

Autoreferat

przedstawiający opis osiągnięć naukowych w związku z ubieganiem się o
nadanie stopnia doktora habilitowanego

dr n. med. Beata Biernat



Zakład Parazytologii Tropikalnej
Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii

Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej
Wydział Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i
Tropikalnej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2016

1. Imię i Nazwisko: Beata Biernat

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1987 – dyplom magistra biologii (nr 2051/B/87) z dnia 1.10.1987, Uniwersytet Gdański, studia dzienne na Wydziale Biologii, Geografii i Oceanologii.

Praca magisterska pt.: „Agresywność kuczmanów (Diptera, Ceratopogonidae) w stosunku do człowieka na przyleśnych terenach rekreacyjnych Gdańska”. Praca wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Feliksa Piotrowskiego.

2004 – doktor n. medycznych w zakresie biologii medycznej (dyplom nr 1817/04), nadany uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Anglojęzycznym i Oddz. Stomatologicznym z dnia 26 lutego 2004, Akademia Medyczna im. Prof. Feliksa Skubiszewskiego w Lublinie.

Rozprawa doktorska pt.: „Identyfikacja i rozprzestrzenienie na wybranych terenach północnej Polski kryptogatunków *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) – owadów o znaczeniu epidemiologicznym”. Promotor: prof. dr hab. Alicja Buczek

(praca została wyróżniona)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

31.12.1987 – 30.06.1988 biolog-stażysta, Pracownia Protozoologii i Helminologii, Zakład Parazytologii Tropikalnej Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni

1.07.1988 – 30.09.2003 asystent, Pracownia Akaromologii, Zakład Parazytologii Tropikalnej Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni

1.10.2003 – 30.11.2004 asystent, Zakład Parazytologii Tropikalnej Katedry Medycyny Tropikalnej i Parazytologii Międzywydziałowego Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej Akademii Medycznej w Gdańsku

Od 1.12.2004 roku do dnia dzisiejszego – adiunkt w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej Katedry Medycyny Tropikalnej i Parazytologii Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej Wydziału Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

4. 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/artystycznego,

Kleszcze *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodida) jako wektory wirusów kleszczowego zapalenia mózgu i riketsji z grupy gorączek plamistych – wybrane aspekty epidemiologiczne

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa) cykl publikacji

1. **Biernat B.**[#], Cieniuch S., Stańczak J. 2014. Detection of TBEV RNA in *Ixodes ricinus* ticks in north-eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 21 (4): 689-692. DOI: 10.5604/12321966.1129915 **IF₂₀₁₄ – 1,126, MNiSW – 10**
2. **Biernat B.**[#], Karbowski G., Werszko J., Stańczak J. 2014. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland. *Experimental and Applied Acarology* 64 (4): 543-551. DOI 10.1007/s10493-014-9836-5 **IF₂₀₁₄ – 1,622, MNiSW – 35**
3. **Biernat B.**[#], Karbowski G., Stańczak J., Masny A., Werszko J. 2016. The first detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the lowland European bison (*Bison bonasus bonasus* L.). *Acta Parasitologica* 61 (1): 130-135. DOI: 10.1515/ap-2016-0017 **IF₂₀₁₅ – 1,293, MNiSW – 15**
4. Karbowski G., **Biernat B.**, Werszko J., Rychlik L. 2016. The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions. *Acta Parasitologica* 61 (1): 201-203. DOI: 10.1515/ap-2016-0028 **IF₂₀₁₅ – 1,293, MNiSW – 15**
5. **Biernat B.**[#], Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Wierzbicka A. 2016. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on non-rickettsiemic rodent hosts in sylvatic habitats of west-central Poland. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7 (1): 135-141. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.001 **IF₂₀₁₅ – 2,690, MNiSW – 30**
6. **Biernat B.**[#], Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Cieniuch S. 2016. *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in immature *Ixodes ricinus* ticks derived from sylvatic passerine birds in west-central Poland. *Parasitology Research* 115 (9): 3469-3477. DOI: 10.1007/s00436-016-5110-6 **IF₂₀₁₅ – 2,027, MNiSW – 30**
7. Piksa K., Stańczak J., **Biernat B.**, Górz A., Nowak-Chmura M., Siuda K. 2016. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in hard ticks (Acari, Ixodidae) parasitizing bats in Poland. *Parasitology Research* 115 (4): 1727-1731. DOI: 10.1007/s00436-016-4936-2 **IF₂₀₁₅ – 2,027, MNiSW – 30**

[#] - autor korespondencyjny

Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **12,078**

Łączna liczba punktów MNiSW: **165**

w tym jako pierwszy autor i korespondencyjny: w 5 pracach [IF **8,758**, MNiSW **120**]

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji zamieszczono w załączniku nr 4.

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

Kleszcze *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodida) jako wektory wirusów kleszczowego zapalenia mózgu i riketsji z grupy gorączek plamistych – wybrane aspekty epidemiologiczne

1. Wprowadzenie

Kleszcze (Acari: Ixodida), zaraz po komarach, są najważniejszymi stawonogami wektorującymi szereg patogennych wirusów, bakterii i pierwotniaków. W Europie choroby odkleszczowe (*ang.* TBD – tick-borne diseases) są najważniejszą grupą chorób transmisyjnych, w tym tzw. „rozwijających się chorób infekcyjnych i inwazyjnych” (*ang.* EID – emerging infectious diseases), do których zalicza się m. in. boreliozę z Lyme, ludzką anaplazmozę granulocytarną, babeszjozę, jak również riketsjozy z grupy gorączek plamistych (*ang.* SFG - spotted fever group) (Jongejan et Uilenberg 2004, de la Fuente et al. 2008). Spośród 29 gatunków kleszczy twardych występujących w zachodniej i środkowej Europie (Karbowiak et al. 2015), dwa z nich: *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* mają największe znaczenie epidemiologiczne. Są to gatunki występujące w Polsce pospolicie i mogące przenosić czynniki etiologiczne chorób transmisyjnych z naturalnych rezerwuarów na ludzi i zwierzęta domowe.

1.1. Epidemiologia chorób odkleszczowych

Kleszczowe zapalenie mózgu i nowo rozpoznawane w ostatnich latach choroby odkleszczowe ludzi są transmisyjnymi zoonozami, których czynniki etiologiczne utrzymywane są w naturalnym cyklu, obejmującym kleszcze (wektory) oraz zwierzęta dzikie i/lub hodowlane. W przypadku każdej z nich, jeden lub kilka gatunków kleszczy może pełnić rolę przynosieli patogenu i dla każdej istnieje jedno lub kilka zoonotycznych źródeł zakażenia/zarażenia (rezerwuarów). W organizmach tych zwierząt odbywa się namnażanie czynników chorobotwórczych i w efekcie rozwija się systemowa bakteriemia, wiremia bądź parazytemia, umożliwiającą bezpośrednią transmisję patogenów do wektora. Źródło zoonotyczne należy odróżnić od kręgowców, które również są żywicielami kleszczy, ale nie wykazują systemowej wiremii/bakteriemii/parazytemii, zatem nie są zdolne do bezpośredniego zakażenia/zarażenia wektora. Zwierzęta te (amplifikatory), utrzymują lokalne populacje kleszczy na wysokim poziomie zagęszczenia, a tym samym ułatwiają krążenie patogenów w środowisku. Transmisja

patogenów może odbywać się pionowo (wertikalnie) i poziomo (horyzontalnie). Ta pierwsza droga polega na przekazywaniu patogenu transstadialnie (larwa - nimfa - postać dorosła) i transowarialnie (samica - jaja), a druga na przekazywaniu patogenu przez wektora żywicielowi. Do najważniejszych czynników determinujących epidemiologię chorób odkleszczowych zalicza się: poziom prevalencji patogenów w populacjach kleszczy, identyfikację gatunków zwierząt rezerwuarnych, poziom ich zakażenia/zarażenia oraz zagęszczenie żywicieli tych roztoczy. Zakażenia i zarażenia przenoszone przez kleszcze mają znaczący udział w grupie chorób zakaźnych, a zasięg występowania tych chorób pokrywa się z obszarem występowania przenoszących je kleszczy. Tematykę przedstawianych badań podjęto wobec rosnącej liczby przypadków chorób odkleszczowych w Polsce (Kmieciak et al. 2016).

1.2. Kleszczowe zapalenie mózgu (KZM)

Kleszczowe zapalenie mózgu (*encephalitis ixodica*) jest drugą po boreliozie, najczęstszą chorobą odkleszczową diagnozowaną w Polsce (Szczekliak 2010). Jest to potencjalnie śmiertelna, wirusowa choroba ośrodkowego układu nerwowego wywoływana przez wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) (*ang.* TBEV – tick-borne encephalitis virus) (Flaviviridae, *Flavivirus*). Wirus ten występuje endemicznie w strefie rozciągającej się od środkowej i wschodniej Europy po Syberię i Japonię, a w ostatnich latach rozszerza swój zasięg w północnej i zachodniej Europie (Gray 2008, Qviller et al. 2014). Rozprzestrzenia się również lokalnie w krajach jego endemicznego występowania na tereny, które wcześniej nie były uznawane za endemiczne dla TBEV (Frimmel et al. 2014). Głównym wektorem i zarazem rezerwuarem wirusa KZM w Polsce jest *I. ricinus*, możliwe jest również zakażenie ludzi przez niepasteryzowane produkty mleczne. W większości krajów europejskich liczba przypadków wzrosła w latach 1974 - 2006 o 400% (Süss 2008). Po raz pierwszy kleszczowe zapalenie mózgu opisano w 1931 w Austrii (Schneider 1931), a czynnik etiologiczny wyizolowano w 1937 na rosyjskim Dalekim Wschodzie (Dumpis et al. 1999). Jest to też jeden z najwcześniej rozpoznanych patogenów przenoszonych przez kleszcze w naszym kraju. Pierwsze przypadki KZM u ludzi w Polsce zostały opisane u kilku osób z okolic Białowieży (Demiaszkiewicz 1952), a izolacje tego wirusa ze stawonogów, drobnych ssaków (Rodentia i Insectivora), jak też od pacjentów, miały miejsce wielokrotnie już od połowy ubiegłego stulecia (Lachmajer i Kawecki 1953, Przesmycki et al. 1954, Lachmajer et al. 1957, Wegner 1995). Głównym rejonem endemicznym występowania KZM w Polsce są województwa Podlaskie i Warmińsko-Mazurskie (ok. 90% zachorowań). Obecnie badania wykrywające obecność tego wirusa w kleszczach i ich żywicielach technikami biologii molekularnej są intensywnie prowadzone w wielu krajach europejskich, przede wszystkim na terenach endemicznego występowania tego patogena tj. w środkowej Europie, krajach nadbałtyckich, południowej Skandynawii (Andreassen et al. 2012, Hubálek et al. 2012, Katargina et al. 2013, Frimmel et al. 2014) oraz w Polsce (Karbowski et al. 2016).

1.3. Riketsjozy z grupy gorączek plamistych

Riketsjozy z grupy gorączek plamistych (SFG) są istotnym problemem zdrowia publicznego na świecie i sztandarowym przykładem nowo pojawiających się zagrożeń. Czynnikiem

etiologicznym są Gram-ujemne bakterie z rodzaju *Rickettsia* (Rickettsiaceae), należące do grupy alfa-proteobakterii, rzędu Rickettsiales, które są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi. Wśród 13 gatunków riketsji SFG patogenicznych dla człowieka, przenoszonych przez kleszcze, 4 zanotowano w Europie środkowej: *R. helvetica*, *R. slovaca*, *R. raoultii* i *R. monacensis*. Pozostałe gatunki: *R. conori*, *R. aeschlimanni*, *R. sibirica* i *R. massiliae*, wykazano jedynie serologicznie w surowicy krwi ludzkiej (Karbowski et al. 2016). Namnażają się w komórkach śródbłonna wywołując zapalenie naczyń. Najczęstszym objawem zakażenia jest gorączka i dolegliwości grypopodobne, ale opisano też zapalenie mięśnia sercowego (*perimyocarditis*) i opon mózgowych (*mengitis*) u pacjentów ze Szwecji i Francji, wywołane przez *R. helvetica* (Nilsson et al. 1999, 2010, Fournier et al. 2000, Nilsson 2009, Mączka et Tylewska-Wierzbanowska 2012). W Europie środkowej obecność *Rickettsia helvetica* w kleszczu wykryto po raz pierwszy w 1979 roku w Szwajcarii (Burgdorfer et al. 1979), a *R. conori* u *I. ricinus* w 1993 w Belgii (Parola et al. 2005), natomiast pierwsze doniesienia o występowaniu riketsji SFG w rodzimych kleszczach, zaprezentowała Stańczak (2004). W naszym kraju w latach 2006-2012 wykryto też swoiste przeciwciała dla riketsji SFG u 5 osób (z woj. Mazowieckiego i Dolnośląskiego), w tym u dwóch powracających z Afryki. Wykryte riketsje sklasyfikowano jako *R. conori*, *R. slovaca*, *R. raoultii* oraz *R. africae* (Mączka et al. 2013). Stwierdzono też przeciwciała przeciw SFG u 14,7% pracowników leśnych z północno-wschodniej i południowej Polski, w tej grupie 78,9% osób miało swoiste przeciwciała przeciw *R. massiliae* (Podsiadły et al. 2011), w woj. Kujawsko-Pomorskim w tej samej grupie zawodowej odsetek osób seropozytywnych (SFG) wynosił 45,7% (Biernat et al. 2013), a na Lubelszczyźnie 50,7% i był wyższy niż u pracowników rolnych – 21,3% (Zajac et al. 2013). Na terenie naszego kraju *Rickettsia* spp. wykrywano wielokrotnie zarówno u *I. ricinus* jak i *D. reticulatus* (Stańczak et al. 2008, 2016; Chmielewski et al. 2009, Wójcik-Fatla et al. 2013, Welc-Falęciak et al. 2014, Wodecka et al. 2014).

Kleszcze twarde są wektorem jak i rezerwuarem riketsji z grupy gorączek plamistych (SFG), natomiast kręgowce, w tym człowiek, są żywicielami przypadkowymi. Bakterie te mogą krążyć w populacji kleszczy dzięki transmisji transstadialnej i transowarialnej.

1.4. Wektory wirusów KZM i riketsji z grupy gorączek plamistych

Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) (Acari: Ixodidae) - kleszcz pospolity, kleszcz pastwiskowy, jest pospolicie i najczęściej występującym gatunkiem kleszcza w Europie, również w Polsce. Bytuje na terenach otwartych i w biotopach leśnych, w tym w parkach miejskich. *I. ricinus* należy do kleszczy trójżywicielowych – każda aktywna forma rozwojowa musi pobrać krew innego żywiciela, co jest warunkiem przeobrażenia w następną postać rozwojową bądź też złożenia przez samicę jaj. Mimo, iż człowiek jest żywicielem przypadkowym, to jest to najczęściej atakujący ludzi (głównie przez nimfy i samice) gatunek kleszczy właściwych (Ixodidae), a tym samym mający największe znaczenie medyczne. Całkowity okres rozwoju osobniczego *I. ricinus* warunkach klimatycznych Polski trwa 1,5 – 4 lat. Sezonowa aktywność kleszcza pospolitego rozpoczyna się, w zależności od warunków środowiska, na początku kwietnia i trwa zazwyczaj do listopada z dwoma szczytami występowania: wyższym wiosennym, przypadającym w maju i jesiennym, we wrześniu.

Dermacentor reticulatus (Fabricius, 1794) (Acari: Amblyommidae) - kleszcz łąkowy, jest drugim, po *Ixodes ricinus*, najpowszechniej występującym gatunkiem w Polsce. Jest polifagicznym pasożytem pozagniazdowo-norowym ze stosunkowo szerokim zakresem żywicieli, dostosowującym się do lokalnej fauny. Żywicielami są również zwierzęta hodowlane i domowe. Człowiek atakowany jest rzadko. Gatunek ten zasiedla głównie tereny otwarte o dość wysokim poziomie wód gruntowych. Cykl rozwojowy trwa na ogół rok i jest trójżywieliowy. Optymalne warunki aktywności dorosłych *D. reticulatus* w klimacie Polski występują okresowo, co jest przyczyną dwufazowej aktywności rocznej (szczyt wiosenny: marzec-czerwiec, jesienny: sierpień-listopad). W przeciwieństwie do kleszcza pospolitego, kleszcz łąkowy nie występuje w całej Polsce. Do lat 90-tych ub. wieku jego występowanie ograniczone było do północno-wschodniej i wschodniej Polski. Od tego czasu obserwuje się jego ekspansję do centralnych i południowo-zachodnich regionów naszego kraju.

2. Cel osiągnięcia naukowego

Celem osiągnięcia naukowego było wzbogacenie wiedzy o roli kleszczy (Acari, Ixodida) w naturalnym krążeniu wirusów kleszczowego zapalenia mózgu i riketsji z grupy gorączek plamistych.

Cel ten realizowano poprzez określenie:

- ✓ prewalencji wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) u *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* zebranych z roślinności na wybranych terenach Polski
- ✓ poznanie prewalencji wirusa KZM u *Dermacentor reticulatus* zebranych z żywicieli
- ✓ określenie ekstensywności zakażenia riketsjami z grupy gorączek plamistych *Ixodes ricinus* zebranych z żywicieli

wskazując tym samym na rolę tych roztoczy jako wektorów i rezerwuarów KZM i riketsji z grupy gorączek plamistych.

Bezpośrednia detekcja patogenów w kleszczach jest niezwykle pomocna w określeniu cyklu krążenia patogenicznych mikroorganizmów oraz sytuacji epidemiologicznej chorób odkleszczowych.

Cel pracy realizowano w oparciu o materiał biologiczny zebrany w latach 2006-2012.

3. Omówienie osiągniętych wyników

Badania obejmowały trzy zagadnienia.

3.1. Zagadnienie 1.

Prewalencja wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* zebranych z roślinności

publikacja nr 1: Biernat B., Cieniuch S., Stańczak J. 2014. Detection of TBEV RNA in *Ixodes ricinus* ticks in north-eastern Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 21 (4): 689-692.

publikacja nr 2: Biernat B., Karbowski G., Werszko J., Stańczak J. 2014. Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks from natural and urban environment, Poland. *Experimental and Applied Acarology* 64 (4): 543-551.

W ciągu ostatnich 20 lat obserwuje się w Europie stały wzrost zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu, które tłumaczy się wzrostem zapadalności w dotychczasowych rejonach endemicznych, poszerzeniem zasięgu występowania wirusa, zmianach klimatycznych korzystnie wpływających na liczebność kleszczy, wzrostem liczebności żywicieli tych stawonogów oraz zmianami socjoekonomicznymi (Bröker et Griel 2003, Gray 2008, Süss 2008). Zastosowanie metod biologii molekularnej do detekcji tego patogenu spowodowało w ostatnim czasie wzmożone zainteresowanie badaczy tym tematem, również w Polsce (Karbowski et Biernat 2016), a mimo to, zbyt mało jest badań określających obszar ognisk endemicznych KZM. Tematyka niniejszego zagadnienia jest kontynuacją badań zapoczątkowanych już w latach 50-tych ub. wieku przez prof. Jadwigę Lachmajer i prof. Zofię Wegner, wieloletnich kierowników Zakładu Parazytologii Tropikalnej w Instytucie Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni.

Celem pracy [**publikacja nr 1**] było określenie poziomu zakażenia kleszczy *Ixodes ricinus* zebranych z roślinności w północno-wschodniej Polsce, endemicznym terenie występowania TBEV.

W latach 2006-2009 zebrano z roślinności metodą flagowania 2075 kleszczy (676 samic, 555 samców, 799 nimf i 45 larw) z 55 stanowisk (35 kwadratów siatki UTM) położonych w województwach: Pomorskim, Warmińsko-Mazurskim i Podlaskim. DNA (cDNA) uzyskano z RNA z zebranych kleszczy w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji z zastosowaniem przypadkowych starterów reakcji wg Huang et al. (2001). Do wykrywania TBEV zastosowano technikę gniazdowej łańcuchowej reakcji polimerazy (*ang.* PCR polymerase chain reaction – nested PCR) ze starterami komplementarnymi do fragmentu terminalnego regionu niekodującego (5'-NCR) i końca kodującego białko C kapsydu [**publikacja nr 1, 2, 3 i 4**] (Ramelow et al. 1993). Kleszcze badano w pulach. Losowo wybrane amplikony poddano analizie sekwencyjnej. Stwierdzono wyniki dodatnie u 6,73% przebadanych pul kleszczy, a średni minimalny wskaźnik zakażenia (*ang.* MIR – minimum infection rates) kleszczy wirusem TBE wyniósł na badanym obszarze 0,96%. Poziom zakażenia postaci dorosłych i nimf tym wirusem w Polsce jest zależny od regionu i waha się od 0,21% do 1,6% (Karbowski et Biernat 2016), a na en-

demicznych terenach środkowej Europy, wskaźnik ten wynosi od 0,1% do 5% (Süss 2011). Pozytywne wyniki zanotowano na obszarze wszystkich badanych województw. Wśród kleszczy dorosłych MIR wynosił 1,21%, u samic był ponad trzykrotnie wyższy niż u samców, odpowiednio: 1,77% i 0,54%, zaś wśród nimf wynosił 0,50%. Po raz pierwszy w Polsce przebadano w kierunku występowania RNA wirusa KZM larwy *I. ricinus* i uzyskano wynik pozytywny, co wskazuje na transowarialny przekaz wirusów. Analiza sekwencyjna dodatnich prób potwierdziła 100% homologię ze znanymi sekwencjami Zachodniego podtypu (Eu) wirusa KZM zdeponowanymi w bazie GenBank: JQ654701.1 (szczep Ljubljana), GU183380.1 (Kumlinge) i U27495.1 (Neudörlf).

Uzyskane wyniki potwierdzają występowanie naturalnych ognisk KZM na obszarach badanych województw (Podlaskie, Warmińsko-Mazurskie i Pomorskie). Pomimo faktu, że poziom zakażenia kleszczy może się na danym terenie zmieniać w zależności od pory roku, jak i z upływem lat (Süss et al. 1999), w omawianych badaniach wykazano występowanie RNA TBEV na terenach, gdzie uprzednio były notowane przypadki kleszczowego zapalenia mózgu u ludzi lub też wykazywano RNA tego patogena w wektorze. Z 35 kwadratów siatki UTM z powierzchni których odławiano kleszcze, zakażone osobniki wykazano na 15 z nich (42,85%). Zasięg występowania chorób odkleszczowych ściśle pokrywa się z obszarem występowania przenoszących je kleszczy dlatego też precyzyjne określenie stanowisk w kwadratach siatki UTM stanowi ważny przyczynek do poznania rozmieszczenia występowania zakażonych wektorów.

O ile rola *I. ricinus* w krążeniu TBEV jest w Europie dość bogato udokumentowana, to zdecydowanie mniej jest danych dotyczących kleszcza łąkowego. Jeszcze w 2010 roku podczas International Conference “Emerging Vector-borne Diseases in a changing European Environment” w Montpellier (Francja), wielu badaczy wyrażało wątpliwość odnośnie występowania TBEV u *D. reticulatus* w naturze, tym bardziej, że badania przeprowadzone w Austrii (Dobler et al. 2008) dotyczące występowania TBEV u tego gatunku kleszcza, nie przyniosły wyników dodatnich.

Celem pracy [**publikacja nr 2**] było określenie ekstensywności zainfekowania *D. reticulatus* wirusem KZM na terenach naturalnych i zurbanizowanych.

W latach 2007-2010 zebrano z roślinności metodą flagowania 471 dorosłych (316 samic i 155 samców) *D. reticulatus*. Teren zbioru obejmował stanowiska naturalne w północno-wschodniej Polsce: Biebrzański i Białowieski Park Narodowy (woj. Podlaskie), Mazurski Park Krajobrazowy (woj. Warmińsko-Mazurskie) oraz teren zurbanizowany w Warszawie. Kleszcze badano pojedynczo. Dodatkowo wyniki odnotowano u kleszczy na wszystkich badanych stanowiskach, ogółem poziom zakażenia tych roztoczy TBEV wynosił 2,12%. Na terenach naturalnych odsetek zakażonych *D. reticulatus* wynosił (1,96%), a na obszarze zurbanizowanym (3,12%). Uzyskane sekwencje były w 100% homologiczne ze znanymi sekwencjami szczepów Zachodniego (Europejskiego) podtypu TBEV bazy GenBank Ljubljana I (IQ654701.1), Kumlinge A52 (GU183380.1), Neudoerfl (U2749.1/TEU835597.1) oraz wzajemnie identyczne i *consensus* zdeponowano w bazie European Nucleotide Archiv (ENA) (LK9346890). Nie odnotowano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy poziomem zakażenia samic i samców, jak również pomiędzy terenami naturalnymi jak zurbanizowanym. O ile

omawiany gatunek kleszczy notowany był na terenach zurbanizowanych już wcześniej (Biaduń et al. 2007, Biaduń 2011), to obecność zainfekowanych TBEV *D. reticulatus* na terenie miejskim wykazano po raz pierwszy. Jest to fakt o ogromnym znaczeniu epidemiologicznym. Kleszcze zawsze były częścią ekosystemu miejskiego, zwłaszcza na obszarach podmiejskich. Urbanizacja i związana z nią aktywność ludzka wykazuje często pozytywny wpływ na występowanie i liczebność tych stawonogów (Uspensky 2014). Można przypuszczać, że w tym wypadku żywicielami dorosłych *D. reticulatus* są zapewne psy, które są kompetentnymi żywicielami tego gatunku kleszcza. Tym bardziej, iż stwierdzono, że choroby odkleszczowe, wykazują u psów tendencję wzrostową (Leschnik et al. 2002). Psy mogą również przyczyniać się do rozprzestrzeniania się tych pasożytów na nowe tereny (np. podróżujące z właścicielami).

Ze względu na zakres żywicieli możliwość zakażenia ludzi TBEV przez *D. reticulatus* jest mało prawdopodobna, może on jednak odgrywać istotną rolę czynnika umożliwiającego krążenie wirusa w środowisku miejskim, tym bardziej, że przez pionowy przekaz wirusów możliwe jest utrzymywanie się wirusa w populacji kleszczy przez wiele pokoleń, nawet w przypadku braku w środowisku ssaka wrażliwego na zakażenie.

3.2. Zagadnienie 2.

Prewalencja wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) w kleszczach *Dermacentor reticulatus* zebranych z żywicieli (*Bison bonasus bonasus*, *Microtus oeconomus*).

publikacja nr 3: Biernat B., Karbowski G., Stańczak J., Masny A., Werszko J. 2016. The first detection of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) RNA in *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the lowland European bison (*Bison bonasus bonasus* L.). *Acta Parasitologica* 61 (1): 130-135.

publikacja nr 4: Karbowski G., **Biernat B.**, Werszko J., Rychlik L. 2016. The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions. *Acta Parasitologica* 61 (1): 201-203.

Dorośle *D. reticulatus* atakują głównie jeleniowate, w tym łosie, a w Puszczy Białowieskiej również żubry. U zwierząt tych, z wolnego stada w Puszczy Białowieskiej, wielokrotnie stwierdzano dwa gatunki kleszczy: *I. ricinus* i *D. reticulatus*, przy czym ten ostatni występował najliczniej, mimo, że do lat 90-tych ub. wieku notowany był na tych żywicielach sporadycznie. Od 1994 roku kleszcz łąkowy występuje już regularne i liczne na żubrach w Puszczy Białowieskiej w okresie zimowym, natomiast sporadyczne na żubrach z innych regionów Polski (Izdebska 1998, Izdebska et Cydzik 2010). Żubry jako zwierzęta blisko spokrewnione z bydłem domowym, dzielą z nim szereg patogenów, również odkleszczowych, takich jak: *Anaplasma phagocytophilum* czy *Babesia divergens*. Stwierdzono też u nich przeciwciała przeciw *Borrelia burgdorferi* (Siński et al. 1996, Grzeszczuk et al. 2004, Karbowski et al. 2014, 2015), natomiast badania tych zwierząt pochodzących z Puszczy Białowieskiej na obecność wirusa KZM przyniosły wynik negatywny (Biernat et Karbowski 2014).

W celu określenia ekstensywności zakażenia TBEV *D. reticulatus* zebranych z żubrów [**publikacja nr 3**], które są ważnym żywicielem kleszczy twardych w Puszczy Białowieskiej, endemicznym terenie występowania wirusa KZM, zbierano kleszcze z siedmiu odstrzelonych żubrów z wolnożyjącego stada w Puszczy Białowieskiej podczas zimy 2008 i 2009 roku.

Przebadano 114 dorosłych *D. reticulatus* (4 samice i 110 samców). RNA TBEV wykryto u 21 kleszczy zebranych z ciał 5 żubrów. Intensywność inwazji wynosiła 5,4 osobnika. Poziom zakażenia tych kleszczy wyniósł 18,42%, u samców 18,18%, a u samic 25,0%. Analiza sekwencji losowo wybranych amplikonów wykazała pojedynczą delecję i dwa polimorfizmy, znane z sekwencji TBEV pochodzących z Europy. W zależności od wariantu sekwencji, podobieństwo wynosiło 99% lub 98% do sekwencji Zachodniego (Eu) podtypu wirusa KZM zdeponowanych w GenBank: KJ000002.1 (szczep Absettarov), KC835595.1 (szczep 114), KF151173.1 (A104) i innych oraz do zdeponowanej w bazie ENA sekwencji LK934689 z *D. reticulatus* z woj. Podlaskiego [**publikacja nr 2**]. Zanotowano 11-krotnie wyższy odsetek zakażonych *D. reticulatus* zebranych z żubrów (18.42%) niż z roślinności z tego samego terenu (Białowieża 1.58%), i ponad 6-krotny niż ze stanowisk położonych w woj. Podlaskim (2.91%) [**publikacja nr 2**]. Również badania przeprowadzone we wschodniej Polsce (woj. Lubelskie) wykazały niższy odsetek zakażonych TBEV kleszczy tego gatunku zebranych z roślinności (10.8%) (Wójcik-Fatla et al. 2011). Wyższa prewalencja wirusa KZM w kleszczach zebranych z żywicieli niż z roślinności wynika prawdopodobnie z większej aktywności i agresywności zakażonych TBEV kleszczy, a w konsekwencji takie osobniki znajdowane są na żywicielu częściej. Możliwe również, że u zakażonych, głodnych kleszczy, poziom TBEV jest poniżej wykrywalności, a wirus replikuje się podczas pobierania krwi do wartości wykrywalnych (Süss et al. 2004, Belova et al. 2012). W Europie większość żubrów żyje w Polsce, a populacja tych zwierząt w Puszczy Białowieskiej jest największą w naszym kraju, co ma istotne znaczenie w restytucji i ochronie tego gatunku. Wiele osobników ze stada białowieskiego jest introdukowanych w inne lokalizacje naszego kraju oraz do innych państw europejskich w celu stworzenia nowych stad, co wpływa na ekspansję tego gatunku kleszcza. Również lokalne migracje żubrów na otwarte tereny w rezultacie sprzyjają rozprzestrzenianiu się kleszczy, w tym zakażonych TBEV. Możliwe też, że równoczesny wzrost populacji jeleniowatych w Polsce, jak i wykorzystywanie tego samego środowiska również przez żubry, powoduje wzrost częstości zakażeń pasożytów zewnętrznych patogenami, jak ma to miejsce w przypadku innych ektopasożytów żubrów (Karbowski et al. 2014a,b). Fakt ten może mieć epidemiologiczne implikacje w przetrwaniu wirusa KZM w środowisku. W niniejszej pracy po raz pierwszy wykryto RNA TBEV u *Dermacentor reticulatus* zebranych z żubrów.

Jak wiadomo, utrzymywanie się naturalnych ognisk endemicznych wirusa KZM możliwe jest dzięki krążeniu patogenu pomiędzy jego wektorem (kleszcz), a rezerwuarem, którym są kręgowce, przede wszystkim gryzonie. W Europie środkowej głównym wektorem TBEV jest *I. ricinus*. Gatunek ten może być zakażony wirusem KZM w każdym aktywnym stadium rozwojowym. W przypadku *D. reticulatus*, poza nielicznymi pracami eksperymentalnymi dotyczącymi zakażenia tych kleszczy TBEV i przekazem transowarialnym (Naumov et al. 1980, Řeháček et al. 1987, Alekseev et al. 1996), kilkukrotnego wykrycia RNA omawianego wirusa u kleszczy łąkowych zebranych z roślinności (Wójcik-Fatla et al. 2011, Katargina et al. 2013, **publikacja nr 2**, Mierzejewska et al. 2015) oraz u zimujących kleszczy zebranych z żubrów [**publikacja nr 3**], niewiele wiadomo o udziale tego gatunku w krążeniu TBEV.

Celem pracy [**publikacja nr 4**] było zbadanie prewalencji wirusa KZM u dorosłych form *D. reticulatus* zebranych jako nimfy z żywicieli *Microtus oeconomus* w środowisku naturalnym, po metamorfozie w warunkach laboratoryjnych.

Na obecność kleszczy przebadano 9 norników północnych (*Microtus oeconomus*) odłowionych przyżyciowo w Białowieskim Parku Narodowym w 2006 roku. U 5 zwierząt stwierdzono infestację nimfami *D. reticulatus*. Z 40 zebranych, opitych krwią nimf, 37 (17 samców i 20 samic) zakończyło sukcesem metamorfozę. Wirusa KZM stwierdzono u trzech kleszczy: 1 samca i 2 samic. U *I. ricinus*, TBEV może być przekazywany transstadialnie, z jednego stadium do następnego. W efekcie, raz zakażony kleszcz, może przekazywać wirusa do końca życia różnym żywicielom. Tej drogi zakażenia nie wykazano dotychczas w naturze u kleszczy łąkowych.

Głównym źródłem wirusów u głodnych kleszczy uzyskanych po metamorfozie w warunkach kontrolowanych jest wcześniejsze stadium rozwojowe, a najbardziej prawdopodobnym źródłem zakażenia, w tym przypadku, nornik północny, który uważany jest za głównego żywiciela młodocianych stadiów *D. reticulatus* (Karbowski 2000). Natomiast koinfekcja z *I. ricinus* wydaje się mało prawdopodobna ze względu na różne preferowane lokalizacje miejsc pasożytowania na żywicielu przez te oba gatunki kleszczy. W sumie larwy i nimfy *D. reticulatus* atakują w Europie ponad 35 gatunków żywicieli, a postacie dorosłe ponad 15 włączając w tę liczbę zwierzęta domowe. Biorąc pod uwagę możliwość transstadialnej transmisji TBEV u *D. reticulatus*, jak również liczbę żywicieli tego gatunku, można stwierdzić, że kleszcz ten może odgrywać coraz ważniejszą rolę w podtrzymywaniu krążenia wirusa KZM w środowisku, przekazując TBEV dzikim przeżuwaczom i wypasanemu bydłu, tym bardziej, że ten gatunek roztocza nieustannie poszerza swój zasięg.

3.3. Zagadnienie 3.

Udział kleszczy w naturalnym cyklu krążenia *Rickettsia* spp.

publikacja nr 5: Biernat B., Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Wierzbicka A. 2016. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* ticks feeding on non-rickettsiemic rodent hosts in sylvatic habitats of west-central Poland. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7 (1): 135-141.

publikacja nr 6: Biernat B., Stańczak J., Michalik J., Sikora B., Cieniuch S. 2016. *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* infections in immature *Ixodes ricinus* ticks derived from sylvatic passerine birds in west-central Poland. *Parasitology Research* 115 (9): 3469-3477.

publikacja nr 7: Piksa K., Stańczak J., **Biernat B.,** Górz A., Nowak-Chmura M., Siuda K. 2016. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and spotted fever group rickettsiae in hard ticks (Acari, Ixodidae) parasitizing bats in Poland. *Parasitology Research* 115 (4): 1727-1731.

Ixodes ricinus jest w Polsce znanym wektorem riketsji SFG. Najczęściej wykrywanym gatunkiem riketsji w tym kleszczu jest *R. helvetica*, przewalencja której może sięgać nawet 70% (Wodecka et al. 2014), przeciętnie wynosi jednak od 1,3 do 11,4% (Stañczak et al. 2008, 2016; Chmielewski et al. 2009, Welc-Falęciak et al. 2014). Sporadycznie notowano też występowanie *R. monacensis*, *R. slovaca* i *R. raoultii*, ten ostatni gatunek najczęściej u *D. reticulatus* (Wójcik-Fatla et al. 2013, Stańczak et al. 2016). Kleszcze twarde są zarówno wektorem jak i rezerwuarem riketsji SFG dlatego też bakterie te mogą być przekazywane transstadialnie i transowarialnie. Niezakażone larwy kleszczy nabywają infekcję również podczas pobierania krwi żywiciela z bakterią (transmisja horyzontalna). Jednakże ten model transmisji ograniczony jest krótkim czasem jej trwania. Może to wyjaśniać dlaczego DNA riketsji nie wykryto we wcześniejszych badaniach w próbach krwi zwierząt (Stañczak et al. 2009) – żywi-

cieli zakażonych riketsjami SFG kleszczy. Z drugiej strony riketsje SFG wykrywane już były u małych ssaków, jeleniowatych i ptaków, a eksperymentalnie wykazano możliwość zakażenia gryzoni *Apodemus flavicollis*, *Microtus arvalis* i *Myodes glareolus* riketsjami *R. slovaca*, *R. sibirica*, *R. conori* i *R. acari* (Socolovschi et al. 2009, Klaus et al. 2016). O ile prevalencji riketsji SFG w kleszczach zebranych z roślinności poświęcono już w pracach badawczych sporo uwagi, jak też badaniom dotyczącym prevalencji tego patogenu u żywicieli kleszczy, to informacji o poziomie zainfekowania kleszczy zebranych z żywicieli jest mniej.

Kolejnym celem było określenie poziomu infestacji gryzoni [**publikacja nr 5**] i ptaków wróblowych [**publikacja nr 6**] kleszczami *Ixodes* spp., zbadanie kleszczy żerujących na żywicielach oraz krwi gryzoni na obecność *Rickettsia* spp. oraz określenie potencjalnej roli gryzoni i ptaków w krążeniu riketsji w ekosystemie leśnym.

Zwierzęta odławiano przyżyciowo w sezonie wegetacyjnym 2006 roku w Parku Krajobrazowym „Puszcza Zielonka” (woj. Wielkopolskie). Młocięte formy *I. ricinus* w fazie pasożytniczej oraz krew pobraną od gryzoni badano przesiewowo konwencjonalną techniką PCR [**publikacja nr 5**] oraz real-time PCR [**publikacja nr 6**] na obecność DNA *Rickettsia* spp. stosując opublikowane startery (Regnery et al. 1991) [**publikacja nr 5**] oraz własne startery i sondy TaqMan [**publikacja nr 6**] komplementarne do dwóch fragmentów o różnej długości genu *gltA* kodującego syntazę cytrynianową. Uzyskane wyniki dodatnie potwierdzano następnie techniką nested PCR ze starterami specyficznymi dla genu 16S rRNA i *rOmpA* (Nilsson et al. 1997, Raoult et al. 2002) [**publikacje nr 5 i 6**]. Otrzymane produkty amplifikacji konwencjonalnego i nested PCR poddawano analizie sekwencyjnej, celem określenia gatunku *Rickettsia* sp.

Ogółem przebadano 188 gryzoni (75,5% *A. flavicollis* i 24,5% *M. glareolus*). Większość z nich (84%) było zainfestowanych larwami (99,4%) i nimfami (0,6%) *I. ricinus*, jedyne stwierdzonego gatunku kleszczy. Średnio jedna myszarka leśna (*A. flavicollis*) (dawniej: mysz leśna) była 12 razy liczniej zainfestowana niż nornica ruda (*M. glareolus*) (15,9 vs 1,3, $p < 0,001$). Infestacja larwami była prawie dwukrotnie wyższa u myszarek (94,4%) niż u nornic (52,2%). Nieliczne nimfy kleszcza pospolitego występowały tylko na myszarkach (9,7%). Nie wykryto DNA *Rickettsia* sp. we krwi gryzoni ($n=13$), natomiast zakażenie stwierdzono u jednej (8%) spośród 12 nimf oraz u co najmniej 10,7% (MIR) badanych larw ($n=804$). Prevalencja zainfekowanych kleszczy na obu gatunkach gryzoni była porównywalna (10,8 vs. 9%).

W sieci ornitologiczne odłowiono ogółem 148 ptaków należących do 18 gatunków, w tym 16 gatunków z rzędu Passeriformes i dwa z Piciformes. Młocięte formy kleszczy ($n=804$), wśród których znacząco dominowały larwy nad nimfami (581 vs 253), zebrano z przedstawicieli 11 gatunków (43,2%) ptaków. Wszystkie należały do gatunku *I. ricinus*. Większość osobników ($n=807$; 96,7%) zebrano z 56 ptaków należących do 6 gatunków żerujących na ziemi. Najwyższą intensywność infestacji stwierdzono u kosów zwyczajnych (*Turdus merula*) (21,1 kleszczy) i u drozda śpiewaka (*T. philomelos*) (13,1 kleszczy). Kleszcze z tych dwóch gatunków ptaków stanowiły większość (82%) zbioru ze wszystkich zainfestowanych Passeriformes. Na obecność DNA *Rickettsia* spp. przebadano (w pulach i pojedynczo) 550 kleszczy zebranych z 53 ptaków. DNA *Rickettsia* spp. wykryto zarówno larw jak i nimf (MIR wynosił odpowiednio: 17,4% i 18,7%). Zakażone kleszcze stwierdzono na wszystkich 6

badanych gatunkach wróblowych. Najwyższy MIR odnotowano u *I. ricinus* z rudzików (27%), drożdów (22%) i kosów (17%); ogółem u 66% z nich co najmniej jeden kleszcz był zakażony *Rickettsia* spp.

Analiza uzyskanych sekwencji fragmentów genów *gltA* i 16S rRNA *Rickettsia* sp. wykazała, że dominującym gatunkiem riketsji w *I. ricinus* zebranych zarówno z gryzoni jak i ptaków była *R. helvetica*. W przypadku *gltA* były one wzajemnie zgodne oraz w 100% homologiczne ze zdeponowanymi GenBanku sekwencjami *R. helvetica* z *I. ricinus* z terenu Polski (EU779822), Słowacji (KF016135), Niemiec (KC0071266) i Francji (KF447530). W przypadku 16S rRNA również odnotowano wzajemną zgodność uzyskanych sekwencji oraz ich 100% homologię z sekwencjami *R. helvetica* wyizolowanymi z płynu mózgowo-rdzeniowego pacjenta ze Szwecji (GQ413963), z kleszczy w Szwecji (L36212) oraz *I. ricinus* pasożytujących na jeleniowatych (EU779822) pochodzących z tego samego terenu, co badane gryzonie i ssaki (Stańczak et al. 2009).

Consensus sekwencji fragmentów odpowiednich genów *R. helvetica* zdeponowano w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi: KJ7403888 [**publikacja nr 5**], KU728665 [**publikacja nr 6**] (16S rRNA) oraz KJ740389 (*gltA*) [**publikacja nr 5**].

Drugi gatunek riketsji – *R. monacensis* – został zidentyfikowany tylko w jednej puli larw zebranych z kosa [**publikacja nr 6**]. Poziom zakażenia kleszczy wynosił 0,2%. Sekwencja fragmentu genu 16S rRNA (GenBank akcesja nr KU728666) była identyczna lub w 99% zgodna ze zdeponowanymi w GenBanku sekwencjami *R. monacensis* z kleszczy m.in. z Niemiec (AF141907) i Słowacji (AF141908).

Obecność riketsji SFG u niedojrzałych form pasożytujących kleszczy może być wynikiem ich zakażenia drogą transowarialną, transstadialną, współżerowaniem lub też pobrania krwi od zakażonego żywiciela (transmisja horyzontalna). Jednakże w tym ostatnim przypadku wszystkie ptaki i gryzonie były uprzednio (Stańczak et al. 2009) lub obecnie przebadane [**publikacja nr 5**] i nie wykazano u nich riketsiemii. Zakażenie larw sugeruje zatem głównie transowarialny przekaz riketsji, a w przypadku nimf – drogę transstadialną, tym bardziej, że riketsiemia u kręgowców trwa krótko, a czas pasożytowania larw i nimf również jest krótki. Nie można wykluczyć również efektu współżerowania.

Uzyskane wyniki potwierdzają rezultaty wcześniejszych badań Stańczak et al. (2008, 2009), stwierdzających na obszarze Wielkopolski częste zakażenie *I. ricinus* riketsjami z grupy gorączek plamistych i to zarówno u kleszczy zebranych z roślinności, jak i z jeleniowatych. Podkreślić należy, iż minimalny wskaźnik zakażenia (MIR) larw i nimf *I. ricinus* zebranych z ptaków był odpowiednio 1,6 i 2,3 razy wyższy od poziomu zainfekowania larw i nimf z gryzoni [**publikacja nr 5**] i ponad dwukrotnie wyższy od nimf zebranych z jeleniowatych (Stańczak et al. 2009) z tego samego terenu. Jednocześnie wyniki prewalencji *R. helvetica* u kleszczy zebranych z tych trzech różnych grup żywicieli z terenu Parku Krajobrazowego „Puszcza Zielonka” były wyższe niż u nimf (4,9%), samców (5%) i samic (7%) *I. ricinus* zebranych z roślinności w lasach Wielkopolski (Stańczak et al. 2008). Najwyższy odnotowany odsetek młodocianych stadiów kleszczy zakażonych riketsjami SFG pasożytujących na Passe-riformes wskazuje, że ptaki te odgrywają ważną rolę w ich krążeniu i należy je brać pod uwa-

ge jako główny potencjalny rezerwuuar riketsji. Tym bardziej, że ostatnio wykryto aktywną rikettsię u ptaków z terenu Węgier (Hornok et al. 2014) i Słowacji (Berthová et al. 2016).

Również ostatnie badania Klaus et al. (2016) z terenu Niemiec, wykazały najwyższą infestację *I. ricinus* u *Turdus merula* i *T. philomelos* spośród 48 przebadanych gatunków ptaków. Świadczy to o niezwykle ważnej roli tych gatunków w rozprzestrzenianiu patogenów na nowe tereny, również nieendemiczne. W Polsce badania dotyczące roli ptaków w ekologii chorób odkleszczowych dotyczyły, jak dotąd, tylko boreliozy i anaplazmozy granulocytarnej (Gryczyńska et al. 2004, Skoracki et al. 2006, Michalik et al. 2008). Wyniki prezentowane w **publikacji nr 6** wnoszą nowe, istotne dane epidemiologiczne.

Nietoperze (Chiroptera) są drugim, po Rodentia, najliczniejszym gatunkowo rzędem ssaków, ale niewiele jest informacji o patogenach wektorowanych przez kleszcze, które na nich pasożytują. Jak dotąd wykryto *Rickettsia* spp. tylko u kleszczy miękkich *Carios vespertilionis* i *C. kelleyi* zebranych z tych ssaków (Loftis et al. 2005, Socolovschi et al. 2012).

Celem [**publikacji nr 7**] była między innymi detekcja DNA *Rickettsia* spp. w kleszczach twardych, pasożytujących na nietoperzach.

W latach 2010-2012 zebrano z nietoperzy i przebadano na obecność *Rickettsia* spp. 499 kleszczy: 491 *I. vespertilionis* i 8 *I. ricinus* (7 samic i 1 larwa). Kleszcze pospolite zebrane zostały z 4 gatunków nietoperzy: podkowca małego (*Rhinolopus hipposideros*), nocka dużego (*Myotis myotis*), nocka Bechsteina (*M. bechsteini*) i nocka rudego (*M. daubentonii*). Metodą opisaną w [**publikacji nr 5**] wykryto *Rickettsia* spp. u 3 samic *I. ricinus* zebranych podkowca małego i nocka dużego. Uzyskane sekwencje były wzajemnie identyczne i podobnie jak w przypadku sekwencji uzyskanych z *I. ricinus* zebranych z gryzoni i ptaków [**publikacje nr 5 i 6**], w 100% homologiczne z sekwencjami *R. helvetica* umieszczonych w bazie GenBank pochodzącymi z Niemiec JX040636, JX627379, KC007126, Francji KF447530, Rosji AM418450 i Szwecji GQ413963. *Consensus* sekwencji fragmentów genów *gltA* i 16S rRNA został zdeponowany w bazie GenBank pod numerami akcesyjnymi KJ577821 i KJ577822.

Było to nie tylko pierwsze wykrycie riketsji z grupy SFG u *I. ricinus* zebranych z nietoperzy, ale również wśród kleszczy twardych pasożytujących na tych ssakach. Dlatego też kleszcza pospolitego można uznać za rezerwuuar riketsji SFG nie tylko dla ptaków, ssaków naziemnych, w tym człowieka, ale również nietoperzy. Jednakże udział tego gatunku kleszcza wśród zebranych z badanych żywicieli był niewielki – 0,2%, a w związku z tym, nie pełni on istotnej roli w transmisji patogenów wśród nietoperzy.

4. Wnioski

1. Wykazano zakażenie kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* na badanych terenach wirusem kleszczowego zapalenia mózgu, co stwarza realne zagrożenie zdrowia i życia mieszkańców tych terenów.
2. Po raz pierwszy w Polsce przebadano na obecność wirusa KZM zebrane z roślinności larwy *I. ricinus*. Przeprowadzone badania wykazały wynik pozytywny, co wskazuje na transowarialną transmisję wirusa KZM.

3. Wśród kleszczy zebranych z roślinności w Puszczy Białowieskiej, a także na wybranych stanowiskach woj. Podlaskiego, wyższy średni odsetek zakażonych TBEV stwierdzono wśród *D. reticulatus* niż u *I. ricinus* (odpowiednio: 2,12% i 0,96%). Jest to zgodne z wcześniejszymi badaniami przeprowadzonymi w makroregionie lubelskim. Ze względu na fakt, że bydlę jest kompetentnym żywicielem kleszcza łąkowego, należy wziąć pod uwagę ważną rolę tego kleszcza w podtrzymywaniu i transmisji wirusa KZM w środowisku, jak też możliwość zakażenia ludzi poprzez niepasteryzowane mleko.
4. Po raz pierwszy stwierdzono RNA wirusa KZM w kleszczach *D. reticulatus* zebranych na terenie zurbanizowanym (Warszawa). Świadczy to o istotnej roli tego gatunku kleszcza jako czynnika umożliwiającego krążenie wirusa w środowisku miejskim, gdyż przez transmisję pionową możliwe jest utrzymywanie się wirusa w populacji kleszczy przez wiele pokoleń, nawet w przypadku braku w środowisku ssaka wrażliwego na zakażenie.
5. Po raz pierwszy wykazano RNA wirusa KZM u zimujących kleszczy *D. reticulatus* zebranych z żubrów – naturalnych żywicieli tych ektopasożytów w Puszczy Białowieskiej. Stwierdzenie zakażonych kleszczy zebranych z żywiciela sugeruje możliwość rozprzestrzeniania się patogenów poprzez dyspersję/migrację żywicieli.
6. Po raz pierwszy wykazano RNA TBEV u *Dermacentor reticulatus* po metamorfozie w warunkach laboratoryjnych, zebranych z naturalnego żywiciela w ognisku kleszczowego zapalenia mózgu. Fakt ten potwierdza możliwość transmisji transstadialnej TBEV również u tego gatunku kleszcza.
7. Wykazano wyższą (12x) infestację larwami *I. ricinus* u *Apodemus flavicollis* niż u *Myodes glareolus* w ekosystemie leśnym Wielkopolski, gdzie populacje tych gryzoni występują sympatrycznie. Niska infestacja u nornicy może być wynikiem immunologicznej odporności tych gryzoni nabytej po kolejnych ekspozycjach na larwy kleszczy. Tym samym to myszarka leśna ogrywa ważniejszą rolę jako żywiciel kleszczy i ewentualny rezerwuar *R. helvetica* niż nornica ruda.
8. Wykrycie *R. helvetica* u larw i nimef *I. ricinus* żerujących na gryzoniach i ptakach przy równoczesnym braku riketsiemii u żywicieli tych kleszczy, potwierdza wcześniejsze sugestie, że zakażenie kleszczy odbywa się głównie drogą transmisji wertykalnej (transowarialnej i/lub transstadialnej) lub też wskazuje na bardzo krótki okres riketsiemii u kręgowców.
9. Wyniki prewalencji *R. helvetica* u *I. ricinus* zebranych z ptaków były ok. dwukrotnie wyższe niż u kleszczy zebranych z gryzoni i jeleniowatych, co świadczy o ważnej roli jaką pełnią ptaki (zwłaszcza kosy i drozdy) w naturalnym cyklu krążenia tego patogena i sugeruje, że mogą pełnić one rolę kręgowego rezerwuaru *R. helvetica*.

10. Stwierdzono po raz pierwszy występowanie w kleszczach *I. ricinus* zebranych z nietoperzy riketsje z grupy gorączek plamistych, było to również pierwsze stwierdzenie tego patogenu w kleszczach twardej z tych żywicieli. Jednakże ze względu na niewielki udział kleszcza pospolitego wśród kleszczy pasożytujących na tych ssakach, jego rola jako wektora wydaje się mało znacząca.

Konkluzja

Znajomość biologii i zakresu żywicieli wektora, rozpoznanie gatunków rezerwuarowych oraz poznanie prevalencji patogenów odkleszczowych są kluczowymi aspektami badań nad ogniskowością naturalną chorób wektorowanych przez kleszcze oraz pozwalają przewidywać konsekwencje epidemiologiczne.

5. Piśmiennictwo

- Alekseev AN, Burenkova LA, Vasilieva IS, Dubinina HV, Chunikhin SP. 1996. Preliminary studies on virus and spirochete accumulation in the cement plug of ixodid ticks. *Exp Appl Acarol* 20 (12): 713-723.
- Andreassen A, Jore S, Cuber P, Dudman S, Tengs T, Isaksen K, Hygen HO, Viljugrein H, Ånestad G, Ottesen P, Vainio K. 2012. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in tick nymphs in relation to climatic factors on the southern coast of Norway. *Parasites & Vectors* 5: 177.
- Berthová L, Slobodník V, Slobodník R, Olekšák M, Sekeyová Z, Svitáľková Z, Kazímirová M, Špitalská E. 2016. The natural infection of birds and ticks feeding on birds with *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in Slovakia. *Exp Appl Acarol* 68: 299-314.
- Belova OA, Burenkova LA, Karganova GG. 2012. Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks – Evidence of virus replication and changes in tick behavior. *Ticks Tick Borne Dis* 3: 240-246.
- Biaduń W. 2011. New Habitats of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in the Lublin Region. *Pol J Environ Stud* 20 (2): 263–266.
- Biaduń W, Chybowski J, Najda N. 2007. A new records of *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in Lublin region. *Wiad Parazytol* 53 (1): 29–32.
- Biernat B, Matyjasek A, Stańczak J. 2013. The seroprevalence of antibodies against Spotted Fever Group rickettsiae among forestry workers from northern Poland. *Ann Parasitol* 59 suppl: 112.
- Biernat B, Karbowski G. 2014. Study on the occurrence of tick-borne encephalitis virus RNA in European bison (*Bison bonasus*) eliminated at Białowieża Primeval Forest (north-eastern Poland) in 2005-2009. *Ann Parasitol* 60 (2): 99-102.
- Bröker M, Gniel D. 2003. New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad. *Travel Med Infect Dis* 1 (3): 181– 184.
- Burgdorfer W, Aeschliman A, Péter S, Hayes SF, Philip RN. 1979. *Ixodes ricinus* vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. *Acta Trop* 36: 357-367.
- Chmielewski T, Podsiadły E, Karbowski G, Tylewska-Wierzbanowska S. 2009. *Rickettsia* spp. in ticks, Poland. *Emerg Infect Dis* 15: 486-488.
- Demiaszkiewicz W. 1952. Wiosenno-letnie kleszczowe zapalenie mózgu w Puszczy Białowieskiej. *Pol Tyg Lek* 7: 799-801.

- Dobler G, Essbauer S, Terzioglu R, Thomas A, Wölfel R. 2008. Prevalence of tick-borne encephalitis virus and rickettsiae in ticks of the district Burgenland, Austria. *Wien Klin Wochenschr* 120 (Suppl 4): 45–48.
- Dumpis U, Crook D, Oksi J. Tick-borne encephalitis. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 882–890.
- de la Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci* 13: 6938–6946.
- Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. 2000. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerg Infect Dis* 6: 389–392.
- Frimmel S, Krienke A, Riebold D, Loebermann M, Littmann M, Fiedler K, Klaus C, Süss J, Reisinger EC. 2014. Tick-Borne Encephalitis Virus Habitats in North East Germany: Reemergence of TBEV in Ticks after 15 Years of Inactivity. *BioMed Res Int*, Article ID 308371, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/308371>
- Gray J. 2008. *Ixodes ricinus* seasonal activity: Implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *Int J Med Microbiol* 298: 19-24.
- Gryczyńska A, Zgódka A, Płoski R, Siemiątkowki M. 2004. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in passerine birds from the Mazurian Lake region (Northeastern Poland). *Avian Pathol* 33: 69–75.
- Grzeszczuk A, Ziarko S, Radziwon PM, Prokopowicz D. 2004. Evidence of *Anaplasma phagocytophilum* infection of European Bison in the Białowieża Primeval Forest, Poland. *Med Wet* 60: 600-601.
- Hornok S, Csörgő T, de la Fuente J, Gyuranecz M, Privigyei C, Meli ML, Kreizinger Z, Gönczi E, de Mera F, Hofmann-Lehmann R. 2013. Synanthropic birds associated with high prevalence of tick-borne rickettsiae and with the first detection of *Rickettsia aeschlimannii* in Hungary. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 13: 77–83.
- Huang C, Slater B, Campbell W. 2001. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 94: 121–128.
- Hubálek Z, Rudolf J. 2012. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 111: 9-36.
- Izdebska JN. 1998. Występowanie *Dermacentor reticulatus* (Acari, Ixodidae) u żubra (*Bison bonasus*) z Puszczy Białowieskiej. *Przeegl Zool* 42: 219-221.
- Izdebska JN, Cydzik K. 2010. Analysis of the reasons of differences in topical specificity among various species of tick (Acari, Ixodidae) infesting European bison. *Eur Bison Conserv News* 3: 75–84.
- Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129, Suppl.: S3-S14.
- Karbowiak G. 2000. The role of *Apodemus flavicollis* and *Clethrionomys glareolus* as hosts of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* in northern Poland. W: Kazimírová M, Labuda M, Nuttall PA (red.), Proceedings of the 3rd International Conference “Ticks and Tick - borne pathogens: Into the 21st century”. High Tatra Mountains, Slovakia, 30 August - 3 September 1999. Institute of Zoology SAS, Bratislava, 181-183.
- Karbowiak G, Demiaszkiewicz A, Pyziel AM, Wita I, Moskwa B, Werszko J, Bień J, Goździk K, Lachowicz J, Cabaj W. 2014a. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 1. Summarizing list of parasites noted. *Acta Parasitol* 59 (3): 363-371.
- Karbowiak G, Demiaszkiewicz AW, Pyziel AM, Wita I, Moskwa B, Werszko J, Bień J, Goździk K, Lachowicz J, Cabaj W. 2014b. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2. The structure and changes over time. *Acta Parasitol* 59 (3): 372-379.
- Karbowiak G, Biernat B, Szewczyk T, Sytykiewicz H. 2015. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 1. The general pattern. *Ann Parasitol* 61 (4): 221-228.

- Karbowiak G, Vichová B, Werszko J, Demiaszkiewicz W, Pyziel AM, Sytykiewicz H, Szewczyk T, Petko B. 2015. The infection of reintroduced ruminants – *Bison bonasus* and *Alces alces* – with *Anaplasma phagocytophilum* in northern Poland. *Acta Parasitol* 60 (4): 645-648.
- Karbowiak G, Biernat B. 2016. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Ann Parasitol* 62 (1): 3-9.
- Karbowiak G, Biernat B, Stańczak J, Szewczyk T, Werszko J. 2016. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 3. Rickettsiae. *Ann Parasitol* 62 (2): 89-100.
- Katargina O, Russakova S, Geller J, Kondrusik M, Zajkowska J, Zygotiene M, Bormane A, Trofimova J, Golovljova I. 2013. Detection and Characterization of Tick-Borne Encephalitis Virus in Baltic Countries and Eastern Poland. *PLoS ONE* 8 (5): e61374. doi:10.1371/journal.pone.0061374
- Klaus C, Gethmann J, Hoffmann B, Ziegler U, Heller M, Beer M. 2016. Tick infestation in birds and prevalence of pathogens in ticks collected from different places in Germany. *Parasitol Res* 115: 2729-2740.
- Kmieciak W, Ciszewski M, Szewczyk EM. 2016. Choroby odkleszczowe w Polsce – występowanie i trudności diagnostyczne. *Med Pracy* 67 (1): 73-87.
- Lachmajer J, Kawecki Z. 1953. Szczepy wirusów neurotropowych izolowane z kleszczy *Ixodes ricinus* na Wybrzeżu. *Biul Inst Med Morsk Trop* 5: 49-53.
- Lachmajer J, Wegner Z, Kawecki Z. 1957. Spontaneous infection of ticks *Ixodes ricinus* with the virus of tick encephalitis in the coast-district. *Biul Inst Med Morsk Trop* 8 (3-4): 173-182.
- Leschnik M, Kirtz GC, Thalhammer JG. 2002. Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs. *Int J Med Microbiol* 291 (suppl 33): 66-69.
- Loftis AD, Gill JS, Schriefer ME, Levin ML, Eremeeva ME, Gilchrist MJR, Dasch GA. 2005. Detection of *Rickettsia*, *Borrelia* and *Bartonella* in *Carios kelleyi* (Acari: Argasidae). *J Med Entomol* 42: 473-480.
- Mączka I, Tylewska-Wierzbanowska S. 2012. Choroby serca jako późne powikłania zakażeń odzwierzęcych przenoszonych przez kleszcze. *Post Mikrobiol* 51 (1): 37-45.
- Mączka I, Roguska U, Tylewska-Wierzbanowska S. 2013. Występowanie riketsjoz w Polsce w latach 2006-2012. *Przegl epidemiol* 67: 721-723.
- Michalik J, Wodecka B, Skoracki M, Sikora B, Stańczak J. 2008. Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). *Int J Med Microbiol* 298:129-138.
- Mierzejewska EJ, Pawełczyk A, Radkowski M, Welc-Falęciak R, Bajer A. 2015. Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites & Vectors* 8: 490. DOI: 10.1186/s13071-015-1099-4
- Naumov RL, Gutova VP, Chunikhin SP. 1980. Ixodid ticks and the agent of tick-borne encephalitis. Communication 2. The genera *Dermacentor* and *Haemaphysalis*. *Med Parazit (Moskva)* 49 (3): 66-69.
- Nilsson K, Jaenson TGT, Uhnoo I, Lindquist O, Pettersson B, Uhlén M, Friman G, Pålsson C. 1997. Characterization of the spotted fever group rickettsia from *Ixodes ricinus* ticks in Sweden. *J Clin Microbiol* 35: 243-247.
- Nilsson L, Lindquist O, Pålsson C. 1999. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. *Lancet* 354: 1169-1173.
- Nilsson K. 2009. Septicaemia with *Rickettsia helvetica* in a patient with acute febrile illness, rash and myasthenia. *J Infect* 58:79-82.

- Nilsson K, Elfving K, Pålsson C. 2010. *Rickettsia helvetica* in patients with meningitis, Sweden, 2006. *Emerg Infect Dis* 16:490-492.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev* 18: 719-756.
- Podsiadły E, Chmielewski T, Karbowski G, Kędra E, Tylewska-Wierzbanowska S. 2011. The Occurrence of Spotted Fever Rickettsioses and Other Tick-Borne Infections in Forest Workers in Poland. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 11 (7): 985-989.
- Przesmycki F, Taytsch Z, Semkow Z, Walentynowicz-Stańczyk R. 1954. Research on the tick-borne encephalitis. I. Biology of the tick-borne encephalitis virus strains, isolated in Poland. *Przegl Epidemiol* 8: 205-214.
- Qviller L, Gróva L, Viljugrein H, Klingen J, Mysterud A. 2014. Temporal pattern of questing tick *Ixodes ricinus* density at differing elevations in the coastal region of western Norway. *Parasites & Vectors* 7, 179.
- Ramelow Ch, Süß J, Berndt D, Roggendorf M, Schreier E. 1993. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in ticks (*Ixodes ricinus*) by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 45: 115-119.
- Raoult D, Lakos A, Fenollar F, Beytout J, Brouqui P, Fournier PE. 2002. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with *Dermacentor* ticks. *Clin Infect Dis* 34: 1331-1336.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikyatis BD. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of interspecies divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 173: 1576-1589.
- Řeháček J, Kováčová E, Čiampor F, Grešíková M, Tarasevich IV. 1987. Experimental double infection with *Coxiella burnetii* and tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks. *Acta Virol* 31 (1): 65-73.
- Schneider H. 1931. Über epidemische acute 'Meningitis secosa'. *Wien Klin Wochenschr* 44: 350-352.
- Siński E, Gill J, Rijpkema S. 1996. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in European bison (*Bison bonasus*) from Białowieża Primeval Forest. *Rocz Akad Med Białystok* 41: 111-116.
- Skoracki M, Michalik J, Skotarczak B, Rymaszewska A, Sikora B, Hofman T, Wodecka B, Sawczuk M. 2006. First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites (Acari: Symbiophila) parasitizing passerine birds. *Microbes Infect* 8: 303-307.
- Socolovschi C, Mediannikov O, Raoult D, Parola P. 2009. The relationship between spotted fever group Rickettsiae in ixodid ticks. *Vet Res* 34: 40.
- Socolovschi C, Kernif T, Raoult D, Parola P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France 2010. *Emerg Infect Dis* 18: 1966.
- Stańczyk J. 2004. The first report of the occurrence of a spotted fever group rickettsia from *Ixodes ricinus* in Poland. *Wiad Parazytol* 50 (Suppl.): 112.
- Stańczyk J, Racewicz M, Michalik J, Buczek A. 2008. Distribution of *Rickettsia helvetica* in *Ixodes ricinus* tick populations in Poland. *Int J Med Microbiol* 298 (Suppl. 1): 231-234.
- Stańczyk J, Racewicz M, Michalik J, Cieniuch S, Sikora B, Skoracki M. 2009. Prevalence of infection with *Rickettsia helvetica* in feeding ticks and their hosts in western Poland. *Clin Microbiol Infect* 15 (Suppl 2): 328-329.
- Stańczyk J, Biernat B, Matyjasek A, Racewicz M, Zalewska M, Lewandowska D. 2016. Kampinos National Park – a risk area for spotted fever group rickettsioses, central Poland. *Exp Appl Acarol* DOI: 10.1007/s10493-016-0083-9
- Süß J. 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveil* 13, pii=18916
- Süß J. 2011. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – an overview. *Ticks Tick Borne Dis* 2: 2-15.

Süss J, Schrader C, Falk U, Wohanka N. 2004. Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany – epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *Int J Med Microbiol* 293: 69-79.

Süss J, Schrader Ch, Abel U, Voigt WP, Schosser R. 1999. Annual and seasonal variation of tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalence in ticks in selected hot spot areas in Germany using a nRT-PCR: results from 1997 and 1998. *Zentr Bakteriol* 289: 564–678.

Szczeklik A. (red.) 2010. Choroby wewnętrzne. Wyd. II, Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków: 2445 str.

Uspensky I. 2014. Tick pests and vectors (Acari: Ixodoidea) in European towns: Introduction, persistence and management. *Ticks Tick Borne Dis* 5: 41–47.

Wegner Z. 1995. Rezerwuary i przenosiciele wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. *Med ogólna* 30 (2): 146-152.

Welc-Falęciak R, Kowalec M, Karbowski G, Bajer A, Behnke JM, Siński E. 2014. Rickettsiaceae and Anaplasmataceae infections in *Ixodes ricinus* ticks from urban and natural forested areas of Poland. *Parasites & Vectors* 7: 121.

Wodecka B, Rymaszewska A, Skotarczak B. 2014. Host and pathogen DNA identification in blood meals of nymphal *Ixodes ricinus* ticks from forest parks and rural forests of Poland. *Exp Appl Acarol* 62: 543–555.

Wójcik-Fatla A, Cisak E, Zając V, Zwoliński J, Dutkiewicz J. 2011. Prevalence of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from the Lublin region (eastern Poland). *Ticks Tick Borne Dis* 2: 16-19

Wójcik-Fatla A, Cisak E, Zając V, Sroka J, Sawczyn A, Dutkiewicz J. 2013. Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. Prevalence in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Amblyommidae). *Ann Agric Environ Med* 20 (2): 276-279.

Zając V, Wójcik-Fatla A, Cisak E, Sroka J, Sawczyn A, Dutkiewicz J. 2013. Study on tick-borne rickettsiae in eastern Poland. II. Serological response of occupationally exposed populations. *Ann Agric Environ Med* 20 (2): 280-282.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Kierunki moich pozostałych zainteresowań naukowych można podzielić na następujące zagadnienia:

1. Badania faunistyczne stawonogów o znaczeniu medycznym (wektorów chorób transmisyjnych)
2. Detekcja patogenów w stawonogach hematofagicznych
 - A) w komarach
 - B) w kleszczach oraz w wybranych ich żywicielach
3. Diagnostyka chorób tropikalnych wektorowanych przez stawonogi u pacjentów powracających ze stref ich endemicznego występowania
4. Varia

Ad. 1. Wśród szerokiej tematyki badań parazytologicznych podejmowanych w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej, od wielu lat ważne miejsce zajmują badania faunistyczne wektorów chorób transmisyjnych: komarów i kleszczy.

Badania faunistyczne traktują faunę jako zasób biologiczny podlegający zmianom w czasie i wpływowi środowiskowym i antropogennym. Są bardzo ważnym elementem badań nad inwentaryzacją różnorodności biologicznej, prowadzonych w celu rejestracji zmian zachodzących w środowisku, a przypadku stawonogów o znaczeniu medycznym, również oszacowania ryzyka zagrożenia ze strony stawonogów przenoszących patogeny.

W latach 1988-1991 [Wegner et al. 1993] prześlędzono w okolicach jez. Żarnowieckiego wpływ antropopresji, związanej z budową elektrowni jądrowej, na faunę hematofagicznych muchówek. W porównaniu do stanu z wcześniejszych lat (Szadziwska et Okróy-Rysop 1988) stwierdzono niższą liczebność komarów (Diptera: Culicidae) (głównie wczesnowiosennych), a w badaniach jakościowych nie odnotowano obecności czterech gatunków notowanych uprzednio [Wegner et al. 1993].

Ponadto, w porównaniu z wcześniejszymi badaniami na tym terenie Okróy-Rysop (1987), zaobserwowałam ilościowe i jakościowe zubożenie (o 10 gatunków) fauny kuczmanów (Diptera: Ceratopogonidae) [Kubica-Biernat 1993]. Stwierdzono tym samym, że na skutek silnej antropopresji zaszły przekształcenia prowadzące do zubożenia fauny muchówek z rodzin Culicidae i Ceratopogonidae.

Kolejnym aspektem badań faunistycznych jest inwentaryzacja entomofauny. W tym celu zebrałam dostępne dane bibliograficzne od 1893 roku (Bobek 1893) do 1999, dotyczące występowania Culicidae w naszym kraju i naniosłam je w siatce UTM, która dzieli Europę na kwadraty o bokach 10 km x 10 km, w tym Polskę na ponad 3000 kwadratów. W ten sposób sporządzono 47 map rozmieszczeniowych Culicidae [Kubica-Biernat 1999]. System UTM nie odzwierciedla współrzędnych geograficznych, jest natomiast precyzyjnym narzędziem służącym do sporządzania map rozmieszczeniowych zwierząt, głównie bezkręgowych oraz ich ewidencji przez wyspecjalizowane ośrodki (Centrum Dokumentacji Faunistycznej Instytutu Zoologii PAN). Było to podsumowanie ponad stuletnich badań nad tą rodziną owadów w Polsce i punkt odniesienia do dalszych.

Pomimo licznych publikacji dotyczących Culicidae, wiedza na temat występowania Anophelinae w Polsce jest nadal fragmentaryczna i nieadekwatna do stanu faktycznego. Analiza rekordów historycznych w siatce UTM (od 1999 roku) oraz materiału entomologicznego *Anopheles claviger* s.l. zebranego w latach późniejszych [Kubica-Biernat 2007b] wskazuje, że obecnie gatunek ten nie występuje w naszym kraju tak licznie jak sugerują poprzednie badania (Lachmajer 1971, Skierska 1977).

Przeanalizowano również rolę rodzimych gatunków Anophelinae w przenoszeniu *Plasmodium vivax* na terenie Polski [Kubica-Biernat 2005]. W Europie środkowej malaria wywoływana była głównie przez *P. vivax*, a incydentalne przypadki tej choroby wywoływane przez *P. falciparum*, związane były z migracją ludności z południa na północ Europy. Pomimo, że Polska w 1968 roku została uznana przez WHO za kraj wolny od malarii endemicznej (WHO 1968), stałe występowanie wektorów tej choroby oraz wzmożony ruch turystyczny do krajów

endemicznego jej występowania, stwarza realne zagrożenie reintrodukcji malarii do naszego kraju.

W badaniach przeprowadzonych na Mierzei Wiślanej [**Kubica-Biernat et Kowalska-Ulczyńska 2006**], zebrano ponad 20 tys. komarów należących do 22 gatunków, na 47 odnotowanych wówczas w Polsce, co stanowi niemal połowę (47%) fauny Culicidae naszego kraju (Kubica-Biernat 1999). Wśród zebranego materiału 2,18% zbioru komarów należało do podrodziny Anophelinae, a 97,82% do Culicinae. Wykazano 12 gatunków nowych dla tego terenu, co stanowi 1/4 fauny komarów badanego obszaru. Gatunkami dominującymi były: *Ochlerotatus cantans*, *Oc. communis* oraz *Oc. cataphylla*, wszystkie w Polsce występujące plagowo, agresywne w stosunku do człowieka.

Ważnym aspektem badań faunistycznych jest fauna miast. Fauna komarów aglomeracji miejskich w Polsce jest zróżnicowana, wykazano bowiem 33 gatunki, co stanowi 66% fauny Culicidae Polski. Oznaczono morfologicznie bogaty materiał (ponad 14.000 komarów) zebrany w latach 2000-2001 w Trójmieście [**Kubica-Biernat et al. 2007a**]. Aglomeracja Trójmiejska, szczególnie Gdańsk, wzbudzał zainteresowanie kulicidologów już w okresie międzywojennym, kiedy to wykazano obecność 15 gatunków (Martini 1920). W badaniach przeprowadzonych pod moim kierunkiem, stwierdzono 20 gatunków, wśród nich aż 7 plagowych i antropofilnych: *Aedes cinereus*, *Oc. cantans*, *Oc. caspius*, *Oc. communis*, *Oc. punctator*, *Oc. sticticus* oraz *Culex pipiens*. Tym samym wykazano występowanie potencjalnych wektorów groźnych chorób transmisyjnych, stanowiących zagrożenie zdrowia i życia ludzi. Ponadto stwierdzono też dla badanego terenu trzy nowe gatunki: *Oc. cataphylla*, *Cx. territans*, *Cx. torrentium*. Interesująco przedstawia się udział poszczególnych gatunków w faunie Gdańska przed i po powodzi w 2001 roku. Rok przed powodzią, udział *Cx. pipiens* – potencjalnego wektora arbowirusów (np. gorączki Zachodniego Nilu) wynosił 23,8%, a bezpośrednio po powodzi aż 97%. Odsetek pozostałych gatunków osiągał wartości poniżej 1%. Jeszcze rok po powodzi odsetek *Cx. pipiens* wynosił ponad 76%. Tym samym można stwierdzić, że w Trójmieście wzrósł udział gatunków plagowych, mogących przenosić wirusa gorączki Zachodniego Nilu i inne arbowirusy. Jak wiadomo *Cx. pipiens* i *Cs. annulata* zimują w stadium *imago*, co znacząco wpływa na zwiększenie ryzyka transmisji arbowirusów ze względu na możliwość przeżywania arbowirusów w ciele hibernujących samic komarów. Natomiast w bezpośrednim sąsiedztwie portu lotniczego Gdańsk-Rębiechowo stwierdzono miejsca wylęgu *Anopheles maculipennis* complex – głównego wektora malarii w Europie oraz *An. claviger* s.s. Taka sytuacja stwarza realne niebezpieczeństwo powstania lokalnego ogniska malarii w sezonie letnim, w przypadku importowania drogą lotniczą zarażonych *Plasmodium vivax* komarów lub też zarażonych żywicieli pośrednich – ludzi.

Do badań faunistycznych wdrożyłam również technikę PCR i sekwencjonowania DNA bowiem w obrębie gatunków kompleksowych, istnieją kryptogatunki (gatunki bliźniacze) morfologicznie nierozróżnialne, ale wykazujące różnice w biologii i behawiorze. Problem identyfikacji gatunków o znaczeniu medycznym jest o tyle istotny, że w obrębie kompleksów gatunków współistnieją gatunki wektorujące patogeny oraz nie będące przenosicielami, przy czym mogą one występować sympatrycznie (Black et Munstermann 1996). Gatunki takie mogą różnić się wrażliwością na działanie insektycydów, np. opartych na bakteriach *Bacillus thuringiensis* (Stegnii et al. 1996), co ma istotne znaczenie przy zabiegach zwalczających.

Rozróżnienie morfologiczne imagines kompleksu „*maculipennis*” jest trudne, czasochłonne i nierzadko zakończone niepowodzeniem. Polega ono bowiem na różnicach w deseniach powierzchni chorionu jaj złożonych przez hodowane samice (Bates et Hackett 1939). Badania identyfikujące kryptogatunki komarów z kompleksu *An. maculipennis* przeprowadzono na obszarze północnej Polski – niegdyś endemicznym terenie występowania malarii (woj. Pomorskie, Podlaskie i Warmińsko-Mazurskie - 22 kwadraty siatki UTM) stosując metodę PCR [Kubica-Biernat et Kowalska-Ulczyńska 2011]. Reakcję PCR przeprowadzano stosując startery specyficzne gatunkowo, komplementarne do sekwencji rybosomalnego DNA regionu ITS2 trzech kryptogatunków *An. maculipennis* complex. Gatunkiem dominującym był *An. messeae* – gatunek słodkowodny, który był głównym wektorem *P. vivax* w Europie środkowo-wschodniej. Nie stwierdzono halofilnego *An. atroparvus* – gatunku charakterystycznego dla wybrzeża Bałtyku, wykazanego uprzednio jako dominujący na tym terenie (Lachmajer 1948). Stwierdzono natomiast nowe stanowiska występowania *An. maculipennis* s.s. i *A. messeae* (9 kwadratów UTM), przy czym w Borach Tucholskich i na Pojezierzu Iławskim wykazano te dwa gatunki po raz pierwszy, jak też pierwszy raz wykazano *An. maculipennis* s.s. na Pojezierzu Mazurskim. Analiza sekwencji DNA nie wykazała niespecyficznych różnic wewnątrzgatunkowych badanych osobników (reprezentowały ten sam haplotyp ITS2), zarówno wśród *An. maculipennis* s.s. jak i *An. messeae*, pochodzących z różnych rejonów północno-wschodniej Polski, a sekwencje były identyczne z opublikowanymi sekwencjami tych gatunków pochodzących z Anglii, Grecji, Chin i Włoch. Była to pierwsza w Polsce identyfikacja kryptogatunków komarów metodą PCR.

Publikacje z tego zakresu

Kubica-Biernat B. 1993. Badania faunistyczno-ekologiczne nad hematofagicznymi muchówkami prowadzone w okolicach Jeziora Żarnowieckiego w latach 1988-1991. Część II. Kuczmany (Diptera, Ceratopogonidae). *Biuletyn Metodyczno-Organizacyjny Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* 26, 2-4: 73-80.

Wegner Z., **Kubica-Biernat B.**, Stańczak J., Racewicz M. 1993. Badania faunistyczno-ekologiczne nad hematofagicznymi muchówkami prowadzone w okolicach Jeziora Żarnowieckiego w latach 1988-1991. Część I. Komary (Diptera, Culicidae). *Biuletyn Metodyczno-Organizacyjny Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej* 26, 2-4: 55-72.

Kubica-Biernat B. 1999. Distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Poland. *European Mosquito Bulletin* 5: 1-17.

Kubica-Biernat B. 2005. Malaria i jej wektory w Polsce. W: „Stawonogi. Różnorodność form i oddziaływań” (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 281-287.

Kubica-Biernat B., Kowalska-Ulczyńska B. 2006. Fauna komarów (Diptera: Culicidae) Mierzei Wiślanej. W: „Stawonogi. Znaczenie epidemiologiczne”. (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 145-151.

Kubica-Biernat B., Kowalska-Ulczyńska B., Stańczak J. 2007a. Komary (Diptera: Culicidae) Trójmiasta. W: „Stawonogi. Środowisko, patogeny i żywiele”, (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 61-66.

Kubica-Biernat B. 2007b. Biologia i występowanie *Anopheles claviger* s.l. (Diptera: Culicidae) w Polsce. W: „Stawonogi. Środowisko, patogeny i żywiele”, (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 67-70.

Kubica-Biernat B., Kowalska-Ulczyńska B. 2011. Identification and distribution of sibling species of *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) in north-eastern Poland. *Fragmenta Faunistica* 54 (1): 17-27.

Piśmiennictwo

Bates M, Hackett LW. 1939. The distinguishing characteristics of the populations of *Anopheles maculipennis* found in southern Europe. *Proc Int Congr Ent* 3: 1555-1569.

- Black WCIV, Munstermann L.E. 1996. Molecular systematics in vector biology. W: *Biology of Disease Vectors*, Beaty B.J., Marquardt W.C. eds., Univ. Press of Colorado, Niwot, Colorado, 632 str.
- Bobek K. 1893. Przyczynek do fauny muchówek Krakowskiego okręgu. *Spraw Komisji Fizyograf* 28: 8-27.
- Kubica-Biernat B. 1999. Distribution of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Poland. *Eur Mosquito Bull* 5: 1-17.
- Lachmajer J. 1948. Rasy gatunku *Anopheles maculipennis* Mg. występujące na wybrzeżu (rok 47/48). *Przeegl Epidemiol* 2 (1/2): 133-136.
- Lachmajer J. 1971. Biology of *Anopheles claviger* (Meigen, 1804) populations (Diptera, Culicinae) in the Gdańsk environment. *Acta Parasitol Pol* 14 (14): 163-184.
- Martini E. 1920. Über Stechmücken besonders deren europäischen Arten und ihre Bekämpfung. *Arch Schiff – u. Tropenhyg* 24: 1-259.
- Okróy-Rysop G. 1987. Research on parasitic Arthropods of the Lake Żarnowieckie environs, conducted out in 1981-1985. I Part: Biting Midges (Diptera, Ceratopogonidae). *Bull Inst Mar Trop Med* 38: 76-87.
- Skierska B. 1977. Klucze do oznaczania owadów Polski. Część XXVIII. Muchówki – Diptera. Zeszyt 9b. Komary – *Culicidae*. Warszawa, PWN, 120 str.
- Stegnii VN Sharakov IV, Sharakova MV, Sibataev AK, Wasserlauf IE, Burlak VA. 1996. Evolution-genetic analysis of the palearctic *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) complex. *Abstracts of the Xth SOVE Meeting*, Strasbourg 3-7.09.1996: 41.
- Szadziewska M, Okróy-Rysop G. 1988. Research on parasitic Arthropods of the Lake Żarnowieckie environs, conducted out in 1981-1985. II Part: Mosquitoes (Diptera, Culicidae). *Bull Inst Mar Trop Med* 39: 215-226.
- World Health Organization. 1968. Technical report series. 382: 39.

Ad. 2. A. Detekcja patogenów w stawonogach hematofagicznych od wielu lat jest wiodącym tematem badawczym realizowanym w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej GUMed.

Wirusy przenoszone przez stawonogi – arbowirusy, zwłaszcza z rodziny Flaviviridae, odpowiedzialne są szereg chorób objawiających się m. in. objawami grypopodobnymi, biegunkami, dreszczami, bólami głowy, wysypką plamisto-grudkową, wymiotami, wysoką gorączką czy zapaleniem mózgu. W obrębie rodzaju *Flavivirus* występują, patogeniczne również dla ludzi, wirusy takie jak np.: wirus żółtej gorączki (YFV), dengi (DENV), Usutu (USUV), Zika (ZIKV) oraz wirus Kamiti (KRV) i gorączki Zachodniego Nilu (WNV) (Kuno et al. 1998). Zoonotycznym rezerwuarem tych patogenów są przede wszystkim zwierzęta dzikie: gryzonie, psowate, naczelnne, jeleniowate oraz ptaki, a wektorami hematofagiczne muchówki – głównie komary.

W latach 2004-2007 prowadziłam badania nad rolą komarów w krążeniu arbowirusów na terenie woj. Pomorskiego i w Gdańsku. Zimujące komary odławiano w piwnicach, oborach, budynkach mieszkalnych i w wolnej przyrodzie. Zebrano, oznaczono i przebadano metodą RT-PCR na obecność Flaviviridae przenoszonych przez komary ponad 14.400 komarów. Wprawdzie nie stwierdzono obecności ich RNA w badanych próbach, jednakże wykazano, iż w zebranych materiale dominował *Cx. pipiens* – potencjalny wektor arbowirusów, którego

udział wzrasta i który nadal znajduje dogodne warunki lęgu i zimowania na terenie Gdańska [Kubica-Biernat et al. 2008].

Wirus gorączki Zachodniego Nilu (WNV) jest etiologicznym czynnikiem gorączki Zachodniego Nilu (WNF). W Europie znany od ponad 30 lat i dynamicznie obejmujący nowe obszary, zwłaszcza w Ameryce Północnej (Hubálek et Halouzka 1999). Badania mające na celu wykrycie WNV w komarach przeprowadzono w latach 2004-2009 na terenie prawdopodobnego występowania WNV tj. Puszczy Białowieskiej, Kampinoskiej i Piskiej [Kubica-Biernat et al. 2009]. Zebrano i przebadano metodą heminested RT-PCR ponad 15 tys. komarów. Pomimo braku wyników pozytywnych, istnieją przesłanki, że WNV w Polsce występuje (Hermanowska-Szpakowicz et al. 2006; Hubálek et al. 2008; Juricova et al. 1998; Knap et Kubica-Biernat 2003).

W 1998 roku podjęto natomiast badania dotyczące występowania czynnika etiologicznego boreliozy z Lyme u rodzimych komarów [Kubica-Biernat et al. 1998]. Przebadano na obecność krętków *Borrelia burgdorferi* s.l. metodą PCR i odczynem immunofluorescencji pośredniej (OIP) hibernujące samice *Cx. pipiens*, *Culiseta* sp., *Anopheles* sp. i *Aedes* sp. zebrane z „przynyty ludzkiej” w naturalnym ognisku boreliozy z Lyme. Uzyskano 0,5% dodatnich wyników metodą OIP oraz 6,25% metodą PCR. Poziom zainfekowania komarów krętkami *B. burgdorferi* należy wiązać z odsetkiem zakażonych kleszczy i dostępnością rezerwuarów na danym terenie. Na obszarach, gdzie występuje wysoka zapadalność na boreliozę, odsetek zakażonych krętkami komarów sięgał nawet 8% jak np. w stanie Connecticut (USA) (Magnarelli et al. 1986). Było to pierwsze w Polsce wykazanie tych krętków w komarach.

Publikacje z tego zakresu

Kubica-Biernat B., Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W. 1998. Detection of etiological agent of Lyme borreliosis in native mosquitoes (Diptera: Culicidae) population. *Wiadomości Parazytologiczne* 44, 4: 756-757.

Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Chrzanowska A., Kowalska-Ulczyńska B., Stańczak J., Racewicz M. 2008. Badania nad występowaniem arbowirusów z rodziny Flaviviridae u komarów (Diptera: Culicidae) z terenu województwa Pomorskiego. W: „Stawonogi. Oddziaływanie na żywiciela.” (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), AKAPIT, Lublin: 125-135.

Kubica-Biernat B., Kruminis-Łozowska W., Stańczak J., Cieniuch S. 2009. Badania nad występowaniem wirusa Zachodniego Nilu u komarów (Diptera: Culicidae) na wybranych terenach Polski. *Wiadomości Parazytologiczne* 55, 3: 259-263.

Piśmiennictwo

Hermanowska-Szpakowicz T, Grygorczuk S, Kondrusik M, Zajkowska J, Pancewicz S. 2006. Za każenie wirusem zachodniego Nilu. *Przegl Epidemiol* 60: 93–98.

Hubálek Z, Halouzka J. 1999. West Nile Fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 5: 643–650.

Hubálek Z, Wegner E, Halouzka J, Tryjanowski P, Jerzak L, Šikutova S, Rudolf I, Kruszewicz AG, Jaworski Z, Włodarczyk R. 2008. Serologic survey of potential host for West Nile virus in Poland. *Viral Immunol* 21: 247–253.

Juricova Z, Pinowski J, Literak I, Hahm KH, Romanowski J. 1998. Antibodies to Alphavirus, Flavivirus and Bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian Dis* 42: 182–185.

Knap JP, Kubica-Biernat B. 2003. Czy gorączka Zachodniego Nilu (WNF) dotarła do Polski? Stanowisko zespołu ekspertów powołanych przez głównego inspektora sanitarnego. *Przeegl Epidemiol* 57: 399-404.

Kuno G, Chang G-J, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. 1998. Phylogeny of the Genus *Flavivirus*. *J. Virol.* 72 (1): 73-83.

Magnarelli LA, Anderson JF, Barbour AG. 1986. The etiologic agent of Lyme disease in deer flies, horse flies, and mosquitoes. *J Infect Dis* 154: 355-358.

Ad. 2. B. Kleszcze są wektorami wielu gatunków wirusów, riketsji, bakterii oraz pierwotniaków wywołujących infekcje i inwazje mające zazwyczaj ciężki przebieg i nierzadko kończące się śmiercią.

Borelioza z Lyme (krętkowica kleszczowa) jest jedną z najważniejszych i najszerzej rozprzestrzenioną chorobą wektorowaną przez kleszcze, której zoonotycznym źródłem są gryzonie leśne, natomiast wektorami kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Czynnikiem etiologicznym są Gram-ujemne krętki z kompleksowego gatunku *Borrelia burgdorferi*. W Polsce pierwsze zdiagnozowane przypadki boreliozy z Lyme zostały opisane u pacjentów z Pomorza Zachodniego (Januszkiewicz et Kieda 1987). Pierwsze w Polsce badania nad występowaniem *B. burgdorferi* s.l. w populacjach *I. ricinus*, prowadzono z moim udziałem, na początku lat 90-tych ub. wieku, na terenie byłego woj. olsztyńskiego. Obecność krętków u nimf i postaci dorosłych kleszczy, zebranych z roślinności oraz z jeleniowatych, wykryto przy zastosowaniu odczynu immunofluorescencji pośredniej (OIP) [Wegner et al. 1993/94]. Ogólny poziom infekcji wynosił 11,5%, a na niektórych stanowiskach badawczych sięgał nawet do 35,7%. Uzyskane rezultaty wykazały, że na badanym terenie *B. burgdorferi* krąży w naturalnym cyklu, a jej głównym wektorem jest *I. ricinus* oraz potwierdziły, że istnieją tam ogniska boreliozy z Lyme.

Kolejne prace badawcze, w których uczestniczyłam, wniosły istotny wkład w poznanie rozprzestrzenienia *B. burgdorferi* s.l. w populacjach kleszcza pospolitego w Polsce. Najintensywniejsze badania były prowadzone na terenach północno-wschodniej i północnej Polski. Odłowiono tam z roślinności i przebadano metodą OIP 15.830 nimf i dorosłych *I. ricinus*. Krętki wykryto odpowiednio u 6,5% i 8,8% kleszczy pochodzących z ówczesnego woj. gdańskiego i białostockiego [Wegner et al. 1997a, 1997b, 1997c]. Ponadto oprócz wykazania nowych ognisk boreliozy w byłym woj. białostockim i olsztyńskim, gdzie zakażenie kleszczy wynosiło odpowiednio 4,1% i 10,3%, krakowskim (15,5%) i katowickim (37,5%), wykryto kolejne: w woj. śląskim, elbląskim, bydgoskim i lubelskim, potwierdzając iż *B. burgdorferi* jest rozprzestrzeniona w populacjach kleszczy na terenie całego kraju [Stańczak et al. 1997, 1999]. Do badań tych zastosowano technikę PCR (startery specyficzne do fragmentu genu *fla*). W ten sam sposób przebadano *I. ricinus* zebrane w zalesionych, rekreacyjnych okolicach Weilburga (Hesja, Niemcy), wykazując ekstensywność u larw, nimf, samców i samic wynoszącą odpowiednio: 0%, 6,9%, 13,9% i 20,9% [Stańczak et al. 2002a].

Ludzka anaplazmoza granulocytarna (*ang.* HGA – human granulocytic anaplasmosis), początkowo znana jako ludzka ehrlichioza granulocytarna (*ang.* HGE - human granulocytic ehrlichiosis), jest wywoływana przez Gram-ujemne bakterie (Anaplasmataceae), będące

obligatoryjnymi, wewnątrzkomórkowymi pasożytami białych krwinek. HGA opisana była po raz pierwszy w 1994 r. w USA (Bakken et al. 1994; Chen et al. 1994). Pierwsze kliniczne przypadki HGA w Polsce zdiagnozowano w 2000 roku (Tylewska-Wierzbanowska et al. 2001). Bazując na wynikach badań molekularnych (PCR), wykazano zakażenie *A. phagocytophilum* populacji *I. ricinus* z terenu północnej i północno-wschodniej Polski. U kleszczy zebranych na Pojezierzu Mazurskim i Podlasiu (okolice Białegostoku i Puszcza Białowieska) ogólny odsetek zainfekowanych osobników wynosił 8,7%, a w woj. Pomorskim sięgał 19,2%. Zaobserwowano znaczne różnice ekstensywności zakażenia kleszczy z różnych stanowisk badawczych, od 0% aż do 38,5%. [Stańczak et al. 2002b]. W Puszczy Białowieskiej, znanym ognisku boreliozy i kleszczowego zapalenia mózgu, stwierdzono 16% zakażonych *A. phagocytophilum* *I. ricinus* (PCR) oraz seropozytywność u ponad 6% przebadanych metodą OIP surowic krwi pracowników leśnych. Powyższe wyniki potwierdziły krążenie czynnika HGA w naturalnym ekosystemie leśnym [Grzeszczuk et al. 2002].

Zbadano również występowanie *A. phagocytophilum* na rekreacyjnych, zalesionych obszarach miejskich i podmiejskich – środowiskach, gdzie ekspozycja ludzi na ataki kleszczy bywa najczęstsza. Przeprowadzono je na terenie dzielnic mieszkaniowych Trójmiasta i okolic [Stańczak et al. 2004]. Badania wykazały, że *I. ricinus* występuje tam licznie, a najwyższe zakażenie odłowionych kleszczy (19,2%), występowało w granicach Gdańska, w Gdyni wynosiło 11,7%, a w Sopocie 5,1%. Odsetek samic *I. ricinus*, u których wykryto *A. phagocytophilum* sięgał nawet ponad 47%.

Babeszjoza jest zoonozą przenoszoną przez kleszcze, wywoływaną przez pierwotniaki z rodzaju *Babesia*. Jest to jedna z najczęstszych inwazji wśród dziko żyjących i hodowlanych zwierząt na całym świecie, wzbudza zainteresowanie klinicystów również jako rozwijająca się choroba ludzi. Spośród ok. 100 znanych gatunków *Babesia* spp., głównie dwa: *B. microti* (pasożyt gryzoni) i *B. divergens* (pasożyt bydła) wywołują inwazje u ludzi. Technika PCR wykryła DNA tego pasożyta (fragment genu SS-rDNA) u 2,4% ogółu nimf i dorosłych kleszczy. Prawie 3-krotny wzrost zakażenia dorosłych kleszczy w porównaniu do nimf potwierdzał, że podobnie jak w przypadku *B. burgdorferi*, rezerwuarem zoonotycznym *B. microti* są głównie gryzonie. W Trójmieście najwyższy poziom infekcji (3,1%) notowano na stanowiskach w Gdańsku, w Sopocie i Gdyni, wynosił on odpowiednio 2,6% i 1,5%. Wyniki te wskazują, że mieszkańcy osiedli przyleśnych oraz osoby korzystające z leśnych terenów są potencjalnie narażeni na inwazję *B. microti* [Stańczak et al. 2004].

Badania kleszczy prowadzono również w kierunku wykrycia riketsji z grupy gorączek plamistych [Stańczak et al. 2016]. Przebadano na obecność *Rickettsia* sp. 1041 kleszczy: 305 *I. ricinus* i 736 *D. reticulatus* zebranych z roślinności w Puszczy Kampinoskiej w latach 2012-2013. DNA *Rickettsia* sp. wykazano u 27,5% kleszczy pospolitych i 42,8% kleszczy łąkowych. Analiza sekwencji wykazała iż *I. ricinus* zakażony był *R. helvetica* (27,5%), zaś *D. reticulatus* *R. raoultii* (42,8%). Wstępne badania serologiczne w kierunku *Rickettsia* SFG wykazały seropozytywność (IgG) ogółem u 31,1% przebadanych 74 pracowników, mieszkańców i gości Kampinoskiego Parku Narodowego. Analiza regresji wykazała, że czynnikami ryzyka związanymi z seropozytywnością były: zawodowa ekspozycja na ukłucia kleszczy ($p = 0,002$), ich częstość ($p = 0,02$) i płeć męska ($p = 0,005$).

Ważnym zagadnieniem jest współwystępowanie omawianych powyżej gatunków mikroorganizmów nie tylko w obrębie populacji *I. ricinus* z różnych regionów kraju, ale przede wszystkim w organizmie pojedynczego kleszcza, gdyż może wskazywać na możliwość jednoczesnej transmisji żywicielowi kilku patogenów. Często u dorosłych kleszczy (26,8%) notowano infekcje mieszane dwoma, a nawet trzema gatunkami *B. burgdorferi* s.l. [Stańczak et al. 2000]. Wykazano również możliwość wystąpienia u *I. ricinus* koinfekcji *A. phagocytophilum* i *B. burgdorferi* s.l. (8,3 – 16,7%), *A. phagocytophilum* i *B. microti* (2,0%), a także *B. microti* i *B. burgdorferi* s.l. (0,3%) [Stańczak et al. 2002b, 2004]. Koinfekcja *A. phagocytophilum* i *Babesia* spp. badana była w kleszczach równocześnie [Stańczak et al. 2015]. Przebadano *I. ricinus* (n=1875) zebrane z miejskich (Trójmiasto) i wiejskich (Pojezierze Kaszubskie) stanowisk woj. Pomorskiego. Do detekcji jakościowej i ilościowej obu patogenów zastosowano duplex real-time PCR i qPCR ze starterami komplementarnymi do fragmentów genów 16S rRNA i 18S rRNA. Częstość występowania w/w patogenów była zdecydowanie niższa u nimf niż u postaci dorosłych (p=0,02) oraz na obszarach wiejskich niż na miejskich (p=0,007). Dominującym gatunkiem wśród *Babesia* spp. okazał się *B. venatorum*, który również może wywoływać inwazje u ludzi. Różnice w wynikach qPCR z zastosowaniem kołowych i liniowych plazmidów użytych jako standardy okazały się znaczące (0,001). Liczba kopii *A. phagocytophilum* i *Babesia* spp. ustalona na podstawie plazmidu liniowego była odpowiednio 28,7 i 5,1 raza niższa w porównaniu z plazmidem kołowym. Uzyskane niskie wskaźniki prevalencji tych patogenów u kleszczy wskazują, że ryzyko zakażenia dla miejscowej ludności i turystów jest niskie. Potwierdzono też najnowsze badania (Hou et al. 2010), które wskazują na przeszacowanie wyników przy stosowaniu kołowego plazmidu DNA, co czyni go mniej użytecznym do badań niż plazmid liniowy, który powinien być rekomendowany do badań metodą qPCR.

Jak wiadomo, dzikie i domowe zwierzęta bywają wykorzystywane jako wskaźniki rozpoznawania terenów endemicznych, dokumentują ten fakt prace dotyczące stwierdzania wiremii TBEV u drobnych ssaków, ptaków i jeleniowatych (Achazi et al. 2011, Mikryutova et al. 2013, Jemeršić et al. 2014, Pinter et al. 2014) oraz serokonwersji (Gerth et al. 1995, Cisak et al. 2012, Klaus et al. 2012). Celem pracy [Biernat et Karbowski 2014] była detekcja wirusa KZM u żubrów (*Bison bonasus bonasus*) żywicieli *Dermacentor reticulatus* w Puszczy Białowieskiej – endemicznym terenie występowania KZM. Przebadano na obecność wirusa KZM krew pobraną z 95 żubrów odstrzelonych w latach 2005-2009 w Puszczy Białowieskiej oraz od dwóch płodów. Wszystkie wyniki były negatywne. Prawdopodobnie wiremia, tak jak u bydła domowego i Cervidae, trwa u żubrów krótko (Achazi et al. 2011), a w związku z tym, ten gatunek żywicieli nie powinien być brany pod uwagę jako wskaźnik terenów endemicznych KZM. Możliwe jednak, że zwierzęta te pełnią rolę „mostu” pomiędzy zainfekowanymi i wolnymi od infekcji TBEV kleszczami bowiem poprzez współżerowanie (*ang.* co-feeding) może dochodzić do zakażenia niezainfekowanych osobników pomimo braku wiremii u żywiciela.

Patogeny przenoszone przez kleszcze występują w środowisku naturalnym pospolicie, jednakże ich występowanie ma charakter ogniskowy. W pracy [Karbowski et al. 2015] przeanalizowano rolę poszczególnych komponentów ogniska enzoptycznego oraz rolę stadiów rozwojowych *I. persulcatus* complex i *Dermacentor* spp. w krążeniu patogenów w Europie

środkowej. Analogiczną analizę przeprowadzono dla rodzimych gatunków kleszczy w odniesieniu do wirusa kleszczowego zapalenia mózgu [Karbowiak et Biernat 2016] oraz riketsji z grupy SFG [Karbowiak et al. 2016].

Publikacje z tego zakresu

Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., **Kubica-Biernat B.** 1993/94. Occurrence of *Borrelia spirochaetes* in ticks (Acari, Ixodidae) collected in the forest areas in Olsztyn province (north central Poland). *Bulletin of the Institute of Maritime and Tropical Medicine in Gdynia* 44/45, 1-4: 51-59.

Wegner Z., Stańczak J., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.**, Kruminis-Łozowska W. 1997a. The etiological agent of Lyme diseases, *Borrelia burgdorferi* in ticks (Acari: Ixodidae) from eastern Poland. *Zentralblatt für Bakteriologie* 286: 93-106.

Stańczak J., **Kubica-Biernat B.**, Burkiewicz A., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kur J. 1997. Wstępne badania nad zastosowaniem techniki reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) do wykrywania krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae). *Problemy Higieny* 54: 122-126.

Wegner Z., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.**, Kruminis-Łozowska W., Stańczak J. 1997b. Występowanie krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na terenach północno-wschodniej Polski. *Problemy Higieny* 54: 127-131.

Wegner Z., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.**, Kruminis-Łozowska W. 1997c. Występowanie kleszczy *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) na zalesionych obszarach Trójmiasta i ich zakażenie krętkami *Borrelia burgdorferi*. *Przegląd Epidemiologiczny* 51, 1-2: 13-20.

Stańczak J., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.**, Kruminis-Łozowska W., Dąbrowski J., Adamczyk A., Markowska M. 1999. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in different Polish woodlands. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 6: 127-132.

Stańczak J., **Kubica-Biernat B.**, Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Kur J. 2000. Detection of three genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different regions of Poland. *International Journal of Medical Microbiology* 290: 559-566.

Stańczak J., Okrój-Rysop G., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.**, Kruminis-Łozowska W. 2002a. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the selected *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) population in Weilburg, Hesse, Germany. *International Journal of Medical Microbiology*, 291 (suppl. 33): 206-209.

Stańczak J., Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., **Kubica-Biernat B.** 2002b. Coinfection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Poland with the agent of Lyme borreliosis (LB) and human granulocytic ehrlichiosis (HGE). *International Journal of Medical Microbiology* 291 (suppl. 33): 198-201.

Grzeszczuk A., Stańczak J., **Kubica-Biernat B.** 2002. Serological and molecular evidence of human granulocytic ehrlichiosis focus in the Białowieża Primeval Forest (Puszcza Białowieska), Northeastern Poland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 21: 6-11.

Grzeszczuk A., Stańczak J., **Kubica-Biernat B.**, Racewicz M., Kruminis-Łozowska W., Prokopowicz D. 2004. Human anaplasmosis in north-eastern Poland: seroprevalence in humans and prevalence in *Ixodes ricinus* ticks. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 99-103.

Stańczak J., Gabre R.M., Kruminis-Łozowska W., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.** 2004. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 11: 109-114.

Biernat B., Karbowiak G. 2014. Study on the occurrence of tick-borne encephalitis virus RNA in European bison (*Bison bonasus*) eliminated at Białowieża Primeval Forest (north-eastern Poland) in 2005-2009. *Annals of Parasitology* 60 (2): 99-102.

Stańczak J., Cieniuch S., Lass A., **Biernat B.**, Racewicz M. 2015. Detection and quantification of *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia* spp. in *Ixodes ricinus* ticks from urban and rural environment, northern Poland. *Experimental and Applied Acarology* 66: 63-81.

Karbowiak G., **Biernat B.**, Szewczyk T., Sytykiewicz H. 2015. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 1. The general pattern. *Annals of Parasitology* 61(4): 221-228.

Karbowiak G., **Biernat B.** 2016. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 2. Tick-borne encephalitis virus. *Annals of Parasitology* 62 (1): 3-9.

Karbowiak G., **Biernat B.**, Stańczak J., Szewczyk T., Werszko J. 2016. The role of particular tick developmental stages in the circulation of tick-borne pathogens affecting humans in Central Europe. 3. Rickettsiae. *Annals of Parasitology* 62 (2): 89-100. doi: 10.17420/ap6202.38

Stańczak J., **Biernat B.**, Matyjasek A., Racewicz M., Zalewska M., Lewandowska D. 2016. Kampinos National Park – a risk area for spotted fever group rickettsioses, central Poland. *Experimental and Applied Acarology* DOI: 10.1007/s10493-016-0083-9

Piśmiennictwo

Achazi K, Růžek D, Donoso-Mantke O, Schlegel M, Ali HS, Wenk M, Schmidt-Chanasit J, Ohlmeyer L, Ruhe F, Vor T, Kiffner C, Kallies R, Ulrich RG, Niedrig M. 2011. Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11 (6): 641-647.

Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. 1994. Human granulocytic ehrlichiosis in the upper Midwest United States. A new species emerging? *J Am Med Assoc* 272: 212.

Chen S-M, Dumler JS, Bakken J, Walker DH. 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* sp. as the etiologic agent of human disease. *J Clin Microbiol* 32: 589.

Cisak E, Wójcik-Fatla A, Sroka J, Zajac V, Bilaska-Zajac E, Chmurzyńska E, Dutkiewicz J. 2012. Prevalence of tick-borne encephalitis virus antibodies in domestic and game animals from eastern Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 56: 275-278.

Gerth H-J, Grimshandl D, Stage B, Döller G, Kunz C. 1995. Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus. *Epidemiol Infect* 115: 355-365.

Hou Y, Zhang H, Miranda L, Lin S. 2010. Serious overestimation in quantitative PCR by circular (supercoiled) plasmid standard: microalgal pcna as the model gene. *PLoS One* 5: e9545.

Januszkiewicz J, Kieda A. 1987. Przypadki boreliozy z Lyme na Pomorzu Zachodnim. *Przeegl Epidemiol* 41: 324. 98.

Jemeršić L, Deždek D, Brnić D, Prpić J, Janicki Z, Keros T, Roić B, Slavica A, Terzić S, Konjević D, Beck R. 2014. detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. *Ticks Tick Borne Dis* 5 (1): 7-1.

Klaus C, Beer M, Saier R, Schau U, Moog U, Hoffman B, Diller R, Süß J. 2012. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus – Epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick-Borne Dis* 3: 27-37.

Mikryutova TP, Moskvitina NS, Kononova YV, Korobitsyn IG, Kartashov MY, Tyuten Kov OY, Protopopova EV, Romanenko VN, Chausov EV, Gashkov SI, Konovalova SN, Moskvitin SS, Tupota NL, Sementsova AO, Ternovoi VA, Loktev VB. 2013. Surveillance of tick-borne encephalitis virus in wild birds and ticks in Tomsk city and its suburbs (Western Siberia)? *Ticks Tick Borne Dis* 5 (2): 145-151.

Pintér R, Madai M, Horváth G, Németh V, Oldal M, Kemenesi G, Dallos B, Bányai K, Jakab F. 2014. Molecular detection and phylogenetic analysis of tick-borne encephalitis virus in rodents captured in the transdanubian region of Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis* 14 (8): 621-624.

Tylewska-Wierzbanowska S, Chmielewski T, Kondrusik M, Hermanowska-Szpakowicz T, Sawicki W, Sulek K. 2001. First cases of acute human granulocytic ehrlichiosis in Poland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 196.

Ad. 3. Kolejnym zagadnieniem wynikającym z moich zainteresowań badawczych jest diagnostyka chorób tropikalnych wektorowanych przez stawonogi u pacjentów powracających ze stref ich endemicznego występowania.

Wraz z intensyfikacją ruchu turystycznego, corocznie importowane są do Polski egzotyczne choroby tropikalne w skali nieporównywalnie większej niż jeszcze kilkanaście lat temu. Poszczególne gatunki, szczepy i serotypy patogenów wywołujących te choroby różnią się stopniem patogeniczności dla człowieka, a rutynowe testy serologiczne, standardowo stosowane w diagnostyce tych chorób, często ich nie różnicują. Badania oparto na technikach biologii molekularnej: PCR, PCR z odwrotną transkryptazą oraz sekwencjonowanie DNA.

Malaria pozostaje na świecie istotnym problemem zdrowia publicznego (WHO 2015). Wśród 5 gatunków zarodźców wywołujących malarię u człowieka, ostatnio poznany, rozwijającym się u człowieka, jest *Plasmodium knowlesi* (Daniels 1908). W warunkach naturalnych żywicielem pośrednim są makaki długoogonowe (*Macaca fascicularis*), ale coraz częściej dochodzi do rozwoju tego gatunku pierwotniaka również u człowieka. W badaniu mikroskopowym gatunek ten bywa trudny do odróżnienia od *P. malariae*, jednak w przeciwieństwie do niego, może szybko prowadzić do wysokiej parazytemii, gwałtownego i ciężkiego przebiegu, często zakończony zgonem (Müller et Schlagenhaut 2014). Istotna jest więc identyfikacja gatunku zarodźca wywołującego chorobę specyficznymi i czułymi technikami molekularnymi.

Techniką nested PCR przebadano archiwalne i bieżące próbki krwi pacjentów leczonych w klinice IMMiT i UCMMiT w latach 1995-2014, powracających z Azji (endemicznego terenu występowania *P. knowlesi*) oraz tych, których historia podróży nie była znana, a u których przebieg malarii był ciężki lub też mikroskopowa identyfikacja wykazała *P. malariae* lub *Plasmodium* sp. [Biernat et al. 2015b]. Nie uzyskano wprawdzie wyników pozytywnych, ale zoptymalizowaną reakcję nested PCR w kierunku *P. knowlesi* z kontrolą dodatnią w postaci plazmidu z wklonowanym syntetycznym fragmentem DNA *P. knowlesi*, wdrożono do diagnostyki chorób tropikalnych prowadzonych w Zakładzie Parazytologii Tropikalnej GUMed, tym samym zakład ten jest aktualnie jedyną placówką w Polsce identyfikującą przypadki malarii wywoływanej przez ten gatunek zarodźca.

Denga jest przenoszona przez komary *Aedes* spp. wirusową chorobą tropikalną, wywołowaną przez wirus dengi (DENV) (Flaviviridae). Występują cztery serotypy wirusa o różnej antygenowości: DENV-1 - DENV-4 (Henchal et al. 1990). Objawy choroby obejmują gorączkę, ból głowy, mięśni i stawów oraz charakterystyczną wysypkę. Czasami choroba prowadzi do zagrażającej życiu gorączki krwotocznej, może także rozwinąć się wstrząs (Guzmán et Kourí 2002). Denga stała się problemem globalnym po II wojnie światowej i jest endemiczna w ponad 110 krajach (Ratnam et al. 2013). W latach 2006-2009 przebadano serologicznie na obecność przeciwciał anti-DENV 753 osoby powracające ze stref endemicznego występowania tej choroby [Goljan et al. 2010]. Dodatkowo wyniki uzyskano u ok. 20% pacjentów, a u dwóch z nich metodą RT-PCR stwierdzono wiramię. Badanie serologiczne nie pozwala na różnicowanie serotypu wirusa, dlatego też w kolejnych badaniach zastosowano technikę RT-PCR i sekwencjonowanie DNA [Biernat et al. 2015a]. Ogółem przebadano 69 surowic pacjentów z Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych UCMMiT, powracają-

cych z endemicznych terenów występowania tej choroby. RNA DENV wykazano we krwi 10 pacjentów. Wszystkie amplikony sekwencjonowano i uzyskane dane porównano z dostępnymi w bazie GenBank. Sześć sekwencji, pochodzących od pacjentów powracających z Ameryki Południowej (Brazylia), Afryki (Czad) oraz Azji (Tajlandia, Indonezja) było identycznych z serotypem DENV-1. Dwie sekwencje z Azji (Tajlandia i Indie) wykazywały zgodność z serotypem DENV-2, a kolejne dwie (Filipiny i Tajlandia) z DENV-3. Określenie serotypu wirusa jest niezwykle istotne. Mimo iż każdy może powodować pełne spektrum choroby, to infekcja jednym z serotypów może wiązać się z ciężkim przebiegiem infekcji wtórnej, gdy osoba uprzednio kontaktująca się z serotypem DENV-1, nadkaża się serotypem DENV-2 lub DENV-3 lub pacjent w przeszłości eksponowany na DENV-3, nabywa DENV-2. Były to pierwsze w Polsce badania określające serotypy wirusa dengi.

Publikacje z tego zakresu

Goljan J., Myjak P., Nahorski W., **Kubica-Biernat B.**, Felczak-Korzybska I., Kowalczyk D., Kotłowski A. 2010. Dengue antibodies in Polish travellers returning from the tropics. Evaluation of serological tests. *International Maritime Health* 61: 36-40.

Biernat B., Szostakowska B., Wroczyńska A., Kuna A., Nahorski W.L., Racewicz M. 2015a. Different serotypes of dengue virus (DENV) imported by Polish travellers from dengue endemic areas to Poland. *International Maritime Health* 66: 72-76.

Biernat B., Lass A., Pietkiewicz H., Szostakowska B., Wroczyńska A., Kuna A., Nahorski W.L. 2015b. Investigations on the occurrence of *Plasmodium knowlesi* in travellers returning from the endemic areas of simian malaria. *International Maritime Health* 66: 168-172.

Piśmiennictwo

Daniels CW. 1908. Animal parasites in man and some of the lower animals in Malaya. *Stud Inst Med Res FMS* 3: 1-13.

Guzmán MG, Kourí G. 2002. Dengue: an update. *Lancet Infect Dis* 2: 33-42.

Henchal EA, Putnak RJ. The Dengue Viruses. 1990. *Clin Microbiol Rev* 3(4): 376-396.

Müller M, Schlagenhauf P. *Plasmodium knowlesi* in travelers, update 2014. 2014. *Int J Infect Dis* 22: 55-64.

Ratnam I, Leder K, Black J, Torresi J. 2013. Dengue Fever and International Travel. *J Travel Med* 20 (6): 384-393.

World Health Organization. Accessed: 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>

Ad. 4. Inne publikacje związane z moimi naukowymi zainteresowaniami obejmowały różnorodne zagadnienia badawcze. Jednym z kluczowych było pierwsze w Polsce zastosowanie w warunkach terenowych, preparatów biologicznych do selektywnego zwalczania komarów opartych o czynniki mikrobiologiczne *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti). Preparaty oparte o Bti stosuje się z powodzeniem w wielu krajach europejskich (Becker 1998). Badania przeprowadzono na terenie Mierzei Wiślanej, która charakteryzuje się nasilonym ruchem turystycznym i gdzie od lat notowane są plagi komarów i to zarówno w samym mieście, jak i w pobliskim Parku Krajobrazowym „Mierzeja Wiślana”. Określono miejsca lęgu komarów, typy zbiorników wodnych oraz udział gatunków migrujących Culicidae. Zastosowano preparaty VectoBac 12AS i VectoBac TP. Po 72 godzinach od aplikacji preparatów uzyskano 98,2%

redukcję liczebności larw komarów przy zastosowaniu preparatu VectoBac 12AS, zaś skuteczność VectoBac TP wynosiła 97,4% [Kubica-Biernat et al. 2010].

W 2002 roku opisano zróżnicowane zmiany skórne u 21 osób. We wszystkich przypadkach ustalono czynnik etiologiczny, który stanowiły dokuczliwe pasożyty zewnętrzne: meszki (Diptera: Simuliidae) - 12 przypadków, pchły (Siphonaptera) - 7 oraz w dwóch przypadkach obrzeżki (Acari: Argasidae) [Chomicz et al. 2002]. Rodzaj stwierdzonych objawów chorobowych był nieco inny dla każdego z wymienionych stawonogów. Przedstawiona ocena reakcji skórnych, które wystąpiły u zaatakowanych osób powinna zwrócić szczególną uwagę na trudne zagadnienie różnicowania takich reakcji z przypadkami dermatoz o innej etiologii.

Rok później przedstawiono zmiany cytologiczne wywołane pokłuciami przez meszki [Chomicz et al. 2003]. Materiał biopsyjny oceniano za pomocą mikroskopu elektronowego. Obserwowane zmiany w ultrastrukturze skóry wskazywały na toczące się procesy rozpadu uszkodzonych komórek śródbłonkowych naczyń włosowatych i postępujący proces przebudowy w komórkach skóry właściwej związany z neoangiogenezą w miejscach ukłuć. Określono również rolę warunków środowiska wpływających na nasilenie ataków Simuliidae na człowieka [Chomicz et al. 2004]. Wykazano też obecność bakterii chorobotwórczych (np. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) w homogenacie z głów i odwłoków *Simulium* sp. złowionych w podmiejskich okolicach Warszawy, jak również u Calliphoridae (*Calliphora vicina* i *Lucilla sericata*) odłowionych wokół budynków szpitalnych Warszawy [Chomicz et al. 2006a, 2006b].

Kolejnym zagadnieniem było porównanie występowania i aktywności *Ixodes ricinus* na obszarach o zróżnicowanym stopniu antropopresji [Stańczak et al. 2012]. Na podstawie 5-stopniowej skali zagrożenia atakami kleszczy (Supergan et Karbowski 2009), oszacowano, że na stanowiskach leśnych Trójmiasta występuje średni i wysoki stopień tego zagrożenia, natomiast na Pojezierzu Kaszubskim jest on wysoki lub bardzo wysoki. Obecność kleszczy pospolitych na terenach rekreacyjnych w obrębie kompleksów leśnych Trójmiasta i Poj. Kaszubskiego stanowi zagrożenie dla zdrowia. W związku z tym istnieje konieczność stałego monitorowania tych środowisk pod kątem występowania kleszczy, jak również poziomu ich zakażenia/zarażenia patogenicznymi mikroorganizmami.

Publikacje z tego zakresu

Chomicz L., Walski M., Turkowicz M., Zawadzki P.J., Kubica-Biernat B., Szubińska D., Dąbrowska J. 2002. Zróżnicowane zmiany skórne u osób zaatakowanych przez pasożytnicze stawonogi z rodzaju *Simulium* (Insecta, Diptera), *Ctenocephalides* (Insecta, Siphonaptera) i *Argas* (Arachnida, Acarina). W: Stawonogi w Medycynie, (A. Buczek, Cz. Błaszak – red.), Liber, Lublin: 205-213.

Chomicz L., Walski M., Żebrowska J., Zawadzki P.J., Kowalewski C., Kubica-Biernat B., Mazurkiewicz M. 2003. Zmiany cytologiczne w skórze człowieka jako skutek ataków meszek z rodzaju *Simulium* (Insecta, Diptera). W: *Stawonogi i Żywiciele* (A. Buczek, Cz. Błaszak – red.), Liber, Lublin: 429-436.

Chomicz L., Żebrowska J., Kubica-Biernat B., Konopka M. 2004. Czynniki wpływające na wzrost częstości atakowania ludzi przez meszki z rodzaju *Simulium* (Insecta, Diptera) w podmiejskich rejonach Warszawy. W: *Stawonogi, interakcje pasożyt-żywiciel* (A. Buczek, Cz. Błaszak – red.), Liber, Lublin: 81-85.

Chomicz L., Starościak B., Perkowski K., Baranowska-Korczyk A., Rehlis V., Kubica-Biernat B. 2006a. Transmisja bakterii chorobotwórczych przez meszki z rodzaju *Simulium* (Insecta, Diptera) w środowiskach

podmiejskich Warszawy. W: „Stawonogi. Znaczenie epidemiologiczne”, (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 255-259.

Chomicz L., Piekarczyk J., Starościak B., Siemińska-Piekarczyk B., **Kubica-Biernat B.**, Perkowski K. 2006b. Drobnoustroje izolowane z synantropijnych muchówek Calliphoridae (Insecta, Diptera) w miejskim rejonie przyszpitalnym. W: „Stawonogi. Znaczenie epidemiologiczne”, (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), Koliber, Lublin: 261-265.

Kubica-Biernat B., Kowalska-Ulczyńska B., Gliniewicz A. 2010. Effectiveness of VectoBac 12AS and VectoBac TP against mosquito larvae in the field trials in northern Poland. W: Stawonogi. Ekologiczne i patologiczne aspekty układu pasożyt-żywciciel. (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), AKAPIT, Lublin 2010: 263-271.

Stańczak J., Cieniuch S., Racewicz M., **Kubica-Biernat B.** 2012. Występowanie, aktywność i zagrożenie atakami kleszczy *Ixodes ricinus* na rekreacyjnych terenach Trójmiasta i Pojezierza Kaszubskiego. W: Stawonogi. „Znaczenie medyczne i gospodarcze”, (red. A. Buczek, Cz. Błaszak), AKAPIT, Lublin: 63-79.

Piśmiennictwo

Becker N. 1998. The use of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) against mosquitoes, with special emphasis on the ecological impact. *Israel J Ent* 32: 63-69.

Supergan M, Karbowski G. 2009. The estimation scale of endangerment with ticks attacks on recreational town areas. *Przegl Epidemiol* 63: 67-71.

Dorobek naukowy (szczegółowo w załączniku nr 5)

Sumaryczna liczba publikacji pełnotekstowych (z pracami z cyklu habilitacyjnego): 55

(w tym jako pierwszy autor w 24 pracach)

Łączna wartość współczynnika oddziaływania **IF 26,353**

Łączna liczba punktów **MNiSW 413**

Łączna liczba streszczeń zjazdowych 80 (30 z konferencji zagranicznych i 50 z konferencji krajowych)

Liczba cytowań: baza ISI Web of Sciences Core Collection z dn. 19.09.2016: **272**

baza Scopus z dn. 19.09.2016: **336**

h-index baza Web of Sciences z dn. 19.09.2016: **8**

h-index baza Scopus z dn. 19.09.2016: **8**

6. Omówienie pozostałych osiągnięć

Kierowanie międzynarodowymi i krajowymi projektami badawczymi oraz udział w takich projektach

a) Projekty krajowe

1. nr **4 S401 057 10** – Badania nad występowaniem naturalnych ognisk boreliozy z Lyme na wybranych terenach Polski. – 1993-1996. (Wykonawca)
2. nr **6 P04C 037 10** – Genotypowanie szczepów *Borrelia burgdorferi* sensu lato występujących w kleszczach (Ixodidae), pochodzących z naturalnych ognisk boreliozy z Lyme w Polsce. – 1996-1999. (Wykonawca)

3. nr **6 PO4C 047 17** – Badania nad występowaniem naturalnych ognisk ludzkiej ehrlichiozy i babesiozy na terenie północno-wschodniej Polski, ze szczególnym uwzględnieniem kleszczy (Ixodidae) jako wektorów infekcji i inwazji. – 1999-2002 (I główny wykonawca)
4. nr **6 PO4C 019 18** – Identyfikacja kryptogatunków *Anopheles maculipennis* (Diptera: Culicidae) z terenu północnej Polski. – 2000-2001. (**kierownik projektu**)
5. nr **6 P04C 024 21** – Występowanie *Cryptosporidium* spp. u szczura wędrownego (*Rattus norvegicus*) i muchówek synantropijnych (Diptera: Muscidae, Calliphoridae, Sarcophagidae) na wybranych terenach miejskich i wiejskich. – 2001-2003. (Wykonawca)
6. nr **3 P05D 97 25** – Molekularne i serologiczne badania nad występowaniem zakażeń *Anaplasma phagocytophilum* – etiologicznym czynnikiem ludzkiej ehrlichiozy granulocytarnej (HGE) – w grupach ryzyka z różnych terenów północnej i północno-wschodniej Polski. (2003-2006) (wykonawca)
7. nr **2 P04C 130 29** Molekularne badania nad występowaniem wirusa Zachodniego Nilu (WNV) w populacji komarów (Diptera: Culicidae), potencjalnych wektorów patogena na wybranych naturalnych i zurbanizowanych terenach Polski. (2005-2009) – (**kierownik projektu**)
8. nr **2186/B/P01/2008/34** Detekcja i ilościowe oznaczanie wybranych patogenów zagrażających zdrowiu człowieka w kleszczach *Ixodes ricinus* (Acari, Ixodidae) przy zastosowaniu PCR i Real-Time PCR. (2008-2011) - wykonawca
9. nr **N N 404 179040** Serologiczne i molekularne badania nad występowaniem zakażeń *Rickettsia* spp., etiologicznego czynnika ludzkich riketsjoz z grupy gorączek plamistych (SFG), u mieszkańców oraz w populacjach kleszczy (Acari, Ixodidae) z terenów północnej i środkowo-wschodniej Polski. (2011-2013) - wykonawca

b) Projekty międzynarodowe

nr **PL/99/1/0093/PL/I.1.2.c/FPC** "Exchange and schooling of trainers in environmental-aware methods of mosquito control used in Europe", Leonardo da Vinci Programme of European Union - wykonawca (2000)

Nagrody za działalność naukową

Zespołowa Nagroda Naukowa II Stopnia Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za osiągnięcia naukowe w dziedzinie epidemiologii transmisyjnych zoonoz - ludzkiej anaplazmozy granulocytarnej na terenie Polski (za rok 2004).

Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach oraz towarzystwach naukowych

European Mosquito Control Association (EMCA) – od 2001, regular member

Polskie Towarzystwo Parazytologiczne - od 2003, kolejno przez dwie kadencje pełniłam funkcję Członka Zarządu oraz Przewodniczącej Komisji Rewizyjnej o/Gdańsk, obecnie członek

Polskie Towarzystwo Entomologiczne – od 1988, wielokrotnie w kolejnych kadencjach pełniłam funkcję skarbnika oraz sekretarza o/Gdańsk, obecnie działalność o. Gdańskiego jest zawieszona

Kursy i szkolenia w zagranicznych i krajowych ośrodkach naukowych lub akademickich.

- ✓ Szwecja, Uppsala, Uppsala Universitet, Zoologiska Institutionen, Entomologiska Avdelningen, staż naukowo-szkoleniowy z zakresu taksonomii komarów (Diptera: Culicidae), 1991 – 2 miesiące
- ✓ Polska, Gdańsk, Politechnika Gdańska i A&A Biotechnology, kurs biologii molekularnej „Metody diagnostyczne oparte na analizie DNA (PCR)”, 1996
- ✓ Republika Federalna Niemiec, Waldsee, Kommunale Aktionsgemeinschaft zur Bekämpfung der Schnakenplage (KABS) - szkolenie dotyczące biologicznych metod zwalczania komarów przy zachowaniu bioróżnorodności środowiska naturalnego, 2000 – 2 tygodnie
- ✓ Polska, Gdańsk, EURx, szkolenie indywidualne w zakresie sekwencjonowania DNA – 2001
- ✓ Polska, Warszawa, Polskie Towarzystwo Genetyczne oraz Applera-Polska Sp. z o.o., seminarium szkoleniowe: „Najnowsze osiągnięcia w technikach biologii molekularnej”, 2001
- ✓ Polska, Warszawa, Applera-Polska Sp. z o.o., szkolenie: „Nowe rozwiązania aplikacyjne dla użytkowników ABI Prism 310”, 2001
- ✓ Polska, Warszawa, Applera-Polska Sp. z o.o., seminarium „Real Time PCR” – 2002
- ✓ Polska, Warszawa, WSSE, German – Polish EU Twinning Project on Occupational Health and Safety Regarding Biological Agent at Work, szkolenie dla przedstawicieli pracodawców i pracobiorców (Laboratoria), 2005
- ✓ Portugalia, Lisboa, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Unidade de Virologia, - indywidualne szkolenie dotyczące wykrywania arbowirusów z rodziny Flaviviridae w stawonogach – 1 tydzień 2005
- ✓ Polska, Gdynia, szkolenie z zakresu obsługi urządzenia NucliSENS minima zorganizowane przez bioMérieux, - 2007

Inna działalność habilitanta

Recenzowanie publikacji w czasopismach – od 2005 roku jestem recenzentem prac ukazujących się w następujących czasopismach:

Polskie Pismo Entomologiczne
Annals of Agricultural and Environmental Medicine
Fragmenta Faunistica

Wiadomości Parazytologiczne
Acta Biochimica Polonica
Przegląd Epidemiologiczny

Udział w zespołach eksperckich

Główny Inspektorat Sanitarny - narada zespołu ekspertów powołanych przez dyrektora Departamentu Przeciwepidemicznego GIS dotycząca zagrożenia terytorium Polski wirusem Gorączki Zachodniego Nilu – 17.02.2003 (członek zespołu)

