleszczach najedzonych wzrosła do 223 900. Herrmann i wsp. (2013) [55] określali liczbę bakterii *B. burgdorferi* s.l. w kleszczach *I. ricinus* (głodne nimfy zebrane ze środowiska). Średnia liczba krętków wynosiła 15 556, podczas gdy zakres był bardzo szeroki (1-496 000). Autorzy porównywali również intensywność infekcji w zależności od genogatunku krętków.

W przypadku bakterii z rodzaju *Anaplasma* odnaleziono jedynie jedną pracę mającą na celu określenie intensywności infekcji w kleszczach (Ramos 2014 [106]). Żerujące na psach kleszcze należące do gatunku *Rhipicephalus sanguineus* badano na obecność *A. platys* za

pomocą techniki qPCR. Amplifikowany był fragment genu 16S rRNA. Autorzy zanotowali wyższą intensywność infekcji u samic niż u nimf oraz u kleszczy najedzonych niż u nienajedzonych, jednak bezwzględne wartości nie są podane.

5.1.4 WPŁYW POSTACI DNA NA WYDAJNOŚĆ REAKCJI QPCR

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym stanowi obecnie złoty standard w określaniu liczby kopii DNA w próbce. Pomimo powszechnego zastosowania w szeregu aplikacji metoda ta jest wrażliwa na błędy. Wiele czynników wpływa na reakcję PCR. Jednym z nich jest postać DNA, która może oddziaływać na wydajność amplifikacji. Wybór standardu ma istotne znaczenie, szczególnie w przypadku absolutnej kwantyfikacji, w której różnice w wydajności amplifikacji standardu i badanej matrycy mają wpływ na uzyskane wyniki. Najczęściej stosowanymi standardami w PCR są plazmidy niosące powielany fragment DNA (Hou 2010 [59]). Plazmidy to niewielkie cząsteczki DNA występujące zwykle w postaci superskręconej (najczęstsza postać jaką przyjmuje nieprzecięta cząsteczka plazmidu), mogą występować również jako kolistą otwartą cząsteczka lub w postaci liniowej (Latulippe 2009 [74]). Plazmidy wykazują znacznie wyższą stabilność w warunkach przechowywania niż produkty reakcji PCR, które również mogą być wykorzystywane jako standard. Są one bardziej wytrzymałe na cykliczne rozmrażanie i zamrażanie (Dhanasekaran 2010 [34]).

Wpływ postaci DNA na reakcję qPCR został po raz pierwszy opisany przez Chen i wsp. (2007) [19]. Stosując superskręcone plazmidowe DNA i mitochondrialne DNA autorzy wykazali, że zmiany konformacyjne materiału genetycznego mają znaczny wpływ na kwantyfikację kwasów nukleinowych w reakcji qPCR. Zaburzenie negatywnych superskręceń przez wprowadzenie pęknięć w łańcuchu wpłynęło na znaczny wzrost wydajności amplifikacji, podczas gdy sama relaksacja skrętów przez zastosowanie topoizomerazy I miała ograniczony wpływ na wydajność reakcji. Prawdopodobną przyczyną różnic w wydajności reakcji PCR jest większa dostępność liniowej formy DNA dla wiązania starterów oraz samej polimerazy podczas wydłużania łańcucha DNA, co prowadzi do efektywniejszej amplifikacji (Chen 2007 [19]).

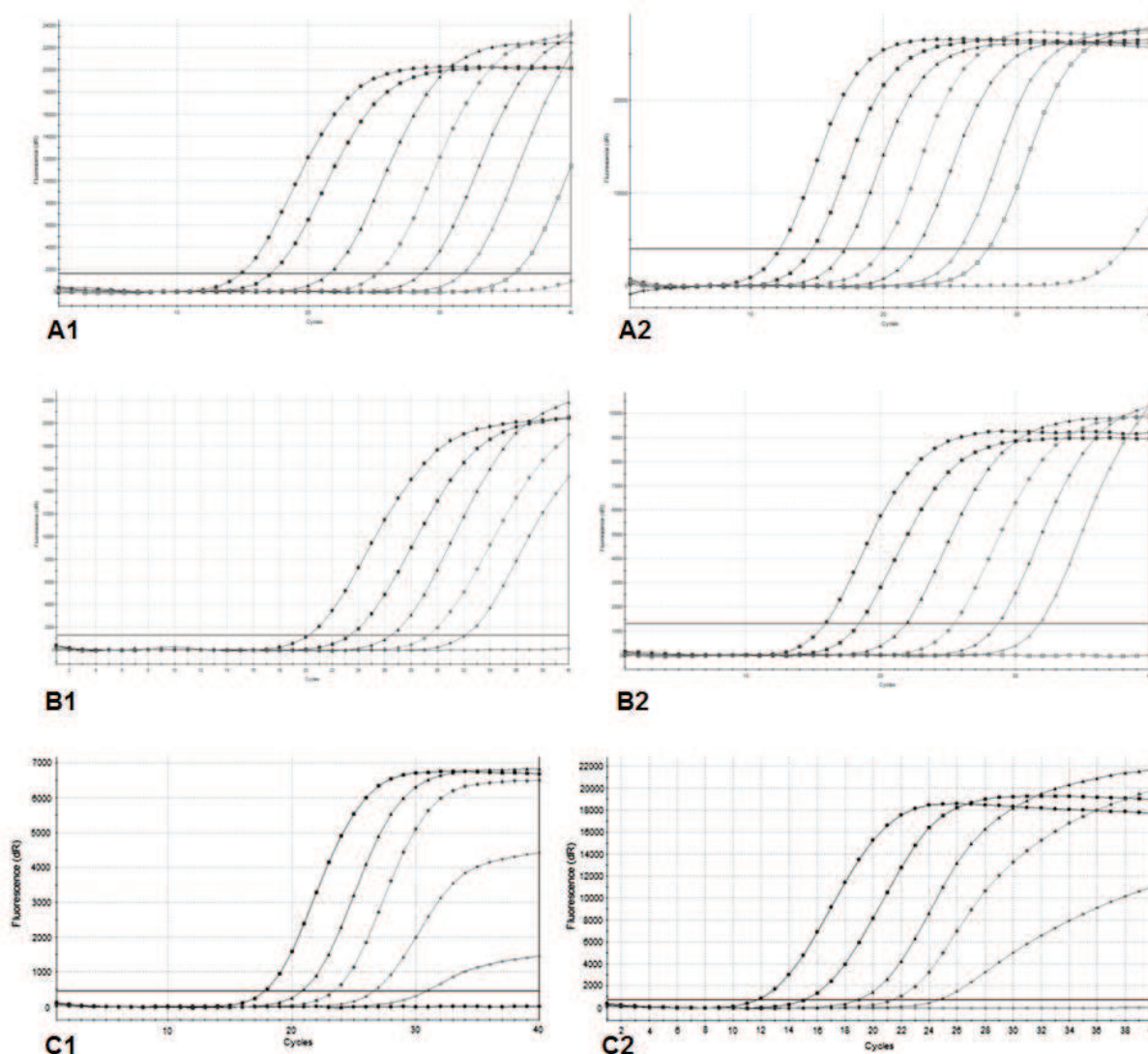
Dalsze badania w tym zakresie dowiodły, że stosowanie kolistych, superskręconych cząsteczek DNA jako standardów reakcji qPCR może prowadzić do znacznego zawyżenia otrzymanych wyników. Hou i wsp. (2010) [59] ocenili różnice w wydajności reakcji PCR przy zastosowaniu jako standardy plazmidów w postaci kolistej (superskręconej) oraz liniowej. Autorzy porównywali dokładność zyskanych wyników qPCR, w której jako standardy użyty został plazmid kolisty (głównie w postaci superskręconej) i DNA w formie liniowej (plazmid zlinearyzowany lub amplikon PCR). Jako modelowy gen użyto gen jądrowy *pcna* (gen powszechnie występujący u organizmów eukariotycznych), izolowany z pięciu różnych gatunków mikroalg morskich. W badaniu wykazano, że w reakcji PCR, w której zastosowano plazmidy koliste jako standardy cykl progowy był o 2,65 – 4,38 wyższy w porównaniu do cyklu progowego reakcji, w których zastosowano równomolowe ilości standardów liniowych. Chociaż udokumentowana sekwencja genomu *Thalassiosira pseudonana* wykazała, iż organizm ten posiada jedną kopię genu *pcna*, badania za pomocą qPCR

przy użyciu kulistego plazmidu jako standardu wykazywały 7,77 kopii genomu PCNA natomiast, zastosowanie standardu liniowego dało wynik 1,02 kopii. Autorzy wysunęli wniosek, że koliste plazmidy nie nadają się jako wzorzec w reakcji PCR, w której oznaczana jest absolutna liczba kopii DNA w próbce. Znaczne przeszacowanie liczby kopii badanego DNA wynika prawdopodobnie z niższej wydajności reakcji PCR w początkowych cyklach, gdy sygnał pochodzący od sond nie jest jeszcze wykrywalny (Hou 2010) [59]. W późniejszym stadium reakcji PCR wydajność wzrasta, gdyż matrycą dla nowo powstających amplikonów są już powielone fragmenty DNA w formie liniowej.

W celu zweryfikowania hipotezy, że postać plazmidowego DNA stanowiącego kontrolę pozytywne służące do sporządzenia krzywej standardowej może mieć wpływ na uzyskane wyniki ilościowego oznaczania patogenów, porównano amplifikację plazmidów kolistych do plazmidów zlinearyzowanych, uzyskanych przez trawienie enzymami restrykcyjnymi. Porównano amplifikację seryjnych rozcieńczeń poszczególnych plazmidów.

Uzyskane wyniki potwierdzają istnienie znacznych różnic w amplifikacji w zależności od tego, jaki typ plazmidu został użyty. W przypadku plazmidów kolistych przy podobnych stężeniach cykl progowy C_t był osiągany znacznie później niż w przypadku plazmidów liniarnych. Różnice wynosiły od 4 do 8 cykli, w zależności od metody (Ryc. 34).

Uzyskane wyniki wskazują, że metoda ilościowego oznaczania kopii DNA w próbce za pomocą techniki Real Time PCR jest podatna na błędy, wynikające nie tylko z błędów w przygotowywaniu próbek, np. podczas oczyszczania DNA, czy przygotowywania reakcji PCR (błędy przypadkowe) ale również na błąd systematyczny, wynikający z różnic w wydajności amplifikacji matrycy w próbkach kontrolnych i badanych. Błąd taki jest dużo bardziej znaczący, ze względu na znaczny wpływ na wyniki amplifikacji (wielokrotne zawyżenie wyników).



Ryc. 34 Porównanie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń plazmidów kolistych (1) i lincarnych (2) dla poszczególnych metod.

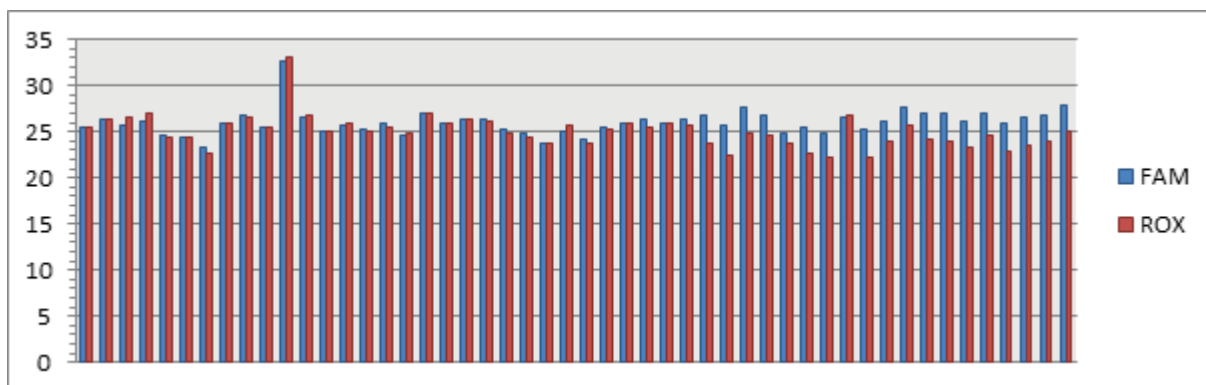
A: Plazmid pJet1- Bb23S (ROX) (amplifikacja fragment genu 23S *B. burgdorferi* s.l.),
 B: Plazmid pJet1- Bb23Sp (FAM) (amplifikacja fragment genu 23S *B. burgdorferi* s.l.),
 C: Plazmid pJet1-Aph16S (amplifikacja fragment genu 16S rRNA *A. phagocytophilum*).

Z powyższych powodów, uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki nie mogą być interpretowane jako wartości absolutne, były jedynie interpretowane jako wartości względne.

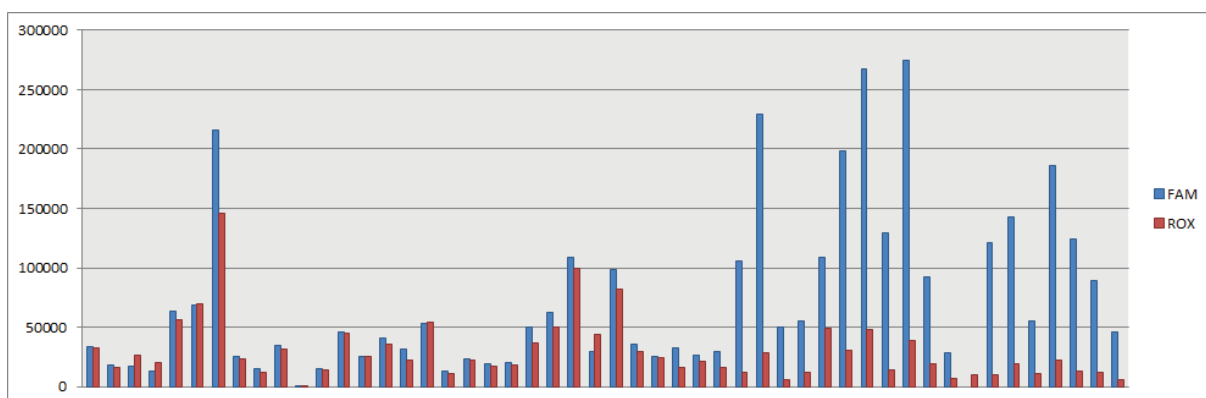
5.1.5 RÓŻNICE W ILOŚCIOWYM OZNACZANIU PATOGENÓW W ZALEŻNOŚCI OD ZASTOSOWANEJ METODY

W ramach dodatkowych analiz porównano różne metody ilościowe oznaczania krętków *Borrelia* w próbkach kleszczy (metoda opracowana na potrzeby pracy oraz metoda opisana w literaturze (Courtney 2004 [29]). Badania zostały wykonane we współpracy z niezależnym laboratorium (A&A Biotechnology, Gdynia). Obie metody wykorzystują startery i sondę specyficzną do fragmentu genu 23SrRNA, w związku z czym nie należy się spodziewać różnic wynikających z

innej liczby kopii genu na genomie. Na wykresach poniżej zestawiono wyniki uzyskane dla obu metod: porównanie średnich wartości C_t (Ryc. 35) oraz średnie wartości liczby patogenów w kleszczach (Ryc. 36).



Ryc. 35 Porównanie wartości C_t dla wybranych próbek kleszczy przy użyciu metody opisanej w literaturze (FAM) oraz metody opracowanej w ramach pracy (ROX).



Ryc. 36 Porównanie intensywności zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* spp. dla wybranych próbek kleszczy przy użyciu metody opisanej w literaturze (FAM) oraz metody opracowanej w ramach pracy (ROX).

Dodatkowe analizy potwierdziły stosunkowo wysokie wyniki ilościowe uzyskiwane za pomocą techniki Real-Time PCR. Wartości mieściły się w zakresie $200-2,75 \cdot 10^5$ krętków w badanych próbkach.

Ponadto wykazano, że wartości C_t były zbliżone dla większości próbek, niezależnie od zastosowanego układu. Jednakże, w przypadku ok. 30% próbek wartości C_t różniły się w dość znacznym stopniu. Warto zwrócić uwagę, że różnice w większości przypadków prowadziły do wyższych wartości jednego z układów (metody z piśmiennictwa). Uzyskane rezultaty mogą mieć różne przyczyny, np. niespecyficzność opublikowanej metody, prowadząca do zawyżania wyników ze względu na jednoczesną amplifikację fragmentów DNA pochodzących z zanieczyszczeń próbek, bądź współwystępujących mikroorganizmów w kleszczach. Inną przyczyną może być różna podatność obu metod na inhibitory reakcji PCR, które mogą występować w próbkach pobranych ze środowiska.

Ze względu na znaczne różnice uzyskiwane za pomocą obu metod, porównywanie wyników uzyskanych obiema metodami ma ograniczoną wartość poznawczą. Wyniki analiz potwierdzają

jednak przydatność obu metod w analizie ilościowej mikroorganizmów, pod warunkiem, że porównania będą miały charakter relatywny, a nie bezwzględny.

5.2. AKTYWNOŚĆ KLESZCZY *IXODES RICINUS*

W poniższej sekcji omówiono aspekty związane występowaniem kleszczy i epidemiologią chorób odkleszczowych w kontekście uzyskanych wyników. Przybliżono również zagadnienie profilaktyki chorób i zwalczania wektorów ich czynników etiologicznych.

5.2.1 ZMIANY W WYSTĘPOWANIU KLESZCZY I ICH WPŁYW NA EPIDEMIOLOGIĘ CHORÓB ODKLESZCZOWYCH

Na geograficzne rozprzestrzenienie kleszczy *I. ricinus* w Europie wpływa wiele czynników. Ogden i wsp. (2013) [97] wykorzystali model matematyczny w celu opisu zmian zasięgu występowania kleszczy oraz przenoszonych przez nie patogenów. Autorzy jako główne czynniki odpowiedzialne za rozszerzanie się populacji kleszczy oraz związanych z nimi patogenów wyodrębnili zmiany klimatyczne, zmiany w środowisku oraz zmiany w populacjach żywicieli tych pasożytów. Zmiany w występowaniu tych kleszczy częściowo związane są ze klimatem, jednak większe znaczenie mają czynniki pozaklimatyczne, takie jak zarządzanie przyrodą, które wpływa na dostępność żywicieli kleszczy (Medlock 2013 [86]). Najważniejsze czynniki i ich mechanizm działania i wpływ na biologię kleszczy *I. ricinus* przedstawiono w

Tab. 16 oraz na diagramie (Ryc. 37).

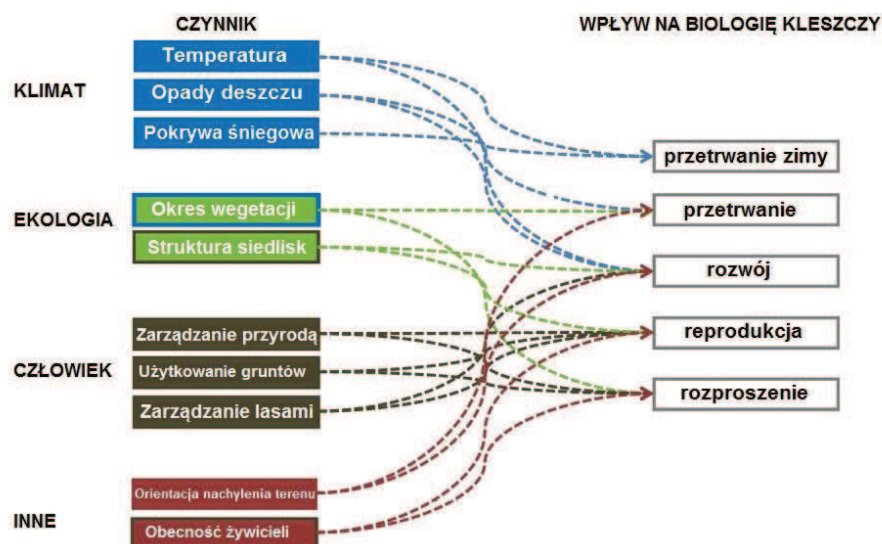
Tab. 16 Przegląd kluczowych czynników wraz z mechanizmami działania oraz wpływ na geograficzne rozmieszczenie kleszczy *I. ricinus* w Europie (Medlock 2013 [86]).

Główny czynnik	Czynnik	Mechanizm działania	Wpływ na biologię kleszczy	Wpływ na rozprzestrzenienie lub obfitość		
				Pionowe	Poziome	Strefy endemiczne
Klimat	Temperatura	Wzrost temperatury zimą	Wyższa przeżywalność	X	x	
		Ogólny wzrost temperatury	Wydłużenie okresu rozwoju	X	x	
	Deszcz	Wzrost wilgotności	Wydłużenie okresu rozwoju, wyższa przeżywalność	X	x	
	Śnieg	Izolacja, temp. gruntu nie spada poniżej 0°C	Wyższa przeżywalność	X	x	
	Przedłużona wegetacja	Ekspansja lasów liściastych	Odpowiedni mikroklimat dla przetrwania i rozwoju kleszczy	X	x	
		Rozprzestrzenienie się populacji sarny	Ułatwione rozprzestrzenianie się i reprodukcja	X	x	
Człowiek	Zarządzanie dziką przyrodą	Rozwój siedlisk kleszczy	Wzrost rozprzestrzenienia kleszczy	x	x	
		Rozwój siedlisk żywicieli				x
	Zmiany w użytkowaniu gruntów	Zwiększona liczba żywicieli	Wzrost reprodukcji			
		Rozwój siedlisk kleszczy	Wzrost rozprzestrzenienia kleszczy	x	x	
	Zwiększona liczba żywicieli	Wzrost reprodukcji				x
Zarządzanie terenami zalesionymi	Zalesianie, tworzenie dogodnych siedlisk		x	x	x	
Ekologia/geografia	Struktura siedlisk	Powstawanie odpowiedniego środowiska	Wzrost reprodukcji i rozwoju			x
		Rozprzestrzenienie żywicieli	Ułatwione rozprzestrzenianie się kleszczy			x
	Orientacja nachylenia stoków	Wpływ na mikroklimat	Wpływ na przeżycie, rozwój	x		
	Rozprzestrzenienie żywicieli	Przystosowanie żywicieli do obecności człowieka	Wzrost reprodukcji i rozprzestrzenienia			x

Zmiany klimatu wpływają na obfitość, przeżycie i aktywność sezonową kleszczy. U *I. ricinus* występuje diapauza podczas okresu zimowego, podczas której ich aktywność zanika na skutek

skracających się dni. Pajęczaki rozpoczynają żerowanie po przerwie, gdy temperatura wzrasta. Łagodne zimy pozwalają kleszczom rozpocząć żerowanie wcześniej, jednak okres wysokich temperatury i suszy wpływają niekorzystnie na ich aktywność. Chłodniejsze zimy mogą wpływać niekorzystnie na przeżycie niewielkich zwierząt, które służą jako żywicieli *I. ricinus*. Z drugiej strony pokrywa śnieżna może korzystnie wpływać na przeżycie samych pajęczaków, przez ograniczenie wahań temperatury (Medlock 2013 [86]).

Sposoby gospodarowania przyrodą i krajobrazem, które wpływają na zmiany w zakresie rozmieszczenia i liczebności kleszczy mają istotne znaczenie w ocenie i zarządzaniu ryzykiem dla zdrowia publicznego związanym z kleszczami i przenoszonymi przez nie patogenami. Lepsze zrozumienie i mapowanie rozprzestrzeniania kleszczy *I. ricinus* (i zmian w obfitości), jest niezbędne do oceny ryzyka rozprzestrzeniania się infekcji związanych z tym gatunkiem. Standaryzacja wykorzystywanych metod oraz intensywniejsze monitorowanie występowania kleszczy umożliwiają skuteczniejsze wykrywanie i śledzenie trendów zmian w tym zakresie i lepszą kontrolę chorób odkleszczowych, co ma wpływ na zdrowie publiczne (Medlock 2013 [86]).



Ryc. 37 Schematyczne ujęcie czynników wpływających na rozmieszczenie kleszczy *I. ricinus*. Czynniki podzielono na bezpośrednio związane ze: zmianami klimatycznymi (niebieski), zmianami ekologicznymi (zielony), zmianami antropogenicznymi (brązowy) i inne (czerwony). (Medlock 2013 [86]).

Coraz częściej obserwowane jest zjawisko migracji kleszczy na tereny zurbanizowane, szczególnie zielone obszary miejskie (proces synantropizacji kleszczy). Sprzyja mu utrzymywanie ogródków działkowych i przydomowych oraz nielegalnych wysypisk śmieci, które wpływają na wzrost populacji gryzoni w małych i dużych miastach. Oprócz gryzoni, także populacje udomowionych zwierząt, ptaki i większe zwierzęta (sarny, dziki) pełnią rolę żywicieli kleszczy w miastach (Rizzoli 2014 [116]). Zjawisku temu prawdopodobnie sprzyja duża plastyczność tych stawonogów (Biaduń 2006 [9]).

Badania populacji kleszczy żyjących na terenach zurbanizowanych potwierdziły, że są one wektorami chorobotwórczych mikroorganizmów. Wykryto w nich obecność wirusa kleszczowego

zapalenia mózgu (KZM), wysoki odsetek osobników zakażony jest także *Borrelia burgdorferi* s.l. Na terenach zurbanizowanych wykrywano również w populacjach kleszczy bakterie z rzędu Rickettsiales (*Anaplasma phagocytophilum*, *Neohhrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica* i *R. monacensis*) (Derdáková 2014 [32], Tappe 2013 [142], Silaghi 2008) [121]), krętki z gatunku *Borrelia miyamotoi* (Reis 2011 [110]) i chorobotwórcze pierwotniaki (*Babesia divergens*, *B. venatorum* i *B. microti*) (Schorn 2011 [118], Silaghi 2012 [123], Cieniuch 2009 [23]).

Problem kleszczy w miastach przyciąga uwagę mieszkańców miast, mediów i specjalistów począwszy od końca XX wieku. Problem ten pojawił się jako wynik zwiększonego tempa urbanizacji, które miały miejsce po II wojnie światowej. Pojęcie "urbanizacji" oznacza, między innymi, powiększenie granic komunalnych kosztem przyległych obszarów zalesionych. Obecne strategie ochrony przyrody i zachowania bioróżnorodności zostały stworzone w odpowiedzi na niekontrolowaną ekspansję obszarów miejskich. Urbanizacja stworzyła nową rzeczywistość w relacji między populacją ludzką i przyrodą, zmniejszył się dystans między mieszkańcami miast i ich otoczeniem. Konsekwencje takiej bliskości mogą być zarówno pozytywne, jak i negatywne i mogą mieć znaczny wpływ na zdrowie mieszkańców (Uspensky 2016 [151]).

Halos i wsp. (2010) [53] badali wpływ zmian środowiskowych, takich jak fragmentacja lasów, charakter fauny i flory na epidemiologię kleszczy i chorób przez nie wektorowanych na przykładzie *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* i *Rickettsia* spp. Przeprowadzone badanie środowiskowe ujawniło, że fragmentacja lasów sprzyja występowaniu patogenów. Zarówno *B. burgdorferi* s.l. jak i *A. phagocytophilum* preferowały takie tereny, natomiast *Rickettsia* spp. częściej występowała u kleszczy na otwartych pastwiskach. Autorzy wysunęli wniosek, że zmiany w terenach zalesionych, prowadzące do powstania większej liczby siedlisk, w których występuje niska roślinność (brzegi lasu, ścieżki) sprzyja zarówno rozprzestrzenianiu się kleszczy, jak i ich żywicieli, szczególnie niewielkich gryzoni, często będących jednocześnie rezerwuarami chorobotwórczych mikroorganizmów, co również wpływa na łatwiejsze rozprzestrzenianie się chorób odkleszczowych. Pozytywną korelację pomiędzy stopniem urbanizacji a zakażeniem kleszczy krętkami *Borrelia* spp. potwierdziły również badania przeprowadzone przez Reye i wsp. (2010) [112].

5.2.2 WYSTĘPOWANIE KLESZCZY Ixodes ricinus w POLSCE

Badania nad występowaniem kleszczy, prowadzone w różnych rejonach Polski potwierdzają obecność tych pasożytów zarówno na terenach leśnych i zurbanizowanych, jak i ich rolę jako wektorów patogenów chorób odkleszczowych. Najszerszej rozpowszechnionymi w Polsce gatunkami kleszczy są *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, jednak większe znaczenie medyczne ma pierwszy z nich, gdyż znacznie częściej atakuje ludzi. Badania środowiskowe prowadzone, m.in., na terenie województwa lubelskiego ujawniły, że aktywność tych kleszczy waha się od 2,5 do 42 kleszczy/h/osobę (Bartosik 2011 [7]). Ponadto, badania środowiskowe wykazały, że wraz z ociepleniem klimatu, może zmieniać się skład gatunkowy kleszczy. Gatunki

preferujące cieplejszy klimat mogą się rozprzestrzeniać stanowiąc potencjalne źródło nowych chorób (Buczek 2011 [14]).

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki świadczą o wysokim zagrożeniu atakiem kleszczy na badanych terenach. Średnie zagęszczenie kleszczy w okresie od kwietnia do września wynosiło 24 do 63 osobniki/h/osobę, w zależności od miejsca odłowu. Najwyższe wartości aktywności kleszczy odnotowano na stanowisku Gdynia Kolibki, na terenie zurbanizowanym o wysokiej antropopresji. Podobne wartości obserwowano na innym podmiejskim stanowisku (Gdynia Chwarzno) w roku 2008. W kolejnym roku aktywność kleszczy na tym stanowisku zmalała, prawdopodobnie ze względu na rozpoczęcie prac budowlanych, co mogło zakłócić naturalny ekosystem. W Sulęczynie aktywność kleszczy była również relatywnie wysoka. Jest to teren rekreacyjny, często odwiedzany przez turystów i wczasowiczów, którzy posiadają tam domki letniskowe. Najmniejsze zagęszczenie kleszczy odnotowano w Kleszczewie, w terenie leśnym, oddalonym od siedzib ludzkich. Powyższe obserwacje potwierdzają, że tereny zurbanizowane stanowią szczególne ryzyko ataku kleszczy, a pośrednio także transmisji patogenów na człowieka.

5.3. EPIDEMIOLOGIA BORELIOZY Z LYME I BIOLOGIA KRĘTKÓW *BORRELIA*

Borelioza z Lyme jest jedną z najczęściej występujących chorób odkleszczowych i od wielu lat cieszy się dużym, niestabnym zainteresowaniem świata naukowego. Niektóre badania wskazują, że liczba przypadków boreliozy znacząco wzrosła w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat. Opublikowano wiele prac poświęconych rozpowszechnieniu i biologii krętków *Borrelia* spp., wektorowanych przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. W niniejszym rozdziale przedyskutowano uzyskane wyniki, zarówno jakościowe jak i ilościowe w kontekście aktualnej wiedzy na temat epidemiologii choroby z Lyme oraz występowania krętków należących do rodzaju *Borrelia* w kleszczach *I. ricinus*.

Jak już wspomniano, kompleks *Borrelia burgdorferi* sensu lato jest niejednorodną grupą krętków obejmującą kilkanaście genogatunków. Dla genogatunków *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. bavariensis* (gatunek blisko spokrewniony z *B. garinii*), *B. afzelii* i *B. spielmanii* (blisko spokrewniony z *B. afzelii*) potwierdzono związek z wywoływaniem choroby z Lyme. Podział na poszczególne genogatunki ma, oprócz uzasadnienia genetycznego, również znaczenie kliniczne. Gatunek *B. burgdorferi* s.s. najczęściej związany jest z zapaleniem stawów, szczególnie w Ameryce Północnej, *B. garinii* powoduje neuroboreliozę, a *B. afzelii* objawy skórne. Obserwuje się również objawy mieszane, natomiast wszystkie genogatunki mogą wywoływać rumień wędrujący. Istnieją dowody, że na kontynencie europejskim, rumień występuje częściej w przypadku zakażenia *B. afzelii*, szczególnie u kobiet, niż w przypadku gatunku *B. garinii*, który związany jest raczej z objawami układowymi. Genogatunki *B. valaisiana* i *B. lusitaniae* nie są obecnie uważane za patogeniczne, jednak *B. valaisiana* wykryto w płynie mózgowo-rdzeniowym metodą PCR, a *B. lusitaniae* wyizolowano u chorego z zapaleniem naczyń. Najmniej informacji jest dostępnych dla *B. bissettii* – gatunku występującego głównie w Kalifornii. Nie wykryto zakażeń tym gatunkiem w USA, jednak istnieją doniesienia o identyfikacji *B. bissettii* u chorych z terenu Europy, w tym z ludzkiej tkanki zastawki serca (EUCALB [43]).

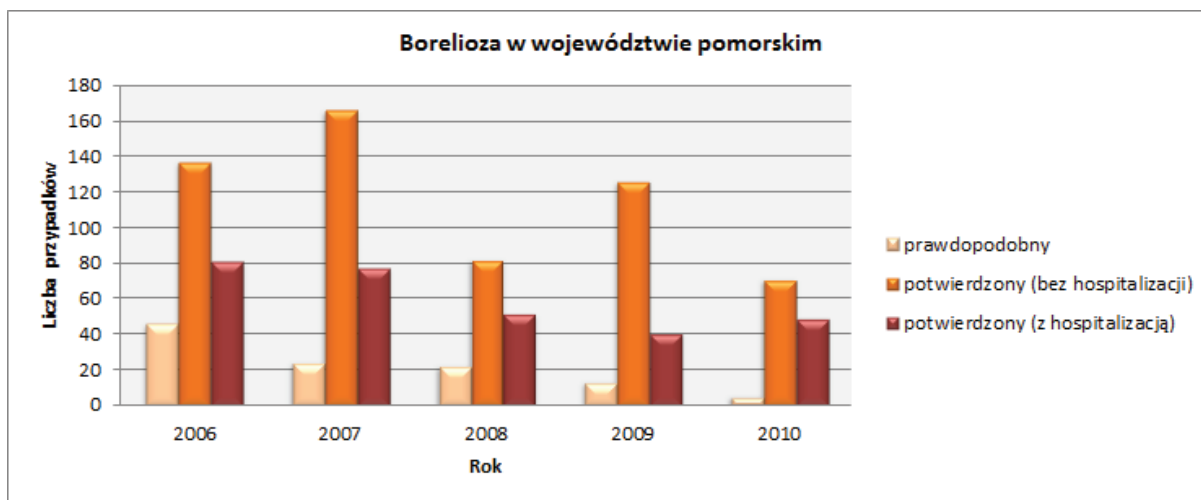
5.3.1 SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA BORELIOZY Z LYME

Najwięcej przypadków choroby z Lyme w Stanach Zjednoczonych występuje w południowej Nowej Anglii, południowo-wschodniej części Nowego Jorku, New Jersey, wschodniej Pensylwanii, wschodniej części Maryland, Delaware oraz w części stanów Minnesota, Wisconsin i Michigan. Ponad trzy czwarte tych przypadków występuje w mniej niż 70 okręgów, co wskazuje na ograniczenie geograficzne choroby. W najbardziej endemicznych obszarach Stanów Zjednoczonych, jak stan Connecticut zapadalność wynosi ok. 0,5 przypadków na 1000 mieszkańców, ale lokalnie może być znacznie wyższa. Najczęściej chorują dzieci w wieku 5 – 10 lat (dwa razy częściej niż osoby dorosłe) (Murray 2010 [92]).

Zgodnie z oceną WHO, cały obszar Europy można uznać za teren endemiczny boreliozy (Mucha 2010 [91]). Większość przypadków boreliozy notuje się w krajach skandynawskich oraz w Europie Środkowej (zwłaszcza w Niemczech, Austrii i Szwajcarii), chociaż choroba z Lyme może

występować na całym kontynencie, w tym także w Wielkiej Brytanii (głównie South Downs i New Forest) (Ryc. 17). Jedynie nieliczne kraje europejskie, w tym Polska, wprowadziły obowiązek zgłaszania przypadków zachorowań na boreliozę. Dane epidemiologiczne można również uzyskać z prospektywnych badań klinicznych, które jednak są kosztowne i czasochłonne, a także metodami pośrednimi, poprzez pomiar gęstości kleszczy na danym terenie, badania serologiczne, jak również badanie stopnia zakażenia kleszczy krętkami *Borrelia* (EUCALB [43]). Odsetek osób posiadających przeciwciała przeciwko krętkom *B. burgdorferi* s.l. wynosi w zależności od kraju 5 – 20%, przy czym nie wszystkie osoby seropozytywne prezentują objawy kliniczne (Biesiada 2010 [10]).

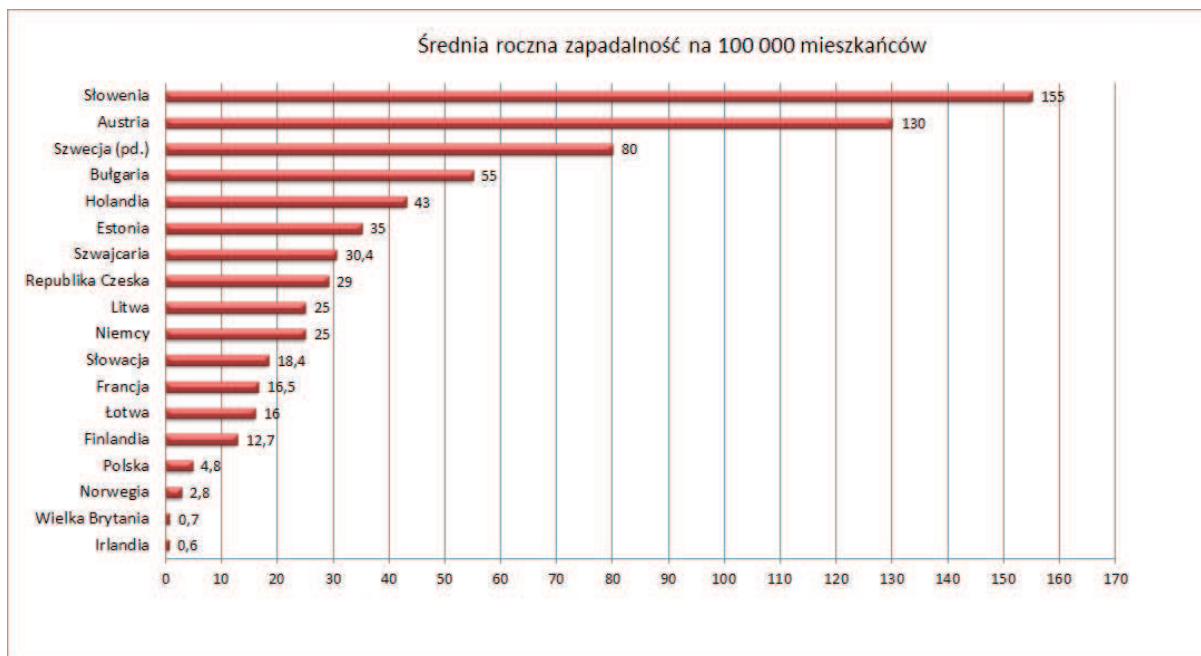
W Polsce nadzór epidemiologiczny nad chorobą z Lyme wprowadzono w 1996 roku. Przypadki dzieli się na prawdopodobne (osoby z objawami klinicznymi późnej boreliozy przy jednoczesnym wykluczeniu innych przyczyn) i potwierdzone (osoby z objawami klinicznymi wczesnej fazy boreliozy tj. rumień wędrujący lub z objawami klinicznymi i potwierdzeniem laboratoryjnym). Dane z lat 1999-2005 wskazują na pięciokrotny wzrost liczby zarejestrowanych zachorowań: z 892 przypadków w 1999 roku do 4406 zachorowań w roku 2005 (Stefanoff 2006 [134]). Wzrost przypadków boreliozy obserwowany był też w latach późniejszych (3 822 przypadki w roku 2004, 9 011 przypadków w roku 2010). Największą zapadalność notowano w województwach podlaskim i warmińsko-mazurskim. Dane epidemiologiczne dla województwa pomorskiego przedstawione są na poniższym wykresie (Ryc. 38).



Ryc. 38 Przypadki choroby z Lyme w województwie pomorskim w latach 2006-2010 (Mucha 2010 [91]).

Borelioza najczęściej notowana jest w miesiącach letnich i jesiennych, jednak notowane są również przypadki w okresach wiosennym, a nawet zimowym, co może mieć związek ze zmianami klimatycznymi, które sprzyjają rozprzestrzenianiu się kleszczy (Mucha 2010 [91]). Ponadto, ze względu na trudności w diagnozie choroby z Lyme, liczba zgłaszanych przypadków w Polsce może być zaniżona. Wiele przypadków może być też zgłaszanych z opóźnieniem, gdyż choroba często jest rozpoznawana dopiero w późnej fazie. Wśród zarejestrowanych zachorowań, 26% zgłoszono z opóźnieniem, które najczęściej wynosiło od 1 do nawet 5 lat od zachorowania. Notuje się także wzrost przypadków boreliozy jako choroby zawodowej. Przyczynami wzrostu zachorowalności

mogą być zmiany zasięgu geograficznego bytowania kleszczy oraz wydłużony okres ich żerowania na skutek zmian klimatycznych, a także zmieniające się sposoby spędzania wolnego czasu przez ludzi i częstsze podróże. Pewną rolę mogą też odgrywać migrujące ptaki, które mogą przenosić zainfekowane kleszcze na obszary do tej pory wolne od boreliozy (Raport GIS 2010 [107]).



Ryc. 39 Średnia zapadalność na boreliozę na 100 000 mieszkańców, na przestrzeni 10 lat w wybranych krajach europejskich (Lingren 2006 [76]).

W USA krętki *B. burgdorferi* są transmitowane głównie przez kleszcze *I. scapularis* oraz *I. pacificus* (wybrzeże Oceanu Spokojnego), w Europie – *I. ricinus*, a w Azji – *I. persulcatus*. Kleszcze należące do rodziny Ixodidae, w tym *I. ricinus* mają 2-3 letni cykl życia obejmujący 4 stadia rozwojowe (por. sekcja 1.2.2). Wykluwające się larwy zwykle nie są zakażone, gdyż bardzo rzadko dochodzi do transowarialnej transmisji krętków z zainfekowanej samicy na potomstwo. Kleszcz może zostać zainfekowany na każdym etapie cyklu życiowego poprzez żerowanie na zakażonym żywicielu, który stanowi rezerwuar krętków. Zazwyczaj są to małe gryzonie. W populacji kleszczy krętki przenoszone są w wyniku transmisji transstadialnej (transmisja pionowa – wertykalna). Larwy zimują i w kolejnym roku przekształcają się w nimfy, które najczęściej przenoszą *B. burgdorferi* na człowieka, gdyż ze względu na niewielkie rozmiary ich ukłucia często nie są zauważane. Postacie dorosłe są zazwyczaj zakażone w większym odsetku, jednak są one dużo łatwiej zauważalne na skórze (Murray 2010 [92]; Marques 2010 [80]).

Poziom zakażonych kleszczy jest bardzo zróżnicowany, w zależności od obszaru. Borelioza rzadko występuje na wybrzeżu Oceanu Spokojnego, gdyż jednym z głównych żywicieli kleszczy *I. pacificus* są jaszczurki, w których surowicy krętki nie są w stanie przetrwać. Natomiast na terenach endemicznych, np. w Nowej Anglii odsetek zakażonych kleszczy wynosi w przybliżeniu 2% dla larw, 15-30% dla nimf i 30-50% dla postaci dorosłych. W krajach Europejskich

odsetek zainfekowanych *I. ricinus* waha się w zależności od kraju, średnio wynosi on 10% dla nimf i 20% dla postaci dorosłych (Murray 2010 [92]).

W Europie, poziom zainfekowania kleszczy został określony przez Hubálek i wsp. (1997) [60] na bazie przeglądu badań epidemiologicznych i środowiskowych. Średni poziom zainfekowania *I. ricinus* wynosił 1.9% (0–11%) dla larw, 10.8% dla nimf (2–43%) i 17.4% dla postaci dorosłych (3–58%).

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki potwierdzają wysoki stopień narażenia zakażeniem boreliozą na terenie Trójmiasta i terenach wiejskich woj. pomorskiego. Odnotowano zarówno wysoką aktywność kleszczy na badanych stanowiskach, a także znaczny stopień zakażenia tych pajęczaków (ok. 30%), zarówno na terenach leśnych, jak i zurbanizowanych o wysokiej antropopresji. Szczegółowa dyskusja otrzymanych wyników została przedstawiona w kolejnych sekcjach.

5.3.2 BORRELIA BURGdorFERI SENSU LATO W POLSCE

Wraz z rozwojem technik molekularnych wzrosła liczba badań nad epidemiologią chorób odkleszczowych. Większość publikowanych prac dotyczy badań nad występowaniem krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. W Tabeli 17 zestawiono wyniki badań z Polski opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat. W większości badań pajęczaki były zbierane z roślinności (kleszcze głodne), w niektórych badaniach materiał stanowiły kleszcze zdejmowane z powierzchni skóry żywicieli (gryznie, gady). Najczęściej stosowaną techniką detekcji zakażenia była technika PCR, w tym także techniki nested-PCR i real-time PCR, jednak dwie ostatnie odmiany były stosowane rzadko. W kilku pracach oprócz detekcji patogenów, określany był również genogatunek krętków. Stosowano w tym celu metodę PCR-RFLP, IFA, hybrydyzację i nested-PCR.

Tab. 17 Badania epidemiologiczne nad występowaniem krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. w kleszczach *I. ricinus* w Polsce (okres od 2005-2015).

Referencje	Metoda	Region	Wyniki
Michalik 2005 [88]	PCR	Polska zachodnio-środkowa	Kleszcze zebrane z gryzoni. Nimfy – 2,2% (<i>B. burgdorferi</i> s.s.). 87,5% dodatnich nimf była zarażona <i>B. burgdorferi</i> s.s.
Lencáková 2006 [75]	PCR/RFLP	Tarnów	22,5% pozytywnych kleszczy: nimfy – 22%, dorosłe – 23%. <i>B. burgdorferi</i> s.s.: nimfy – 67%, dorosłe – 12% <i>B. afzelii</i> : nimfy – 5%, dorosłe – 28% <i>B. garinii</i> : nimfy – 29%, dorosłe – 48% <i>B. valaisiana</i> – dorosłe – 20%
Siński 2006 [124]	PCR	Urwitałt (Mazury)	Kleszcze zebrane z gryzoni: Mysz leśna (<i>A. flavicollis</i>) – 5,7% zainfekowanych larw, 5,5% zainfekowanych nimf, Nornica ruda (<i>M. glareolus</i>) – 4,5% zainfekowanych larw, 7,6% zainfekowanych nimf, Nornik zwyczajny (<i>Microtus arvalis</i>) – 8,6% zainfekowanych larw.

Referencje	Metoda	Region	Wyniki
Cisak 2006 [26]	PCR/hodowla kultur/DMF nested-PCR (oznaczenie gatunku)	Lublin	PCR: 5,4% pozytywnych kleszczy (12,1% samic, 6,0% samców, 1,7% nimf). Hodowla: najniższy poziom zakażenia kleszczy – 3,4%. DMF: najniższy poziom zakażenia kleszczy – 11,2%. 81,4% kleszczy – infekcja jednym gatunkiem, 16,8% - 2 gatunkami, 1,8% - 3 gatunkami. <i>B. burgdorferi</i> s.s. – 62,8% zainfekowanych kleszczy, <i>B. afzelii</i> – 39,8%, <i>B. garinii</i> – 17,8%.
Strzelczyk 2006 [136]	PCR	Śląsk	14,2% dodatnich kleszczy.
Wodecka 2007 [164]	PCR-RFLP	Dobra Szczecińska	Kleszcze zebrane z roślinności: <i>B. garinii</i> – 3,2%, <i>B. afzelii</i> – 6,9%, <i>B. valaisiana</i> – 3,6%. Kleszcze żerujące na jeleniu (<i>Cervus elaphus</i>) – <i>B. miyamotoi</i> .
Kosik-Bogacka 2007 [72]	IFA	Szczecin	16,6% pozytywnych kleszczy – postaci dorosłe. 16,5% pozytywnych kleszczy – nimfy.
Komoń 2007 [71]	PCR	Nadbużański Park Krajobrazowy	8,8% dodatnich kleszczy: samice – 18,8%, samce – 13,8%, nimfy – 6,1%, larwy – 3,8%. Odsetek zainfekowanych kleszczy wahał się w zależności od miejsca od 2,7% do 14,1%.
Zygner 2008 [172]	PCR	Warszawa	6,2% dodatnich kleszczy (<i>B. afzelii</i>).
Cisak 2008 [25]	PCR nested-PCR (oznaczenie gatunku)	Lublin	13,1% dodatnich próbek: samice – 26,7% dodatnich, samce – 20,1%, nimfy – 7,5%. 49,1% - pojedyncza infekcja, 42,5% koinfekcja 2 gatunkami, 6,7% - koinfekcja 3 gatunkami. W przypadku pojedynczych infekcji najczęściej identyfikowano <i>B. afzelii</i> , w koinfekcjach – <i>B. burgdorferi</i> s.s.
Wójcik-Fatla 2009 [165]	PCR	Lublin	4,94% pojedyncza infekcja (<i>B. burgdorferi</i> s. l.), 0,93% (<i>Borrelia</i> + <i>Anaplasma</i>), 0,13% (<i>Borrelia</i> + <i>Babesia</i>), 0,06% (<i>Borrelia</i> + <i>Anaplasma</i> + <i>Babesia</i>).
Wodecka 2010 [162]	nested-PCR	Szczecin	Porównanie różnych starterów. Wyniki dla starterów amplifikujących fragment genu <i>fla</i> : do 7,4% dodatnich kleszczy, dorosłe – 5,88%, nimfy – 7,76%. <i>B. burgdorferi</i> s.s. – 0,86%, <i>B. garinii</i> – 2,59%, <i>B. afzelii</i> – 1,04%; <i>B. valaisiana</i> – 1,55%, <i>B. miyamotoi</i> – 0,52%, koinfekcje – 0,86%.
Sroka 2009 [129]	PCR	Lublin	12,6% dodatnich kleszczy: samice – 23,5% dodatnich, samce – 13,2%, nimfy – 4,4%.
Chmielewski 2011 [22]	PCR	Warszawa	6,1% kleszczy dodatnich (<i>B. burgdorferi</i> s.s.)
Ekner 2011 [42]	PCR	Dolina Baryczy	4,14% dodatnich kleszczy zebranych z gadów (jaszczurka zwinka (<i>Lacerta agilis</i>)).
Rozwadowska 2012 [117]	Real-time PCR	Katowice	Badano kleszcze dostarczone przez pacjentów. 17,5% dodatnich kleszczy, z czego 81,8% - <i>B. afzelii</i> , 18,2% - <i>B. burgdorferi</i> s.s.
Sytykiewicz 2012b [141]	PCR	Polska wschodnia i środkowa	12,3% dodatnich kleszczy: samice – 23,6% dodatnich, samce – 17,3%, nimfy – 5,5%. Odsetek zakażonych kleszczy wahał się od 3,4% (Nadburzański Park Krajobrazowy) do 23,5% (Warszawa) w zależności od regionu.
Cisak 2012 [28]	PCR	Lublin	22,1% dodatnich kleszczy: samice – 29,2% dodatnich, samce – 28,1%, nimfy – 16,6%.
Asman 2013 [4]	PCR	Niepołomice (koło Krakowa)	3,3% dodatnich kleszczy.
Wodecka 2014 [163]	PCR-RFLP	Północno-zachodnia Polska	27,8% dodatnich nimf. <i>B. afzelii</i> – 9,24%, <i>B. garinii</i> – 11,33%, <i>B. lusitaniae</i> – 1,03%, <i>B. miyamotoi</i> – 6,2%.
Dunaj 2014 [41]	PCR, hybrydyzacja typu <i>reverse line blot</i>	Północno-wschodnia Polska (Białystok)	6,83% dodatnich kleszczy: samice – 7,5% dodatnich, samce – 4,40%, nimfy – 9,46%. <i>B. garinii</i> – 1,95%, <i>B. afzelii</i> – 4,88%.

Referencje	Metoda	Region	Wyniki
Kiewra 2014 [69]	PCR-RFLP	Dolny Śląsk	15,5% dodatnich kleszczy. <i>B. afzelii</i> – 68,5% zainfekowanych kleszczy, <i>B. burgdorferi</i> s.s. – 14% zainfekowanych kleszczy, <i>B. miyamotoi</i> – 2%. Inne: <i>B. valaisiana</i> , <i>B. garinii</i> . 4 rodzaje koinfekcji zostały zidentyfikowane: <i>B. miyamotoi/B. afzelii</i> , <i>B. miyamotoi/B. burgdorferi</i> s.s., <i>B. miyamotoi/B. garinii</i> oraz <i>B. afzelii/B. burgdorferi</i> s.s.
Cisak 2014 [27]	PCR	Lublin	Ogółem 23,7% zakażonych kleszczy, koinfekcje <i>B. burgdorferi</i> s.l. + <i>B. microti</i> – 1,6%, koinfekcje <i>B. burgdorferi</i> s.l. + <i>A. phagocytophilum</i> – 0,7%.

Powyższe zestawienie demonstruje, że badania nad zakażeniem kleszczy krętkami *Borrelia* były prowadzone w różnych częściach Polski, szczególnie w terenach, gdzie występują korzystne warunki występowania kleszczy (parki, lasy), najczęściej są to też tereny, gdzie występuje duże ryzyko kontaktu człowieka z patogenem (okolice terenów zamieszkanymi, tereny turystyczne). Takie obszary stanowią szczególne ryzyko zakażenia chorobą z Lyme.

Odsetek kleszczy zakażonych *B. burgdorferi* s.l. wahał się od kilku procent, np. 5,4% - Lublin (Cisak 2006 [26]), 8,8% - Nadbużański Park Krajobrazowy (Komoń 2007 [71]), 6,2% - Warszawa (Zygner 2008 [172]), 6,1% - Lublin (Wójcik-Fatla 2009 [165]), 3,3% - Niepołomice (Asman 2013 [4]), 6,83% - Białystok (Dunaj 2014 [41]) do ponad 20%, np. 22,5% - Tarnów (Lencáková 2006 [75]), 22,1% - 23,7% - Lublin (Cisak 2012 [28], Cisak 2014 [27]). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy (średni odsetek zakażonych kleszczy wyniósł 28,5%) odpowiadają górnym granicom poziomu zakażenia dla innych rejonów Polski.

Porównanie poziomu zakażenia w zależności od stadium rozwojowego kleszcza wykazano, iż postacie dorosłe są zakażone w wyższym stopniu niż postacie młodociane (nimfy). Jest to zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Na przykład Cisak i wsp. (2008) [25] przebadali 915 kleszczy zebranych z roślinności. Ogólny poziom zakażenia krętkami z rodzaju *Borrelia* wyniósł 13,1%. Odsetek zainfekowanych samic wyniósł 26,7%, samców – 20,1% i nimf – 7,5%, odpowiednio. W innym badaniu (Cisak 2012 [28]) prowadzonym w tym rejonie przebadano 641 kleszczy. Zakażonych było 29,2% samic, 28,1% samców i 16,6% nimf. Natomiast w badaniu prowadzonym w okolicach Białegostoku (Dunaj 2014 [41]) największy odsetek zakażonych kleszczy odnotowano nieoczekiwanie wśród nimf (9,46%), podczas gdy zainfekowanych samic było 7,5%, a samców 4,4%. Wyniki te mogły być jednak spowodowane niską liczbą przebadanych osobników (205 kleszczy) oraz ogólnie niskim poziomem zakażenia. Wyższy poziom zakażenia u osobników dorosłych spowodowany jest faktem, że osobniki dorosłe mogą nabyć patogeny zarówno w stadium larwalnym, jak i nimfalnym, natomiast nimfy mogą ulec zakażeniu tylko jako larwy. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje z innych badań. Poziom zakażenia był około 2 razy wyższy u osobników dorosłych (ok. 35%) niż u nimf (ok. 17%). Nie było natomiast różnic w poziomie zakażenia samców i samic. Nie wykryto patogenów w larwach, co zgadza się z faktem, że w przypadku *B. burgdorferi* s.l. przekaz transowarialny raczej nie występuje. Należy jednak wziąć pod uwagę, że liczba osobników była stosunkowo niska. W przypadku badań ilościowych, intensywność zakażenia była statystycznie istotnie wyższa u samic, jednak nie było różnic

w intensywności zakażenia nimf i samców. Najprawdopodobniej wyższa intensywność zakażenia u samic związana jest z większymi rozmiarami tego stadium rozwojowego, a zatem większą objętością jelit, w których znajdują się patogeny. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że ryzyko nabycia zakażenia przez człowieka jest najniższe w przypadku samców, które rzadko pobierają pokarm od żywiciela, a średnie liczby patogenów są stosunkowo niskie (porównywalne do średnich liczb patogenów u nimf). Natomiast w przypadku nimf, chociaż zarówno odsetek zakażonych osobników, jak i liczba patogenów w kleszczu jest niższa niż u samic, to biorąc pod uwagę, że pobierające pokarm nimfy mogą przebywać niezauważalnie na skórze człowieka przez dłuższy czas, ryzyko transmisji jest wysokie. Ponadto, pomimo stwierdzenia korelacji pomiędzy liczbą patogenów a ryzykiem zakażenia, ze względu na ograniczenia w możliwości określenia absolutnej liczby patogenów, nie można stwierdzić, jaka jest najniższa intensywność zakażenia, która umożliwia transfer patogenów do żywiciela kleszcza. Badania ilościowe wykazały jednak, że intensywność zakażenia jest bardzo różna, odchylenia standardowe wahały się w granicach 200 000 do 500 000 w zależności od stadium rozwojowego, liczba patogenów wahała się od 11 do ponad 5 mln krętków/kleszcza. Zgodnie z wynikami badań eksperymentalnych do efektywnej transmisji z kleszcza do myszy niezbędne jest przekroczenie progowej liczby patogenów (por. sekcja 5.1.3). Najniższe liczby patogenów (poniżej wartości progowej 300 krętków) odnotowano w przypadku jedynie niewielkiego odsetka zainfekowanych osobników (3,1%). Może to sugerować, że tylko w przypadku niewielkiego odsetka zainfekowanych kleszczy transmisja patogenów jest mało prawdopodobna, jednak należy brać pod uwagę fakt, że porównanie absolutnych wartości liczby patogenów otrzymanych różnymi metodami obarczone może być dużym błędem (por. sekcja 5.1.4 oraz 5.1.5).

Krętki są transmitowane wraz ze śliną kleszcza podczas pobierania krwi żywiciela, po migracji z jelita środkowego. Ta migracja z jelita środkowego do gruczołów ślinowych trwa zwykle 2-3 dni i prawdopodobnie jest odpowiedzialna za to, że do transmisji nie dochodzi w ciągu pierwszych 24 godzin od przyłączenia się kleszcza. Jednak wyniki niektórych badań wskazują, że różne odsetki głodnych kleszczy mogą zawierać patogeny także w gruczołach ślinowych. Wyjaśnia to notowane przypadki, w których do transmisji dochodziło w ciągu kilku godzin. Obecnie wiadomo *B. afzelii* jest przekazywana do żywiciela szybciej niż *B. burgdorferi* s.s. (EUCALB [43]). Różnice w czasie transmisji patogenów mogą również być zależne od liczby patogenów w kleszczach, która może wzrastać także u kleszczy głodnych. Zakażenie żywiciela przez kleszcze, w których patogeny uległy już namnożeniu może być możliwe w krótszym czasie niż przez kleszcze charakteryzujące się niższą liczbą patogenów. Potwierdzenie tej tezy wymagałoby jednak dalszych badań.

W wielu badaniach oprócz wykrycia patogenów w kleszczach określano również genogatunki krętków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. W kleszczach na terenie Polski wykrywano następujące gatunki z tego kompleksu: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*. Ponadto identyfikowano także krętki należące do innego chorobotwórczego gatunku, spoza kompleksu *B. burgdorferi* s.l. – *B. miyamotoi*. Identyfikowano również jednoczesne

występowanie dwóch, a nawet trzech genogatunków. Wszystkie z powyższych gatunków wykryto również w ramach niniejszej pracy. Najliczniej reprezentowane były gatunki *B. garinii* oraz *B. afzelii*, które stanowiły łącznie ok. 80% zidentyfikowanych prób. We wszystkich stadiach rozwojowych przeważały zakażenia *B. afzelii*, jednak widoczne były różnice w poziomie infekcji. W przypadku tego gatunku najczęściej zainfekowane były nimfy, co świadczyć może o tym, że kleszcze w stadium larwalnym najczęściej nabywają zakażenie właśnie tym gatunkiem. Rezerwuarem *B. afzelii* są gryzonie, które też przeważnie są żywicielami larw. Należy zauważyć jednak, że w nimfach zidentyfikowano także pozostałe genogatunki, z wyjątkiem *B. lusitaniae*, dla którego rezerwuarem zwykle są gady, nie będące najczęściej żywicielami larw. Znaczne różnice w występowaniu poszczególnych genogatunków zaobserwowano w zależności od stanowiska, co świadczy o znacznych różnicach środowiskowych, w tym także dużym zróżnicowaniu kręgu żywicieli, nawet na terenach geograficznie zbliżonych. W związku z powyższym należy przyjąć, że ocena ryzyka zakażenia poszczególnymi genogatunkami ma charakter lokalny. Więcej informacji na temat różnorodności genetycznej krętków zaprezentowano w sekcji 5.3.3.

Poziom infekcji może zależeć również od typu środowiska, w którym bytują kleszcze. Sytykiewicz i wsp. (2012b) [141] badali poziom zakażenia tych pajęczaków zbieranych w różnych lokalizacjach Polski wschodniej i środkowej. Najwyższy odsetek kleszczy zakażonych krętkami *B. burgdorferi* s.l. zidentyfikowano w podmiejskich lasach w okolicach Warszawy (23,5%), podczas gdy najniższy odsetek zainfekowanych kleszczy zanotowano w terenach leśnych – Jerzyska (3,4%) a także na terenach miejskich (zieleń miejska) – Siedlce (4,4%) oraz Międzyrzec Podlaski (4,8%). Pomimo różnic z poziomem infekcji, krętki występowały w każdej lokalizacji. Podobne wnioski można wyciągnąć z wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy. Poziom zakażenia różnił się na poszczególnych stanowiskach badawczych. Najwyższy stopień zakażenia zidentyfikowano na stanowiskach Gdynia Kolibki oraz Gdynia Chwarzno. Są to tereny wysoko zurbanizowane o wysokim i średnim stopniu antropopresji, w pobliżu siedlisk ludzkich i uczęszczanych ulic. Środowiska te stwarzają dogodne warunki do krążenia patogenów. Związane to może być z różnorodnością i obfitością żywicieli. Najniższy poziom zakażenia odnotowano w Kleszczewie, środowisku nieurbanizowanym. Teren leśny stwarza niższe ryzyko zakażenia, zarówno ze względu na niższy poziom infekcji w krętkach, jak i ze względu na niższe ryzyko kontaktu człowieka z kleszczami. Na dwóch stanowiskach (Chwarzno i Kolibki) porównano odsetek zakażonych kleszczy w kolejnych dwóch latach. Odsetek ten był niższy w roku 2009 niż w roku 2008, co mogło być spowodowane różnymi przyczynami, np. pogodą, zmianami środowiskowymi w obrębie stanowisk. Badania ilościowe nie wykazały związku pomiędzy odsetkiem zakażonych kleszczy i intensywnością zakażenia (liczbą patogenów w kleszczu). Na stanowiskach Chwarzno i Kolibki w kolejnym roku wzrosła intensywność zakażenia, co podkreśla brak związku pomiędzy intensywnością zakażenia kleszczy a ogólnym odsetkiem zakażonych kleszczy.

Większość opublikowanych badań dotyczyła terenów wschodniej Polski (Mazury, okolice Lublina), część skupiona była na terenach środkowej i zachodniej części kraju (Warszawa, Szczecin) oraz południowej części (np. Katowice, Kraków). Nie odnaleziono badań dotyczących terenów Pomorza

z okresu ostatnich 10 lat, co świadczy o potrzebie ich prowadzenia w tym regionie. Znalezione jednak dwie wcześniejsze prace dotyczące terenu Trójmiasta. Wegner i wsp. (1997) [158] badali infekcje *B. burgdorferi* na przestrzeni dwóch kolejnych sezonów wegetacyjnych za pomocą metody IFA na rekreacyjnych obszarach Gdańska, Gdyni i Sopotu. Odsetek zainfekowanych kleszczy wynosił ogółem 10,3%. Największy odsetek zainfekowanych pajęczaków odnotowano wśród samców (18,9%). Poziom infekcji wśród samic wynosił 14,9%, a nimf 8,2%. Stańczak i wsp. (2004) [131] badali poziom zakażenia kleszczy *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* and *B. microti*, odłowionych na terenie miejskich i podmiejskich lasów aglomeracji Trójmiasta. Ogółem 12,4% kleszczy zakażonych było krętkami z rodzaju *Borrelia* (samice – 24,3% zakażonych osobników, samce – 13,7%, nimfy – 7,0%). Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wskazują, że odsetek zakażenia *I. ricinus* krętkami *Borrelia* spp. na badanym terenie wzrósł w ciągu ostatnich 10-ciu lat, jednak różnice mogą mieć również związek ze stosowaniem obecnie nowszych, bardziej czułych metod (Real-Time PCR).

W ramach pracy oceniono również zmiany w zakażeniu kleszczy w ciągu roku. Analizując wyniki w kolejnych miesiącach zauważalny był spadek ogólnego odsetku zakażonych kleszczy pod koniec okresu zbioru (sierpień – wrzesień), przy jednoczesnym wzroście średniej liczby patogenów w kleszczach. W sierpniu i wrześniu spadła również aktywność kleszczy. Wyniki takie mogą sugerować, że w trakcie roku, wraz z wydłużającym się okresem aktywności głodnych kleszczy, patogen ulega namnożeniu. Potwierdzenie tych obserwacji wymagałoby jednak dalszych badań.

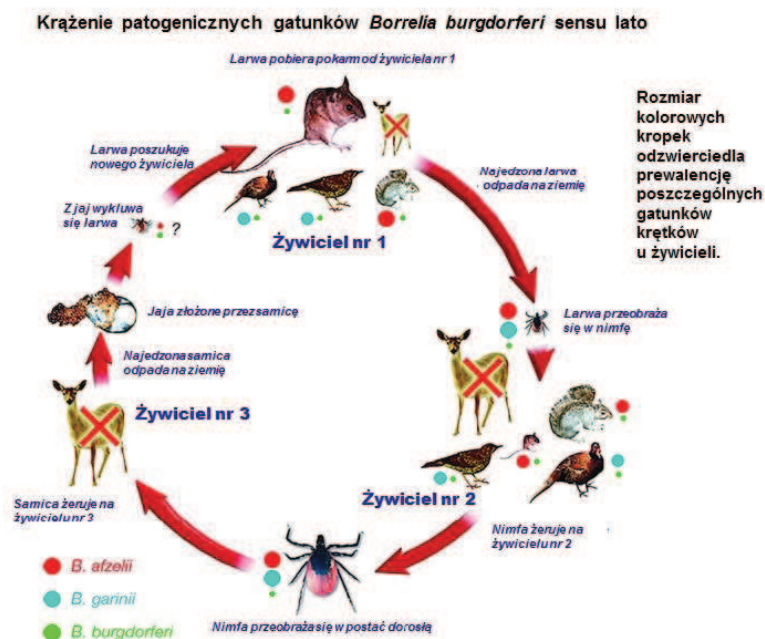
Badania ilościowe nad występowaniem krętków *Borrelia* w kleszczach zostały opisane w sekcji 5.1. Badania te dotyczyły głównie kleszczy *I. scapularis* i były prowadzone w warunkach laboratoryjnych. Nie odnaleziono prac, w których oceniano wpływ różnych czynników środowiskowych na liczebność krętków w kleszczach.

5.3.3 RÓŻNORODNOŚĆ GENETYCZNA KRĘTKÓW *BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO*

Wyniki badań środowiskowych potwierdzają, że w Europie najbardziej rozpowszechnionymi ganogatunkami z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. są *B. garinii* i *B. afzelii* oraz rzadziej występująca *B. burgdorferi* s.s. (Hubálek 1997 [60]).

Do tej pory odnotowano niewielkie postępy w identyfikacji patogennych i niepatogennych genotypów różnych gatunków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. Opisane w literaturze badania odnoszą się do identyfikacji genotypów *B. burgdorferi* s.s. oraz *B. afzelii* na podstawie sekwencji genu *Osp C*, które prowadzone były w USA (EUCALB [43]; Wormser 2008 [169]).

Istnieją różnice ekologiczne pomiędzy poszczególnymi genogatunkami. Przeprowadzone badania sugerują, że poszczególne genogatunki związane są z różnymi grupami rezerwuarów: *B. afzelii* – z gryzoniami, *B. garinii* – głównie z ptakami, a *B. valaisiana* wyłącznie z ptakami. Cykl krążenia różnych genogatunków krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. przedstawiony jest na schemacie poniżej (Ryc. 40).



Ryc. 40 Schemat krążeń genogatunków *Borrelia burgdorferi* s.l. w kleszczach i ich żywicielach (na podstawie Alessandro Mannelli et al. FEMS Microbiol Rev 2012;36:837-861).

Gatunek *B. garinii* jest czasem izolowany w tkankach pobranych od gryzoni, a *B. garinii* wariant OspA serotyp 4 (obecnie *B. bavariensis*), który jest rzadko obserwowany w kleszczach, związany jest z neuroboreliozą i jest specyficzny dla gryzoni. W większości badań, w przypadku koinfekcji u kleszczy obserwowane są jednocześnie *B. valaisiana* i *B. garinii*, a oba gatunki są przekazywane z ptaków wróblowych, takich jak kosy (*Turdus merula*) do kleszczy. *Borrelia burgdorferi* s.s. prawdopodobnie może występować zarówno u ptaków i gryzoni. Ostatnio, gatunek *B. lusitaniae* został uznany za powiązany z jaszczurkami.

Uzyskane wyniki sekwencjonowania wskazują, że poszczególne genogatunki cechują się odmiennym zróżnicowaniem genetycznym. Wszystkie sekwencje fragmentu genu *fla* dla *B. afzelii* były identyczne (11 zsekwencjonowanych próbek), podczas gdy w przypadku *B. garinii* zidentyfikowano aż trzy różne sekwencje, choć liczba sekwencjonowanych próbek była ponad dwukrotnie niższa (5 próbek). Ponadto w przypadku *B. burgdorferi* s.s. uzyskano 2 typy sekwencji (na 6 analizowanych próbek). Zróżnicowanie genetyczne może mieć kilka przyczyn, między innymi różny zakres rezerwuarów (genogatunki bardziej zróżnicowane mogły przystosować się do ich większego zakresu). Gatunek *B. garinii* ma szerszy zakres rezerwuarów (był izolowany zarówno z ptaków jak i gryzoni), gatunek *B. afzelii* jest wiązany obecnie jedynie z gryzoniami, co potwierdza powyższą tezę. Różnice genetyczne mogą także wiązać się z różnym poziomem patogeniczności dla człowieka.

Niedawno scharakteryzowany genogatunek *B. bavariensis*, który został zidentyfikowany u pacjentów zarówno z neuroboreliozą, jak i u chorych z zapaleniem stawów, jest blisko spokrewniony z *B. garinii* (Marconi 1999 [79]; Glatz 2014 [47]). Rezerwuarem gatunku są gryzonie.

Gatunek ten nie został do tej pory wykryty w kleszczach na terenie Polski, jednakże wykryto specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko *B. bavariensis* u pracowników leśnych (Tokarska-Rodak 2014 [148]). Analizowane tu sekwencje *B. garinii* były w 98% podobne do sekwencji *B. bavariensis*.

Sekwencje uzyskane w ramach pracy były identyczne lub najbardziej zbliżone do sekwencji z banku genów, pochodzących z krętków izolowanych z kleszczy z terenu Polski. Sugeruje to, że szczepy gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. wykazują zróżnicowanie geograficzne.

Badania ilościowe ujawniły znaczne różnice w liczbach patogenów w kleszczach w przypadku poszczególnych genogatunków (por. sekcja 4.3.4). Najwyższe średnie wartości liczby patogenów w kleszczach zaobserwowano w przypadku gatunku *B. garinii*. Zależały one od stadium rozwojowego i były wyższe od wartości dla *B. afzelii* od 1,2 (nimfy) do 2,5 razy (samice). Różnice pomiędzy intensywnością zakażenia *B. garinii* a gatunków *B. burgdorferi* s.s., *B. lusitaniae* i *B. valaisiana* były jeszcze większe. Uzyskane wyniki są spójne z wynikami otrzymanymi przez Herrmann i wsp. (2013) [55]. Autorzy powyższej pracy określali liczbę patogenów w nimfach *I. ricinus*. Najwyższą intensywność infekcji odnotowali dla *B. garinii* (średnio 22 442 bakterie), niższy dla *B. afzelii* (11 144), *B. burgdorferi* s.s. (9 886) i najniższy dla *B. valaisiana* (7 116). Wyniki badań nad transmisją różnych genogatunków z kleszcza do żywiciela (myszy) wykazały, że *B. afzelii* może być szybciej przekazany niż *B. burgdorferi* s.s. oraz że kleszcze *I. ricinus* są lepszym wektorem dla tego genogatunku (Crippa 2002 [30]). Biorąc pod uwagę powyższe dane można przypuszczać, że szybkość transmisji patogenów może być związana z liczbą bakterii w kleszczach. Ryzyko zakażenia może być wyższe w przypadku większej liczby patogenów w wektorach. W takim przypadku transmisja bakterii może zachodzić w krótszym czasie od przyłączenia się kleszcza, co wiąże się z wyższym relatywnym ryzykiem zakażenia człowieka. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują, że poszczególne genogatunki różnią się nie tylko spektrum oddziaływania na człowieka, ale także przystosowaniem i zdolnością przetrwania w organizmach kleszczy.

Średnie wartości intensywności zakażenia kleszczy gatunkiem *B. miyamotoi* były kilkakrotnie wyższe niż w przypadku kompleksu *B. burgdorferi* s.l., co sugeruje, że gatunek ten jest bardzo dobrze przystosowany do przetrwania w organizmach kleszczy. Przystosowanie tego gatunku do przetrwania w organizmach pajęczaków potwierdza także fakt, że gatunek ten zdolny do przekazu transowarialnego, w przeciwieństwie do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

5.4. EPIDEMIOLOGIA ANAPLAZMOZY I BIOLOGIA BAKTERII *ANAPLASMA* SPP.

W niniejszym rozdziale przedyskutowano uzyskane wyniki, zarówno jakościowe jak i ilościowe w kontekście aktualnej wiedzy na temat epidemiologii HGA oraz występowania *A. phagocytophilum* w kleszczach.

5.4.1 SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA LUDZKIEJ ANAPLAZMOZY GRANULOCYTARNEJ

Pierwszy przypadek ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej opisano w 1994 roku w Stanach Zjednoczonych (Chen 1994 [20]). Od tego czasu infekcje *A. phagocytophilum* zostały zdiagnozowane również w Europie i Azji. Według danych CDC, w Stanach Zjednoczonych do roku 2008 zanotowano około 5000 przypadków zakażeń, jednak przypuszcza się, że ich rzeczywista liczba może być znacznie wyższa, gdyż często nie są zgłaszane lub poprawnie diagnozowane, ze względu na niespecyficzne objawy kliniczne. Większość przypadków jest notowanych w północno-wschodniej i środkowo-zachodniej części USA, szczególnie w stanach Rhode Island, Minnesota, Connecticut, Maryland i Nowy Jork. Średnia częstość występowania HGA w tym kraju wyniosła 1,4 przypadków na milion mieszkańców, seroprewalencja natomiast wahała się od 0,6% do 14,9% na terenach endemicznych. Mediana wieku pacjentów wynosiła 51 lat, najwięcej zakażeń odnotowywano w grupie wiekowej 60-69 lat. Badania serologiczne wśród dawców krwi wykazały seroprewalencję na poziomie 3,5%, wskazującą na potencjalną możliwość infekcji poprzez transfuzję (Jin 2012 [65]).

W Europie pierwszy przypadek HGA stwierdzono w 1995 roku w Słowenii. Na kontynencie europejskim notuje się niewiele klinicznych przypadków anaplazmozy. Dotychczas zachorowania odnotowano w Holandii, Niemczech, Francji, Włoszech, Hiszpanii, Szwecji, Norwegii, Austrii, Danii, Polsce oraz Chorwacji. Odsetek osób, u których wykryto specyficzne przeciwciała wynosił: 9% (Austria), 9,6-19,8% (Polska), 1,4% (Hiszpania), 7,3% (Grecja), 5,7% (Włochy), 21% (Dania), 1,4-2,8% (Niemcy). Rośnie on wraz z wiekiem badanych i jest wyższy u osób, które zgłaszały pokłucie przez kleszcza (Jin 2012 [65]).

W Polsce pierwsze przypadki HGA odnotowano w 1999 roku, w tym dwa potwierdzone i jeden prawdopodobny (Tylewska-Wierzbanowska 2001 [150]). W 2015 roku scharakteryzowano genetycznie patogeniczny szczep odpowiedzialny za infekcję (Welc-Falęciak 2015 [160]).

Infekcje *A. phagocytophilum* mogą współwystępować z innymi patogenami odkleszczowymi. We Włoszech, przeciwciała specyficzne dla tych riketsji wykrywano u osób zakażonych krętkami *B. burgdorferi* s.l. W Słowacji, przeciwciała przeciw obu ww mikroorganizmom występowały jednocześnie u 0,93% badanej populacji. Badania prowadzone w Portugalii ujawniły, że HGA występowała u 7,8% pacjentów z boreliozą, podczas gdy w grupie pacjentów, u których nie wykryto przeciwciał przeciwko *B. burgdorferi* odsetek osób zakażonych HGA był znacząco niższy (0,4%). Wyniki te mogą sugerować, iż u osób z boreliozą może łatwiej dojść do zachorowania na anaplazmozę. W Republice Czeskiej, przeciwciała IgG przeciwko *A.*

phagocytophilum wykryto u 9,9% pacjentów hospitalizowanych z powodu podejrzenia kleszczowego zapalenia mózgu. Identyfikowano również koinfekcje *A. phagocytophilum* i *Coxiella burnetii* (czynniki etiologiczne gorączki Q) (Jin 2012 [65]).

Ludzka anaplazmoza granulocytarna występuje również w Azji, gdzie pierwszy przypadek zachorowania zanotowano w 2006 roku w Chinach (prowincja Anhui). Dotyczył 50-letniej kobiety, która zmarła 12 dni po ukłuciu przez kleszcza. Infekcję HGA wykryto następnie u 9 osób, które miały kontakt z tą pacjentką. Był to pierwszy, wewnątrzszpitalny, zidentyfikowany przypadek transmisji *A. phagocytophilum* z człowieka na człowieka, prawdopodobnie na skutek kontaktu z krwią lub wydzieliną dróg oddechowych chorej (Zhang 2008 [171]). W Chinach infekcje *A. phagocytophilum* zdiagnozowano u co najmniej 557 osób, z czego 18 przypadków śmiertelnych. Specyficzne przeciwciała wykryto u 20% badanych osób w populacji szczególnie narażonej na atak kleszczy. W Korei seroprewalencja wynosiła 1,8%, jednak nie zidentyfikowano żadnych przypadków zakażeń (Jin 2012 [65]).

Badania molekularne i środowiskowe nad ludzką anaplazmozą granulocytarną wykazały, że wśród bakterii z gatunku *A. phagocytophilum* jedynie część szczepów odpowiedzialna jest za wywoływanie choroby u ludzi (Krakowetz 2014 [73]).

5.4.2 ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM W POLSCE

Podobnie jak w przypadku badań nad występowaniem krętków należących do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. przeszukano dostępną literaturę naukową z okresu ostatnich 10-ciu lat. Podsumowanie badań przedstawiono w

Tab. 18. Odnaleziono łącznie 13 prac naukowych, których celem było oznaczenie poziomu zakażenia *I. ricinus*. Kleszcze zbierane były głównie z roślinności (kleszcze głodne), w niektórych badaniach materiał stanowiły kleszcze zdejmowane z powierzchni skóry żywicieli (psy, jeleniowate). W badaniach wykorzystywano technikę PCR, w tym nested-PCR.

Tab. 18 Badania epidemiologiczne nad występowaniem *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach w Polsce (okres od 2005-2015).

Referencje	Metoda	Region	Wyniki
Skotarczak 2006 [128]	PCR	Wielkopolski Park Narodowy	4,1% dodatnich kleszczy.
Grzeszczuk 2006 (a) [49]	PCR	Białystok	Kleszcze usunięte ze skóry pacjentów: 23,7% dodatnich kleszczy: samice – 36,8%, samce – 16,6%, nimfy – 10,5%.
Grzeszczuk 2006 (b) [50]		Północno-wschodnia Polska	14,1% dodatnich kleszczy: samice – 36,8%, samce – 8,2%, nimfy – 0,9%.
Grzeszczuk 2006 (c) [51]	PCR	Białystok	14,5% dodatnich kleszczy: samice – 27,8%, samce – 9,2%, nimfy – 4,1%.
Adamska 2007 [1]	PCR	Województwo zachodnio-pomorskie	Kleszcze żerujące na sarnach (<i>Capreolus capreolus</i>) nie były nosicielami <i>A. phagocytophilum</i> .
Chmielewski-Badora 2007 [21]	PCR	Lublin	10,2% dodatnich kleszczy. Odsetek zainfekowanych kleszczy zależał od lokalizacji i stadium rozwojowego pączęzaków. Najwyższy odsetek zainfekowanych kleszczy odnotowano u samic (24,6%) w porównaniu z samcami (6,5%) i nimfami (4,4%). Czulsza była metoda detekcji bazująca na amplifikacji fragmentu genu 16S rRNA niż <i>ankA</i> .
Zygner 2008 [172]	PCR	Warszawa	Kleszcze zebrane z psów. 2,6% dodatnich kleszczy <i>I. ricinus</i> ,
Michalik 2009 [88]	PCR	Wielkopolska	Kleszcze zebrane ze zwierząt z rodziny jeleniowatych. Samice były najczęściej zainfekowane (22,7%). Odsetek dodatnich samców wyniósł 9,1%. Kleszcze znalezione na zainfekowanych zwierzętach były częściej nosicielami patogenów.
Wójcik-Fatla 2009 [165]	PCR	Lublin	Pojedyncza infekcja <i>A. phagocytophilum</i> została zidentyfikowana w 4,9% kleszczy (12,7% samic, 5,3% samców, 1,0% nimf). Koinfekcje <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Borrelia</i> wykryto w 1% kleszczy, koinfekcje <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> wykryto w 1,1% kleszczy, koinfekcje <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Borrelia</i> + <i>Babesia</i> wykryto w 0,1% kleszczy.
Sytykiewicz 2012a [140]	PCR	Polska środkowa i wschodnia	8,5% dodatnich kleszczy (samice – 17,9%, samce – 10,5%, nimfy – 2,7%). Odsetek zakażonych kleszczy w zależności od lokalizacji: Nadbużański Park Krajobrazowy – 10,8%, Kampinoski Park Narodowy – 5,5%, Warszawa – 14,5% (lasy podmiejskie), 8,7% (parki miejskie), Siedlce – 13,0% (lasy podmiejskie), 0,0% (parki miejskie), Biała Podlaska – 3,4% (lasy podmiejskie), 0,0% (parki miejskie).
Asman 2013 [4]	PCR	Niepołomice (koło Krakowa)	Pojedyncza infekcja <i>A. phagocytophilum</i> została zidentyfikowana w 26,6% kleszczy. Koinfekcje <i>A. phagocytophilum</i> + <i>Babesia</i> sp. wykryto w 46,7% kleszczy, koinfekcje <i>A. phagocytophilum</i> + <i>B. burgdorferi</i> s.l. + <i>Babesia</i> sp. wykryto w 3,3% kleszczy. Łącznie <i>A. phagocytophilum</i> zidentyfikowano w 76,7% kleszczy.
Cisak 2014 [27]	PCR	Lublin	Ogółem 2,7% zakażonych kleszczy, koinfekcje <i>B. burgdorferi</i> s.l. + <i>A. phagocytophilum</i> – 0,7%.
Kiewra 2014 [69]	nested-PCR	Polska południowo-zachodnia	Najwyższy odsetek zainfekowanych kleszczy odnotowano u samic (15,2%) w porównaniu z samcami (3,9%) i nimfami (1,3%).

Badania prowadzono na terenach Polski wschodniej (Białystok, Lublin), południowej (okolice Wrocławia, Krakowa), środkowej (Warszawa) oraz w Wielkopolsce i województwie zachodnio-pomorskim. Liczba odnalezionych publikacji dotyczących występowania *A. phagocytophilum* w tym okresie jest zdecydowanie mniejsza niż w przypadku *B. burgdorferi* s.l., co wskazuje na potrzebę prowadzenia dalszych badań nad epidemiologią tych patogenów.

Odsetek kleszczy zakażonych *A. phagocytophilum* wahał się od kilku, np. 4,1% - Wielkopolska (Skotarczak 2006 [128]), 2,7% - 4,9% - Lublin (Cisak 2014 [27], Wójcik-Fatla 2009 [165]) do kilkunastu procent, np. 14,1% - północno-wschodnia Polska (Grzeszczuk 2006b [50]), 14,5% - Białystok (Grzeszczuk 2006c [51]). W jednym z badań patogeny wykryto łącznie aż w 76,7% kleszczy, jednak liczba przebadanych osobników była bardzo niska (Asman 2013 [4]).

Podobnie jak w przypadku krętków *B. burgdorferi* s.l. najwyższy poziom infekcji stwierdzono u samic, np. w przypadku badań Grzeszczuk i wsp. (2006b) [50] odsetek zainfekowanych samic wynosił 36,8%, samców – 8,2%, a nimf – 0,9%. W innych badaniach tej autorki, zakażonych było: 27,8% samic, 9,2% samców i 4,1% nimf (Grzeszczuk 2006c [51]). Również Chmielewska-Badora 2007 [21] najwyższy odsetek zainfekowanych kleszczy odnotował u samic (24,6%) w porównaniu z samcami (6,5%) i nimfami (4,4%) (Podobne wyniki uzyskali Wójcik-Fatla i wsp. (2009) [165] (12,7% zainfekowanych samic, 5,3% zainfekowanych samców, 1,0% zainfekowanych nimf) oraz Kiewra i wsp. (2014) [69] (15,2% zainfekowanych samic, 3,9% zainfekowanych samców, 1,3% zainfekowanych nimf).

Poziom zakażenia kleszczy *A. phagocytophilum* może być zależny, podobnie jak w przypadku krętków *Borrelia*, od charakteru miejsca ich zbioru. Sytykiewicz i wsp. (2012a) [140] badali poziom infekcji w kleszczach zbieranych w lasach, terenach podmiejskich i parkach miejskich. Poziom zakażenia kleszczy zbieranych w obszarach leśnych wahał się od 3,1% do 12,1%. Podobny poziom zakażenia odnotowano w lasach podmiejskich (od 3,4% do 14,5%). W przypadku parków miejskich w Siedlcach oraz Białej Podlaskiej nie wykryto *A. phagocytophilum* u *I. ricinus*, natomiast kleszcze z terenu Warszawy były zakażone, poziom infekcji w pajęczakach wynosił 8,7%.

Dodatkowo, we wspomnianym wcześniej badaniu (Stańczak 2004 [131]) badano poziom zakażenia *A. phagocytophilum* kleszczy występujących na terenie Trójmiasta. Ogółem 14,0% kleszczy było zakażonych tymi riketsjami (samice – 47,6% zakażonych osobników, samce – 8,6%, nimfy – 2,0%). Na tak wysoki odsetek pozytywnych prób mógł wpłynąć jednak fakt, że w cytowanej pracy użyto starterów o wysokiej czułości, ale niskiej specyficzności (Massung 1998 [82], Massung 2003 [83]).

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wskazują na bardzo niski poziom zakażenia *A. phagocytophilum* na badanym terenie. Ogółem zakażonych było 0,6% kleszczy i był znacznie niższy niż w innych badaniach prowadzonych w różnych rejonach Polski, w tym również w porównaniu do badań wcześniej prowadzonych na terenie Trójmiasta. Może to świadczyć o ogólnej tendencji spadkowej poziomu zakażenia tym patogenem na badanym terenie. Analiza zależności zakażenia kleszczy riketsjami *A. phagocytophilum* od czynników środowiskowych nie wykazała żadnych zależności, jednak ze względu na niski poziom infekcji wyniki nie mogły zostać uznane za miarodajne. Na bazie otrzymanych wyników należy przyjąć, że ryzyko zakażenia HGA na terenie Trójmiasta i okolic jest bardzo niskie. Niskie jest również ryzyko koinfekcji *A. phagocytophilum* oraz krętkami *Borrelia* spp.

5.4.3 WARIANTY GENETYCZNE ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM

Kliniczne objawy anaplazmozy granulocytarnej notowane są u różnych gatunków zwierząt, głównie domowych (psy, koty) oraz u zwierząt hodowlanych (owce, kozy, konie, bydło domowe). *Anaplasma phagocytophilum* jest potwierdzonym czynnikiem etiologicznym ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej zarówno w Stanach Zjednoczonych, jak i na kontynencie Europejskim. Nie jest jednak do końca poznane w jakim stopniu te bakterie stanowią zagrożenie dla zdrowia publicznego, częściowo przez ograniczone dane epidemiologiczne i trudności diagnostyczne (Jahfari 2014 [64]), ale także przez różnice ekologiczne i genetyczne pomiędzy szczepami występującymi na różnych kontynentach, które mogą być powodem znacznych różnic w częstości występowania HGA w Europie i USA (por. sekcja 5.4.1). Badania nad różnorodnością genetyczną *A. phagocytophilum* i jej znaczeniu w ocenie patogeniczności dla człowieka rozpoczęły się w latach 90-tych ubiegłego wieku. Massung i wsp. (1998) [82] zaproponowali metodę nested PCR do detekcji czynnika etiologicznego HGA. W reakcji PCR amplifikowano fragment genu 16S rRNA o długości 546 pz. W wyniku sekwencjonowania próbek DNA izolowanych z kleszczy *I. scapularis* otrzymano dwa warianty genu 16S rRNA, z czego jeden był identyczny z sekwencją *A. phagocytophilum*, szczep Webster (U02521) o potwierdzonej patogeniczności dla człowieka (Chen 1994 [20]), natomiast drugi wariant nie został do tej pory zidentyfikowany u ludzi. Ponadto, różne warianty genetyczne *A. phagocytophilum*, oprócz różnej patogeniczności względem człowieka, prawdopodobnie różnią się również zakresem zwierząt pełniących funkcję rezerwuarów. Ponieważ dla *A. phagocytophilum* nie odnotowano transmisji transowarialnej u kleszczy *I. ricinus*, w przetrwaniu tych bakterii zasadniczą funkcję pełnią rezerwuary zwierzęce. Poznanie ekologii *A. phagocytophilum* i cyklu krążenia tej bakterii w przyrodzie jest więc ważne dla oceny bezpieczeństwa zdrowia człowieka.

Badania prowadzone na terenie USA wykazały, że rezerwuarem patogenicznych szczepów *A. phagocytophilum* jest myszak białostopy (*Peromyscus leucopus*) (Telford 1996 [145]; Stafford 1999 [130]). Różnicowanie genetyczne szczepów patogenicznych i niepatogenicznych dla człowieka próbowano wykonywać na podstawie sekwencji różnych genów. Ze względu na fakt, że wszystkie sekwencje genu 16S rRNA, zidentyfikowane w materiale pobranym od chorych na HGA były identyczne, wysunięto hipotezę, że gen ten może być użyteczny w ocenie patogeniczności *A. phagocytophilum* względem człowieka. Szczep patogeniczny oznaczono jako AP-ha, szczepy o niepotwierdzonej patogeniczności (prawdopodobnie niepatogeniczne), jako AP Variant 1 oraz AP Variant 2. W USA, szczep oznaczony jako Variant 1 zidentyfikowano u jeleni, natomiast Variant 2 u gryzoni (myszak białostopy, pręgowiec) (Massung 1998 [82]; Massung 2002 [81]).

W Europie sytuacja ekologiczna *A. phagocytophilum* wydaje się bardziej skomplikowana. Sekwencje genu 16S rRNA *A. phagocytophilum* izolowanych od chorych w Europie były identyczne z sekwencją patogenicznego szczepu AP-ha, skąd powstało przypuszczenie, że szczepy patogeniczne dla człowieka na obu kontynentach są blisko spokrewnione. *A. phagocytophilum* była zidentyfikowana u różnych gatunków (wolno żyjące przeżuwacze, dziki, lisy, małe ssaki), jednak

niewiele wiadomo na temat kompetentnych rezerwuarów tych bakterii (Stuen 2013 [137]). Ponadto, szczepy patogeniczne dla człowieka wykazują podobieństwo do szczepów powodujących infekcje u psów i koni, natomiast szczepy występujące u gryzoni i jeleniowatych nie były identyfikowane jako czynnik etiologiczny HGA. W wyniku badań prowadzonych na terenie Polski wykazano, że charakterystyczna sekwencja genu 16S rRNA, identyczna z sekwencją dla szczepu patogenicznego występuje u dzików (*Sus scrofa*) (Michalik 2012 [88]). Późniejsze badania prowadzone na terenie Niemiec potwierdziły, że gatunek ten może być rezerwuarem szczepów patogenicznych dla człowieka (Silaghi [122]). Warto zwrócić uwagę, że ostatnie, szeroko zakrojone badania genetyczne szczepów *A. phagocytophilum* wykazały, że określanie patogeniczności na podstawie pojedynczego genu może być obarczone błędem (Huhn 2014 [61]). Autorzy, za pomocą techniki MLST (ang. *multi locus sequence typing*) wykorzystującej sekwencje 7 różnych genów, wykazali, że szczepy występujące w Europie można podzielić na 5 grup (klastrów). W klastrze I znalazły się szczepy identyfikowane u ludzi, psów, koni, dzików i jeży, z czego dwa ostatnie prawdopodobnie pełnią funkcję wolnożyjących rezerwuarów czynnika etiologicznego HGA. Szczepy charakterystyczne dla saren, ryjówek i nornic najprawdopodobniej nie są patogeniczne dla człowieka. Co istotne, szczepy patogeniczne z USA znalazły się w klastrze V, razem ze szczepem wyizolowanym od psa, a klaster ten okazał się odległy genetycznie od klastra I, pomimo identycznej sekwencji genu 16S rRNA. Ponadto, spośród 42 sekwencji genu 16S rRNA szczepów patogenicznych dla człowieka, uzyskanych w ramach powyższej pracy, tylko jedna sekwencja była różna od pozostałych i identyczna z sekwencją zdeponowaną w banku genów (AF136712). Sekwencja ta jest również identyczna z dwiema sekwencjami uzyskanymi w ramach niniejszej pracy (por. sekcja 4.5.4).

Spośród sześciu sekwencji uzyskanych w wyniku niniejszej pracy, nie zidentyfikowano sekwencji charakterystycznej dla szczepu AP-ha i szczepów patogenicznych z terenu Europy (np. AY833407). Wszystkie sekwencje były już wcześniej uzyskiwane z różnych źródeł, w tym także z kleszczy *I. ricinus*. Trzy z uzyskanych sekwencji były identyczne z sekwencjami uzyskanymi z materiału pobranego od kozy, łosia i drobnego gryzonia (bawełniak szczeciniasty). Dwie sekwencje były identyczne z sekwencjami wcześniej zidentyfikowanymi w materiale pobranym od zwierząt domowych (pies, kot). Jedna sekwencja była identyczna z sekwencjami notowanymi u kozy i sarny. Warto zwrócić uwagę, że sekwencja 84-9 była jeden raz zidentyfikowana u człowieka.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że różnorodność genetyczna bakterii *A. phagocytophilum* występujących w środowisku jest stosunkowo wysoka. Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że większość szczepów izolowanych od człowieka ma identyczną sekwencję genu 16S rRNA, może on być dobrym predyktorem pozwalającym określić potencjał patogeniczny mikroorganizmów. Należy jednak liczyć się w ograniczeniach tej metody. Wyniki badań wskazują ponadto, że szczepy *A. phagocytophilum* występujące na terenie Trójmiasta i okolic prawdopodobnie nie są patogeniczne dla człowieka. Biorąc pod uwagę zarówno bardzo niski odsetek zakażonych

kleszczy, jak również wyniki sekwencjonowania genu 16S rRNA, zagrożenie HGA na badanym terenie jest niewysokie.

5.5. KOINFEKCJE W KLESZCZACH *IXODES RICINUS*

Kleszcze *I. ricinus* mogą ulegać zakażeniu podczas pobierania posiłku. Ponieważ piją krew żywiciela trzy razy w ciągu cyklu życiowego, ryzyko pobrania patogenów zwiększa się. Larwy kleszczy zwykle nie są zakażone *B. burgdorferi* oraz *A. phagocytophilum*, transmisja transowarialna w przypadku tych patogenów jest rzadka lub w ogóle nie występuje (Swanson 2006 [139]). Koinfekcje *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* są notowane zarówno u ludzi, zwierząt domowych jak i dzikich zwierząt. Koinfekcja oboma patogenami może pogorszyć objawy u pacjenta. W ponad 30% przypadków HGA notowano jednoczesną infekcję *B. burgdorferi* lub wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (Grzeszczuk 2009 [48]).

Anaplasma phagocytophilum ma właściwości immunomodulujące, wpływające na żywotność i aktywność granulocytów, co może prowadzić do upośledzenia zdolności obronnych zarażonego gospodarza, a tym samym może ułatwić drugiemu patogenowi jego kolonizację. Jednoczesna infekcja *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* może zmniejszać poziom interferonu α oraz interleukiny-12 prowadząc do łatwiejszego namnażania się tego pierwszego patogenu. Istnieją dowody sugerujące, że istnieją różnice w odpowiedzi immunologicznej wywoływanej przez kleszcze zakażone kilkoma patogenami w porównaniu z kleszczami zakażonymi jednym patogenem (Nieto 2009 [94]). Z tego względu duże znaczenie ma nie tylko poznanie występowania pojedynczych patogenów w kleszczach, ale także częstości występowania koinfekcji dwoma lub większą liczbą mikroorganizmów.

Przypadki koinfekcji kilkoma różnymi patogenami w kleszczach należących do rodzaju *Ixodes* były opisywane na całym świecie (Siński 2009 [125]). W badaniach prowadzonych na terenie Polski, oprócz pojedynczych infekcji, weryfikowano również, czy kleszcze *I. ricinus* mogą być nosicielami wielu gatunków patogenów jednocześnie. Krętki *B. burgdorferi* s.l. współwystępowały z *Anaplasma* spp. w 0,93% kleszczy, a z patogenami należącymi z rodzaju *Babesia* w 0,13% badanych pajęczaków. W tym samym badaniu stwierdzono również jednoczesne występowanie tych trzech patogenów u 0,06% pajęczaków (Wójcik-Fatla 2009 [165]). W innym badaniu koinfekcje *B. burgdorferi* s.l. i *B. microti* zidentyfikowano u 1,6% kleszczy, a koinfekcje *B. burgdorferi* s.l. + *A. phagocytophilum* u 0,7% tych pajęczaków (Cisak 2014 [27]).

W kilku badaniach stwierdzano również współwystępowanie *A. phagocytophilum* z innymi patogenami: krętkami *Borrelia* spp. u 1% kleszczy, a pierwotniakami z rodzaju *Babesia* u 1,1% kleszczy. Infekcje wszystkimi trzema patogenami wystąpiły u 0,1% kleszczy (Wójcik-Fatla 2009 [165]). Cisak (2014 [27]). odnotowała koinfekcje *B. burgdorferi* s.l. i *A. phagocytophilum* u 0,7% kleszczy. Natomiast Asman (2013 [4]) wykrył jednoczesne występowanie *A. phagocytophilum* i *Babesia* sp. aż u 46,7% badanych kleszczy, a koinfekcje *A. phagocytophilum*, *B. burgdorferi* s.l. i *Babesia* sp. u 3,3% *I. ricinus*.

W niniejszej pracy koinfekcje *Borrelia* spp. i *A. phagocytophilum* wykryto jedynie w dwóch kleszczach. Liczba ta jest niższa niż można by było oczekiwać, biorąc pod uwagę poziom zakażenia oboma patogenami, jednak ze względu na ogólnie bardzo niski poziom zakażenia *A. phagocytophilum*, nie jest możliwe wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Niemniej, należy wziąć pod uwagę, że koinfekcje *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* na badanym terenie nie są wykluczone.

5.6. PROFILAKTYKA CHOROÓB ODKLESZCZOWYCH I ZWALCZANIE KLESZCZY

Ryzyko zakażenia chorobą odkleszczową po ukłuciu przez kleszcza zależy od wielu czynników, takich jak rodzaj patogenu, liczby chorobotwórczych mikroorganizmów w kleszczu, długości kontaktu z kleszczem, czy indywidualnej podatności na infekcję. Tijisse-Klasen i wsp. (2011) [146] wykazali, że ryzyko zakażenia, w przypadku *B. burgdorferi* s.l. jest niższe niż 1%, nawet jeżeli kleszcz był zakażony. Biorąc jednak pod uwagę, że wraz ze zmianami środowiskowymi kontakt z kleszczami będzie rósł, także na terenach zurbanizowanych, ryzyka zakażenia chorobami odkleszczowymi nie należy lekceważyć.

Profilaktyka chorób odkleszczowych polega głównie na zapobieganiu przyczepieniu się kleszcza do skóry żywiciela. Przed wstępem na tereny występowania kleszczy należy odpowiednio się zabezpieczyć, przez zastosowanie specjalnej odzieży ochronnej lub przystosowanie zwykłej odzieży. Niedopuszczalne jest przebywanie na terenach o wysokim zagęszczeniu kleszczy w sukienkach, czy luźnych spodniach z krótkimi nogawkami. Wskazany jest strój sportowy, należy zabezpieczyć wszelkie miejsca, przez które kleszcze mogą przedostawać się na powierzchnię ciała (nogawki, rękawy). Zwykle, kleszcze po przedostaniu się na powierzchnię ciała nie od razu wbijają się w skórę. Dlatego, w celu minimalizacji ryzyka ataku pasożytów należy możliwie jak najczęściej przeprowadzać przeglądy powierzchni ubrania i usuwać pełzające po nim kleszcze. Dodatkowo należy w miarę możliwości 2 – 3 razy na dobę obejrzeć powierzchnię ciała i usunąć z niego pajęczaki. Przegląd taki należy wykonywać w miejscu wolnym od kleszczy oraz nie w pomieszczeniach mieszkalnych, gdyż można w ten sposób przenieść do nich pajęczaki. Należy unikać przebywania na szlakach zwierząt oraz wzdłuż ścieżek leśnych, gdyż są to charakterystyczne miejsca żerowania kleszczy. Należy unikać leżenia bezpośrednio na trawie i pod krzakami, najlepiej posłużyć się impregnowanym repelentem podścieleniem (Deryło 2002 [33]). Na terenach endemicznych, usuwanie liści, śmieci, regularne koszenie trawy i jej usuwanie może zmniejszać narażenie na kleszcze (Murray 2010 [92]).

Innym sposobem zabezpieczenia się przed kleszczami jest używanie repelentów na skórę, które odstraszą i zapobiegają przyczepianiu się pajęczaków. Środki odstraszące owady i pajęczaki, które zawierają n, n- N,N-Dietylo-m-toluamid (DEET) nakłada się na skórę w celu zapewnienia dodatkowej ochrony, wymaga to jednak ponownego zastosowania co 1 do 2 godzin dla maksymalnej skuteczności. Ponadto środki te nie są obojętne dla zdrowia. Zgłaszano przypadki poważnych powikłań neurologicznych u dzieci, u których stosowano środki z DEET w nadmiernej ilości lub z nadmierną częstotliwością. Ryzyko wystąpienia niekorzystnych efektów jest jednak małe, jeżeli środki te stosowane są zgodnie z instrukcją. Inna stosowana w walce z kleszczami substancja – permetryna (syntetyczny pyretroid) jest stosowana tylko do impregnacji odzieży i jest szczególnie skuteczna, ponieważ powoduje śmierć pajęczaków (Murray 2010 [92]).

Kleszcze można również zwalczać w ich środowisku naturalnym poprzez zmianę warunków mikroklimatycznych siedlisk, co utrudnia lub uniemożliwia odbycie tym pajęczakom pełnego cyklu

rozwojowego (Deryło 2002 [33]). Stosuje się też zabiegi chemiczne. Ostatnie dane wskazują, że skuteczne może być też stosowanie akarycydu, który uniemożliwia kleszczom pobieranie pokarmu, na populację dziko żyjących jeleni zmniejsza ryzyka chorób odkleszczowych. Stosowanie pestycydów na terenach zamieszkałych jest skuteczne w ograniczaniu populacji kleszczy, ale może być szkodliwe zarówno dla zwierząt i ludzi (Murray 2010 [92]).

Istotne znaczenie ma również szybkie usunięcie kleszcza ze skóry. Rozwinięte narządy gębowe kleszczy *I. ricinus* utrudniają ich usunięcie. Przed usunięciem nie należy kleszcza smarować tłuszczem, kremem ani innymi substancjami, gdyż może to doprowadzić do podrażnienia pajęczaka, który może zwrócić treść pokarmową, a wraz z nią ewentualne patogeny, co może prowadzić do masowej infekcji. Kleszcze najlepiej wyciągnąć przy użyciu pęsety lub innych dostępnych komercyjnie urządzeń np. zestawów wytwarzających podciśnienie. Miejsce przyczepu pajęczaka należy następnie zdezynfekować (Wanyura 2006 [157]).

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność chorobotwórczych patogenów na terenie Trójmiasta i okolic. Szczególnie w przypadku *B. burgdorferi* ryzyko kontaktu z kleszczem będącym nosicielem tych bakterii jest bardzo wysokie. Biorąc pod uwagę, że obecnie nie istnieją szczepionki zapewniające ochronę przed infekcją, a także zważywszy na fakt, że badane tereny są obszarami często odwiedzanymi przez turystów, a także przez okolicznych mieszkańców, ważne jest propagowanie wiedzy na temat zagrożeń ze strony chorób odkleszczowych oraz odpowiednich sposobów ochrony przed kleszczami.

6. WNIOSKI

- Liczne występowanie *I. ricinus* na terenach poddanych antropopresji, w tym zurbanizowanych, potwierdza opisane w literaturze zjawisko migracji kleszczy na zielone obszary podmiejskie i miejskie (proces synantropizacji).
- Średni i wysoki poziom narażenia atakami kleszczy na terenach zurbanizowanych sprawia, że ryzyko zakażenia/zarażenia mikroorganizmami zagrażającymi zdrowiu ludzi również jest znaczne.
- Opracowany w ramach niniejszej pracy duplex Real-Time PCR ze starterami i sondami, których celem molekularnym są geny *fla B. burgdorferi* s.l. i 16S rRNA *A. phagocytophilum*, stanowi czułe i specyficzne narzędzie do detekcji obu tych patogenów w kleszczach. Potwierdzono, że metoda może być stosowana w badaniach środowiskowych. Prawdopodobnie, zaprojektowany układ mógłby być wykorzystywany również do detekcji powyższych patogenów w innych rodzajach materiału, np. materiale klinicznym, jednak takie wykorzystanie wymagałoby dodatkowego etapu walidacji metody. Duplex Real-Time PCR, stanowi podstawę multiplexu do dodatkowej detekcji „dużych” *Babesia* spp. i *Rickettsia* spp. z grupy gorączek plamistych.
- Na terenach zurbanizowanych (Kolibki, Chwarzno) odsetek kleszczy zainfekowanych *Borrelia* spp. był istotnie wyższy niż na terenach wiejskich i leśnych (Sulęczyno, Kleszczewo). Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu antropopresji na poziom zakażenia kleszczy na terenach niezurbanizowanych. Obserwacje te potwierdzają wpływ synantropizacji fauny będącej żywicielami kleszczy (gryznie, dziki, lisy) na rozprzestrzenianie się krętków *Borrelia* spp. na tereny miejskie i podmiejskie. Sprzyja temu również wzrastająca populacja zwierząt towarzyszących. Odsetek zakażenia *I. ricinus* krętkami *Borrelia* spp. na badanym terenie wzrósł w ciągu ostatnich 10-ciu lat, w porównaniu do danych literaturowych.
- Obserwowany spadek poziomu zakażenia kleszczy krętkami *B. burgdorferi* w czasie (sierpień –wrzesień), przy jednoczesnym wzroście średniej intensywności infekcji (najmniejsze liczby patogenów w kleszczach odnotowano kwietniu w porównaniu do pozostałych miesięcy, przy czym liczba krętków wzrastała na przestrzeni kolejnych miesięcy aż do sierpnia) może sugerować, że wraz z wydłużającym się okresem aktywności głodnych kleszczy patogeny ulegają namnażaniu. W konsekwencji, ryzyko ataku przez zainfekowanego kleszcza spada w ciągu roku, ale wzrasta ryzyko transmisji patogenów. Potwierdzenie tej hipotezy wymagałoby jednak dalszych, szczegółowych badań.
- Najwyższy poziom ekstensywności (35,3%) zakażenia dorosłych *I. ricinus* krętkami *B. burgdorferi* potwierdza zarówno znaczenie transmisji transstadialnej oraz szerokiego kręgu żywicieli w epidemiologii boreliozy z Lyme.
- Poszczególne genogatunki cechują się odmiennym zróżnicowaniem genetycznym. Najmniejszą różnorodność (najwyższy stopień zakonserwowania) zaobserwowano w przypadku *B. afzelii*, największą w przypadku *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii*. Zróżnicowanie

genetyczne może mieć kilka przyczyn, między innymi różny zakres rezerwuarów (genogatunki bardziej zróżnicowane mogły przystosować się do ich większego zakresu). Gatunek *B. garinii* ma szerszy zakres rezerwuarów (był izolowany zarówno z ptaków jak i gryzoni), gatunek *B. afzelii* jest wiązany obecnie jedynie z gryzoniami. Różnice genetyczne mogą także wiązać się z różnym poziomem patogeniczności dla człowieka.

- Bardzo niski poziom zakażenia *A. phagocytophilum* (0,6%) na badanych terenach przy jednoczesnym braku sekwencji charakterystycznej dla szczepu AP-ha (uważanego za patogeniczny) i szczepów patogenicznych z terenu Europy (poza jednym o możliwym potencjale chorobotwórczym) sugerują, że zagrożenie HGA na tym obszarze jest niskie. Tym samym, niskie jest również ryzyko koinfekcji bakteriami *A. phagocytophilum* oraz krętkami *Borrelia* spp.
- Średnia intensywność zakażenia samic krętkami *B. burgdorferi* (rozumiana jako liczba patogenów obecnych w kleszczach) była istotnie wyższa niż intensywność zakażenia samców i nimf, natomiast nie było znaczącej różnicy pomiędzy intensywnością zakażenia samców i nimf. Ilości patogenów w kleszczach związane są więc prawdopodobnie z wielkością osobników (samice są znacznie większe niż samce i nimfy). Większa liczba patogenów może ułatwiać ich transmisję na żywiciela. Z drugiej strony, większe osobniki łatwiej dostrzec i usunąć ze skóry.
- Znaczne różnice w intensywności zakażenia wykazano dla poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Najwyższa intensywność infekcji dotyczyła gatunku *B. garinii*. Ryzyko zakażenia może być wyższe w przypadku wysokiego poziomu patogenów w wektorach. W takim przypadku transmisja bakterii może zachodzić w krótszym czasie od przyłączenia się kleszcza, co wiąże się z wyższym relatywnym ryzykiem zakażenia człowieka. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują, że poszczególne genogatunki różnią się nie tylko spektrum oddziaływania na człowieka, ale także przystosowaniem i zdolnością przetrwania w organizmach kleszczy.
- Średnia intensywność zakażenia kleszczy gatunkiem *Borrelia miyamotoi* była kilkakrotnie wyższa niż w przypadku kompleksu *B. burgdorferi* s.l., co sugeruje, że gatunek ten jest bardzo dobrze przystosowany do przetrwania w organizmach kleszczy. Przystosowanie tego gatunku do przetrwania w organizmach pajęczaków potwierdza także fakt, że gatunek ten zdolny do przekazu transowarialnego, w przeciwieństwie do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.
- Ze względu na ograniczoną liczbę prac poświęconych badaniom ilościowym występowania patogenów w kleszczach, wyniki niniejszej pracy stanowią cenny wkład w poznanie ekologii badanych patogenów w tym kontekście.
- Postać plazmidowego DNA stanowiącego kontrolę pozytywne służące do sporządzania krzywej standardowej w ilościowym PCR (qPCR) ma wpływ na wyniki uzyskiwane w reakcji. Stosowanie kolistych, superskręconych cząsteczek DNA może prowadzić do znacznego (wielokrotnego) zawyżenia otrzymanych wyników.
- Metoda ilościowego oznaczania kopii DNA w próbce za pomocą qPCR jest podatna na błędy wynikające z różnic w wydajności amplifikacji matrycy w próbach kontrolnych i badanych,

dlatego w interpretacji wyników należy kierować się raczej względnymi zależnościami między liczbami badanych mikroorganizmów, niż wartościami absolutnymi. Należy również unikać porównania pomiędzy wynikami uzyskiwanymi przy zastosowaniu różnych celów molekularnych zarówno różnych genów, jak i fragmentów tych samych genów.

- Monitorowanie występowania kleszczy i współwystępujących patogenów ma wpływ na zdrowie publiczne, przez skuteczniejsze wykrywanie i śledzenie trendów zmian w tym zakresie i lepszą kontrolę chorób odkleszczowych.

7. LITERATURA

1. Adamska M, Skotarczak B. Wild game as a reservoir of *Anaplasma phagocytophilum* in north-western Poland. *Wiad Parazytol.* 2007;53(2):103-7.
2. Amiel C, Abadia G, Choudat D. [Human granulocytic ehrlichiosis in Europe]. *Med Mal Infect.* 2004 Mar;34(3):111-22.
3. Asbrink E, Hovmark A. Classification, geographic variations, and epidemiology of Lyme borreliosis. *Clin Dermatol.* 1993 Jul-Sep;11(3):353-7.
4. Asman M1, Nowak M, Cuber P, Strzelczyk J, Szilman E, Szilman P, Trapp G, Siuda K, Solarz K, Wiczowski A. The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Babesia* sp. and co-infections in *Ixodes ricinus* ticks on the territory of Niepołomice forest (southern Poland). *Ann Parasitol.* 2013;59(1):13-9.
5. Bakken JS, Dumler JS. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Oct;1078:236-47.
6. Barthold SW, Feng S, Bockenstedt LK, et al. Protective and arthritis-resolving activity in sera of mice infected with *Borrelia burgdorferi*. *Clin Infect Dis.* Jul; 1997 25(Suppl 1):S9-17.
7. Bartosik K, Sitarz M, Szymańska J, Buczek A. Tick bites on humans in the agricultural and recreational areas in south-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2011;18(1):151-7.
8. Beugnet F, Marié JL. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Vet Parasitol.* 2009 Aug 26;163(4):298-305.
9. Biaduń W1, Krasnodebski S. Występowanie kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus* L. w środowiskach o różnym stopniu i charakterze antropopresji. *Wiad Parazytol.* 2007;53(2):133-7.
10. Biesiada G, Czepiel J, Leśniak MR, Garlicki A, Mach T. Lyme disease: review. *Arch Med Sci.* 2012 Dec 20;8(6):978-82.
11. Blanco JR, Oteo JA. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Dec;8(12):763-72.
12. Briciu VT, Sebah D, Coroiu G, Lupșe M, Cârstina D, Țățulescu DF, Mihalca AD, Gherman CM, Leucuța D, Meyer F, Hizo-Teufel C, Fingerle V, Huber I. Immunohistochemistry and real-time PCR as diagnostic tools for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks collected from humans. *Exp Appl Acarol.* 2016 May;69(1):49-60.
13. Brouqui P, Bacellar F, Baranton G, Birtles RJ, Bjoërsdorff A, Blanco JR, Caruso G, Cinco M, Fournier PE, Francavilla E, Jensenius M, Kazar J, Laferl H, Lakos A, Lotric Furlan S, Maurin M, Oteo JA, Parola P, Perez-Eid C, Peter O, Postic D, Raoult D, Tellez A, Tselentis Y, Wilske B; ESCMID Study Group on *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* and *Bartonella*; European Network for Surveillance of Tick-Borne Diseases. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004 Dec;10(12):1108-32.
14. Buczek A, Bartosik K. Ticks (Ixodida: Ixodidae, Amblyomma) in south-eastern Poland and their medical and epidemiological importance. *Zdr Publ* 2011;121(4):392-297.

15. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP. Lyme disease—a tick-borne spirochetosis? *Science*. 1982 Jun 18;216(4552):1317-9.
16. Cadavid D, O'Neill T, Schaefer H, et al. Localization of *Borrelia burgdorferi* in the nervous system and other organs in a nonhuman primate model of Lyme disease. *Lab Invest*. Jul; 2000 80(7):1043–1054.
17. Carlyon JA, Fikrig E. Mechanisms of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr Opin Hematol*. 2006 Jan;13(1):28-33.
18. Chan K, Marras SA, Parveen N. Sensitive multiplex PCR assay to differentiate Lyme spirochetes and emerging pathogens *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*. *BMC Microbiol*. 2013 Dec 20;13:295.
19. Chen J, Kadlubar FF, Chen JZ. DNA supercoiling suppresses real-time PCR: a new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(4):1377-88.
20. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*. 1994 Mar;32(3):589-95.
21. Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Cisak E, Wójcik-Fatla A, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks determined by polymerase chain reaction with two pairs of primers detecting 16S rRNA and ankA genes. *Ann Agric Environ Med*. 2007 Dec;14(2):281-5.
22. Chmielewski T, Andrzejewski K, Maczka I, Fiecek B, Radlińska M, Tylewska-Wierzbanowska S. [Ticks infected with bacteria pathogenic to humans in municipal parks in Warsaw]. *Przegl Epidemiol*. 2011;65(4):577-81.
23. Cieniuch S, Stańczak J, Ruczaj A. The first detection of *Babesia EU1* and *Babesia canis canis* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) collected in urban and rural areas in northern Poland. *Pol J Microbiol*. 2009;58(3):231-6.
24. Ciesielska A, Sikorski MM. Zastosowanie techniki PCR w czasie rzeczywistym do walidacji eksperymentu mikromacierzowego. *Biotechnologia*. 2008;4(83):88-100.
25. Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Wojcik-Fatla A, Zajac V, Skórska C, Dutkiewicz J. Study on Lyme borreliosis focus in the Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med*. 2008 Dec;15(2):327-32.
26. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Stojek N, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Buczek A, Dutkiewicz J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(2):301-6.
27. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Dutkiewicz J. Prevalence of tick-borne pathogens at various workplaces in forest exploitation environment. *Med Pr*. 2014;65(5):575-81.
28. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Zając V, Sroka J, Dutkiewicz J. Risk of Lyme disease at various sites and workplaces of forestry workers in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2012;19(3):465-8.
29. Courtney JW, Kostelnik LM, Zeidner NS, Massung RF. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul;42(7):3164-8.

30. Crippa M, Rais O, Gern L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2002 Spring;2(1):3-9.
31. Czubasiewicz Z, Strzelczyk JK, Krzakiewicz K. Przegląd metod służących do wykrycia zakażenia *Borrelia burgdorferi*. *Pediatr Med Rodz* 2013; 9(2): 144–149.
32. Derdákóvá M, Václav R, Pangrácova-Blaňárová L, Selyemová D, Koči J, Walder G, Špitalská E. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of Central Europe. *Parasit Vectors.* 2014 Apr 2;7:160.
33. Deryło A, Boczoń K, Drewa G, Grytner-Zięcina B, Hadaś E, Humiczewska-Rajska M, Jankowski S, Kurnatowska A, Kurnatowski P, Kuźna-Grygiel W, Kwaśniewska J, Siuda K, Solarz K, Wiczkowski A. *Parazytologia i akarontomologia medyczna. Podręcznik dla studentów, nauczycieli akademickich, lekarzy praktyków i pracowników laboratoriów diagnostycznych.* Redaktor naukowy Antoni Deryło. Wydawnictwo Naukowe PWN 2002.
34. Dhanasekaran S, Doherty TM, Kenneth J; TB Trials Study Group. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *J Immunol Methods.* 2010 Mar 31;354(1-2):34-9.
35. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *J Mol Diagn.* 2008 May;10(3):185-97.
36. Drazenovich N, Foley J, Brown RN. Use of real-time quantitative PCR targeting the *msp2* protein gene to identify cryptic *Anaplasma phagocytophilum* infections in wildlife and domestic animals. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2006 Spring;6(1):83-90.
37. Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis.* 2005 Dec;11(12):1828-34. (a)
38. Dumler JS, Madigan JE, Pusterla N, Bakken JS. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007 Jul 15;45 Suppl 1:S45-51.
39. Dumler JS. *Anaplasma* and Ehrlichia infection. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1063:361-73. (b)
40. Dumler JS. The biological basis of severe outcomes in *Anaplasma phagocytophilum* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Feb;64(1):13-20.
41. Dunaj J, Zajkowska JM, Kondrusik M, Gern L, Rais O, Moniuszko A, Pancewicz S, Świerzbńska R. *Borrelia burgdorferi* genospecies detection by RLB hybridization in *Ixodes ricinus* ticks from different sites of North-Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2014;21(2):239-43.
42. Ekner A, Dudek K, Sajkowska Z, Majláthová V, Majláth I, Tryjanowski P. Anaplasmataceae and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in the sand lizard *Lacerta agilis* and co-infection of these bacteria in hosted *Ixodes ricinus* ticks. *Parasit Vectors.* 2011 Sep 20;4:182.
43. EUCALB 1997-2016. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (<http://www.eucalb.com/>).
44. Exner MM, Lewinski MA. Isolation and detection of *Borrelia burgdorferi* DNA from cerebral spinal fluid, synovial fluid, blood, urine, and ticks using the Roche MagNA Pure system and real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003 Aug;46(4):235-40.

45. Fairfax MR, Salimnia H. Diagnostic molecular microbiology: a 2013 snapshot. *Clin Lab Med*. 2013 Dec;33(4):787-803.
46. Flisiak R, Pancewicz S; Polish Society of Epidemiology and Infectious Diseases. Diagnostyka i leczenie boreliozy z Lyme. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. *Przeegl Epidemiol*. 2008;62(1):193-9.
47. Glatz M, Muellegger RR, Hizo-Teufel C, Fingerle V. Low prevalence of *Borrelia bavariensis* in *Ixodes ricinus* ticks in southeastern Austria. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014 Oct;5(6):649-50.
48. Grzeszczuk A, Puzanowska B, Zirako S. *Anaplasma phagocytophilum* infection in patients with early Lyme borreliosis, erythema migrans, in north-eastern Poland. 2009 CMI, 15 (Suppl. 2), 17–18.
49. Grzeszczuk A, Stanczak J. High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(1):45-8 (a).
50. Grzeszczuk A, Stańczak J. Highly variable year-to-year prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in northeastern Poland: a 4-year follow-up. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1078:309-11 (b).
51. Grzeszczuk A. *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and human granulocytic anaplasmosis seroprevalence among forestry rangers in Białystok region. *Adv Med Sci*. 2006;51:283-6 (c).
52. Guo BP, Brown EL, Dorward DW, Rosenberg LC, Höök M. Decorin-binding adhesins from *Borrelia burgdorferi*. *Mol Microbiol*. 1998 Nov;30(4):711-23.
53. Halos L, Bord S, Cotté V, Gasqui P, Abrial D, Barnouin J, Boulouis HJ, Vayssier-Taussat M, Vourc'h G. Ecological factors characterizing the prevalence of bacterial tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* ticks in pastures and woodlands. *Appl Environ Microbiol*. 2010 Jul;76(13):4413-20.
54. Handeland K, Qviller L, Vikøren T, Viljugrein H, Lillehaug A, Davidson RK. *Ixodes ricinus* infestation in free-ranging cervids in Norway--a study based upon ear examinations of hunted animals. *Vet Parasitol*. 2013 Jul 1;195(1-2):142-9.
55. Herrmann C, Voordouw MJ, Gern L. *Ixodes ricinus* ticks infected with the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, have higher energy reserves. *Int J Parasitol*. 2013 May;43(6):477-83.
56. Heylen DJ, Müller W, Vermeulen A, Sprong H, Matthysen E. Virulence of recurrent infestations with *Borrelia*-infected ticks in a *Borrelia*-amplifying bird. *Sci Rep*. 2015 Nov 10;5:16150.
57. Hojgaard A, Lukacik G, Piesman J. Detection of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*, with two different multiplex PCR assays. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014 Apr;5(3):349-51.
58. Holzer BR. [Tick borne diseases]. *Ther Umsch*. 2005 Nov;62(11):757-63.
59. Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S. Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal *pcna* as the model gene. *PLoS One*. 2010 Mar 5;5(3):e9545.

60. Hubálek Z, Halouzka J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidemiol*. 1997 Dec;13(8):951-7.
61. Huhn C, Winter C, Wolfspurger T, Wüppenhorst N, Strašek Smrdel K, Skuballa J, Pfäffle M, Petney T, Silaghi C, Dyachenko V, Pantchev N, Straubinger RK, Schaarschmidt-Kiener D, Ganter M, Aardema ML, von Loewenich FD. Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. *PLoS One*. 2014 Apr 3;9(4):e93725.
62. Inokuma H, Yoshizaki Y, Shimada Y, Sakata Y, Okuda M, Onishi T. Epidemiological survey of *Babesia* species in Japan performed with specimens from ticks collected from dogs and detection of new *Babesia* DNA closely related to *Babesia odocoilei* and *Babesia divergens* DNA. *J Clin Microbiol*. 2003 Aug;41(8):3494-8.
63. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):261-92. doi: 10.1016/j.cll.2009.10.004.
64. Jahfari S, Coipan EC, Fonville M, van Leeuwen AD, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, Szekeres S, van Duijvendijk G, Tack W, Rijks JM, van der Giessen J, Takken W, van Wieren SE, Takumi K, Sprong H. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasit Vectors*. 2014 Aug 15;7:365.
65. Jin H, Wei F, Liu Q, Qian J. Epidemiology and control of human granulocytic anaplasmosis: a systematic review. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012 Apr;12(4):269-74. doi: 10.1089/vbz.2011.0753. Epub 2012 Jan 4.
66. Kaplan RF, Trevino RP, Johnson GM, Levy L, Dornbush R, Hu LT, Evans J, Weinstein A, Schmid CH, Klempner MS. Cognitive function in post-treatment Lyme disease: do additional antibiotics help? *Neurology*. 2003 Jun 24;60(12):1916-22.
67. Karbowski G, Siuda K. Występowanie kleszcza pospolitego *Ixodes ricinus* (Aari: Ixodida) na terenach rekreacyjnych dużych aglomeracji miejskich w Polsce i jego znaczenie epidemiologiczne. *Wyd. NICE, Bydgoszcz 2001*, 150-154.
68. Kiewra D, Lonc E. Epidemiological consequences of host specificity of ticks (Ixodida). *Ann Parasitol*. 2012;58(4):181-7.
69. Kiewra D, Stańczak J, Richter M. *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Borrelia miyamotoi* in Lower Silesia, Poland--preliminary study. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014 Oct;5(6):892-7.
70. Kmiecik W, Ciszewski M, Szewczyk EM. Choroby odkleszczowe w Polsce - występowanie i trudności diagnostyczne. *Medycyna Pracy* 2016;67(1):73-87.
71. Komoń T, Sytykiewicz H. [Occurrence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in selected *Ixodes ricinus* populations within Nadbuzański Landscape Park]. *Wiad Parazytol*. 2007;53(4):309-17.
72. Kosik-Bogacka DI, Kuźna-Grygiel W, Jaborowska M. Ticks and mosquitoes as vectors of *Borrelia burgdorferi* s. l. in the forested areas of Szczecin. *Folia Biol (Krakow)*. 2007;55(3-4):143-6.
73. Krakowetz CN, Dibernardo A, Lindsay LR, Chilton NB. Two *Anaplasma phagocytophilum* strains in *Ixodes scapularis* ticks, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2014 Dec;20(12):2064-7.

74. Latulippe DR, Zydney AL. Size exclusion chromatography of plasmid DNA isoforms. *J Chromatogr A*. 2009 Aug 28;1216(35):6295-302.
75. Lencáková D1, Hizo-Teufel C, Petko B, Schulte-Spechtel U, Stanko M, Wilske B, Fingerle V. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA types in *Ixodes ricinus* ticks from selected localities in Slovakia and Poland. *Int J Med Microbiol*. 2006 May;296 Suppl 40:108-18.
76. Lindgren E, Jaenson TGT. Lyme borreliosis in Europe: influences of climate and climate change, epidemiology, ecology and adaptation measures. 2006 WHO Regional Office for Europe.
77. Lipkin WI. Microbe hunting. *Microbiol Molec Biol Revs* 2010; 74: 363–77.
78. Manual JET system.
79. Marconi RT1, Hohenberger S, Jauris-Heipke S, Schulte-Spechtel U, LaVoie CP, Rössler D, Wilske B. Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. *J Clin Microbiol*. 1999 Dec;37(12):3965-70.
80. Marques AR. Lyme disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010 Jan;10(1):13-20.
81. Massung RF, Mauel MJ, Owens JH, Allan N, Courtney JW, Stafford KC III, et al. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode island and Connecticut. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:467–72.
82. Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol*. 1998 Apr;36(4):1090-5.
83. Massung RF, Slater KG. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):717-22.
84. Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12:731–54.
85. Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol*. 2004 Feb;7(1):62-6.
86. Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenson TG, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. 2013 Jan 2;6:1.
87. Meyer-Kayser E, Hoffmann L, Silaghi C, Pfister K, Mahling M, Passos LM. Dynamics of tick infestations in foxes in Thuringia, Germany. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012 Sep;3(4):232-9.
88. Michalik J, Skotarczak B, Skoracki M, Wodecka B, Sikora B, Hofman T, Rymaszewska A, Sawczuk M. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland. *J Med Entomol*. 2005 Sep;42(5):850-6.
89. Mihalca AD, Sándor AD. The role of rodents in the ecology of *Ixodes ricinus* and associated pathogens in Central and Eastern Europe. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Oct 1;3:56.
90. Morse SS, Mazet JA, Woolhouse M, Parrish CR, Carroll D, Karesh WB, Zambrana-Torrel C, Lipkin WI, Daszak P. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet*. 2012 Dec 1;380(9857):1956-65.

91. Mucha D, Zielazny P, Karakiewicz B. Choroby przenoszone przez kleszcze – sytuacja epidemiologiczna w województwie pomorskim. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 2012, Tom 18, Nr 2, 93-99.
92. Murray TS, Shapiro ED. Lyme disease. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):311-28.
93. Nau R, Christen HJ, Eiffert H. Lyme disease--current state of knowledge. *Dtsch Arztebl Int*. 2009 Jan;106(5):72-81; quiz 82, I.
94. Nieto NC, Foley JE. Meta-analysis of coinfection and coexposure with *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in humans, domestic animals, wildlife, and *Ixodes ricinus*-complex ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009 Feb;9(1):93-102.
95. Nilsson K, Lindquist O, Pålsson C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1169-73.
96. Nowak-Chmura M, Siuda K. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann Parasitol*. 2012;58(3):125-55.
97. Ogden NH, Mechai S, Margos G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Aug 29;3:46.
98. Ornstein K, Barbour AG. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of *Borrelia burgdorferi* 16S rRNA for highly sensitive quantification of pathogen load in a vector. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2006 Spring;6(1):103-12.
99. Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res*. 2005 May-Jun;36(3):469-92.
100. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev*. 2013 Oct;26(4):657-702.
101. Parola P. Tick-borne rickettsial diseases: emerging risks in Europe. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):297-304.
102. Piesman J, Schneider BS, Zeidner NS. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. *J Clin Microbiol*. 2001 Nov;39(11):4145-8.
103. Piksa K, Stańczak J, Biernat B, Górz A, Nowak-Chmura M, Siuda K. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in hard ticks (Acari, Ixodidae) parasitizing bats in Poland. *Parasitol Res*. 2016 Apr;115(4):1727-31.
104. Platonov AE, Karan LS, Kolyasnikova NM, Makhneva NA, Toporkova MG, Maleev VV, Fish D, Krause PJ. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1816-23.
105. Preacher, K. J. (2001, April). Calculation for the chi-square test: An interactive calculation tool for chi-square tests of goodness of fit and independence [Computer software]. Available from <http://quantpsy.org>.

- 106.Ramos RA, Latrofa MS, Giannelli A, Lacasella V, Campbell BE, Dantas-Torres F, Otranto D. Detection of *Anaplasma platys* in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* group ticks by a quantitative real-time PCR. *Vet Parasitol.* 2014 Sep 15;205(1-2):285-8.
- 107.Raport Głównego Inspektora Sanitarnego. Stan sanitarny kraju w roku 2010.
- 108.Real-Time PCR Handbook. Applied Biotechnology.
- 109.Reinbold JB, Coetzee JF, Sirigireddy KR, Ganta RR. Detection of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in bovine peripheral blood samples by duplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul;48(7):2424-32.
- 110.Reis C, Cote M, Paul RE, Bonnet S. Questing ticks in suburban forest are infected by at least six tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Jul;11(7):907-16.
- 111.Relman DA. Microbial genomics and infectious diseases. *N Engl J Med* 2011; 365: 347–57.
- 112.Reye AL, Hübschen JM, Sausy A, Muller CP. Prevalence and seasonality of tick-borne pathogens in questing *Ixodes ricinus* ticks from Luxembourg. *Appl Environ Microbiol.* 2010 May;76(9):2923-31.
- 113.Rijpkema S, Golubić D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruijff N, Schellekens J. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol.* 1996 Jan;20(1):23-30.
- 114.Rikihisa Y. Ehrlichia subversion of host innate responses. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Feb;9(1):95-101. Epub 2006 Jan 6.
- 115.Rikihisa Y. Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jul;24(3):469-89. doi: 10.1128/CMR.00064-10.
- 116.Rizzoli A, Silaghi C, Obiegala A, Rudolf I, Hubálek Z, Földvári G, Plantard O, Vayssier-Taussat M, Bonnet S, Spitalská E, Kazimírová M. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front Public Health.* 2014 Dec 1;2:251.
- 117.Rozwadowska B, Hudzik G. [*Borrelia burgdorferi* genotypes detected in the Silesian Voivodeship in years 2010-2012]. *Przegl Epidemiol.* 2012;66(4):587-90.
- 118.Schorn S, Pfister K, Reulen H, Mahling M, Silaghi C. Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasit Vectors.* 2011 Jul 15;4:135.z
- 119.Sevcik M, Kristofik J, Uhrin M, Benda P. New records of ticks (Acari: Ixodidae) parasitising on bats in Slovakia. *Vespertilio.* 2010;13/14:139–147.
- 120.Severo MS1, Stephens KD, Kotsyfakis M, Pedra JH. *Anaplasma phagocytophilum*: deceptively simple or simply deceptive? *Future Microbiol.* 2012 Jun;7(6):719-31. doi: 10.2217/fmb.12.45.
- 121.Silaghi C, Gilles J, Höhle M, Fingerle V, Just FT, Pfister K. *Anaplasma phagocytophilum* infection in *Ixodes ricinus*, Bavaria, Germany. *Emerg Infect Dis* (2008); 14:972–4.
- 122.Silaghi C, Pfister K, Overzier E. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014 May;14(5):371-3.

123. Silaghi C, Woll D, Hamel D, Pfister K, Mahling M, Pfeffer M. *Babesia* spp. and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks, ticks parasitizing rodents and the parasitized rodents--analyzing the host-pathogen-vector interface in a metropolitan area. *Parasit Vectors*. 2012 Sep 5;5:191.
124. Siński E, Pawełczyk A, Bajer A, Behnke J. Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(2):295-300.
125. Siński E. [Effect of coinfections in Ixodidae ticks on transmission of blood microparasites]. *Wiad Parazytol*. 2009;55(4):341-7.
126. Siuda K (1991) *Kleszcze (Acari: Ixodida) Polski. (Część 1): Zagadnienia ogólne*. Warszawa, Wrocław. Wydawnictwo Naukowe PWN.
127. Siuda K (1993) *Ticks of Poland (Acari: Ixodidae). Vol 2. Part II: Systematyka i rozmieszczenie [Systematic and distribution]*, Warszawa, Polskie Towarzystwo Parazytologiczne: 372.
128. Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M, Adamska M, Maciejewska A. PCR detection of granulocytic *Anaplasma* and *Babesia* in *Ixodes ricinus* ticks and birds in west-central Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(1):21-3.
129. Sroka 1, Szymanska J, Wojcik-Fatla A. The occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks from east Poland with the use of pcr. *Ann Agric Environ Med*. 2009 Dec;16(2):313-9.
130. Stafford KC 3rd, Massung RF, Magnarelli LA, Ijdo JW, Anderson JF. Infection with agents of human granulocytic ehrlichiosis, lyme disease, and babesiosis in wild white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in Connecticut. *J Clin Microbiol*. 1999 Sep;37(9):2887-92.
131. Stańczak J, Gabre RM, Kruminis-Łozowska W, Racewicz M, Kubica-Biernat B. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Ann Agric Environ Med*. 2004;11(1):109-14.
132. Stanek G, Wormser GP, Gray J, Strle F. Lyme borreliosis. *Lancet*. 2012 Feb 4;379(9814):461-73.
133. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Ross MR, Steele FM. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*. 1977 Jan-Feb;20(1):7-17.
134. Stefanoff P, Rosińska M, Zieliński A. [Epidemiology of tick-borne diseases in Poland]. *Przegl Epidemiol*. 2006;60 Suppl 1:151-9.
135. Stephenson N, Hodzic E, Mapes S, Rejmanek D, Foley J. A real-time PCR assay for differentiating pathogenic *Anaplasma phagocytophilum* from an apathogenic, woodrat-adapted genospecies from North America. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015 Sep;6(6):774-8.
136. Strzelczyk JK, Wiczowski A, Spausta G, Ciarkowska J, Zalewska-Ziob M, Izdebska-Straszak G, Strzelczyk J, Kasperczyk J. [Presence of spirochetes of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in the recreational area of Tarnowskie Gory and Zabrze districts in 2001-2003]. *Przegl Epidemiol*. 2006;60(3):589-95.
137. Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Jul 22;3:31.

138. Supergan M, Karbowski G. The estimation scale of endangerment with tick attacks on recreational towns areas. *Przegl Epidemiol.* 2009;63(1):67-71.
139. Swanson SJ, Neitzel D, Reed KD, Belongia EA. Coinfections acquired from ixodes ticks. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):708-27.
140. Sytykiewicz H, Karbowski G, Hapunik J, Szpechciński A, Supergan-Marwicz M, Goławska S, Sprawka I, Czerniewicz P. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* co-infections in *Ixodes ricinus* ticks in central-eastern region of Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(1):45-9. (a)
141. Sytykiewicz H, Karbowski G, Werszko J, Czerniewicz P, Sprawka I, Mitrus J. Molecular screening for *Bartonella henselae* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* co-existence within *Ixodes ricinus* populations in central and eastern parts of Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2012;19(3):451-6. (b)
142. Tappe J, Strube C. *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. infections in hard ticks (*Ixodes ricinus*) in the city of Hanover (Germany): revisited. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013 Sep;4(5):432-8.
143. Taragelová V, Koci J, Hanincová K, Olekšák M, Labuda M. Songbirds as hosts for ticks (Acari, Ixodidae) in Slovakia. *Biologia* (2005) 60(5):529–37.
144. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Jul 29;356(1411):983-9.
145. Telford SR 3rd, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jun 11;93(12):6209-14.
146. Tijssse-Klasen E, Jacobs JJ, Swart A, Fonville M, Reimerink JH, Brandenburg AH, van der Giessen JW, Hofhuis A, Sprong H. Small risk of developing symptomatic tick-borne diseases following a tick bite in The Netherlands. *Parasit Vectors.* 2011 Feb 10;4:17.
147. Tijssse-Klasen E, Koopmans MP, Sprong H. Tick-borne pathogen - reversed and conventional discovery of disease. *Front Public Health.* 2014 Jul 7;2:73.
148. Tokarska-Rodak M, Plewik D, Koziol-Montewka M, Szepeluk A, Paszkiewicz J. [Risk of occupational infections caused by *Borrelia burgdorferi* among forestry workers and farmers]. *Med Pr.* 2014;65(1):109-17.
149. Tyburski J, Studzińska A, Dąca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. *Metody analizy danych. Biotechnologia.* 2008; 1(80): 86-96.
150. Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T, Kondrusik M, Hermanowska-Szpakowicz T, Sawicki W, Sułek K. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 196–198.
151. Uspensky I. Blood-Sucking Ticks (Acari: Ixodoidea) and their Mammalian Hosts in the Urban Environment: A Review. *RRJZS.* 2016 January-April; 4(2): 8-16.
152. van Doorn HR. Emerging infectious diseases. *Medicine (Abingdon).* 2014 Jan;42(1):60-63.
153. Vannier E, Gewurz BE, Krause PJ. Human babesiosis. *Infect Dis Clin North Am.* 2008 Sep;22(3):469-88, viii-ix.

154. Vorou RM, Papavassiliou VG, Tsiodras S. Emerging zoonoses and vector-borne infections affecting humans in Europe. *Epidemiol Infect.* 2007 Nov;135(8):1231-47. Epub 2007 Apr 20.
155. Wang G, Liveris D, Brei B, Wu H, Falco RC, Fish D, Schwartz I. Real-time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Aug;69(8):4561-5.
156. Wang P, Glowacki MN2, Hoet AE3, Needham GR4, Smith KA5, Gary RE5, Li X1. Emergence of *Ixodes scapularis* and *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease vector and agent, in Ohio. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Jun 4;4:70.
157. Wanyura H, Wagner T, Kowalska K. Borelioza – choroba z Lyme. *Czas. Stomatol.* 2006, LIX, 9, 640-648.
158. Wegner Z, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Lozowska W, Stańczak J. [The prevalence of *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in the forested areas of Gdansk, Sopot, and Gdynia and their infection rate with *Borrelia burgdorferi* spirochetes]. *Przegl Epidemiol.* 1997;51(1-2):11-20.
159. Welc-Falęciak R, Kowalec M, Karbowski G, Bajer A, Behnke JM, Siński E. Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasit Vectors.* 2014 Mar 24;7:121.
160. Welc-Falęciak R, Kowalec M, Zajkowska J, Pancewicz SA, Siński E. Clinical and molecular features of one case of human infection with *Anaplasma phagocytophilum* from Podlaskie Province in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(3):414-7.
161. Welinder-Olsson C, Kjellin E, Vaht K, Jacobsson S, Wennerås C. First case of human "Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*" infection in a febrile patient with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1956-9.
162. Wodecka B, Leońska A, Skotarczak B. A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *J Med Microbiol.* 2010 Mar;59(Pt 3):309-14.
163. Wodecka B, Rymaszewska A, Skotarczak B. Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland. *Exp Appl Acarol.* 2014 Apr;62(4):543-55.
164. Wodecka B. [Significance of red deer (*Cervus elaphus*) in the ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato]. *Wiad Parazytol.* 2007;53(3):231-7.
165. Wójcik-Fatla A, Szymańska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J. Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin macroregion. *Ann Agric Environ Med.* 2009 Jun;16(1):151-8.
166. Woldehiwet Z. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet J.* 2008 Jan;175(1):37-44. Epub 2007 Feb 1.
167. Wolff D, Gerritzen A. Evaluation of a real-time PCR assay for the detection, genotyping, and quantification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes* ticks in a routine laboratory setting. *Clin Lab.* 2011;57(1-2):67-73.

168. Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ. Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol*. 2002 Jan 1;168(1):348-55.
169. Wormser GP, Brisson D, Liveris D, Hanincová K, Sandigursky S, Nowakowski J, Nadelman RB, Ludin S, Schwartz I. *Borrelia burgdorferi* genotype predicts the capacity for hematogenous dissemination during early Lyme disease. *J Infect Dis*. 2008 Nov 1;198(9):1358-64.
170. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, Krause PJ, Bakken JS, Strle F, Stanek G, Bockenstedt L, Fish D, Dumler JS, Nadelman RB. The clinical assessment, treatment, and prevention of Lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2006 Nov 1;43(9):1089-134.
171. Zhang L, Liu Y, Ni D, Li Q, Yu Y, Yu XJ, Wan K, Li D, Liang G, Jiang X, Jing H, Run J, Luan M, Fu X, Zhang J, Yang W, Wang Y, Dumler JS, Feng Z, Ren J, Xu J. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*. 2008 Nov 19;300(19):2263-70.
172. Zygner W, Jaros S, Wedrychowicz H. Prevalence of *Babesia canis*, *Borrelia afzelii*, and *Anaplasma phagocytophilum* infection in hard ticks removed from dogs in Warsaw (central Poland). *Vet Parasitol*. 2008 May 6;153(1-2):139-42.

8. RYCINY

Ryc. 1 Mapa obrazująca ryzyko pojawienia się nowych zoonoz (Morse 2012 [90]).	8
Ryc. 2 Czynniki wpływające na występowanie, transmisję i diagnostykę chorób przenoszonych przez kleszcze (Tijssse-Klasen 2014 [147]).	9
Ryc. 3 Stadia rozwojowe kleszczy twardych. Od lewej: larwa, nimfa, samiec i samica (http://itg.content-e.eu).	12
Ryc. 4 Rozprzestrzenienie geograficzne ważnych medycznie gatunków kleszczy należących do rodzaju <i>Ixodes</i> (Swanson 2006 [139]).	14
Ryc. 5 Bakterie <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w neutrofilu pobranym z krwi obwodowej człowieka (Dumler 2005a [37]).	20
Ryc. 6 Objawy skórne boreliozy: a, b – różne postacie rumienia wędrującego, c – chłoniak limfocytarny, d – zanikowe zapalenie skóry (Nau 2009 [93]).	25
Ryc. 7 Objawy boreliozy: a – porażenie nerwu twarzonego, b – pleocytoza w płynie mózgowo rdzeniowym, aktywowane limfocyty, monocyty, komórki plazmatyczne i rzadziej neutrofile, c – zapalenie naczyń w mózgu, badanie MRI, obraz T2-zależny, przekrój osiowy mózgu 14-letniej dziewczynki z podostrym niedowładem połowicznym prawostronnym dotyczącym głównie kończyny górnej, pleocytozą płynu mózgowo-rdzeniowego i syntezą przeciwciał przeciwko <i>Borrelia burgdorferi</i> w OUN, całkowite ustąpienie objawów po pozajelitowej antybiotykoterapii, MRI w fazie ostrej (prawa strona) oraz kilka miesięcy później (lewa strona), d –zapalenie stawu kolanowego (Nau 2009 [93]).	26
Ryc. 8 Lokalizacja miejsc zbioru kleszczy (czerwone znaczniki) na tle województwa pomorskiego (źródło mapy: www.google.pl/maps).	31
Ryc. 9 Dokumentacja fotograficzna miejsc odłowu kleszczy: A – Gdynia Kolibki, B – Gdynia Chwarzno, C - Sulęczyo, D – Kleszczewo (fot. Jan Stańczak).	31
Ryc. 10 Sekwencje oraz właściwości fizyko-chemiczne starterów oraz sond molekularnych użytych w celu detekcji <i>Anaplasma phagocytophilum</i> i <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i> .	39
Ryc. 11 Porównanie mieszanin MasterMix A&A Biotechnology (lewa kolumna) oraz Stratagene (prawa kolumna) (<i>Anaplasma</i> i <i>Borrelia</i>).	41
Ryc. 12 Aktywność kleszczy na poszczególnych stanowiskach od kwietnia do września. Oś Y – liczba odłowionych kleszczy/godzinę/osobę.	44
Ryc. 13 Liczba kleszczy <i>I. ricinus</i> niezainfekowanych (zielony) i zakażonych krętkami <i>Borrelia</i> sp. (czerwony) w latach 2008 i 2009. Na wykresach podano odsetek zainfekowanych kleszczy.	46
Ryc. 14 Zależności pomiędzy aktywnością kleszczy (oś X) i poziomem zakażenia kleszczy krętkami <i>Borrelia</i> spp.(oś Y).	47
Ryc. 15 Odsetek zainfekowanych kleszczy krętkami <i>Borrelia</i> spp. na poszczególnych stanowiskach zbioru. Intensywność barwy odzwierciedla stopień antropopresji (w kolejności od najwyższego do najniższego: Sulęczyo, Kolibki, Chwarzno, Kleszczewo).	48
Ryc. 16 Analiza restrykcyjna fragmentu genu <i>fla</i> . Oznaczenia poszczególnych genogatunków: A – <i>Borrelia afzelii</i> , G – <i>Borrelia garinii</i> , V – <i>Borrelia valaisiana</i> , L – <i>Borrelia lusitaniae</i> , B – <i>Borrelia burgdorferi</i> s.s., M – <i>Borrelia miyam otoi</i> .	49
Ryc. 17 Rozkład zidentyfikowanych gatunków <i>Borrelia</i> na stanowiskach Gdynia Kolibki i Gdynia Chwarzno.	49
Ryc. 18 Procentowy odsetek poszczególnych gatunków <i>Borrelia</i> w zależności od stadium rozwojowego.	50
Ryc. 19 Dopasowanie uzyskanych sekwencji fragmentu genu <i>fla</i> krętków z kompleksu <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. uzyskane przy pomocy programu CodonCode Aligner v 6.0.2.	52

Ryc. 20 Filogram obrazujący zależności genetyczne pomiędzy poszczególnymi sekwencjami otrzymanymi w ramach pracy oraz sekwencjami zdeponowanymi w banku genów. Podziałka obrazuje odległość genetyczną pomiędzy sekwencjami (różnice 2.2 na 100 nukleotydów). Filogram został wygenerowany za pomocą narzędzia CLC Sequence Viewer (7.6.1), metoda Neighbor-Joining.	53
Ryc. 21 Rozkład uzyskanych wartości liczby krętków <i>Borrelia</i> spp. w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i> (http://scistatcalc.blogspot.com), statystyka $W <$ wartość krytyczna, hipoteza zerowa odrzucona, rozkład nie spełnia założeń rozkładu normalnego.	54
Ryc. 22 Rozkład uzyskanych wartości liczby krętków <i>Borrelia</i> spp. w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i> (http://scistatcalc.blogspot.com) po transformacji logarytmicznej, statystyka $W >$ wartość krytyczna, hipoteza zarowa nie została odrzucona, rozkład spełnia założenia rozkładu normalnego.	55
Ryc. 23 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stadium rozwojowym a liczebnością krętków <i>Borrelia</i> w kleszczach.	58
Ryc. 24 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu kleszczy a średnią liczebnością krętków w kleszczach, łącznie dla lat 2008 i 2009.	59
Ryc. 25 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu a intensywnością zakażenia kleszczy w 2008 r.	60
Ryc. 26 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy miesiącem odłowu a średnią intensywnością zakażenia kleszczy w 2009 r.	61
Ryc. 27 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stanowiskiem odłowu kleszczy a intensywnością zakażenia kleszczy. Gwiazdki oznaczają różnice istotne statystycznie.	62
Ryc. 28 Liczba kleszczy <i>I. ricinus</i> niezainfekowanych (zielony) i zainfekowanych bakteriami <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (czerwony) w roku 2008 i 2009. Na wykresach podano odsetek zainfekowanych kleszczy.	66
Ryc. 29 Zależności pomiędzy aktywnością kleszczy (oś X) i poziomem zakażenia kleszczy bakteriami <i>A. phagocytophilum</i> (oś Y).	66
Ryc. 30 Odsetek zainfekowanych kleszczy <i>A. phagocytophilum</i> na poszczególnych stanowiskach zbioru. Intensywność barwy odzwierciedla stopień antropopresji (w kolejności od najwyższego do najniższego: Sulęczyno, Kolibki, Chwarzno, Kleszczewo).	67
Ryc. 31 Dopasowanie uzyskanych sekwencji fragmentu genu 16S rRNA <i>Anaplasma phagocytophilum</i> uzyskane przy pomocy programu CodonCode Aligner v 6.0.2.	69
Ryc. 32 Filogram obrazujący zależności genetyczne pomiędzy poszczególnymi sekwencjami otrzymanymi w ramach pracy oraz sekwencjami zdeponowanymi w banku genów. Podziałka obrazuje odległość genetyczną pomiędzy sekwencjami (różnice 1 na 1000 nukleotydów). Filogram został wygenerowany za pomocą narzędzia CLC Sequence Viewer (7.6.1), metoda Neighbor-Joining.	70
Ryc. 33 Wykres ramka-wąsy obrazujący relacje pomiędzy stadium rozwojowym a liczebnością <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w kleszczach.	71
Ryc. 34 Porównanie amplifikacji seryjnych rozcieńczeń plazmidów kolistych (1) i limeraynych (2) dla poszczególnych metod.	80
Ryc. 35 Porównanie wartości Ct dla wybranych próbek kleszczy przy użyciu metody opisanej w literaturze (FAM) oraz metody opracowanej w ramach pracy (ROX).	81
Ryc. 36 Porównanie intensywności zakażenia kleszczy krętkami <i>Borrelia</i> spp. dla wybranych próbek kleszczy przy użyciu metody opisanej w literaturze (FAM) oraz metody opracowanej w ramach pracy (ROX).	81

Ryc. 37 Schematyczne ujęcie czynników wpływających na rozmieszczenie kleszczy <i>I. ricinus</i> . Czynniki podzielono na bezpośrednio związane ze: zmianami klimatycznymi (niebieski), zmianami ekologicznymi (zielony), zmianami antropogenicznymi (brązowy) i inne (czerwony). (Medlock 2013 [86]).....	86
Ryc. 38 Przypadki choroby z Lyme w województwie pomorskim w latach 2006-2010 (Mucha 2010 [91]).....	90
Ryc. 39 Średnia zapadalność na boreliozę na 100 000 mieszkańców, na przestrzeni 10 lat w wybranych krajach europejskich (Lingren 2006 [76]).	91
Ryc. 40 Schemat krążenia genogatunków <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. w kleszczach i ich żywicielach (na podstawie Alessandro Mannelli et al. FEMS Microbiol Rev 2012;36:837-861).	98
Ryc. 41 Sekwencje oraz właściwości fizyko-chemiczne starterów oraz sond molekularnych użytych w celu detekcji <i>Rickettsia</i> spp. i <i>Babesia</i> spp. w kleszczach <i>Ixodes ricinus</i>	135
Ryc. 42 Porównanie mieszanin MasterMix A&A Biotechnology (lewa kolumna) oraz Stratagene (prawa kolumna) (<i>Babesia</i> i <i>Rickettsia</i>).	136
Ryc. 43 Wpływ stężenia starterów i sond na przebieg reakcji Real-Time PCR, na przykładzie amplifikacji fragmentu genu 18S rRNA <i>Babesia</i> spp. za pomocą starterów Bab18S-f, Bab18S-r oraz sondy Bab18S-p. Na rysunkach podano również objętości dodawanych starterów. Stężenia dodawanych starterów i sond wynosiły 10µM.	137
Ryc. 44 Dane źródłowe i krzywa standardowa – amplifikacja fragmentu genu <i>gltA</i> , <i>Rickettsia</i> , startery RickGltA-f, RickGltA-r i sonda RickGltA-p.	138

9. TABELE

Tab. 1 Systematyka <i>Ixodes ricinus</i> (wg. Siudy 1993 [127]).....	11
Tab. 2 Mikroorganizmy przenoszone przez kleszcze <i>I. ricinus</i> (na podstawie Nowak-Chmura 2013 [96]).	14
Tab. 3 Wybrane patogeny oraz gatunki zwierząt będące rezerwuarami dla patogenów (potwierdzone eksperymentalnie) (Rizzoli 2014 [116]; Heylen 2015 [56]).	16
Tab. 4 Charakterystyka stanowisk zbioru kleszczy.	30
Tab. 5 Sekwencje starterów oraz sond umożliwiających detekcję <i>Borrelia spp.</i> i <i>A. phagocytophilum</i>	35
Tab. 6 Porównanie sekwencji genów w obrębie wybranych gatunków. Brak podobieństw – nałożenie sekwencji (ang. query coverage) < 25%, *w przypadku danego gatunku podano zakres podobieństwa na podstawie sekwencji zdeponowanych w banku genów GenBank.	38
Tab. 7 Analiza reakcji krzyżowych wybranych fragmentów genów z wybranymi mikroorganizmami, procent podobieństwa sekwencji (<i>Anaplasma</i> i <i>Borrelia</i>).	40
Tab. 8 Porównanie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych starterów i sond.	41
Tab. 9 Liczby kleszczy zebranych w poszczególnych stanowiskach i latach. W nawiasach podano procentowy udział poszczególnych stadiów rozwojowych w odłowionych kleszczach na danym stanowisku.	43
Tab. 10 Aktywność kleszczy <i>Ixodes ricinus</i> na poszczególnych stanowiskach.	43
Tab. 11 Kleszcze <i>I. ricinus</i> zakażone krętkami <i>Borrelia</i> w poszczególnych stanowiskach.	45
Tab. 12 Poziom zakażenia kleszczy <i>I. ricinus</i> krętkami <i>Borrelia</i> w poszczególnych stanowiskach, średnie i odchylenia standardowe.	57
Tab. 13 Podsumowanie testu ANOVA dla wyników ilościowych krętek <i>Borrelia</i> w zależności od stadium rozwojowego kleszcza. F> wartość krytyczna, istnieją różnice między średnimi.	58
Tab. 14 Średnie liczby patogenów w poszczególnych stadiach rozwojowych w zależności od genogatunku krętek <i>Borrelia</i>	64
Tab. 15 Kleszcze <i>I. ricinus</i> zakażone <i>A. phagocytophilum</i> w poszczególnych stanowiskach.	65
Tab. 16 Przegląd kluczowych czynników wraz z mechanizmami działania oraz wpływ na geograficzne rozmieszczenie kleszczy <i>I. ricinus</i> w Europie (Medlock 2013 [86]).	85
Tab. 17 Badania epidemiologiczne nad występowaniem mikroorganizmów <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. w kleszczach <i>I. ricinus</i> w Polsce (okres od 2005-2015).	92
Tab. 18 Badania epidemiologiczne nad występowaniem mikroorganizmów <i>Anaplasma phagocytophilum</i> w kleszczach w Polsce (okres od 2005-2015).	103
Tab. 19 Sekwencje starterów oraz sond umożliwiających detekcję <i>Borrelia spp.</i> , <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia spp.</i> , <i>Babesia spp.</i>	132
Tab. 20 Porównanie sekwencji genów w obrębie wybranych gatunków. Brak podobieństw – nałożenie sekwencji (ang. query coverage) < 25%, *w przypadku danego gatunku podano zakres podobieństwa na podstawie sekwencji zdeponowanych w banku genów GenBank.	133
Tab. 21 Analiza reakcji krzyżowych wybranych fragmentów genów z wybranymi mikroorganizmami, procent podobieństwa sekwencji (<i>Babesia</i> i <i>Rickettsia</i>).	134
Tab. 22 Porównanie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych starterów i sond.	137

10. ANEKS

Poniżej opisano najważniejsze pojęcia stosowane przy analizie danych uzyskiwanych w technice Real-Time PCR (Real-Time PCR Handbook [108]; Tyburski 2008 [149]).

Linia bazowa

Linia bazowa to poziom sygnału otrzymywany w początkowych cyklach reakcji PCR, zwykle do 3 – 15 cyklu, w których wartość fluorescencji nie ulega większym zmianom. Linia bazowa wyznaczana jest empirycznie dla każdej reakcji indywidualnie.

Wartość progowa fluorescencji (ang. fluorescence treshold, F_t)

Wartość progowa fluorescencji w reakcji Real-Time PCR to taki poziom sygnału, który odzwierciedla statystycznie istotny wzrost fluorescencji ponad linię bazową. Zwykle jest ustalany automatycznie przez oprogramowanie analizujące wyniki jako 10 odchyłeń standardowych dla wartości fluorescencji linii bazowej. Wartość progowa może być jednak wyznaczona w dowolnym punkcie w fazie logarytmicznego wzrostu fluorescencji.

Cykl progowy (ang. treshold cycle, C_t)

Cykl progowy jest to cyklu, w którym przekroczony zostaje wartość progowa fluorescencji. Wartość cyklu progowego jest odwrotnie proporcjonalna do początkowej liczby kopii DNA w próbce i jest wykorzystywana w ilościowej reakcji PCR. Wraz ze wzrostem wyjściowej liczby kopii DNA wartość C_t maleje. Ze względu na to, że w każdym cyklu liczba kopii DNA ulega podwojeniu, różnica pomiędzy wartościami C_t wynosząca 1 oznacza dwukrotną różnicę w początkowej liczbie kopii DNA w próbce (zakładając 100% wydajność reakcji).

Krzywa standardowa

Seryjne rozcieńczenia matrycy DNA o znanym stężeniu mogą być użyte do wyznaczenia krzywej standardowej. Krzywa standardowa może być wykorzystana do wyznaczenia wyjściowej liczby kopii DNA w próbce oraz do wyznaczenia wydajności reakcji PCR. Na osi X wyznaczone są zlogarytmowane wartości wyjściowych stężeń DNA, na osi Y – wartości C_t dla poszczególnych stężeń. Krzywa standardowa umożliwia wyznaczenie wartości nachylenia, współczynnika korelacji, punktu przecięcia y. Rozcieńczenia użyte do sporządzenia krzywej standardowej powinny pokrywać przewidywane wartości stężeń w badanych próbkach.

Współczynnik korelacji R^2

Współczynnik korelacji określa, w jakim stopniu uzyskane dane pokrywają się z wyznaczoną krzywą standardową. Wartość R^2 odzwierciedla stopień liniowości krzywej standardowej. W warunkach idealnych współczynnik korelacji powinien wynosić 1.

Punkt przecięcia y (ang. y-intercept)

Wartość punktu przecięcia krzywej wzorcowej z osią Y odzwierciedla teoretyczną wartość limitu detekcji reakcji. Teoretycznie reakcja PCR umożliwia detekcję pojedynczej kopii genu, jednak rzeczywista czułość nie jest niższa niż 2-10 kopii DNA. Z tego względu użyteczność w wykorzystaniu wartości punktu przecięcia y do bezpośredniego wyznaczania czułości reakcji jest ograniczona, natomiast może służyć do porównywania czułości pomiędzy różnymi metodami.

Fazy reakcji PCR

W przebiegu reakcji PCR wyróżnić można trzy fazy: fazę wstępną, fazę wzrostu logarytmicznego oraz fazę plateau. W pierwszych etapach reakcji, czyli w fazie wstępnej następuje powolny przyrost produktu. Długość tej fazy zależy od wyjściowego stężenia matrycowego DNA. Po przekroczeniu wartości F_t reakcja wchodzi w fazę wzrostu logarytmicznego. W fazie tej produkt szybko przyrasta, dostępność substratów jest duża, a wydajność polimerazy wysoka. Ostatnią fazą reakcji jest faza plateau, w której ilość substratów ulega wyczerpaniu, a szybkość reakcji maleje.

Nachylenie (ang. slope)

Nachylenie krzywej wzorcowej odzwierciedla wydajność reakcji. W celu uzyskania wiarygodnych i dokładnych wyników wydajność reakcji powinna być jak najbliższa 100%, co odpowiada nachyleniu krzywej równemu -3,32.

Wydajność reakcji (E)

Wydajność reakcji PCR wyznaczana jest z następującego wzoru:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

Maksymalna teoretyczna wydajność reakcji wynosi 100%, co oznacza, że w każdym cyklu dochodzi do podwojenia ilości amplifikowanego fragmentu DNA w fazie logarytmicznego wzrostu. Wiele czynników może wpływać na wydajność reakcji, np. długość powielanego fragmentu, powstawanie struktur drugorzędowych, odsetek par GC, nieoptymalne stężenie mogą obniżyć wydajność reakcji. Obecność inhibitorów może zawiązać wydajność reakcji. Optymalna wydajność reakcji powinna mieścić się w zakresie 90 – 100%, co odpowiada nachyleniu krzywej wzorcowej od -3,58 do -3,10.

Zakres dynamiczny

Zakres, w którym wzrost materiału wyjściowego skutkuje w odpowiednim wzroście amplifikacji produktu. Optymalnie, zakres dynamiczny dla plazmidowego DNA powinien wynosić 7 – 8 rzędów wielkości i przynajmniej 3 – 4 rzędy wielkości dla genomowego DNA.

Zaprojektowany w ramach pracy układ starterów i sond do detekcji *Borrelia* spp. oraz *A. phagocytophilum* został rozszerzony do tetraplexu, za pomocą którego można jednocześnie wykrywać również *Rickettsia* spp. i *Babesia* spp. W przypadku *Rickettsia* spp. oraz *Babesia* spp. zaprojektowano startery amplifikujące fragment genu syntazy cytrynianowej (*glfA*) oraz fragment

genu 18S rRNA, odpowiednio. Sekwencje starterów i sond zestawione są w Tab. 19. Oligonukleotydy zaprojektowano przy użyciu programu Beacon Designer™.

Tab. 19 Sekwencje starterów oraz sond umożliwiających detekcję *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Babesia* spp.

Patogen/ amplifikowany gen	Nazwa startera/sondy	Sekwencja 5'->3'	Długość amplikonu
<i>Babesia</i> spp. 18S rRNA	Bab18S-f	CATGAACGAGGAATGCCTAGTATG (24 pz)	116 pz
	Bab18S-r	CCGAATAATTCACCGGATCACTC (23 pz)	
	Bab18S-p	FAM-AAGTCATCAGCTTGTGCAGATTACGTCCCT-BHQ1 (30 pz)	
<i>Rickettsia</i> spp. <i>gltA</i>	RickGltA-f	ATCCTACATGCCGATCATGAGC (22 pz)	123 pz
	RickGltA-r	GTGAGCAGGTCCCCAAAGTG (20 pz)	
	RickGltA-p	HEX-ATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCG-BHQ1 (30 pz)	

Metoda została zoptymalizowana pod względem stężeń poszczególnych oligonukleotydów oraz użytych oddczynników. Stosowano standardowe warunki temperaturowe dla technik opartych o startery typu TaqMan: 10 min – 95°C (denaturacja wstępna), a następnie 40 cykli: 15 s – 95°C + 60 s – 60°C (przyłączenie starterów i wydłużanie).

Wybór celów molekularnych

Podobnie jak w przypadku układu do detekcji patogenów będących przedmiotem pracy, także w tym przypadku pierwszym etapem opracowania układu był wybór odpowiednich genów jako targetów molekularnych. Podczas projektowania starterów i sond przeznaczonych do wykrywania poszczególnych patogenów w kleszczach brano pod uwagę fragmenty genów, które umożliwiły detekcję danego gatunku lub grupy gatunków o wysokim stopniu zakonserwowania, dzięki czemu możliwa będzie detekcja danego mikroorganizmu bez względu na zmienność w obrębie jednego gatunku.

Wybrane geny, które mogłyby posłużyć jako cele molekularne wraz ze stopniem pokrewieństwa wśród blisko wybranych gatunków w obrębie danego rodzaju zestawiono w Tabeli 20.

Tab. 20 Porównanie sekwencji genów w obrębie wybranych gatunków. Brak podobieństw – nałożenie sekwencji (ang. query coverage) < 25%, *w przypadku danego gatunku podano zakres podobieństwa na podstawie sekwencji zdeponowanych w banku genów GenBank.

Gen Gatunek	16S rRNA	23S rRNA	<i>gltA</i>	<i>OmpB</i>
<i>Rickettsia helvetica</i> *	100%	97-100%	99-100%	99-100%
<i>Rickettsia slovaca</i>	99%	90% (nałożenie 70%)	97%	87%
<i>Rickettsia raoulti</i>	99%	Nie znaleziono	97%	87%
<i>Rickettsia prowazekii</i>	99%	98% (nałożenie 25%)	92%	79%
<i>Rickettsia rickettsii</i>	99%	98% (nałożenie 63%)	96%	86%
<i>Rickettsia conorii</i>	99%	87% (nałożenie 70%)	97%	87%

Gen Gatunek	18S rRNA
<i>Babesia divergens</i> *	99-100%
<i>Babesia microti</i>	95%
<i>Babesia canis</i>	94%
<i>Babesia bigemina</i>	93%
<i>Babesia capreoli</i>	100%
<i>Babesia gibsoni</i>	95%

Dla *Rickettsia spp.* wybrano gen *gltA*, a dla *Babesia spp.* gen 18S rRNA. W przypadku pierwotniaków *Babesia* opisane w literaturze metody PCR opierały się w większości na powyżej wymienionym genie.

Projektowanie starterów i sond

Startery oraz sondy zaprojektowano przy użyciu programu Beacon DesignerTM, który umożliwia wybór oligonukleotydów o optymalnych parametrach fizykochemicznych (odpowiednie temperatury topnienia, minimalny potencjał tworzenia struktur drugorzędowych). Oligonukleotydy zostały zaprojektowane w sposób umożliwiający stosowanie w układzie Multiplex. Zaprojektowane startery oraz sondy przedstawione są na Ryc. 41.

Dla powielanych fragmentów, przeprowadzono analizę możliwych reakcji krzyżowych z pozostałymi badanymi patogenami oraz innymi potencjalnie mogącymi wystąpić w badanych próbkach mikroorganizmami. Zbadano możliwość krzyżowych reakcji z DNA kleszczy *Ixodes ricinus*, a także DNA mikroorganizmów z rodzaju *Coxiella*, *Salmonella*, *Francisella*, *Listeria*, *Bartonella* i *Theileria*, które były wykrywane w kleszczach. Zbadano również możliwość reakcji krzyżowych z bakteriami należącymi do rodzaju *Escherichia* i *Staphylococcus*, które mogłyby

stanowić zanieczyszczenie próbek pochodzące ze środowiska. Wyniki analizy przedstawiono w poniższej Tab. 21.

Tab. 21 Analiza reakcji krzyżowych wybranych fragmentów genów z wybranymi mikroorganizmami, procent podobieństwa sekwencji (*Babesia* i *Rickettsia*).

Rodzaj	Bab18S-p	RickGItA-p
<i>Ixodes ricinus</i> (taxid:34613)	84%	Nie znaleziono
<i>Coxiella burnetti</i> (taxid:777)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Salmonella enteritidis</i> (taxid:149539)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Francisella tularensis</i> (taxid:263)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Listeria monocytogenes</i> (taxid: 1639)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Theileria mutans</i> (taxid: 27991)	98%	Nie znaleziono
<i>Bartonella vinsonii</i> (taxid: 33047)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Escherichia coli</i> (taxid: 562)	Nie znaleziono	Nie znaleziono
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (taxid: 1282)	Nie znaleziono	Nie znaleziono

Przedstawione powyżej wyniki wykazały, że ryzyko reakcji krzyżowych jest niskie. Jedynie w przypadku patogenów z rodzaju *Babesia*, wykazano wysokie podobieństwo analizowanej sekwencji do sekwencji mikroorganizmów należących do tego samego rzędu – *Piroplasmida*, do którego należą patogeny z rodzaju *Theileria*. W związku z powyższym, w celu określenia gatunku wykrytych patogenów należy zastosować różnicowanie bądź sekwencjonowanie.

Beacon Designer		Project Name: tetraplex Accession No/Name: '000002	
<p>1 1 24 28 30 37 34 22 118</p> <p>←CATGAACGAGGAATGCCATGATG→AGGTGATCAGCTTGTGCAGATTAGTGCCT→→SMPFSAFCCNPSMATHPTFCB</p>			
Sequence Information			
Accession No/Name	'000002	Definition	Bab_18SrRNA Length 116
Reaction Conditions			
Nucleic Acid Conc. mM	0,25	Monovalent Conc. mM	50,0
Free Mg ⁺⁺ Conc. mM	5,0	Temp. for Free Energy Calc. °C	25,0
Temp. for Beacon Free Energy Calc. °C	55,0	Na ⁺ Conc. mM	332,84
Forward Primer - CATGAACGAGGAATGCCATGATG			
Rating	70,3	Position	1
Length bp	24	Tm °C	58,3
GC%	45,8	GC Clamp	1
3'End ΔG	-3,1	Self Dimer ΔG	-1,7
Self Dimer ΔG	-1,7	3'End	-1,7 (3'End)
Hairpin ΔG	-1,4	Run/Repeat Len.	2
3'End	-1,4 (3'End)		
Reverse Primer - CCGAATAATTCACCGGATCACTC			
Rating	54,3	Position	116
Length bp	23	Tm °C	58
GC%	47,8	GC Clamp	1
3'End ΔG	-4,2	Self Dimer ΔG	-4,4
Self Dimer ΔG	-4,4	3'End	-4,4 (3'End)
Hairpin ΔG	-2,4	Run/Repeat Len.	2
3'End	-2,4 (3'End)		

Beacon Designer		Project Name: tetraplex Accession No/Name: '000002	
Amplicon			
Pair Quality	Good	Pair Rating	64,7
Product Len. bp	116	Product Tm °C	76
Product TaOpt °C	55,7	Cross Dimer ΔG	-2,1
Cross Dimer ΔG	-2,1	3'End	-2,1 (3'End)
TaqMan - AAGTCATCAGCTTGTGCAGATTACGTCCT			
Type of Probe	Sense	Quality	Good
Rating	64,4	Position	28
Length bp	30	Tm °C	67,7
GC%	46,7	Hairpin ΔG	-0,6
Self Dimer ΔG	-3,5	Run/Repeat Len.	3
Report Comments:			

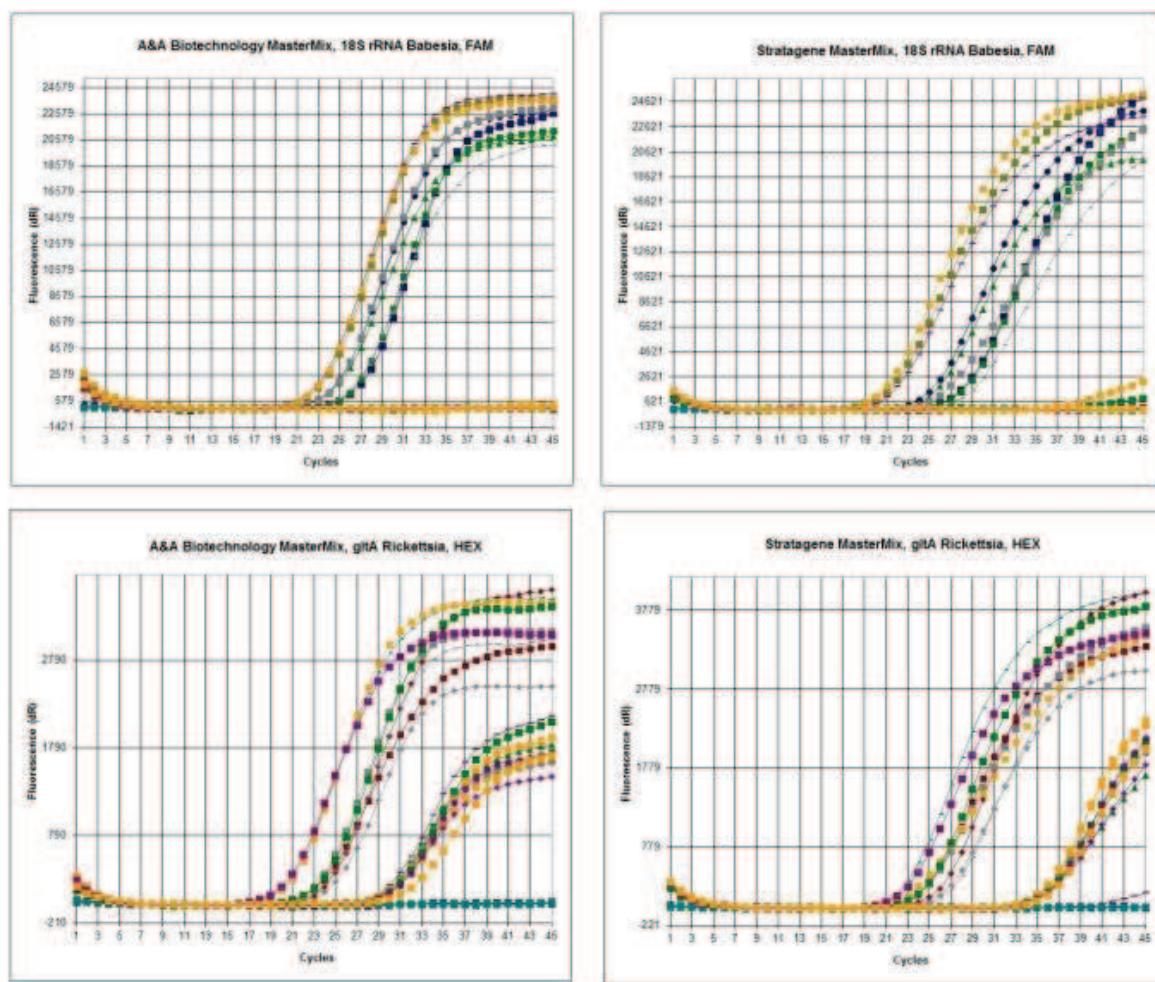
Beacon Designer		Project Name: tetraplex Accession No/Name: '000004	
<p>1 1 22 28 30 60 124 20 123</p> <p>←ATCCTACATGCCATCAGAC→ATGCTTACTTCAACAGTCCGAATTGCCG→→CACTT3000AGCTBCTCAG</p>			
Sequence Information			
Accession No/Name	'000004	Definition	Rick_gItA Length 123
Reaction Conditions			
Nucleic Acid Conc. mM	0,25	Monovalent Conc. mM	50,0
Free Mg ⁺⁺ Conc. mM	5,0	Temp. for Free Energy Calc. °C	25,0
Temp. for Beacon Free Energy Calc. °C	55,0	Na ⁺ Conc. mM	332,84
Forward Primer - ATCCTACATGCCATCAGAC			
Rating	58,6	Position	1
Length bp	22	Tm °C	58,9
GC%	50	GC Clamp	2
3'End ΔG	-4,9	Self Dimer ΔG	.5
Self Dimer ΔG	.5	3'End	.5 (3'End)
Hairpin ΔG	-2,3	Run/Repeat Len.	2
3'End	-2,3 (3'End)		
Reverse Primer - GTGAGCAGTCCCAAGTG			
Rating	65,5	Position	123
Length bp	20	Tm °C	58,9
GC%	60	GC Clamp	1
3'End ΔG	-3,8	Self Dimer ΔG	0
Self Dimer ΔG	0	3'End	0 (3'End)
Hairpin ΔG	0	Run/Repeat Len.	4
3'End	0 (3'End)		

Beacon Designer		Project Name: tetraplex Accession No/Name: '000004	
Amplicon			
Pair Quality	Good	Pair Rating	61,2
Product Len. bp	123	Product Tm °C	74,1
Product TaOpt °C	54,6	Cross Dimer ΔG	-2
Cross Dimer ΔG	-2	3'End	-2 (3'End)
TaqMan - ATGCTTACTTCAACAGTCCGAATTGCCG			
Type of Probe	Sense	Quality	Good
Rating	60,3	Position	26
Length bp	30	Tm °C	67,2
GC%	46,7	Hairpin ΔG	-0,9
Self Dimer ΔG	-1,2	Run/Repeat Len.	2
Report Comments:			

Ryc. 41 Sekwencje oraz właściwości fizyko-chemiczne starterów oraz sond molekularnych użytych w celu detekcji *Rickettsia spp.* i *Babesia spp.* w kleszczach *Ixodes ricinus*.

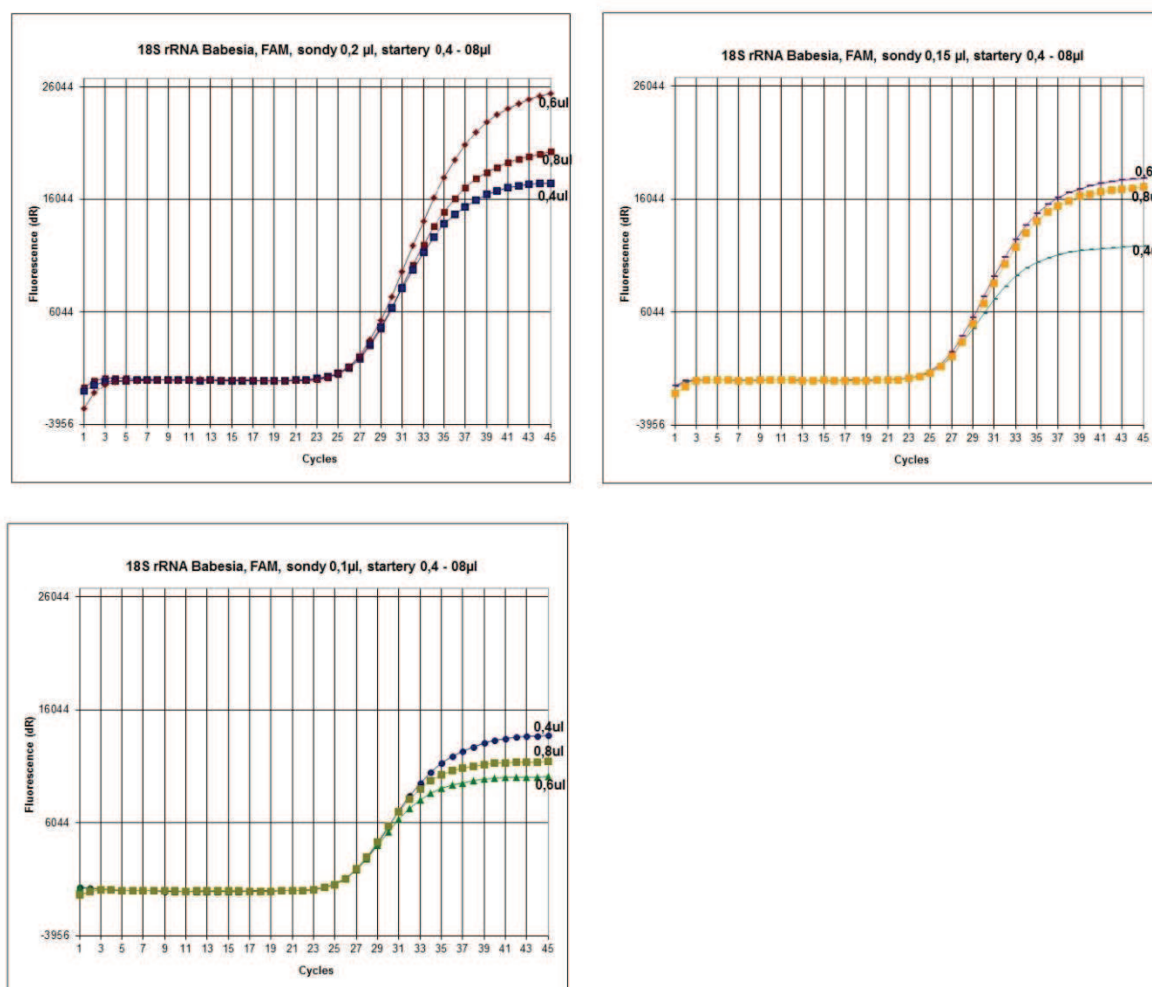
Optymalizacja reakcji Real-Time PCR

W celu wyboru odpowiednich optymalnych odczynników porównano przebieg reakcji Real-Time PCR przygotowanych za pomocą odczynników firmy A&A Biotechnology oraz Stratagene na wybranych próbkach (izolaty kleszczy *I. ricinus*). Porównanie zastosowanych odczynników przedstawione jest na wykresie (Ryc. 42). W przypadku odczynników A&A Biotechnology obserwowano niższe wartości C_t dla tych samych próbek oraz szybszy wzrost fluorescencji, co sugeruje, że reakcja przebiegała w tym przypadku z wyższą wydajnością.



Ryc. 42 Porównanie mieszanin MasterMix A&A Biotechnology (lewa kolumna) oraz Stratagene (prawa kolumna) (*Babesia* i *Rickettsia*).

Sprawdzano również wpływ stężeń stosowanych nukleotydów na przebieg reakcji Real-Time PCR. Wraz ze wzrostem stężenia sond obserwowano wyższe wartości fluorescencji, jednak nie obserwowano wpływu na wartość C_t . Nie zaobserwowano wyraźnego wpływu stężenia starterów na przebieg reakcji Real-Time PCR. Porównanie przebiegu reakcji na przykładzie amplifikacji fragmentu genu 18S rRNA *Babesia* spp. przedstawiono na Ryc. 43. Podobne wyniki otrzymano dla pozostałych starterów i sond. Do analiz wybrano objętości starterów 0,4 μ L oraz objętości sond 0,2 μ L o stężeniu 10 μ M.



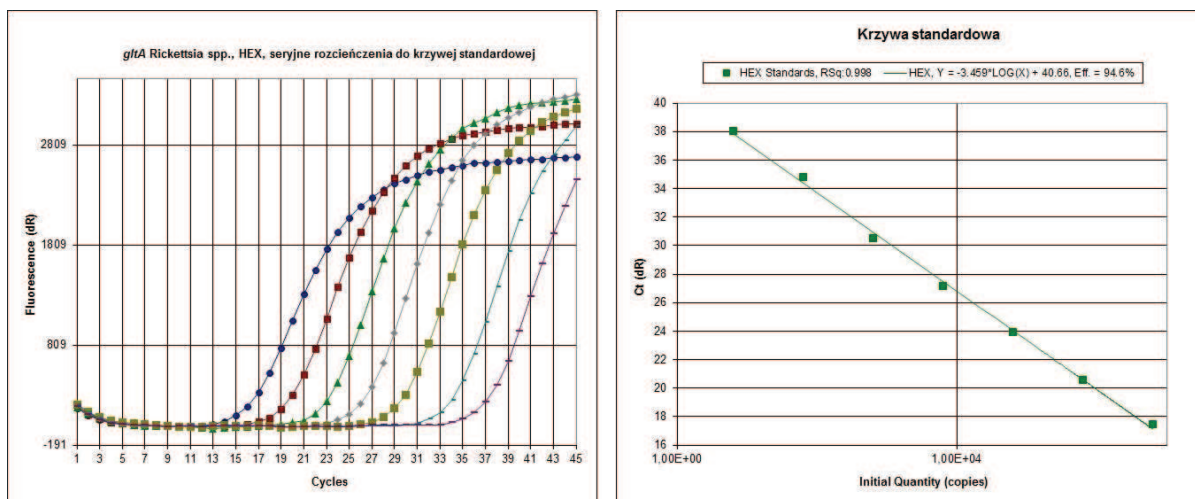
Ryc. 43 Wpływ stężenia starterów i sond na przebieg reakcji Real-Time PCR, na przykładzie amplifikacji fragmentu genu 18S rRNA Babesia spp. za pomocą starterów Bab18S-f, Bab18S-r oraz sondy Bab18S-p. Na rysunkach podano również objętości dodawanych starterów. Stężenia dodawanych starterów i sond wynosiły 10 μM.

Stosowanie starterów i sond łącznie nie miało wpływu na przebieg reakcji Real-Time PCR, w stosunku do amplifikacji poszczególnych fragmentów genów oddzielnie. Współczynniki korelacji R^2 dla otrzymywanych krzywych standardowych wynosiły $>0,95$. Wartości średnie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych celów molekularnych zestawiono w Tab. 22.

Tab. 22 Porównanie parametrów reakcji Real-Time PCR dla poszczególnych starterów i sond.

	Babesia, 18S rRNA	Rickettsia, gItA
Czułość reakcji PCR	7,8 kopii	59 kopii
Wydajność reakcji (E)	102,8%	94,9%

Przykładowy wynik amplifikacji (dane źródłowe oraz krzywą standardową) przedstawiono na Ryc. 44.



Ryc. 44 Dane źródłowe i krzywa standardowa – amplifikacja fragmentu genu *gltA*, Rickettsia, startery RickGltA-f, RickGltA-r i sonda RickGltA-p.



Gdański Uniwersytet Medyczny
Medical University of Gdańsk



ERRATUM

Stella Cieniuch

**Zastosowanie Real-Time PCR do detekcji i ilościowego oszacowania
Borrelia burgdorferi sensu lato i *Anaplasma phagocytophilum*
w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae)**

**Real-Time PCR technique in detection and quantification of *Borrelia*
burgdorferi sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes*
ricinus ticks (Acari, Ixodidae)**

Niniejsza errata została wydana w celu uzupełnienia rozprawy doktorskiej o streszczenie w języku polskim i angielskim.

This erratum has been released in order to supplement the doctoral dissertation with in Polish and English version of abstract.

Gdynia, 2016

Streszczenie

Kleszcze *I. ricinus* służą jako wektory i rezerwuary wielu czynników chorobotwórczych. Stanowią one dogodny wektor dla patogenów, takich jak wirus kleszczowego zapalenia mózgu, krętki *Borrelia burgdorferi* s.l., riketsje z grupy gorączek plamistych, bakterie *Anaplasma phagocytophilum* wywołujące ludzką anaplazmozę granulocytarną, *Francisella tularensis*, pierwotniaki z rodzaju *Babesia* wywołujące babeszjozę.

Wiele czynników wpływa na geograficzne rozprzestrzenienie kleszczy *I. ricinus* w Europie. Jako główne czynniki odpowiedzialne za rozszerzanie się populacji kleszczy oraz związanych z nimi patogenów wymienia się zmiany klimatyczne, zmiany w środowisku oraz zmiany w populacjach żywicieli tych pasożytów. Coraz częściej obserwowane jest zjawisko migracji kleszczy na tereny zurbanizowane (proces synantropizacji kleszczy). Badania epidemiologiczne opisane w literaturze potwierdzają, że kleszcze bytujące w miastach oraz w pobliżu aglomeracji miejskich są często zakażone ludzkimi patogenami.

W ramach niniejszej pracy zbadano występowanie *B. burgdorferi* s.l. i *A. phagocytophilum* w kleszczach *I. ricinus* z terenu województwa pomorskiego (Trójmiasto i okolice). Analizowano zależności pomiędzy poziomem i intensywnością infekcji a stadium rozwojowym, sezonową aktywnością, terenem występowania kleszczy oraz rodzajem infekcji (infekcje pojedyncze, koinfekcje).

Dodatkowym celem pracy było opracowanie metody detekcji *B. burgdorferi* s.l. i *A. phagocytophilum* za pomocą techniki Real-Time PCR, która mogłaby być rozszerzona na inne patogeny wektorowane przez kleszcze (tzw. multiplex Real-Time PCR). W niniejszej pracy zaprojektowano układ oparty o sondy typu TaqMan, umożliwiający docelowo detekcję czterech różnych patogenów człowieka w badanych próbkach: *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia helvetica* i *B. divergens*. Takie podejście skraca czas analizy, a także w dużej mierze ogranicza jej koszty, ze względu na fakt, że można ją wykonać w jednej mieszaninie reakcyjnej.

Aktywność kleszczy

Uzyskane wyniki świadczą o wysokim zagrożeniu atakiem kleszczy na badanych terenach. Najwyższe wartości aktywności kleszczy odnotowano na stanowisku Gdynia-Kolibki, na terenie zurbanizowanym o wysokiej antropopresji (56 i 63 kleszcze/h/osobę w roku 2008 i 2009, odpowiednio). Podobne wartości obserwowano na innym podmiejskim stanowisku (Gdynia Chwarzno) w roku 2008 (41 kleszczy/h/osobę). W Sulęczynie, terenie rekreacyjnym, często odwiedzany przez turystów i wczasowiczów aktywność kleszczy była również relatywnie wysoka. Najmniejsze zagęszczenie kleszczy odnotowano w Kleszczewie, w terenie leśnym, oddalonym od siedzib ludzkich.

***Borrelia burgdorferi* sensu lato**

Borelioza z Lyme podlega w Polsce nadzorowi epidemiologicznemu od 1996 roku. Rocznie w naszym kraju diagnozuje się kilka tysięcy przypadków tej choroby, jednak dane te mogą być zaniżone. Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki potwierdzają wysoki stopień narażenia zakażeniem boreliozą na terenie Trójmiasta i terenach wiejskich woj. pomorskiego. Poziom zakażenia krętkami *Borrelia* postaci dorosłych wynosił ogółem 35,3% i był znacząco wyższy niż u nimf (17,1%), co jest

zgodne z wynikami innych badań środowiskowych i ekologią krętków *Borrelia* (brak lub bardzo ograniczona transmisja transowarialna).

Najwyższy odsetek zainfekowanych kleszczy zaobserwowano na stanowisku Kolibki i Chwarzno w roku 2008 (średnio 40,3% i 35,4% odpowiednio). Poziom zakażenia na powyższych stanowiskach był wyższy w roku 2008 niż w roku 2009. Odsetek zakażonych kleszczy był skorelowany ze stopniem urbanizacji. W roku 2009 na terenach zurbanizowanych (Kolibki – 29,2%, Chwarzno – 26,6%) odsetki zainfekowanych kleszczy były istotnie wyższe niż na terenach wiejskich i leśnych (Sulęczyno – 14,7%, Kleszczewo – 17,5%) ($p < 0,01$). Obserwacje te potwierdzają wpływ zmian środowiskowych na rozprzestrzenianie się boreliozy z Lyme.

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wskazują, że odsetek zakażenia *I. ricinus* krętkami *Borrelia* spp. na badanym terenie wzrósł w ciągu ostatnich 10-ciu lat, w porównaniu do danych literaturowych, jednak różnice mogą mieć również związek ze stosowaniem obecnie nowszych, bardziej czułych metod (Real-Time PCR). Przeprowadzone badania wykazały zauważalny spadek ogólnego odsetka zakażonych kleszczy pod koniec okresu zbioru (sierpień – wrzesień), przy jednoczesnym wzroście liczby patogenów w kleszczach. Wyniki takie mogą sugerować, że w trakcie roku, wraz z wydłużającym się okresem aktywności kleszczy, patogeny ulegają namnożeniu.

Uzyskane wyniki sekwencjonowania fragmentu genu *fla* wskazały, że poszczególne genogatunki cechują się odmiennym zróżnicowaniem genetycznym. Najmniejszą różnorodność obserwowano w przypadku *B. afzelii*, największą w przypadku *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii*. Zróżnicowanie genetyczne może mieć kilka przyczyn, między innymi różny zakres rezerwuarów (*B. garinii* ma szerszy zakres rezerwuarów (ptaki, gryzonie), *B. afzelii* jest wiązany jedynie z gryzoniami). Różnice genetyczne mogą także wiązać się z różnym poziomem patogeniczności dla człowieka. Ponadto porównanie z sekwencjami z banku genów sugeruje zróżnicowanie geograficzne szczepów.

Anaplasma phagocytophilum

W Europie notuje się niewiele klinicznych przypadków anaplazmozy. Z drugiej strony, odsetek osób, u których wykryto specyficzne przeciwciała wynosił waha się w zależności od kraju od ok. 1 do 20%.

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wskazują na bardzo niski poziom zakażenia kleszczy *A. phagocytophilum* na badanym terenie. Ogółem zakażonych było 0,6% kleszczy, czyli znacznie mniej niż w innych badaniach prowadzonych w różnych rejonach Polski, w tym również w porównaniu do badań wcześniej prowadzonych na terenie Trójmiasta. Może to świadczyć o ogólnej tendencji spadkowej poziomu zakażenia tym patogenem na badanym terenie. Ryzyko zakażenia HGA na terenie Trójmiasta i okolic jest bardzo niskie. Niskie jest również ryzyko koinfekcji bakteriami *A. phagocytophilum* oraz krętkami *Borrelia* spp.

Przeprowadzone badania genetyczne potwierdziły wysoką różnorodność genetyczną *A. phagocytophilum*. Wykazano ponadto, że szczepy *A. phagocytophilum* występujące na terenie Trójmiasta i okolic prawdopodobnie nie są patogeniczne dla człowieka. Biorąc pod uwagę zarówno bardzo niski odsetek zakażonych kleszczy, jak również wyniki sekwencjonowania genu 16S rRNA, zagrożenie HGA na badanym terenie jest niewysokie.

Ilościowe oznaczanie *B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum* w kleszczach

Badania ilościowe wykonane w ramach niniejszej pracy ujawniły, że średnia intensywność zakażenia samic krętkami *B. burgdorferi* (liczba patogenów obecnych w kleszczach) była istotnie wyższa niż intensywność zakażenia samców i nimf, natomiast nie było znaczącej różnicy pomiędzy intensywnością zakażenia samców i nimf.

Najniższe średnie liczby patogenów w kleszczach odnotowano w kwietniu w porównaniu do pozostałych miesięcy, przy czym liczba krętków wzrastała na przestrzeni kolejnych miesięcy aż do sierpnia. Wyniki mogą sugerować, że na przestrzeni miesięcy wiosennych i letnich bakterie ulegają namnożeniu w kleszczach, co przekłada się na wyższe ryzyko transmisji patogenów z kleszcza na człowieka.

Nie wykazano istotnych różnic pomiędzy intensywnością zakażenia kleszczy na poszczególnych stanowiskach. Nie wykazano też zależności pomiędzy intensywnością zakażenia krętkami *Borrelia* a poziomem zakażenia (odsetkiem zakażonych kleszczy).

Znaczne różnice w liczbach patogenów w kleszczach wykazano natomiast w przypadku poszczególnych genogatunków *B. burgdorferi* s.l. Najwyższe średnie wartości liczby patogenów w kleszczach zaobserwowano w przypadku gatunku *B. garinii*. Dane literaturowe wskazują, że ryzyko transmisji i jej szybkość może być większa, im większa liczba patogenów znajduje się w kleszczach. Uzyskane wyniki wskazują, że poszczególne genogatunki różnią się nie tylko spektrum oddziaływania na człowieka, ale także przystosowaniem i zdolnością przetrwania w wektorach.

Średnia wartość liczby patogenów w kleszczach w przypadku *Borrelia miyamotoi* była kilkakrotnie wyższa niż w przypadku kompleksu *B. burgdorferi* s.l., co sugeruje, że gatunek ten jest bardzo dobrze przystosowany do przetrwania w organizmach kleszczy. Dobre przystosowanie tego gatunku do przetrwania w organizmach pajęczaków potwierdza także fakt, że jest on zdolny do przekazu transowarialnego, w przeciwieństwie do kompleksu *B. burgdorferi* s.l.

Ze względu na bardzo niski odsetek kleszczy zakażonych *A. phagocytophilum* analiza statystyczna wpływu poszczególnych czynników na intensywność zakażenia kleszczy nie została przeprowadzona.

Ograniczenia w stosowaniu metod ilościowych w badaniach środowiskowych

Ze względu na to, że wyniki badań literaturowych a także badań przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy wykazały stosunkowo wysokie liczby patogenów w kleszczach (nawet kilkaset tysięcy), zweryfikowano hipotezę, że postać plazmidowego DNA stanowiącego kontrolę pozytywną służące do sporządzenia krzywej standardowej, może mieć wpływ na otrzymane wartości.

Powyższa hipoteza została potwierdzona eksperymentalnie. Stosowanie kolistych, superskręconych cząsteczek DNA może prowadzić do znacznego (wielokrotnego) zawyżenia otrzymanych wyników.

Metoda bezpośredniego ilościowego oznaczania kopii DNA w próbce za pomocą qPCR jest podatna na błędy wynikające z różnic w wydajności amplifikacji matrycy w próbach kontrolnych i badanych. Dlatego też, w interpretacji wyników należy kierować się raczej względnymi zależnościami między liczbami badanych mikroorganizmów, niż wartościami absolutnymi. Należy również unikać porównania pomiędzy wynikami uzyskiwanymi przy zastosowaniu różnych celów molekularnych, zarówno różnych genów, jak i fragmentów tych samych genów.

Abstract

I. ricinus ticks serve as a vector and reservoir of many infectious agents. They are suitable vector for pathogens, such as tick-borne encephalitis virus, *Borrelia burgdorferi* s.l. spirochetes, spotted fever group rickettsiae, *Anaplasma phagocytophilum*, causing human granulocytic anaplasmosis, *Francisella tularensis*, protozoa of the genus *Babesia* causing babesiosis.

Many factors influence the geographical distribution of *I. ricinus* ticks in Europe. Climate changes, environmental changes and changes in populations of ticks' hosts are regarded as the main factors responsible for the expansion of the tick population and related pathogens. The process of ticks' migration to urban areas is more often observed (synantropisation of ticks). Environmental studies described in literature confirm that ticks living in cities and the vicinity of urban agglomerations are frequently infected with human pathogens.

In the present study the occurrence of *B. burgdorferi* sensu lato. and *A. phagocytophilum* in *I. ricinus* ticks from Pomorskie region (Tri-City agglomeration and its vicinity) was investigated. The relation between the infection level/intensity and developmental stage, seasonal activity, the site of occurrence of ticks or type of infection (single or coinfections) were analysed.

The additional goal of the study was to develop method for simultaneous detection of *B. burgdorferi* s.l. and *A. phagocytophilum* using a Real-Time PCR technique, which could be extended to other pathogens transmitted by ticks (so-called multiplex Real-Time PCR). In the present study, the method based on TaqMan probes was designed, allowing the detection of four different human pathogens in tested samples: *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *Rickettsia helvetica* and *B. divergens*. Such approach reduces the time of analysis, and largely reduces its costs, due to the fact that it can be performed in single reaction tube.

Activity of ticks

The obtained results indicate a high risk of ticks attack in the studied areas. The highest values of tick activity was recorded in Gdynia-Kolibki (56 and 63 ticks/hour/person in the 2008 and 2009, respectively), which is the urban area with high anthropopression. Similar values were found in another suburban location (Gdynia Chwarzno) in 2008 (41 ticks/hour/person). In Sulęczyño, recreational area, often visited by tourists and campers, ticks activity was also relatively high. The lowest density of ticks was recorded in Kleszczewo, in the forest area, far away from human settlements.

***Borrelia burgdorferi* s.l.**

Lyme disease is subject of epidemiological surveillance in Poland since 1996. Each year several thousand cases are diagnosed in our country, however these figures may be underestimated. Results obtained in the present study confirm the high risk of Lyme disease infection in the Tri-city agglomeration and rural areas of Pomeranian province. The percentage of adult ticks infected with *Borrelia* spirochetes was 35.3% and was significantly higher than the percentage of infected nymphs

(17.1%), which is consistent with other environmental studies and the knowledge about ecology of *Borrelia* (no or very limited transovarial transmission).

The highest percentage of infected ticks was observed in Kolibki and Chwarzno in 2008 (40.3% and 35.4% respectively). The level of infection in these sites was higher in 2008 than in 2009. The percentage of infected ticks was correlated with the degree of urbanization. In 2009, in urban areas (Kolibki - 29.2%, Chwarzno - 26.6%) percentage of infected ticks was significantly higher than in rural and forest areas (Sulęczyno - 14.7%, Kleszczewo - 17.5%) ($p < 0.01$). These observations confirm the impact of environmental changes on the spread of Lyme disease.

Results obtained in this study indicate that the rate of infection of *I. ricinus* with spirochetes *Borrelia* spp., increased in the investigated region during the past 10 years, comparing to literature data, but this observation may also be associated with the fact that currently used detection methods are more sensitive (Real-Time PCR). The study showed a noticeable decline in the overall percentage of infected ticks at the end of the ticks activity period (August - September). These results may suggest that during the year, with lengthening of tick activity period, pathogens undergo multiplication.

The results of sequencing of the fragment of *fla* gene indicated that individual genospecies are characterized by different genetic divergence. The lowest diversity (the highest degree of conservation) was observed in the case of *B. afzelii*, the highest in the case of *B. burgdorferi* s.s. and *B. garinii*. Genetic diversity can be caused by several factors, including a diverse range of reservoirs (*B. garinii* has wider range of reservoirs (birds, rodents), *B. afzelii* is associated only with rodents). Genetic differences may also be associated with different pathogenicity for humans. Furthermore, a comparison of sequences from the gene bank suggests the geographic diversity of strains.

Anaplasma phagocytophilum

In Europe only small number of clinical cases of anaplasmosis is reported. On the other hand, the percentage of subjects in which specific antibodies were detected varies depending on the country from approximately 1 to 20%.

The results obtained in this study indicate very low level of infection with *A. phagocytophilum* in ticks in investigated areas. In total, 0.6% of ticks were infected, which is significantly less than showed the results of other studies conducted in Poland, including studies conducted in Tri-city agglomeration. This may indicate a general decrease of infection with this pathogen in tested locations. The risk of infection with HGA in Tri-City and the surrounding areas is very low. The risk of coinfection with *A. phagocytophilum* and *Borrelia* spp. spirochetes is similarly low.

Genetic studies confirmed the high genetic diversity of *A. phagocytophilum*. It was also shown that *A. phagocytophilum* strains from Tri-City and the surrounding areas are probably not pathogenic to humans. Taking into account both the very low percentage of infected ticks, as well as the results of sequencing the 16S rRNA gene, there is only little risk of HGA in the investigated region.

Quantitative determination of *B. burgdorferi* and *A. phagocytophilum* in ticks

The quantitative studies performed in this study revealed that the average intensity of infection of female ticks with spirochetes *Borrelia burgdorferi* (the number of pathogens per tick) was significantly higher than the intensity of infection of males and nymphs, but there was no significant difference between the average number of pathogen per tick between males and nymphs.

The smallest average numbers of pathogens per tick was recorded in April comparing to other months, the number of spirochetes increased over the next months until August. The results may suggest that over the spring and summer months bacteria multiply in ticks' organisms, which translates into a higher risk of transmission from tick to human.

There was no significant difference between the average intensity of infection in ticks in tested locations. No relationship between the intensity of infection with *Borrelia* spirochetes and the level of infection (percentage of infected ticks) was identified.

Significant differences in the numbers of pathogens per tick has been shown depending on particular genospecies of *B. burgdorferi* s.l. The highest average numbers of pathogens were reported in case of *B. garinii*. Literature data indicate that the risk of transmission and its rate increase with the infection intensity. The obtained results indicate that individual genospecies differ not only in the range of effects on humans, but also in adaptation and survival capacity in vectors.

The mean value of pathogen numbers per tick was several times higher in case of *Borrelia miyamotoi* than in the case of *B. burgdorferi* s.l. complex, suggesting that this species is very well adapted to survive in ticks organisms. The excellent adaptation of this species may be confirmed by the fact that this it is able to transovarial transmission, in contrast to *B. burgdorferi* s.l.

Due to the very low percentage of ticks infected with *A. phagocytophilum* statistical analysis of the impact of various factors on the intensity of infection was not performed.

Limitations of quantitative methods in environmental studies

Due to the fact that the results of this and other published studies showed a relatively high number of pathogens per tick (even few hundreds of thousands), the hypothesis that the structural type of plasmid DNA, which served as the positive controls for the standard curve, can affect the results.

The above mentioned hypothesis was confirmed experimentally. The use of circular, supercoiled DNA can lead to significant overestimation of the results (even several times).

The method of absolute quantification of DNA copy number in a sample using qPCR is prone to errors due to differences in matrix amplification efficiency in control and test samples. Therefore, the interpretation of the results should be based rather on relative relationships between the burdens of analysed microorganisms than on its absolute values. The comparison between the results obtained using different molecular targets, both different genes as well as different fragments of the same gene, should also be avoided.