

Borrelia burgdorferi sensu lato infection rate of ticks collected from Harghita county, Romania

Czink Gergő¹, Pál Endre-Csaba^{2,3}, Székely Edit^{3,4}

George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science and Technology of Targu Mures, ¹Faculty of Medicine, ²Doctoral School of Medicine and Pharmacy, ³Department of Microbiology, ⁴Targu Mures County Clinical Emergency Hospital, Microbiology Laboratory

Abstract • Lyme disease is one of the most prevalent vector-borne diseases in Europe. The disease is primarily transmitted by *Ixodes ricinus* ticks infected with members of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) group of spirochetes. Local tick infection rates exceeding 20% may warrant antibiotic prophylaxis following tick bites. The aim of this study was to assess the infection rate of ticks collected along frequently used tourist routes and to compare tick collection methods. Questing ticks were collected using the dragging method along six tourist routes in Harghita County in 2022, while ticks from a seventh location were collected from a white dog. The locations of tick findings were recorded using GPS coordinates. Samples were stored in 70% ethyl alcohol until identification by light microscopy. Genomic DNA was extracted using the Quick-DNA Tissue/Insect Kit (Zymo Research) and subsequently screened for *Borrelia burgdorferi* s.l. by PCR. Amplicons were visualized using a standard gel electrophoresis protocol. Positive pools were subsequently re-examined individually. The 51 ticks collected along the tourist routes were predominantly nymphs (41/51) and all tested negative for *Borrelia burgdorferi* s.l. Samples collected from the dog were predominantly adult male ticks (46/54), with 12 positive samples detected overall. Among the positive samples, one was a larva, two were adult females, and nine were adult males. Consequently, the local infection rate reached 22.2%, while the overall *Borrelia* prevalence was 11.4%. Of the 105 ticks collected, 104 were *Ixodes ricinus*, whereas only one specimen was identified as *Dermacentor reticulatus*. This study confirmed the presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in tick populations occurring along hiking trails in Harghita County. Further nationwide surveillance studies are warranted to accurately assess *B. burgdorferi* s.l. infection rates in *Ixodes ricinus* ticks. Companion animals, particularly dogs, may be at a substantially higher risk of exposure to *B. burgdorferi* s.l. than humans; therefore, we recommend thorough post-exposure examinations of both animals and humans for attached ticks following outdoor activities.

Keywords • Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, vector-borne diseases

DOI: 10.2478/orvtudert-2025-0003

Bulletin of Medical Sciences 2025, 98(1): 28–41

Introduction

Lyme disease (LD) is one of the most prevalent vector-borne diseases in Europe, with an average annual incidence of 128,888 confirmed cases [1]. In Romania, the incidence of symptomatic Lyme disease between

2018 and 2020 was 86 cases per 100,000 population per year [2]. The most common clinical manifestation of LD is erythema migrans, an expanding skin lesion that develops in more than 70% of patients [3]. The diagnosis of LD remains a significant challenge for healthcare professionals, as the sensitivity of enzyme immunoassays may be as low as 50%, according to case-control studies cited by the European Centre for Disease Prevention and Control [4]. Ticks are considered second only to mosquitoes as vectors of human disease, including LD [5]. In Romania, *Ixodes ricinus* is the predominant tick species, accounting for more than 70% of the total tick population [6].

Corresponding author

Czink Gergő

Bucin qt, 19/D/55

Niklasmarkt, Romania

czinkgergo@gmail.com



Figure 1. *Ixodes ricinus* larva, showing three pairs of legs.



Figure 2. *Ixodes ricinus* nymph, showing four pairs of legs.

Feeding represents only a small fraction of the tick life cycle; however, this relatively brief period is responsible for the transmission of infections commonly associated with these vectors. Questing, or more precisely appetite, is the process of actively seeking a host either through locomotion or from a vantage point and constitutes the first stage of feeding. Following host contact, the tick searches for a suitable attachment site and penetrates the host's integument. The uptake of a full blood meal is referred to as engorgement, which is followed by detachment and disengagement, the final stages of feeding activity [7].

The tick life cycle consists of an egg stage and three active developmental stages: larva, nymph, and adult. Larvae possess only three pairs of legs (Figure 1), whereas nymphs and adults have four pairs (Figure 2). Another important distinguishing feature is the presence of genital apertures in adults, which are absent in nymphs. Males and females can be differentiated by the scutum, a heavily pigmented chitinous shield located on the dorsal surface. In males, the scutum covers the entire dorsal surface, whereas in females it covers only part of the dorsum (Figure 3 and 4) [8]. During each active (non-egg) developmental stage, a blood meal is required for progression to the next stage. This process is facilitated through questing behaviour. Questing involves climbing vegetation and waiting for a potential host to pass nearby. This behaviour is commonly referred to as the ambush strategy, whereas

another strategy employed by some ticks is active hunting. In the hunting strategy, ticks actively pursue potential hosts [9]. Adult female ticks require a blood meal for egg production, whereas adult males feed only occasionally, as they primarily attach to hosts to locate and mate with adult females [10].

Ixodes ticks become infected when feeding on an infected host; larvae do not inherit spirochetes from their mothers, or only very rarely do so [11].

Lyme disease is caused by bacteria belonging to the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* s.l.) complex, which currently comprises 28 recognized genospecies (<https://lpsn.dsmz.de>). Studies have demonstrated that the likelihood of acquiring infection from a tick bite increases with the duration of attachment. Experimental studies in rodents have shown transmission rates of approximately 70% after 72 hours of attachment and up to 90% following complete feeding, when the tick detaches spontaneously. No clinical evidence of infection has been observed within the first 24 hours of attachment, and the probability of transmission after 48 hours is estimated at approximately 10% [12].

The 2020 Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America recommend antibiotic prophylaxis only within 72 hours of tick removal when the bite occurred in a highly endemic area, was caused by an *Ixodes* spp. vector, and the tick had been attached for more than 36 hours [13]. Highly endemic areas are



Figure 3. Adult female *Ixodes ricinus*. The scutum does not cover the entire dorsal surface of the tick .



Figure 4. Adult male *Ixodes ricinus* (ventral view). The genital aperture and anus are visible.

defined as regions where more than 20% of *Ixodes scapularis* ticks are infected with *Borrelia burgdorferi* s.l. [14].

The reported infection rate of questing *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi* s.l. in Romania ranges from 0.75% to 18.8% [15]. According to a Europe-wide meta-analysis, 18.5% of ticks on the Balkan Peninsula were infected [16]. Although species identification of removed ticks is routinely recommended [13], it remains unclear to what extent this recommendation is followed in Romania.

Aim

The aim of this study was to assess the infection rate of ticks collected along commonly used tourist routes in Harghita County, Romania. Secondary objectives were to evaluate differences between collection methods and to gain insight into the species distribution of the county's tick population.

Materials and methods

Questing ticks were collected using the dragging method (adapted from Falco & Fish [17]) along six tourist routes during the autumn of 2022. Dragging was performed using a 1 × 1 m white cloth while simultaneously recording route

distance and elevation using GPS mapping. The cloth was inspected visually at 100 m intervals. Collected ticks were stored individually in numbered Eppendorf tubes, georeferenced on the GPS map, and transferred to 70% ethanol within 24 hours of collection [18]. The choice of route side for dragging and the method of circumventing obstacles (e.g., thorn bushes, dense undergrowth, or inaccessible terrain) were left to the discretion of the sampler.

Samples originating from the route labelled X in [Table 1](#) were collected from a companion animal (a medium-sized, white-coated female dog) in a seventh sampling area over a 48-hour period. The dog's exact movements were not monitored. Only live, non-engorged ticks were collected using this approach.

As the collection procedure remained constant throughout the sampling period, the number of collected specimens could be estimated. In this study, this normalization was referred to as the determination of tick abundance. This quantitative approach could only be applied to ticks collected by the dragging method, and the results were categorized according to the landscape type of each sampling route.

The specimens were identified under a microscope, with species, sex, and developmental stage recorded [19]. Following identification, samples were stored at −20°C until further processing.

DNA was extracted from collected ticks using the Quick-DNA Tissue/Insect Kit (Zymo Research) accord-

Table 1. Characteristics of the tourist routes surveyed for questing ticks.

Route	No. of ticks collected	Route length (km)	Mean altitude (range, m)	Landscape type
A	4	1.3	851 (829–873)	Pine forest
B	2	4.4	934.5 (807–1062)	Grassland
C	0	3.9	1201 (649–1753)	Mountainside
D	21	0.7	936.5 (918–955)	Beech forest
E	14	6.2	1015 (871–1159)	Beech forest
F	10	1.1	746 (696–796)	Pine forest
Total	51	17.6		
X	54	n.a.*	807	Pine forest

*The estimated area covered by the animal was approximately 1 km².

The term “landscape type” refers to the predominant vegetation type along the respective tourist route.

ing to the manufacturer's instructions. Extracted DNA samples were stored at –4°C until *Borrelia* screening. For screening purposes, DNA extracts were pooled by combining 5 µl from each of seven to eight individual DNA samples. The resulting pools were analysed by PCR. Eight µl of pooled DNA was used for amplification with OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs).

The following primer pair was used to detect *B. burgdorferi* s.l. in the extracted DNA samples: forward primer 5'-ATGCACACTTGGTGTTAACTA-3' and reverse primer 5'-GACTTATCACCGGCAGTCTTA-3', targeting a *Borrelia* genus-specific 16S rRNA sequence (Eurogentec). The presence of a 357 bp amplicon was considered indicative of a positive screening result.

Amplicons were visualized using a standard gel electrophoresis protocol with 2% agarose gel in 1× TAE buffer and GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Electrophoresis was performed for 45 min-

utes at 100 V. Positive pools were subsequently analysed by PCR amplification of the individual samples using the same protocol. The *B. burgdorferi* s.l. detection results were then correlated with GPS mapping and microscopic identification data.

Results

Overall, six tourist routes were surveyed (**Figure 5**) using the dragging method, resulting in the collection of 51 ticks (**Table 1**). Of these, 80.4% (41/51) were nymphs, 11.8% (6/51) were larvae, and 7.8% (4/51) were adult males. No adult female questing ticks were collected.

The mean route length was 2.93 km (range: 0.7–6.2 km), at a mean altitude of 947.3 m (range: 746–1201 m). Tick abundance, defined as the number of collected specimens per kilometre of route, was 5.0 in beech forests (35 ticks collected along 6.9 km of routes), 5.8 in pine forests (14

Table 2. Distribution of tick developmental stages according to collection route and sampling method.

Route	No. of ticks collected	No. of larvae	No. of nymphs	No. of adults (total)	No. of adult males	No. of adult females	Collection method
A	4	0	4	0	0	0	dragging
B	2	2	0	0	0	0	dragging
C	0	0	0	0	0	0	dragging
D	21	1	17	3	3	0	dragging
E	14	1	12	1	1	0	dragging
F	10	2	8	0	0	0	dragging
Total	51	6	41	4	4	0	
X	54	1	0	53	46	7	animal
Total	105	7	41	57	50	7	



Figure 5. Map of Harghita County showing the tick collection sites. Locations sampled by dragging are marked with letters A –F, whereas X indicates the site where ticks were collected from companion animals. .

Contains public sector licensed under the Open Government License v1.0(OGL) available at <http://data.gov.ro/base/images/logoinst/OGL-ROU-1.0.pdf>, via Wikimedia Commons.

ticks along 2.4 km), and 0.5 in grasslands (2 ticks along 4.4 km). No ticks were collected on the mountainside route.

Of the total 105 questing ticks collected, 104 were identified as *Ixodes ricinus* and one as *Dermacentor reticulatus*. The distribution of developmental stages is presented in [Table 2](#).

PCR analysis of pooled DNA samples yielded four positive pools (Pools 1, 3, 4, and 5; [Figure 6](#)). Subsequent individual testing identified a total of 12 positive samples. All positive specimens were *Ixodes ricinus* ticks collected from the companion animal (Route X). Among the positive samples, one was a larva, two were adult females, and nine were adult males. The prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection among ticks collected from Route X was 22.2%.

Discussion

The primary objective of this study was to assess the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. infection in ticks col-

lected along popular hiking routes in Harghita County, Romania. Hiking is a widely practised recreational activity in this region and may expose even urban residents to tick-infested environments. Combined with the relatively limited public awareness regarding ticks and Lyme disease, tick bites represent a significant public health concern for local communities.

To assess infection rates, we employed a standard PCR-based diagnostic method for the detection of *B. burgdorferi* s.l., including a positive control sample. To improve laboratory efficiency, we initially screened pooled DNA samples, as described above. This approach successfully reduced the number of PCR reactions required by excluding samples belonging to negative pools from further analysis.

Compared with previous studies reporting *Borrelia* infection rates of approximately 3.8% in Romanian tick populations [20], we observed a relatively high prevalence among ticks collected in Harghita County (22.2%). Notably, one larval specimen tested positive for *B. burgdorferi* s.l. The presence of an infected larva raises questions regarding its route of exposure, given the presumed absence of previous feeding on an infected host. One possible explanation is partial feeding that did not result in moulting to the next developmental stage. Another possibility is vertical transmission. Although uncommon, transovarial transmission has been documented, occurring in approximately 1.4% of field-collected infected females [21].

A secondary objective of the study was to compare different tick collection methods. Tick collection by dragging proved to be labour-intensive; however, the standardized protocol yielded a substantial number of specimens (2.9 ticks per kilometre overall) and provided detailed information regarding tick distribution across routes and route segments. In contrast, we also evaluated a canine-based collection method. The rationale for this approach was based on evidence that mammalian characteristics such as body heat and carbon dioxide emission influence tick questing behaviour [7]. As these factors are difficult to replicate using the conventional dragging method, a companion animal was used as a biological attractant.

The canine-based collection method produced markedly different results compared with dragging. Almost all specimens collected from the dog were adult ticks, whereas only four adult specimens (7.8%) were obtained through dragging. This discrepancy is difficult to explain

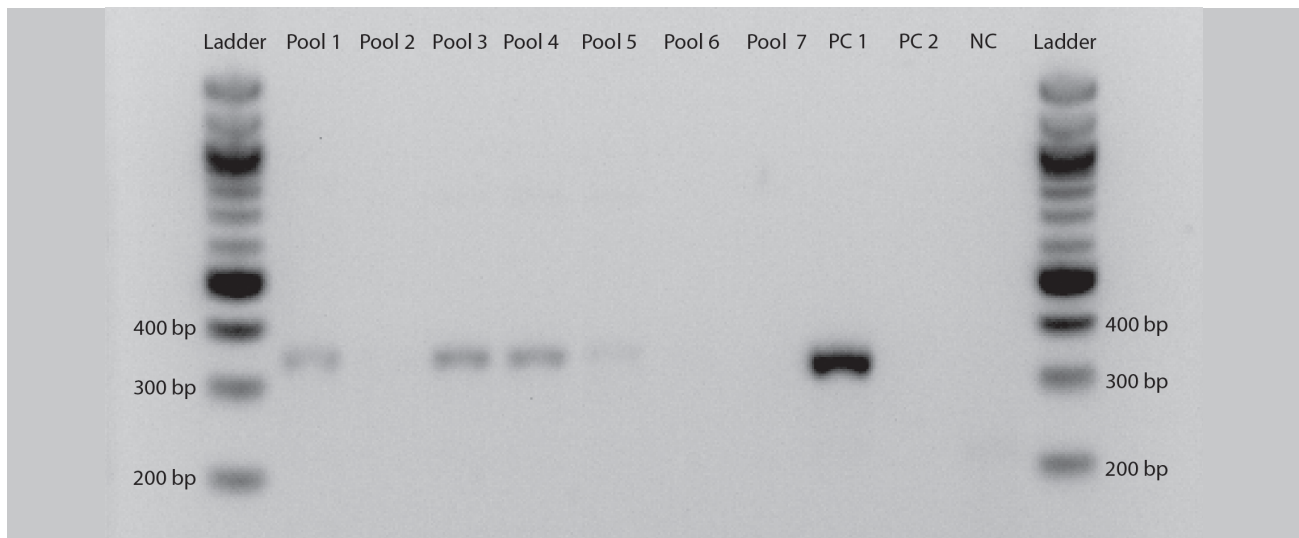


Figure 6. Agarose gel showing electrophoresis result of pools 1-7. 357 bp long amplicons are visible in the positive pools.

based on the current understanding of tick questing behaviour and life-history characteristics.

An additional point of comparison between collection methods concerns the prevalence of *B. burgdorferi* s.l. infection. All positive specimens originated from the canine-based collection method. The predominance of adult ticks (75%) among positive samples may partly explain this finding, as ticks typically acquire *B. burgdorferi* s.l. during successive blood meals throughout their life cycle. Consequently, older developmental stages have had more opportunities for exposure to the pathogen.

A previous study from the United Kingdom reported that most ticks removed from humans were nymphs [22]. Although our study did not include human-derived specimens, 41 ticks (80.4%) collected by dragging were nymphs. None of these nymphs tested positive for *B. burgdorferi* s.l. Together, these findings may suggest a comparatively lower risk of human infection from contact with questing ticks in the surveyed areas.

In contrast, our results suggest that companion animals may face a higher risk of exposure, as all positive samples originated from ticks collected from the dog. In a previous study, ticks collected from companion animals were predominantly adult females (81.6%), while adult males represented only 15.3% and juvenile stages 3.1% of specimens [22]. In contrast, 85.1% of ticks collected from the companion animal in our study were adult males, while females accounted for 13.0% and larvae for 1.9%. Because adult male ticks feed on their hosts only occasionally, their epidemiological significance may be lower

than that of females, suggesting that the actual risk of pathogen transmission may be lower than the observed infection prevalence would imply.

Based on field observations made during sampling, ticks appeared to be more abundant in ecotonal habitats, and their density seemed to decrease with increasing altitude. However, the available data are insufficient to support these observations statistically.

Limitations

We acknowledge that the relatively small sample size limits the strength of the conclusions that can be drawn from this study. Nevertheless, we consider this work a preliminary assessment of *B. burgdorferi* s.l. prevalence in Harghita County and intend to build upon these findings in future investigations. Furthermore, the lack of standardization regarding route length, sampled area, and randomization of selected tourist routes may have introduced bias regarding the results. It should also be noted that no representative studies specific to this region were identified; therefore, prevalence estimates could only be compared with national-level data.

Conclusions

In this study, we confirmed the presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. infection in tick populations occurring along

hiking trails in Harghita County. To accurately determine the true prevalence of infection, further investigations involving larger sample sizes are required. Companion animals, particularly dogs, may be at a substantially higher risk of exposure to *B. burgdorferi* s.l. than humans; therefore, we recommend thorough examination of both animals and humans for attached ticks following outdoor activities.

Acknowledgement

G.C., E.C.P., and E.S. gratefully acknowledge the financial support provided by the Forerunner Federation. The authors also thank Angela Ionica for providing positive control samples and Zolt Kovács for assistance with sample processing. Special thanks are extended to Csaba Péter and Evelin Menykő from Miercurea Ciuc County Emergency Hospital for identifying the collected ticks and for producing the excellent photographic documentation.

References

1. Burn L, Tran TMP, Pilz A, Vyse A, Fletcher MA, Angulo FJ, et al. Incidence of Lyme Borreliosis in Europe from National Surveillance Systems (2005–2020). *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 2023;23:156. <https://doi.org/10.1089/vbz.2022.0071>.
2. Angulo, F. J., Olsen, J., Purdel, V., Lupșe, M., Hristea, A., Briciu, V., Colby, E., Pilz, A., Halsby, K., Kelly, P. H., Brestrich, G., Moiši, J. C., & Stark, J. H. (2024). Incidence of symptomatic *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in Romania, 2018–2023. <https://doi.org/10.1186/s13071-024-06449-5>
3. Dandache P, Nadelman RB. Erythema Migrans. *Infect Dis Clin North Am* 2008;22:235–60. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.012>.
4. Ecdc. A systematic literature review on the diagnostic accuracy of serological tests for Lyme borreliosis n.d. <https://doi.org/10.2900/309479>.
5. De La Fuente J, Estrada-Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience* 2008;13. <https://doi.org/10.2741/3200>.
6. Mihalca AD, Gherman CM, Magdaş C, Dumitrache MO, Györke A, Sándor AD, et al. Ixodes ricinus is the dominant questing tick in forest habitats in Romania: the results from a countrywide dragging campaign. *Experimental and Applied Acarology* 2012 58:2 2012;58:175–82. <https://doi.org/10.1007/S10493-012-9568-3>.
7. Obenchain FD, Galun R. *Physiology of Ticks: Current Themes in Tropical Science*. Elsevier Science; 2013.
8. Sándor Babos. KULLANCSOK - IXODIDEA - Fauna Hung. 77. Budapest: Akadémiai Kiadó Budapest; 1965.
9. Leal B, Zamora E, Fuentes A, Thomas DB, Dearth RK. Questing by Tick Larvae (Acari: Ixodidae): A Review of the Influences That Affect Off-Host Survival. *Ann Entomol Soc Am* 2020;113:425. <https://doi.org/10.1093/aesa/saaa013>.
10. Kahl O, Gray JS. The biology of Ixodes ricinus with emphasis on its ecology. *Ticks Tick Borne Dis* 2023;14:102114. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102114>.
11. Matuschka FR, Schinkel TW, Klug B, Spielman A, Richter D. Failure of Ixodes ticks to inherit Borrelia afzelii infection. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3089–91. <https://doi.org/10.1128/aem.64.8.3089-3091.1998>.
12. Eisen L. Pathogen transmission in relation to duration of attachment by Ixodes scapularis ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 2018;9:535–42. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.002>.
13. Lantos PM, Rumbaugh J, Bockenstedt LK, Falck-Ytter YT, Agüero-Rosenfeld ME, Auwaerter PG, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America, American Academy of Neurology, and American College of Rheumatology: 2020 Guidelines for the Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lyme Disease. *Neurology* 2021;96:262–73. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001151>.
14. Wormser GP, Dattwyler RJ, Shapiro ED, Halperin JJ, Steere AC, Klemperer MS, et al. The Clinical Assessment, Treatment, and Prevention of Lyme Disease, Human Granulocytic Anaplasmosis, and Babesiosis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2006;43:1089–134. <https://doi.org/10.1086/508667>.
15. Kalmár Z, Mihalca AD, Dumitrache MO, Gherman CM, Magdaş C, Mircean V, et al. Geographical distribution and prevalence of Borrelia burgdorferi genospecies in questing Ixodes ricinus from Romania: A countrywide study. *Ticks Tick Borne Dis* 2013;4:403–8. <https://doi.org/10.1016/J.TTBDIS.2013.04.007>.
16. Strnad M, Hönig V, Růžek D, Grubhoffer L, Rego ROM. Europe-Wide Meta-Analysis of Borrelia burgdorferi Sensu Lato Prevalence in Questing Ixodes ricinus Ticks. *Appl Environ Microbiol* 2017;83:e00609-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17>.
17. Falco RC, Fish D. A comparison of methods for sampling the deer tick, Ixodes dammini, in a Lyme disease endemic area. *Exp Appl Acarol* 1992;14:165–73. <https://doi.org/10.1007/BF01219108>.
18. Mtambo J, Van Bortel W, Madder M, Roelants P, Backeljau T. Comparison of Preservation Methods of Rhipicephalus appendiculatus (Acari: Ixodidae) for Reliable DNA Amplification by PCR. *Experimental & Applied Acarology* 2006 38:2 2006;38:189–99. <https://doi.org/10.1007/S10493-006-0004-4>.
19. Estrada-Peña A, Mihalca AD, Petney TN. Ticks of Europe and North Africa - A Guide to Species Identification. 2017.
20. Kalmár Z, Dumitrache M, D'Amico G, Matei IA, Ionică AM, Gherman CM, et al. Multiple tick-borne pathogens in ixodes ricinus ticks collected from humans in Romania. *Pathogens* 2020;9. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050390>.
21. Bellet-Edimo R, Betschart B, Gern L. Frequency and efficiency of transovarial and subsequent transstadial transmissions of Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus Ticks. *Bulletin de La Société Neuchâteloise Des Sciences Naturelles* 2005. <https://doi.org/10.5169/seals-89634>.
22. Hansford KM, Gandy SL, Gillingham EL, McGinley L, Cull B, Johnston C, et al. Mapping and monitoring tick (Acari, Ixodida) distribution, seasonality, and host associations in the United Kingdom between 2017 and 2020. *Med Vet Entomol* 2023;37:152–63. <https://doi.org/10.1111/mve.12621>.

Hargita megyében gyűjtött kullancsok *Borrelia burgdorferi sensu lato* fertőzöttsége

Czink Gergő¹, Pál Endre-Csaba^{2,3}, Székely Edit^{3,4}

Marosvásárhelyi George Emil Palade Orvosi, Gyógyszerészeti, Tudomány- és Technológiai Egyetem, ¹Általános Orvosi Kar, ²Orvosi és Gyógyszerészeti Doktori Iskola, ³Mikrobiológia tanszék; ⁴Marosvásárhelyi Megyei Sürgősségi Kórház, Mikrobiológia laboratórium

Összefoglaló • A Lyme betegség az egyik leggyakrabban előforduló vektorok által terjesztett betegség Európában. A kór okozója a *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.) csoportba tartozó spirokéták bármelyike lehet, melyek terjesztője főleg az *Ixodes ricinus* kullancs. A 20%-ot meghaladó helyi fertőzöttségi arány antibiotikumos megelőzést indokolhat kullancscsípés esetén. Kutatásunk célja gyakran használt turistaösvények mentén fellelhető kullancsok fertőzöttségi arányának felmérése és a kullancsok begyűjtési módszereinek összehasonlítása volt. Gazdakereső kullancsokat gyűjtöttünk zászlózás segítségével hat gyakran használt turistaösvény mentén Hargita megyében, 2022 őszén. Egy hetedik helyszínről egy fehér bundájú kutyáról távolítottunk el be nem fúródott kullancsokat csipesszel. A kullancsok begyűjtésének helyszíne GPS koordináták segítségével került megjelölésre. A mintákat 70° etil-alkoholban tároltuk, míg mikroszkóp segítségével azonosításra és további feldolgozásra nem kerültek. A genomikus anyagokat Quick-DNA Tissue/Insect Kit (Zymo Research) segítségével extraháltuk, majd összevontuk és PCR-rel szűrtük *Borrelia burgdorferi* s.l. jelenlétére. Az amplikonokat standard elektroforézis protokollal vizsgáltuk. A pozitív összevont mintákat egyesével újra teszteltük. A turistaútvonalakról gyűjtött kullancsok túlnyomó többsége nimfa volt (41/51), viszont mindegyik minta negatív volt *Borrelia burgdorferi* s.l. tekintetében. A kutyáról gyűjtött minták főként hím imágók voltak (46/54), összesen 12 pozitív mintával. Az egyik pozitív minta lárvá volt, 2 nőstény imágó és 9 hím. Ezen a helyszínen a fertőzési arány 22,2% volt; míg összességében a *Borrelia burgdorferi* s.l. prevalenciája 11,4% volt. A 105 begyűjtött kullancs közül 104 *Ixodes ricinus* volt, és csak egyetlen *Dermacentor reticulatus* találtunk. Mivel a *Borrelia burgdorferi* s.l. helyi fertőzöttségi aránya helyenként meghaladhatja a CDC által meghatározott 20%-os küszöbértéket, az *Ixodes ricinus* kullancsok által okozott kullancscsípések antibiotikumos kezelése profilaktikus céllal indokolt lehet, feltéve, hogy a kullancs több mint 36 órán át volt a bőrbe fúródva, és az antibiotikum beadása a kullancs eltávolítását követő 72 órán belül kivitelezhető. További országos szintű vizsgálatokra lenne szükség az *Ixodes ricinus* *Borrelia burgdorferi* s.l. fertőzési arányának pontosabb felméréséhez.

Kulcsszavak • Lyme-kór, *Borrelia burgdorferi*, *Ixodes ricinus*, vektorok által terjesztett betegségek

DOI: 10.2478/orvtudert-2025-0003

Orvostudományi Értesítő 2025, 98(1): 28–41

Bevezetés

A Lyme-kór (LD) az egyik leggyakoribb vektor által terjesztett betegség Európában, incidenciája évi átlagos 128 888 megerősített eset [1]. Romániában 2018 és 2020 között a LD incidenciája évi 86 eset volt 100 000 lakosra vetítve [2]. A LD leggyakoribb tünete az erythema migrans, egy centrifugálisan terjedő bőrkiütés, amely a LD-betegek több mint 70%-ánál jelentkezik [3]. A LD diagnosztizálása továbbra is komoly kihívást jelent az orvosok számára, figyelembe véve, hogy az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) által hivatkozott

eset-kontroll tanulmányok szerint az enzim-immunoassayek érzékenysége egyes esetekben rendkívül alacsony, akár 50% is lehet [4]. A kullancsokat csak a szúnyogok előzik meg az emberi betegségek (köztük a LD) terjesztésében [5]. Romániában a legelterjedtebb kullancsfaj az *Ixodes ricinus*, amely a teljes kullancsállomány több mint 70%-át teszi ki [6].

A táplálkozás a kullancs életének csak egy kis részét képezi, azonban ez a viszonylag rövid időszak felelős a fertőzések átviteléért. A *questing*, azaz gazdakeresés az a folyamat, amikor a kullancs aktívan keresi a zsákmányt, vagy egy kedvező helyen lesben áll a prédára várva. Miután a kullancs ráakad a gazda kültakarójára, megfelelő



1. ábra. *Ixodes ricinus* lárva, három pár lábbal.



2. ábra. *Ixodes ricinus* nimfa, négy pár lábbal.

helyet keres és átfúrja a gazdaszervezet bőrét. Ezt követi az *engorgement*, amikor a kullancs mintegy felfúvódik a felszívott vértől, majd leválik a gazdáról [7].

A kullancsok életciklusa egy kezdeti pete-stádiumból és három aktív ciklusból áll: lárva, nimfa és imágó, azaz ivarérett példány. A lárváknak csak 3 pár lába van (**1. ábra**), ellentétben a nimfákkal és imágókkal, amelyeknek 4 pár lába van (**2. ábra**). További fontos megkülönböztető jel, hogy az imágóknak van nemi nyílásuk, míg a nimfáknak nincs. A hím imágók hátát teljes mértékben borítja az erősen pigmentált kitingpáncél, míg a nőstényeknél csak a hát feji részét (**3. és 4. ábra**) [8]. Minden aktív stádiumban a kullancsok vért kell fogyasztania, hogy a következő életciklusba léphessen. A táplálkozást a *questing*, avagy gazdakeresés folyamata teszi lehetővé, amely során a kullancs felmászik a növényzetre és arra vár, hogy egy potenciális gazda mellette haladjon el – a kullancs gyakorlatilag lesben áll. Egyes esetben a kullancsok aktívan követik a lehetséges prédát, ezt „vadászatnak” nevezzük [9]. A nőstény imágóknak egy újabb adag vérre van szükségük a peterakáshoz, míg a hím kullancsok csak ritkán fogyasztanak vért; főként azért tapadnak a gazdákra, hogy párzásra alkalmas nőstény imágókat találjanak [10].

Az *Ixodes* kullancsok akkor vannak kitéve a fertőződés lehetőségének, amikor fertőzött gazdaszervezetből táplálkoznak; a lárvák nem, vagy csak nagyon ritkán öröklik anyjuktól a *spirocheta* baktériumokat [11].

A Lyme-kórt a *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B.*

burgdorferi s.l.) *spirocheta*-csoportba tartozó baktériumok okozzák, amely egy jelenleg 28 ismert fajból álló komplexum (<https://lpsn.dsmz.de>). A tanulmányok azt mutatják, hogy a kullancscsípésből származó bakteriális fertőzés kialakulásának esélye az idő múlásával növekszik. Egy rágcsálókön végzett kísérletes tanulmány kimutatta, hogy a fertőzés átadásának aránya 72 óra után eléri a 70%-ot, és akár a 90%-ot is, ha a kullancs eléri a telített állapotot, és magától elhagyja a gazdát. 24 óránál kevesebbet tapadó kullancsok esetén nincs klinikai bizonyíték a fertőzés átadására, míg 48 óra után nagyjából 10% az esély [12].

A Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2020-as irányelvei szerint antibiotikum-profilaxist csak a kullancs eltávolításától számított legfeljebb 72 órán belül szabad megkezdeni, ha a kullancscsípés egy endémiának számító területen történt *Ixodes* spp. vektor által, és a kullancs több mint 36 órán át volt a bőrbe fúródva [13]. Az endémiás terület definíciója, hogy az ott található *Ixodes* spp. kullancsokban a *B. burgdorferi* s.l. fertőzöttség prevalenciája meghaladja a 20%-ot [14].

Romániában az *Ixodes ricinus* kullancsok *B. burgdorferi* s.l. fertőzöttségének aránya 0,75% és 18,8% között mozog [15]. Egy európai szintű metaanalízis szerint a Balkán-félszigeten a kullancsok 18,5%-a volt fertőzött [16]. Bár az emberből eltávolított kullancsok fajának azonosítását rutinszerűen javasolják [13], nem világos, hogy ezt az ajánlást Romániában követik-e.



3. ábra. Kifejlett nőstény *Ixodes ricinus*. A scutum (hátpajzs) nem fedi a kullancs teljes háti felületét.



4. ábra. Kifejlett hím *Ixodes ricinus* (hasi nézet). Az ivarnyílás és a végbélnyílás látható.

Célkitűzés

Tanulmányuk célja az volt, hogy felmérjék a kullancsok fertőzöttségi arányát Hargita megyében, gyakran használt turistaösvények mentén. Másodlagos célként a gyűjtési módszerek közötti különbségek és a megye kullancspopulációjának felmérését tűztük ki.

Anyag és módszer

A gazdakereső kullancsokat 2022 őszén hat turistaútvonal mentén, *dragging* módszerrel (Falco & Fish [17] alapján) gyűjtöttük. A gyűjtést 1x1 méteres fehér szövettel végeztük, miközben rögzítettük az útvonalat GPS koordinátáit és tengerszint feletti magasságát. A szövetet 100 méterenként ellenőriztük és a begyűjtött kullancsokat egyesével Eppendorf-csövekben helyeztük el. A mintákat 24 órán belül 70%-os etanol oldatba helyeztük át [18]. A gyűjtést végző személy saját döntésére bíztuk, hogy a kijelölt turistaútvonal melyik oldalán végzi a *dragging*-et, és hogy hogyan kerül ki az akadályokat (tüskés bokrok, átjárhatatlan aljnövényzet, stb.).

Az 1. táblázatban X-szel jelölt helyszínről származó mintákat egy háziállatról (közepes méretű, fehér szőrű nőstény kutya) gyűjtöttük, egy 48 órás periódusban. A kutya pontos mozgását nem követtük nyomon. Ezzel a módszerrel csak élő, be nem fűródott, *questing* kullancsokat gyűjtöttünk.

A módszertan a *dragging* eljárással végzett gyűjtés esetében állandó volt, így megbecsülhető a kullancsok számának eloszlása. Tanulmányunk során ezt az adatkategóriát „gyakoriságnak” neveztük; az eredményeket a gyűjtési útvonal növényzettípusa alapján kategorizáltuk.

A begyűjtött egyedeket mikroszkóp alatt azonosítottuk, meghatározva a fajt, a nemet és az életciklust [19]. Azonosítás után a mintákat -20°C-on tároltuk további feldolgozásig.

A mintákat Quick-DNA Tissue/Insect Kit (Zymo Research) segítségével, a gyártó utasításai szerint feldolgoztuk, és kivontuk a DNS-t. A nyert mintákat -4°C-on tároltuk a *B. burgdorferi* s.l. szűrésig. Szűrés céljából a kivont DNS-mintákat hetes vagy nyolcas csoportokba (pool-okba) vontuk össze; a minták mindegyikéből 5 µL-t adtunk a keverékhez. A kapott pool-okat PCR amplifikációnak vetettük alá. E folyamat során minden pool-ból 8 µL-t használtunk, One Taq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer készítményt alkalmazva. A *B. burgdorferi* s.l. jelenlétének vizsgálatához a következő primerpárt használtuk: forward primer 5'-ATGCACACTTGGTGTTAACTA-3' és reverse primer 5'-GACTTATCACCGGCAGTCTTA-3', amely *Borrelia* spp. specifikus 16S rRNA-t céloz meg (Eurogentec). Egy 357 bázispár hosszú ampikon jelenléte jelezte a pozitív szűrés eredményt. Az ampikonokat standard gélelektroforézis-protokoll alkalmazásával vizualizáltuk, 2%-os agaróz géllal, 1x TAE elektroforézis

1. táblázat. A kutatás során bejárt útvonalak sajátosságai

Útvonal	Kullancsok száma	Útvonal hossza (km)	Átlagmagasság (tartományméterben)	Tájtípus
A	4	1,3	851 (829–873)	Fenyőerdő
B	2	4,4	934.5 (807–1062)	Mező
C	0	3,9	1201 (649–1753)	Hegység
D	21	0,7	936.5 (918–955)	Bükkerdő
E	14	6,2	1015 (871–1159)	Bükkerdő
F	10	1,1	746 (696–796)	Fenyőerdő
Összesen	51	17,6		
X	54	n.r.*	807	Fenyőerdő

*Az állat által bejárt terület hozzávetőlegesen 1 km².

A „tájtípus” az adott turistaösvényre leginkább jellemző növényzettípusra vonatkozik.

pufferben és geneRuler 100 bp DNS-létrával (Thermo Fisher Scientific). Az elektroforézist 45 percig futtattuk 100V feszültségen. A pozitív pool-okat egyesével újra teszteltük, ugyanezen módszer alkalmazásával. A *B. burgdorferi* s.l. szűrés eredményeit ezután összevetettük a GPS nyomkövetés és mikroszkópos azonosítás adataival.

Eredmények

Összességében hat turistautat vizsgáltunk meg (5. ábra) *dragging* módszerrel, amelynek eredményeként összesen 51 kullancsot gyűjtöttünk be (1. táblázat). Összesen 80,4% (41/51) nimfa, 11,8% (6/51) lárva és 7,8% (4/51) hím imágó volt. Gazdakereső (questing) nőtény imágót nem gyűjtöttünk.

Az útvonalak átlagos hossza 2,93 km (0,7–6,2 km), átlagos tengerszint feletti magasságuk pedig 947,3 m

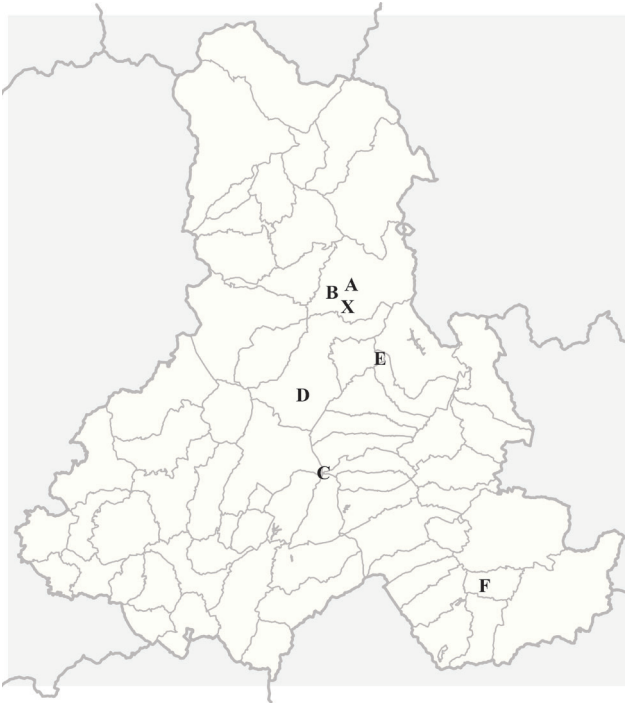
(746–1201 m) volt. A kullancsok gyakorisága, amelyet az egy kilométernyi útvonalon begyűjtött példányok számaként határoztunk meg, bükkerdőkben 5 (35 kullancs összesen 6,9 km-es útvonalhosszon), fenyőerdőkben 5,8 (14 kullancs / 2,4 km), míg füves területeken 0,5 (2 kullancs / 4,4 km) volt. A hegyoldalon nem találtunk kullancsot.

Az összesen begyűjtött 105 gazdakereső kullancsból 104 *Ixodes ricinus*, egy pedig *Dermacentor reticulatus* volt. A begyűjtött kullancsok életciklus szerinti eloszlását a 2. táblázat részletezi.

A poolozott genomok PCR-analízise 4 pozitív poolt eredményezett: 1, 3, 4, 5 (6. ábra). Az ezt követő egyedi feldolgozás során összesen 12 pozitív mintát azonosítottunk. Az összes pozitív minta a társállatról (X. útvonal) begyűjtött *Ixodes ricinus* kullancs volt. A pozitív minták közül egy lárva, 2 nőtény imágó, 9 pedig hím imágó volt. A *Borrelia burgdorferi* s.l. prevalenciája az X. útvonalon 22,2% volt.

2. táblázat. A begyűjtött kullancsok életciklus szerinti megoszlása az egyes útvonalakon.

Útvonal	Begyűjtött kullancsok	Lárvák	Nimfák	Imágók összesen	Hím imágók	Nőtény imágók	Gyűjtési módszer
A	4	0	4	0	0	0	dragging
B	2	2	0	0	0	0	dragging
C	0	0	0	0	0	0	dragging
D	21	1	17	3	3	0	dragging
E	14	1	12	1	1	0	dragging
F	10	2	8	0	0	0	dragging
Összesen	51	6	41	4	4	0	
X	54	1	0	53	46	7	állat
Összesen	105	7	41	57	50	7	



5. ábra. Hargita megye térképe, amely a kullancsgyűjtési helyeket mutatja. A vonsszalással mintavételezett helyeket A–F betűk jelölik, míg az X azt a helyet jelöli, ahol a kullancsokat társállatokról gyűjtötték. Tartalmazza a közsféra Open Government License v1.0 (OGL) alatt licencelt anyagát, amely elérhető a <http://data.gov.ro/base/images/logoinst/OGL-ROU-1.0.pdf> címen, a Wikimedia Commonson keresztül.

Megbeszélés

Vizsgálatunk során a *B. burgdorferi* s.l. fertőzöttségi arányát kívántuk felmérni a kullancsokban Hargita megye (Románia) népszerű túraútvonalai mentén.

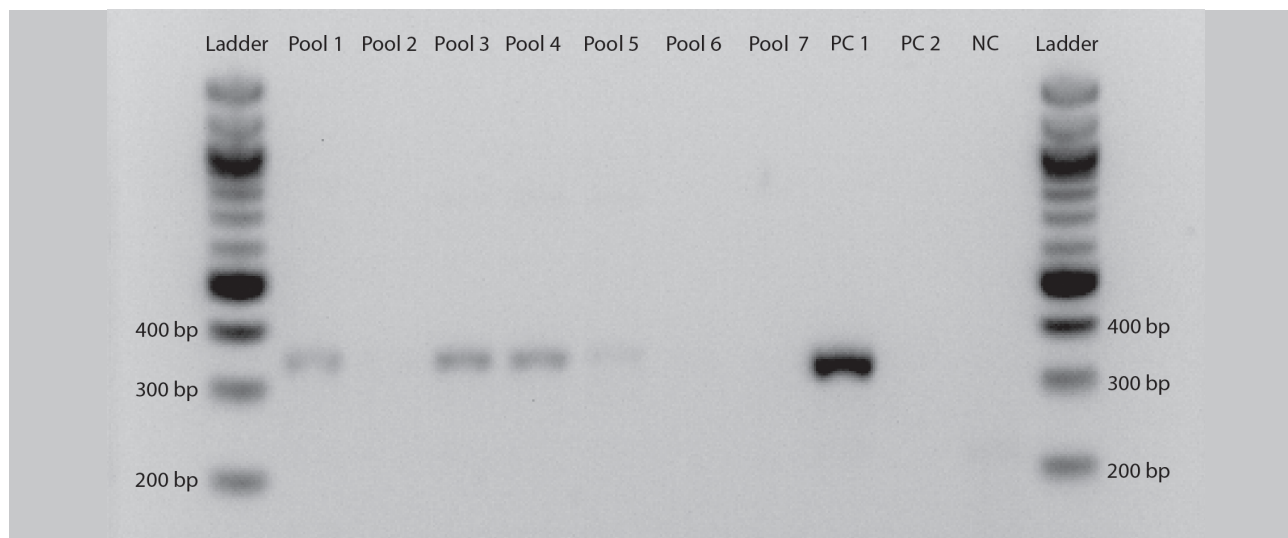
A túrázás népszerű tevékenység ebben a régióban, ami még a városi lakosok számára is magában foglalja a kullancsokkal való érintkezés kockázatát. A lakosság viszonylag hiányos ismeretei a kullancsokról és a Lyme-kórról a kullancscsípéseket a helyi közösségek számára is valós problémává teszik.

A begyűjtött kullancsok fertőzöttségi arányának felmérésekor a *B. burgdorferi* s.l. kimutatására egy standard diagnosztikai PCR-módszert alkalmaztunk, pozitív kontrollminta használatával. A munkafolyamat gyorsítása érdekében – a fent leírtak szerint – egy kezdeti genom-poolozási és szűrési módszer alkalmazása mellett döntöttünk. Ez a megközelítés sikeresen csökkentette a szükséges reakciók számát a negatív eredményt adó genom-poolokban lévő minták kizárása révén.

A romániai kullancsok fertőzöttségi arányát vizsgáló korábbi tanulmányokhoz (3,8%, [20]) képest viszonylag magas fertőzöttségi arányt tapasztaltunk a Hargita megyében begyűjtött mintáink körében (22,2%). Egy lárvát azonosítottunk, amely pozitív teszteredményt mutatott *B. burgdorferi* s.l. fertőzésre. Ennek a példánynak a jelenléte vizsgálatunkban felveti a kérdést, hogy a lárvá hogyan volt kiteve a baktériumnak anélkül, hogy korábban érintkezett volna egy fertőzött köztigazdával. Az egyik lehetséges magyarázat egy korábbi, részleges táplálkozás lehet, amely nem eredményezett átalakulást a következő aktív életciklusba. Egy másik magyarázat a vertikális fertőződés lehet. Bár ritka, a transzovariális fertőzés lehetséges, amely a szabadból gyűjtött nőstények mindössze 1,4%-ánál fordul elő [21].

Másodlagos célként a különböző kullancsgyűjtési módszerek összehasonlítását tűztük ki. A *dragging* módszerrel történő gyűjtés időigényesnek bizonyult, bár az aprólékos munkafolyamat viszonylag magas kullancsszámot eredményezett (összesen 2,9 kullancs kilométerenként), miközben kiváló minőségű adatokat is szolgáltatott a kullancsok eloszlásáról a különböző útvonalak és azok szakaszai között. Másrészt kísérleteztünk egy kutyával történő gyűjtési módszerrel is. Ennek a módszernek a kiválasztásakor a kezdeti elképzelésünk azon a tényen alapult, hogy egy emlősállat bizonyos jellemzői, mint például a testhő és a CO₂-kilégzés, befolyásolják a kullancsok gazdakereső (*questing*) aktivitását [7]. Mivel ezeket a szempontokat nehéz lett volna reprodukálni a hagyományos *dragging* módszerrel, egy társállat használata mellett döntöttünk. A társállaton alapuló gyűjtés alkalmazása merőben eltérő gyűjtési eredményeket hozott a standardizált *dragging* gyűjtési módszerhez képest, mivel a kutyáról szinte kizárólag imágókat azonosítottunk. Ezzel szemben a *dragging* módszer csupán négy imágót eredményezett, ami a *dragginggel* begyűjtött kullancsok teljes számának 7,8%-át teszi ki. Ezt az eltérést a kullancsok gazdakereső viselkedésének és életciklusának jelenlegi ismeretei alapján nehéz megmagyarázni.

A gyűjtési módszerek összehasonlításának egy másik releváns szempontja a mintavételezett kullancsok *B. burgdorferi* s.l. pozitivitási arányán alapul. Az összes pozitív minta a kutyás gyűjtési módszerrel begyűjtött kullancsokból származott. Az a tény, hogy a pozitív minták többsége (75%) imágó volt, megmagyarázhatja a társállat-csoportból származó magas pozitivitási arányt, mivel a kullancsok többnyire az életciklusuk során „szerzik be”



6. ábra. Az 1-7. csoportok (poolok) elektroforézis eredményét mutató agargél. A pozitív csoportokban 357 bp hosszú amplikonok láthatók.

a *B. burgdorferi* s.l. fertőzést, és így egy érettebb példánynak nagyobb esélye van a baktérium hordozójává válni.

Egy korábbi egyesült királyságbeli tanulmány arról számolt be, hogy az embereken talált kullancsok többsége nimfa [22]. Bár a mi vizsgálatunk nem terjedt ki az emberekről történő kullancsgyűjtésre, a dragging módszerrel összesen 41 (80,4%) nimfa stádiumú példányt azonosítottunk. Ebből a vizsgálatból származó nimfaminták egyike sem volt pozitív a *B. burgdorferi* s.l. fertőzésre történő tesztelés során. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a gazdakereső kullancsokkal való érintkezés során kisebb az emberi fertőződés esélye.

Ezzel szemben, eredményeink alapján a társállatok magasabb fertőzési kockázatnak vannak kitéve, mivel az összes pozitív minta a kutyás gyűjtési módszerből származott. Egy korábban végzett vizsgálatban a társállatokról begyűjtött kullancsok túlnyomórészt nőstény imágók voltak (81,6%), míg a hímek (15,3%) vagy a juvenilis stádiumok (3,1%) kisebbségben voltak [22]. Ezzel éles ellentétben, a mi vizsgálatunkban a társállaton talált kullancsok 85,1%-a hím imágó volt, 13% nőstény és 1,9% lárva. Mivel a hím kullancsok csak alkalmanként táplálkoznak a gazdaszervezetükön, lehetséges, hogy epidemiológiai jelentőségük kisebb, ami arra utalhat, hogy az általános fertőzés kockázata a magas fertőzöttségi arány ellenére is alacsonyabb lehet.

A mintavételezők empirikus megfigyeléseként megemlíthetjük, hogy a kullancsok gyakrabban találhatók meg két eltérő növényzettípus határán, és sűrűségük a tengerszint feletti magassággal csökken, azonban nem

áll rendelkezésünkre elegendő adat ezen megfigyelések bizonyítására.

Limitációk

Tisztában vagyunk azzal, hogy az alacsony mintaszám gátat szab a szignifikáns következtetések levonására irányuló céljainknak, azonban a vizsgálatot a *B. burgdorferi* s.l. fertőzés Hargita megyei prevalenciájába nyújtott első betekintésnek tekintjük, és a jövőbeli tanulmányok során építeni kívánunk a megszerzett tapasztalatokra. Továbbá az útvonalhossz és a lefedett terület standardizálásának, valamint a kiválasztott turistautak randomizációjának hiánya torzított eredményekhez vezethet. Fontos megjegyezni azt is, hogy nem találtunk kifejezetten erre a régióra vonatkozó, reprezentatív tanulmányokat, így a prevalenciaadatokat csak az országos átlaggal tudtuk összehasonlítani.

Következtetés

Jelen vizsgálatunk során igazoltuk a Hargita megyei túraösvényeken előforduló kullancspopulációk *Borrelia burgdorferi* s.l. fertőzöttségét. A valós fertőzöttségi arány pontos meghatározásához további, nagyobb mintaszámú vizsgálatok elvégzése szükséges.

A társállatok, különösen a kutyák, az embereknél sokkal nagyobb kockázatnak lehetnek kitéve a *B. burg-*

dorferi s.l. baktériummal való érintkezés szempontjából, ezért javasoljuk mind az állatok, mind az emberek alapos átvizsgálását a kullancsok jelenlétére vonatkozóan a természetben tett túrákat követően.

Köszönetnyilvánítás

C.G., P.E.C. és S.E. elismerését és köszönetét fejezi ki a Székely Előfutár Alapítványnak a nyújtott anyagi támogatásért, valamint Angela Ionicának a pozitív kontroll-

minták biztosításáért és Kovács Zsoltnak a minták feldolgozásában nyújtott segítségért. Külön köszönet illeti Péter Csabát és Menykő Evelint a Csíkszeredai Megyei Sürgősségi Kórházból a begyűjtött kullancsok azonosításáért és a rendkívüli fényképek elkészítéséért.

Irodalom

(Lásd az angol nyelvű cikk végén.)