

mgr Anna Sawczyn-Domańska

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Ocena występowania bakterii z rodzaju *Borrelia*, *Candidatus Neoehrlichia* oraz pierwotniaków z rodzaju *Babesia* w kleszczach *Ixodes ricinus* oraz *Dermacentor reticulatus* w aspekcie narażenia na choroby odkleszczowe”

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

Promotor pomocniczy: dr n. med. Jacek Zwoliński

Streszczenie

Kleszcze są jednym z najważniejszych rezerwuarów i wektorów chorób zakaźnych ludzi oraz zwierząt. W Europie Środkowej kleszcze mogą przenosić ponad 20 czynników etiologicznych chorób transmisyjnych. Najczęściej przenoszonymi patogenami są: *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *Borrelia miyamotoi*, wirus kleszczowego zapalenia mózgu oraz pierwotniaki z rodzaju *Babesia*. Stale obserwuje się zmiany zachodzące w biologii oraz ekologii kleszczy, które mogą przekładać się na epidemiologię chorób odkleszczowych. Jednym z elementów pozwalających ocenić ryzyko zakażenia/zarażenia czynnikami chorobotwórczymi są badania nad występowaniem patogenów w środowisku naturalnym.

Głównym celem niniejszej pracy była ocena występowania chorobotwórczych mikroorganizmów: *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* oraz *Babesia* spp. w kleszczach *Ixodes ricinus* oraz *Dermacentor reticulatus*, odłowionych na terenie województwa lubelskiego, w aspekcie narażenia ludzi na choroby przez nie powodowane.

Materiał do badań stanowiły kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* oraz *Dermacentor reticulatus* zebrane z roślinności na terenach pięciu stanowisk w województwie lubelskim: Suchawa, Piotrowice, Ostrów Lubelski, Parczew oraz Wilków. Odłowu kleszczy dokonywano metodą flagowania. Łącznie odłowiono 1442 kleszcze, z których 855 należało do gatunku *Ixodes ricinus* a 587 osobników należało do gatunku *Dermacentor reticulatus*. Wstępną identyfikację gatunkową kleszczy dokonywano na podstawie cech morfologicznych, co potwierdzano w kolejnym etapie badaniami molekularnymi (PCR). Całkowite DNA z kleszczy izolowano metodą amoniakalną lub kolumienkową. Detekcję patogenów w próbkach kleszczy wykonywano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), gdzie amplifikowano wybrane fragmenty genów charakterystyczne dla danego drobnoustroju. W celu potwierdzenia

otrzymanych wyników dodatnich wykonano sekwencjonowanie wybranych fragmentów genów, a następnie otrzymane sekwencje nukleotydowe analizowano za pomocą narzędzia BLAST.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, wysoką prevalencję krętków należących do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (23,0%) w kleszczach z gatunku *Ixodes ricinus*. W badanej populacji kleszczy najczęściej występował genogatunek *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (18,1%), mniej osobników zakażonych było *Borrelia garinii* (15,3%) oraz *Borrelia afzelii* (13,0%). W badanej populacji kleszczy *Ixodes ricinus* infekcje pojedynczym genogatunkiem *Borrelia* odnotowano w 64 kleszczach (7,5%), stwierdzono natomiast dwukrotnie wyższy odsetek genogatunkowych infekcji mieszanych – 15,6% (dwoma oraz trzema genogatunkami). Oprócz krętków należących do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato wykryto po raz pierwszy w kleszczach na terenie województwa lubelskiego krętki z grupy gorączek powrotnych – *Borrelia miyamotoi*, gdzie poziom infekcji wyniósł 2,8%. Ponadto po raz pierwszy na badanym terenie wyizolowano DNA bakterii *Candidatus Neohrlichia mikurensis* z kleszczy *Ixodes ricinus*. Zakażenie tym drobnoustrojem stwierdzono u 2,8% badanej populacji. Do zidentyfikowanych gatunków pierwotniaków z rodzaju *Babesia* należały: *Babesia microti* (1,5%), *Babesia venatorum* (1,2%), *Babesia divergens* (0,2%) oraz *Babesia capreoli* (0,1%). Spośród 855 przebadanych kleszczy należących do gatunku *Ixodes ricinus* współwystępowanie różnych gatunków drobnoustrojów w organizmie pojedynczego kleszcza wykryto w 28 osobnikach, co stanowiło 3,3% całej populacji. W większości przypadków koinfekcje tworzyły krętki z kompleksu *B. burgdorferi* sensu lato wraz z jednym lub dwoma innymi badanymi gatunkami bakterii i pierwotniaków. Odsetek kleszczy *Dermacentor reticulatus* zainfekowanych badanymi patogenami był niższy w porównaniu do kleszczy *Ixodes ricinus* i dla pierwotniaków *Babesia* oraz krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato wyniósł odpowiednio 2,6% oraz 1,7%. Nie stwierdzono obecności DNA bakterii *Candidatus Neohrlichia mikurensis* oraz *Borrelia miyamotoi* w kleszczach *Dermacentor reticulatus*.

Uzyskane wyniki wskazują na duże ryzyko narażenia osób przebywających na badanych terenach na pogryzienie przez kleszcze zainfekowane krętkami *Borrelia burgdorferi*. Ponadto, występowanie infekcji mieszanych kilkoma genogatunkami *Borrelia* w organizmie pojedynczego kleszcza może prowadzić do zakażenia człowieka dwoma lub trzema genogatunkami w wyniku pojedynczego pogryzienia przez kleszcza, co może przełożyć się na różnorodność objawów oraz cięższy przebieg choroby. Współwystępowanie krętków *Borrelia burgdorferi* z jednym lub dwoma innymi patogenami u kleszczy stwarza ryzyko wystąpienia

koinfekcji u ludzi. Potwierdzenie obecności patogenów *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* oraz *Borrelia miyamotoi* w kleszczach *Ixodes ricinus* na terenie województwa lubelskiego, wskazuje na możliwe ryzyko wystąpienia boreliozy Miyamotoi oraz neoerlichiozy na badanym obszarze. Zakażenia te mogą utrudniać prawidłowe diagnozowanie poprzez występowanie niejasnych symptomów chorobowych. Zasadne jest zatem prowadzenie nadzoru epidemiologicznego nad występowaniem chorób odkleszczowych w populacji ludzi, jak również badań środowiskowych dotyczących prevalencji patogenów zarówno w ich wektorach jak i rezerwuarze zwierzęcym.

Summary

Ticks are one of the most important reservoir and vector of human and animal pathogens causing widespread infectious diseases. In Central Europe tick species are capable of harbour over 20 pathogens (tick-borne pathogens), including: *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neorhlichia mikurensis*, *Rickettsia helvetica*, *Borrelia miyamotoi*, tick-borne encephalitis virus and protozoa (*Babesia* spp.), which could be transmitted to vertebrates. The changes observed in the biology and ecology of ticks, may affect the epidemiology of tick-borne diseases. Thus, the studies focused on the prevalence and distribution of pathogens in the natural environment should be taken into account when evaluating the risk of exposure to human tick-borne disease.

The aim of this dissertation was to determine the prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Borrelia miyamotoi*, *Candidatus Neorhlichia mikurensis* and *Babesia* spp. in questing *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Lublin Voivodeship region and to evaluate the potential risk of human exposure to tick-borne pathogens.

A total of 1447 questing ticks were collected by flagging method from the forested areas of 5 districts of the Lublin Voivodeship: Suchawa, Piotrowice, Ostrów Lubelski, Parczew and Wilków. The two species of tick, *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, were collected in amount of 855 and 587, respectively. Identification of species was based on morphological features and by using molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. Total DNA was isolated from ticks by the ammonia method or by using nucleic acid isolation kit. The presence of DNA tick-borne pathogens was investigated by amplification of specific gene fragment for each pathogen in polymerase chain reaction. Positives samples were confirmed by sequencing and the results were compared with sequences in the GenBank database using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

A total of 23,0% of examined *Ixodes ricinus* ticks were found to be infected with *Borrelia burgdorferi* sensu lato. The most prevalent genospecies was *Borrelia burgdorferi* sensu stricto which accounted for the majority of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (18,1%), followed by *Borrelia garinii* (15,3%) and finally *Borrelia afzelii* (13,0%). Molecular studies confirmed that 64 out of 855 *Ixodes ricinus* ticks (7,5%) were infected with a single spirochete genospecies. Moreover, it was detected that 15,6% ticks harboured two or three different genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex. The presence of *Candidatus Neorhlichia mikurensis* and *Borrelia miyamotoi* was shown for the first time in *Ixodes ricinus* ticks from the Lublin Voivodeship province. Four species of *Babesia* genus were identified in

examined population of ticks. The most prevalent species was *Babesia microti* which occurred in 1,5% of ticks, while *Babesia venatorum*, *Babesia divergens*, and *Babesia capreoli* species were found at the frequency of 1,2%, 0,2% and 0,1%, respectively. The co-infection rate with multiple pathogens in *Ixodes ricinus* ticks amounted to 3,3%. A total of 28 specimens were co-infected with at least two different species of pathogens. The most common were dual infections with participation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and other tick-borne pathogen. None of the examined *Dermacentor reticulatus* ticks were infected with *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis and *Borrelia miyamotoi*, whereas 2,6% and 1,7% of ticks were infected with *Babesia* spp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato, respectively.

The results obtained in this study indicate a high risk of exposure to Lyme disease after tick bite. Furthermore, the presence of mixed infections with several *Borrelia burgdorferi* genospecies and co-infections in one tick specimen may increase the risk of transmission more than one pathogen to humans. This could potentially lead to difficulties in diagnosis and treatment of tick-borne diseases. Obtained data indicate a risk of novel tick-borne diseases such as *Borrelia miyamotoi* disease or human neoehrlichiosis in this region. This is important to conduct epidemiological research of tick-borne diseases including studies of the prevalence of pathogens in ticks and their animal reservoir.