Původce lymeské borreliózy ve vybraném revíru u lovné zvěře a myslivců.

Dagmar Hulínská, Jiří a Jan Votýpkovi

Národní referenční laboratoř pro lymeskou borreliózu Centra epidemiologie a mikrobiologie Státního zdravotního ústavu v Praze.

Cíle.

Cílené hledání původců lymeské borreliózy u lovné zvěře mělo ověřit možnost parenterálního přenosu virulentních borrelií bez účasti klíšťat.Předpokládanou cestou byl průnik spirochét drobnými oděrkami na rukou při ošetření zvěřiny bezprostředně po ulovení.Byli jsme inspirováni případem laboratorní infekce vzniklé po pětiminutové expozici narostlé kultury *Borrelia garinii* v kultivačním mediu při kontaktu s kůží na rukou díky prasklé gumové rukavici.Během několika dnů došlo na exponované ruce ke klinickým projevům onemocnění s bolestí kloubů a proximálním šířením.Z krve postiženého byl pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) identifikován shodný kmen *Borrelia garinii.*Po intenzivní léčbě,klinické projevy ustaly. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) kmene byla prokazatelná v krvi postiženého ještě 6 měsíců po expozici. Předpokládali jsme významný podíl na perenterálním přenosu při manipulaci s ulovenými savci.Především proto,že k vyvržení zvěřiny se přistupuje bezprostředně po ulovení.Myslivecká etika a tradice přímo zakazuje použití gumových rukavic,dokonce vykasání rukávů nebo převlečení.Navíc na místě ulovení není k dispozici nezávadná voda k omytí ani případná desinfekce.Vyvržení a ošetření úlovku se provádí "za tepla" tedy v době ,kdy i případné pathogenní zárodky jsou plně vitální a schopné invadovat narušenou pokožku rukou.I přes častý výskyt původců lymeské borreliózy v tkáních ptáků není zde nebezpečí přenosu tak výrazné,neboť se většinou úlovek necháváuležet a to je pro borrelie letální úkon,stejně jako případné zmražení a jiné úpravy.

Místo a čas.

Pro toto sdělení jsme vybrali výsledky získané vyšetřením zvířat v jedné příměstské honitbě a doplnili je o vyšetření krve myslivců hospodařících na stejném území a ve stejném časovém období.Odběr vzorků byl prováděn na území honitby Zemědělského družstva Velké Přílepy, mysliveckého sdružení Horoměřice-Roztoky.Honitba patří do okresu Praha-západ.Území leží na severozápadním okraji Prahy a je vymezeno katastry následujících obcí: Velké Přílepy,Holičky,Levý Hradec,Roztoky u Prahy,obcemi patřícími do území městské části Prahy 6 (Suchdol,Výhledy,Lysolaje,Dolní Šárka,Nebušice,Přední Kopanina) dále Statenice,Černý vůl a opět Velké Přílepy.Rozloha honitby byla 1900 hektarů.S intravilánem zde ležících obcí je o 300 hektarů více. Na území je 1280 ha polí, z toho 10 ha neobdělávané orné půdy.Smíšený les se rozprostírá na 100 ha, ovocné sady na 250 ha.Skály , skalnaté stráně a lomy tvoří 100 ha, vodní plochy (4 rybníky,2 potoky,2 bystřiny a část řeky Vltavy) 20 ha,cesty a silnice a podobné plochy 50 ha.Bonitní třída honitby je třetí..Jednotlivé lokality leží od 200 do 344 metrů nad mořem. První část práce byla provedena v letech 1998-2000,druhá část probíhá dodnes.Laboratoř Národní referenční laboratoře Státního zdravotního ústavu v Praze rozšířila výzkum promořenosti naší zvěře ve spolupráci se Státním veterinárním ústavem v Praze v rámci uděleného Grantu IGA.

Historie a současný stav.

Ve Spojených státech amerických byla v roce 1982 popsána Willi Burgdorferem příčinná souvislost mezi nově izolovaným druhem spirochéty z klíštěte *Ixodes dammini* a dětským kloubním onemocněním -epidemickou juvenilní oligoartritidou v městě Old Lyme ve státě Connecticut .V roce 1984 byla nová spirochéta popsána skupinou vědců vedených R.C.Johnsonem a označena jako nový druh Borrelia burgdorferi Toto onemocnění se zde vyskytovalo na území Spojených států amerických nejméně od začátku osmdesátých let minulého století..Roku 1977 bylo onemocnění klinicky popsáno .Následné studie nalezly další

klinické formy postihující mimo klouby i nervový systém,srdce a kůži, vzácně i jiné orgány. Sympozium odborníků v roce 1985 se dohodlo,že klinické projevy způsobené infekcí *Borrelia burgdorferi* se budou označovat jako lymeská borrelióza.Následný výzkum objevil i jinde na světě další druhy rodu *Borrelia* které mohou způsobovat stejné onemocnění . Všechny uvedené druhy byly zahrnuty do skupiny druhů *Borrelia burgdorferi sensu lato* (tj. v širším slova smyslu).Do skupiny patří mimo původní americký druh označený *Borrelia burgdorferi sensu stricto* -(tj. v užším slova smyslu), i ryze evropské druhy *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii, Borrelia valaisiana,Borrelia lusitaniae*.Dalšími druhy uvedené skupině jsou asijské druhy *Borrelia japonica, Borrelia tanuki a Borrelia turdi,* ale i další americké druhy *Borrelia bissettii, Borrelia lonestari a Borrelia andersonii.* Průkazný vztah k onemocnění lymeskou borreliózou mají genomospeciés *Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia afzelii, Borrelia garinii ,Borrelia japonica* a *Borrelia valaisiana*.U ostatních ze skupiny *sensu lato* není ještě otázka jejich patogenity uzavřena.Lymeská borrelióza je rozšířena prakticky po všech kontinentech světa výjimkou snad zůstává Antarktida.

Role živočichů .

Již při průkazu o přenosu *Borrelia burgdorferi* klíštětem se uvažovalo o rezervoárech této spirochéty ve volně žijících zvířatech. Jen u evropského klíštěte *Ixodes ricinus* se uvádí,že saje na více než dvoustech druzích zvířat Průkaz spirochéty způsobující u lidí lymeskou borreliózu se podařil u řady volně žijících savců i ptáků .Mimo izolace *Borrelia burgdorferi* z klíšťat, uvádí se ojediněle i nález této bakterie i u jiného krevsajícího hmyzu.muchničky,*(Simulidae)*,kočičí blecha (*Ctenocephalides felis)*ovádi (*Tabanidae*).Patrně jen u klíšťat dochází k pomnožení borrélií v jejich tkáních a proto se nalézají v jejich tělech v e velkém množství.To zvyšuje

pravděpodobnost průniku borrelií do tkání hostitele.U amerického klíštěte *Ixodes scapularis* a

Ixodes pacifikus bylo zjištěno že v infikovaných larvách je průměrný počet 16 000 borelií, v přisátých nymfách 55 000..Během sání nymf klesl počet borrelií na polovinu původního počtu v souvislosti s nákazou hostitele. To znamená,že od jednoho klíštěte dostává hostitel dávku kolem 20 000 borrelií což je jistě dostatečná infekční dávka.Věrohodnost přenosu u jiného krevsajícího hmyzu kde takové pomnožení borrelií nebylo zaznamenáno je i z tohoto hlediska problematická. Průkaz bakterie nebo její DNA z homogenátu tohoto hmyzu není důvodem považovat jej za přenašeče (vektor)původců lymeské borreliózy.Mnohé nálezy původců lymeské borreliózy u zvířat mají často slabá místa.Příkladem je průkaz původce lymeské borreliózy u 100% potkanů v městských parcích.Například v tkáni ušních boltců potkanů v Magdeburku byla prokazována DNA *Borrelia burgdorferi*..poté když těla potkanů byla máčena ve vodě až do doby pokud je neopustila všechna klíšťata.Když vezmeme v úvahu vlastní zkušenost s izolací specifické DNA *Borrrelia burgdorferi* v odpadních vodách a metodiku autorů můžeme mít pochybnost o hodnotě takového průkazu.Zároveň je třeba opatrně přistupovat k izolacím DNA *Borrelia burgdorferi* u vodních ptáků a živočichů žijících kolem vody.

.

Metodika.

V úvodu jsme uvedli že nás zajímala především skupina lovné zvěře z vymezeného území,které je shodné s místem výkonu práva myslivosti členů jednoho mysliveckého sdružení.Museli jsme se podřídit ustanovením zákona o myslivosti a tak jsme vzorky získávali z řádného odlovu v době povoleného lovu.Od roku 1995 jsme měli jedinečnou možnost při retrospektivní studii vyšetření desetitisíce vzorků lidských tkání a tělních tekutin, vyšetřit stejnými metodami i stovky zvířecích tkání.Navíc ve specializované Národní referenční laboratoři pro lymeskou borreliózu CEM v Praze jsme měli možnost srovnat i využít další metody průkazu přítomnosti agens lymeské borreliózy.Jednalo se především o možnost kultivace,přímého průkazu imunoelektroopticky a

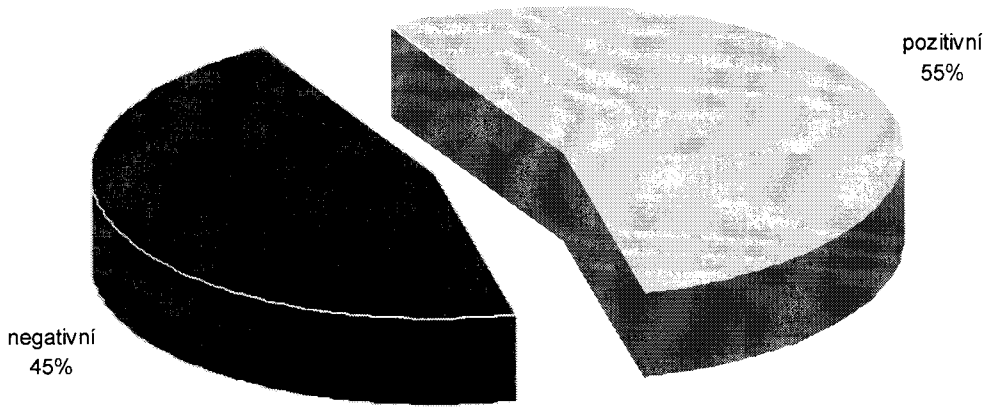
izolaci geonomové i plastidové deoxyribonukleové kyseliny a vyšetření vzorků pomoc polymerázové řetězové reakce (PCR). Velmi cenná byla též možnost identifikovat produkt PCR hybridizací a sekvenací. U vyšetření skupiny myslivců jsme využili průkazu specifických protilátek v séru pomocí ELISA a imunoblotem Přímý průkaz mikroskopicky je možný pozorováním nativních preparátů v zástinu , za pomoci imunofluorescence ielektronopticky.stříbřením nebo negativním barvením.*Borrelia burgdorferi* se velmi špatně barví Pouze 24 hodinové barvení zředěným Giemsovým barvivem dává přijatelné výsledky.U imunofluorescence jsou problémy se specifitou. Imunoelektronoptické metody jsou pro rutinní vyšetření tkání zdlouhavé a náročné.Metoda identifikace borrelií mikroskopií v zástinu dobře identifikuje podle tvaru a pohybu tuto bakterii.Bohužel neodliší velmi podobné a hojné druhy nepatogenních spirálovitých bakterií od původců lymeské borreliózy. Kultivace se daří z klíšťat u lidí z biopsií kůže v místě zákusu infikovaného klíštěte.Z lidské krve a dalších tělních tekutin je izolace již obtížnější. Při našich pokusech se ani v jednom případě nepodařila pozitivní kultivace ze savců ani z ptáků.Důvodem zde jistě byl malý počet růstuschopných borrelií v kultivačním BSK mediu.Problémem byla i kontaminace vzorků dalšími druhy bakterií vyskytujících se ve vyšetřovaných tkáních.Většinou se jednalo o nutričně méně náročné ,rychle rostoucí bakterie, které rychle nevhodně změnily kultivační medium. I kdyby se pár pomalu rostoucích borrelií do media dostalo nemělo by šanci v soutěži s kontaminací..Největší část vzorků byla vyšetřena pomocí PCR.Odběru pro toto vyšetření bylo nutné věnovat největší péči.Použitelné byly pouze vzorky tkání z čerstvě ulovených zvířat a odebírané v ohni vyžíhanými nástroji na čistém, hlubokém řezu tkání.Odběr byl prováděn do pufru s ochranou před působením nukleáz,část konzervována zmražením..Izolace byla prováděna komerčně dodávanými soupravami pro izolaci genomové DNA podle protokolu na izolaci bakteriální DNA. I pro vlastní amplifikaci

specifického produktu DNA byl použit postup akreditované laboratoře s využitím komerčních směsí s horkým startem pro zvýšení specifiky omezení možné kontaminace. Pro identifikaci byla vybrána geneticky stabilní část genu 16SrRNA s konfirmací dalšími částmi genomové i plasmidové DNA .K určení genomospeciés jsme používali sety primerů odvozených též z genu 16SrRNA.I při vyšetření vzorků metodou PCR se setkáváme s řadou problémů .Problémem může být u polymerázové řetězové reakce nevhodný výběr identifikovaného genu například pro podobnost se sekvencí DNA koliformních bakterií ,které se hojně vyskytují například v odpadních vodách. Tuto skutečnost jsme měli možnost si sami ověřit při testování specifity používaných primerů pro PCR k identifikaci lymeské borreliózy. Při použití DNA především koliformních bakterií při vyšší koncentraci způsobuje slabou nespecifickou pozitivitu. Jedná se hlavně o DNA sbírkových kmenů rodu *Escherichia,Proteus* a *Pseudomonas.* Vezmeme-li v úvahu,že se někdy k průkazu DNA agens lymeské borreliózy používají kadavery zvířat, na nichž se množí velmi rychle právně koliformní bakterie ,a že zvířata pocházejí navíc z kontaminovaného prostředí může být výsledek nejméně problematický. Sama .vysoká citlivost reakce může ovlivnit vyšší počet falešně pozitivních výsledků. Naopak přítomnost nadbytku inhibitorů reakce PCR v materiálu zase snižuje citlivost reakce.Využili jsme léty vyzkoušené schéma erudované laboratoře při vyšetření PCR, abychom zaručili spolehlivost a reprodukovatelnost výsledků.

Výsledky.

V první etapě jsme vyšetřili na tomto území 153 jedinců patřících k 26 druhům živočichů Srovnání celkových počtů pozitivních výsledků u lovných savců a ptáků jasně ukazuje převahu ve skupině lovných ptáků (47%) .U lovných savců byla DNA *Borrelia burgdorferi sensu lato* byla

Graf č.1.: **Výsledky vyšetření tkání lovné zvěře na přítomnost DNA *Borrelia burgdorferi sensu lato***



pozitivní v 32% vyšetřených vzorků. U myslivců z téhož území bylo provedeno vyšetření krve na přítomnost protilátek proti agens lymeské borreliózy a přímý průkaz specifické DNA pomocí PCR V obou případech byla pozitivity kolem čtyřiceti procent. V kontrolní skupině vybrané ze vzorků pacientů s klinicky nesouvisející diagnózou a z jiné oblasti byla pozitivita necelých 10 procent.Soubor jsme doplnili o vyšetření přisátých klíšťat na kůži myslivců., zde byla nejvyšší pozitivita a to 68 %!V jednom případě jsme obdrželi i klíšťáka *Lipoptoma cervi* který též údajně poštípal jednu osobu. Vyšetřili jsme také krev dalších obratlovců a několika bezobratlých živočichů ve sledované oblasti..Při identifikaci genomspeciés *Borrelia* šedesátišesti pozitivních vzorků jsme konstatovali převahu *Borrelia garinii* (60 %) následovala *Borrelia afzelii* (35 %)a v nejmenší míře byla zastoupena *Borrelia burgdorferi sensu stricto.* (5 %) U vyšetřované skupiny myslivců jednoznačně převažuje *Borrelia garinii* (9 z 14), což je v souhlase s nejčastěji identifikovaným genomospeciés u vyšetřovaných pacientů. Také u přisátých klíšťat ze sledovaného území byl identifikován v absolutní většině genomspeciés *Borrelia garinii* (5 ze

6 pozitivních).

Tabulka č.1: **Vyšetřená lovná zvěř - savci**

Druh	Vyšetřeno	Pozitivní
Capreolus capreolus - srnec	4	1
Lepus europaneus - zajíc	11	2
Sus strofa -prase divoké	11	4
Vulpes vulpes - liška	5	3
Celkem	**31**	**10**

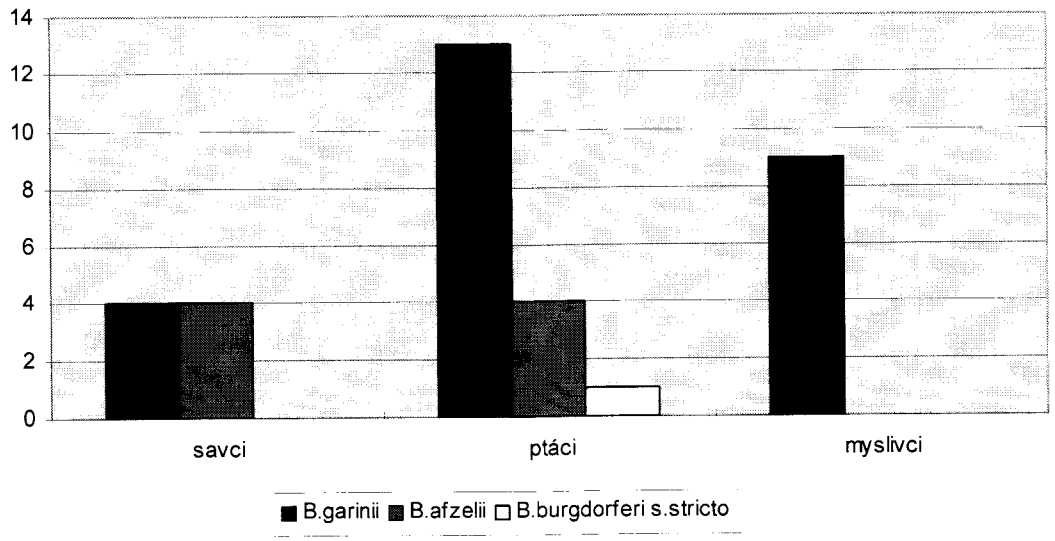
Tabulka č.2: **Vyšetřená lovná zvěř - ptáci**

Druh	Vyšetřeno	Pozitivní
Anas plathyrynchos - kachna divoká	15	8
Columba livia v.domest. - holub domácí zdiv.	4	4
Columba palumbus - holub hřivnáč	4	3
Corvus frugilegus – havran	15	1
Fulica atra - lyska	1	1
Garrulus glandarius - sojka	10	7
Larus ridibundus - racek chechtavý	9	8
Phasianus colchicus - bažant	24	6
Phalacrocorax carbo - kormorán	1	1
Pica pica - straka	3	2
Streptopelia decaocto - hrdlička zahradní	5	2
Celkem	**91**	**43**

Tabulka č.3: **Výsledky vyšetření myslivců**

druh vyšetření	Vyšetřeno	Pozitivní (+)	Negativní (-)	% (+)
Serologické	17	7	10	41
PCR	31	14	17	45
Celkem	**48**	**21**	**27**	**43**

Graf č.:2: **Určený genospeciés Borrelia burgdorferi ze všech pozitivních vzorků**



Zdá se proti předpokladu, že parenterální přenos krví ulovených zvířat je velmi vzácný, je-li vůbec možný.Důvodem bude především malý počet virulentních spirochét v krvi a tělních tekutinách ulovených zvířat.Hlavní úlohu při infikování hrají i u zpracovatelů zvěřiny promořená klíšťata.Jako zajímavost uvádíme nález specifické DNA v povrchové i podzemní vodě a průkaz přítomnosti genomu *Borrelia garinii a afzelii* u klíštěte z entomologické sbírky pocházející z roku 1963 ze stejného území.Je to průkaz toho,že klíšťata šířila u nás původce lymeské borreliózy již dvacet let před uznáním onemocnění za samostatnou nosologickou jednotku.Od roku 1995 též pátráme v materiálu pacientů a zvířat po infekčním agens rodu Anaplasma (dříve Ehrlichia), které též přenášejí klíšťata.S ohledem na rozsah studie budou výsledky samostatným sdělením .

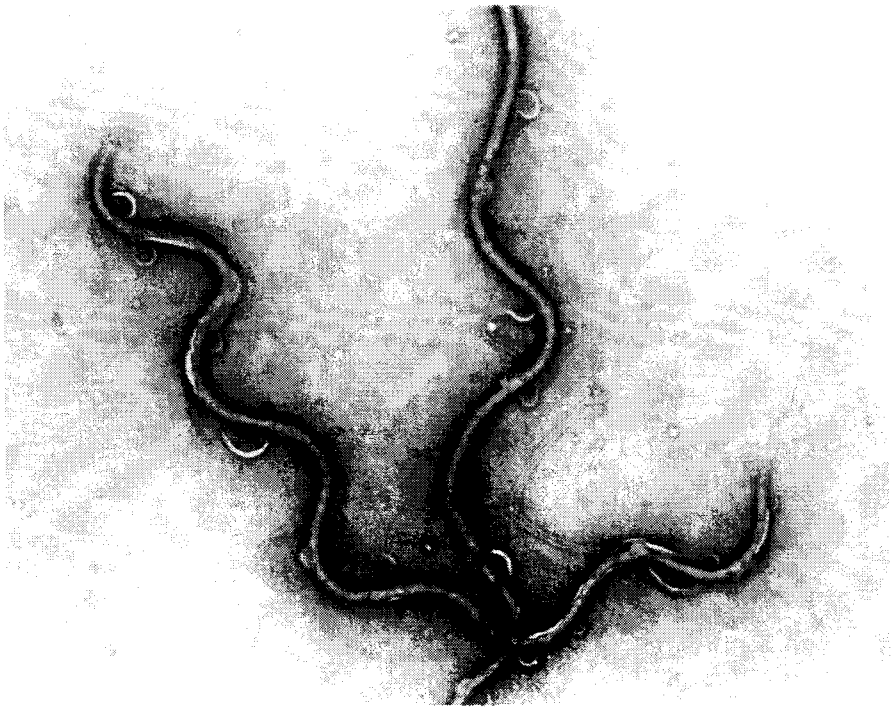
Co dál?

V řádu Spirochaetales jsou zahrnuty různé skupiny spirálovitých a aktivně pohyblivých bakterií. Klasifikace spirálovitých bakterií byla prováděna především na morfologickém podkladě,tím se stalo,že skupina obsahuje mimo tvarově podobné organismy i velmi biologicky odlišné druhy. Jedna čeleď výše uvedeného řádu *Spirochaetaceae* zahrnuje několik rodů

nepatogenních spirochét žijících ve stokách,kontaminované vodě ,v bahně a v písku.Druhá čeleď *Treponemataceae* obsahuje rody *Treponema, Leptospira* a *Borrelia* .Treponemy i leptospiry jsou organismy jak primárně saprofytické, tak primárně patogenní pro člověka i zvířata. Rod *Borrelia* zahrnuje řadu patogenních druhů pro člověka i zvířata.Přesto některé druhy jsou součástí normální bakteriální flóry člověka. Příkladem může být *Borrelia refringens* nalézaná u člověka na patrových mandlích,v ústech ,v dolní části zažívacího traktu , i ve stolici . *Borrelia burgdorferi* je podobně jako ostatní druhy rodu velmi starobylý organismus.Tento druh obsahuje čtyřikrát menší množství DNA v chromozómu než má běžná střevní bakterie *Escherichia coli* Navíc má vzácně se vyskytující jeden lineární chromozom.Skladba stěny *Borrelie burgdorferi* nese archaické znaky.Zdá se,že máme co do činění s organismem,který prošel dlouhým vývojem a je velmi dobře adaptován na život v tkáních hostitele.Při dlouholetém vyšetřovaní jsme si všimli opakujících se cyklů při průkazu tohoto organismu u lidí.Předpokládáme,že by mohla *Borrelia burgdorferi* prodělávat část životního cyklu v lidském a zvířecím organismu.Studiu této problematiky bude třeba věnovat větší pozornost.Stejně tak bude nutné více odlišovat v rámci druhu patogenní a nepatogenní sérotypy u lidí i u zvířat.Nakonec bude nutné objasnit nález DNA patogenních borrelií v povrchových a spodních vodách.

Obraz č.1.***Borrelia garinii***
Kmen M 192 izolovaný z mozkomíšního moku člověka,kultivace v BSK mediu

Snímek z elektronového mikroskopu , zvětšení 20 000 x
Autor Dr.D.Hulínská



Souhrn.

Na území 2200 hektarů v příměstské oblasti byl sledován výskyt původce lymeské borreliózy u zvířat(26 druhů 153 jedinců), především u lovné zvěře a u myslivců (31 lidí) zde vykonávajících právo myslivosti.U zvířat byla prokázána v 55 % přítomnost DNA Borrelia burgdorferi sensu lato. Z 60 pozitivních vzorků u kterých se podařila identifikace genospeciés patřilo 60% k Borrelia garinii, 35 % k Borrelia afzelii a jen 5% k Borrelia burgdorferi sensu stricto.U myslivců se podařilo prokázat v 41 % přítomnost specifických protilátek a v 45 % přítomnost borreliové DNA.Během sledovaného období se na toto onemocnění léčili dva lidé ze sledované skupiny.U dalších dvou bylo podezření na chronické projevy lymeské borreliózy. U myslivců se podařilo prokázat pouze Borrelia garinii.Ze sbírkového preparátu klíštěte sebraného ve sledovaném území v roce 1963 se podařila prokázat DNA *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Nepodařilo se prokázat že dochází k parenterálnímu přenosu lymeské borreliózy při zpracování zvěřiny průnikem oděrkami v kůži rukou.