

# DNA *Anaplasma phagocytophilum* we krwi saren oraz w pozyskanych z nich kleszczach

MAŁGORZATA ADAMSKA

Katedra Genetyki Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego, al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin

Adamska M.

## Detecting *Anaplasma phagocytophilum* DNA in blood of roe deer and in ticks

### Summary

The aim of the study was to establish the role of roe deer (*Capreolus capreolus*) as reservoirs of *Anaplasma phagocytophilum* and the role of *Ixodes ricinus* ticks as vectors of this pathogen in North–West Poland. Blood samples of 127 roe deer were collected between May and June 2004 and between September and December 2004. 51 of the 63 roe deer caught between May and June 2004 and 7 of the 64 roe deer caught between September and December 2004 were infested by *I. ricinus* ticks. 170 individuals of the common tick were collected from 45.7% of roe deer. PCR amplification of a fragment of the *msp2* gene was used for detecting *A. phagocytophilum* DNA. Pathogen DNA was detected in 30 of the blood samples (23.6%) and in 10 ticks collected from the animals (5.9%). 28.6% of the roe deer caught between May and June 2004 and 18.75% of the roe deer caught between September and December 2004 were infected, but this difference was not significant. 5.3% of *I. ricinus* ticks were infected by *A. phagocytophilum*. It is clear that *C. capreolus* is a significant reservoir of *A. phagocytophilum* in North–West Poland. In addition, *I. ricinus* is a significant vector in this area.

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*, roe deer, *Ixodes ricinus*

Anaplazmoza granulocytarna to zoonoza odkleszczowa, której czynnikiem etiologicznym jest *Anaplasma phagocytophilum*. Jest to Gram-ujemna bakteria będąca bezwzględny pasażerem wewnątrzkomórkowym (5). *A. phagocytophilum* występuje powszechnie w Europie i Ameryce Północnej. Liczne badania prowadzone na kontynencie amerykańskim wykazały, że wektorem patogenu na tym terenie są kleszcze z gatunków *Ixodes scapularis* i *I. pacificus*, a rezerwuarem – leśne gryzonie oraz przeżuwacze (3). Rozważa się również udział ptaków w utrzymywaniu *A. phagocytophilum* w środowisku (8). W Europie głównym wektorem tego gatunku jest kleszcz pospolity *I. ricinus* (5, 16), jednak nadal mało jest danych dotyczących rezerwuaru anaplazmy. Badania prowadzone w Wielkiej Brytanii (6) oraz Szwajcarii (12) wykazały obecność DNA *A. phagocytophilum* u nornicy rudej (*Clethrionomys glareolus*), myszy zaroślowej (*Apodemus sylvaticus*), myszy leśnej (*A. flavicollis*), darniówki pospolitej (*Pitymys subterraneus*) oraz u owadożerne ryjówki aksamitnej (*Sorex araneus*). Badania prowadzone w Wielkiej Brytanii (1) wskazują, że sarna (*Capreolus capreolus*) jest ważnym naturalnym rezerwuarem dla *A. phagocytophilum* na terenie tego kraju. W Norwegii wykryto obecność przeciwciał przeciwko *A. phagocytophilum* u saren, jeleni (*Cervus elaphus*) i łosi (*Alces alces*) (20). W Słowenii stwierdzono obec-

ność DNA *A. phagocytophilum* w izolatach z krwi i tkanek jeleni, saren oraz dzików (10, 15).

Celem badań było określenie roli sarny jako rezerwuaru *A. phagocytophilum* oraz kleszcza pospolitego jako wektora tego patogenu na terenie województwa zachodniopomorskiego.

### Materiał i metody

W okresie od maja do czerwca 2004 r. oraz od września do grudnia 2004 r. pobrano próbki krwi (w objętości 1 cm<sup>3</sup>) od 127 saren. Krew była pobierana do probówek zawierających 100 µl Na-EDTA. W okresie wiosennym (maj i czerwiec 2004) odstrzelono 63 osobniki, a w okresie jesiennym (od września 2004 do grudnia 2004) – 64. Zwierzęta pochodziły z terenów leśnych okolic miasta Szczecina, endemicznych dla *A. phagocytophilum*. Z odłowionych zwierząt zebrano żerujące na nich kleszcze, łącznie 170 osobników *I. ricinus*.

DNA z próbek krwi izolowano gotowym zestawem MasterPure™ DNA Purification Kit (Epicentre, USA) według załączonej instrukcji. Do izolacji DNA całkowitego z kleszczy zastosowano metodę amoniakalną (9).

Do wykrycia obecności DNA *A. phagocytophilum* w uzyskanych izolatach zastosowano metodę PCR. Użyto zestawu starterów *msp2*-3f/*msp2*-3r, umożliwiających amplifikację fragmentu genu *msp2* o długości 334 pz (13). Jako próby dodatniej użyto DNA *A. phagocytophilum* uzys-

kanego z hodowli na komórkach HL60, MRL Diagnostics (19). Profil czasowo-temperaturowy PCR obejmował: denaturację wstępną w 94°C – 2 minuty; 8 cykli: denaturacja właściwa 94°C – 30 sekund, przyłączanie starterów 62°C – 56°C (spadek temperatury o 2°C co 2 cykle) – 45 sekund, elongacja 72°C – 30 sekund; 28 cykli: denaturacja właściwa 94°C – 30 sekund, przyłączanie starterów 54°C – 45 sekund, elongacja 72°C – 30 sekund oraz wydłużanie końcowe 72°C – 5 minut. Polimeraza i bufor użyte do reakcji pochodziły z firmy Qiagen (Germany). Nukleotydy wyprodukowała firma Polgen S.C. (Polska), a startery – firma Bionovo (Polska). Uzyskane produkty poddano elektroforesie w 2,5% żelu agarozowym wybarwionym bromkiem etydyny.

Analizy statystycznej porównań częstości występowania DNA *A. phagocytophilum* w izolatach z krwi *C. capreolus* odłowionych w dwóch kolejnych sezonach dokonano stosując nieparametryczny test istotności chi kwadrat ( $\chi^2$ , 14).

### Wyniki i omówienie

Wśród 170 zebranych *I. ricinus* większość stanowiły samice (144/84,7%); 137 z nich (95,1%) było opitych krwią. Z jednego osobnika zbierano od 1 do 8 kleszczy. Z przeprowadzonej analizy statystycznej stopnia zakażenia *C. capreolus* przez *A. phagocytophilum* wynika, że różnice w stopniu zakażenia w dwóch kolejnych sezonach były nieistotne statystycznie. W izolatach z kleszczy DNA anaplazmy wykryto u 8 samic i 1 samca zebranych w okresie wiosennym, oraz u jednej samicy z okresu jesiennego. Wszystkie PCR+ samice były opite krwią; tylko jeden osobnik PCR+ (samica zebrana wiosną) został zdjęty z sarny, w której krwi nie stwierdzono obecności DNA patogenu. Wyniki zbioru kleszczy ze zwierząt oraz wyniki PCR przedstawia tab. 1.

Zagrożenie ludności chorobami odkleszczowymi w ostatnich latach gwałtownie wzrosło, gdyż zmiany klimatyczne ostatnich kilku lat sprzyjały rozwojowi kleszczy oraz rozpowszechniła się forma rekreacji związana z obszarami leśnymi. Jedną z zoonoz odkleszczowych jest ludzka anaplazmoza granulocytarna, wywoływana przez *A. phagocytophilum*. W Europie rolę wektora tego patogenu spełnia *I. ricinus* (kleszcz pospolity). Zbadanie rezerwuaru *A. phagocytophilum* pozwoli na dokładniejsze poznanie ekologii tego patogenu, a także na określenie ryzyka zakażenia anaplazmą ludzi przebywających na terenach bytowania kleszczy. Ryzyko zakażenia człowieka zależy bowiem od występowania na danym terenie nie tylko za-

każonych kleszczy, ale także pośrednio od ich żywicieli utrzymujących krążenie patogenów w środowisku. Istnieją także doniesienia o zakażeniach patogenami przenoszonymi przez kleszcze ludzi, którzy nie zauważyli kleszcza na swoim ciele, a mieli kontakt z zakażoną krwią zwierząt łownych (7). Leśnicy, myśliwi i pracownicy punktów skupu dziczyzny są więc grupą szczególnie narażoną na zakażenie patogenami, których wektorem są kleszcze, nie tylko ze względu na wysokie ryzyko kontaktu z kleszczami, ale także ze względu na styczność z materiałem zakaźnym, jakim jest krew zwierząt będących rezerwuarem tych patogenów.

Przeżuwacze wydają się grupą zwierząt, która pełni najważniejszą rolę jako rezerwuar *A. phagocytophilum*. Wprawdzie liczne badania wykazały obecność tego patogenu u różnych gatunków gryzoni, jednakże prawdopodobnie nie są one w stanie utrzymać anaplazmy w środowisku ze względu na stosunkowo małą efektywność transmisji (11). Badania prowadzone w Wielkiej Brytanii (6) wykazały sezonowość zakażeń u *C. glareolus* i *A. sylvaticus*. Obecności *A. phagocytophilum* nie stwierdzono u osobników odławianych w okresie od stycznia do kwietnia, natomiast najwyższy poziom zakażenia miał miejsce późnym latem i jesienią. Wyniki te wskazują na krótkotrwałą bakteriemie szacowaną zaledwie na kilka tygodni. Stosunkowo mało jest poznany rezerwuar ptasi dla *A. phagocytophilum*. Alekseev i wsp. (2) wykryli obecność *A. phagocytophilum* w kleszczach *I. ricinus* zebranych z 5 gatunków wróblowatych odłowionych w okolicach Kaliningradu; podobne badania prowadzili w Szwecji Bjöersdorff i wsp. (4). Ostatnie badania gryzoni *A. flavicollis* oraz 9 różnych gatunków ptaków leśnych odłowionych na terenie Wielkopolskiego Parku Narodowego, przeprowadzone przez zespół Katedry Genetyki US, nie wykazały obecności DNA *A. phagocytophilum* we krwi tych zwierząt, aczkolwiek wykryto jego obecność w kleszczach zebranych zarówno z gryzoni i ptaków, jak i z roślinności na terenach ich odłowu (17, 18). Stwierdzone zakażenie kleszczy musiało więc pochodzić od innej grupy żywicieli niż badane zwierzęta, być może właśnie od przeżuwaczy.

Poziom zakażenia *A. phagocytophilum* saren odstrzelonych na terenach leśnych okolic Szczecina (23,6%) sugeruje, że zwierzęta te są naturalnym rezerwuarem tego patogenu, co zostało już potwierdzone przez innych autorów (1, 10, 15, 20). Podobnie jak w przypadku gryzoni (6) występowała wyraźna sezo-

Tab. 1. Liczba i procent (%) odłowionych i zakażonych oraz infestowanych przez kleszcze saren oraz infestujących i zakażonych kleszczy *I. ricinus* wiosną i zimą

Sezon odłowu	Liczba (%) saren	Liczba (%) zakażonych saren	Liczba (%) infestowanych saren	Liczba (%) <i>I. ricinus</i> zebranych z saren	Liczba (%) zakażonych <i>I. ricinus</i>
Wiosna	63 (49,6)	18 (28,60)	51 (80,90)	155 (91,2)	9 (5,80)
Jesień	64 (50,4)	12 (18,75)	7 (10,90)	15 (8,8)	1 (0,64)
Razem	127 (100)	30 (23,60)	58 (45,70)	170 (100)	10 (5,30)

nowość zakażenia. Jednakże w przypadku saren poziom zakażenia był wyższy w okresie wiosennym (28,6%) niż jesiennym (17,75%). Różnica zakażeń

była niższa niż u gryzoni, a test chi kwadrat wykazał, że jest ona nieistotna. U saren okres bakteriemii jest więc dłuższy niż u gryzoni, a co za tym idzie, są one zdolne do zakażenia anaplazmą żerujących na nich kleszczy przez znacznie dłuższy czas. Wynika z tego, że sarny są lepszym niż gryzonie rezerwuarem dla *A. phagocytophilum*. Duża ilość zwierząt na których żerowały kleszcze, odstrzelonych wiosną, kiedy poziom zakażenia jest najwyższy, zwiększa szansę zakażenia kleszczy tym patogenem. Wprawdzie wśród 48 kleszczy żerujących na 16 zakażonych sarnach wykryto zakażenie anaplazmą jedynie u 9 osobników zebranych z 5 zwierząt, jednakże pozostałe osobniki mogły żerować zbyt krótko, aby doszło do ich zakażenia. Obecność DNA *A. phagocytophilum* w kleszczu żerującym na sarnie nie zakażonej tym patogenem świadczy o tym, że jego zakażenie nastąpiło podczas żerowania na innym żywicielu, a w przypadku dłuższego żerowania na sarnie mogłoby dojść do jej zakażenia. Planowana jest kontynuacja badań przez kolejny sezon w celu stwierdzenia, czy zakażenie saren utrzymuje się na stałym poziomie, czy też ulega wahaniom w kolejnych latach.

### Piśmiennictwo

1. Alberdi M. P., Walker A. R., Urquhart K. A.: Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for Ehrlichia phagocytophila. *Epidemiol. Infect.* 2000, 124, 315-323.
2. Alekseev A. N., Dubinina H. V., van de Pol I., Schouls L. M.: Identification of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi in Ixodes ticks in the Baltic regions of Russia. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2237-2242.
3. Bakken J. S., Dumler J. S.: Human granulocytic ehrlichiosis. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31, 554-560.
4. Björnsdóttir A., Bergström S., Massung R. F., Haeming P. D., Olsen B.: Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, 7, 877-879.
5. Blanco J. R., Oteo J. A.: Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, 8, 763-772.
6. Bown K. J., Begon M., Bennett M., Woldehewet Z., Ogden N. H.: Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophilum* in rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2003, 9, 63-70.
7. Comer J. A., Nicholson W. I., Sumner J. W., Olson J. G., Childs J. E.: Diagnosis of human ehrlichiosis by PCR assay acute-phase serum. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 31-34.
8. Daniels T. J., Battaly G. R., Liveris D., Falco R. C., Schwartz I.: Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 1524-1525.
9. Guy E. C., Stanek G.: Detection of Borrelia burgdorferi in patient with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 1991, 44, 610-611.
10. Hulinska D., Votýpka J., Plch J., Vlček E., Valesova M., Bojar M., Hulinsky V., Smetana K.: Molecular and microscopical evidence of Ehrlichia spp. and Borrelia burgdorferi sensu lato in patients, animals and ticks in the Czech Republic. *New Microbiol.* 2002, 5, 437-448.
11. Levin M. L., des Vignes F., Fish D.: Disparity in the natural cycles of Borrelia burgdorferi and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5, 204-208.
12. Liz J. S., Anderes L., Sumner J. W., Massung R. F., Gern L., Rutti B., Brosard M.: PCR detection of granulocytic Ehrlichiae in Ixodes ricinus ticks and wild small mammals in Western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 1002-1007.
13. Massung R. F., Slater K.: Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, Anaplasma phagocytophilum. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 717-722.
14. Mikulski T.: Statystyka medyczna. PAM, Szczecin 1994, 94-95.
15. Petrovec M., Bidovec A., Sumner J. W., Nicholson W. L., Childs J. E., Avsinc-Zupanc T.: Infection with Anaplasma phagocytophila in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. *Wien. Klin. Wochenschr.* 2002, 114, 641-647.
16. Skotarczak B., Rymaszewska A.: Wstępne badania czynnika etiologicznego ludzkiej ehrlichiozy (HGE) w kleszczach z zachodniopółnocnej Polski. *Wiad. Parazytol.* 2001, 47, 95-101.
17. Skotarczak B., Rymaszewska A., Sawczuk M., Adamska M., Suproń M., Jerszyńska-Mazur J.: PCR detection of granulocytic Anaplasma and Babesia in Ixodes ricinus ticks and yellow-necked mice (Apodemus flavicollis) in West-Central Poland. *A Parazytol.* in press.
18. Skotarczak B., Rymaszewska A., Wodecka B., Sawczuk M., Adamska M., Suproń M., Maciejewska A.: PCR detection of granulocytic Anaplasma and Babesia in Ixodes ricinus ticks and birds in West-Central Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* in press.
19. 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, 33, 198-201.
20. Stuenkel S., Akerstedt J. K., Bergström K., Handeland K.: Antibodies to granulocytic Ehrlichia in moose, red deer, and roe deer in Norway. *J. Wildl. Dis.* 2002, 38, 1-6.

Adres autora: mgr Małgorzata Adamska, al. Piastów 40B, 71-065 Szczecin; e-mail: adamska@univ.szczecin.pl