

Angelina Wójcik-Fatla

Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii

Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie

AUTOREFERAT

Lublin 2015

I. IMIĘ I NAZWISKO

Angelina Wójcik-Fatla

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE

16.04.2009 – Uniwersytet Medyczny w Lublinie, I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym – uzyskanie stopnia **doktora nauk medycznych w zakresie biologii medycznej**, ze specjalnością akarologia stosowana

Tytuł rozprawy doktorskiej: Współwystępowanie trzech patogenów (*Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* i *Babesia microti*) u kleszczy *Ixodes ricinus* w makroregionie lubelskim (wyróżniona rozprawa doktorska)

03.06.2002 – Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, uzyskanie tytułu **magistra biologii**, specjalizacja biochemia

Tytuł pracy magisterskiej: Zmiany aktywności lipazy zewnątrzkomórkowej z *Alternaria* sp. w zależności od warunków hodowli

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

01.04.2004 – nadal, Instytut Medycyny Wsi im. Witolda Chodźki w Lublinie

20.04.2015 – nadal, Zakład Biologicznych Szkodliwości Zdrowotnych i Parazytologii – **Kierownik Zakładu, Adiunkt**

01.01.2012-20.04.2015 – Zakład Chorób Odzwierzęcych – **Kierownik Zakładu, Adiunkt**

01.05.2010-31.12.2011 – Samodzielna Pracownia Chorób Odzwierzęcych – **Kierownik Samodzielnej Pracowni, Adiunkt**

05.11.2009-30.04.2010 – Pracownia Aerobiologii i Alergologii w Zakładzie Biologicznych Szkodliwości Zawodowych – **Kierownik Pracowni, Adiunkt**

04.11.2009-30.04.2011 – Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych – **Adiunkt**

01.11.2005-03.11.2009 – Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych – **Asystent**

01.04.2004-31.10.2005 – Zakład Biologicznych Szkodliwości Zawodowych – **Stanowisko inżyneryjno-techniczne**

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. NR 65, POZ. 595 ZE ZM.)

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* jako rezerwuaru i wektora wybranych patogenów w aspekcie zagrożenia zdrowia mieszkańców Polski Wschodniej.

b. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:

1. **Wójcik-Fatla A.**, Zając V., Sawczyn A., Cisak E., Dutkiewicz J.: *Babesia* spp. in questing ticks from eastern Poland: prevalence and species diversity. *Parasitol Res* 2015, 114: 3111-3116.
IF=2.098; 30 pkt. MNiSW/KBN
2. **Wójcik-Fatla A.**, Zając V., Sawczyn A., Cisak E., Sroka J., Dutkiewicz J.: Occurrence of *Francisella* spp. in *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland. *Ticks Tick Borne Dis* 2015, 6(3): 253-257.
IF=2.718; 30 pkt. MNiSW/KBN
3. **Wójcik-Fatla A.**, Cisak E., Zając V., Sroka J., Sawczyn A., Dutkiewicz J.: Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. I. Prevalence in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae). *Ann Agric Environ Med* 2013, 20(2): 276-279.
IF=0; 30 pkt. MNiSW/KBN
4. **Wójcik-Fatla A.**, Bartosik K., Buczek A., Dutkiewicz J.: *Babesia microti* in adult *Dermacentor reticulatus* ticks from eastern Poland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2012, 12(10): 841-843.
IF=2.277; 30 pkt. MNiSW/KBN
5. **Wójcik-Fatla A.**, Zając V., Cisak E., Sroka J., Sawczyn A., Dutkiewicz J.: Leptospirosis as a tick-borne disease? Detection of *Leptospira* spp. in *Ixodes ricinus* ticks in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2012, 19(4): 656-659/
(IF=3,060; 25 pkt. MNiSW/KBN
6. **Wójcik-Fatla A.**, Cisak E., Zając V., Zwoliński J., Dutkiewicz J.: Prevalence of tick borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks Tick Borne Dis* 2011, 2(1): 16-19.
IF=2,370; 0 pkt. MNiSW/KBN
7. **Wójcik-Fatla A.**, Zając V., Knap J. P., Dutkiewicz J.: Hantavirus DNA not detected in *Ixodes ricinus* ticks. *Ann Agric Environ Med* 2011, 18:446-447.
IF=2.311; 25 pkt. MNiSW/KBN

8. Sroka J., Szymańska J., **Wójcik-Fatla A.**: The Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from east Poland with the use of PCR. *Ann Agric Environ Med* 2009, 16(2): 313-319.

IF=1,538; 27 pkt. MNiSW/KBN

Łączny IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: 16,372

Łączna liczba punktów MNiSW/KBN: 197

c. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

1. Wprowadzenie

a. Wstęp

Na terenach wschodniej Polski występują głównie dwa gatunki kleszczy, które są uważane za najważniejszy rezerwuar i wektor różnych patogenów. Pierwszy z nich – *Ixodes ricinus* – kleszcz pospolity, jest najczęściej występującym gatunkiem kleszcza w Polsce. *Ixodes ricinus* pełni rolę kompetentnego wektora wielu patogenów niebezpiecznych zarówno dla ludzi jak i zwierząt. Kleszcze głównie tego gatunku, zwłaszcza w dorosłym stadium rozwojowym, atakują ludzi, co zwiększa ryzyko nabycia chorób transmisyjnych

Drugim najpowszechniej spotykanym gatunkiem kleszczy jest *Dermacentor reticulatus*, „kleszcz łąkowy”, który licznie występuje we wschodnich częściach Polski, ale zaznacza się wyraźna tendencja do migracji tego gatunku na tereny zachodnie kraju. Jego rola, jako wektora i rezerwuaru patogenów odkleszczowych, jest mniej poznana w porównaniu do kleszczy *Ixodes ricinus*. Kontrowersyjna pozostaje również zdolność tego gatunku do atakowania nie tylko zwierząt ale także i ludzi. Ostatnie badania prowadzone w Polsce wschodniej i centralnej wykazały, że u ludzi częściej zdarzały się pokłucia przez kleszcze z gatunku *D. reticulatus* niż przez *I. ricinus*.

Biorąc pod uwagę wzrastającą ilość zachorowań na boreliozę z Lyme oraz inne choroby odkleszczowe, badania nad rolą tych dwóch gatunków kleszczy jako rezerwuaru i wektora różnorodnych patogenów we wschodniej Polsce, spełniają ważną rolę w aspekcie zdrowia publicznego i chorób zawodowych.

b. Rola kleszczy *Ixodes ricinus* jako wektora i rezerwuaru wybranych patogenów w świetle współczesnej literatury

Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) jest najczęstszym gatunkiem kleszczy zarówno w Polsce jak i w Europie. Kleszcze te bytują głównie w lasach mieszanych i liściastych o bogatym poszyciu i dużym zagęszczeniu ich żywicieli – drobnych gryzoni (głównie myszy leśnych i nornic), które są podstawowymi gatunkami żywicielskimi młodocianych form *Ixodes ricinus*. Kleszcze *Ixodes ricinus* odgrywają kluczową rolę jako wektor i rezerwuar licznych patogenów, w tym również gatunków drobnoustrojów o znaczeniu medycznym i epidemiologicznym. *Ixodes ricinus* jest rezerwuarem i

wektorem licznych wirusów, bakterii i pierwotniaków, m. in. wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (TBE), wirusa choroby skokowej owiec (LI), krymsko-kongijskiej gorączki krwotocznej (CCHF), wirusów z grupy Uukuniemi i Kamerowo, a także bakterii: *Rickettsia slovaca*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Anaplasma phagocytophilum*, *Salmonella enteritidis*, *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes* i *Brucella melitensis*. Jest on także wektorem pierwotniaków z rodzaju *Theileria* i *Babesia* spp. (Buczek 2004).

c. Rola kleszczy *Dermacentor reticulatus* jako wektora i rezerwuaru wybranych patogenów w świetle współczesnej literatury

Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794) – kleszcz łąkowy, występuje w klimacie umiarkowanym w dwóch głównych sferach: zachodniej (kraje Europy zachodniej) oraz wschodniej (od Polski wschodniej po rejony Syberii). Według wielu autorów w ostatnich latach zasięg występowania tego gatunku wyraźnie się powiększa. Na obszarze Polski *D. reticulatus* pojawia się głównie w części wschodniej, północno-wschodniej i centralnej, oraz na kilku stanowiskach usytuowanych w części zachodniej. Najczęściej występuje w zakrzewionych dolinach rzek i strumieni, podmokłych lasach mieszanych oraz pastwiskach. Gatunek ten należy do pasożytów pozagniazdowych, polifagicznych z trójżywieliowym cyklem rozwoju. *Dermacentor reticulatus* odgrywa ważną rolę jako rezerwuar i/lub wektor patogenów wywołujących choroby ludzi i zwierząt, takich jak: kleszczowe zapalenie mózgu, omska gorączka krwotoczna, choroby wywołane przez riketsje z grupy gorączek plamistych (SFGR) (*R. conorii*, *R. slovaca*), gorączka Q (*Coxiella burnetii*), tularemia (*Francisella tularensis*), tyfus (*Salmonella* spp.), listerioza (*Listeria monocytogenes*). Do pozostałych jednostek chorobowych należą choroby, których czynnikiem etiologicznym są pierwotniaki, jak np. babeszjoza u bydła (wywoływana przez *Babesia bigemina* i *Babesia bovis*), babeszjoza u psów (wywoływana przez *Babesia canis*) czy teilerioza u bydła (wywoływana przez *Theileria annulata*) (Siuda 2006).

2. Cel osiągnięcia naukowego

Głównym celem osiągnięcia naukowego było określenie występowania 8 wybranych patogenów w kleszczach z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* zebranych z terenu makroregionu lubelskiego (wschodnia Polska), wskazując tym samym potencjalną rolę kleszczy jako wektora i rezerwuaru chorobotwórczych mikroorganizmów. Wybrane patogeny (wirus kleszczowego zapalenia mózgu, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Babesia* spp.) występujące u obu gatunków mogą powodować jedne z najważniejszych chorób odkleszczowych. W przypadku patogenów o innych znanych drogach szerzenia się, takich jak *Leptospira* spp. czy *Toxoplasma gondii*, potencjalna rola kleszczy w ich transmitowaniu nadal wymaga naukowego potwierdzenia. Występowanie wybranych czynników patogennych w badanych kleszczach przedstawiono w 8 podrozdziałach, w których przedstawiono najważniejsze

wyniki badań własnych, stosowane metody badawcze oraz wnioski, w odniesieniu do badań uzyskanych przez innych autorów.

3. Występowanie wybranych patogenów w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* zebranych z terenu makroregionu lubelskiego (wschodnia Polska) ze szczególnym uwzględnieniem roli kleszczy jako ich wektora i rezerwuaru

3.1. Występowanie *Babesia* spp. w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*

[Publikacje nr 1 i 4]

Do rodzaju *Babesia*, typ Apicomplexa, rodzina Babesiidae, należą pasożytnicze wewnątrzkomórkowe pierwotniaki, namnażające się w komórkach erytrocytów ludzkich i zwierzęcych, przenoszone przez kleszcze (Ixodidae). Pierwotniaki są czynnikiem etiologicznym babeszjozy ludzkiej i zwierzęcej, choroby o ciężkim przebiegu prowadzącej do anemii, hiperbilirubinemii, hemoglobinurii oraz poważnych uszkodzeń narządów wewnętrznych. Do najważniejszych pasożytów wywołujących choroby u zwierząt hodowlanych należą: *B. bigemina*, *B. bovis* i *B. divergens* u bydła oraz *B. canis* u psów. Ludzka babeszjoza zaliczana jest co tzw. chorób typu „emerging” (nowo pojawiających się chorób zakaźnych), gdzie w Ameryce Północnej rocznie jest stwierdzanych ok. 1,000 przypadków, wywoływanych głównie przez *B. microti* (Hildebrandt i Hunfeld 2014). Choroba, wywołana przez patogen, transmitowany głównie na tych terenach przez kleszcze z gatunku *Ixodes scapularis*, może mieć przebieg łagodny z asymptomatycznymi objawami lub ostry, często kończący się zgonem. W Europie do roku 2010 opisano tylko 3 przypadki kliniczne babeszjozy ludzkiej wywołanej przez *B. microti*. Kolejnych 50 zachorowań odnotowano w przypadku schorzeń wywołanych głównie przez *B. divergens* i w mniejszym stopniu przez *B. venatorum* u osób z obniżoną odpornością (Hildebrandt i Hunfeld 2014). Liczba klinicznych przypadków babeszjozy spowodowanej przez *B. microti* w Europie stanowi zatem niewielki odsetek zachorowań w porównaniu do Ameryce Północnej, a powody takiej rozbieżności pozostają niewyjaśnione. Pierwsze dwa przypadki babeszjozy w Polsce zostały opisane przez Welc-Fałęciak i wsp. (2010), jako koinfekcje klinicznej boreliozy, gdzie sekwencja nukleotydowa wyizolowanego z krwi pierwotniaka wykazywała 98.9% homologii do *B. divergens* lub *B. venatorum*.

Ixodes ricinus jest uważany za główny wektor *Babesia* w Europie, podczas gdy rola innych potencjalnych wektorów jak np. *Dermacentor reticulatus* czy *Ixodes persulcatus*, jest słabo poznana. Potwierdzona została rola kleszczy *Dermacentor reticulatus* jako wektora pierwotniaków z gatunku *Babesia* stanowiących czynnik etiologiczny babeszjozy (piroplazmy) u bydła, koni i psów: *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. caballi*, *B. canis*, *Theileria (Babesia) equi*. Jak dotąd nie wykazano związku kleszczy z gatunku *D. reticulatus* z ludzką babeszjozą, powodowaną przez *B. microti* czy *B. divergens*. Dotychczas obecność *Babesia microti* potwierdzono jedynie w stadiach

młodocianych kleszczy *Dermacentor reticulatus* – u larw (11.8%) i nimf (4.0%) (Welc-Fałęciak i wsp. 2008). Natomiast zarówno w Polsce, jak i w innych państwach nie wykazano obecności *B. microti* u postaci dorosłych *D. reticulatus* – gatunku kleszcza, który może również żerować na ludziach.

Celem prezentowanych publikacji było poszerzenie wiedzy odnośnie roli kleszczy jako rezerwuaru i wektora pierwotniaków z gatunku *Babesia* we wschodniej Polsce. Celem pierwszej pracy opublikowanej w 2012 roku było ustalenie, czy *Babesia microti* może występować w postaciach dorosłych kleszczy z gatunku *Dermacentor reticulatus*, podczas gdy kolejne badania opublikowane w 2015 roku miały określić występowanie i różnorodność gatunkową pierwotniaków w kleszczach *D. reticulatus* i *I. ricinus* zebranych na terenie makroregionu lubelskiego (Polska Wschodnia).

W pierwszych badaniach (Wójcik-Fatla i wsp. 2012) przebadano ogółem 468 kleszczy *D. reticulatus* (298 samic i 170 samców), zebranych z roślinności na terenach leśnych pięciu stanowisk Lubelszczyzny. Obecność DNA *B. microti* w kleszczach potwierdzono stosując technikę nested-PCR zwiększając tym samym czułość reakcji i otrzymując w efekcie wysoce swoisty produkt końcowy. Jako markera genetycznego w celu wykrycia DNA *Babesia microti* użyto fragmentu genu kodującego małą podjednostkę rybosomy RNA (SS-rDNA), najczęściej wykorzystywanego w badaniach molekularnych i diagnostycznych, dotyczących pierwotniaków z rodzaju *Babesia*.

Spośród 468 przebadanych osobników zarażenie pierwotniakiem *B. microti* stwierdzono u 21 kleszczy (4.5%). Obecność pierwotniaka potwierdzono u 15 z 298 samic (5.0%) i u 6 ze 170 samców (3.5%). Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy oznaczonymi odsetkami zarażeń dla samców i samic ($p > 0.05$). Analiza sekwencyjna prób dodatnich otrzymanych z kleszczy *Dermacentor reticulatus* potwierdziła 97-99% homologii ze znanymi sekwencjami dla *B. microti*: AB366158.1 (99% homologii do *Babesia microti* gene for 18S ribosomal RNA, szczep: München) i EU882727.1 (97-98% homologii do genu *Babesia microti* 18S ribosomal RNA, wyizolowanego z kleszczy *Ixodes ricinus*).

Przeprowadzone badania potwierdziły po raz pierwszy występowanie *B. microti* w postaciach dorosłych kleszczy z gatunku *D. reticulatus*, których żywicielem są głównie duże zwierzęta dzikie i hodowlane (bydło, jelenie, łosie), ale może nim być również człowiek. Cochez et al. (2012) w swoich badaniach prowadzonych w Belgii na grupie 282 osobnikach dorosłych kleszczy, nie potwierdził występowania *Babesia* spp. u *D. reticulatus*. Do czasu opublikowania naszych wyników badań, *Ixodes ricinus* był uważany za jedyny możliwy gatunek kleszcza będący wektorem *B. microti* w Europie. W Polsce odsetek zarażeń kleszczy *I. ricinus* pierwotniakiem mieści się w granicach 3-15.3% (Skotarczak i wsp. 2002, Stańczak i wsp. 2004). Wyniki badań własnych sugerują, że również *D. reticulatus* może być potencjalnym wektorem *B. microti*, czynnika etiologicznego ludzkiej babeszjozy.

Kolejne badania dotyczące tego zagadnienia (Wójcik-Fatla i wsp. 2015) przeprowadzono na grupie 853 kleszczy *Ixodes ricinus* (271 nimf, 268 samców, 314 samic) i 582 kleszczy *Dermacentor reticulatus* (241 samców i 341 samic), zebranych z roślinności na terenach 5 stanowisk leśnych w makroregionie lubelskim (Polska

wschodnia). Identyfikację poszczególnych gatunków *Babesia* spp. oparto na technice PCR i sekwencjonowaniu. Amplifikację przeprowadzono z użyciem primerów komplementarnych do fragmentu genu kodującego małą podjednostkę rybosomu (18S rRNA) (Hilpertshauser i wsp. 2006). Rodzaj *Babesia* spp. obejmował następujące możliwe do identyfikacji gatunki: *B. divergens*, *B. bigemina*, *B. major*; *B. venatorum*; *B. canis*; *B. odocoilei*; *B. ovata*; *B. motasi* and *B. crassa* oraz *B. divergens* i *B. venatorum*. Identyfikację *B. microti* wykonano według metody opisanej w poprzedniej publikacji (Wójcik-Fatla i wsp. 2012).

Ogółem częstotliwość występowania szczepów *Babesia* w kleszczach *Ixodes ricinus* zebranych z terenów Polski wschodniej oznaczono na poziomie 4.6%. Zidentyfikowano trzy gatunki *Babesia*, z których najczęściej występującym okazał się gatunek *B. microti* (2.8%). Z kolei *B. venatorum*, *B. divergens* oraz niezidentyfikowany gatunek *Babesia* potwierdzono odpowiednio u 1.2%, 0.2% i 0.3% zbadanych kleszczy. Tym samym gatunek *B. microti* stanowił 61.5% wszystkich prób dodatnich wśród kleszczy *I. ricinus*, *B. venatorum* – 25.7 %, *B. divergens* – 5.1%, i niezidentyfikowany gatunek *Babesia* – 7.7%. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy odsetkami zarażeń a miejscem zbioru kleszczy ($\chi^2=1.885$, $P=0.390$), podobnie jak zależności od stadium rozwojowego kleszczy ($\chi^2=4.874$, $P=0.087$).

Zarażenie kleszczy z gatunku *D. reticulatus* *Babesia* spp. określono na poziomie 2.7%. Zidentyfikowano dwa występujące w tej grupie gatunki pierwotniaka. Odsetek zakażeń kleszczy *B. microti* wyniósł 2.1%, natomiast *B. canis* stwierdzono u 0.7% zbadanych osobników. Tym samym odsetek zakażeń *B. microti* stanowił 75% wszystkich prób dodatnich, a *B. canis* – 25%. U jednej samicy stwierdzono koinfekcję *B. canis* z *B. microti*. Częstość występowania poszczególnych gatunków *Babesia* nie była zależna statystycznie od miejsca zbioru kleszczy ($\chi^2=0.463$, $P=0.793$). Znacząca statystycznie okazała się zależność odsetka zarażeń w przypadku samic i samców ($P=0.0954$). Znacząca okazała się również różnica w odniesieniu do różnorodności gatunkowej *Babesia* występującej wśród kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus* ($P<0.05$).

Sekwencjonowaniu i analizie sekwencyjnej poddano 54 próby dodatnie (w tym jedną próbę ze stwierdzoną koinfekcją). W 24 próbach z kleszczy *I. ricinus* potwierdzono wysoką zgodność homologiczną do *B. microti* (numery akcesyjne: KM051833.1, KM051836.1). *B. venatorum* potwierdzono w 10 próbach (numery akcesyjne: JQ929917.1, KM244044.1). Dwie próby zostały zidentyfikowane jako *B. divergens* (numery akcesyjne: KC465977.2, AY572456.1). W przypadku trzech prób nie udało się zidentyfikować gatunku *Babesia* spp. W większości prób dodatnich otrzymanych z kleszczy *D. reticulatus* analiza sekwencyjna potwierdziła 100% homologii otrzymanych sekwencji do *B. microti* (numery akcesyjne: AB085191.1, AB366158.1). Trzy próby zostały zidentyfikowane jako *B. canis* (numery akcesyjne: AY072926.1, KM111283.1). W przypadku jednego izolatu, gdzie stwierdzono koinfekcję, sekwencjonowanie potwierdziło obecność *B. canis* i *B. microti* (odpowiednio numery akcesyjne: AY072926.1 i AB085191.1).

Prezentowane wyniki dotyczące występowania *Babesia* u 4.6% kleszczy *Ixodes ricinus* na obszarze Lubelszczyzny potwierdzają, że w Polsce istnieje ryzyko nabycia

babeszjozy na drodze pokłucia przez kleszcze z tego gatunku, który jest kompetentnym wektorem pasożyta. *B. microti* wyraźnie dominuje wśród badanej populacji kleszczy stanowiąc 61.5% wszystkich zidentyfikowanych gatunków *Babesia*. Poza kilkoma wyjątkami, *Ixodes ricinus* powszechnie występujący we wschodniej Europie (łącznie z terytorium Polski) jest głównie wektorem *B. microti*, podczas gdy w Europie centralnej i zachodniej u kleszczy zidentyfikowano na ogół *B. venatorum*. Uważa się, że terytorium Niemiec może być obszarem wspólnym dla równorzędnego występowania w kleszczach *B. microti* i *B. venatorum* i/lub *B. divergens*. Taką prawidłowość może wyjaśniać fakt występowania *B. microti* u gryzoni na poziomie 10-20% w Europie Wschodniej, co stanowi znacznie wyższy odsetek w porównaniu do państw Europy Zachodniej. W konsekwencji determinuje to występowanie *B. microti* u kleszczy na tych właśnie obszarach (Siński i wsp. 2006). Prezentowane wyniki potwierdzają poprzednie badania prowadzone na terenach makroregionu lubelskiego (Wójcik-Fatla i wsp. 2006).

Częstość występowania *Babesia* spp. w kleszczach *D. reticulatus* oznaczono na poziomie 2.7%, co daje wynik niższy niż odsetek zarażeń stwierdzony u *I. ricinus*. Podobnie jak w przypadku *I. ricinus*, również u *D. reticulatus* najczęściej występującym gatunkiem pierwotniaka jest *B. microti*. Jak dotąd jedynymi badaniami na obecność *B. microti* u dorosłych kleszczy *D. reticulatus* zebranych z wegetacji były badania przeprowadzone przez nasz zespół (Wójcik-Fatla i wsp.2012), gdzie stwierdzony odsetek zarażeń wyniósł 4.5%. Prezentowane wnioski stanowią pierwsze potwierdzenie uprzednich wyników badań, mimo uzyskanego niższego odsetka zarażeń. Powtarzające się wyniki badań własnych potwierdzają możliwą rolę *D. reticulatus* jako wektora ludzkiej babeszjozy, wymaga to jednak dalszych badań eksperymentalnych. Z kolei oznaczony odsetek zarażeń kleszczy *B. canis* (0.7%) –ważnego czynnika etiologicznego babeszjozy u psów, potwierdza rolę tego gatunku kleszcza jako wektora tego pierwotniaka. Ponadto, zgodne jest to również z innymi badaniami, gdzie we wschodniej części Polski stwierdzano babeszjozę u psów częściej niż w innych rejonach kraju (Adaszek i wsp.2011).

Dominacja *B. microti* wśród wszystkich zidentyfikowanych gatunków *Babesia* spp. jest zgodna z typowym schematem różnorodności gatunkowej *Babesia* we wschodniej Europie. Badania potwierdzają, że populacja kleszczy *I. ricinus* w makroregionie lubelskim jest wektorem co najmniej trzech gatunków *Babesia* spp., z których *B. microti* stanowi największe zagrożenie dla zdrowia ludzi, oraz występowanie co najmniej dwóch gatunków u *D. reticulatus*. Podsumowując, mieszkańcy Polski wschodniej, zwłaszcza terenów zalesionych, mogą ulec zarażeniu pierwotniakiem z rodzaju *Babesia*, w wyniku pokłucia przez kleszcze z gatunku *I. ricinus* – głównego wektora czynnika etiologicznego ludzkiej babeszjozy, jak również przez kleszcze *D. reticulatus* – którego potencjalna rola w transmisji patogenu wymaga jeszcze dalszego potwierdzenia, natomiast przeprowadzone badania nie wykluczają takiej możliwości.

3.2. Występowanie *Francisella tularensis* i *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* [Publikacja nr 2]

Francisella tularensis (*F. tularensis*) należy do tlenowych bakterii Gram-ujemnych i jest czynnikiem etiologicznym tularemii – choroby odzwierzęcej o szczególnie dużej zakaźności. Rezerwuarem pałeczek *F. tularensis* są zwierzęta kręgowce, głównie zające i drobne gryzonie. U ludzi przebieg kliniczny tularemii może przybierać różne postacie (m.in. postać wrzodziejąco-węzłową, oczno-węzłową, anginową, płucną i trzewną), często o bardzo ciężkim przebiegu i dające złe rokowania. Zachorowania pojawiają się sporadycznie i występują najczęściej na półkuli północnej, włączając Amerykę Północną, Europę i Azję. W obrębie gatunku *Francisella* wyróżnia się trzy podgatunki: *F. tularensis*, *F. holarctica* i *F. mediasiatica*. Do zakażenia tularemią u ludzi dochodzi najczęściej na skutek kontaktu z krwio pijnymi stawonogami (kleszcze, moskity, gzy) oraz z zakażonymi zwierzętami (głównie z zajęcami i królikami) lub produktami zanieczyszczonymi ich wydaliniami. Do infekcji może również dojść na drodze aerogennej (poprzez wdychanie zainfekowanego aerozolu) lub poprzez spożywanie wody zakażonej bakteriami *F. tularensis* (Carvalho i wsp. 2014). W ostatnich latach w Europie odnotowano wzrost liczby zachorowań na tularemię w wyniku wykrywania nowych ognisk endemicznych tej choroby. Głównym wektorem *F. tularensis* są kleszcze należące do gatunków: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* i *Ornithodoros*.

Wiele gatunków kleszczy jest również rezerwuarem bakterii blisko spokrewnionych z *Francisella tularensis* – *Francisella-like endosymbionts* (FLEs). Właściwości patogenne FLEs są jak dotąd nierozpoznane, mimo że stwierdzono u nich obecność sekwencji homologicznych do genów *iglC* i *mglA* biorących udział w patogenezie zakażeń *F. tularensis* (Machado-Ferreira i wsp. 2009). *Francisella-like endosymbionts* namnażają się wewnątrzkomórkowo. Wykazano również ich zdolność do transmisji transowarialnej. Obecność FLEs w różnych gatunkach kleszczy potwierdzono na czterech kontynentach (Scoles 2004). W Europie jak dotąd FLEs wyizolowano z kleszczy *Dermacentor reticulatus* na Węgrzech, we Francji i w Niemczech, natomiast w Bułgarii bakterie wykryto dodatkowo u kleszczy z gatunków *Hyalomma marginatum marginatum*, *Hyalomma aegyptium* i *Rhipicephalus sanguineus*. Do chwili obecnej brak jest doniesień naukowych odnośnie zakażeń tymi patogenami na terenach endemicznych Polski.

Celem pracy było zbadanie kleszczy z gatunków *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* na obecność bakterii *Francisella tularensis*, jak również zbadanie potencjalnej roli kleszczy jako rezerwuaru *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) na terenie makroregionu lubelskiego (wschodnia Polska).

Ogółem przebadano 530 kleszczy *Dermacentor reticulatus* i 861 kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych z wegetacji na czterech wybranych stanowiskach województwa lubelskiego. W celu identyfikacji DNA *Francisella* wykonano reakcję PCR w oparciu o amplifikację fragmentów genów 16S rRNA (*rrs*) i *tul4*. Dodatkowo, próby pozytywne

były przebadane na obecność fragmentu genu *lpnA* kodującego fragment lipoproteiny 17 kDA. Fragment genu *lpnA* o długości 233 pz. jest rekomendowany jako właściwy marker genetyczny w celu odróżnienia *F. tularensis* od FLEs. Spośród badanych kleszczy *Dermacentor reticulatus* tylko u jednej samicy udało się potwierdzić obecność bakterii *Francisella tularensis* podtyp *holarctica* (numer akcesyjny: CP007148), co stanowiło 0,2% wszystkich przebadanych osobników tego gatunku. Z kolei *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) stwierdzono u ponad połowy kleszczy *Dermacentor reticulatus* (50,4%). Stwierdzono również istotną statystycznie zależność występujących zakażeń FLEs odnośnie miejsca zbioru kleszczy ($P=0.008$) oraz płci: samice *Dermacentor reticulatus* były częściej zakażone niż samce ($P=0.0034$). Nie stwierdzono zakażeń *F. tularensis* u kleszczy *Ixodes ricinus*. Obecność *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) potwierdzono jedynie u 0,8% przebadanych osobników. Infekcje FLE kleszczy tego gatunku były zależne od stadium rozwojowego. Nie potwierdzono zakażeń u nimf, a jedynie u samic i samców.

Analiza sekwencyjna 30 losowo wybranych prób dodatnich kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* w kierunku zakażeń FLEs potwierdziła 100% homologii z sekwencją nukleotydową genu *tul4* (GenBank accession no. EU126640) szczepu FLE wykrytego u *D. reticulatus* na Węgrzech (Sréter-Lancz i wsp. 2009). Analiza sekwencyjna potwierdziła również 100% homologii ze znanymi sekwencjami genu *lpnA* (numery akcesyjne: FN686808-FN686813, FN686815, FN686816, HM629449 i KJ477082) oraz 100% homologii z sekwencjami genu *rrs* (numery akcesyjne: JX561116, JQ942365, HQ705173 i EU234535).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na znikomy udział zarówno kleszczy *D. reticulatus* jak i *I. ricinus* w krążeniu bakterii *F. tularensis* w środowisku naturalnym na terenach Polski wschodniej. Z drugiej strony badania własne potwierdzają wysoki odsetek zakażeń kleszczy *D. reticulatus* patogenami *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) o nieznanym patogenezie, których obecność w kleszczach wykryto również w innych krajach europejskich. Po raz pierwszy udało się potwierdzić infekcje bakteriami FLEs u kleszczy *Ixodes ricinus*. Według aktualnej wiedzy, prowadzone badania nad zakażeniami kleszczy *F. tularensis* podtyp *holarctica* i *Francisella-like endosymbionts* (FLEs) były pierwszymi w Polsce. Również po raz pierwszy w Polsce wykryto *F. tularensis* u *Dermacentor reticulatus*.

3.3. Występowanie *Rickettsia* spp. w kleszczach *Dermacentor reticulatus*

[Publikacja nr 3]

Rickettsia spp. należy do małych Gram-ujemnych bakterii przenoszonych przez różne stawonogi, takie jak kleszcze, pchły i wszy. Bakterie *Rickettsia* spp. transmitowane przez kleszcze w większości należą do grupy gorączek plamistych (Spotted Fever Group Rickettsiae –SFGR). W Eurazji licznie identyfikowane w ciągu ostatniej dekady gatunki tych wewnątrzkomórkowych bakterii zostały uznane za tzw. patogeny typu „emerging”. Do grupy tej zaliczyć możemy takie gatunki jak *Rickettsia helvetica*, *R. raoultii*, *R. slovaca*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. sibirica*, *R. monacensis*, *R.*

massiliae, *R. hoogstraalii*, *R. japonica*. U ludzi mogą powodować występowanie gorączek plamistych, objawów grypopodobnych, limfadenopatię, perimyocarditis oraz wielu innych zaburzeń. Za główny wektor *Rickettsia* spp. w Europie uważany jest gatunek kleszcza – *Ixodes ricinus*, podczas gdy *Dermacentor reticulatus*, a także kilka innych gatunków kleszczy (*Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis sulcata*) jest wskazywanych jako wektor dodatkowy.

Celem prezentowanej pracy było określenie prevalencji *Rickettsia* spp. w kleszczach z gatunku *Dermacentor reticulatus* w rejonach Polski wschodniej. Do badań zebrano z vegetacji 528 osobniki na 7 stanowiskach makroregionu lubelskiego, które przebadano na obecność fragmentu DNA *Rickettsia* spp. metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). W reakcji amplifikacji zastosowano primery komplementarne do fragmentu genu kodującego syntazę cytrynianową (*gltA*). Analizę filogenetyczną nowo zidentyfikowanej sekwencji nukleotydowej (która została umieszczona w bazie GeneBank pod numerem akcesyjnym JX402775) przeprowadzono za pomocą oprogramowania MEGA (v. 5). Drzewo filogenetyczne zostało skonstruowane z wykorzystaniem algorytmu Neighbor-Joining.

Z 528 dorosłych osobników *Dermacentor reticulatus* u 280 (53.0%) wykryto obecność *Rickettsia* spp. Odsetki zakażeń zarówno u samic jak i samców były wysokie i na zbliżonym poziomie (odpowiednio: 52.5% i 53.8%). Stwierdzono zależność częstości występowania zakażeń w zależności od miejsca zbioru ($P < 0.001$), co może sugerować ogniskowy charakter dystrybucji identyfikowanej bakterii. Analiza sekwencyjna prób dodatnich w kierunku *Rickettsia* spp. potwierdziła 100% homologii produktów amplifikacji z sekwencją części *cdc* genu syntazy cytrynianowej (*gltA*): *Rickettsia raoultii* szczep Khabarovsk (numer akcesyjny: DQ365804) i szczep Marne (numer akcesyjny: DQ365803). Jedna sekwencja wykazywała mniejszą homologię (99%) z sekwencją *R. raoultii* i została zdeponowana w GenBank jako blisko spokrewniona z *R. raoultii* pod numerem akcesyjnym JX402775.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na częste występowanie *Rickettsia raoultii* w kleszczach *D. reticulatus* zebranych z vegetacji w makroregionie lubelskim, sięgające 50%. Taki rezultat potwierdza występowanie naturalnych ognisk tych bakterii na terenie wschodniej Polski. Badania własne pozostają w zgodzie z badaniami innych naukowców, gdzie na terenie Polski północno-wschodniej u kleszczy z gatunku *D. reticulatus* występowanie *Rickettsia raoultii* potwierdzono u 56,7% osobników (Chmielewski i wsp. 2009). Również w badaniach Stańczak (2006a) 40.7% kleszczy należących do tego gatunku było zainfekowanych gatunkami bakterii z grupy SFGR. Z kolei występowanie bakterii SFGR u kleszczy *I. ricinus* oznaczono na niższym poziomie, gdzie odsetek zakażeń mieścił się w granicach 2,9-18,2% (Stańczak 2006b).

W przedstawionej pracy analiza sekwencyjna potwierdziła homologię uzyskanych sekwencji do *Rickettsia raoultii* na poziomie 99-100% co pozwala zaklasyfikować badane izolaty do tego gatunku. Gatunek ten, należący do grupy SFGR, opisano wspólnie z *Rickettsia slovaca* jako czynnik etiologiczny zespołu chorobowego TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy), znanego również pod nazwą DEBONEL

(Dermacentor-borne necrosis, erythema and lymphadenopathy) lub SENLAT (scalp eschar and neck lymphadenopathy after tick bite) (Rieg i wsp. 2011). Ostatnio w Polsce Świtaj i wsp. (2012) opisali kliniczny przypadek riketsjozy wywołanej przez *R. raoultii*. W związku z powyższym *D. reticulatus* powinien być brany pod uwagę jako potencjalny wektor i rezerwuuar *Rickettsia raoultii*, zwłaszcza ze względu na dużą częstotliwość występowania tych bakterii u kleszczy, co stwarza ryzyko wystąpienia u ludzi chorób o obrazie klinicznym odpowiadającym przypadkom TIBOLA.

3.4. Występowanie *Leptospira* spp. w kleszczach *Ixodes ricinus*

[Publikacja nr 5]

Do rodzaju *Leptospira* należą bakterie zaliczane do cienkich ruchomych krętków, głównie zasiedlających kanaliki nerkowe gryzoni, ale również innych zwierząt dzikich i hodowlanych. Do zakażenia człowieka dochodzi najczęściej przez uszkodzoną skórę, błony śluzowe i spojówki w przypadku kontaktu z moczem, jak również bezpośredniego kontaktu z tkankami zakażonych zwierząt. Głównym rezerwuarem krętków *Leptospira* są gryzonie, które wraz z moczem wydalają bakterie do środowiska, przez co do zakażenia ludzi i zwierząt może dojść na drodze kontaktu z zakontaminowaną wodą i glebą. W zależności od wielu czynników, choroba może mieć przebieg łagodny z grypopodobnymi objawami; w ostrej postaci choroby przeważają objawy uszkodzeń wielu narządów. Leptospiroza jest uznawana za jedną z najbardziej rozpowszechnionych zoonoz na świecie. Sytuacja ta jest ściśle związana z postępującymi zmianami klimatycznymi, częstszymi przypadkami pojawiania powodzi, cyklonów, co znacznie zwiększa ryzyko rozprzestrzeniania się tej bakterii (Vijayachari i wsp. 2008).

Do chwili obecnej ukazało się tylko kilka doniesień dotyczących transmisji krętków *Leptospira* przez kleszcze. Ponad 50 lat temu Burgdorfer (1959) udowodnił eksperymentalnie transmisję *Leptospira pomona* przez kleszcze z gatunku *Dermacentor andersoni* i *Amblyomma maculatum*, podczas gdy naukowcom z Kazachstanu (Krepkogorskaya i Rementsova 1957) udało się wyizolować 2 szczepy *Leptospira grippotyphosa* z kleszczy *Dermacentor marginatus*. Prezentowana praca przedstawia aktualny stan wiedzy w odniesieniu do zakażeń kleszczy *Ixodes ricinus* krętkami *Leptospira* spp., ze względu na rolę tego gatunku kleszcza jako siedliska różnorodnych patogenów oraz udziału w ich transmisji.

Celem pracy było przebadanie kleszczy *Ixodes ricinus* na obecność bakterii *Leptospira* spp. Badania były prowadzone na terenach rolniczych dwóch gmin: Wilkowa – obszaru objętego powodzią oraz Dąbrowy – stanowiska kontrolnego, które nie zostało dotknięte powodzią. Ogółem przebadano 836 kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych w czasie dwóch sezonów wegetacyjnych wiosna/lato w latach 2011-2012, z czego 540 osobników zebrano z terenów popowodziowych i 296 z terenów kontrolnych. Badania przeprowadzono metodą nested-PCR w celu wykrycia fragmentów DNA *Leptospira* spp. Dodatkowo przeprowadzono badania w kierunku zakażeń kleszczy innymi krętkami – *Borrelia burgdorferi* sensu lato, w celu

wykluczenia wystąpienia wyników fałszywie dodatnich pomiędzy obydwoma gatunkami bakterii. Do identyfikacji DNA *Leptospira* spp. wykorzystano jako marker genetyczny fragment genu kodującego lipo proteinę LipL32, podczas gdy fragment genu *fla* kodującego białko wici (flagelinę) został wykorzystany jako marker genetyczny do identyfikacji DNA dla gatunku zbiorowego *Borrelia burgdorferi* sensu lato.

Ogółem odsetek zakażeń przebadanych kleszczy *Ixodes ricinus* w kierunku *Leptospira* spp. wyniósł 10.5%. Znacznie wyższe odsetki zakażeń stwierdzono u nimf (16.9%) w porównaniu do osobników dorosłych- samców i samic (odpowiednio 7.1% i 7.9%) ($P < 0.01$). Częstość występowania DNA *Leptospira* spp. w kleszczach była zdecydowanie większa wśród osobników zebranych z terenów popowodziowych niż z terenów kontrolnych (odpowiednio 15.6% vs. 1.4%, $P < 0.0001$). Nie wykryto istotnych statystycznie korelacji pomiędzy występowaniem *Leptospira* spp. i *Borrelia burgdorferi* s.l. u badanych kleszczy, co jednocześnie potwierdza prawidłową detekcję bakterii z rodzaju *Leptospira* spp. i wyklucza występowanie fałszywie pozytywnych reakcji krzyżowych z DNA *B. burgdorferi* s.l.

Podsumowując, prezentowana praca przedstawia po raz pierwszy wyniki badań nad występowaniem *Leptospira* spp. w kleszczach należących do gatunku *Ixodes*. Wnioski wynikające z publikacji wskazują na możliwą transmisję tego patogenu przez kleszcze *Ixodes ricinus*, co może mieć ogromne znaczenie w kontekście badań epidemiologicznych. Jednocześnie nie neguje się głównego sposobu transmisji *Leptospira* poprzez kontakt z moczem zakażonych gryzoni. Natomiast udział kleszczy w transmisji patogenu może okazać się możliwą alternatywną drogą rozprzestrzeniania się bakterii, co wyjaśniałoby pojawianie się nietypowych przypadków leptospirozy w różnych częściach świata. Szczególnie częste występowanie *Leptospira* spp. w kleszczach z terenów popowodziowych może sugerować potencjalną rolę gatunku *Ixodes ricinus* w podtrzymywaniu krążenia leptospiroz w środowisku na terenach zalewowych. Możliwa jest również rola kleszczy jako rezerwuaru krętków umożliwiającego ich przetrwanie w okresach poprzedzających kolejne powodzie.

3.5. Występowanie wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*

[Publikacja nr 6]

Czynnikiem etiologicznym kleszczowego zapalenia mózgu – KZM (ang. *Tick-borne encephalitis* TBE), zwanego również wczesnoletnim lub wiosenno-letnim zapaleniem mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych, jest wirus kleszczowego zapalenia mózgu należący do rodziny *Flaviviridae*. Tereny endemiczne występowania KZM obejmują obszary centralnej i wschodniej Europy sięgając po rejony Azji wschodniej. W krajach europejskich zakażenie wirusem kleszczowego zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych jest jedną z najbardziej niebezpiecznych i potencjalnie śmiertelnych infekcji centralnego układu nerwowego. Występowanie zakażeń wirusem KZM jest ściśle związane z jego rezerwuarem, który stanowią określone gatunki

kleszczy twardych z rodziny Ixodidae (np. *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis inermis*). Występowanie naturalnych ognisk endemicznych wirusa KZM jest możliwe dzięki krążeniu patogenu pomiędzy jego wektorem (kleszcze) a rezerwuarem, który stanowią zwierzęta kręgowce – głównie gryznie. Polska jest jednym z krajów o zlokalizowanych obszarach endemicznych występowania wirusa KZM, m.in. na podstawie badań nad detekcją wirusa w kleszczach. W oparciu o metody z zakresu biologii molekularnej (m.in. nested-PCR i real-time PCR) dystrybucja patogenu w kleszczach była oznaczana w wielu krajach europejskich.

Celem badań przedstawionych w publikacji było określenie prevalencji wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach na terenie makroregionu lubelskiego. Ogółem przebadano 875 kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus* (270 samic, 240 samców, 365 nimf) oraz 148 kleszczy z gatunku *Dermacentor reticulatus* (97 samic oraz 51 samców). Kleszcze zbierano w ciągu dwóch sezonów wegetacyjnych od kwietnia do września w latach 2008-2009, metodą flagowania. Obszar badań obejmował głównie lasy liściaste i mieszane w 9 wybranych rejonach województwa lubelskiego. Kleszcze *I. ricinus* badano w pulach, natomiast osobniki *D. reticulatus* były badane pojedynczo. Wyizolowane RNA przepisywano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Do identyfikacji wirusa kleszczowego zapalenia mózgu zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) – nested PCR, według modyfikacji własnej opartej na metodzie opisanej przez Schrader i Süß (1999). Jako marker genetyczny przy identyfikacji wirusa zastosowano fragment terminalnego regionu niekodującego (5'-terminal noncoding region). Próby dodatnie w reakcji nested-PCR były poddane analizie sekwencyjnej.

Ogółem odsetek zakażeń kleszczy *Ixodes ricinus* wirusem KZM wyniósł 1,6%, z uwzględnieniem minimalnego wskaźnika zakażenia (*ang.* MIR- minimum infection rate). Najwyższe odsetki zakażeń stwierdzono w dwóch badanych rejonach usytuowanych w bliskiej odległości od miasta Lublin (odpowiednio 4.3% i 2.0%). Na pozostałych terenach minimalny wskaźnik zakażenia kleszczy mieścił się w granicach od 0% do 1.4%. Spośród wszystkich przebadanych osobników najbardziej zakażone okazały się samice (2,2%). Nieco niższy odsetek zakażeń stwierdzono u samców (1,7%) i najniższy dla nimf (1,1%). Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej nie wykazano istotnej zależności pomiędzy odsetkami zakażeń a miejscem zbioru kleszczy, a także ich stadium rozwojowym.

Zdecydowanie wyższy odsetek zakażeń wirusem KZM stwierdzono wśród kleszczy *D. reticulatus*, gdzie na 148 przebadanych osobników 16 było dodatnich (10,8%). Nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy zakażeniami wśród samców i samic (odpowiednio: 10,3% i 11,8%). Z kolei stwierdzono istotne statystycznie różnice w odsetkach zakażeń na poszczególnych stanowiskach ($P=0,006$), gdzie procent wyników dodatnich mieścił się w zakresie od 0% do 14,3%.

Analiza sekwencyjna prób pozytywnych otrzymanych zarówno z kleszczy *I. ricinus* jak i *D. reticulatus* potwierdziła 96-100% homologii amplifikatów ze znanymi sekwencjami wirusa KZM: GQ266392 (TBEV szczep AS33), FJ572210 (TBEV szczep

Salem), U39292 (TBEV szczep Hypr), U27495 (TBEV szczep Neudoerfl). W analizie sekwencyjnej nie stwierdzono różnic pomiędzy izolatami otrzymanymi z kleszczy *I. ricinus* i *D. reticulatus*.

Uzyskane wyniki badań nad dystrybucją wirusa kleszczowego zapalenia mózgu w kleszczach *I. ricinus* korelują z wynikami badań przeprowadzonymi w Niemczech. Odsetek zakażeń wirusem KZM wśród 9189 kleszczy *I. ricinus* na terenach południowo-zachodnich Niemiec mieścił się w granicach od 0% do 2,3% (Oehme i wsp. 2002). Z kolei w Szwajcarii uzyskano znacznie wyższe odsetki zakażeń (14,3%), gdzie stwierdzono występowanie u kleszczy wirusa KZM podtypu zachodnio-europejskiego (Western European TBEV subtype) na terenach endemicznych kraju (Casati i wsp. 2006). Z kolei odsetek zakażeń stwierdzony dla kleszczy *D. reticulatus* w przedstawionej pracy jest znacznie wyższy w porównaniu do kleszczy *I. ricinus*, nawet przy uwzględnieniu minimalnego wskaźnika zakażenia. Wyniki badań wskazują na ważną rolę kleszczy *D. reticulatus* w transmisji wirusa KZM, co dowodziły już wcześniejsze badania prowadzone przez Katin (1996) na terenach zachodniej Syberii (w rejonie Tyumen). Wyizolowano wówczas 25 szczepów KZM z różnych stadiów rozwojowych kleszczy *D. reticulatus*. Eksperymentalnie dowiedziono również, że istnieje możliwość transmisji transowarialnej wirusa KZM w cyklu życiowym tego gatunku kleszcza.

Do chwili obecnej istnieje niewielka liczba naukowych doniesień dotyczących roli kleszczy *D. reticulatus* w epidemiologii kleszczowego zapalenia mózgu na terenach centralnej Europy. Występowanie wirusa KZM udało się potwierdzić u 0,33% kleszczy *D. reticulatus* na terenach endemicznych północno-wschodniej Polski (Kondrusik i wsp. 2010). Na podstawie dostępnej wiedzy naukowej, uzyskane wyniki badań nad infekcjami *D. reticulatus* wirusem KZM (powyżej 10%) są jak dotąd jednymi z najwyższych w Europie centralnej, co może potwierdzać potencjalną rolę tego gatunku kleszczy jako wektora wirusa KZM. Potwierdzają to również dane epidemiologiczne dotyczące przypadków klinicznych kleszczowego zapalenia mózgu, z których większość jest odnotowywana na terenach endemicznych o dużym zasięgu występowania kleszczy *D. reticulatus*.

Wyniki badań prezentowane w publikacji pozwalają stwierdzić występowanie terenów endemicznych kleszczowego zapalenia mózgu we wschodniej Polsce na terenie makroregionu lubelskiego, jak również potwierdzają potencjalne występowanie tego typu obszarów w innych rejonach Polski, ze względu na rozpowszechnienie *D. reticulatus*.

3.6. Występowanie hantawirusów w kleszczach *Ixodes ricinus*

[Publikacja nr 7]

Hantawirusy należą do jednoniciowych RNA wirusów, przynależnych do rodziny Bunyviridae. Infekcje wywołane przez hantawirusy (HDV) stanowią narastający problem zdrowotny i określane są mianem “emerging infectious diseases” – nowo pojawiających się chorób zakaźnych. W Eurazji rozpowszechnione są dwie

postacie choroby: 1) gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym (HFRS) wywoływana przez wirusy: Hantaan (HTNV), Dobrava (DOBV) oraz Seoul (SEOV), gdzie śmiertelność sięga nawet 20%, oraz 2) epidemiczna nefropatia (NE) o znacznie łagodniejszym przebiegu, którą wywołują wirusy Puumala (PUUV) i and Saaremaa (SAAV). W ostatnich latach pierwszy przypadek infekcji wywołanej przez hantawirusy w Polsce odnotowano w rejonie Karpat w południowej części kraju. Ogółem odnotowano 13 potwierdzonych serologicznie przypadków klinicznych zakażeń hantawirusami, z czego 10 miało symptomy schorzenia typu HFRS wywołanych wirusem DOBV i 2 o charakterze NE wywołanych wirusem PUUV (Nowakowska i wsp. 2009).

Rezerwuarem i wektorem hantawirusów są małe gryzonie, a infekcje u ludzi pojawiają się najczęściej na drodze inhalacji poprzez wdychanie powietrza zanieczyszczonego odchodami zwierzęcymi. Niemniej jednak rozważane są inne drogi zakażenia włączając m.in. transmisję wirusa przez krwiopijne stawonogi, takie jak kleszcze i roztocza (Houck i wsp. 2001). Biorąc pod uwagę wyniki badań Knapa i wsp. (2010), w których stwierdzono obecność przeciwciał przeciw hantawirusom na poziomie 2.5% wśród pracowników leśnictwa Roztoczańskiego Parku Narodowego we wschodniej Polsce, założono, że istnieje możliwość transmisji wirusa przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus*. Według dostępnej mi wiedzy, nie prowadzono dotychczas badań nad możliwym udziałem kleszczy zarówno z gatunku *I. ricinus* jak i *D. reticulatus* w przeniesieniu hantawirusów.

Ogółem na obecność hantawirusów przebadano 174 kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* (104 nimfy, 36 samców i 34 samice), zebrane z wegetacji na terenie Roztoczańskiego Parku Narodowego we wschodniej Polsce – rejonu gdzie we wcześniejszych badaniach uzyskano seropozytywne wyniki u osób zamieszkujących i pracujących na tym obszarze. Kleszcze zbierano metodą flagowania w obrębie lasów liściastych i mieszanych metodą flagowania. Kleszcze przechowywano do czasu dalszych oznaczeń żywe lub mrożono je w temp. -80 °C. Pojedyncze osobniki miażdżono w ciekłym azocie i homogenizowano, a następnie zawieszano w buforze zawierającym izotiocyanian guanidyny (GITC) hamujący działanie RNaz. Całościowe RNA zostało wyizolowane przy użyciu zestawów kolumnkowych do izolacji RNA z tkanek (RNeasy Mini Kit, Qiagen). Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) została przeprowadzona z użyciem kitu komercyjnego QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen). Reakcję PCR oparto na amplifikacji fragmentu genu segmentu S i L, według metodyki opisanej przez Arai i wsp. (2008).

W przebadanych kleszczach *Ixodes ricinus* nie stwierdzono obecności RNA hantawirusów. Pomimo użycia dwóch specyficznych primerów komplementarnych do dwóch różnych segmentów (S i L) wyniki dodatnie uzyskano jedynie dla kontroli pozytywnych. W związku z powyższym, nie potwierdzono hipotezy o możliwym udziale kleszczy w transmisji hantawirusów. W celu gruntownego wykluczenia kleszczy jako wektorów, należałoby kontynuować badania na znacznie większej liczbie osobników. Również późniejsze badania nad występowaniem hantawirusów w

kleszczach z gatunku *Dermacentor reticulatus* nie potwierdziły obecności wirusów u przebadanych osobników (Wójcik-Fatla i wsp. 2013).

3.7. Występowanie *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus*

[Publikacje nr 5 i 8]

Krętki należące do kompleksu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) są przenoszone głównie przez kleszcze z rodzaju *Ixodes* i powodują boreliozę – wielonarządową chorobę, która należy do najpowszechniej występującej choroby odkleszczowej w północnej części globu. Aktualnie znanych jest 19 genogatunków w obrębie kompleksu *B. burgdorferi* s. l., z których co najmniej 9 (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. bavariensis*, *B. bissettii*, *B. finlandensis*, *B. carolinensis*, i *B. lusitaniae*) występuje w Europie. Najważniejsze pod względem patogennym dla człowieka są trzy genogatunki, wywołujące odmienne i najpoważniejsze w skutkach objawy chorobowe charakterystyczne dla boreliozy z Lyme (LB): *B. burgdorferi* sensu stricto wywołujący postać stawową, *B. garinii* – wywołujący neuroboreliozę i *B. afzelii* – związany głównie z objawami skórными (zanikowe zapalenie skóry, chłoniak limfatyczny skóry) (Rauter i Hartung 2005).

Według niektórych autorów liczba przypadków boreliozy w Europie ma tendencję wzrostową. Takie wnioski potwierdzają oficjalne statystyki prowadzone w Polsce przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, w których liczba zachorowań wzrosła z 8,225 w 2008 roku do 13,875 w roku 2014 (Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce, Warszawa 2008-2014). Jedną z przyczyn obecnej sytuacji epidemiologicznej boreliozy może być wzrastająca liczba zainfekowanych krętkami *Borrelia* kleszczy *I. ricinus* – gatunku najpowszechniej występującego w Polsce i Europie oraz będącego kompetentnym wektorem i rezerwuarem bakterii. Próba potwierdzenia tej tezy były badania na obecność DNA *B. burgdorferi* s.l w kleszczach *I. ricinus*, których wyniki przedstawiono w dwóch publikacjach.

Celem prezentowanych publikacji było określenie roli kleszczy *Ixodes ricinus* jako potencjalnego wektora i rezerwuaru krętków *B. burgdorferi* s.l. w makroregionie lubelskim (wschodnia Polska). Celem założonym w pierwszej publikacji z 2009 roku [publikacja 8] było określenie częstości zakażenia kleszczy *I. ricinus* krętkami *Borrelia* w ramach ich przynależności do kompleksu *B. burgdorferi* s.l. w latach 2007-2009, podczas gdy w kolejnej publikacji z 2012 roku [publikacja 5] oznaczono prevalencję oraz różnorodność genogatunkowe wykrytych bakterii w kleszczach, zebranych na terenie Lubelszczyzny w latach 2011-2012.

Pierwsze badania [publikacja 8] przeprowadzono na grupie 715 osobników *I. ricinus* (295 nimf, 212 samców i 208 samic), zebranych na 4 stanowiskach makroregionu lubelskiego w latach 2007-2008 metodą flagowania. Detekcję fragmentu DNA *Borrelia* wykonano metodą PCR z wykorzystaniem primerów komplementarnych do fragmentu genu *fla* kodującego białko wici krętka, specyficznego dla gatunku zbiorowego *B. burgdorferi* s.l (Wodecka i Skotarczak 2000).

Ogółem odsetek zakażeń kleszczy *I. ricinus* *B. burgdorferi* s.l. wyniósł 12.7%. Występowanie zakażeń było w znaczący sposób zależne od miejsca zbioru, a także od stadium rozwojowego kleszczy. Odsetek infekcji stwierdzony dla nimf (7.1%) był wyraźnie niższy w porównaniu do samców (13.7%, $P=0.0143$) i samic (19.7%, $P<0.0001$). Na podkreślenie zasługuje fakt, że otrzymane wyniki były co najmniej dwukrotnie wyższe od wyników otrzymanych we wcześniejszych badaniach prowadzonych na terenie województwa lubelskiego w latach 2005-2006, gdzie odsetek zakażeń wyniósł 5.4% (Cisak i wsp. 2006).

W kolejnych badaniach [publikacja 5] przebadano ogółem 836 kleszczy *I. ricinus* (266 nimf, 280 samców i 290 samic) zebranych z wegetacji na dwóch stanowiskach makroregionu lubelskiego w latach 2011-2012. W pierwszym etapie badań kleszcze przebadano na obecność fragmentu DNA *B. burgdorferi* s.l. stosując jako marker genetyczny gen *fla* (Wodecka i Skotarczak 2000). W drugim etapie, próby dodatnie zostały oznaczone do genogatunku metodą nested-PCR, z uwzględnieniem trzech z nich, szczególnie patogennych dla człowieka, tj. *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* i *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Detekcję *B. burgdorferi* s.l. oraz poszczególnych genogatunków prowadzono równolegle z detekcją *Leptospira* spp. w kleszczach, w celu wykluczenia wystąpienia reakcji krzyżowych mogących dać wyniki fałszywie dodatnie przy oznaczaniu obydwu gatunków krętków.

Średnia prewalencja *B. burgdorferi* s.l. w kleszczach *I. ricinus* została określona na poziomie 24.3%, dając tym samym dwukrotnie wyższy wynik niż miało to miejsce w pierwszych badaniach. Wykazano również znaczące różnice w zakażeniach kleszczy odnośnie miejsca ich zbioru. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic biorąc pod uwagę stadium rozwojowe *I. ricinus*. W badanych materiale stwierdzono występowanie genogatunkowych infekcji mieszanych na niemal identycznym poziomie co infekcji pojedynczym genogatunkiem (12.1% vs. 12.2%). Biorąc pod uwagę zarówno pojedyncze jak i mieszane infekcje, najczęściej występującym genogatunkiem okazał się genogatunek *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (15.6%). Mniejsza liczba kleszczy zakażona była *Borrelia garinii* (11.5%), natomiast genogatunkiem najrzadziej występującym okazał się *Borrelia afzelii* (9.7%). Wyniki oznaczeń genogatunkowym potwierdzają rezultaty z lat 2005-2006, gdzie *B. burgdorferi* sensu stricto również okazał się najpowszechniej występującym genogatunkiem w makroregionie lubelskim (Cisak et al. 2006). Pewnym ograniczeniem przy porównywaniu wyników badań obu prac jest fakt, że kleszczy nie zbierano dokładnie na tych samych stanowiskach.

Podsumowując, wyraźnie zaznaczona jest tendencje wzrostowa zakażeń kleszczy *I. ricinus* krętkami *Borrelia*, od 12.7% w 2009 roku do 24.3% w roku 2012 ($P<0.0001$). Obserwowane zjawisko zdecydowanie zwiększa ryzyko zachorowań na boreliozę, głównie wśród osób pracujących, zamieszkujących bądź przebywających rekreacyjnie na terenach leśnych makroregionu lubelskiego. Wyniki badań własnych pozostają także w zgodzie z obserwowanych wzrostem liczby stwierdzanych przypadków boreliozy w oficjalnych statystykach.

3.8. Występowanie *Toxoplasma gondii* w kleszczach *Ixodes ricinus*

[Publikacja nr 8]

Toxoplasma gondii jest obligatoryjnym wewnątrzkomórkowym pasożytniczym pierwotniakiem w obrębie typu Apicomplexa, rodziny Sarcocystidae. Żywicielem ostatecznym pierwotniaka są kotowate, podczas gdy żywicielem pośrednim jest wiele innych gatunków ssaków i ptaków, w których stwierdzono powszechne występowanie *T. gondii*. U ludzi pasożyt wywołuje toksoplazmozę, która zazwyczaj ma przebieg bezobjawowy, ale w niektórych przypadkach może być przyczyną poważnych powikłań zdrowotnych. Najniebezpieczniejszą postacią choroby jest toksoplazmoza wrodzona, kiedy zarażenie płodu następuje w wyniku przekazania *T. gondii* przez łożysko, powodując zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym (m.in. padaczkę, niedorozwój umysłowy i psychomotoryczny, zwapnienia śródczaszkowe, rozległe uszkodzenie gałki ocznej). Poważny problem kliniczny stanowią również nieliczne przypadki toksoplazmozy ocznej, neurotoksoplazmozy i toksoplazmozy rozsianej, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością (np. w trakcie terapii immunosupresyjnej czy chorzy na AIDS) (Dubey i Beattie 1988). Wyróżniane są trzy główne genotypy (I, II i III) odpowiedzialne za większość infekcji u ludzi.

Transmisja *T. gondii* drogą pokarmową (przez spożycie surowego mięsa zawierającego cysty pasożyta, czy wody i żywności zanieczyszczonej przez kocie odchody zawierające oocysty *T. gondii*) jest uważana za podstawową przyczynę pierwotnych infekcji. Jednakże ta droga nie wyjaśnia do końca powszechnego występowania tego pierwotniaka u różnorodnych żywicieli, takich jak roślinożerne ssaki, dzikie gryzonie i ptaki, które nie żywią się surowym mięsem i nie mają kontaktu z kocimi odchodami. Z tego powodu w dawniejszych badaniach zakładano istnienie alternatywnych dróg szerzenia się *T. gondii*, m.in. przez uszkodzoną skórę czy transmisję pierwotniaka przez żywiące się krwią stawonogi, głównie kleszcze (Gidel i Provost 1965).

W Polsce Deryło i wsp. (1978) udowodnili eksperymentalnie transmisję pierwotniaków *Toxoplasma gondii* przez nimfy kleszczy z gatunku *Ixodes ricinus*, gdzie w badaniach mikroskopowych stwierdzono obecność tachyzoitów i bradyzoitów *T. gondii* w tkankach nimf i samic. Przepuszczalna rola kleszczy *I. ricinus* jako potencjalnego wektora *T. gondii* została potwierdzona badaniami molekularnymi w 2003 roku, gdzie DNA pierwotniaka stwierdzono u 2 z 92 kleszczy *I. ricinus* (2.2%) zebranych z terenów leśnych makroregionu lubelskiego. W kolejnych badaniach w 2008 roku określono również występowanie *T. gondii* u kleszczy zebranych w północno-zachodniej Polsce, gdzie odsetek zarażeń wyniósł 12.7% (Sroka i wsp. 2008).

Celem pracy było określenie prevalencji *T. gondii* w kleszczach z gatunku *I. ricinus* zebranych z terenów Lubelszczyzny (wschodnia Polska) na większej grupie osobników niż miało to miejsce w 2003 roku. Ogółem przebadano 715 osobników zebranych z vegetacji na 4 stanowiskach leśnych w latach 2007-2009. Detekcji DNA dokonano na podstawie amplifikacji fragmentu genu B1 (35-fold-repetitive gene B1) w reakcji nested-PCR według metodyki opisaną przez Grigg i Boothroyd (2001).

Identyfikację genotypu (I i II/lub/III) wyizolowanego *T. gondii* przeprowadzono na podstawie analizy RFLP stosując enzymy restrykcyjne Eco721 i XhoI. Próbkę dodatkowo sekwencjonowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki-PAN w Warszawie. Otrzymane sekwencje nukleotydowe porównano z wykorzystaniem oprogramowania BLAST z sekwencjami zamieszczonymi w GenBank na serwerze NCBI (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

Ogółem odsetek kleszczy *I. ricinus* dodatnich w kierunku *T. gondii* wyniósł 12.6%. Największy odsetek zarażeń stwierdzono u samic (23.5%), niższy u samców (13.2%) i najniższy u nimf (4.4%). Częstość występowania *T. gondii* u samic była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do samców ($P=0.0066$) i nimf ($P<0.0001$). Istotna statystycznie była również zależność częstości infekcji w zależności od miejsca zbioru ($P=0.007$). Analiza RFLP/PCR udowodniła, że najczęściej identyfikowanymi typami wśród szczepów *T. gondii* były: typ I patogenny dla człowieka (45.5% prób dodatnich) oraz typ atypowy „A” (45.5%). Pozostałe 0.9% stanowił typ II/III potencjalnie patogenny dla człowieka. Analiza sekwencyjna potwierdziła 100% homologii wykrytych sekwencji do sekwencji genu B1 *Toxoplasma gondii*.

Stwierdzony w prezentowanych badaniach odsetek występowania *T. gondii* w kleszczach *I. ricinus* był znacznie wyższy niż w badaniach z lat ubiegłych (2003 i 2008), zarówno na Lubelszczyźnie jak i na terenach północno-zachodniej Polski. Wyniki otrzymanych badań mogą wskazywać na potencjalną rolę kleszczy w transmisji pierwotniaka, zwłaszcza że najwyższe odsetki stwierdzono u samic, które najczęściej żerują na większych zwierzętach i ludziach. Zauważone istotne różnice w dystrybucji zakażonych kleszczy w odniesieniu do miejsc zbioru, potwierdzają ogniskowy charakter dystrybucji tego pierwotniaka w środowisku z wyraźną tendencją wzrostową na terenach o wysokiej wilgotności (np. obszary wokół jezior Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego). Otrzymane wyniki pozostają również w zgodzie z wysokim odsetkiem wyników seropozytywnych w kierunku *T. gondii* wśród leśników z rejonu lubelskiego (68.8%) otrzymanym w testach aglutynacji bezpośredniej. Niemniej jednak uzyskane wyniki badań własnych powinny być interpretowane z dużą ostrożnością. Istnieje potrzeba eksperymentalnego potwierdzenia stawianych założeń, zwłaszcza że niektórym autorom nie udało się wyizolować *T. gondii* z kleszczy zbieranych z roślinności, ani potwierdzić doświadczalnie transmisji pierwotniaka przez te stawonogi.

Podsumowując wyniki własnych doświadczeń, można założyć, że na niektórych obszarach makroregionu lubelskiego, zwłaszcza w okolicach jezior i innych zbiorników wodnych, istnieje potencjalne ryzyko nabycia toksoplazmozy w wyniku pokłucia przez kleszcze *I. ricinus*. To stwierdzenie wymaga jednak dalszego potwierdzenia na drodze badań eksperymentalnych i badań epidemiologicznych.

4. Wnioski

1. Kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* występujące na obszarze makroregionu lubelskiego (Polska Wschodnia) są wektorem i rezerwuarem różnorodnych patogenów, włączając gatunki bakterii i pierwotniaków nie zaliczane jak dotąd do patogenów typowo odkleszczowych, stwarzając tym samym nowe zagrożenie dla zdrowia populacji zamieszkującej te tereny.
2. Obydwa gatunki kleszczy (*I. ricinus* i *D. reticulatus*) występujące na obszarze makroregionu lubelskiego są zainfekowane pierwotniakiem *Babesia microti* (od 2.7% do 4.6%), co wskazuje na możliwe ryzyko zachorowań na babeszjozę w wyniku pokłucia przez kleszcze. Po raz pierwszy potwierdzono występowanie pierwotniaka *B. microti* u dorosłych osobników *D. reticulatus*.
3. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na niskie ryzyko zachorowań na tularamię w wyniku pokłucia przez kleszcze. U ponad połowy dorosłych osobników kleszczy *D. reticulatus* stwierdzono występowanie bakterii blisko spokrewnionych z *Francisella tularensis*, nazwanych *Francisella*-like endosymbionts (FLEs) – mikroorganizmów o nieznanym jak dotąd patogenezie
4. Ponad połowa (53.0%) kleszczy z gatunku *D. reticulatus* występujących na obszarze makroregionu lubelskiego jest zakażona *Rickettsia raoultii*, patogenem zaliczanym do grupy riketsji wywołujących gorączki plamiste (SFGR), co wskazuje na potencjalną rolę *D. reticulatus* jako czynnika etiologicznego odkleszczowych gorączek plamistych o obrazie klinicznym zespołu chorobowego TIBOLA (tick-borne lymphadenopathy).
5. Po raz pierwszy stwierdzono występowanie w kleszczach z gatunku *Ixodes ricinus* krętków *Leptospira* spp. (10.5%), co sugeruje możliwą rolę kleszczy jako rezerwuaru i wektora tych bakterii na terenach endemicznych. Dotychczas za rezerwuara *Leptospira* uważane były wyłącznie gryzonie, których zakażony mocz wydalany do środowiska stanowi bezpośrednią przyczyną zakażeń ludzi i zwierząt.
6. Ryzyko infekcji wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (TBVE) na terenach Lubelszczyzny wydaje się być związane z pokłuciem przez kleszcze głównie z gatunku *Dermacentor reticulatus*, u których stwierdzony odsetek zakażeń (na poziomie 10.8%) jest znacząco większy w porównaniu do odsetka stwierdzonego u kleszczy *Ixodes ricinus* (1.6%).
7. Kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* nie wydają się pełnić roli wektora i rezerwuaru hantawirusów.
8. Zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi* sensu lato transmitowanymi przez kleszcze z gatunku *Ixodes ricinus* stanowi największe zagrożenie zachorowań na boreliozę dla zdrowia osób zamieszkujących tereny makroregionu lubelskiego, gdzie prowadzono badania. Liczba zainfekowanych kleszczy *Ixodes ricinus* znacząco się podwoiła w ciągu trzech lat ($P < 0.0001$), osiągając w 2012 roku poziom 24.3%.
9. Stwierdzono znaczący odsetek kleszczy *Ixodes ricinus* zarażonych *Toxoplasma gondii* (12.6%), pierwotniakiem szeroko rozpowszechnionym w środowisku,

którego transmisja odbywa się głównie na drodze pokarmowej. Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną rolę kleszczy, jako rezerwuaru i wektora toksoplazmozy, co wymaga jednak prowadzenia dalszych badań.

5. Piśmiennictwo:

1. Adaszek Ł, Martinez AC, Winiarczyk S: The factors affecting the distribution of babesiosis in dogs in Poland. *Vet Parasitol* 2011, 181: 160-165.
2. Arai S, Bennett SN, Sumibcay L, Cook JA, Song JW, Hope A, Parmenter C, Nerurkar VR, Yates TL, Yanagihara R: Short Report: Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. *Am J Trop Hyg* 2008, 78: 348-351.
3. Buczek A: Choroby pasożytnicze. Epidemiologia, diagnostyka, objawy. Wyd. II popr. Wydawnictwo Liber, Lublin 2004.
4. Burgdorfer W: The possible role of ticks as vectors of leptospirae. II. Infection of ixodid ticks, *Dermacentor andersoni* and *Amblyomma maculatum*, with *Leptospira pomona*. *Exp Parasitol* 1959, 8: 502-508.
5. Carvalho CL, Lopes de Carvalho I, Zé-Zé L, Nuncio MS, Duarte EL: Tularaemia: a challenging zoonosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2014, 37: 85-96.
6. Casati S, Gern L, Piffaretti JC: Diversity of the population of tick-borne encephalitis virus infecting *Ixodes ricinus* ticks in an endemic area of central Switzerland (Canton Bern). *J Gen Virol* 2006, 87: 2235-2241.
7. Chmielewski T, Podsiadły E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanowska S: *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerg Infect Dis* 2009, 15(3): 486-488.
8. Cisak E, Wójcik-Fatla A, Stojek NM, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Buczek A, Dutkiewicz J: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* genospecies in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 2006, 13: 301-306.
9. Cochez C, Lempereur L, Madder M, Claerebout E, Simons L, De Wilde N, Linden A, Saegerman C, Heyman P, Losson B: Foci report on indigenous *Dermacentor reticulatus* populations in Belgium and a preliminary study of associated babesiosis pathogens. *Met Vet Entomol* 2012, 26: 355-358.
10. Deryło A, Toś-Luty S, Dutkiewicz J, Umiński J: Studies on the participation of *Ixodes ricinus* ticks in the biology and transmission of *Toxoplasma gondii*. *Wiad Parazytol* 1978, 24: 585-595 (in Polish).
11. Dubey JP, Beattie CP: *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL 1988.
12. Gidel R, Provost A: Isolation of *Toxoplasma gondii* from naturally infected ixodid ticks of the genus *Amblyomma*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 1965, 109: 613-616 (in French).
13. Grigg ME, Boothroyd JC: Rapid identification of virulent type I strains of the protozoan pathogen *Toxoplasma gondii* by PCR restriction fragment length polymorphism analysis at the B1 gene. *J Clin Microbiol* 2001, 39: 398-400.
14. Hildebrandt A, Hunfeld KP: Human babesiosis - a rare but potentially dangerous zoonosis. *Dtsch Med Wochenschr* 2014, 139: 957-962 (in German).
15. Hilpertshauer H, Deplazes P, Schnyder M, Gern L, Mathis A: *Babesia* spp. identified by PCR in ticks collected from domestic and wild ruminants in southern Switzerland. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72: 6503-6507.
16. Houck MA, Qin H, Roberts HR: Hantavirus transmission: potential role of ectoparasites. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2001, 1: 75-79.
17. Katin AA (1966) Study on the role of *Dermacentor pictus* ticks as vectors of tick-borne encephalitis virus. Tyumen University, Tyumen. (in Russian).
18. Knap JP, Nowakowska A, Dutkiewicz J, Zajac V, Wójcik-Fatla A, Chmielewska-Badora J, Strupieniuk Z: Detection of antibodies against hantaviruses in forestry workers of the Roztoczanski National Park and Puławy forest inspectorate (Lublin macroregion). Preliminary report. *Med Ogólna* 2010, 16: 201-216 (in Polish).
19. Kondrusik M, Golovljova I, Zajkowska J: Genetic characterization of TBE virus obtained from *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks. *Emerging Vector-Borne Diseases in a Changing European Environment*, 10–12 May 2010, Le Corun, Montpellier, France. Abstracts, pp. 6-7.
20. Krepkogorskaya TA, Rementsova MM: Isolation of *Leptospira* strains from the ticks *Dermacentor marginatus* S. collected from cattle. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunol* 1957, 28(2): 93-94 (in Russian).

21. Machado-Ferreira E, Piesman J, Zeidner NS, Soares CA: *Francisella*-like endosymbiont DNA and *Francisella tularensis* virulence-related genes in Brazilian ticks (Acari:Ixodidae). *J Med Entomol* 2009, 46(2): 369-374.
22. National Institute of Public Health. Reports on Infectious Diseases and Intoxications in Poland 2008-2014. State Institute of Hygiene, 2015, Warsaw.
23. Nowakowska A, Heyman P, Knap JP, Burzyński W, Witas M: The first established focus of hantavirus infection in Poland. *Ann Agric Environ Med* 2007, 16: 79-85.
24. Oehme R, Hartelt K, Backe H, Brockmann S, Kimmig P: Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. *J Int Med Microbiol* 2002, 291 (Suppl. 33): 22-29.
25. Rauter C, Hartung T: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(11): 7203-7216.
26. Rieg S, Schmoltdt S, Theilacker C, de With K, Wölfel S, Kern W.V, Dobler G: Tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) acquired in Southwestern Germany. *BMC Infect Dis* 2011, 11: 167.
27. Schrader C, Süß J: A nested RT-PCR for the detection of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in natural foci. *Zentralbl Bakteriol* 1999, 289: 319-328.
28. Scoles GA: Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. *J Med Entomol* 2004, 41: 277-286.
29. 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 Lakes District of North-Eastern Poland. *Int J Med Microbiol* 2006, 296(Suppl 40): 137-143.
30. Siuda K: Kleszcze (Ixodida) o znaczeniu epidemiologicznym w Polsce. W: Skotarczak B (red.): *Biologia molekularna patogenów przenoszonych przez kleszcze*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Szczecin 2006, str. 25-31.
31. Skotarczak B, Wodecka B, Cichocka A: Coexistence DNA of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland. *Ann Agric Environ Med* 2002, 9: 25-28.
32. Sréter-Lancz Z, Széll Z, Sréter T, Márialigeti K: Detection of a novel *Francisella* in *Dermacentor reticulatus*: a need for careful evaluation of PCR-based identification of *Francisella tularensis* in Eurasian ticks. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009, 9: 123-126.
33. Sroka J, Wójcik-Fatla A, Zwoliński J, Zajac V, Sawczuk M, Dutkiewicz J: Preliminary study on the occurrence of *Toxoplasma gondii* in *Ixodes ricinus* ticks from north-western Poland with the use of PCR. *Ann. Agric Environ Med* 2008, 15: 333-338.
34. 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.
35. Stańczak J: Detection of spotted fever group (SFG) rickettsiae in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) in Poland. *Int J Med Microbiol* 2006a, 296(Suppl. 40): 144-148.
36. Stańczak J: The occurrence of Spotted Fever Group (SFG) Rickettsiae in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in northern Poland. *Ann N Y Acad Sci* 2006b, 1078: 512-514.
37. Świtaj K, Chmielewski T, Borkowski P, Tylewska-Wierzbnowska. S. Olszyńska-Krowicka M: Spotted fever rickettsiosis caused by *Rickettsia raoultii* - case report. *Przegl Epidemiol* 2012, 66(2): 347-350.
38. Vijayachari P, Sugunan AP, Shriram AM: Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci* 2008, 33: 557-569.
39. Welc-Fałęciak R, Bajer A, Behnke JM, Siński E: Effects of host diversity and the community composition of hard ticks (Ixodidae) on *Babesia microti* infection. *Int J Med Microbiol* 2008, 298: 235-242.
40. Welc-Fałęciak R, Hildebrandt A, Siński E: Co-infection with *Borrelia* species and other tick-borne pathogens in humans: two cases from Poland. *Ann Agric Environ Med* 2010, 17: 309-313.
41. Wodecka B, Skotarczak B: Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* ticks in northwestern Poland. *Wiad Parazytol* 2000, 46: 475-485.
42. Wójcik-Fatla A, Cisak E, Chmielewska-Badora J, Zwoliński J, Buczek A, Dutkiewicz J: Prevalence of *Babesia microti* in *Ixodes ricinus* ticks from Lublin region (eastern Poland). *Ann Agric Environ Med* 2006, 13: 319-322.
43. Wójcik-Fatla A, Zajac V, Knap JP, Dutkiewicz J: Hantavirus RNA was not detected In *Dermacentor reticulatus* ticks. *Ann Agric Environ Med* 2013, 20(3): 452-454.

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Główne kierunki badawcze w mojej pracy naukowej dotyczą epidemiologii, etiopatogenezy i diagnostyki chorób odzwierzęcych w aspekcie narażenia zawodowego i zagrożenia dla populacji wiejskiej, ze szczególnym uwzględnieniem chorób transmisyjnych przenoszonych przez kleszcze oraz chorób wywoływanych przez pasożytnicze pierwotniaki.

W ramach kierowanych przeze mnie dwóch grantów naukowych oraz kilku projektów, gdzie byłam głównym wykonawcą, wspólnie z zespołem prowadziłam badania naukowe odnośnie roli kleszczy z gatunków *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* jako wektora i rezerwuaru patogenów odkleszczowych oraz pierwotniaków, wirusów i bakterii, których transmisja przez te stawonogi nie była określona. Dzięki metodom biologii molekularnej udało się potwierdzić występowanie w kleszczach *I. ricinus* (12.6%) pierwotniaka *Toxoplasma gondii*, a w późniejszych badaniach z 2014 roku również u *D. reticulatus* (3.2%) (Wójcik-Fatla i wsp. 2015a). Prowadzono również badania nad występowaniem *Bartonella* spp. w kleszczach *I. ricinus*, gdzie stwierdzono obecność DNA bakterii u 1.7% badanych osobników (Zajac i wsp. 2015) oraz *Anaplasma phagocytophilum* u *I. ricinus* – 8.2% (Wójcik-Fatla i wsp. 2009) oraz u *D. reticulatus* – 1.1% (Wójcik-Fatla i wsp. 2015b).

Oprócz infekcji pojedynczych badano również występowanie infekcji mieszanych oraz koinfekcji w kleszczach, jako zjawiska o istotnym znaczeniu epidemiologicznym, które w konsekwencji może być przyczyną zaostrzenia przebiegu wielu chorób odkleszczowych. W każdym ekosystemie zazwyczaj występuje od kilku do kilkunastu patogennych lub warunkowo patogennych mikroorganizmów. W pojedynczym kleszczu koinfekcje wirusów, pierwotniaków czy bakterii mogą tworzyć swego rodzaju mikropopulacje (parazytocenozy), charakterystyczne dla różnych ekologicznie obszarów. Z najnowszych badań własnych dotyczących infekcji mieszanych genogatunków *Borrelia burgdorferi* sensu lato wynika, że największy odsetek współwystępowania dotyczył infekcji podwójnych: *B. burgdorferi* sensu stricto z *B. garinii*. Odnotowano również, w porównaniu do lat ubiegłych, znaczny wzrost występowania zakażeń pojedynczych (z 4,7% do 7,8%), infekcji podwójnych (1.2% do 6,6%) oraz potrójnych (1.2% do 6,6%) (Wójcik-Fatla i wsp. 2015c).

W badaniach nad koinfekcjami u kleszczy z gatunku *Dermacentor reticulatus* przeanalizowano współwystępowanie 6 patogenów: *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., wirusa kleszczowego zapalenia mózgu – KZM, *Borrelia burgdorferi* s. l., *Toxoplasma gondii* i *Anaplasma phagocytophilum*. W badanej grupie stwierdzono pojedyncze zakażenia na poziomie 42.6%, natomiast współwystępowanie dwóch patogenów wykryto u 8.5% kleszczy. Największy odsetek koinfekcji podwójnych dotyczył współwystępowania z udziałem *Rickettsia* spp. (7.4%) i wirusa KZM (5.21%). Niższe odsetki koinfekcji stwierdzono dla współzakażeń z udziałem *Toxoplasma gondii* (1.58%), *Borrelia burgdorferi* s. l. (1.26%), *Anaplasma phagocytophilum* (0.95%) i *Babesia* spp. (0.63%) (Wójcik-Fatla i wsp. 2015b).

Ze względu na to, że choroby odkleszczowe mogą stanowić poważny problem epidemiologiczny i kliniczny zwłaszcza u osób z grup ryzyka zawodowego, tj. osób wykonujących prace w sektorze rolnictwa, leśnictwa i łowiectwa, prowadziliśmy również badania serologiczne i ankietowe, oceniające stan wiedzy osób narażonych pod kątem profilaktyki. Przeprowadzone badania ankietowe z zakresu epidemiologii i profilaktyki chorób odkleszczowych ze szczególnym uwzględnieniem boreliozy dotyczyły samooceny osób ankietowanych na temat ich wiedzy odnośnie sposobu i umiejętności usuwania kleszcza z powierzchni ciał, stosowania repelentów oraz wiedzy na temat istniejących zagrożeń. Stwierdzono wysoce znamienne dodatnią korelację pomiędzy częstością spostrzegania kleszczy na powierzchni ciała, a częstością ich usuwania oraz samooceną narażenia ($p < 0,001$), a także pomiędzy częstością spostrzegania kleszczy na powierzchni ciała, a częstością stosowania repelentów ($p < 0,001$). Stwierdzono także znamienne korelację ujemną pomiędzy częstością spostrzegania kleszczy, a metodą ich usuwania ($p < 0,05$) oraz stanowiskiem zatrudnienia ($p < 0,01$); najczęściej kleszcze obserwowali robotnicy leśni, którzy usuwali je w najprostszy (nieprawidłowy) sposób, to jest palcami. Wykonując badania epidemiologiczne osób zatrudnionych w tym nadleśnictwie wykazano przy pomocy testu korelacji Spearmana, że u osób wykonujących prace fizyczne występuje najwyższe ryzyko pokłuć przez kleszcze i wystąpienia choroby odkleszczowej. Osoby te są tego świadome, ale nie stosują prawidłowych metod usuwania kleszczy z ciała. Odsetek wyników seropozytywnych w klasie przeciwciał IgG był u tych osób znacznie wyższy (41,0%) niż u pracowników administracyjnych (21,4%). Co ciekawe, w opisanych badaniach wykazano wysoką ekspozycję pracowników leśnictwa na kleszcze (głównie pod kątem ich zakażenia krętkami *Borrelia burgdorferi*) na podstawie swoistej odpowiedzi immunologicznej, przy jednoczesnej względnej niskiej liczbie przypadków boreliozy (Cisak i wsp. 2012b, Cisak i wsp. 2014).

W działaniach profilaktycznych z zakresu boreliozy bardzo ważną rolę odgrywa profilaktyka przedekspozycyjna, tzw. profilaktyka pierwszego stopnia, w której najważniejsze jest unikanie czynników ryzyka i która opiera się głównie na edukacji, wiedzy i świadomości osoby narażonej. Należy traktować ją jako podstawowy element programu profilaktycznego, zwłaszcza, że profilaktyka swoista w postaci szczepień ochronnych jest w przypadku boreliozy w chwili obecnej niemożliwa. W związku z tym część mojej pracy naukowej stanowi opracowywanie materiałów edukacyjnych (broszury, poradniki, wytyczne,) oraz działalność konsultacyjna (szkolenia i wykłady) przeznaczona dla osób związanych bezpośrednio ze środowiskiem eksploatacji lasu, jak również osób zamieszkujących obszary endemiczne czy przebywających na tych terenach w celach rekreacyjnych.

Wspólnie z zespołem prowadziłam badania w kontekście narażenia grup zawodowych

(rolników, leśników) na inne choroby odzwierzęce, w tym odkleszczowe w aspekcie prewalencji u tych osób swoistych przeciwciał pojawiających się w efekcie kontaktu z patogenami. Wśród rolników i leśników obecność przeciwciał anty-*Bartonella henselae* stwierdzono u odpowiednio 27.7% i 31.5% (ogółem 30.4%), (Zajac i wsp. 2015). Nieco

wyższe wyniki uzyskano w badaniach nad występowaniem bakterii *Rickettsia* z grupy gorączek plamistych (SFGR). Seroprewalencja wśród grupy osób zawodowo narażonej na pokłucie przez kleszcze wyniosła 36.0% w porównaniu do grupy kontrolnej (4.7%). U ponad połowy badanych leśników wykryto przeciwciała anty-*Rickettsia* (50.4%), odsetek osób był ponad dwukrotnie wyższy niż w grupie badanych rolników (21.3%) (Zajac i wsp. 2013). W kolejnych badaniach obejmujących narażenie na *Toxoplasma gondii*, obecność przeciwciał stwierdzono u 66.9% badanych rolników w stosunku do 41.0% wyników pozytywnych wśród osób z grupy kontrolnej (Sroka i wsp. 2010). Istotny jest również nasz współdział w wykryciu pierwszych na Lubelszczyźnie przypadków zakażeń hantawirusami. Spośród zbadanych pracowników leśnictwa u 2.5% wykryto obecność przeciwciał (Knap i wsp. 2010). Moje zainteresowania naukowe obejmowały również badania serologiczne bakterii *Francisella tularensis*. U rolników odsetek wyników seropozytywnych w klasie IgM i IgG wynosił odpowiednio: 10,9% i 8,9%., natomiast u pracowników leśnictwa – odpowiednio 11,2% i 2,8%. W surowicach osób z grupy kontrolnej zanotowano 9,7% wyników dodatnich w klasie IgM i 7,3% w klasie IgG (Cisak i wsp. 2014). Natomiast przeciwciała skierowane przeciw różnym serowarom bakterii z rodzaju *Leptospira* stwierdzano na poziomie od 3.0% do 9.2% w zależności od terenu zamieszkiwanego przez badaną populację (Dutkiewicz i wsp. 2015). Prowadzone przeze mnie badania potwierdziły także występowania swoistej odpowiedzi immunologicznej w efekcie kontaktu z tasiemcami z rodzaju *Echinococcus*: *E. granulosus* i *E. multilocularis* – 12.8% badanej populacji rolników. Natomiast wśród grupy kontrolnej (mieszkańcy miast wykonujący prace biurowe) u żadnej z badanych osób nie wykryto przeciwciał (Cisak i wsp. 2015).

Kolejne zagadnienie z obszaru moich zainteresowań naukowych dotyczy biologicznych czynników środowiskowych w aspekcie narażenia dla zdrowia ludzi i zwierząt. Prowadzone badania środowiskowe dotyczyły wykrywania i identyfikacji czynników chorobotwórczych metodami biologii molekularnej w glebie, wodzie i produktach pochodzenia zwierzęcego. Potwierdzono obecność wirusa kleszczowego zapalenia mózgu próbkach surowego mleka owczego (22.2%), koziego (20.7%) oraz krowiego (11.1%) (Cisak i wsp. 2010). Badania dotyczące seroprewalencji w kierunku KZM przeprowadzono również u zwierząt, gdzie w badanych surowicach stwierdzono przeciwciała u 4.1% bydła, 16,8% dzików i u 11.6% jeleniowatych. Podjęto próbę wykrycia wirusa kleszczowego zapalenia mózgu bezpośrednio z pełnej krwi zwierząt dzikich (jelenie) metodami biologii molekularnej, gdzie obecność patogenu potwierdzono u 2.7% badanych prób (Cisak i wsp. 2012a). Z kolei w badaniach nad występowaniem w surowym mleku kozim, krowim i owczym czynnika etiologicznego gorączki Q wywoływanej przez *Coxiella burnetii* stwierdzono zakażenie na poziomie 0.8% (badania nieopublikowane).

W przypadku wykrywania i identyfikacji patogenów środowiskowych, detekcję bakterii *Legionella* spp., *Leptospira* spp. oraz pierwotniaka *Toxoplasma gondii* przeprowadzono w próbkach wody pochodzących z wodociągów miejskich i wiejskich gdzie wodę pobierano z ujęć w placówkach publicznych i mieszkaniach prywatnych, ze studni oraz naturalnych zbiorników (jeziora, rzeki, strumienie). Częstość występowania

Legionella w próbkach wody ciepłej z ujęć miejskich (28.9%) była znacząco wyższa niż w próbkach wody pobranych ze studni i ujęć wody zimnej na obszarach wiejskich (2.3%). W zdecydowanej większości przypadków dominowały szczepy *Legionella pneumophila* należące do serogrup 2-24, podczas gdy szczepy *L. pneumophila* należące do serogrupy 1. oraz inne gatunki *Legionella*, były identyfikowane znacznie rzadziej (Stojek i wsp. 2012).

W badaniach nad występowaniem *Toxoplasma gondii* w wodzie pitnej pobieranej ze studni oraz wodociągów na obszarach wiejskich, stwierdzono obecność pierwotniaka w 27.2% próbkach, przebadanych przy pomocy metod biologii molekularnej. Badania mikroskopowe potwierdziły uzyskane w reakcji PCR wyniki dodatnie w 13.2%. Najwyższy odsetek stwierdzono w przypadku studni płytkich starego typu (z kołowrotem) i w niewłaściwy sposób zabezpieczonych (37.5%), w odróżnieniu od studni głębinowych wyposażonych w pompy automatyczne (6.2%). Nie potwierdzono obecności *T. gondii* w próbach wody wodociągowej (Sroka i wsp. 2006). W celu sprawdzenia potencjalnego zagrożenia i rozprzestrzeniania się w środowisku bakterii z rodzaju *Leptospira* badania prowadzono w próbkach wody i gleby pobranych z obszaru nawiedzanego przez powodzie oraz suchego obszaru kontrolnego. Obecność DNA *Leptospira* potwierdzono jedynie z próbek wody z terenów zalewowych (5.0%), natomiast nie stwierdzono bakterii w próbkach gleby. Podsumowując, otrzymane wyniki badań sugerują, że woda może odgrywać pewną rolę w rozprzestrzenianiu się *Leptospira* spp. na terenach nawiedzanych przez powodzie, podczas gdy gleba prawdopodobnie nie ma większego znaczenia w epidemiologii leptospirozy (Wójcik-Fatla i wsp. 2014).

Podsumowując, przedstawione wyniki potwierdzają częste występowanie na obszarze wschodniej Polski patogenów odkleszczowych i innych czynników wywołujących choroby odzwierzęce, nie tylko w kleszczach, ale także w zwierzętach kręgowych i innych elementach środowiska życia i pracy człowieka.

Pismiennictwo:

1. Cisak E, **Wójcik-Fatla A**, Sroka J, Zajac V, Bilska-Zajac E, Chmurzyńska E, Dutkiewicz J: Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in domestic and game animals from eastern Poland. *Bull Vet Inst Pul* 2012a, 56(3): 275-278.
2. Cisak E, **Wójcik-Fatla A**, Zajac V, Dutkiewicz J: Prevalence of tick-borne pathogens at various workplaces in forest exploitation environment. *Med Pr* 2014, 65(5): 575-581.
3. Cisak E, Sroka J, **Wójcik-Fatla A**, Zajac V, Dutkiewicz J: Evaluation of reactivity to *Echinococcus* spp. among rural inhabitants in Poland. *Acta Parasitologica* 2015, 60(3): 525-530.
4. Cisak E, **Wójcik-Fatla A**, Zajac V, Sroka J, Buczek A, Dutkiewicz J: Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2010, 17(2): 283-286.
5. Cisak E, Zajac V, **Wójcik-Fatla A**, Dutkiewicz J: Risk of tick-borne diseases in various categories of employment among forestry workers in eastern Poland. *Ann Agric Environ Med* 2012b, 19(3): 469-474.
6. Dutkiewicz J, **Wójcik-Fatla A**, Zajac V, Wasiński B, Knap PJ, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A: Ocena narażenia populacji wiejskiej Lubelszczyzny na zakażenie krętkami z rodzaju *Leptospira*, ze szczególnym uwzględnieniem terenów popowodziowych. *Med Og Nauk Zdr.* 2015; 21(1): 65–70.
7. Knap JP, Nowakowska A, Dutkiewicz J, Zajac V, **Wójcik-Fatla A**, Chmielewska-Badora J, Strupieniuik Z: Obecność przeciwciał anty-hantawirusowych u leśników Roztoczańskiego Parku

- Narodowego i nadleśnictwa Puławy (makroregion lubelski). Doniesienie wstępne. Med Ogólna 2010, 16(2): 201-216.
8. Sroka J, **Wójcik-Fatla A**, Dutkiewicz J: Occurrence of *Toxoplasma gondii* in water from wells located on farms. Ann Agric Environ Med 2006, 13(1): 169-175.
 9. Sroka J, **Wójcik-Fatla A**, Szymańska J, Dutkiewicz J, Zając V, Zwoliński J: The occurrence of *Toxoplasma gondii* infection in people and animals from rural environment of Lublin region—estimate of potential role of water as a source of infection. Ann Agric Environ Med 2010, 17(1): 125-132.
 10. Stojek NM, **Wójcik-Fatla A**, Dutkiewicz J: Efficacy of the detection of *Legionella* in hot and cold water samples by culture and PCR. II. Examination of native samples from various sources. Ann Agric Environ Med 2012, 19(2): 295-298.
 11. **Wójcik-Fatla A**, Sroka J, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Dutkiewicz J: *Toxoplasma gondii* detected in *Dermacentor reticulatus* ticks. Folia Parasitol 2015a (przyjęta do druku).
 12. **Wójcik-Fatla A**, Szymańska J, Wdowiak L, Buczek A, Dutkiewicz J: Coincidence of three pathogens (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti*) in *Ixodes ricinus* ticks in the Lublin makroregion. Ann Agric Environ Med 2009, 16(1): 151-158.
 13. **Wójcik-Fatla A**, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Dutkiewicz J: Prevalence of infections and co-infections with six pathogens in the *Dermacentor reticulatus* ticks collected in eastern Poland. 2015b (praca w przygotowaniu).
 14. **Wójcik-Fatla A**, Zając V, Sawczyn A, Cisak E, Sroka J, Dutkiewicz J: Infections and mixed infections with genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in eastern Poland: a significant increase in the course of 5 years. Exp Appl Acarol (2015c- praca w recenzji)
 15. **Wójcik-Fatla A**, Zając V, Wasiński B, Sroka J, Cisak E, Sawczyn A, Dutkiewicz J: Occurrence of *Leptospira* DNA in water and soil samples collected in eastern Poland. Ann Agric Environ Med 2014, 21(4): 730-732.
 16. Zając V., **Wójcik-Fatla A.**, Cisak E., Sroka J., Sawczyn A., Dutkiewicz J.: Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. II. Serological response of occupationally exposed populations. Ann Agric Environ Med 2013, 20(2): 280-282.
 17. Zając V., **Wójcik-Fatla A.**, Dutkiewicz J., Szymańska J.: *Bartonella henselae* in eastern Poland: the relationship between tick infection rates and the serological response of individuals occupationally expose to tick bites. J Vector Ecol 2015, 40(1): 75-82.

Angelina Wójcik-Fatla