
Průkaz *Borrelia*, *Anaplasma*, *Bartonella* a *Rickettsia* sp. v klíštětech *Ixodes ricinus* v roce 2007 a 2008 v pražských parcích

Detection of Borrelia, Anaplasma, Bartonella and Rickettsia spp. in ticks Ixodes ricinus from Prague parks in 2007 and 2008

**Dagmar Hulínská, Jiří Antonín Votýpka, Naděžda Holinková,
Zuzana Kurzová, Lenka Uherková, Kateřina Baštová, Oto Melter**

Souhrn • Summary

Celkem jsme v roce 2007 vyšetřili 1048 jedinců klíštěte *Ixodes ricinus* z toho 935 ze sběrů vlahkováním v pražských parcích a 114 jedinců ze zákusu na člověku. V roce 2008 jsme vyšetřili 364 jedinců z toho 277 ze sběru a 86 sejmutých z lidí. Promořenost klíšťat původcem lymeské borreliózy v roce 2007 byla 9,7 %, zjištěná v temném poli a v 13 % byla prokázána DNA pomocí PCR. V roce 2008 byla promořenost klíšťat vyšší, 14 % v temném poli a 20 % pomocí PCR. Klíšťata sejmutá po zákusu na lidech byla infikována v 7 %. Přítomnost *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* sp. a *Rickettsia* sp byla prokázána pomocí polymerázové řetězové reakce a kontrolována sekvencí geonomu u 11,3–11,8 % klíšťat. Spiroplasma rodu *Babesia* byla zjištěna v 7,4 % u samic *I. ricinus*. Klíšťata sejmutá z lidí byla infikovaná borrelií v 6,5 % a anaplasmou v 1,5 %.

Pravidelnými sběry v jednotlivých měsících r. 2007 a 2008 na jedné lokalitě v Praze 10 jsme ověřili změny výskytu různých stádií klíštěte a jejich měnící se nákazu různými agens v závislosti na teplotě a vývoji. K růstu bakterií *Borrelia* a *Anaplasma* sp. ve střevě klíštěte je zapotřebí určité doby s vyšší teplotou. Nejmenší počet infikovaných klíšťat byl v srpnu 2007 a 2008, kdy se z velké většiny vyskytovaly pouze larvy.

In 2007, 1048 Ixodes ricinus ticks were investigated: 935 of these were collected by flagging in Prague parks and 113 were ticks attached to the human skin. In 2008, 364 ticks were investigated, i.e. 277 and 87 ticks collected by flagging and from humans, respectively. In 2007, the causative agent of Lyme borreliosis was detected in 9.7% of ticks in dark field and in 13% of ticks in DNA by PCR. In 2008, higher positivity rates were found, i.e. 14% and 20%, respectively. Seven percent of ticks obtained from humans were infected. Anaplasma phagocytophilum, Bartonella sp. and Rickettsia sp. were detected by PCR and sequence analysis in 11.3% - 11.8% of ticks. Spiroplasma of the genus Babesia was detected in 7.4% of I. ricinus females. The ticks collected from humans were infected by Borrelia in 6.5% and by Anaplasma in 1.5%.

Regular monthly flagging was performed in one locality in Prague 10 in 2007 and 2008 to obtain data on the incidence of different stages of ticks and rates of infection by different agents depending on temperature and season. To grow in the tick intestine, Borrelia and Anaplasma need higher temperature for a certain period of time. The lowest numbers of infected ticks were found in August 2007 and 2008 when mostly tick larvae were collected.

Zprávy EM (SZÚ, Praha) 2009; 18(4): 167–171.

Klíčová slova: lymeská borrelióza, *Anaplasma*, klíšata

Keywords: Lyme borreliosis, *Anaplasma*, ticks

ÚVOD

V současnosti dochází k významným změnám v epidemiologii borreliózy v České republice. Vlivem zvýšení množství travnatých ploch a poklesem zemědělské půdy dochází k růstu populace hlodavců, stoupá stav vysoké zvěře, bažantů a u nás hnízdících ptáků. Celkové globální projasnění, zvýšení délky slunečního svitu a tím i teploty přináší zvýšení aktivity rezervoárových hostitelů i klíšetického vektora. Nemalý vliv má zvýšený výskyt toulavých koček a psů, opuštěných majiteli v době krize na malých městech. V diagnóze borreliózy ročně přibývají neurologické případy i neobjasněné horečnaté stavy po klíšetěti. Lze se domnívat, že oteplováním k nám přichází i další bakteriální a virové infekce přenášené klíšetaty ve středozemní a balkánské oblasti, především bakterie čeledi *Rickettsiaceae*. Jsou mizivé informace o prevalenci *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia conorii*, *R. helvetica*, *Bartonella henselae*, *B. clarridgeiae* nejen u nás, ale i v celé Evropě. Proto jsme zkoumali přítomnost některých z těchto agens u klíšet v pražských parcích.

MATERIÁL A METODY

Klíšata

V roce 2007 jsme vyšetřili 1049 klíšet *Ixodes ricinus*, z nich 935 bylo ze sběru, prováděném vlajkováním v pražských parcích a přilehlých oblastech. Celkem z nich bylo 404 dospělců, 516 nymf a 15 larev. V roce 2007 bylo přineseno zájemci o vyšetření po zákusu na člověku, celkem 114 jedinců klíšet a 86 jich bylo v r. 2008. V tomto souboru bylo 98 nymf (49 %), 85 dospělců (42,9 %) a nejméně 15 larev (7,5 %). Na vybrané lokalitě v Praze 10, blízko Hostivařské přehrady, byly prováděny periodické sběry klíšet od února do listopadu 2007. Celkem z této lokality pocházelo 114 klíšet (61 nymf, 40 dospělců, 13 larev), získaných v roce 2007.

V roce 2008 bylo vyšetřeno 364 klíšet, 278 jedinců pocházelo ze sběru klíšet z pražských parků. Z nich bylo

132 dospělců, 110 nymf a 35 larev. 86 klíšet bylo ze zákusu na člověku.

Klimatické údaje

Informace o teplotách a srážkách v jednotlivých měsících roku 2007 jsme čerpali z databáze Pražského ekologického monitorovacího a informačního systému PREMIS <http://www.premis.cz/PremisGUI/Meteorology/MonthGraph.aspx>

Metody

Mikroskopie v temném poli

Alkoholem a ve sterilní vodě omyté klíšetě bylo rozmačkané v 0,5 mL zkumavce a obsah doplněn 50 µL sterilním PBS. Mezi jednotlivými klíšetaty byly nástroje vyžihány a dezinfikovány. Z každé zkumavky bylo vyšetřeno v temném poli 2 x 4,5 µL vzorku, pokrytého 18x18 mm krycím sklíčkem. Jako pozitivní byl hodnocen vzorek, ve kterém bylo více než 1000 borrelií/mL přepočteno ze vzorce: počet spirochét ku počtu prohlédnutých polí x 3,81 x 10⁵ = počet spirochét/mL. Nejmenší koncentrace je 9,5 x 10³ spirochét/mL. Tato koncentrace koresponduje 1 *Borrelia* v 40 prohlédnutých polích.

Průkaz specifické genomové DNA

Příprava DNA z klíšet byla prováděna komerčním kitem QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit podle protokolu výrobce pro izolaci DNA z tkání, s tím rozdílem, že po 3 hod v pufru QIAGEN ATL při 56 °C byl vzorek v izolačním pufru QIAGEN AL inkubován 20 minut při 70 °C. Vysrážená a promytá DNA byla uvolněna z kolonek 100 µL elučního pufru AE. Během zkoušek byla DNA uchována při teplotě 4 °C, dlouhodobě v kryozkumavkách (Eppendorf) při -78 °C až -80 °C. Koncentrace směsi nukleových kyselin bez použití RNázy byla 20-30 µg/1 mL. Komeční kit QIAGEN HotStarTaq Master Mix byl zvolen pro PCR s horkým startem. V reakci byly použity genomové rodové a druhově specifické nukleotidy podle T. Marconiho, 1992 [1]. Pro identifikaci *Borrelia* spp. byl použit realtime PCR s primery recA. v LightCycleru (Roche). Pro identifikaci DNA *Anaplasma* byly použity nukleotidy pod-

le E.O. Engvallové, 1996 [2], výsledky byly verifikovány v LightCycleru dle D. Hulínské 2004 [4] a dále s použitím komerčního PCR kitu firmy GENEKAM KO97 k průkazu DNA *A. phagocytophilum*. K průkazu specifické DNA *Bartonella* sp. byly užity rodově specifické nukleotidy podle E.B.Breitschwerda, 1998 [3] a pro LightCycler gltA primery [5], pro *Rickettsia* sp. primery OmpB a OmpA dle Raux and Rault, 2000 [5] a pro rod *Babesia* nukleotidy podle B.Skotarczaka, 2004 [6]. Výsledky byly verifikovány komerčním kitem nested PCR firmy GENEKAM K 022 a kit K 078 k průkazu *Babesia gibsoni* a *Babesia bovis*.

Postup pro přípravu mixu pro PCR a RT-PCR reakcí byl stejný jak uvádí autoři s tím, že jsme předřadili jeden cyklus pro horký start 15 minut při 95 °C a poslední krok v 72 °C jsme prodloužili o 5 min. Produkt byl elektroforeticky separován v 1% agarózovém gelu a porovnán v UV světle s DNA markrem (Sigma) a proti pozitivní a negativní kontrole.

VÝSLEDKY

Vyšetření klíšťat v roce 2007

V roce 2007 bylo v celém souboru vyšetřeno 1049 kusů klíšťat. Většina klíšťat byla získána sběrem, 114 klíšťat bylo ze zákusu. Nejvíce, 935 klíšťat bylo z pražských parků. Mikroskopii v temném poli jsme vyšetřili všech 935 jedinců, a z nich pomocí PCR byla vyšetřena genomová DNA *Borrelia burgdorferi* u 199 klíšťat, *Anaplasma phagocytophilum* u 119, *Bartonella* sp. u 53 jedinců, *Rickettsia* sp. u 58 a *Babesia* sp. u 55 klíšťat. Celkem bylo 9,7 % klíšťat pozitivních na přítomnost spirochét v temném poli. Menší část klíšťat vyšetřených pomocí PCR na přítomnost DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. byla pozitivní v 13 %, DNA *Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* sp. se vyskytla v 11,8 % a v 11,3 %. Pozitivní výskyt *Babesia* sp. a *Babesia divergens* ukazuje tabulka 1.

Tabulka 1: VYŠETŘENÍ KLÍŠŤAT NA RŮZNÉ PATOGENNÍ AGENS v roce 2007

Druh vyšetření	počet vyšetření	negativní	pozitivní	%
Zástin – spirochéty	935	844	91	9,7
PCR <i>Borr. burgdorferi</i>	199	103	26	13,0
PCR <i>Ana. phagocytophilum</i>	119	105	14	11,8
PCR <i>Bartonella</i> sp.	53	47	6	11,3
PCR <i>Babesia</i> sp.	55	51	4	7,3

Pozitivita klíšťat podle lokalit v roce 2007

Vyšetření klíšťat v zástinu ukázalo, že vyšší pozitivita byla u 11–12 % klíšťat z Prahy 10, Počernicích, v Prokopském údolí a na Pražačce a nejvyšší 15 % v Kunraticích. Pozitivita pod 4 % byla zjištěna v Radotíně a ve Stromovce. Procento přítomnosti borrelií v klíšťatech v jednotlivých lokalitách kolísalo. Výsledky jsou ukázány v tabulce 2.

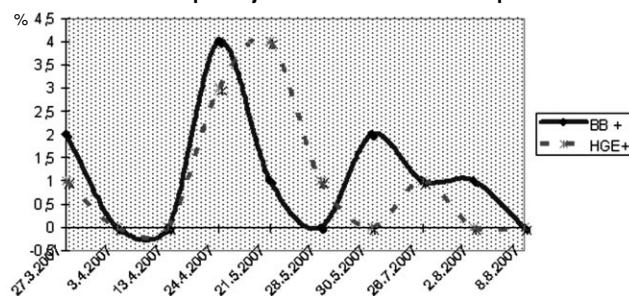
Tabulka 2: POZITIVITA ZÁSTINEM VYŠETŘENÝCH KLÍŠŤAT v jednotlivých místech sběru

Místo sběru	počet klíšťat	negativní výsledek	pozitivní výsledek	procento positivity
Kunratice	213	180	33	15,4
Praha 10	114	94	13	12,1
Hostivař	95	88	7	7,4
Šárka	92	85	7	7,6
Stromovka	68	66	2	2,9
Milíčov	63	59	4	6,3
Pražička	62	55	7	11,3
Petřín	57	52	5	8,8
Radotín	45	42	2	4,5
Prokopské údolí	44	39	5	11,4
Klánovice	26	24	2	7,7
Kelnerka	22	21	1	4,5
Počernice	17	15	2	11,8
Letná	17	16	1	5,9
Celkem	935		91	9,7

PCR pozitivita klíšťat v různém období roku 2007

Pozitivita klíšťat, vyšetřených pomocí PCR na *Borrelia* sp. byla 13 %. Nejvyšší pozitivita v PCR na přítomnost *B. burgdorferi* s.l. byla shodně s výsledky v zástinu zaznamenána v dubnu, kdy byl počet pozitivních nálezů dvojnásobný než v dalších měsících. Nejnižší záchyt pozitivních klíšťat na *B. burgdorferi* s.l. byl v srpnu. Pozitivita klíšťat vyšetřených PCR na DNA *Anaplasma phagocytophilum* byla nejvyšší v květnu, kdy byl počet až devítinásobný oproti ostatním měsícům roku. Nejnižší počet pozitivních klíšťat na *Anaplasma* byl v srpnu. Ve sběru po 10 jedincích toto zjištění znázorňuje graf 1. Celkem v souboru bylo 11,8 % klíšťat pozitivních na *Anaplasma* sp. a 11,3 % klíšťat obsahovalo DNA *Bartonella*, prokázané též v real-time PCR (viz graf 2).

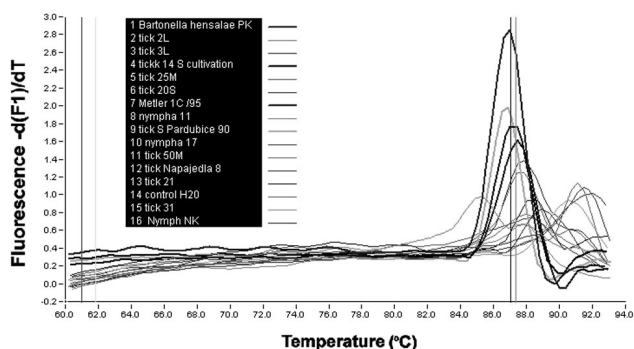
Graf 1: POZITIVITA DNA *Borrelia burgdorferi* s.l. (BB) a *Anaplasma phagocytophilum* (HGE) u klíšťat ve sběrech po 10 jedincích od března do srpna v r. 2007



Na grafu 2 je prezentována pozitivita klíšťat na přítomnost *Bartonella henselae* a *Rickettsia* sp. v roce 2007. Vysoce specifický výsledek real-time PCR v LightCycleru ukazuje pomocí změn fluorescence (záporná derivace) v závislosti na změně teploty v každém denaturačním kro-

ku 40 amplifikací za 30 minut píky teploty tání 86 °C pro *Bartonella* a 86,7 °C pro *Rickettsia*, které ukazují stejnou teplotu tání *gltA* ampliconů jako v kontrolní DNA. Silné linie píků značí pozitivní amplicony, tenké linie jsou negativní vzorky.

Graf 2: POZITIVITA KLÍŠTAT na přítomnost *Bartonella henselae* a *Rickettsia* sp. v roce 2007



DNA prvka *Babesia* (při 55 vyšetřeních) byla prokázána u 7,3 % klíšťat, jak ukazuje tabulka 1. Ve dvou případech byla sekvencí ampliconu zjištěna DNA druhu *Babesia divergens* na dvou lokalitách, která byla pozitivní též v komerčním kitu K078.

Výskyt vývojových stádií na vybrané lokalitě v r. 2007

Z celkového počtu 114 jedinců *I. ricinus* sbíraných na jedné lokalitě (Praha 10) v roce 2007 bylo 42 dospělců (36,8 %) 61 nymf (53,5) a nejméně bylo larev 13 (11,4 %). V první polovině roku bylo nejvíce dospělých klíšťat. Od října již nebyli nalezeni dospělci. Největší počet samic byl v dubnu. Počet nymf kolísal v jednotlivých sběrech s maximem v dubnu a říjnu. Nejvíce nymf z celkového počtu bylo získáno v říjnu. Larvy se vyskytly pouze ve dvou letních měsících v červenci a v srpnu. Rok 2007 byl již od začátku nezvykle teplý. Měsíc před maximálním výskytem nymf a dospělců bylo dostatek srážek. Měsíc březen byl poměrně chladný, byly i srážky sněhové. Naproti tomu v dubnu byly již maximální teploty nezvykle vysoké (kolem 25 °C), ale prakticky beze srážek. V květnu srážek přibývalo a teploty byly vysoké. V měsících, kdy se objevily larvy byly teploty >22 °C a bylo dostatek srážek. To jsou nezbytné podmínky pro líhnutí larev. Vyhlíhlé larvy uprostřed léta se částečně stačily přeměnit v nymfy a to ještě na podzim ve stejném roce.

PCR pozitivita klíšťat na vybrané lokalitě v roce 2007

Ze 114 klíšťat všech vývojových stádií z jedné lokality bylo 16 jedinců (14,3 %) pozitivních na genomovou DNA *B. burgdorferi* s.l. a u 11 klíšťat ze 107 vyšetřených byla identifikována genomová DNA *A. phagocytophilum*. (10,2 %).

Z 16 pozitivních klíšťat na DNA *Borrelia* sp. bylo 7 dospělých samic, 8 nymf a jen 1 larva. Dospělá klíšťata obsahovala DNA *Borrelia* v 16 %, nymfy v 13 % a larvy v 8 %. *Anaplasma* sp. z 11 pozitivních klíšťat byla u 8 (72,7 %) dospělých klíšťat a u 3 (27,2 %) nymf. V larvách nebyla DNA *Anaplasma* zjištěna.

Vyšetření klíšťat v roce 2008

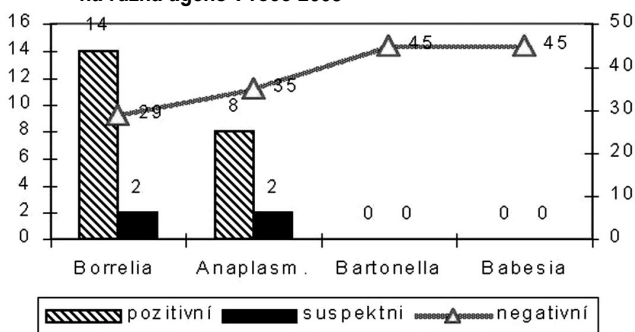
V roce 2008 bylo mikroskopii v temném poli vyšetřeno 277 klíšťat. Z vybrané lokality v Praze bylo vyšetřeno pomocí PCR 87 klíšťat (35 nymf, 40 dospělců, 12 larev) na *B. burgdorferi* s.l. a 50 na přítomnost genomové DNA *Anaplasma phagocytophilum*, genomové DNA *Bartonella* sp a prvoků rodu *Babesia*. Na rozdíl od roku 2007 vyšetření klíšťat v zástinu ukázalo větší rozdíly v nákaze borreliemi v jednotlivých lokalitách. Zatímco na jedné lokalitě (Praha 10) byla klíšťata nakažena borreliemi v 20 %, v Klánovicích a na Letné jsme nezjistili v květnu nákazu vůbec. V Hostivaři a v Šárce byla podzimní nákaza klíšťat vyšší (11 a 16%) než na jaře (6,5%). Celkově byla ale podzimní nákaza klíšťat shodně s rokem 2007 nižší. Nejvíce pozitivních klíšťat s obsahem DNA *Borrelia* sp. (14 %), shodně s výskytem *Anaplasma* sp. v 8 % bylo v květnu (graf 3). *Anaplasma* byla u klíšťat pouze na jaře a nebyla zjištěna na podzim. V žádném klíšťeti jsme neprokázali DNA *Bartonella* nebo *Babesia* spp. ani na vybrané lokalitě v Praze 10.

Druhé maximum infekce *Borrelia* sp. u klíšťat v roce 2008 bylo ještě v září, jak ukazuje graf 4, ale nebyla již zjištěna *Anaplasma* sp.

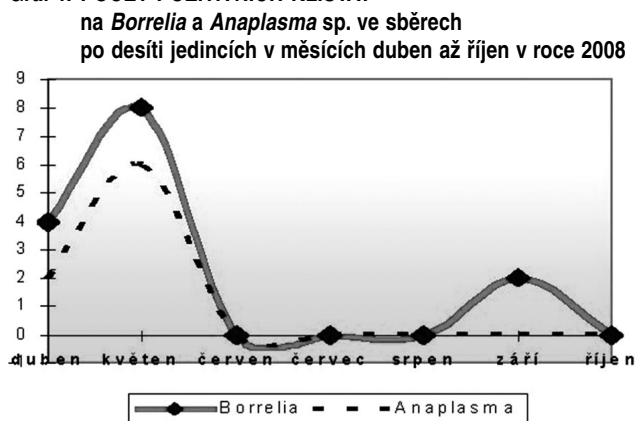
Pozitivita PCR klíšťat na jedné lokalitě v roce 2008

V roce 2008 bylo vyšetřeno 87 klíšťat z jedné lokality a 18 jich bylo pozitivních (20 %) na genomovou DNA *Borrelia* sp. a u 7 byla zjištěna genomová DNA *A. phagocytophilum* (8 %). Z 18 pozitivních klíšťat bylo 11 samic a 7 nymf. *Anaplasma* byla prokázána pouze u dospělců, tj. u 5 samic a 2 samců.

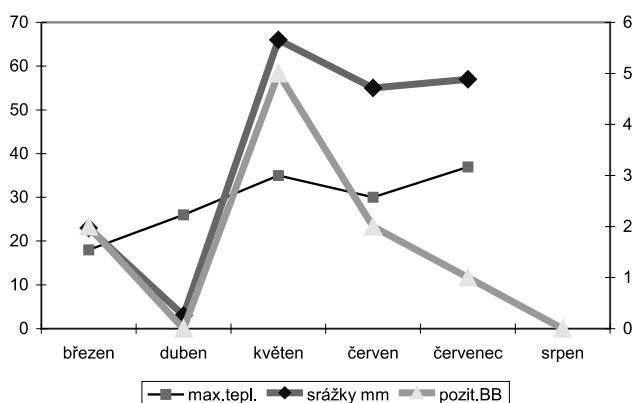
Graf 3: PROCENTO POZITIVNÍCH KLÍŠTAT na různá agens v roce 2008



Graf 4: POČET POZITIVNÍCH KLÍŠTAT na *Borrelia* a *Anaplasma* sp. ve sběrech po desíti jedincích v měsících duben až říjen v roce 2008



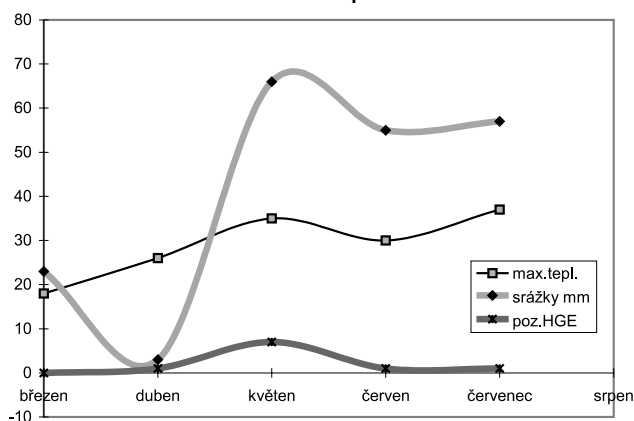
Graf 5: SOUVISLOST VÝŠE TEPLoty A MAXIMÁLNÍCH SRÁŽEK v mm a pozitivitu DNA *Borrelia* sp. v klíštěti v roce 2008



Vývoj infikovanosti klíšťat v lokalitě v jednotlivých měsících

Počet pozitivních klíšťat stoupá zhruba za měsíc po kratším (cca 14 dní) suchém období. Tak tomu bylo v letech 2007 i 2008. Největší výskyt borrelií byl v dubnu 2007 a v květnu 2008, který následoval po prakticky srážkově minimálním dubnu. U původce *Anaplasma* sp. v klíštětech byl ve sledované lokalitě květen absolutním vrcholem výskytu v letech 2007 i 2008. K růstu bakterií *Borrelia* a *Anaplasma* sp. ve střevě klíštěte je zapotřebí určité doby s vyšší teplotou i při srážkovém minimu (viz graf 6). Uložení materiálu s rickettsiemi do vlhké komůrky na několik dní Lenette, 1974 [5] se zvyšuje úspěšnost kultivace.

Graf 6: SEZÓNŇÍ VÝSKYT *Anaplasma phagocytophilum* (HGE) v závislosti na srážkách a teplotě v r. 2008



Zákus klíšťat u pacientů

Vyšetřili jsme celkem 114 klíšťat odstraněných z kůže po zákusu v roce 2007 a 86 v roce 2008. Zákus byl ve většině případů kratší než 24 hodin. Nejvíce zákusů bylo u žen (96x), méně u mužů (74x) a nejméně (30x) u dětí, většinou předškolního věku. Pozitivita přisátých klíšťat na *Borrelia* v našem souboru byla 7%. Pozitivita klíšťat přisátých u mužů byla nejvyšší a to 9,4 %, u žen 6,2 % a nejnižší

byla u dětí, 3,3 %. Pouze jedenkrát jsme v klíštěti od dítěte po 48 hodinách sání zjistili více než 1000 *B. garinii* / 1mL. Metoda PCR pro zjištění borrelií a virů v klíštěti má výzkumný charakter a není vhodná k indikaci léčby, vzhledem k její vysoké citlivosti.

ZÁVĚRY

Nákaza klíšťat různými patogenními agens závisí na teplotě a na jejich vývojovém stádiu. Zatím co larvy přenášejí různá agens minimálně a některá agens vůbec ne, dospělé samice a samci, zvláště na jaře, mohou přenést i více agens najednou. V teplém roce i srážkově pod normálem, může klíště celý generační vývoj prodělat již v jednom roce, což je nebývalé a domníváme se, že to je vlivem oteplování. Závěrem zdůrazňujeme, že naše služba mikroskopické detekce *Borrelia* v klíštěti není většinou indikací k zajišťovací léčbě antibiotiky, doporučené v USA, protože přenos infekce z *Ixodes ricinus* závisí na velikosti invazní dávky (počtu spirochét i virů), době přisátí klíštěte, virulenci i vývoji agens v aktivní formu i na individuální ochraně kůže jedinců. Navíc viry se neléčí antibiotiky a je proti nim vakcína.

LITERATURA

1. Marconi RT and Garon CF. Development of Polymerase Chain Reaction Primer Sets for Diagnosis of Lyme Disease and for Species-Specific Identification of Lyme Disease Isolates by 16S rRNA Signature Nucleotide Analysis. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11): 2830–2834.
2. Engvall EO, Pettersson B, Persson M, Artursson K, and Johansson KE. 16S rRNA-Based PCR Essay for Detection and Identification of Granulocytic *Ehrlichia* Species in Dogs, Horses and Cattle. *J Clin Microbiol* 1996; 34(9): 2170–2174.
3. Breitschwerdt EB, Hegarty BC, and Hancock SI. Sequential Evaluation of Dogs Naturally Infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* or *Bartonella vinsonii*. *J Clin Microbiol* 1998; 36(9): 2645–2651.
4. Hulínská D, Langrová K, Pejřich M, and Pavlásek P. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in animals by real-time polymerase chain reaction. *APMIS* 2004; 112: 239–247.
5. Skotarczak B, Adamska M, Supron M. Blood DNA analysis for *Ehrlichia (Anaplasma) phagocytophila* and *Babesia* spp. of Dogs from Northern Poland. *Acta Vet Brno* 2004; 73: 347–351.
6. Lennette EH, Schmidt NJ, et al. Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz. Avicenum Praha, 1974, str. 496.

Dagmar Hulínská
Jiří Antonín Votýpka
Naděžda Holinková
Zuzana Kurzová
Lenka Uherková
Kateřina Baštová
Oto Melter

Národní referenční laboratoř pro borreliózu
CLČ v OPVZ, Státní zdravotní ústav, Praha