

***Borrelia burgdorferi* s.l. v klišťatech na ostravských haldách**

Jarošová V.^{1,2}, Rudolf I.¹, Halouzka J.¹, Hubálek Z.^{1,2}

¹Ústav biologie obratlovců AVČR v.v.i. Brno, oddělení medicínské zoologie Valtice

²Masarykova univerzita Brno, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie

Souhrn

V letech 2005 a 2006 byly prováděny periodické sběry klišťate obecného *Ixodes ricinus* na ostravských haldách Oskar (A) a Emma (B), částečně porostlých vegetací včetně dřevin, a na kontrolní lesní lokalitě (C) u nedalekého města Hlučín. Průměrná frekvence klišťat (počet nasbíraných klišťat za hodinu vylajkování) byla vysoká, na haldě A 35,3 nymf a 12,7 dospělců, na haldě B 23,3 nymf a 26,0 dospělců, a na lokalitě C 25,4 nymf a 16,8 dospělců. Mikroskopii v zástinu bylo na přítomnost borrelií *Borrelia burgdorferi* sensu lato vyšetřeno z každé lokality 100 nymf a 100 dospělců (50 samic a 50 samců). Průměrná prevalence *B. burgdorferi* s.l. v klišťatech byla na haldě A 10,0 % u nymf a 12,0 % u dospělců, na haldě B 10,0 % u nymf a 24,0 % u dospělců, a na lokalitě C byl tento podíl 13,0 % u nymf a 17,0 % u dospělců. Rozdíly v celkové prevalenci borrelií v klišťatech mezi haldami A nebo B a kontrolní plochou bez ohledu na stadium klišťate nebyly statisticky průkazné, i když dospělá klišťata z haldy B obsahovala borrelie signifikantně čteněji než dospělci z haldy A. Lokality se mezi sebou lišily ve frekvenci průměrného počtu klišťat infikovaných borreliemi za hodinu sběru: na haldě A to bylo 3,3 nymf a 1,2 dospělců, na haldě B 1,5 nymf a 2,9 dospělců, a na kontrolní lokalitě 3,1 nymf a 2,6 dospělců. Izolační pokusy byly provedeny u 16 klišťat s přítomností většího počtu spirochét, a u 8 z nich se podařilo vykultivovat borrelie, které byly pomocí PCR-RFLP identifikovány jako *B. garinii* (3 izoláty: 1 Hlučín; 2 halda B), *B. afzelii* (4 izoláty: 1 halda A; 3 halda B) a *B. burgdorferi* s.s. (1 izolát halda A). Výsledky poněkud překvapivě naznačují, že ostravské haldy hlušiny, pokud jsou porostlé vegetací včetně dřevin a navštěvovány lidmi, mohou teoreticky představovat přibližně stejné potenciální riziko nákazy člověka lymfskou borreliózou jako běžné lesní biotopy.

Klíčová slova: *Ixodes ricinus* – výsypky hlušiny – lymfská borrelióza – riziko přenosu.

Summary

Jarošová V., Rudolf I., Halouzka J., Hubálek Z.: *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ixodid Ticks from Ostrava Slag Heaps

In 2005 and 2006, *Ixodes ricinus* ticks were collected on two slag (waste rock) heaps from coal mines in the Ostrava area (North Moravia/Silesia, Czech Republic), Oskar (site A) and Emma (site B), partially covered by vegetation including trees, and at a control forest site near Hlučín (site C). The mean numbers of *I. ricinus* nymphs and imagoes flagged per person-hour were high: 35.3 nymphs and 12.7 imagoes, at site A, 23.3 and 26.0, respectively, at site B, and 25.4 and 16.8, respectively, at control site C. Using dark-field microscopy, 100 nymphs and 100 imagoes (50 females and 50 males) from each site were examined for borreliae. The mean prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in nymphs and imagoes were 10.0 % and 12.0 %, respectively, at site A, 10.0 % and 24.0 %, respectively, at site B, and 13.0 % and 17.0 %, respectively, at site C. Differences in the prevalence of borreliae in nymphal and adult ticks from the slag heaps and control site were insignificant, but adult ticks from site B compared to site A contained borreliae significantly more frequently. The mean numbers of nymphs and imagoes infected with borreliae flagged per person-hour were 3.3 and 1.2, respectively at site A, 1.5 and 2.9, respectively, at site B, and 3.1 and 2.6, respectively, at site C. Isolation experiments for borreliae were carried out only in 16 ticks containing higher numbers of borreliae, with eight of these being culture-positive. The cultured borreliae were identified by PCR-RFLP as *B. garinii* (3 isolates: two from site B, one from site C), *B. afzelii* (4 isolates: one from site A, three from site B) and *B. burgdorferi* s.s. (one isolate from site A). Surprisingly, the results suggest that slag heaps, when covered by woody vegetation and frequented by humans, could theoretically pose roughly the same LB transmission risk to humans as common forest biotopes.

Key words: *Ixodes ricinus* – slag heaps – Lyme borreliosis – transmission risk.

Lymská borrelióza (LB), jejímž původcem je *Borrelia burgdorferi* sensu lato [2], je jednou z nejvýznamnějších a nejhojnějších zoonóz holarktické oblasti [6, 28, 30, 31]. Komplex *B. burgdorferi* s.l. zahrnuje t.č. minimálně 12 genomických druhů (genomospecies, nomenklatoricky nepřesně zvaných genospecies), které se částečně liší také svou ekologií, epidemiologií, mírou patogenity i klinickým obrazem vyvolávané nemoci. Pro člověka patogenní a LB prokazatelně vyvolávající jsou především *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* a *B. garinii*, ojediněle jsou však popisovány také případy LB vyvolané *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* [3, 27].

V České republice byly případy LB člověka laboratorně (sérologicky) potvrzeny poprvé ve druhé polovině 80. let [4, 21], a borreliie přítomné v tkáních pacientů byly u nás pozorovány nedlouho poté [15, 29]. V tomto období byla také v Česku *B. burgdorferi* s.l. poprvé mikroskopicky detekována v klíšťatech *Ixodes ricinus* [20] a následně z klíšťat izolována [14]. LB je u nás nejhojnější klíšťatý přenosnou zoonózou: během let 1993–2007 bylo v ČR hlášeno průměrně 3680 (rozsah 2138–6302) LB případů ročně [18, EpiDat – Státní zdravotní ústav Praha]. V roce 1995 bylo zaznamenáno rekordních 6302 případů onemocnění, což podle epidemiologů souviselo s nadnormálním výskytem klíšťat. Signifikantní vztah mezi početností nymf klíštěte obecného a incidencí LB byl prokázán např. na jižní Moravě [12].

Ekosystém, v němž se vektor LB – klíště komplexu *Ixodes ricinus* – převážně vyskytuje, jsou listnaté a smíšené lesy mírného klimatického pásu. Popsán je ovšem také častý výskyt borrelií v klíšťatech evropských městských parků [1, 7, 10, 19, 22–24]. Doposud však nebyla věnována dostatečná pozornost možnosti výskytu klíšťat infikovaných borreliemi v tak vyhraněně antropogenním biotopu, jaký představují odvaly karbonské hlušiny z černouhelných dolů, které se nacházejí např. na Ostravsku. Mnohé z těchto ostravských hald byly sukcesně osidlovány vegetací, a postupně se na nich objevovaly také některé druhy endotermních obratlovců, potenciálních hostitelů klíšťat. Proto jsme se domnívali, že by se na haldách mohla vyskytovat i klíšťata, případně nakažená borreliemi. Klíště *I. ricinus* bylo ostatně trvale nalézáno na výsypkách hnědouhelných dolů na Mostecku zhruba 10 let po jejich rekultivaci [26].

Materiál a metody

Charakteristika lokalit

Všechny 3 sledované lokality se nacházejí na území Moravskoslezského kraje (obr. 1). V období 1961–1990 byl na tomto území průměrný roční souhrn srážek 677 mm, průměrná teplota vzduchu 8,6 °C, v měsících březen až listopad 11,7 °C.

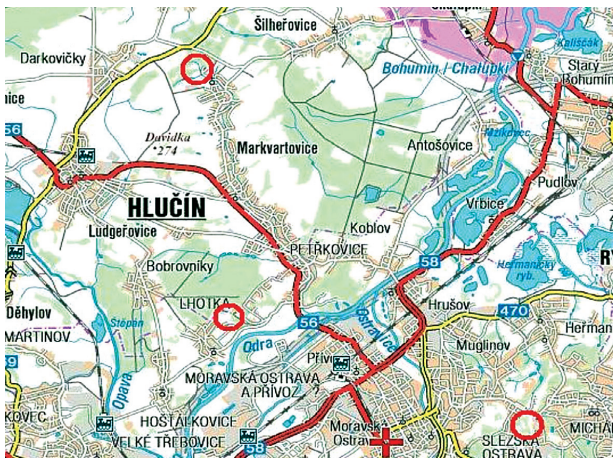
V roce 2005 byla průměrná teplota vzduchu od března do listopadu mírně nadnormální (12,4 °C), a roční souhrn srážek činil 699 mm (údaje Českého hydrometeorologického ústavu).

Sběry klíšťat byly prováděny na haldách patřících ke dvěma městským částem Ostravy, a na kontrolní lokalitě u Hlučína. Oba studované umělé biotopy odvalů na území Ostravy vznikly relativně nedávno, kdy byla hlušina (odpad z těžby černého uhlí) navezena do „hald“ a tyto haldy pak postupně osídleny přírodním náletem dřevin anebo dřevinami uměle osazenými (rekultivovány).

Halda Oskar (lokality A: 49°51'45" N, 18°14'10" E) je výsypkou nepravidelného tvaru z bývalého dolu Oskar (později přejmenovaného na důl Lidice), který byl založen v roce 1891 u západního okraje obce Petřkovice. Těžba uhlí zde probíhala v letech 1896–1967. Halda není termicky aktivní, má rozlohu 2,2 ha a objem hlušiny >1,5 mil. m³. Výsypka byla rekultivována, vegetační kryt je přesto tvořen z velké části přírodním náletem dřevin (obr. 2). V druhové skladbě převládají ve stromovém patru bříza bradavičnatá, dub zimní a cer, javor klen, lípa malolistá, olše lepkavá; v keřovém patru bez černý, líška. Bylinné patro je zastoupeno např. druhy hluchavka bílá, kopřiva dvoudomá, sasanka hajní, jahodník obecný. Zdejší faunu obratlovců – hostitelů klíšťat – tvoří hraboš polní, norník rudý, myšice křovinná a lesní, rejsek obecný, ježek východní, zajíc, liška, prase divoké, srnec; z ptáků bažant obecný, kukačka, drozd zpěvný, kos, červenka, strnad obecný. Z klíšťat jsme prokázali pouze druh klíště obecné (*Ixodes ricinus*).

Halda Emma (lokality B, halda označována také jako Terezie, Terezie-Emma či Emma-Terezie: 49°50'23" N 18°18'54" E) je bývalou výsypkou dolu Terezie (přejmenovaného na důl Petr Bezruč) a dolu Svaté Trojice, a nachází se v oblasti na pravém břehu řeky. Oba doly byly založeny ve 40. letech 19. století, byly posléze sloučeny, a těžba v dolu Petr Bezruč probíhala až do roku 1992. Haldu o rozloze asi 34 ha tvoří >4 mil. m³ slehávací hlušiny. Tato více než 150 let stará halda je termicky aktivní, vyvěrají z ní bělostné obláčky plynů, obsahující zejména oxid siřičitý. Díky tomu se také na vrcholu odvalu nikdy neudrží sníh. Výsypka byla rekultivována: na severní straně je hustý les; jižní svah, který stále prohořívá, je porostlý řídkěji náletovými dřevinami (obr. 3). Halda je protkána několika značenými stezkami, a slouží dokonce jako výletní místo pro obyvatelstvo. V druhové skladbě převládají ve stromovém patru bříza bradavičnatá, dub zimní a cer, javor mléč, jasan ztepilý, jeřáb obecný; v keřovém patru bez černý, líška, dřín, lípa malolistá, svída. V bylinném patru jsou druhy kopřiva dvoudomá, svízel přítula, netýkavka malokvětá, starček obecný, kaprad samec a mnoho dalších. Ze savců se zde vyskytuje veverka, hraboš polní, myšice křovinná a lesní, rejsek obecný, ježek východní, zajíc; z ptáků např. bažant, kos, drozd zpěvný, červenka a strnad obecný. Z klíšťat jsme na lokalitě zjistili pouze klíště obecné.

Hlučín – porost Štípký (lokality C: 49°55'25" N, 18°13'45" E; 286 m n.m.). Les Štípký, který jsme zvolili za kontrolní lokalitu, se nachází asi 2 km od předměstí Darkovičky, a je součástí bažantnice v Šilheřovicích. V druhové skladbě převládají ve stromovém patru dub letní, zimní a cer, javor klen a mléč, buk, bříza bradavičnatá, habr, olše lepkavá, smrk, jeřáb obecný; v keřovém patru pak bez černý, líška, ostružiník křovitý a maliník. V bylinném patru jsou zastoupeny druhy hluchavka bílá, kopřiva dvoudomá, sasanka hajní, netýkavka malokvětá, tuřice třeslicovitá, kaprad samec a mnoho dalších. Ze savců se běžně vyskytují hraboš polní, norník rudý, myšice křovinná, lesní a temnopásá, veverka, rejsek obecný, krtek, ježek východní, zajíc, liška, prase divoké, srnec. Pohybuje se zde velké množství bažantů a mnohé další druhy ptáků např. kukačka, kos, drozd zpěvný, červenka, strážník, brhlík, sojka, straka, strnad obecný. Z klíšťat se zde nachází pouze druh klíště obecné.



Obr. 1. Mapa Ostravska (<http://supermapy.centrum.cz>) se třemi kroužky vyznačujícími lokality sběru (od severu k jihu studijní plochy Hlučín, halda A, a halda B)

Fig. 1. Map of the Ostrava area (<http://supermapy.centrum.cz>) with three encircled tick collection sites (from North to South: Hlučín, control site C, slag heap Oskar, site A, and slag heap Emma, site B)



Obr. 2. Halda A („Oskar“)

Fig. 2. Site A (slag heap Oskar)



Obr. 3. Halda B („Emma“), svahy

Fig. 3. Site B (slag heap Emma), slopes



Obr. 4. Halda B („Emma“), horní partie

Fig. 4. Site B (slag heap Emma), upper part

Sběr klíšťat a jejich vyšetření na borreliie

Sběr. Hladové nymfy a imaga klíštěte obecného *Ixodes ricinus* byly sbírány vlnkováním nízké vegetace pomocí bílé flanelové látky (60x100 cm) od dubna do září v letech 2005 a 2006, a transportovány do laboratoře ve skleněných zkumavkách s korkovými zátkami a několika vloženými listy travin proti

vyschnutí. Zkumavky s živými klíšťaty byly v laboratoři uchovávány při 5 °C, a listy travin podle potřeby obměňovány. Sběry klíšťat byly provedeny v 10 termínech: 4krát v roce 2005 a 6krát v roce 2006, všechny od dubna do července; podzimní sběry nebyly uskutečнены vzhledem k nízké početnosti klíšťat. Úhrnem bylo na borreliie mikroskopicky vyšetřeno 600 klíšťat – po 200 kusech (50 samic, 50 samců a 100 nymf) z každé lokality.

Tab. 1. Přehled použitých kontrolních kmenů borrelií s označením fragmentů vzniklých po restriktivním štěpení PCR produktu rrf (5S)–rrl (23S) [25]**Table 1.** Control strains of 5 Borrelia species and lengths of restriction fragments of rrf (5S)–rrl (23S) intergenic amplicons [25]

Kmen	Genomický druh	Zdroj	Zeměpisná oblast	Donor	Amplikon	Fragmenty (bp)
B31 ^T	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>I. scapularis</i>	Shelter Island (N.Y.)	J.F.Anderson	254 bp	108, 51, 38, 29, 28
20047 ^T	<i>B. garinii</i>	<i>I. ricinus</i>	Bretaň (Francie)	I. Livey	253 bp	108, 95, 50
VS461 ^T	<i>B. afzelii</i>	<i>I. ricinus</i>	Valais (Švýcarsko)	I. Livey	246 bp	108, 68, 50, 20
VS116 ^T	<i>B. valaisiana</i>	<i>I. ricinus</i>	Valais (Švýcarsko)	I. Livey	255 bp	175, 50, 23, 7
BR 41	<i>B. lusitaniae</i>	<i>I. ricinus</i>	Valtice (ČR)	ÚBO AVČR	257 bp	108, 81, 39, 29

^T typový kmen příslušného genomického druhu.

^T type strain of the respective genomic species.

Mikroskopie. U jednotlivých klíšťat byla na mikroskopickém podložním sklíčku idiosoma oddělena od gnathosomy a končetin pomocí preparačních jehel. Vypreparované střevo bylo rozmělněno a střešní obsah homogenizován v kapce sterilního fyziologického roztoku, překryt krycím sklíčkem a vyšetřen mikroskopii v zástinu při zvětšení 160krát a 400krát. Prohlédnuta byla vždy celá plocha preparátu, a u pozitivních vzorků byly spirochéty spočítány. Spirochéty morfologicky shodné s borreliemi jsou považovány v této studii za *Borrelia burgdorferi* s.l., neboť nálezy spirochét jiných než náležejících ke komplexu *B. burgdorferi* s.l. v nymfách a dospělých *I. ricinus* jsou ve střední Evropě zcela výjimečné (a tudíž zanedbatelné).

Izolace a kultivace. Byla-li infekce borreliemi podle mikroskopického vyšetření dostatečně intenzivní (>100 spirochét v klíštěti) nebo vykazovaly-li spirochéty výraznou motilitu, bylo přistoupeno k izolačnímu pokusu. Homogenát střeva klíštěte byl z krycího i podložního sklíčka smyt do malé (3 ml) skleněné zkumavky s médiem BSK-H (Sigma, Německo) s přísadkou fosfomycinu (100 µg/ml) a rifampicinu (50 µg/ml). Ve zvláštních případech (při rezistenci kontaminanty) byl použit také sulfametoxazol (50 µg/ml) a trimetoprim (10 µg/ml) (Sigma, USA). Inokuláty byly inkubovány až 4 týdny při 33 °C, průběžně mikroskopicky kontrolovány, a pozitivní vzorky pasážovány do čerstvého kompletního média BSK-H doplněného antibiotiky. Izolované kmene byly pro uchování zmrazeny v plastových kryozkumavkách (Nunc, Dánsko) v médiu BSK-H s přísadkou 10% dimetylsulfoxidu (Sigma) jako kryo-protékta při teplotě -60°C, případně i v kapalném dusíku při -196 °C.

Identifikace borrelií (PCR a polymorfismus délky restriktivních fragmentů, RFLP). Spirochetální buňky určené pro izolaci DNA byly kultivovány do logaritmické fáze růstu, zkoncentrovány centrifugací (8500 g, 30 min, 4 °C), 2krát promyty sterilním fyziologickým roztokem centrifugací za stejných podmínek, resuspendovány v odpovídajícím množství sterilního fyziologického roztoku (cca 0,5ml), a zmrazeny při -20 °C. Bakteriální DNA byla izolována pomocí DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Německo) přesně podle návodu dodávaného výrobcem. Takto připravený vzorek DNA byl uchováván při -20 °C, a použit jako templát pro PCR. Primery byly vybrány tak, aby došlo k amplifikaci variabilního regionu mezi dvěmi konzervovanými strukturami, 3' koncem 5S rRNA (*rrf*) a 5' koncem 23S rRNA (*rrl*). Amplifikované fragmenty jsou u různých kmenů borrelií dlouhé 226 až 266 bp [25]. Byly připraveny vzorky našich izolátů a také typových kmenů borrelií, které byly pasážovány a uchovávány na oddělení medicínské zoologie ÚBO AVČR ve Valticích (tab. 1). V PCR byl použit 2krát koncentrovaný PPP Master Mix (Top-Bio, ČR): 15 mM Tris-HCl (pH 8,8); 40 mM (NH₄)₂SO₄; 0,02% Tween 20; 5 mM MgCl₂; 400 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 100 U/ml Taq purp-

le DNA polymerázy; aditiva, stabilizátory. Reakční směs o celkovém objemu 25 ml se skládala z PPP Master Mix, PCR H₂O, primerů (Invitrogen, USA) o koncentraci 20 pmol, a templátové DNA. Program termocyklu PTC-200 (MJ Research, USA) zahrnoval celkem 30 cyklů s etapami 1 min/94 °C; 1 min/52 °C; a 2 min/72 °C. Izolace DNA, příprava PCR směsi, vlastní amplifikace stejně jako post-PCR kroky probíhaly odděleně (časově i prostorově) kvůli zamezení možné zkřížené kontaminace vzorků.

Amplikon mezerníkového úseku mezi geny *rrf* a *rrl* byl dále štěpen restriktivním enzymem *Mse*I (New England Biolabs, USA), který rozkládá DNA v cílovém místě 5'-T↓TAA-3'; 3'-AAT↑T-5' [25]. Po restriktivním štěpení PCR produktu byla provedena elektroforéza vzorků v aparatuře Biorad (Biorad Laboratories, USA) v 3% agarózovém gelu (Invitrogen, USA) při použití 0,5krát TBE pufru (SERVA, Německo) za standardních podmínek (napětí 70 V, 18 mA, 2,5 h). Gel byl barven ethidium bromidem (Top-Bio, ČR), a amplifikovaná DNA byla analyzována pod UV světlem v transluminátoru (Ultra-Cam, USA). Vizualizovaná DNA byla zpracována dokumentačním systémem Ultra-Cam (USA).

Kvantitativní údaje a jejich statistické zpracování

Abundance klíšťat a borrelií byly vyjádřeny indexy:

1) **Frekvence klíšťat (F)** – průměrný počet klíšťat za hodinu sběru vlnkou (neboli „na vlnkohodinu“). Charakterizuje momentální početnost klíšťat na lokalitě.

2) **Prevalence borrelií (P)** – průměrný podíl klíšťat s borreliemi z celkového počtu vyšetřených.

3) **Frekvence pozitivních klíšťat (F_p)** – průměrný počet klíšťat s borreliemi za hodinu vlnkování; F_p = F x P [13].

Pro hodnocení statistické průkaznosti rozdílů v proporcích (četnosti) podle tabulek 2x2 nebo 2x3 byl použit χ² test (program SOLO 4.0, BMDP Statistical Software, California, USA).

Výsledky

Početnost klíšťat

Celková průměrná frekvence klíšťat/h byla na kontrolní lokalitě 25,4 nymf a 16,8 dospělců; na haldě A 35,3 nymf a 12,7 dospělců; a na haldě B 23,3 nymf a 26,0 dospělců (tab. 2). Ze všech 3 lokalit byla nejvyšší frekvence nymf na haldě A při sběru dne 30.4.2005 (62,0), na haldě B 13.5.2005 (43,0), a v Hlučíně 16.4.2006 (rovněž 43,0). Frekvence dospělců na haldě A byla nejvyšší při sbě-

Tab. 2. Frekvence klíšťat (F, počet klíšťat/h), prevalence borrelií v nich (P, počet pozitivních/počet vyšetřených klíšťat), a frekvence pozitivních klíšťat (F_p, počet pozitivních klíšťat/h) na 3 lokalitách Ostravska; nt, netestováno

Table 2. Numbers of flagged ticks per person-hour (F), Borrelia prevalence rates (P = number of Borrelia-positives /number of investigated ticks), and numbers of flagged Borrelia-positive ticks per person-hour (F_p) at 3 sites in the Ostrava area; nt, not tested

	Nymfy			Samice			Samci		
Hlučín	F	P	F _p	F	P	F _p	F	P	F _p
17.4.2005	37,5	4/32	4,69	3	1/6	0,5	1,5	0/3	0
22.4.2005	36	nt	nt	3	1/3	1	5	0/5	0
30.4.2005	31	nt	nt	11	3/9	3,67	12	1/9	1,33
13.5.2005	34	nt	nt	12	nt	nt	13	nt	nt
7.4.2006	7	1/7	1	0	nt	nt	3	0/3	0
16.4.2006	43	5/28	7,68	4	1/4	1	14	0/14	0
28.4.2006	42	2/21	4	10	1/5	2	14	3/7	6
20.5.2006	10	0/8	0	5	2/5	2	13	1/4	3,25
17.6.2006	4	1/4	1	13	3/13	3	17	0/5	0
18.7.2006	9	nt	nt	5	0/5	0	9	nt	nt
Průměr	25,35	13,0%	3,06	6,60	24,0%	1,65	10,15	10,0%	1,32
Halda A	F	P	F _p	F	P	F _p	F	P	F _p
17.4.2005	44,7	0/28	0	0,67	0/1	0	1,33	1/2	0,75
22.4.2005	44	0/4	0	2	0/2	0	3	1/3	1
30.4.2005	62	0/10	0	4	0/4	0	3	0/3	0
13.5.2005	41	nt	nt	10	2/8	2,5	12	nt	nt
7.4.2006	27	3/13	6,23	7	0/7	0	6	0/6	0
16.4.2006	45	3/15	9	5	0/5	0	12	1/12	1
28.4.2006	24	0/8	0	10	0/5	0	12	0/6	0
20.5.2006	35	3/12	8,75	11	2/11	2	10	1/9	1,11
17.6.2006	25	1/10	2,5	4	0/4	0	8	3/8	3
18.7.2006	5	nt	nt	3	1/3	1	3	0/1	0
Průměr	35,30	10,0%	3,31	5,67	10,0%	0,55	7,03	14,0%	0,76
Halda B	F	P	F _p	F	P	F _p	F	P	F _p
17.4.2005	31,3	2/28	2,24	1,33	0/2	0	6	2/9	1,33
22.4.2005	25	nt	nt	14	nt	nt	16	4/14	4,57
30.4.2005	35	nt	nt	13	nt	nt	15	3/13	3,46
13.5.2005	43	nt	nt	19	nt	nt	26	nt	nt
7.4.2006	3	1/3	1	5	1/5	1	11	2/11	2
16.4.2006	18	1/16	1,12	12	5/12	5	14	nt	nt
28.4.2006	28	0/3	0	18	2/9	4	38	nt	nt
20.5.2006	30	6/30	6	11	3/11	3	16	nt	nt
17.6.2006	11	0/11	0	10	2/10	2	9	0/3	0
18.7.2006	9	0/9	0	1	0/1	0	5	nt	nt
Průměr	23,33	20,0%	1,48	10,43	26,0%	2,14	15,60	22,0%	2,27

rech 13.5.2005 a 28.4.2006 (pokaždé 22/h), na haldě B 28.4.2006 (56/h), a v Hlučíně 17.6.2006 (30/h). Sezonality klíšťat *I. ricinus* byla posouzena pomocí hodnot jejich frekvence na všech 3 lokalitách během měsíců duben–červenec 2006: maximum frekvence nymf bylo na haldě A v dubnu (38/h), na haldě B v květnu (30/h) a na lokalitě C v dubnu (31/h); maxima frekvence dospělých bylo dosaženo na haldě A v květnu (22/h), na haldě B již v dubnu (33/h), a na lokalitě C až v červnu (30/h).

Prevalence borrelií v klíšťatech

Prevalenci ukazuje rovněž tab. 2. Celková průměrná prevalence *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech byla 11,0 % u nymf a 17,7 % u dospělých. Na lokalitě A bylo pozitivních 10,0 % samic, 14,0 % samců a 10,0 % nymf; na B 26,0 % samic, 22,0 % samců, 10,0 % nymf, a na kontrolní lokalitě 24,0 % samic, 10,0 % samců a 13,0 % nymf. Nejvyšší procento pozitivních dospělých, jak samic tak samců, bylo tedy zaznamenáno na haldě B. Pomocí χ^2 tes-

Tab. 3. Kategorie klíšťat podle počtu zjištěných borrelií. Z každé ze 3 lokalit bylo vyšetřeno 100 nymf, 50 samic a 50 samců**Table 3.** Distribution of ticks by number of detected borreliae. A total of 100 nymphs, 50 males and 50 females from each of sites A, B and C were investigated. C, Hlučín (control site)

Lokalita	Hlučín			Halda A			Halda B		
	1-9	10-99	≥ 100	1-9	10-99	≥ 100	1-9	10-99	≥ 100
Borrelií:	1-9	10-99	≥ 100	1-9	10-99	≥ 100	1-9	10-99	≥ 100
Nymfy	3	8	2	2	7	1	3	7	0
Samice	2	6	4	2	1	2	1	7	5
Samci	1	3	1	1	3	3	2	3	6

Tab. 4. Přehled kmenů borrelií izolovaných z klíšťat *Ixodes ricinus* na Ostravsku**Table 4.** Borrelial strains isolated from *Ixodes ricinus* ticks at three sites of the Ostrava area

Izolát	Sex	Lokalita	Datum sběru	Genomický druh
BR V2	M	Hlučín	28.4.2006	<i>B. garinii</i>
BR V4	F	Halda B	20.5.2006	<i>B. afzelii</i>
BR V5	F	Halda A	20.5.2006	<i>B. afzelii</i>
BR V9	M	Halda A	17.6.2006	<i>B. burgdorferi</i> s.s.
BR V10	M	Halda B	20.5.2006	<i>B. garinii</i>
BR V11	M	Halda B	20.5.2006	<i>B. afzelii</i>
BR V12	M	Halda B	28.4.2006	<i>B. garinii</i>
BR V14	M	Halda B	28.4.2006	<i>B. afzeli</i>

tu nebyl zjištěn průkazný rozdíl v prevalenci borrelií mezi samicemi a samci v úhrnu ($\chi^2 = 1,12$; $P = 0,289$), ani na žádné ze 3 lokalit. Byla však zjištěna průkazně vyšší celková prevalence borrelií u dospělců než u nymf klíšťat ($\chi^2 = 5,43$; $P = 0,020$), která byla velmi výrazná zejména u klíšťat z haldy B ($\chi^2 = 6,94$; $P = 0,008$). Dospělá klíšťata z haldy B obsahovala také borrelie průkazně ($\chi^2 = 4,88$; $P = 0,027$) čteněji (24,0%) než dospělci z haldy A (12,0%), ostatní rozdíly v prevalenci mezi lokalitami u imag ani u nymf průkazně nebyly.

Početnost infikovaných klíšťat

Průměrná frekvence klíšťat s borreliemi „za vlajkohodinu“ byla na kontrolní lokalitě 3,1 nymf, 2,6 dospělců (1,6 samic a 1,3 samců); na haldě A 3,3 nymf, 1,2 dospělců (0,6 samic, 0,8 samců); a na haldě B 1,5 nymf, 2,9 dospělců (2,1 samic, 2,3 samců). Nejvyšší frekvence pozitivních nymf (tab. 2) byla na haldě A při sběru 16.4.2006 (9,0), na haldě B 20.5.2006 (6,0), a v Hlučíně 16.4.2006 (7,7). Frekvence pozitivních dospělců byla nejvyšší na haldě A při sběru 20.5.2006 (3,1), na haldě B 16.4.2006 (5,0), a v Hlučíně 28.4.2006 (8,0).

Počty borrelií v klíšťatech

Klíšťata byla rozdělena podle počtu zjištěných borrelií do 3 skupin (tab. 3). Nejvíce dospělců obsahujících >100 borrelií bylo nasbíráno na haldě B. Nymf obsahujících >100 borrelií bylo jen několik, a nymf s 10–99 borreliemi bylo nejvíce na kontrolní lokalitě C.

Izolace a identifikace borrelií

Z 16 izolačních pokusů v médiu BSK-H bylo úspěšných 8 pokusů (tab. 4). Amplifikací pomocí PCR primerů byl získán u vzorků pozitivních na přítomnost amplikonu *B. burgdorferi* s.l. fragment o velikosti 226-266 pb, který byl dále štěpen restriktázou *MseI*. Separací produktů štěpení na 3% agarózovém gelu byly získány fragmenty, které byly porovnány s již publikovanými restriktčními vzory [25]. Izolát BR-V2, který pocházel z lokality Hlučín, byl identifikován jako *B. garinii*. Izoláty BR-V5 a BR-V9 z lokality A byly identifikovány jako *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s. Z haldy B pocházely vzorky BR-V4, BR-V10, BR-V11, BR-V12 a BR-V14. Ve třech případech byla identifikována *B. afzelii* a ve dvou případech *B. garinii* (tab. 4).

Diskuse

Tato studie byla zaměřena na opakovaný sběr klíšťat v antropogenně narušených ekosystémech ostravské aglomerace (2 starší haldy) a na kontrolním nenarušeném biotopu smíšeného lesa (Hlučínsko). Vybrané lokality jsou od sebe vzdáleny <10 km. Při výběru hald se muselo přihlížet jak k jejich dostupnosti, tak k možnosti provádět sběry. Halda A (Oskar) se nachází na okraji města, v její blízkosti jsou lesy a pole, a proto se u ní předpokládalo větší druhové zastoupení hostitelů a tedy i větší frekvence záchytu klíšťat než u haldy B (Emma), která se nachází v blízkosti centra města Ostravy. To ovšem bylo potvrzeno pouze u nymf, zatímco dospělých klíšťat bylo více na haldě B. Početnost klíšťat mezi lokalitami byla rozdílná, a vcelku výrazně převyšovaly nymfy nad dospělci.

Distribuce LB je vázána na výskyt klíštěte obecného a bývá proto spojena s lesními biotopy, avšak riziko nákazy představují také např. městské parky (viz úvod). Některé studie uvádějí, že v městských parcích dosahuje pozitivita klíšťat až 30 % u dospělců a 14 % procent u nymf – např. v Brně [10]. V literatuře jsme ovšem nenalezli práci, která by se zabývala vyšetřením na borrelii klíšťat z rekultivovaných hald hlušiny z černouhelných dolů. Naše nálezy překvapivě ukazují, že i v tomto extrémním antropogenním biotopu se klíšťata obsahující borrelii vyskytují, a to s početností, která dosahuje abundance v biotopech přirozených.

Všechny sběry byly uskutečněny v měsících duben až červenec. Podzimní sběry nebyly prováděny vzhledem k nízké početnosti klíšťat v této době. V popisu sezonality frekvencí se zaměřujeme pouze na rok 2006, poněvadž v r. 2005 byly provedeny jen 4 jarní sběry. Maximální početnost nymf byla zjištěna na lokalitě Hlučín a na haldě A v dubnu, zatímco na haldě B v květnu. Avšak maximální početnosti dospělců bylo dosaženo u Hlučina v červnu, na haldě A v květnu, na haldě B v dubnu. Zdá se, že na haldách je sezónní vývoj klíšťat rychlejší, pravděpodobně díky teplejšímu mezoklimatu odvalů (zvláště na haldě Emma). Na haldě A a také na haldě B během letních měsíců klesala početnost jak dospělců tak i nymf. To odpovídá studii, ve které v jarních měsících byla početnost klíšťat (dospělců i nymf) maximální a v následujících měsících klesala [13].

Průměrná prevalence *B. burgdorferi* s.l. v *I. ricinus* v Evropě dosahuje 1,9 % u larev, 10,8 % u nymf a 17,4 % u dospělců [9] a liší se podle metod použitých k detekci. Kultivace v BSK médiu je méně citlivá metoda než mikroskopie (v zástinu či fázovém kontrastu) a PCR [5, 9]. V naší studii byla celková průměrná prevalence *B. burgdorferi* s.l. v klíšťatech 11,0 % u nymf a 17,7 % u dospělců, což zcela odpovídá celoevropskému průměru, a neliší se nijak významně od dat uvedených v jiných pracích uskutečněných na území Česka. Např. na jižní Moravě byla zjištěna prevalence u nymf 17,2 % a u dospělců 23,2 % [11], na Olomoucku u nymf 7,0 % a u dospělců 11,8 % [17], v Praze 8,2 % u nymf a 15,9 % u dospělců [23]. V naší studii byla zjištěna průkazně vyšší celková prevalence borrelií u dospělců než u nymf klíšťat, která byla velmi výrazná zejména u klíšťat z haldy B. Je možné, že mikroklima tohoto termicky aktivního odvalu příznivě ovlivňuje vývoj klíšťat i borrelií, zejména v chladnějších obdobích roku. Rozdíly v prevalenci borrelií v klíšťatech mezi kontrolní plochou a haldami nebyly statisticky průkazné.

Lokality se mezi sebou mírně lišily v indexu průměrného počtu klíšťat infikovaných borrelií

mi za hodinu sběru: nejvyšší frekvence pozitivních nymf byla na haldě A (9,0) a největší frekvence pozitivních dospělců v Hlučíně (8,0), a obecně byla nejvyšší frekvence pozitivních klíšťat v květnu. Míra rizika, jakou představuje počet infikovaných klíšťat za hodinu pro potenciální návštěvníky daného stanoviště, je vysoká především u nymf na kontrolní lokalitě a haldě A, a u dospělců na haldě B, kde můžeme v průměru každých 20 min narazit na infikované klíště. Míra rizika je nejvyšší u haldy B, na které se vyskytovalo nejvíce dospělých klíšťat obsahujících >100 borrelií. Nymf obsahujících >100 borrelií bylo jen několik, a nymf obsahujících 10–99 borrelií bylo nejvíce na kontrolní lokalitě Hlučín.

Pro identifikaci spirochét druhového komplexu *B. burgdorferi* s.l. se úspěšně používá PCR amplifikace *rrf* (5S)-*rrl* (23S) intergenového mezerníku ('spaceru') a následné analýzy tohoto amplikonu pomocí RFLP [25, 31], což bylo potvrzeno i v naší studii, v níž bylo pomocí této techniky určeno všech 8 získaných izolátů. Izolát z kontrolní lokality C byl identifikován jako *B. garinii*, izoláty z haldy A jako *B. afzelii* a *B. burgdorferi* s.s., a mezi kmeny pocházejícími z haldy B byla ve třech případech identifikována *B. afzelii* a ve dvou případech *B. garinii*. Toto zastoupení jednotlivých genomických druhů je typické pro Evropu, v níž převažují genomické druhy *B. garinii* (39,7%) a *B. afzelii* (37,1%), méně bývá zastoupena *B. burgdorferi* s.s. (15,9%) [8]. Frekvence výskytu *B. burgdorferi* s.s. se obecně snižuje od západu k východu, v České republice není nijak častá, a nevyskytuje se v Rusku [8, 25, 27]. Genospecies *B. valaisiana* a *B. lusitaniae* jsou daleko méně obvyklé, i když byly zaznamenány i v zemích střední Evropy: *B. valaisiana* i u nás [16] a na Slovensku [5], a *B. lusitaniae* v Portugalsku [3], na Ukrajině, v České republice [11,16] a na Slovensku [5].

Poděkování

Údaje charakterizující obě haldy poskytl Hornické muzeum v Petřkovicích. Tato studie byla podpořena grantem EU GOCE-2003-010284 EDEN (je evidována Radou projektu jako EDEN 0136), a částečně také Grantovou agenturou Akademie věd České republiky (KJB600930613).

Literatura

1. Bašta, J., Plch, J., Hulínská, D., Daniel, M. Incidence of *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks in an urban environment, Prague, Czech Republic, between 1995 and 1998. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1999, 18, 515–517.

2. Burgdorfer, W., Barbour, A. G., Hayes, S. F., Henach, J. L. et al. Lyme disease: a tick-borne spirochetosis? *Science*, 1982, 216, 1317–1319.
3. Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K. et al. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol*, 2004, 42, 1316–1318.
4. Doutlík, S., Hančil, J., Kulková, H., Sköldenberg, B. et al. První sérologický průkaz lymeské nemoci u dětí v ČSSR. *Českosl Pediat*, 1986, 41, 648–650.
5. Gern, L., Hu, C.M., Kocianová, E., Výrosteková, V., Řeháček, J. Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. *Eur J Epidem*, 1999, 15, 665–669.
6. Gray, J., Kahl, O., Lane, R.S., Stanek, G. Lyme borreliosis, biology, epidemiology and control. Wallingford: CABI Publishing, 2002. 347 s.
7. Guy, E.C., Farquhar, R.G. *Borrelia burgdorferi* in urban parks. *Lancet*, 1991, 338, 253.
8. Hubálek, Z., Halouzka, J. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomic groups in Europe, a review. *Eur J Epidem*, 1997, 13, 951–957.
9. Hubálek, Z., Halouzka, J. Prevalence rates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasitol Res*, 1998, 84, 167–172.
10. Hubálek, Z., Halouzka, J., Juřicová, Z. Prevalence of borreliae in *Ixodes ricinus* from urban parks. *Folia Parasitol*, 1993, 40, 236.
11. Hubálek, Z., Halouzka, J., Juřicová, Z. Investigation of haematophagous arthropods for borreliae - summarized data, 1988-1996. *Folia Parasitol*, 1998, 45, 67–72.
12. Hubálek, Z., Halouzka, J., Juřicová, Z. Longitudinal surveillance of the tick *Ixodes ricinus* for borreliae. *Med Vet Entomol*, 2003, 17, 46–51.
13. Hubálek, Z., Halouzka, J., Juřicová, Z., Svobodová, Š. Seasonal distribution of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks. *Zentralbl Bakt Mikrobiol Hyg A*, 1994, 280, 423–431.
14. Hubálek, Z., Korenberg, E.I., Juřicová, Z., Kovalevski, Yu.V. et al. Prevalence of borreliae in *Ixodes ricinus* ticks from southern Moravia, Czechoslovakia. *Folia Parasitol*, 1990, 37, 359–362.
15. Hulínská, D., Jirouš, J., Valešová, M., Herzogová, J. Ultrastructure of *Borrelia burgdorferi* in tissues of patients with Lyme disease. *J Basic Microbiol*, 1989, 29, 73–83.
16. Hulínská, D., Votýpka, J., Kříž, B., Holínková, N. et al. Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes ricinus* ticks by using electrophoretic chips and real-time polymerase chain reaction. *Folia Microbiol*, 2007, 52, 315–324.
17. Chmela, J. Kolísání výskytu borelií u klíštěte *Ixodes ricinus* (L.) v okrese Olomouc. *Epidem Mikrobiol Imunol*, 1994, 43, 32–35.
18. Janovská, D. Epidemiologická situace v České republice. In *Bartůněk, P. a kol. Lymeská borelióza. Praha: Grada Publishing, 2006. 25–42.*
19. Kahl, O., Schmidt, K., Schönberg, A., Laukamm-Josten, U. et al. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in Berlin (West). *Zentralbl Bakt Mikrobiol Hyg A*, 1989, 270, 434–440.
20. Kmety, E., Řeháček, J., Výrosteková, V. Investigations of ticks for the presence of *Borrelia* in Czechoslovakia. *Zentralbl Bakt Mikrobiol Hyg A*, 1986, 263, 468–470.
21. Markvart, K., Mazák, V., Vítková, V., Chalupský, J. Výsledky průzkumu lymeské nemoci ve Středočeském kraji. *Českosl Epidem Mikrobiol Imunol*, 1987, 36, 369–370.
22. Pejchalová, K., Žákovská, A., Mejzlíková, M., Halouzka, J., Dendis, M. Isolation, cultivation and identification of *Borrelia burgdorferi* genospecies from *Ixodes ricinus* ticks from the city of Brno, Czech Republic. *Ann Agric Environ Med*, 2007, 14, 75–79.
23. Pokorný, P. *Borrelia* sp. v klíštěti obecném (*Ixodes ricinus*) na území města Prahy. *Českosl Epidem Mikrobiol Imunol*, 1990, 39, 32–38.
24. Pokorný, P., Zahrádková, S. Výskyt borelií v klíštěti obecném (*Ixodes ricinus*) na území města Brna. *Českosl Epidem Mikrobiol Imunol*, 1990, 39, 166–170.
25. Postic, D., Assous, M. V., Grimont, P.A.D., Baranton, G. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic amplicons. *Int J Syst Bact*, 1994, 44, 743–752.
26. Rosický, B., Daniel, M. Lékařská entomologie a životní prostředí. Praha: Academia, 1989. 437 s.
27. Saint Girons, I., Gern, L., Gray, J.S., Guy, E.C. et al. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl Bakt Mikrobiol Hyg A*, 1998, 287, 190–195.
28. Steere, A.C., Coburn, J., Glickstein, L. The emergence of Lyme disease. *J Clin Invest*, 2004, 113, 1093–1101.
29. Valešová, M., Hulínská, D., Jirouš, J. Izolace borelií z tkání pacienta s Lymeskou boreliózou. *Čas Lék čes*, 1988, 127, 825–826.
30. Votava, M. a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003. 497 s.
31. Wang, G., van Dam, A.P., Schwarz, I., Dankert, J. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12, 633–653.

Do redakce došlo 8. 1. 2009

Prof. RNDr. Zdeněk Hubálek, DrSc.
Ústav biologie obratlovců AVČR, v.v.i.
Kláster 2
691 42 Valtice
e-mail: zhubalek@brno.cas.cz