

**Mgr inż. Anna Kloc**

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** „Transmisja transowarialna wybranych patogenów u kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, żerujących na zwierzętach dzikich i domowych”

**Promotor rozprawy:** dr hab. n. o zdr. Angelina Wójcik-Fatla, prof. IMW

**Promotor pomocniczy:** dr n. med. Violetta Zając

## **STRESZCZENIE**

W ostatnich latach zaobserwowano zwiększenie liczby zachorowań na choroby odkleszczowe, co może być związane ze wzrostem liczebności kleszczy oraz zwiększeniem liczby patogenów przenoszonych przez te stawonogi. Kleszcze stanowią wektor i rezerwuar szkodliwych drobnoustrojów będących czynnikami etiologicznymi chorób odkleszczowych. Do zakażenia kleszczy dochodzi na skutek żerowania na zainfekowanych zwierzętach, stanowiących rezerwuar patogennych mikroorganizmów. Część z nich może być przenoszona z zakażonej samicy na składane przez nią jaja i w dalszej kolejności na wyklute larwy. Transmisja transowarialna należy do mechanizmów sprzyjających utrzymaniu się niektórych patogenów w danej populacji kleszczy.

Główny cel badań dotyczył możliwości transmisji transowarialnej bakterii: *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* i *Rickettsia* spp. oraz endosymbiontów: *Francisella-like endosymbionts* i *Spiroplasma* spp. u kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*.

Materiał do badań stanowiła grupa 88 napitych samic kleszczy usuniętych ze skóry zwierząt domowych oraz dzikich. Wśród zebranych kleszczy zidentyfikowano 33 osobniki należące do gatunku *Ixodes ricinus* oraz 55 osobników z gatunku *Dermacentor reticulatus*. Identyfikację gatunkową samic przeprowadzono na podstawie amplifikacji fragmentu genu mitochondrialnego 16S rRNA kodującego małą podjednostkę rybosomu. Wśród 55 samic z gatunku *D. reticulatus* 49 z nich (90,9%) złożyła jaja w liczbie 16600, z czego 11280 zostało przebadane w tej formie, a z 5320 jaj wykluły się larwy. W przypadku samic z gatunku *I. ricinus* łącznie samice złożyły 1080 jaj, z czego przebadano 920 jaj i 160 wyklutych larw. Obecność fragmentów DNA wybranych mikroorganizmów – badano za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Detekcję produktów amplifikacji przeprowadzono na 2% żelach agarozowych. Uzyskane sekwencje nukleotydów zostały porównane z dostępnymi sekwencjami genów w bazie GenBank z użyciem oprogramowania BLAST.

Obecność DNA *Borrelia burgdorferi* sensu lato potwierdzono w przypadku jednej samicy *I. ricinus*. Przyjmując minimalny wskaźnik zakażenia MIR procent ten wyniósł 0,6%. Analizując transmisję transowarialną bakterii *Rickettsia* spp. można stwierdzić, że proces ten zachodzi bardziej korzystnie u kleszczy z gatunku *D. reticulatus* (MIR =3,48%), niż u *I. ricinus* (MIR =0,74%). Dodatkowo w przypadku samic *D. reticulatus* biorąc pod uwagę procent samic dodatnich jak i ujemnych które złożyły jaja dodatnie procent transmisji transowarialnej wyniósł 69,1%. Pozytywne wyniki uzyskano dla FLEs u kleszczy z gatunku *D. reticulatus*, gdzie u ponad 50% badanych samic potwierdzono transmisję transowarialną w każda puli jaj. W przypadku endosymbiontów *Spiroplasma* spp. u kleszczy z gatunku *I. ricinus* wyniki były niskie i wynosiły zaledwie dwa przypadki. U samic z gatunku *D. reticulatus*, poziom transmisji transowarialnej *Spiroplasma* spp. wynosił u samic powyżej 27,7%.

Na podstawie przeprowadzonych badań można stwierdzić, że transmisja transowarialna nie odgrywa większej roli w podtrzymaniu krążenia bakterii z rodzaju *Rickettsia* oraz krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w populacji kleszczy *Ixodes ricinus*. Tym samym ryzyko zachorowania na boreliozę czy riketsjozy na skutek pokłucia przez larwy *Ixodes ricinus* jest bardzo mało prawdopodobne. U kleszczy *Dermacentor reticulatus* prawdopodobieństwo przeniesienia bakterii z rodzaju *Rickettsia* z zakażonej samicy na składane przez nią jaja jak i utrzymywanie się patogenu w pokoleniu larw, jest wysokie. Niemniej jednak ryzyko pokłucia przez larwy tego gatunku jest mało możliwe z uwagi na fakt, że postacie młodociane *D. reticulatus* żerują na małych ssakach wewnątrz ich nor. Potwierdzono również, że obecność *Francisella*-like endosymbionts u samic kleszczy *Dermacentor reticulatus* wpływa pozytywnie zarówno na ilość składanych jaj jak i efektywniejszą transmisję transowarialną *Rickettsia* spp.

## SUMMARY

In recent years an increase has been observed in the number of cases of tick-borne diseases, which may be associated with the growing numbers of ticks and pathogens transmitted by these arthropods. Ticks constitute a vector and reservoir of hazardous microbes which are etiologic factors of tick-borne diseases. Infection of ticks occurs as a result of their feeding on infected animals which are the reservoir of microorganisms. A part of them may be transmitted from the infected female tick to the eggs which it lays, and subsequently to the hatched larvae. Transovarial transmission belongs to the mechanisms conducive to the maintenance of some pathogens in a given population of ticks.

The primary aim of the study concerned the possibility of transovarial transmission of the following bacteria: *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp., as well as endosymbionts: *Francisella*-like endosymbionts and *Spiroplasma* spp. in ticks of the species *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*.

The material for the study was a group of 88 engorged female ticks removed from the skin of domestic and wild animals. Among the collected ticks 33 were identified belonging to the species *Ixodes ricinus* and 55 ticks of the species *Dermacentor reticulatus*. Species identification of female ticks was carried out based on the amplification of the fragment of the mitochondrial 16S rRNA gene encoding the small ribosomal subunit. Among 55 female ticks of the species *D. Reticulatus* 49 (90.9%) laid eggs in the number of 16,600, of which 11,280 were examined in this form, while from 5,320 eggs hatched larvae. In the case of female ticks of the species *I. ricinus* female ticks laid a total number of 1,080 eggs, of which 920 eggs and 160 hatched larvae were examined. The presence of fragments of DNA of selected microorganisms was investigated by means of the polymerase chain reaction (PCR). Detection of amplification products was conducted on 2% agarose gel. The obtained nucleotide sequences were compared with DNA sequences available in the GenBank genetic database, using the BLAST software.

The presence of DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato was confirmed in the case of one female tick of the species *I. ricinus*. Assuming the minimum infection rate (MIR) this percentage was 0.6%. While analyzing transovarial transmission of the *Rickettsia* spp. bacteria it may be presumed that this process is more favourable in ticks of the species *D. reticulatus* (MIR =3.48%), compared to *I. ricinus* (MIR =0.74%). In addition, in *D. Reticulatus* female ticks, considering the percentage of positive, as well as negative ticks which laid positive eggs, the percentage of transovarial transmission was 69.1%. Positive results were obtained for FLEs in ticks of the species *D. reticulatus*, where transovarial transmission was confirmed in every

pool of eggs in more than 50% of the examined female ticks. Considering endosymbionts *Spiroplasma* spp. in ticks of the species *I. ricinus* the results were low, and concerned only two cases. In female ticks of the species *D. reticulatus*, the level of transovarial transmission of *Spiroplasma* spp. was over 27.7%.

Based on the results of the study it may be presumed that transovarial transmission does not play any major role in the maintenance of the circulation of bacteria of the species *Rickettsia* and the spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the population of *Ixodes ricinus* ticks. Consequently, the risk of contracting borreliosis or rickettsiosis as a result of being bitten by larvae of *Ixodes ricinus* is very poorly probable. In *Dermacentor reticulatus* ticks the probability of transmission of bacteria of the genus *Rickettsia* from the infected female to the eggs which it lays, as well as the maintenance of the pathogen in the generation of larvae is high. However, the risk of being bitten by larvae of this species is poorly possible due to the fact that the juvenile forms of *D. reticulatus* feed on small mammals inside their earth holes. It was also confirmed that the presence of *Francisella*-like endosymbionts in female ticks of the species *Dermacentor reticulatus* exerts a positive effect on both, the amount of the eggs laid and the more effective transovarial transmission of *Rickettsia* spp.