

AKADEMIA MEDYCZNA W GDAŃSKU
MIEDZYWYDZIAŁOWY INSTYTUT MEDYCZYNY MORSKIEJ I TROPIKALNEJ
KATEDRA MEDYCZYNY TROPIKALNEJ I PARAZYTOLOGII
ZAKŁAD PARAZYTOLOGII TROPIKALNEJ

Joanna Stańczak

KLESZCZE (ACARI, IXODIDAE)
JAKO PRZENOSICIELE PATOGENÓW ROZWIJAJACYCH SIĘ
CHORÓB INFEKCYJNYCH I INWAZYJNYCH
(„EMERGING INFECTIOUS DISEASES”)
NA TERENIE POLSKI

Rozprawa habilitacyjna

GDAŃSK 2006

Wydano za zgodą
Senackiej Komisji Wydawnictw Akademii Medycznej w Gdańsku

© Copyright by Medical University of Gdańsk

Wydawca: *Akademia Medyczna w Gdańsku*
Druk: *Dział Wydawnictw AMG*
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
Zlecenie KW/427/06

Serdeczne podziękowania składam
Pani Prof. dr hab. n. przyr. Zofii Wegner, znakomitemu naukowcowi i wspaniałemu
człowiekowi, która zawsze zachęcała mnie do wyężonej pracy naukowej oraz
wspierała radą i doświadczeniem,
a także Panu Prof. dr hab. n. med. Przemysławowi Myjakowi, za stworzenie mi
doskonałych warunków do badań i pomoc przy rozwiązywaniu problemów
naukowych.

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
AUTOREFERAT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ	7
1. WPROWADZENIE.....	7
1.1. OPUBLIKOWANE PRACE BĘDĄCE PODSTAWĄ ROZPRAWY HABILITACYJNEJ:	9
2. WSTĘP	10
2.1. KLESZCZE (ACARI, IXODIDA, IXODIDAE).....	10
2.2. EPIDEMIOLOGIA CHOROÓB ODKLESZCZOWYCH	12
2.3. TRANSMISYJNE ZOONOZY ODKLESZCZOWE ZALICZANE DO TZW. „ROZWIJAJĄCYCH SIĘ CHOROÓB INFEKCYJNYCH I INWAZYJNYCH” (EID - „EMERGING INFECTIOUS DISEASES”).....	12
2.3.1. <i>Borelioza z Lyme</i>	12
2.3.2. <i>Ludzka anaplazmoza granulocytarna</i>	13
2.3.3. <i>Babeszjoza</i>	15
2.3.4. <i>Gorączki plamiste</i>	15
3. CEL BADAŃ	17
4. MATERIAŁ I METODY	17
4.1. ZBIÓR KLESZCZY	17
4.2. ODCZYN IMMUNOFLUORESCENCJI POŚREDNIEJ (OIP).....	17
4.3. POLIMERAZOWA REAKCJA ŁAŃCUCHOWA (PCR)	18
4.4. DETEKcja SPECYFICZNEGO PRODUKTU REAKCJI PCR I ANALIZA OTRZYMANÝCH SEKWENCJI	18
5. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE NA TLE PIŚMIENNICTWA KRAJOWEGO I EUROPEJSKIEGO.....	19
5.1. <i>BORRELIA BURGDORFERI</i> SENSU LATO W KLESZCZACH <i>IXODES RICINUS</i>	19
5.2. <i>ANAPLASMA PHAGOCYTOPHILUM</i> W KLESZCZACH <i>IXODES RICINUS</i>	20
5.3. <i>BABESIA MICROTI</i> W KLESZCZACH <i>IXODES RICINUS</i>	22
5.4. RIKETSJE Z GRUPY GORĄCZEK PLAMISTYCH (SFG) W KLESZCZACH <i>IXODES RICINUS</i> I <i>DERMACENTOR RETICULATUS</i>	23
5.5. KOINFEKCJE WYSTĘPUJĄCE W KLESZCZACH <i>IXODES RICINUS</i>	24
6. PODSUMOWANIE	25
7. WNIO SKI.....	26
8. PIŚMIENNICTWO	27
9. STRESZCZENIE.....	35
10. SUMMARY	36

Wykaz używanych skrótów

ACA	– <i>acrodermatitis chronica atrophicans</i> - przewlekłe zapalenie zanikowe skóry kończyn
EID	– <i>emerging infectious diseases</i> – rozwijające się choroby infekcyjne i inwazyjne
EM	– <i>erythema migrans</i> – rumień wędrujący
HGA	– <i>human granulocytic anaplasmosis</i> – ludzka anaplazmoza granulocytarna
HGE	– <i>human granulocytic ehrlichiosis</i> – ludzka ehrlichioza granulocytarna
IMMiT	– Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
KZM	– odkleszczowe zapalenie mózgu
LB	– <i>Lyme borreliosis</i> – borelioza z Lyme
LM	– <i>lymphocytic meningoradiculitis</i>
OIP	– odczyn immunofluorescencji pośredniej
PCR	– <i>polymerase chain reaction</i> – polimerazowa reakcja łańcuchowa
SF	– <i>spotted fever</i> – gorączki plamiste
SFG	– <i>spotted fever group</i> – grupa gorączek plamistych
s.l.	– <i>sensu lato</i>
s.s.	– <i>sensu stricto</i>
TBD	– <i>tick-borne diseases</i> – choroby odkleszczowe
TIBOLA	– <i>tick-borne lymphadenopathy</i> – odkleszczowa limfadenopatia

AUTOREFERAT ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

1. WPROWADZENIE

Badania nad hematofagicznymi stawonogami i ich rolą w przenoszeniu transmisyjnych zoonoz zapoczątkowano w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej (IMMiT) w Gdyni (od 2003 r. włączonego w struktury Akademii Medycznej w Gdańsku jako Międzywydziałowy IMMiT) już na przełomie lat 40. i 50. ubiegłego wieku. Wiązały się one początkowo z występującą po II Wojnie Światowej epidemią rodzimej malarii na Wybrzeżu oraz pojawianiem się przypadków tularemii u ludzi w okolicach Szczecina i licznych przypadków odkleszczowego zapalenia mózgu (KZM) w okolicach Puszczy Białowieskiej i Kartuz k. Gdańska. Badania dotyczyły poznania występowania naturalnych ognisk tych chorób na ww. terenach i szczegółowego opracowania ich biocenozy. Dzięki ówczesnym pracownikom naukowym, prof. Jadwidze Lachmajer, doc. Barbarze Skierskiej i prof. Zofii Wegner, m.in. dokładnie poznano również występowanie, biologię i ekologię komarów z podrodzin *Anophelinae* (wektorujących malarię) i *Culicinae* na różnych obszarach Polski, opracowano pierwszy wykaz występowania i rozmieszczenia gatunków kleszczy (Ixodidae) na terenie naszego kraju, a w warunkach laboratoryjnych zbadano rolę nietypowych wektorów, tj. niektórych gatunków pcheł, komarów, kleszczy (*Argas reflexus*) i roztoczy (Dermanyssidae), w utrzymywaniu i rozprzestrzenianiu wirusa KZM. Wykazano wówczas podatność danego gatunku stawonoga na zakażenie tym wirusem, zdolność przekazywania go kręgowym żywicielom oraz możliwość przekazywania go w obrębie samych stawonogów drogą transstadialną i transowarialną. Prace te należały wówczas do priorytetowych w Europie Środkowej.

Przez wiele lat IMMiT w Gdyni był jedyną placówką naukowo-badawczą w Polsce tak kompleksowo zajmującą się badaniami stawonogów hematofagicznych o znaczeniu medycznym. Prowadzone od 1993 r., z udziałem autorki, prace stanowiły naturalną kontynuację wcześniej rozpoczętych badań i koncentrowały się na wszechstronnym poznaniu roli wybranych gatunków Ixodidae w epidemiologii tzw. „rozwijających się chorób infekcyjnych i inwazyjnych” (EID – „*emerging infectious diseases*”) na terenie Polski. Badania te zaowocowały licznymi publikacjami, wykazującymi istotny udział kleszczy w naturalnej transmisji etiologicznych czynników takich nowo zdiagnozowanych chorób odzwierzęcych, jak borelioza z Lyme, ludzka anaplazmoza granulocytarna, babeszjoza, czy gorączki plamiste.

Prezentowana rozprawa habilitacyjna jest całościowym podsumowaniem badań prowadzonych w latach 1993-2004, które stanowią pionierski wkład w poznanie epidemiologii rozwijających się chorób zakaźnych. Autorka rozprawy habilitacyjnej w badaniach tych uczestniczyła albo jako główny wykonawca albo też nimi kierowała. Integralną częścią rozprawy są załączone kserokopie opublikowanych 8 prac (P1 – P8). Sześć z nich (P1 – P6) zawiera informacje o pierwszym w Polsce wykryciu w kleszczach *Ixodes ricinus* krętków *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) i riketsji *Anaplasma phagocytophilum* oraz potwierdza udział tych stawonogów w przenoszeniu pasożytniczych pierwotniaków *Babesia microti*, a także informacje o ekstensywności zakażenia kleszczy ww. patogenami i ich rozprzestrzenieniu na terenach objętych badaniami. Najszersze badania przeprowadzono w północnych i północno-wschodnich rejonach Polski i uwzględniono w nich, istotne z punktu widzenia epidemiologii EID przenoszonych przez kleszcze, infekcje/inwazje mieszane jednocześnie dwoma lub trzema patogenami. W dwóch ostatnich pracach (P7 – P8), również pionierskich dla naszego kraju, wykazano występowanie w rodzimych kleszczach riketsji z grupy gorączek plamistych

(SFG – *spotted fever group*), tj. *Rickettsia helvetica* u *I. ricinus* oraz *Rickettsia* sp. RpA4, z genogrupy *R. massiliae*, w populacjach *D. reticulatus*.

Opublikowane prace, będące podstawą rozprawy habilitacyjnej, są wynikiem badań prowadzonych w ramach trzech grantów własnych finansowanych przez Komitet Badań Naukowych oraz w ramach działalności statutowej Akademii Medycznej w Gdańsku:

1. Grant nr 4 S401 057 04: „Badania nad występowaniem naturalnych ognisk boreliozy z Lyme na wybranych terenach Polski”.

Kierownik: prof. dr hab. n. przyr. Zofia Wegner

Główny wykonawca: **dr n. przyr. Joanna Stańczak**

Okres realizacji: 01.04.1993 – 31.03.1996

2. Grant nr 6 P04C 037 10: „Genotypowanie szczepów *Borrelia burgdorferi* sensu lato występujących w kleszczach (Ixodidae), pochodzących z naturalnych ognisk boreliozy z Lyme w Polsce”.

Kierownik: **dr n. przyr. Joanna Stańczak**

Okres realizacji: 1.04.1996 – 31.03.1999

3. Grant nr 6 P04C 047 17: „Badania nad występowaniem naturalnych ognisk ludzkiej ehrlichiozy i babesiozy na terenie północno-wschodniej Polski, ze szczególnym uwzględnieniem kleszczy (Ixodidae) jako wektorów infekcji i inwazji”.

Kierownik: **dr n. przyr. Joanna Stańczak**

Okres realizacji: 01.07.1999 – 30.06.2002

4. Badania statutowe ST-24 AMG (2004 – 2006)

Badania epidemiologiczne nad występowaniem stadiów dyspersyjnych pasożytów w środowisku naturalnym oraz patogenów chorób transmisyjnych w stawonogach.

Kierownik: prof. dr hab. Przemysław Myjak

Wykonawca: **dr n. przyr. Joanna Stańczak**

Okres realizacji: 01.01.2004 – 31.12.2006

1.1. Opublikowane prace będące podstawą rozprawy habilitacyjnej:

- P1.** Wegner Z, **Stańczak J**, Racewicz M, Kruminis-Łozowska W, Kubica-Biernat B. Occurrence of *Borrelia spirochaetes* in ticks (Acari, Ixodidae) collected in the forest areas in Olsztyn province (north central Poland). *Bull Inst Mar Trop Med Gdynia*, 1993/1994, 44/45: 51-59. **KBN = 5**
- P2.** **Stańczak J**, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W, Dąbrowski J, Adamczyk A, Markowska M. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari, Ixodidae) in different Polish woodlands. *Ann Agric Environ Med*, 1999, 6: 127-132. **IF = 1,051, KBN = 9**
- P3.** **Stańczak J**, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Łozowska W, Kur J. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different regions of Poland. *Int J Med Microbiol*, 2000, 290: 559-566. **IF = 2,667, KBN = 12**
- P4.** **Stańczak J**, Racewicz M, Kruminis-Łozowska W, Kubica-Biernat B. Coinfection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agents of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *Int J Med Microbiol*, 2002, 291, Suppl. 33: 198-201. **IF = 2,667, KBN = 12**
- P5.** Grzeszczuk A, **Stańczak J**, Kubica-Biernat B, Racewicz M, Kruminis-Łozowska W, Prokopowicz D. Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Ann Agric Environ Med*, 2004, 11: 99-103. **IF = 1,051, KBN = 9**
- P6.** **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: 109-114. **IF = 1,051, KBN = 9**
- P7.** **Stańczak J**. The occurrence of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. *Ann N York Acad Sci*, 2006, 1078: 512-514. **IF = 1,971, MNiSW = 24**
- P8.** **Stańczak J**. Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Poland. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296, S1: 144-148. **IF = 2,667, MNiSW = 20**

Łączna punktacja: **IF = 13,125, KBN/ MNiSW = 100**

2. WSTĘP

We wstępie do rozprawy habilitacyjnej dokładnie scharakteryzowano dwa gatunki kleszczy, *I. ricinus* i *D. reticulatus*, które stanowiły materiał badawczy oraz szeroko omówiono biologię i epidemiologię tzw. „rozwijających się chorób infekcyjnych i inwazyjnych”, których etiologiczne czynniki wykryto w populacjach tych kleszczy. W kolejnych rozdziałach przedstawiono cel i metody badań oraz omówiono wyniki badań własnych na tle piśmiennictwa krajowego i europejskiego. Całość kończy podsumowanie, wnioski, wykaz piśmiennictwa oraz streszczenie w jęz. polskim i angielskim.

2.1. Kleszcze (Acari, Ixodida, Ixodidae)

Kleszcze należą do niebezpiecznych stawonogów zagrażających zdrowiu ludzi i zwierząt. Pod względem różnorodności czynników patogennych, które mogą przenosić ustępują miejsca jedynie komarom. Są wektorami rozmaitych gatunków wirusów, riketsji, bakterii oraz pierwotniaków wywołujących infekcje i inwazje mające zazwyczaj ciężki przebieg i nierzadko kończące się śmiercią.

W Polsce, spośród kleszczy właściwych (Ixodidae), zwanych również kleszczami twarzymi, gatunkiem pospolitym i najczęściej atakującym ludzi, a tym samym mającym największe znaczenie medyczne, jest kleszcz pospolity *Ixodes (Ixodes) ricinus* (Linnaeus, 1758) (tab. 1). Ten liczny i szeroko rozprzestrzeniony w naszym kraju gatunek jest żywicielsko nieswoisty, może więc atakować wszystkich dostępnych dla siebie żywicieli. Wylęgające się z jaj larwy oraz kolejne stadium rozwojowe – nimfy preferują jednak małe (np. drobne owadożerne i gryzonie leśne) i średniej wielkości ssaki (np. zające, lisy), a także ptaki, za których pośrednictwem mogą być też przenoszone na znaczne odległości. Natomiast dorosłe osobniki pasożytują zazwyczaj na dzikich i domowych, lub hodowlanych zwierzętach średnich (dziki, psy, owce) i dużych rozmiarów (zwierzyna płowa, bydło domowe). Człowiek może być atakowany przez wszystkie aktywne stadia rozwojowe *I. ricinus*, głównie jednak przez nimfy i samice. Po pobraniu krwi pasożyt odpada od żywiciela i chowa się w ściółkę. Postacie młodociane tam linieją, przekształcając się w następne stadium rozwojowe, natomiast samice produkują i składają jaja (średnio ok. 2500 sztuk), po czym giną. Całkowity okres rozwoju osobniczego *I. ricinus* w naszych warunkach klimatycznych trwa 1,5 – 4 lat. Sezonowa aktywność tego kleszcza rozpoczyna się, w zależności od temperatury, w końcu marca lub na początku kwietnia i trwa zazwyczaj do listopada. Cechują ją przeważnie dwa szczyty: wiosenny, wyższy, w maju i jesienny, niższy, we wrześniu. Wówczas też najczęściej dochodzi do kontaktów kleszczy z ludźmi i, w konsekwencji ukłucia przez zakażonego stawonoga, może mieć miejsce transmisja patogenu/patogenów. W miesiącach letnich notuje się spadek aktywnych form *I. ricinus*. W naszym kraju gatunek ten bytuje w siedliskach o wilgotności względnej ok. 80-100%. Sporadycznie zatem występuje w lasach sosnowych na piaszczystym podłożu i w borach szpilkowych bez poszycia, a także na moczarach i torfowiskach, natomiast głównie zasiedla lasy liściaste i mieszane [83]. Coraz częściej znajduje również dogodne warunki rozwoju w biotopach leśnych na obrzeżach miast, a także w lasach i parkach miejskich, gdzie częstotliwość jego kontaktów z ludźmi tym samym wzrasta.

Tabela 1. Systematyka występujących w Polsce gatunków kleszczy o dużym znaczeniu epidemiologicznym wg Siudy [84] (systematyka uproszczona).

Typ: Arthropoda von Siebold et Stannius, 1945 - stawonogi
Gromada: Arachnida Lamarck, 1801 – pajęczaki
Podgromada: Acari Latreille, 1795 – roztocze
Rząd: Ixodida (Sundevall, 1833) Van Der Hammen, 1968 – kleszcze
Rodzina: Argasidae Murray, 1877 – obrzeżki, kleszcze miękkie
Rodzaj: <i>Argas</i> Latreille, 1796
Gatunek: <i>Argas (Argas) reflexus</i> (Fabricius, 1794) <i>A. (A.) polonicus</i> Siuda, Hoogstrall, Clifford et Wassef, 1979
Rodzina: Ixodidae Murray, 1877 – kleszcze właściwe, kleszcze twarde
Rodzaj: Ixodes Latreille, 1795
Gatunek: <i>Ixodes (Ixodes) ricinus</i> (Linnaeus, 1758) <i>I. (I.) persulcatus</i> Schulze, 1930 <i>I. (Exopalgiger) trianguliceps</i> Birula, 1895 <i>I. (Pholeoixodes) hexagonus</i> Leach, 1815
Rodzina: Amblyommidae – kleszcze właściwe, kleszcze twarde
Rodzaj: <i>Dermacentor</i> Koch, 1844
Gatunek: <i>Dermacentor (Dermacentor) reticulatus</i> (Fabricius, 1794)
Rodzaj: <i>Haemaphysalis</i> Koch, 1844
Gatunek: <i>Haemaphysalis (Aboimisalis) punctata</i> Canestrini et Fanzago, 1877 <i>H. (Haemaphysalis) concinna</i> Koch, 1844

W przeciwieństwie do *I. ricinus*, zasięg występowania kleszcza łąkowego, *Dermacentor (Dermacentor) reticulatus* (Fabricius, 1794) (tab. 1), jest ograniczony do północno-wschodnich i wschodnich połaci kraju. Jednak w swoich siedliskach występuje on powszechnie, a w okresach wzmożonej aktywności wiosennej i jesiennej może być nawet liczniejszy niż kleszcz pospolity. Bytuje przede wszystkim w zadrzewionych lub zakrzewionych dolinach rzek i strumieni, na torfowiskach niskich i w bagnistych lasach mieszanych, na polanach i łąkach śródleśnych, a także na porębach oraz zakrzewionych pastwiskach. *D. reticulatus* jest gatunkiem pozagniazdowo-norowym, o trójżywieliowym cyklu rozwojowym. Młodościane osobniki występują w norach i korytarzach nor drobnych ssaków, a ich żywicielami są głównie nornikowate. Żywicielami postaci dorosłych są średniej i dużej wielkości ssaki dzikie (m.in. króliki, zające, dziki, sarny, jelenie, łosie) oraz bydło domowe [83]. Ponieważ jednak gatunek ten rzadko atakuje ludzi, uważa się, że nie stanowi on w Polsce istotnego zagrożenia dla ich zdrowia. Nie znaczy to jednak, iż powinno się lekceważyć jego znaczenie medyczne, ponieważ *D. reticulatus* występuje na żywicielach, na których chętnie pasożytuje również *I. ricinus* i ten fakt ma istotne znaczenie epidemiologiczne. Może bowiem dochodzić do współżerowania (*co-feeding*) obu gatunków na jednym żywicielu. Dzięki temu możliwa jest transmisja patogenów z zakażonych osobników kleszczy pospolitych, służących jako dawcy (*donors*) do pasożytujących obok nich kleszczy łąkowych, będących biorcami (*recipients*). Tym samym *D. reticulatus* może pełnić rolę w podtrzymywaniu naturalnego krążenia chorobotwórczych mikroorganizmów, zwłaszcza, że zasiedla on licznie tereny o endemicznym występowaniu wielu chorób transmisyjnych.

Cykl rozwojowy kleszcza łąkowego jest zasadniczo jednoroczny, ale w rzadkich przypadkach może trwać dwa lata. W ciągu roku występują dwa okresy aktywności głodnych form dorosłych – wiosenny (marzec – czerwiec), ze szczytem w kwietniu i jesienny (sierpień – listopad), ze szczytem w październiku. Postacie młodościane mają jeden okres aktywności od czerwca do września, ze szczytem w lipcu dla larw oraz w sierpniu dla nimf.

2.2. Epidemiologia chorób odkleszczowych

Nowo rozpoznawane w ostatnich latach choroby odkleszczowe (TBD – *tick-borne diseases*) ludzi są transmisyjnymi zoonozami, których czynniki etiologiczne utrzymywane są w naturalnym cyklu obejmującym kleszcze oraz zwierzęta dzikie i/lub hodowlane. W przypadku każdej z nich jeden lub kilka gatunków kleszczy może pełnić rolę przenosicieli patogenu i dla każdej istnieje jedno lub kilka zoonotycznych źródeł zakażenia (rezerwuarów). W organizmach tych zwierząt odbywa się namnażanie czynników chorobotwórczych i w efekcie rozwija się systemowa bakteremia, wiremia lub parazytemia umożliwiające bezpośrednią transmisję patogenów do wektora. Źródło zoonotyczne należy odróżnić od znacznie liczniejszej grupy kręgowców, które choć także są żywicielami kleszczy, to jednak nie wykazują objawów systemowej bakteriemii i nie są zdolne do bezpośredniego zakażenia wektora. Zwierzęta te, nazywane amplifikatorami, utrzymują jednakże lokalne populacje kleszczy na wysokim poziomie zagęszczenia i tym samym ułatwiają krążenie patogenów w naturze.

W naturalnym ognisku choroby występuje pionowa i pozioma transmisja patogenów. Transmisja pionowa zachodzi w obrębie populacji kleszczy i wiąże się z przekazem transstadialnym mikroorganizmów z jednego stadium rozwojowego na kolejne, np. z zainfekowanej larwy na nimfę, a następnie na postać dorosłą oraz przekazem transowarialnym z samicy na potomstwo. Oba rodzaje transmisji występują w przypadku riketsji SFG i krętków *B. burgdorferi* s.l., dzięki temu kleszcze pełnią rolę nie tylko wektorów, ale i rezerwuarów tych patogenów. Natomiast w przypadku *A. phagocytophilum* i *B. microti* nie dochodzi do przekazu transowarialnego, dlatego też kleszcze są tu jedynie przenosicielami infekcji/inwazji.

Krażenie patogenów w płaszczyźnie poziomej odbywa się pomiędzy kleszczami a zwierzętami, będącymi rezerwuarem patogenu. Kleszcze, które ulegają zakażeniu/zarażeniu podczas biorczego ssania krwi na zainfekowanym żywicielu, po transmisji transstadialnej przekazują je wrażliwemu żywicielowi podczas kolejnego pobierania krwi. Człowiek, który nie jest właściwym żywicielem kleszczy, jedynie przypadkowo bywa włączony w cykl rozwojowy zarówno kleszcza jak i patogenu, i ulega zakażeniu i/lub zarażeniu.

Infekcyjność zwierząt rezerwuarowych, poziom zainfekowania kleszczy oraz zagęszczenie żywicieli są najważniejszymi czynnikami determinującymi epidemiologię chorób odkleszczowych.

2.3. Transmisyjne zoonozy odkleszczowe zaliczane do tzw. „rozwijających się chorób infekcyjnych i inwazyjnych” (EID - „*emerging infectious diseases*”)

2.3.1. Borelioza z Lyme (LB – *Lyme borreliosis*) (krętkowica kleszczowa) jest jedną z najważniejszych i najszerzej rozprzestrzenioną chorobą transmitowaną przez kleszcze, której zoonotycznym źródłem są drobne gryzonie leśne, natomiast wektorami kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Czynnikiem etiologicznym LB są Gram-ujemne krętki *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetales, Spirochaetaceae), które po raz pierwszy zostały wyizolowane w 1981 r. w Stanach Zjednoczonych z kleszczy *I. dammini/scapularis*, a w 1984 r. opisane jako nowy gatunek [9, 47]. Obecnie uważany jest on za kompleksowy, obejmujący 11 gatunków genomowych [101, 55] (tab. 2).

Tabela 2. Gatunki genomowe z kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

<p style="text-align: center;"><i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto</p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia garinii</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia afzelii</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia valaisiana</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia lusitaniae</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia japonica</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia andersoni</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia tanukii</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia turdii</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia bissetti</i></p> <p style="text-align: center;"><i>Borrelia sinica</i></p>

Co najmniej trzy z nich: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s), *B. afzelii* i *B. garinii*, są patogennicne dla ludzi i zwyczajowo to właśnie te gatunki określa się mianem *B. burgdorferi* s.l., Wszystkie występują w Europie. Wywoływana przez nie przewlekła zoonoza może rozwijać się latami i doprowadzić do trwałych zmian narządowych. W jej fazowym przebiegu można wyróżnić trzy następujące po sobie okresy, z których I, wczesny, charakteryzuje się zazwyczaj występowaniem lokalnych zmian skórnych – rumieni (EM – *erythema migrans*). W miarę upływu czasu następuje krwiopochodny wysiew krętków do innych organów, a obraz kliniczny choroby jest powiązany z narządowym umiejscowieniem zmian. W tym II okresie najbardziej typowym objawem jest neuroborelioza (LM – *lymphocytic meningoradiculitis*), ale może dochodzić również do zmian w sercu, narządach wzroku i ruchu. Po kilku/kilkunastu miesiącach lub latach, w III okresie, dolegliwości stawowe, neurologiczne i skórne przybierają charakter przewlekły, a najbardziej typową zmianą jest *acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), prowadząca stopniowo do zaniku skóry. Zazwyczaj pierwszym objawem zakażenia każdym z trzech ww. patogenicznych gatunków krętków jest wystąpienie EM. W dalszym przebiegu schorzenia, *B. burgdorferi* s.s. związana jest głównie z zapaleniem stawów, *B. garinii* występuje przede wszystkim u pacjentów z LM, natomiast *B. afzelii* najczęściej towarzyszy ACA.

W Europie stwierdzono ponadto występowanie *B. valaisiana* i *B. lusitaniae*, których patogeniczność względem człowieka nie została jeszcze w pełni wykazana i wymaga dalszych badań.

W Polsce pierwsze zdiagnozowane przypadki boreliozy z Lyme zostały opisane w 1987 r. u pacjentów na Pomorzu Zachodnim [46]. Odnotowane zachorowania potwierdziły, sugerowaną już wcześniej, konieczność podjęcia badań nad występowaniem naturalnych ognisk LB w naszym kraju, ze szczególnym uwzględnieniem kleszczy *I. ricinus* jako potencjalnych wektorów krętków *B. burgdorferi* s.l.

2.3.2. Ludzka anaplazmoza granulocytarna (HGA – *human granulocytic anaplasmosis*), początkowo znana jako ludzka ehrlichioza granulocytarna (HGE - *human granulocytic ehrlichiosis*), jest wywoływana przez niewielkich rozmiarów (0,5 do 1,5 μm) Gram-

ujemne bakterie z obrębu α -Proteobacteria, rzędu Rickettsiales, rodziny Anaplasmataceae, będące obligatoryjnymi, wewnątrzkomórkowymi pasożytami białych krwinek. Zakażają przede wszystkim granulocyty obojętnochłonne, neutrofile, i replikują się w wakuolach wewnątrz ich cytoplazmy tworząc tzw. morule. Świadczy to o unikatowych zdolnościach adaptacyjnych i mechanizmach patogenetycznych tych bakterii, umożliwiających im przeżycie w komórkach układu odpornościowego, pełniących zasadniczą rolę w odpowiedzi immunologicznej skierowanej właśnie przeciwko takim mikroorganizmom.

HGA została opisana po raz pierwszy w Stanach Zjednoczonych w 1994 r. [4, 11]. Dokładny taksonomiczny status jej czynnika etiologicznego, wyizolowanego dwa lata później i nazywanego początkowo „czynnikiem HGE”, ostatecznie określono dopiero w 2001 r. Wówczas, wraz ze zbieżnymi genowo patogenami o znaczeniu weterynaryjnym (*Ehrlichia phagocytophila* i *E. equi*), „czynnik HGE” przeniesiono z rodzaju *Ehrlichia* do rodzaju *Anaplasma* jako jeden wspólny gatunek *Anaplasma phagocytophilum* comb. nov. [19].

W Ameryce Północnej, Europie i Azji *A. phagocytophilum* krąży w naturalnym cyklu przenoszona przez różne gatunki kleszczy z rodzaju *Ixodes*. Za źródło zakażenia uważane są drobne gryzonie, ale coraz częściej pod uwagę bierze się również duże dzikie ssaki, głównie jeleniowate, ze względu na występującą u nich długotrwałą infekcję o subklinicznym przebiegu.

Do zakażenia człowieka dochodzi na skutek ukłucia przez zainfekowanego kleszcza. Po przeniknięciu skóry, bakterie rozprzestrzeniają się drogą naczyń chłonnych i krwionośnych, atakując komórki docelowe układu krwiotwórczego oraz siateczkowo-śródbłonkowego.

Kliniczny obraz HGA jest zróżnicowany i może mieć przebieg od łagodnego do ciężkiego. Średni okres wylegania choroby, wg różnych źródeł, wynosi 7-11 dni (od 5 do 11-21 dni), natomiast czas jej trwania od kilku dni do 2-3 tygodni, jednakże, przy braku odpowiedniego leczenia, może przedłużyć się nawet do 2-3 miesięcy. We wstępnym okresie choroba objawia się złym samopoczuciem i zmęczeniem (94% przypadków), gorączką ($> 39^{\circ}\text{C}$) (92%), bólami mięśni (77%) i głowy (75%), rzadziej stawów, dreszczami i nadmiernym poceniem się. Po kilku dniach mogą wystąpić nudności, wymioty, biegunka oraz bóle brzucha, prowadzące do utraty masy ciała. Powyższym objawom może również towarzyszyć kaszel połączony z napadową dusznością, związany z zapaleniem płuc, a niekiedy zaburzenia świadomości. Stosunkowo rzadko (6% przypadków), przede wszystkim u dzieci, pojawia się płamkowo-grudkowy lub wybroczynowy rumień [5, 20]. Należy jednak brać również pod uwagę możliwość wystąpienia innych objawów skórnych, jak np. zespołu Sweeta – neutrofilowej dermatozy charakteryzującej się m.in. tkliwymi, rumieniowymi, pseudopęcherzowymi zmianami skórnymi, prawdopodobnie będącymi wynikiem aktywacji neutrofilii już przez niewielką liczbę komórek *A. phagocytophilum* [36]. W przypadkach bardzo ciężkich może wystąpić zespół wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. W badaniach laboratoryjnych obserwuje się trombocytopenię (71%), leukopenię (49%), anemię (37%) oraz podwyższony poziom aminotransferaz (71%) [20]. Ok. 40% pacjentów jest poddawanych hospitalizacji, trwającej średnio 6 dni, a 17% wymaga intensywnej opieki medycznej [5]. Wykryta wcześniej i leczona, ludzka anaplazmoza granulocytarna nie powoduje powikłań, jednak późne rozpoznanie i podjęcie leczenia może być bezpośrednią przyczyną śmierci, zwłaszcza u osób starszych, lub zgonów z powodu infekcji/inwazji oportunistycznych [2, 37]. W związku z tym śmiertelność wg różnych źródeł wynosi 1-5%. Wyniki badań seroepidemiologicznych sugerują ponadto, że wiele przypadków zakażeń *A. phagocytophilum* jest nierozpoznanych.

Pierwsze kliniczne przypadki HGA w Polsce zdiagnozowano w roku 2000 [98].

2.3.3. Babeszjoza jest kolejną zoonozą przenoszoną przez kleszcze, wywoływaną przez pierwotniaki z rzędu Piroplasmida, rodziny Babesiidae, rodzaju *Babesia*, będących obligatoryjnymi pasożytami erytrocytów. Jedną z najczęstszych inwazji wśród dziko żyjących i hodowlanych zwierząt na całym świecie, przyciąga coraz żywsze zainteresowanie klinicystów również jako rozwijająca się choroba ludzi. Spośród ok. 100 znanych gatunków *Babesia* spp., dwa: *B. microti*, pasożyt drobnych gryzoni i *B. divergens*, pasożyt bydłęcy, wywołują grose inwazji u ludzi. Ponadto, w Stanach Zjednoczonych notowano pojedyncze przypadki kliniczne będące skutkiem zarażenia pacjentów dotychczas nienazwanymi gatunkami piroplazm typu WA-1 (od „Washington 1”), CA-1 (od „California 1”) i MO-1 (od „Missouri 1”) [38, 40, 67, 72], a w Europie typu EU1 (od „European Union 1”) [39].

Na naszym kontynencie pierwszy, śmiertelny, przypadek ludzkiej babeszjozy opisano w 1957 r. w dawnej Jugosławii [87]. Od tego czasu odnotowano ponad 30 dalszych przypadków, z których większość była wywołana przez *B. divergens*, a zaledwie dwa przez *B. microti* [42]. W USA choroba ta znana jest od 1966 r., a liczba zachorowań, których przyczyną jest przede wszystkim inwazja *B. microti*, przekroczyła 400. Kliniczny obraz babeszjozy w Ameryce Północnej i Europie nieco różni się od siebie. Na naszym kontynencie jej przebieg jest zwykle bardziej gwałtowny i cięższy. Charakteryzuje się m.in. złym samopoczuciem, zmęczeniem, dreszczami, mdłościami, bólami głowy i brzucha, utratą wagi, żółtaczką, zaburzeniami emocjonalnymi. Temperatura ciała może sięgać 40°C. Najczęstszym klinicznym objawem jest wewnątrznaczyniowa hemoliza z hemoglobinurią oraz niewydolność nerek. W przebiegu choroby parazytemia wynosi od 1% do 80% zarażonych krwinek. Do grupy podwyższonego ryzyka zalicza się osoby po splenektomii, wśród których, w razie zachorowania, śmiertelność sięga 50% [28, 29].

W naturze kleszcze zarażają się *B. divergens* w stadium samicy, która następnie przekazuje inwazję transowarialnie na potomstwo, natomiast do zarażenia *B. microti* dochodzi podczas pasożytowania młodocianych stadiów rozwojowych (larwy, nimfy) i wiąże się z transstadialną transmisją pasożytów, przy czym dochodzi tylko do jednej transmisji: z larwy na nimfę lub z nimfy na postać dorosłą.

Dotychczas w Polsce nie notowano rodzimych przypadków ludzkiej babeszjozy.

2.3.4. Gorączki plamiste (SF – *spotted fever*) wywoływane są przez drobne (0,3-0,5 x 0,8-2,0 µm), Gram-ujemne riketsje (rząd Rickettsiales, rodzina Rickettsiaceae, rodzaj *Rickettsia*, grupa gorączek plamistych – SFG „*spotted fever group*”), będące obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Są one przede wszystkim przenoszone przez kleszcze twarde, będące zarazem wektorami i rezerwuarami riketsji, podczas gdy kręgowce, w tym człowiek, są ich żywicielami przypadkowymi. Głównymi objawami zakażenia riketsjami z grupy gorączek plamistych są bóle głowy i gorączka. W większości przypadków obserwowane są plamiste wykwity skórne, którym czasami towarzyszy nekrotyczna grudka (strup). W patogenie, cechą charakterystyczną jest umiejscowienie i namnażanie się riketsji w komórkach śródbłonna drobnych naczyń włosowatych, który ulega zniszczeniu na skutek efektu cytotoksycznego. Pociąga to za sobą wytworzenie rozsianych wielonarządowych zmian typu *vasculitis*, które są umiejscowione w drobnych naczyniach skóry, płuc, serca, nerek i mózgu, a także w innych narządach wewnętrznych. Uszkodzenie nabłonka naczyń prowadzi do ogniskowej martwicy, do tworzenia się nacieków wokół tych naczyń i do zwolnienia przepływu krwi w naczyniach włosowatych. Powoduje to przechodzenie osocza przez ściany naczyń i powstawanie obrzęków okołonaczyniowych. Niedokrwienie i niedotlenienie prowadzą do uszkodzenia narządów i układów, m.in. ośrodkowego układu nerwowego, nerek, nadnerczy, czy mięśnia sercowego. Może również dojść do zespołu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego [21].

Tabela 3. Riketsje z grupy gorączek plamistych występujące w Europie i wywoływane przez nie choroby ludzi.

Patogeniczne dla człowieka	
<i>Rickettsia conori</i> s.s.	gorączka śródziemnomorska
<i>Rickettsia akari</i> *	wysypka riketsjowa
<i>Rickettsia slovaca</i>	odkleszczowa limfadenopatia (TIBOLA)
<i>Rickettsia sibirica</i>	syberyjski dur kleszczowy
<i>Rickettsia helvetica</i>	nienazwana riketsjoza
<i>Rickettsia mongolotimonae</i>	nienazwana riketsjoza
Uznawane obecnie za niepatogeniczne dla człowieka	
<i>Rickettsia massiliae</i>	
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	
<i>Rickettsia monacensis</i> sp. nov.	
<i>Candidatus Rickettsia kotlanii</i>	

* przenoszona przez drobne roztocze

Spośród znanych obecnie ok. 30 gatunków riketsji SFG, co najmniej 13 jest uważanych za patogeniczne dla człowieka, w tym 6 w Europie (tab. 3). Pozostałe były dotychczas izolowane jedynie ze stawonogów i często są traktowane jako niechorobotwórcze. Jednakże w ostatnich latach, np. *R. slovaca* została jednoznacznie określona jako etiologiczny czynnik odkleszczowej limfadenopatii (TIBOLA – *tick-borne lymphadenopathy*). Chorobę tę charakteryzuje m.in. występowanie nekrotycznej zmiany skórnej oraz rumień w miejscu ukłucia kleszcza (przeważnie na głowie i karku), którym towarzyszą wyraźnie powiększone i bolesne węzły chłonne. Natomiast *R. helvetica* uznano za czynnik kolejnej ludzkiej riketsjozy o objawach *perimyocarditis* (zapalenia mięśnia sercowego) [60], sarcoidozy [61] i grypopodobnej, ostrej choroby gorączkowej [25, 26].

W Polsce do chwili obecnej nie zdiagnozowano zachorowań na gorączki plamiste, będące wynikiem ukłucia przez zakażonego kleszcza.

3. CEL BADAŃ

Do najważniejszych czynników determinujących epidemiologię chorób odkleszczowych zalicza się zakażenie zwierząt rezerwuarnych, **poziom prewalencji patogenów w populacjach kleszczy** oraz zagęszczenie żywicieli tych ektopasożytów. Dlatego też celem prezentowanych badań, prowadzonych w latach 1993–2004, było przede wszystkim:

- 1) wykazanie, czy w rodzimych populacjach dwóch gatunków Ixodidae – *I. ricinus* i *D. reticulatus* występują etiologiczne czynniki chorób zaliczanych do EID: boreliozy z Lyme, ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej, babeszjozy oraz gorączek plamistych, stanowiących zagrożenie zdrowia ludzi;
- 2) określenie, jak kształtuje się prewalencja poszczególnych gatunków patogenów w populacjach kleszczy;
- 3) określenie terenów występowania naturalnych ognisk wspomnianych chorób na terenie kraju, a szczególnie na jego północnych i północno-wschodnich obszarach;
- 4) określenie ryzyka wystąpienia infekcji/inwazji, w tym mieszanych, u ludzi ekspozowanych na ataki kleszczy.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Zbiór kleszczy

Kleszcze odławiano na wytypowanych stanowiskach leśnych północnej, północno-wschodniej, wschodniej i południowej Polski. Miejsca zbioru *I. ricinus* były zlokalizowane głównie w lasach liściastych i mieszanych: wokół miejsc piknikowych i parkingów leśnych, wzdłuż dróg i ścieżek leśnych oraz na obrzeżach lasów, natomiast *D. reticulatus* na torfowiskach niskich, na polanach i łąkach śródleśnych, a także na porębach oraz zakrzewionych pastwiskach, a więc wszędzie tam, gdzie kontakt kleszczy z ludźmi był najbardziej prawdopodobny. Odłowu dokonywano w okresach aktywności kleszczy (kwiecień – październik) ogólnie przyjętą do tego celu metodą „flagowania” niskiej roślinności i ściółki flanelową flagą o powierzchni 1m². W laboratorium zebrane kleszcze segregowano wg gatunku i stadium rozwojowego. Do badań metodą immunofluorescencji pośredniej (OIP) używano żywych osobników, podczas gdy do badań z zastosowaniem techniki polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) kleszcze konserwowano w 70% alkoholu etylowym.

4.2. Odczyn immunofluorescencji pośredniej (OIP)

OIP stosowano w latach 1993 – 1999 do detekcji krętków *B. burgdorferi* s.l., z użyciem poliklonalnych króliczych przeciwciał przeciw *B. burgdorferi*, szczep 1 B 29 (PAB 1 B 29) oraz kozich przeciwciał przeciwkróliczych znakowanych FITC [6, 80].

4.3. Polimerazowa reakcja łańcuchowa (PCR)

Izolacji DNA poszukiwanych patogenów z kleszczy dokonywano metodą amoniakalną [77]. Amplifikacji wybranych fragmentów genów dokonywano z zastosowaniem opublikowanych lub własnych starterów reakcji specyficznych rodzajowo lub gatunkowo.

Do amplifikacji DNA *B. burgdorferi* s.l. stosowano parę oligonukleotydów FL6 i FL7 [69] specyficznych do fragmentu genu *fla* kodującego białko wici, wysoce konserwatywnego w obrębie tego kompleksowego gatunku. Następnie detekcji trzech patogenicznych gatunków *B. burgdorferi* s.l. dokonywano techniką nested PCR, z zaprojektowanymi przez zespół **własnymi** starterami reakcji wewnętrznej: BB1/BB2, BA1/BA2 i BG1/BG3, specyficznymi odpowiednio dla *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* i *B. garinii*. DNA *A. phagocytophilum* wykrywano przy użyciu starterów EHR 521 i EHR 747, amplifikujących fragment genu 16S rDNA tego gatunku riketsji [65], podczas gdy DNA *B. microti* z zastosowaniem zewnętrznych starterów bab1 i bab4 oraz wewnętrznych bab2 i bab3 (nested PCR) amplifikujących fragment genu kodującego małe podjednostki rybosomalnego RNA (SS-rDNA) [66]. DNA riketsji SFG wykrywano amplifikując, przy pomocy starterów Rp.Cs.877p. i Rp.Cs.1258n, fragmenty genu *gltA*, kodującego syntazę cytrynianową, który zawiera zakonserwowane regiony występujące u wszystkich znanych gatunków z rodzaju *Rickettsia* [75] oraz przy pomocy starterów SLO1F i SLO1R – pary oligonukleotydów specyficznych do fragmentu genu *ompA*, kodującego zewnętrzne białko powierzchniowe rOmpA tych drobnoustrojów.

W każdej reakcji stosowano właściwe kontrole pozytywne oraz kontrolę negatywną (podwójnie destylowaną wodę). Wszystkie reakcje przeprowadzono w termocyklarach GeneAmp PCR System 2400 lub 9700 (Applied Biosystem, USA, dawniej Perkin Elmer).

4.4. Detekcja specyficznego produktu reakcji PCR i analiza otrzymanych sekwencji

Detekcję specyficznych produktów PCR przeprowadzono na drodze elektroforezy na 1,5% lub 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy w obecności wzorców masowych DNA.

Analizy sekwencji uzyskanych produktów PCR dokonywano za pomocą automatycznego sekwenatora ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystem, USA) wg protokołu producenta. Uzyskane sekwencje porównywano ze zdeponowanymi w banku genów (GenBank) za pomocą programu NCBI BLAST.

5. WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE NA TLE PIŚMIENICTWA KRAJOWEGO I EUROPEJSKIEGO

5.1. *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus*

Wyniki **pierwszych w Polsce badań** nad występowaniem *B. burgdorferi* s.l. w populacjach *I. ricinus*, prowadzonych w pierwszej połowie lat 90. ubiegłego wieku, przedstawiono w **pracy P1**. Obecność krętków u nimf i postaci dorosłych kleszczy, zebranych z roślinności na leśnych stanowiskach dawnego woj. olsztyńskiego oraz ze zwierzyny łownej, wykryto wówczas przy zastosowaniu OIP. Ogólny poziom infekcji u głodnych osobników wynosił 11,5% (n=192/1666), ale na poszczególnych 35 stanowiskach badawczych wahał się od 0% do 35,7%. Uzyskane rezultaty wykazały, że na badanym terenie *B. burgdorferi* krąży w naturalnym cyklu, a jej głównym wektorem jest *I. ricinus* oraz potwierdziły, że istnieją tam ogniska boreliozy z Lyme, w tym ze znacznym ryzykiem wystąpienia zachorowań u ludzi.

W prowadzonych równolegle badaniach, również z udziałem autorki, dokonano także pierwszej w kraju izolacji krętków z *I. ricinus* metodą hodowli na podłożu BSK-H (Sigma) [15]. Wyizolowany szczep 1 BF 5 reagował pozytywnie zarówno z ww. przeciwciałami poliklonalnymi, jak i monoklonalnymi przeciwciałami specyficznymi rodzajowo (MAB 9724) i gatunkowo (MAB: H 5332 i 11 G 1), co wówczas pozwoliło na jednoznaczne zidentyfikowanie tego szczepu jako *B. burgdorferi*. Jednoczesny brak reakcji z monoklonalnymi przeciwciałami MAB H 3TS umożliwił zakwalifikowanie go do serogrupy II, zgodnie z ówczesnym systemem serotypowania.

Rezultaty ww. badań były zgodne z wynikami uzyskiwanymi w tamtych latach również w innych krajach europejskich [22, 31, 49, 62] i potwierdzały rolę *I. ricinus* jako przenosiciela *B. burgdorferi* s.l. w Europie.

Do końca lat 90. XX w. wspomniane powyżej oraz kolejne prace badawcze, przy znaczącym współdziałaniu lub prowadzone przez autorkę, wniosły istotny wkład w poznanie rozprzestrzenienia *B. burgdorferi* s.l. w populacjach kleszcza pospolitego w Polsce. Najintensywniejsze badania były prowadzone na terenach północno-wschodniej i północnej Polski, i z tego obszaru pochodzą najbardziej szczegółowe dane. Odłowiono tam z roślinności i przebadano odczynem immunofluorescencji pośredniej ogółem 15.830 nimf i dorosłych *I. ricinus*. Krętki wykryto odpowiednio u 6,5% i 8,8% kleszczy pochodzących z dawnego woj. gdańskiego i białostockiego [102, 103, 104]. Natomiast w **pracy P2**, oprócz wykazania nowych ognisk boreliozy z Lyme na terenie woj. białostockiego i olsztyńskiego, gdzie zakażenie kleszczy wynosiło odpowiednio 4,1% i 10,3%, oraz krakowskiego (15,5%) i katowickiego (37,5%), wykryto kolejne: w woj. śląskim (9,1% zakażonych kleszczy), elbląskim (13,2%), bydgoskim (7,4%) i lubelskim (11,3%), potwierdzając tym samym, że *B. burgdorferi* jest rozprzestrzeniona w populacjach kleszczy na terenie całego kraju. Było to możliwe m.in. dzięki wprowadzeniu do badań techniki PCR, w której do amplifikacji zastosowano parę starterów FL6 i FL7, specyficznych do fragmentu genu *fla* krętków z tego kompleksowego gatunku. Pozwoliła ona na detekcję DNA bakterii również w materiale zakonserwowanym w alkoholu, podczas gdy w przypadku OIP antygen musiał być sporządzany z żywych kleszczy, z których część nie przeżyłaby transportu z odległych stanowisk ich odłowu do laboratorium IMMiT w Gdyni.

Należy tu zaznaczyć, że w **pracach nr P1 – P3** notowano zawsze znacznie wyższy odsetek zakażonych dorosłych postaci kleszczy (18,8% – 22,9%) w porównaniu do nimf (4,7% – 7,6%).

W ślad za IMMiT w Gdyni, badania nad występowaniem *B. burgdorferi* w rodzimych populacjach kleszczy podjęty i inne krajowe ośrodki naukowe. Pozwoliły one na wykrycie ognisk boreliozy z Lyme na terenach centralnej Polski [82], Pomorza Zachodniego [8, 106], Wielkopolski [56, 63] oraz Małopolski i Śląska [68]. Ogółem, na podstawie przeanalizowanych danych z piśmiennictwa można stwierdzić, że w Polsce poziom zakażenia *I. ricinus* krętkami z kompleksu *B. burgdorferi* waha się od 0 do 58,3% [90]. Wyniki te są zgodne z uzyskiwanymi w innych krajach europejskich, gdzie ogólny odsetek głodnych kleszczy zainfekowanych krętkami również sięga do 58%, przy czym poziom zakażenia postaci młodocianych, tj. larw i nimf (odpowiednio od 0 – 11% oraz 2 – 43%) jest zazwyczaj niższy aniżeli form dorosłych (3 – 58%) [44].

W tym samym czasie autorka wraz z zespołem, drogą hodowli oraz PCR i analizy długich fragmentów restrykcyjnych (LRFP - *large restriction fragment pattern*), wykazała **po raz pierwszy** w Polsce obecność w rodzimych kleszczach trzech patogenicznych gatunków krętków, tj. *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* i *B. garinii* [91]. Jak widać z **pracy P3**, wkrótce do badań wprowadzono technikę nested-PCR, z zaprojektowanymi przez zespół **własnymi** startarami reakcji wewnętrznej: BB1/BB2, BA1/BA2 i BG1/BG3, specyficznymi odpowiednio dla ww. gatunków, która pozwoliła na ich bezpośrednie wykrywanie w kleszczach i tym samym uniknięcie żmudnej i długotrwałej izolacji bakterii z tych stawonogów metodą hodowli. W wyniku stwierdzono, że wszystkie trzy gatunki krążą w naturalnych cyklach na badanych obszarach kraju (północnych, północno-wschodnich, południowo-wschodnich, południowych). Ogółem odnotowano nieznaczną przewagę zakażeń *B. afzelii* (47,1%) nad *B. burgdorferi* s.s. (39,2%) oraz *B. garinii* (33,3%), choć w zależności od regionu, odsetek kleszczy zainfekowanych poszczególnymi gatunkami genomowymi był zmienny. Ten ich nierównomierny rozkład w Polsce został odnotowany również przez innych autorów. Np. na terenie Pomorza Zachodniego zdecydowanie dominuje *B. burgdorferi* s.s. (96%) [107]. Także dane z pozostałych krajów europejskich wskazują, że geograficzne rozprzestrzenienie różnych gatunków z kompleksu *B. burgdorferi* s.l. nie jest równomierne [12, 48, 58, 94, 105].

Oprócz gatunków patogenicznych, w naszym kraju stwierdzono również występowanie *B. valaisiana* [82] i *B. lusitaniae* [108]. Nie określono jeszcze ostatecznie ich potencjału chorobotwórczego, istnieją jednak coraz liczniejsze dowody na to, że przynajmniej pierwszy z nich również może być przyczyną wystąpienia klinicznych objawów boreliozy u ludzi, ponieważ *B. valaisiana* izolowano z bioptatów skórnych pobranych od pacjentów z EM, ACA, neuroboreliozą i zapaleniem stawów [79].

5.2. *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach *Ixodes ricinus*

Wyniki **pierwszych polskich badań** dotyczących występowania *A. phagocytophilum* w rodzimych kleszczach *I. ricinus* zostały przedstawione przez autorkę w 2000 r. na VIII European Multicolloquium of Parasitology w Poznaniu [92]. Równolegle zaprezentowano rezultaty badań własnych nad prewalencją przeciwciał przeciw czynnikowi HGA (wówczas HGE) w grupie ludzi eksponowanej na ataki kleszczy [34]. Uzyskane rezultaty potwierdzały założenie, że w naszym kraju istnieją naturalne ogniska ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej i że chorobę tę należy zaliczyć do odkleszczowych EID. Rok później opisano pierwsze zdiagnozowane kliniczne przypadki HGA w naszym kraju [98].

W **pracach P4 – P6**, bazując na wynikach kolejnych badań molekularnych (PCR), wykazano zakażenie *A. phagocytophilum* populacji *I. ricinus* z terenu północnej i północno-wschodniej Polski. U kleszczy zebranych na stanowiskach zlokalizowanych na Pojezierzu Mazurskim, w okolicach Białegostoku i w Puszczy Białowieskiej ogólny odsetek zainfekowanych osobników wynosił 8,7%, a w woj. pomorskim sięgał 19,2%. Obserwowano jednak znaczne różnice w ekstensywności zakażenia kleszczy pochodzących z różnych stanowisk badawczych, od 0% aż do 38,5%. Najczęściej obecność *A. phagocytophilum* notowano u samic (21,3% – 47,6%) i samców (4,2% – 8,6%). Natomiast poziom zakażenia nimf był znacznie niższy wynosił i 1,4 – 2,1%, **co wskazywało na istotną rolę zwierząt średnich i/lub dużych rozmiarów, jako głównych rezerwuarów riketsji w naszym kraju.** Jej potwierdzeniem może być niedawne wykrycie, przy współdziałaniu autorki, *A. phagocytophilum* we krwi jeleniowatych w Wielkopolsce [57]. Tendencję wzrostu poziomu zakażenia w miarę rozwoju kleszczy zaobserwowano już we wcześniejszych badaniach prowadzonych z udziałem autorki, zarówno na wspomnianych wyżej obszarach Polski [33] oraz w środkowo-wschodniej części kraju, gdzie poziom zakażenia ogółu przebadanych kleszczy wynosił 13,1% [97]. Natomiast na Pomorzu Zachodnim notowana częstotliwość zakażeń *I. ricinus* przez *A. phagocytophilum* była znacznie niższa (1,4 – 4,5%) [85, 86]. W innych krajach europejskich odsetek kleszczy – nosicieli czynnika HGA, również jest zmienny i wynosi, przykładowo, od 1,3 – 4,1% w Szwajcarii i Niemczech [53, 71] do ok. 24% we Włoszech i Hiszpanii [14, 64] oraz ok. 30% w Bułgarii [12].

Niewiele jeszcze wiadomo o występowaniu *A. phagocytophilum* na rekreacyjnych zalesionych obszarach miejskich i/lub podmiejskich – środowiskach, gdzie ekspozycja ludzi na ataki kleszczy bywa najczęstsza. W Polsce tę lukę informacyjną częściowo wypełniły badania, których wyniki przedstawiono w **pracy P6**. Przeprowadzono je w lasach wokół i na terenie dzielnic mieszkaniowych Gdańska, Gdyni i Sopotu. Specyficzne położenie Trójmiasta, którego rozrost ogranicza z jednej strony Zatoka Gdańska, sprawiło jego ekspansję na zalesione wzgórza morenowe, gdzie coraz częściej lokalizowane są nowe osiedla mieszkaniowe, co pociąga za sobą wzmożony kontakt ich mieszkańców z kleszczami. Badania wykazały, że *I. ricinus* występuje tam licznie, a najwyższe zakażenie ogółu odłowionych osobników – 19,2%, występowało w obrębie Gdańska. Na zadrzewionych terenach Gdyni wynosiło 11,7%, a Sopotu 5,1% zbadanych kleszczy. Odsetek samic *I. ricinus*, u których wykryto *A. phagocytophilum* sięgał nawet ponad 47%. W związku z tym prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji u ludzi jest tam podwyższone.

Warto podkreślić, że badania wykonane z udziałem autorki wykazały obecność czynnika HGA (GenBank acc. no. DQ006828) u ponad 23% oraz ok. 10% *I. ricinus* zebranych ze skóry pacjentów zgłaszających się do Akademii Medycznej w Białymstoku [32] i Akademii Medycznej we Wrocławiu [95]. Natomiast wyniki badań seroepidemiologicznych, przedstawione przez autorkę w **pracy P5**, jak również w innych publikacjach z jej udziałem [33, 35] oraz dane jeszcze niepublikowane (Stańczak i wsp.), potwierdzają znaczną częstotliwość występowania zakażeń *A. phagocytophilum* u ludzi. Obecność przeciwciał przeciw tej riketsji u osób w różny sposób ekspozowanych na kleszcze, w tym zawodowo związanych z gospodarką leśną, stwierdzano u 0% – 32,4% badanych. Ten znaczny odsetek osób seropozytywnych, przy jednoczesnej niewielkiej liczbie klinicznych przypadków [35, 98], potwierdza, że w naszym kraju, podobnie jak w innych krajach europejskich [1, 7, 27, 99], HGA ma zazwyczaj przebieg skąpoobjawowy lub bezobjawowy. Być może jest to związane z możliwością występowania dwóch wariantów *A. phagocytophilum* [54], z których jeden jest patogeniczny dla ludzi, a drugi wprawdzie wywołuje odpowiedź immunologiczną organizmu, ale nie rozwija objawów choroby. Oba te warianty mogłyby być przenoszone przez *I. ricinus*, ale różniłyby

się źródłem zoonotycznym. Obecnie autorka jest zaangażowana w badania, w ramach wspólnego grantu MNiSW, prowadzone na Uniwersytecie A. Mickiewicza w Poznaniu, mające na celu m.in. genotypowanie riketsji *A. phagocytophilum* izolowanych z różnych kręgowców (ptaki, drobne ssaki leśne, jeleniowate), co pozwoliłoby na ewentualne zweryfikowanie ww. hipotezy.

5.3. *Babesia microti* w kleszczach *Ixodes ricinus*

Badania przedstawione w **pracy P6** wniosły nowe informacje dotyczące występowania *B. microti* w populacjach *I. ricinus* w Polsce. Przeprowadzono je na kleszczach zebranych na leśnych obszarach Trójmiasta. Technika PCR wykryto DNA tego pasożyta (fragment genu SS-rDNA) u 2,4% ogółu nimf i dorosłych form kleszczy, w tym u 4,3% samców, 3% samic oraz 1,3% nimf. Ten ok. 3-krotny wzrost zakażenia dorosłych kleszczy w porównaniu do nimf potwierdzał, że, podobnie jak w przypadku *B. burgdorferi*, rezerwuarem zoonotycznym *B. microti* są głównie drobne ssaki. W badaniach innych polskich autorów, występowanie tego gatunku pierwotniaka dotychczas wykazano właśnie u nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*), myszy leśnej (*Apodemus flavicollis*), polnika burego (*Microtus agrestis*), polnika północnego (*M. oeconomus*) oraz polnika zwyczajnego (*M. arvalis*) [3, 50, 51, 81].

W Trójmieście najwyższy poziom infekcji (3,1%) notowano na stanowiskach zlokalizowanych w obszarze Gdańska, podczas gdy w Sopocie i Gdyni wynosił on odpowiednio 2,6% i 1,5%. Wyniki te wskazują, że mieszkańcy terenów przyleśnych oraz osoby odwiedzające lasy w celach rekreacyjnych są potencjalnie narażeni na inwazję *B. microti* na skutek ukłucia przez zainfekowane kleszcze.

Niewiele jeszcze wiadomo o występowaniu naturalnych zarażeń *B. microti* w populacjach *I. ricinus* na naszym kontynencie, a piśmiennictwo na ten temat jest skąpe. Do niedawna uważano, że w przenoszeniu tego pasożyta najistotniejsze znaczenie ma *I. trianguliceps*, gatunek bytujący w gniazdach gryzoni [73, 74]. Ponieważ kleszcz ten jedynie sporadycznie atakuje ludzi, wpływałoby to na znikomą liczbę zachorowań wywołanych inwazją tego pierwotniaka. Jednak niedawne badania laboratoryjne wykazały, że również *I. ricinus* jest jego kompetentnym wektorem [30]. Dotychczas w Europie stwierdzono występowanie *B. microti* u 7,5% przebadanych kleszczy tego gatunku w Słowenii [18] i u ok. 4%, a w Szwajcarii [24]. W naszym kraju, na Pojezierzu Mazurskim odnotowano zarażenie 0,6% odłowionych *I. ricinus* [81], podczas gdy na Pomorzu Zachodnim było ono wielokrotnie wyższe, bo sięgające do 13,3% [86]. Ponadto zakażone kleszcze odnotowano w różnych kompleksach leśnych na terenie woj. pomorskiego (0,2%), kujawsko-pomorskiego (5,5%) oraz podlaskiego (7,9%) (Stańczak i wsp. dane jeszcze niepubl.). Przytoczone powyżej wyniki prac polskich autorów świadczą, że *B. microti* rozprzestrzeniona jest w populacjach *I. ricinus* na całym obszarze północno-zachodniej, północnej i północno-wschodniej Polski, z przewagą zakażeń wśród form dorosłych.

Dotychczas w Polsce nie wykryto zarażenia *B. microti* u ludzi. Być może przyczyną takiej sytuacji jest np. fakt, że pierwotniaki tego gatunku powszechnie pasożytujące u gryzoni z rodzaju *Microtus* w północno-wschodniej Polsce, nie są szczepem zoonotycznym [81]. Z drugiej jednak strony, wykrycie przeciwciał przeciw *B. microti* u 1,8 – 5,4% ludzi eksponowanych na kleszcze w pewnych regionach Niemiec [45, 96], u 1,5% w Szwajcarii [24] i 1,4% w północno-wschodniej Polsce [100], potwierdza wysuwane sugestie, że w Europie do kontaktów ludzi z tym pierwotniakiem dochodzi częściej niż dotychczas sądzono.

5.4. Riketsje z grupy gorączek plamistych (SFG) w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*

W Polsce, **pierwsze doniesienia** o występowaniu w kleszczach Ixodidae riketsji SFG, nie należących do gatunku *R. slovaca*, autorka zaprezentowała w 2004 r. na XX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego w Warszawie [89, 93].

Bardziej szczegółowe badania, będące przedmiotem **pracy P7**, kontynuowano na materiale wyizolowanym z *I. ricinus* (n=560) odłowionych w lasach woj. pomorskiego. Amplifikacja fragmentu genu *gltA*, kodującego syntazę cytrynianową, wykazała obecność DNA *Rickettsia* sp. u 2,9% ogółu kleszczy, przy czym poziom infekcji u samic i samców (10,5% i 11,8%) był znacznie wyższy niż u nimf (1,6%). Na podstawie analizy sekwencji uzyskanego produktu PCR (GenBank acc. no. DQ 672603) stwierdzono, że wykazywała ona 99% homologię do zgłoszonych w banku genów sekwencji *R. helvetica* (GenBank acc. no. AJ427878 i U59723). Świadczyłoby to o tym, że riketsje SFG wykryte w rodzimych *I. ricinus* należą do tego właśnie gatunku. W chwili oddawania pracy do druku było to pierwsze doniesienie o występowaniu *R. helvetica* w Polsce. Jednocześnie jest to ważna informacja dotycząca zasięgu występowania tego gatunku w Europie. Dotychczas był on notowany m.in. w Szwajcarii [10], Szwecji [59], Słowenii [70], Bułgarii [12] i Hiszpanii [23], a odsetek zakażonych kleszczy sięgał od ułamków do ponad 40%. Jak już wspomniano, *R. helvetica* może być przyczyną riketsjozy u ludzi.

Założonym celem badań prezentowanych w **pracy P8** była detekcja *R. slovaca* w kleszczach z gatunku *D. reticulatus*. Riketsja ta jest etiologicznym czynnikiem TIBOLA i potencjalnie może zagrażać zdrowiu ludzi w naszym kraju. Wprawdzie za głównego jej przenosi-ciela w Europie uznaje się *D. marginatus*, gatunek zasadniczo w Polsce nie występujący, ale doniesienia z terenu Węgier [76], Rosji i Kazachstanu [88] wskazywały, że i *D. reticulatus* odgrywa rolę w krążeniu *R. slovaca* w naturze. Badaniami techniką PCR objęto ok. 280 dorosłych form kleszczy tego gatunku, odłowionych na terenie woj. podlaskiego, stosując startery specyficzne do fragmentu genu *gltA* riketsji. Pozytywne wyniki uzyskano w przypadku 40,7% osobników. Odsetek zakażonych samic (41,7%) był nieznacznie wyższy w porównaniu do samców (36,4%), a poziom zainfekowania *D. reticulatus* na poszczególnych z pięciu stanowisk badawczych wahał się od 20% do 55%.

Dalsze badania z zastosowaniem starterów amplifikujących fragment genu *ompA* i analiza otrzymanych sekwencji wykazały, że *Rickettsia* sp. występująca w badanych *D. reticulatus* nie należała do gatunku *R. slovaca*, lecz była w 98,8% zbliżona genowo do szczepu RpA4, stwierdzonego po raz pierwszy u kleszczy tego gatunku w Rosji i należącego do genogrupy *R. massiliae* [78]. **Dotychczas w Polsce nie było żadnych doniesień o występowaniu riketsji SFG, w tym z tej genogrupy, w populacjach *D. reticulatus*.** Obecnie prowadzone są badania nad dokładnym ustaleniem przynależności taksonomicznej wykrytych riketsji, a uzyskane sekwencje fragmentów genów *gltA* i *ompA* zgłoszono do banku genów (GenBank DQ010406 i 010407). Ciekawym wydaje się zaobserwowany wysoki odsetek zainfekowanych *D. reticulatus*. W Niemczech szczep RpA4, który wykryto tam niedawno, notowano u 19 – 33% samców oraz samic tego gatunku [16]. Na podstawie powyższych danych można stwierdzić, że *Rickettsia* sp. szczep RpA4, jest w Europie szeroko rozprzestrzeniony. Jego patogeniczność względem człowieka nie została jeszcze poznana, ale wydaje się, że powinien on zostać dopisany do listy patogenów transmitowanych przez kleszcze jako potencjalnie zagrażający zdrowiu ludzi w Polsce.

5.5. Koinfekcje występujące w kleszczach *Ixodes ricinus*

Ważną informacją, wynikającą z **prac P1-P6** jest współwystępowanie omawianych powyżej gatunków mikroorganizmów nie tylko w obrębie populacji *I. ricinus* z różnych terenów kraju, ale przede wszystkim w organizmie pojedynczego kleszcza. Częstość (26,8%) u form dorosłych notowano infekcje mieszane dwoma, tj. *B. burgdorferi* s.s. i *B. afzelii*; *B. burgdorferi* s.s. i *B. garinii*; *B. afzelii* i *B. garinii*, a nawet trzema gatunkami krętków z obrębu *B. burgdorferi* s.l. (**praca P3**). Wykazano również możliwość wystąpienia u *I. ricinus* koinfekcji *A. phagocytophilum* i *B. burgdorferi* s.l. (8,3 – 16,7%), *A. phagocytophilum* i *B. microti* (2,0%), a także *B. microti* i *B. burgdorferi* s.l. (0,3%) (**prace P4 i P6**).

Wyniki te są zgodne z doniesieniami innych autorów europejskich i wskazują, że zjawisko koinfekcji zarówno różnymi gatunkami krętków z obrębu *B. burgdorferi* s.l. [12, 13, 43, 58], jak i odmiennymi gatunkami patogenów [12, 17, 41, 52, 86] jest u *I. ricinus* zjawiskiem powszechnym.

Stwierdzone koinfekcje mogą być następstwem:

- a) poziomej transmisji patogenów - pomiędzy kleszczami a ich żywicielami - wewnątrz naturalnego ogniska choroby,
- b) pokarmowych preferencji *I. ricinus*, który jest kleszczem trójżywicielowym,
- c) pionowej transmisji mikroorganizmów w obrębie populacji kleszczy z jednego stadium rozwojowego na kolejne (transmisja transstadialna), włączając w to przekaz transowarialny, w wyniku którego larwy już od początku mogą być zainfekowane jednym lub kilkoma gatunkami riketsji, bakterii i/lub pierwotniaków.

Możliwość występowania w kleszczu dwu lub więcej patogenów sprawia, że u człowieka, na skutek pojedynczego ukłucia kleszcza, również może dojść do wystąpienia infekcji/inwazji mieszanych, których przebieg jest wówczas długotrwały i znacznie cięższy.

6. PODSUMOWANIE

W toku wieloletnich badań, będących m.in. przedmiotem niniejszej rozprawy habilitacyjnej, prowadzonych konsekwentnie od początku lat 90. XX w., **stwierdzono po raz pierwszy** występowanie w Polsce nowo poznanych bakterii tj. krętków z obrębu *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* i *R. helvetica*, będących etiologicznymi czynnikami odkleszczowych tzw. „rozwijających się chorób infekcyjnych i inwazyjnych” (EID - „*emerging infectious diseases*”): boreliozy z Lyme, ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej oraz nienazwanej jeszcze ludzkiej riketsjozy, jak również potencjalnie chorobotwórczej *Rickettsia* sp. RpA4 z genogrupy *R. massiliae*. **Potwierdzono jednocześnie**, że przenosicielami ww. patogenicznych gatunków, a także potencjalnie chorobotwórczych dla ludzi pierwotniaków *B. microti*, są kleszcze pospolite z gatunku *I. ricinus*, w populacjach których są one rozprzestrzenione na terenie całego kraju. Natomiast *Rickettsia* sp. RpA4, z genogrupy *R. massiliae*, wektorowana jest przez *D. reticulatus*. Ekstensywność zakażenia/zarażenia kleszczy, w zależności od terenu badań i gatunku patogenu, może sięgać od kilku do kilkudziesięciu procent, będąc przy tym zazwyczaj wyższa u form dorosłych niż u postaci młodocianych. Wykazano ponadto, że **naturalne ogniska EID występują często w bliskim sąsiedztwie człowieka**, co skutkuje zwiększeniem częstotliwości wzajemnych kontaktów kleszczy i ludzi, i tym samym możliwości transmisji chorobotwórczych mikroorganizmów do organizmu człowieka. Często przy tym obserwowane **jednoczesne występowanie w pojedynczych kleszczach dwu lub więcej gatunków patogenów** może być przyczyną wystąpienia koinfekcji i/lub koinwazji u ludzi. Należy przy tym pamiętać, że w wielu przypadkach, ze względu na drobne rozmiary pasożytujących larw i nimf, ukłucia tych form rozwojowych kleszczy mogą pozostać niezauważone.

Bardzo istotnym sygnałem ostrzegawczym dla lekarzy jest wykrycie w rodzimych populacjach kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* riketsji z grupy SF. Zakażenie *R. helvetica*, nie rozpoznane lub źle zdiagnozowane i nie leczone, może skutkować nawet śmiercią pacjenta. Do potencjalnie patogenicznych należy zaliczyć również szczep RpA4, ze znaczną częstotliwością notowany w populacjach *D. reticulatus*. Choć występowania tego gatunku kleszcza jest ograniczone przede wszystkim do obszarów Polski położonych na wschód od linii Wisły i Sanu, i rzadko atakuje on ludzi, nie można lekceważyć jego roli epidemiologicznej w utrzymaniu naturalnych ognisk chorób transmisyjnych w przyrodzie i przenoszeniu tych chorób na ludzi.

Wyniki badań, prowadzonych zgodnie z tendencjami światowymi dotyczącymi EID przenoszonych przez kleszcze, stanowią istotny wkład w poznanie epidemiologii tych chorób w naszym kraju, a tym samym Europie. Są również cenną wskazówką dla klinicyстів i mogą być pomocne w opracowaniu strategii profilaktycznych zmierzających do ograniczenia ryzyka wystąpienia odkleszczowych zoonoz u ludzi.

7. WNIOSKI

1. Na terenie Polski wektorem *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum*, *R. helvetica* i *B. microti*, będących etiologicznymi czynnikami EID zagrażających zdrowiu ludzi, tj. boreliozy z Lyme, ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej, nienazwanej jeszcze ludzkiej riketsjozy oraz babeszjozy, jest kleszcz pospolity *I. ricinus*.
2. Obecność ww. patogenów w populacjach *I. ricinus* na badanych terenach północnej, północno-wschodniej, centralnej i południowej Polski świadczy o występowaniu tam licznych naturalnych ognisk chorób przez nie wywoływanych.
3. Obserwowana na niektórych terenach wysoka ekstensywność zakażenia *I. ricinus* krętkami *B. burgdorferi* i riketsjami *A. phagocytophilum*, sięgająca nawet do kilkadziesiąt procent, sprawia, że prawdopodobieństwo wystąpienia infekcji u ludzi w następstwie ukłucia kleszcza jest tam znaczne, tym bardziej, że *I. ricinus* chętnie atakuje człowieka we wszystkich swoich aktywnych stadiach rozwojowych.
4. Kleszcz łąkowy *D. reticulatus* jest na terenie Polski przносителеm potencjalnie chorobotwórczego gatunku *Rickettsia* sp. RpA4, należącego do genogrupy *R. massiliae*, co sugeruje, że należy zwrócić większą uwagę na rolę tego gatunku kleszcza w epidemiologii EID.
5. Wykryte w kleszczach riketsje SFG mogą być przyczyną występowania u ludzi gorączek, uznawanych obecnie za gorączki o nieznannej etiologii.
6. Możliwość zakażenia kleszcza dwoma lub trzema gatunkami patogenów jednocześnie może być przyczyną wystąpienia koinfekcji i/lub koinwazji również u ludzi. Sugeruje to potrzebę stosowania u pacjentów zgłaszających pokłucie przez kleszcze, lub zdradzających objawy jednej z chorób odkleszczowych, diagnostyki różnicującej umożliwiającej rozpoznanie infekcji i/lub inwazji o różnej etiologii.
7. Wiedza o rozprzestrzenieniu *I. ricinus* w połączeniu z oszacowaniem ekstensywności zakażenia/zarażenia populacji tych kleszczy różnymi patogenami zagrażającymi zdrowiu człowieka może być przydatna przy zapobieganiu transmisji EID i diagnozowaniu tych chorób.
8. Wyniki badań wskazują na konieczność zintensyfikowania działań mających na celu informowanie ludzi o możliwościach zabezpieczenia się przed atakami kleszczy, o konsekwencjach żerowania tych ektopasożytów na człowieku oraz prawidłowych sposobach ich usuwania ze skóry w celu zapobieżenia ewentualnej infekcji/inwazji, a także o prawidłowym zabezpieczeniu usuniętego kleszcza do badań laboratoryjnych oraz o konieczności zgłaszania się pokłutych osób do lekarza.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Afanasieva MV, Vorobyeva NN, Korenberg EI, Frizen VI. Human granulocytic anaplasmosis: risk in the CisUral region, Russia. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296S1: 167.
2. Agüero-Rosenfeld ME, Donnarumma L, Zentmaier L, Jacob J, Frey M, Noto R, Carbonaro CA, Wormser GP. Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2612.
3. Bajer A, Bednarska A, Pawełczyk A, Konopka E, Karbowski G, Siński E. Blood parasites in a wild community of Mazury Lake District, Poland. *Special number 18th Congress of the Polish Parasitological Society, Abstracts. Wiad Parazytol*, 1998, 44: 426.
4. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *J Am Med Assoc*, 1994, 272: 212.
5. Bakken JS, Krueth J, Wilson-Nordskog C, Tilden RL, Asanovich K, Dumler JS. Clinical and laboratory characteristics of human granulocytic ehrlichiosis. *J Am Med Assoc*, 1996, 275: 199.
6. Barbour AG, Schrupf ME. Polymorphism of major surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Zbl Bakt Hyg*, 1986, A 263: 83.
7. Bjöersdorff A, Wittesjö B, Berglund J, Massung RF, Eliasson I. Human granulocytic ehrlichiosis as a common cause of tick-associated fever in southeast Sweden: report from a prospective clinical study. *Scand J Infect Dis*, 2002, 34: 187.
8. Bukowska K, Kosik-Bogacka D, Kuźna-Grygiel W. The occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the populations of *Ixodes ricinus* in forest areas of Szczecin in 2000-2001. *Ann Agric Environ Med*, 2003, 10: 5.
9. Burgdorfer G, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davies JP. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science*, 1982, 216: 1317.
10. Burgdorfer W, Aeschlimann A, Péter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus* of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop*, 1979, 36: 357.
11. Chen S-M, Dumler JS, Bakken J, Walker DH. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* sp. as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol*, 1994, 32: 589.
12. Christowa I, van de Pol J, Yazar S, Velo E, Schouls L. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species, and spotted fever group rickettsiae in ticks from southeastern Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22: 535.
13. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Poldini L, Frusteri L, Van de Pol I, Verbreek-de Kruif N, Rijpkema S, Maroli M. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998, 17: 90.

14. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Heldtander M, Engvall EO. Detection of HGE agent-like *Ehrlichia* in *Ixodes ricinus* ticks in northern Italy by PCR. *Wien Klin Wochenschr*, 1998, 110: 898.
15. Dąbrowski J, Schönberg A, Wegner Z, **Stańczak J**, Kruminis-Łozowska W. The first isolation of *Borrelia burgdorferi* from *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) ticks in Poland. *Bull Inst Mar Trop Med Gdynia*, 1993/1994, 44/45: 61.
16. Dautel H, Dippel C, Oehme R, Hartelt K, Schettler E. Evidence of increased geographical distribution of *Dermacentor reticulatus* in Germany and detection of *Rickettsia* sp. RpA4. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296 (Suppl.40): 149.
17. Derdáková M, Halánová M, Stanko M, Štefančíková A, Čisláková A, Pet'ko B. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*, 2003, 10: 269.
18. Duh D, Petrovec M, Avsic-Zupanc T. Diversity of *Babesia* infecting European sheep ticks (*Ixodes ricinus*). *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 3395.
19. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, SC Ray, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia*, and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*; descriptions of five new species combination and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 2145.
20. Dumler SJ, Choi K-S, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*, 2005, 12: 1828.
21. Dziubek Z. Riketsjozy – *Rickettsioses*. W: Choroby zakaźne i pasożytnicze. Z. Dziubek (Red.), Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 1996: 169-173.
22. Fingerle V, Begmeister H, Liegl G, Vanek E, Wilske B. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks in southern Germany. *J Spirochetal and Tick-borne Dis*, 1994, 1: 41.
23. Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A, Álamo Sanz R. Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. *Eur J Microbiol Infect Dis*, 2004, 23: 648.
24. Foppa IM, Krause PJ, Spielman A, Goethert H, Gern L, Brandt B, Telford III SR: Etiologic and serologic evidence of zoonotic transmission of *Babesia microti*, eastern Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8: 722.
25. Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis*, 2000, 6: 389.
26. Fournier PE, Allombert C, Supputamongkol Y, Caruso G, Broqui P, Raoult D. Aneuruptive fever associated with antibodies to *Rickettsia helvetica* in Europe and Thailand. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 816.
27. Garcia JC, Núñez MJ, Castro B, Fraile FJ, López MA, Mella MC, Blanco A, Sieira C, Loureiro E, Portillo A, Oteo JA. Human anaplasmosis. The first Spanish case confirmed by PCR. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1078: 545.

28. Gorenflot A, Moubiri K, Percigout E, Carcy B. Human babesiosis. *Am Trop Med Hyg*, 1998, 4: 489.
29. Grandström M. Human 'tick-borne diseases' in Europe. *Infect Dis Rev*, 1999, 2: 88.
30. Gray J, von Stedingk LV, Gürtelschmidt M, Grantström M. Transmission studies of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks and gerbils. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 1259.
31. Gustafson R, Jaenson TG, Gardulf A, Mejlom H, Svenungsson B. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infections in *Ixodes ricinus* in Sweden. *Scand J Infect Dis*, 1995, 27: 597.
32. Grzeszczuk A, **Stańczak J**. High prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in ticks removed from human skin in north-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*, 2006, 13: 45.
33. Grzeszczuk A, **Stańczak J**, Kubica-Biernat B. Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieża), north-eastern Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002, 21: 6.
34. Grzeszczuk A, **Stańczak J**, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W, Racewicz M. First seroepidemiological evidence of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in Poland. Preliminary results. *Abstracts of the VIII European Multicolloquium of Parasitology. Acta Parasitol*, 2000, 45: 219.
35. Grzeszczuk A, Ziarko S, Kovalchuk O, **Stańczak J**. Etiology of tick-borne febrile illnesses in adult residents of north-eastern Poland: report from a prospective clinical study. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296S1: 242.
36. Halasz CLG, Niedt GW, Kurtz CP, Scorpio DG, Bakken JS, Dumler JS. A case of Sweet syndrome associated with human granulocytic anaplasmosis. *Arch Dermatol*, 2005, 141: 887.
37. Hardalo C, Quagliariello V, Dumler JS. Human granulocytic ehrlichiosis in Connecticut: report of a fatal case. *Clin Infect Dis*, 1995, 21: 910.
38. Herwaldt BL, de Bruyn G, Pieniazek NJ, Homer M, Lofy KH, Slemenda SB, Fritsche TR, Persing DH, Limaye AJ. *Babesia divergens*-like infection, Washington State. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10: 622.
39. Herwaldt BL, Cacio S, Gherlinzoni F, Aspöck H, Slemenda S, Piccaluga PP, Martinelli G, Edelhofer R, Hollenstein U, Poletti G, Pampiglione S, Löschenberger K, Tura S, Pieniazek NJ. Molecular characterization of a non-*Babesia divergens* organism causing zoonotic babesiosis in Europe. *Emerg Infect Dis*, 2003, 8: 942.
40. Herwaldt BL, Persing DH, Précigout EA, Goff WL, Mathiesen DA, Taylor PW, Eberhardt ML, Gorenflot AF. A fatal case of babesiosis in Missouri: identification of another piroplasm that infects humans. *Ann Intern Med*, 1996, 124: 643.
41. Hildebrandt A, Schmidt KH, Wilske B, Dorn W, Sraube E, Fingerle V. Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2003, 22: 364.
42. Homer MJ, Aguilar-Delfin I, Telford III SR, Krause P, Persing DH. Babesiosis. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13: 451.

43. Hovius KE, Beijer B, Rijpkema SGT, Bleumink-Pluym NMC, Houwers DJ. Identification of four *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in *Ixodes ricinus* ticks collected from Dutch dogs. *Vet Quart*, 1998, 20: 143.
44. Hubálek Z, Halouzka J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*, 1998, 84: 167.
45. Hunfeld KP, Lambert A, Kampen H, Albert S, Epe C, Brade V, Tenter AM. Seroprevalence of *Babesia* infections in humans exposed to ticks in midwestern Germany. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 2431.
46. Januszkiewicz J, Kieda A. Przypadki boreliozy z Lyme na Pomorzu Zachodnim. *Przeg Epid*, 1987, 41: 324.
47. Johnson RC, Schmidt GP, Hyde FW, Steigerwald AG, Brenner DJ. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol*, 1984, 34: 496.
48. Junttila J, Peltomaa M, Soini H, Marijamäki M, Viljanen MK. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1361.
49. Kahl O, Janetzki C, Gray JS, Stein J, Bauch R. Tick infection rates with *Borrelia: Ixodes ricinus* versus *Haemaphysalis concinna* and *Dermacentor reticulatus* in two locations in eastern Germany. *Med Vet Entomol*, 1992, 6: 363.
50. Karbowski G, Siński E. The findings of *Babesia microti* in bank vole *Clethrionomys glareolus* in the district of Mazury Lakes (Poland). *Acta Parasitol*, 1996, 41: 50.
51. Karbowski G, Stanko M, Rychlik L, Nowakowski W, Siuda K. The new data about zoonotic reservoir of *Babesia microti* in small mammals in Poland. *Acta Parasitol*, 1999, 44: 142.
52. Leutenegger CM, Puserla N, Mislin CN, Weber R, Lutz H. Molecular evidence of coinfection of ticks with *Borrelia burgdorferi sensu lato* and the human granulocytic agent in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 3390.
53. Loewenich, von, FD, Baumgarten BU, Schröppel K, Geißdörfer W, Röllinghoff M, Bogdan C. High diversity of *ankA* sequences of *Anaplasma phagocytophilum* among *Ixodes ricinus* ticks in Germany. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 5033.
54. Massung RF, Priestley RA, Miller NJ, Mather TN, Levin ML. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J Infect Dis*, 2003, 188: 1757.
55. Masuzawa T, Takad N, Kudeken M, Fukui T, Yano Y, Ishirigo F, Kawamura Y, Imai Y, Ezaki T. *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 1817.
56. Michalik J, Hofman T, Buczek A, Sikora B. *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznań. *J Med Entomol*, 2003, 40: 690.
57. Michalik J, **Stańczak J**, Skoracki M, Sikora B, Racewicz M, Szubert A, Badek A: PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in wild cervids from the forest areas in the Wielkopolska province (west-central Poland). *VIII Międzynarodowe Sympozjum Stawonogi Pasożytnicze, Alergogenne i Jadowite – Znaczenie Medyczne i Sanitarne*. Kaziemierz Dolny, 16-19 maja 2006: 77.

58. Misonne MC, Van Impe G, Hoet PP. Genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in Belgium. *J Clin Microbiol*, 1998, 36: 3352.
59. Nilsson K, Lindquist O, Liu AJ, Jaenson TGT, Friman G, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 400.
60. Nilsson K, Lindquist O, Pålsson C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 1999, 354, 1169.
61. Nilsson K, Pålsson C, Lukinius A, Eriksson L, Nilsson L, Lindquist O. Presence of *Rickettsia helvetica* in granulomatous tissue from patients with sarcoidosis. *J Infect Dis*, 2002, 185: 1128.
62. Nohlmans MKE, de Boer R, van den Bogaard AE, Blaauw AAM, van Boven CPA. Voorkomen van *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk*, 1990, 134: 1300.
63. Nowosad A, Jenek J, Głazaczow A, Szkaradkiewicz A. Occurrence of the spirochetes *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* (L.) from selected municipal woods of the city of Poznań. *Wiad Parazytol*, 1999, 45: 533.
64. Oteo JA, Gil H, Barral M, Perez, Jimenez S, Blanco JR, Martinez de Artola V, Gracia-Perez A, Juste RA. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. *Epidemiol Infect*, 2001, 127: 353.
65. Pancholi P, Kolbert CP, Mitchel PD, Reed KD, Dumler JS, Bakken JS, Telford SR III, Persing D. *Ixodes dammini* as a potential vector of human granulocytic ehrlichiosis. *J Infect Dis*, 1995, 172: 1007.
66. Persing DH. PCR detection of *Babesia microti*. W: Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and applications. Persing DH, Smith TF, Tenover PC, White TJ (Eds), Washington: American Society for Microbiology, 1993: 475.
67. Persing DH, Herwaldt BL, Glaser C, Lane RS, Thomford JW, Mathiesen BA, Peter J, Krause MD, Douglas FP, Conrad PA. Infection with a *Babesia*-like organism in northern California. *N Engl J Med*, 1995, 332: 298.
68. Pet'ko B, Siuda K, Stanko M, Tresová G, Karbowski G, Fričová J. *Borrelia burgdorferi sensu lato* in southern Poland. *Ann Agric Environ Med*, 1997, 4: 263.
69. Picken RN. Polymerase chain reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme disease and North American relapsing fever. *J Clin Microbiol*, 1992, 30: 99.
70. Prosenc K, Petrowec M, Trilar T, Duh D, Avšič-Županc T. Detection of rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Ann NY Acad Sci*, 2003, 990: 201.
71. Pusterla N, Leutenegger CM, Huder JB, Weber R, Braun U, Lutz H. Evidence of human granulocytic agent in *Ixodes ricinus* ticks in Switzerland. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1332.
72. Quick RE, Herwaldt BL, Thomford JW, Garrett ME, Eberhard ML, Wilson M, Spach DH, Dickerson JW, Telford SR, Steingart KR, Pollock R, Persing DH, Kobayashi JM, Juranek DD, Conrad PA. Babesiosis in Washington State: a new species of *Babesia*? *Ann Intern Med*, 1993, 119: 284.
73. Randolph SE. Density-dependent acquired resistance to ticks in natural hosts, independent of concurrent infection with *Babesia microti*. *Parasitol*, 1994, 108: 413.

74. Randolph SE. Quantifying parameters in the transmission of *Babesia microti* by the tick *Ixodes trianguliceps* among voles (*Clethrionomys glareolus*). *Parasitol*, 1995, 110: 287.
75. Regenery RL, Spruill CL, Plikyatis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of interspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*, 1991, 173: 1576.
76. Řeháček J, Nosek J, Úrvölgyi J, Sztankay M. Rickettsiae of the spotted fever group in Hungary. *Folia Parasitol (Praha)*, 1979, 26: 367.
77. Rijpkema S, Golubič D, Molkenboer M, Verbeek-De Kruif N, Schellekens J. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in *Ixodes ricinus* ticks collected in Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Exp Appl Acarol*, 1996, 20: 23.
78. Rydkina E, Roux V, Rudakov N, Gafarova M, Tarasevich I, Raoult D. New rickettsiae in ticks collected in territories of the former Soviet Union. *Emerg Infect Dis*, 1999, 5: 811.
79. Ryffel K, Péter O, Rutti B, Suard A, Dayer E. Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestation and presence of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 4086.
80. Schönberg A, Loser Ch. W: Potsdamer Symposien. Durch Zecken übertragbare Erkrankungen FSME und Lyme-Borreliose. J. Süß, Weller Verlag, 1994: 84.
81. Siński E, Bajer A, Welc R, Pawełczyk A, Ogrzewalska M, Behnke JM. *Babesia microti*: prevalence in wild rodents and *Ixodes ricinus* ticks from the Mazury Lake District of north-eastern Poland. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296S1: 137.
82. Siński E, Rijpkema SGT. Występowanie zakażeń *Borrelia burgdorferi* s.l. u kleszczy *I. ricinus* w miejskim i podmiejskim biotopie leśnym. *Przeg Epid*, 1997, 51: 431.
83. Siuda K. Kleszcze Polski (Acari: Ixodida). Część II. Systematyka i rozmieszczenie. Warszawa, Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, 1993, 375 str.
84. Siuda K. Kleszcze (Ixodida). W: Fauna Polski – Charakterystyka i wykaz gatunków. W. Bogdanowicz, E. Chudzicka, I. Pilipiuk, E. Skibińska (Red.), Warszawa, Muzeum i Instytut Zoologii PAN (w druku).
85. Skotarczak B, Rymaszewska A. Prevalence of etiological agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in ticks from north-western Poland. *Wiad Parazytol*, 2001, 47: 95.
86. Skotarczak B, Rymaszewska A, Wodecka B, Sawczuk M. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi sensu lato*, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. *J Parasitol*, 2003, 89: 194.
87. Škrabalo Z, Deanovič Z. Piroplasmiasis in man. Report on a case. *Docum Med Geogr Trop (Amsterdam)*, 1957, 9: 11.
88. Sphynov S, Parola P, Rudakov N, Samoilenko I, Tankibaev M, Tarasevich I, Raoult D. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* ticks from Russia and central Kazakhstan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2001, 20: 903.
89. **Stańczak J.** The first report of the occurrence of a spotted fever group rickettsia from *Ixodes ricinus* in Poland. *Wiad Parazytol*, 2004, 50 (Suppl.): 112.

90. **Stańczak J.** Kubica-Biernat B. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks from different areas of Poland. *Zent.bl Bakteriolog*, 1999, 286: 704.
91. **Stańczak J.** Picken RN, Wegner Z, Kubica-Biernat B, Picken MM. Comparison of immunofluorescence assay and culture isolation for the detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from northern Poland. *VII Int. Congress on Lyme borreliosis, June 16-21, 1996, San Francisco, California. Abstracts*: 102.
92. **Stańczak J.** Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W. Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in ticks in Poland. *Abstracts of the VIII European Multicolloquium of Parasitology. Acta Parasitol*, 2000, 45: 217.
93. **Stańczak J.** Szostakowska B, Kruminis-Łozowska W, Cedzyński M. Detection of the spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* in Poland. *Wiad Parazytol*, 2004, 50 (Suppl.): 115.
94. Stünzner D, Hubálek Z, Halouzka J, Postic D, Pierer K, Marth E. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks from Styria (Austria) and species identification by PCR-RFLP analysis. *Zbl Bakteriolog*, 1998, 288: 471.
95. Szenborn L, **Stańczak J.** Talaska T, Krolicka M. Human anaplasmosis in south Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, USA, December 16-19 2005. Abstracts*: 406.
96. Talaska T, Bätzing-Feigenbaum J, Schein E. *Babesia microti* – an emerging pathogen in Berlin and Brandenburg (Germany)? *Int J Med Microbiol*, 2002, 291 (Supl. 33): 230.
97. Tomaszewicz K, Modrzewska R, Buczek A, **Stańczak J.** Maciukajć J. The risk of exposure to *Anaplasma phagocytophilum* infection in mid-eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*, 2004, 11: 261.
98. 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.
99. Walder G, Fuchs D, Sarcletti M, Berek K, Falkensammer B, Huber K, Petrovec M, Dierich MP, Würzner R. Human granulocytic anaplasmosis in Austria: epidemiological, clinical and laboratory findings in five consecutive patients from Tyrol, Austria. *Int J Med Microbiol*, 2006, 296 S1: 297.
100. Walory J, Bukowska B, Grzesiowski P, Czarnecka I, Paluchowska E, Zabielski S, Grzywocz A. Prevalence of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* in adults in north-eastern Poland. *Pol Merkuriusz Lek*, 2005, 19: 754.
101. Wang G, van Dam AP, Le Fléche A, Postic D, Péter O, Baranton G, de Boer R, Spanjaard L, Dankert J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12: 633.
102. Wegner Z, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W, **Stańczak J.** Występowanie kleszczy *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na zalesionych obszarach Trójmiasta i ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi*. *Probl Hig*, 1997a, 54: 11.
103. Wegner Z, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W, **Stańczak J.** Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na terenach północno-wschodniej Polski. *Probl Hig*, 1997b, 54: 127.

104. Wegner Z, **Stańczak J**, Racewicz M, Kubica-Biernat B, Kruminis-Łozowska W: The etiological agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, in ticks (Acari, Ixodidae) from eastern Poland. *Zbl bakteriol*, 1997c, 286: 93.
105. Wittenbrink MM, Reuter C, Baumaister K, Schütze H, Krauss H. Identification of group VS116 strains among *Borrelia burgdorferi* sensu lato grown from the hard ticks, *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) by PCR-coupled restriction fragment length polymorphism analysis. *Zbl bakteriol*, 1998, 288: 45.
106. Wodecka B. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in *Ixodes ricinus* ticks in north-western Poland. *Ann Agric Environ Med*, 2003, 10: 171.
107. Wodecka B, Skotarczak B. Genetyczna zmienność *Borrelia burgdorferi* u kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w północno-zachodniej Polsce. *Wiad Parazytol*, 2000, 46: 475.
108. Wodecka B, Skotarczak B. First isolation of *Borrelia lusitaniae* DNA from *Ixodes ricinus* ticks in Poland. *Scand J Infect Dis*, 2005, 37: 27.

9. STRESZCZENIE

Celem badań, prowadzonych latach 1993 – 2004, było: 1) wykazanie, czy w rodzimych populacjach dwóch gatunków Ixodidae – *I. ricinus* i *D. reticulatus* występują etiologiczne czynniki odkleszczowych chorób zaliczanych do EID, zagrażających zdrowiu ludzi w naszym kraju; 2) określenie jak kształtuje się prevalencja poszczególnych gatunków patogenów w populacjach kleszczy; 3) określenie terenów występowania naturalnych ognisk odkleszczowych EID na terenie kraju, a szczególnie na jego północno-wschodnich obszarach; oraz 4) określenie ryzyka wystąpienia infekcji/inwazji, w tym mieszanych, u ludzi ekspozowanych na ataki kleszczy.

Kleszcze odławiano standardową metodą „flagowania” roślinności na wytypowanych terenach leśnych północnej, północno-wschodniej, centralnej i południowej Polski. Detekcji patogenów dokonywano początkowo metodą OIP, a następnie przy zastosowaniu techniki PCR i nested PCR, z zastosowaniem odpowiednich, w tym własnych, starterów reakcji specyficznych rodzajowo i gatunkowo, z analizą sekwencji wybranych produktów amplifikacji.

Ogółem przebadano 7368 *I. ricinus* i 285 *D. reticulatus*. W wyniku stwierdzono po raz pierwszy w Polsce występowanie w populacjach kleszczy patogenicznych krętków *B. burgdorferi* s.l. oraz riketsji *A. phagocytophilum* i *R. helvetica*, będących etiologicznymi czynnikami, odpowiednio, boreliozy z Lyme, ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej oraz nienazwanej jeszcze ludzkiej riketsjozy, a w populacjach *D. reticulatus* potencjalnie patogenicznych dla człowieka *Rickettsia* sp. RpA4, z genogrupy *R. massiliae*. Potwierdzono również rolę *I. ricinus* w przenoszeniu pasożytniczych pierwotniaków *B. microti*.

W zależności od terenu badań i gatunku mikroorganizmu, odsetki zakażonych/zarażonych kleszczy były zmienne i zazwyczaj wyraźnie wyższe u dorosłych niż młodocianych form *I. ricinus*. Na najlepiej zbadanych terenach północnej i północno-wschodniej Polski, ekstensywność zakażenia tych kleszczy krętkami *B. burgdorferi* s.l. wahała się od 6,5% do 11,5%, podczas gdy na południu kraju, w okolicach Krakowa i Katowic, wynosiła odpowiednio 15,5% i 37,5%. W obrębie tego kompleksowego gatunku krętków ogółem obserwowano nieznaczną przewagę infekcji *B. afzelii* (47,1%) nad *B. burgdorferi* s.s. (39,2%) oraz *B. garinii* (33,3%), choć odsetki kleszczy zakażonych poszczególnymi genogatunkami były zmienne w zależności od terenu objętego badaniami. Riketsje *A. phagocytophilum* ogółem wykryto u 8,7% - 19,2% *I. ricinus*, a *R. helvetica* i *B. microti* odpowiednio u 2,9% i 2,4% przebadanych kleszczy. U *D. reticulatus* zaobserwowano wysoką ekstensywność zarażenia *Rickettsia* sp. RpA4 (40,7%).

Wyniki badań potwierdziły, że na badanych obszarach istnieją liczne naturalne ogniska chorób odkleszczowych zaliczanych do EID, a ich występowanie związane jest z rozmieszczeniem populacji *I. ricinus* i *D. reticulatus* w Polsce. Prawdopodobieństwo zakażenia/zarażenia ludzi w wyniku ataku zainfekowanego kleszcza na niektórych terenach może być wysokie, zwłaszcza w przypadku LB i HGA. Często obserwowane, ważne z epidemiologicznego punktu widzenia, zjawisko koinfekcji kleszczy różnymi gatunkami patogenów może być przyczyną wystąpienia infekcji i/lub inwazji mieszanych także u ludzi. Sugeruje to potrzebę stosowania diagnostyki różnicującej u wszystkich pacjentów zgłaszających się na badania po pokłuciu przez kleszcze, lub zdradzających objawy jednej z chorób odkleszczowych. W celach profilaktycznych powinno się podjąć kroki zmierzające do informowania ludzi o możliwościach zabezpieczenia się przed atakami kleszczy, o konsekwencjach żerowania tych ektopasożytów oraz prawidłowych sposobach ich usuwania i przechowywania do badań laboratoryjnych oraz o konieczności zgłaszania się pokłutych osób do lekarza.

10. SUMMARY

The presence of ticks (Ixodidae) may lead to establish foci of different zoonoses that may affect human health, therefore the aims of studies conducted in 1993 – 2004 were as follows: a) to make a survey of the occurrence of the etiologic agents of the “*emerging infectious diseases*” (EID) in *I. ricinus* and *D. reticulatus* population from various parts of Poland; b) to estimate the infection level of ticks with different pathogenic micro-organisms; c) to determine the areas of the occurrence of natural foci of diseases; d) to evaluate the risk of acquiring infection, including mixed multipathogenic infections, as a result of a single tick bite.

Questing nymphs and adults of *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks were collected successively by flagging lower vegetation in the different forested areas, mainly in the northern and north-eastern parts of Poland. Ticks were investigated for the presence of pathogenic micro-organisms by the indirect immunofluorescence assay (IFA) and the polymerase chain reaction (PCR, nested PCR) using genus and species specific primers, followed by the analysis of the chosen positive products of amplification.

A total of 7368 *I. ricinus* and 285 *D. reticulatus* were examined. As a result, for the first time in Poland, the occurrence of *B. burgdorferi* s.l., *A. phagocytophilum* and *R. helvetica*, the etiologic agents of Lyme borreliosis, human granulocytic anaplasmosis and yet unnamed human rickettiosis, respectively, were detected in *I. ricinus* population, while potentially pathogenic *Rickettsia* sp. RpA4 of *R. massiliae* genogroup was found in *D. reticulatus*. Moreover, demonstration of *B. microti*-infected specimens confirmed recent findings that *I. ricinus* is involved in circulation of this protozoan in Europe.

The infection level in ticks varied from a few up to several dozens percents, depending on the pathogen and the area investigated, being usually higher in adult than in nymphal ticks. Overall, 6.5% - 37.5% of *I. ricinus* were infected with *B. burgdorferi* s.l. Among the spirochete-infected ticks, *B. afzeli* was the most prevalent (47.1%), followed by *B. burgdorferi* s.s. (39.2%) and *B. garinii* (33.3%), however geographic distribution of these genospecies in Poland seemed to be not uniform. The prevalence of *A. phagocytophilum* infection in *I. ricinus* ranged from 8.7% to 19.2% while *B. microti* and *R. helvetica* were detected in 2.9% and 2.4% ticks, respectively. Moreover, *Rickettsia* sp. RpA4 was noted in 40.7% *D. reticulatus*.

The results obtained confirm the presence of numerous natural foci of EID transmitted by ticks in Poland. A risk of acquiring infection, especially with *B. burgdorferi* s.l. and *A. phagocytophilum*, in some areas should be considered as high. The phenomenon of mixed infection seems to be frequent in *I. ricinus* and may lead to concurrent infection in humans as a consequence of a single tick bite. Thus, physicians should consider the possible co-infection with different pathogens for those who declare a tick bite and/or develop LB or flu-like symptoms. More attention should be paid to the problem and health authorities should take preventive steps, first of all by providing information and advice to people on methods of avoiding tick attacks, on recognising attached ticks and their proper removal.