

Praca oryginalna

Original paper

# Zakażenie żubrów z Puszczy Białowieskiej bakteriami *Anaplasma phagocytophilum*

ANNA GRZESZCZUK, SŁAWOMIR ZIARKO\*, DANUTA PROKOPOWICZ,  
PIOTR MAREK RADZIOWON\*\*

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna Wydziału Lekarskiego AM, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok

\*Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa – SP ZOZ, ul. M. Curie-Skłodowskiej 23, 15-950 Białystok

\*\*Klinika Hematologii Wydziału Lekarskiego AM, ul. M. Curie-Skłodowskiej 25, 15-276 Białystok

Grzeszczuk A., Ziarko S., Prokopowicz D., Radziwon P. M.

## Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of European Bisons in the Białowieża Primeval Forest, Poland

### Summary

In recent years *Anaplasma phagocytophilum* has emerged as a public health problem in forested areas. The Białowieża Primeval Forest is a unique ecosystem where the largest herd of European bison (*Bison bonasus*) has survived with a wild population of 350 at the end of 2002.

The aim of the study was to determine whether European Bison constitute a reservoir of *Anaplasma phagocytophilum*. Duplicate blood samples from 8 bison culled in the National Park, 6 males and 2 females aged from 6.5 months to 17 years old, were examined. The blood was collected in March 2003. Nucleic acids were extracted from 200 µl whole EDTA blood using QIAamp blood kit (Qiagen). The fragment of 16S rRNA gene was amplified by applying nested PCR, according to Massung. The nested PCR product specific for *Anaplasma phagocytophilum* was found in duplicate blood samples of 5 out of the 8 animals examined. All the positive bison were significantly younger than the negative ones (11 months vs. 14 years). The obtained results constitute the first molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of wild European Bison and may indicate the role of these largest mammals living in a primeval forest as a natural reservoir of these bacteria.

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*, European bison, PCR

Zakażenia *Anaplasma phagocytophilum* zwracają coraz większą uwagę lekarzy weterynarii i medycyny w ostatnich latach (4, 12, 14, 20). Zakażenia tymi bakteriami powodują zaburzenia odporności pod postacią, między innymi, upośledzenia limfoproliferacji limfocytów (21) oraz migracji i fagocytozy neutrofilów (20). Ta obligatoryjnie wewnątrzkomórkowa bakteria została odkryta przypadkowo podczas badań nad chorobą skokową owiec w Szkocji w 1932 r. (6) jako czynnik etiologiczny gorączki odkleszczowej (tick-borne fever). Ostatnie lata przynoszą informacje o wykrywaniu zakażeń ludzi (2) oraz zwierząt wolno żyjących i hodowlanych (1, 12-15). Nowe możliwości diagnostyczne zaistniały po wprowadzeniu metod molekularnych (22). Badania te doprowadziły do zmian w systematyce rodzin *Rickettsiaceae* i *Anaplasmataceae*. *Ehrlichia phagocytophila* oraz czynnik ludzkiej erlichiozy granulocytarnej (HGE) i *Ehrlichia equi* (dawniej: genogrupa *Ehrlichia phagocytophila*) uznano za jeden gatunek z rodzaju *Anaplasma* pod nazwą *Anaplasma phagocytophilum* (3).

Wzrost częstości chorób odkleszczowych powodują, między innymi, globalne procesy, jak przede wszystkim, ocieplenie klimatu, ale także zmiany ekologiczne – zaniechanie intensywnych upraw oraz nasilenie zalesia-

nia (9, 18). Dotyczy to również zakażeń bakteriami z rodzaju *Anaplasma*. Puszcza Białowieska jest terenem endemicznym występowania wcześniej poznanych chorób przenoszonych przez kleszcze, jak kleszczowe zapalenie mózgu oraz borelioza z Lyme (5, 16, 17). Zapoczątkowanie na tym terenie badań zakażenia *A. phagocytophilum* kleszczy *Ixodes ricinus* (19) oraz seroepidemiologicznych (7) doprowadziło do rozpoznania i opisanie ogniska anaplazmozy w Białowieskim Parku Narodowym w 2002 r. (8). Przedmiotem badań aktualnie podjętych jest określenie naturalnego rezerwuaru *A. phagocytophilum*. W tym celu przebadano żubry z Puszczy Białowieskiej. W dostępnym piśmiennictwie brak danych na ten temat. Na uwagę zasługuje publikacja dotycząca zakażeń *Ehrlichia canis* psów w Polsce południowo-zachodniej (14).

### Materiał i metody

Badaniami objęto 8 żubrów europejskich (*Bison bonasus bonasus*, Linnaeus, 1758), wolno żyjących w Puszczy Białowieskiej, odstrzelonych ze względów ekologicznych (selekcjonowano słabsze, gorzej rozwinięte zwierzęta) w marcu 2003 r., w tym: 6 samców i 2 samice w wieku od 6,5 miesięcy do 17 lat. Krew od zwierząt pobrano w terenie, bezpośrednio po odstrzale.

DNA ekstrahowano z 200 µl krwi pełnej, pobranej na EDTA przy użyciu zestawu komercyjnego QIAamp, firmy Qiagen. Amplifikację fragmentu genu 16S rRNA przeprowadzono według Massunga (11) z zastosowaniem techniki nested PCR i wykorzystaniem primerów: ge3a (5' CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC) i ge10r (5' TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC) do pierwszej reakcji oraz ge9f (5' AACGGATTATTCTTTATAG) i ge2 (5' GGCAGTAT-TAAAAGCAGCTCCAGG) do reakcji nested. Otrzymywano pierwszy produkt reakcji o masie 932-bp oraz drugi produkt o masie 546-bp. Amplifikację wykonywano w dwóch niezależnych próbkach krwi od każdego zwierzęcia. W każdym cyklu kontrolę dodatnią stanowiły komórki HL-60 zakażone *A. phagocytophilum*, pochodzące z komercyjnego testu immunofluorescencyjnego (HGE IFA IgG Test Kit, MRL Diagnostics, USA) oraz kontrolę ujemną – podwójnie destylowana woda.

### Wyniki i omówienie

Swoisty produkt reakcji nested PCR uzyskano z podwójnych próbek krwi pochodzących od 5 z 8 badanych zwierząt (ryc. 1), 4 samców i jednej samicy. Wszystkie zwierzęta, u których wykryto fragmenty genu 16S rRNA swoiste dla *A. phagocytophilum* były istotnie młodsze (od 6,5 miesięcy do 2 lat, śr. 11 miesięcy) od tych, u których uzyskano wynik ujemny (9-17 lat, śr. 14 lat).

Uzyskane wyniki są pierwszym dowodem zakażenia *A. phagocytophilum* żubrów europejskich. Dane te wskazują na bardzo dużą częstość infekcji – 62,5% (5 z 8) przebadanych zwierząt, co pozwala domniemywać, że żubry stanowią jedno z ogniw w łańcuchu enzootycznym *A. phagocytophilum*.

Naturalny rezerwar *A. phagocytophilum* w Europie stanowią zwierzęta hodowlane, jak: owce, kozy, bydło oraz wolno żyjące – sarna, jeleni szlachetny, nornica ruda, mysz wielkooka leśna (13). Psy, konie i koty mogą być również zakażone, ale nie wydają się naturalnym gospodarzem *A. phagocytophilum* (10, 13).

Zakażenia ludzi *A. phagocytophilum* wykazano stonkunkowo niedawno (2). Przebieg kliniczny infekcji może

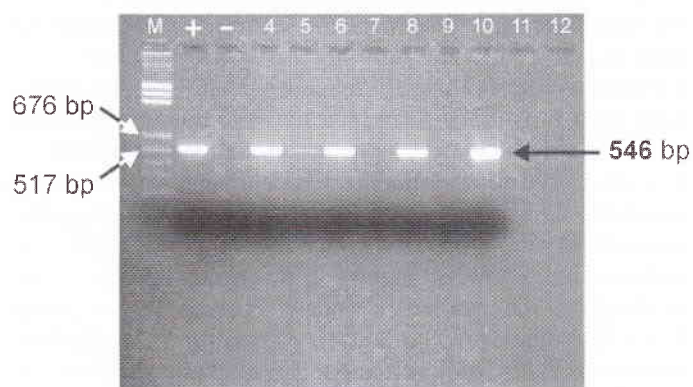
być różny, od zakażeń subklinicznych do zakończonych zgonem (4, 13).

Żubry żyjące w Puszczy Białowieskiej stanowią największe stado w Europie, liczące około 350 sztuk (stan z końca 2002 r.). Wyniki niniejszych badań, oparte na czulej i swoistej metodzie nested PCR, wskazują na istnienie zakażenia *A. phagocytophilum* tych największych ssaków roślinożernych. Pozostaje otwarte pytanie, czy obserwowane zakażenie *A. phagocytophilum* jest przyczyną gorszej kondycji fizycznej zwierząt wybranych do eliminacji ze stada, czy też było konsekwencją innych, współistniejących wcześniej infekcji lub wad rozwojowych.

### Piśmiennictwo

1. Björnsdorff A., Bagert B., Massung R. F., Gusa A., Eliasson I.: Isolation and characterization of two European strains of Ehrlichia phagocytophila of equine origin. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2002, 9, 341-343.
2. Chen S. M., Dumler J. S., Bakken J. S., Walker D. H.: Identification of a granulocytotropic Ehrlichia species as the etiologic agent of human disease. J. Clin. Microbiol. 1994, 32, 589-595.
3. Dumler J. S., Barbet A. F., Bekker C. P. J., Dasch G. A., Palmer G. H., Ray S. G., Rikihisa Y., Rurangirwa F. R.: Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales; unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia; description of five new species combinations; and designation of Ehrlichia equi and HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51, 2145-2165.
4. Dumler J. S., Walker H. D.: Tick-borne ehrlichioses. Lancet Inf. Dis. 2001, 4, 21-28.
5. Flisiak R., Prokopowicz D., Flisiak I., Bobrowska E., Mięgoć H., Grzeszczuk A.: Endemic risk of Lyme borreliosis in Białowieża Primeval Forest region. Przegl. Epidemiol. 1994, 48, 211-217.
6. Gordon W. S., Brownlee A., Wilson D. R., MacLeod J.: Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). J. Comp. Pathol. 1932, 45, 301-312.
7. Grzeszczuk A., Stańczak J., Kubica-Bierant B., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M.: First seroepidemiological evidence of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in Poland. Preliminary results. VIII European Multicolloquium of Parasitology (EMOP) Poznań, Acta Parasitol. 2000, 45, 219-219.
8. Grzeszczuk A., Stańczak J., Kubica-Bierant B.: Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieska), north-eastern Poland. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2002, 21, 6-11.
9. Lindgren E., Gustafson R.: Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. Lancet 2001, 358, 16-18.
10. Loevenich von F. D., Stumpf G., Baumgarten B. U., Röllinghoff M., Dumler J. S., Bogdan C.: A case of equine granulocytic ehrlichiosis provides molecular evidence for the presence of pathogenic Anaplasma phagocytophilum (HGE agent) in Germany. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2003, 22, 303-305.
11. Massung R. F., Slater K., Owens J. H., Nicholson W. L., Mather T. N., Solberg V. B., Olson J. G.: Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1090-1095.
12. Mizak B., Rzeżutka A.: Ehrlichiozy psów. Medycyna Wet. 1998, 54, 658-662.
13. Olano J. P., Walker D. H.: Human ehrlichioses. Med. Clin. North. Am. 2002, 86, 375-392.
14. Platt-Samoraj A., Szweida W., Ciecierski H.: Ehrlichiozy w świetle najnowszych badań. Medycyna Wet. 1998, 54, 363-367.
15. Ploneczka K., Smielewska-Łoś E.: Występowanie przeciwciał swoistych dla Ehrlichia canis u psów z terenu południowo-zachodniej Polski. Medycyna Wet. 2003, 59, 1005-1008.
16. Prokopowicz D.: Niektóre cechy kleszczy i ich znaczenie medyczo-weterynaryjne. Medycyna Wet. 2002, 52, 224-226.
17. Prokopowicz D., Bobrowska E., Bobrowski M., Grzeszczuk A.: Prevalence of antibodies to tick-borne encephalitis among residents of north-eastern Poland. Scand. J. Infect. Dis. 1995, 27, 15-16.
18. Stafford K. C. III, Cartter M. L., Magnarelli L. A., Ertel S-H., Mshar P. A.: Temporal correlations between tick abundance and prevalence of ticks infected with Borrelia burgdorferi and increasing incidence of Lyme disease. J. Clin. Microbiol. 1998, 36, 1240-1244.
19. Stańczak J., Kubica-Bierant B., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M.: Detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis (HGE) in Poland. VIII European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), Poznań, Acta Parasitol. 2000, 45, 217-217.
20. Stuenkel S., Van De Pol I., Bergström K., Schouls L. M.: Identification of Anaplasma phagocytophilum (formerly Ehrlichia phagocytophila) variants in blood from sheep in Norway. J. Clin. Microbiol. 2002, 40, 3192-3197.
21. Woldehiwet Z. B.: The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. J. Comp. Pathol. 1987, 97, 481-485.
22. Woldehiwet Z.: Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. Res. Vet. Sci. 1991, 51, 40-43.

Adres autora: dr n. med. Anna Grzeszczuk, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok; e-mail: oliwa@amb.edu.pl



Ryc. 1. Produkty amplifikacji reakcji nested PCR fragmentu genu 16S rRNA *Anaplasma phagocytophilum*

Prążki: M – marker (pUC/Pvu II/Rsa I/Hinf I); + kontrola dodatnia, komórki HL-60 zakażone *A. phagocytophilum* z komercyjnego testu (HGE IFA, IgG, MRL Diagnostics, USA); – kontrola ujemna, podwójnie destylowana woda; 4, 6, 8, 10 – wyniki dodatnie; 5 – wynik słabo dodatni; 7, 9, 11 – wyniki ujemne