

West Nile virus (linie 2) v komárech na jižní Moravě – očekávání prvních autochtonních lidských případů

Rudolf I.^{1,2}, Blažejová H.¹, Šebesta O.^{1,3}, Mendel J.¹, Peško J.¹, Betášová L.¹, Straková P.¹, Šikutová S.¹, Hubálek Z.^{1,2}

¹Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Květná 8, Brno

²Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno

³Krajská hygienická stanice Jihomoravského kraje se sídlem v Brně

SOUHRN

V roce 2015 a 2016 jsme opakovaně detegovali neuroinvasivní linii 2 viru West Nile (WNV-2) v komárech *Culex modestus* a *Cx. pipiens* v oblasti rybníků Lednicko-valtického areálu. Tato linie je geneticky shodná s WNV, který byl na daném území poprvé zachycen při rozsáhlém monitorování v roce 2013 a také s kmeny WNV cirkulujícími v současnosti v jižní a střední Evropě. Opakovaný záchyt WNV v komárech

naznačuje setrvalý výskyt viru v dané lokalitě a současně varuje infekcionisty a epidemiology před možnými lidskými případy nebo dokonce epidemií západonilské horečky v tomto regionu.

KLÍČOVÁ SLOVA

West Nile virus – arboviry – emergentní zoonózy – komáři – *Culex pipiens* – *Culex modestus*

ABSTRACT

Rudolf I., Blažejová H., Šebesta O., Mendel J., Peško J., Betášová L., Straková P., Šikutová S., Hubálek Z.: West Nile virus (lineage 2) in mosquitoes in southern Moravia – awaiting the first autochthonous human cases

Here we report repeated detection of lineage 2 West Nile virus (WNV-2) from *Culex modestus* and *Cx. pipiens* mosquitoes collected at fishponds in the Lednice-Valtice Area during the mosquito seasons 2015 and 2016. The WNV strains recovered share genetic homology with WNV strains isolated during an

extensive monitoring in 2013 as well as with strains circulating in southern and central Europe at the same time. Repeated detection of WNV indicates its establishment in the area and also warns infection specialists and epidemiologists about possible emergence of human cases or even outbreaks of West Nile fever in the region.

KEYWORDS

West Nile virus – arboviruses – emerging zoonoses – mosquitoes – *Culex pipiens* – *Culex modestus*

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 67, 2018, č. 1, s. 42–44

ÚVOD

West Nile virus (WNV; *Flavivirus*, *Flaviviridae*) je původně africký arbovirus, dnes již s kosmopolitním rozšířením. V přírodě cirkuluje mezi ptáky (hostiteli – amplifikátory) a ornitofilními komáři, v Evropě především druhů *Culex pipiens* a *Cx. modestus*. Koně a lidé jsou tzv. konečnými („dead-end“) hostiteli viru a WNV je u nich původcem tzv. západonilské horečky. Infekce tímto virem probíhá asi v 80 % případů asymptomaticky, ve 20–40 % případů je charakterizována horečnatým onemocněním připomínajícím chřipku a v 1–2 % případů se může vyvinout v neuroinvasivní onemocnění provázené meningitidou, encefalitidou nebo dokonce paralýzami [1].

V Evropě bylo v posledních dekáдах zaznamenáno několik významných WNV epidemií, např. v Rumunsku (1996), Itálii (1998) a Rusku (1999). Od roku 2008 jsme svědky šíření nebezpečné neuroinvasivní linie 2 (WNV-2) především v jižní a střední Evropě, kde byly zaznamenány epidemie v Maďarsku (2007), Řecku (2010) nebo Srbsku (2012) [2].

V České republice byl WNV poprvé izolován, respektive jeho méně virulentní linie 3 (WNV-3; Rabensburg), po

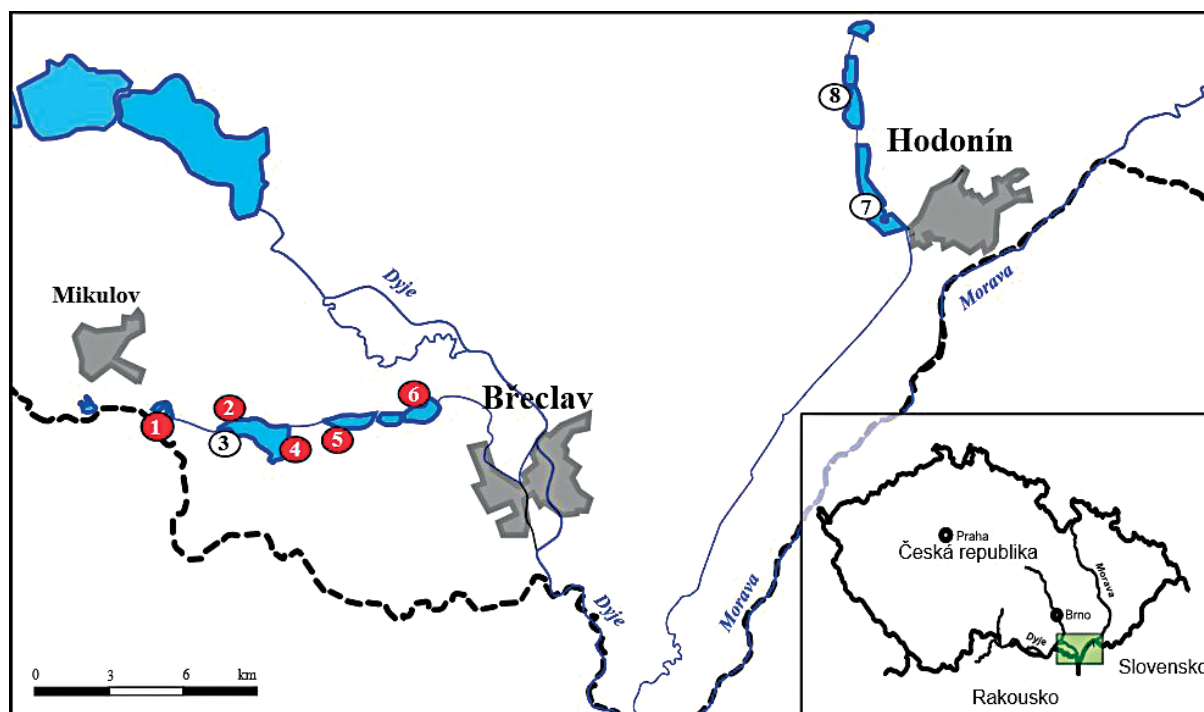
povodních v roce 1997 z komárů *Cx. pipiens* na Břeclavsku a současně zde bylo zaznamenáno několik autochtonních infekcí západonilské horečky u lidí, pravděpodobně způsobené linií 1 (WNV-1), která cirkulovala v Evropě [3, 4]. Byly detegovány specifické WNV protilátky u divokého ptactva [5, 6] a také u koní [7]. Velmi důležitý byl ovšem první záchyt WNV-2 v roce 2013 u komárů *Cx. modestus* na rybnících Lednicko-valtického areálu [8].

Cílem naší studie bylo vyšetřit dostatečné množství komárů na zasažených lokalitách Jihomoravského kraje také v následujícím období (sezony 2015 a 2016) a zhodnotit míru rizika nákazy pro obyvatele regionu.

MATERIÁL A METODY

Studijní plochy

Komáři byli v roce 2015 odchyceni na lokalitách „Nový“, „Nesyt-Včelínek“, „Hodonín“, „Mutěnice“ a „Mlýnský“. Tři ze sledovaných lokalit byly v roce 2015 WNV negativní („Nesyt-Včelínek“, „Hodonín“, „Mutěnice“), proto jsme je v následujícím roce nahradili lokalitami novými („Nesyt-pozorovatelná 1“, „Nesyt-pozorovatelná 2“, „Hlohovecký“).



Obr. 1. Studijní plochy odchyty komárů v roce 2015 a 2016 s vyznačením lokalit se záchytem WNV (červeně)
Vysvětlivky: 1-‘Nový’, 2-‘Nesyt-pozorovatelna 1’, 3-‘Nesyt-Včelínek’, 4-‘Nesyt-pozorovatelna 2’, 5-‘Hlohovecký’, 6-‘Mlýnský’, 7-‘Hodonín’, 8-‘Mutěnice’.

Figure 1. Mosquito collections (2015, 2016). WNV positive study sites are highlighted in red colour
Legend: 1-‘Nový’, 2-‘Nesyt-pozorovatelna 1’, 3-‘Nesyt-Včelínek’, 4-‘Nesyt-pozorovatelna 2’, 5-‘Hlohovecký’, 6-‘Mlýnský’, 7-‘Hodonín’, 8-‘Mutěnice’.

Všechny studijní plochy byly situovány v oblasti velkých rybníků Lednicko-valtického areálu, které slouží mj. jako vhodná stanoviště pro vodní ptactvo (obr. 1). Pro přesnější geografický a botanicko-zoologický popis lokalit odkazujeme na naše starší práce [8, 9].

Sběr a determinace komárů

Komáři byli odchyceni pomocí speciálních EVS pastí (Bioquip, San Domingo, USA) doplněných suchým ledem působícím jako atraktant. Pastí byly exponovány vždy dvě následné noci v týdenních intervalech od července do konce září v letech 2015 a 2016. Odchycení komáři byli na místě zchlazeni a transportováni do laboratoře, kde byli uchováni v hlubokomrazicím boxu (-60 °C) do dalšího zpracování. Poté byli na chladicím stolku pomocí stereomikroskopu identifikováni do druhů [10], roztrženi do směsí obsahujících 1–50 jedinců (odpovídající datu, lokalitě a druhu komára), homogenizováni v PBS (pH 7,4) doplněným 0,4% hovězím sérovým albuminem (BSA) a centrifugováni. Supernatant byl využit pro následné molekulární analýzy.

Extrakce virové RNA a molekulární identifikace arbovirů

Virová RNA byla izolována ze 140 µl komářského homogenátu komerčním kitem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Konvenční PCR byla provedena s využitím kitu One-step RT-PCR kitu (Qiagen, Hilden, Německo) a s generickými primery zacílenými do oblasti NS5 genu (RNA polymeráza) flavivirů [11].

Positivní vzorky byly sekvenovány podle Sangera a sekvence poté vyhodnoceny pomocí bioinformatických nástrojů [8].

VÝSLEDKY A DISKUSE

V roce 2015 a 2016 jsme se zaměřili na monitorování komárů v oblasti jižní Moravy, kde jsou díky klimatu nejvhodnější podmínky pro jejich přemnožení a tím také nejvyšší riziko pro šíření nálezů jimi přenášených. Vyšetřili jsme celkem 42 740 komárů *Cx. modestus* a *Cx. pipiens* v oblasti rybníků Lednicko-valtického areálu a Hodonínska na přítomnost flavivirů (tab. 1). V roce 2015 jsme zachytili celkem 21 WNV pozitivních směsí s minimální prevalencí 0,098 % (z 21 401 vyšetřených komárů) na 2 lokalitách (‘Nový’ a ‘Mlýnský’), v následujícím roce 12 pozitivních WNV směsí s minimální prevalencí 0,056 % (z 21 339 vyšetřených komárů) na 5 lokalitách (‘Nový’, ‘Nesyt-pozorovatelna 1’, ‘Nesyt-pozorovatelna 2’, ‘Hlohovecký’ a ‘Mlýnský’). Sekvenovaný WNV úsek (250 bp) všech detegovaných kmenů byl geneticky shodný s WNV izolovaným v roce 2013 ve stejné oblasti a velmi podobný WNV-2 kmenům cirkulujícím v současnosti v Rakousku, Itálii, Maďarsku nebo Srbsku [8].

Západonilská horečka je dnes z pohledu veřejného zdraví jedním z nejdůležitějších komárů přenosných onemocnění v Evropě. Na rozdíl od původní studie v roce 2013 se nám podařilo zachytit WNV také v komárech druhu *Cx. pipiens*, což je epidemiologicky závažnější zjištění, pro-

KRÁTKÉ SDĚLENÍ

Tabulka 1. Prevalence WNV v komárech *Culex modestus* a *Cx. pipiens* na studijních plochách (2015, 2016)
Table 1. Minimal prevalence of WNV in *Culex modestus* and *Cx. pipiens* mosquitoes on study sites (2015, 2016).

Číslo lokality	Název lokality	Sezona 2015		Sezona 2016	
		<i>Culex modestus</i>	<i>Culex pipiens</i>	<i>Culex modestus</i>	<i>Culex pipiens</i>
1	„Nový“	9560/192/18 ^a	146/3/0	1891/38/2	262/3/2
2	„Nesyt-pozorovatelná 1“	N	N	4063/83/4	92/2/0
3	„Nesyt-Včelínek“	1074/22/0	47/1/0	N	N
4	„Nesyt-pozorovatelná 2“	N	N	2060/42/1	23/1/0
5	„Hlohovecký“	N	N	2340/49/1	576/11/0
6	„Mlýnský“	9827/198/3	127/3/0	9748/193/2	284/8/0
7	„Hodonín“	448/10/0	12/1/0	N	N
8	„Mutěnice“	150/3/0	10/1/0	N	N

Legenda: ^apočet komárů/počet směsí/počet pozitivních směsí; N – netestováno
 Legend: ^anumber of mosquitoes/number of pools/number of positive pools; N – not tested

tože na rozdíl od druhu *Cx. modestus*, který je striktně vázaný na rákosinný biotop, druh *Cx. pipiens* se běžně vyskytuje i v urbánním biotopu, a dokonce zde může přezimovat [10]. V naší studii jsme potvrdili setrvalý výskyt WNV v komárech v oblasti jižní Moravy, a tím i zvýšené riziko nákazy západonilskou horečkou, zejména při přemnožení komáří populace po vydatných deštích či povodních podobně jako v roce 1997 na Břeclavsku nebo v roce 2012 při epidemii v Srbsku [12]. Nelze zcela opomenout ani fakt, že Lednicko-valtický areál představuje převážně v letních měsících významnou rekreační a památkovou oblast, a tudíž lze zde předpokládat zvýšenou návštěvnost turistů. Tato studie je současně upozorněním pro infekcionisty a praktické lékaře v ohniscích možného výskytu WNV, kteří by při diferenciální diagnostice letních horečnatých stavů a meningitid měli brát v úvahu i možnou nákazu tímto pro nás dosud exotickým virem a také pro epidemiology a pracovníky hygienických stanic, kteří by WNV měli zařadit do plánování odhadu rizik v oblasti komáry přenosných nákaz [13].

LITERATURA

- Hubálek Z, Rudolf I. Microbial Zoonoses and Saprozooses. Dordrecht: Springer; 2011.
- Gossner CM, Marrama L, Carson M, et al. West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. Eurosurveill 2017;22:10–19.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z. West Nile fever in Czechland. Emerg Infect Dis 1999; 5:594–595.
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, et al. Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. Emerg Infect Dis 2005;1:225–231.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z, et al. Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). Vector-borne and Zoonotic Dis 2008;8:659–666.
- Straková P, Šikutová S, Jedličková P, et al. The Common Coot as sentinel species for the presence of West Nile and Usutu flaviviruses in Central Europe. Res Vet Sci 2015;102:159–161.

- Sedláčková K, Zelená H, Křivda V, et al. Surveillance západonilské horečky u koní v České republice v letech 2011–2013. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2014;63:307–311.
- Rudolf I, Bakonyi T, Šebesta O, et al. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? Euro Surveill 2014;19(3):pii=20867.
- Šebesta O, Gelbič I, Minář J. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of the Lower Dyje River Basin (Podjij) at the Czech–Austrian border. Cent Eur J Biol 2012;7:288–298.
- Becker N, Petrič D, Zgomba M, et al. Mosquitoes and their control. Heidelberg: Springer; 2010.
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, et al. Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. J Clin Microbiol 2001;39:1922–1927.
- Popović N, Milošević B, Urošević A, et al. Outbreak of West Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. Euro Surveill 2013;18(43):pii=20613.
- Vlčková J, Rupeš V, Horáková D, et al. Rizika šíření viru západonilské horečky v České republice. Epidemiol Mikrobiol Imunol 2015;64:80–86.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena regionálním projektem Akademie věd České republiky (R200931601) ve spolupráci s Jihomoravským krajem a městem Břeclav a současně standartním projektem GAČR (16-20054S).

Do redakce došlo 8. 9. 2017.

Adresa pro korespondenci:

doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.
 Klášterní 212
 691 42 Valtice
 e-mail: rudolf@ivb.cz