

Virus západonilské horečky (linie 2) zjištěn v komárech *Culex modestus* na Třeboňsku

West Nile virus (lineage 2) detected in mosquitoes Culex modestus in the Třeboň area (South Bohemia)

František Rettich, Kateřina Imrichová, Ivo Rudolf, Lenka Betášová, Jan Mendel, Zdeněk Hubálek, Silvie Šikutová

Souhrn • Summary

V roce 2018 jsme poprvé detekovali neuroinvasivní linii 2 viru West Nile (WNV-2) v komárech *Culex modestus* v oblasti rybníků Velký Tisý u Lomnice nad Lužnicí v jižních Čechách. Celkem bylo vyšetřeno 5816 komárů *Cx. modestus* ve 116 směsích. RNA viru West Nile byla detekována v jedné z nich. Zachycený virus je geneticky shodný s kmeny WNV, které v současnosti cirkulují na jižní Moravě, a rovněž s kmeny tohoto viru způsobujícími epidemie ve střední a jižní Evropě. Výsledky naznačují nezbytnost entomologické surveillancce patogenních arbovirů i v lokalitách, kde dosud nebyl WNV prokázán. Jihočeský region se tak po jižní Moravě stává další oblastí s možným rizikem autochtonního výskytu onemocnění západonilskou horečkou.

Here we report the first detection of lineage 2 of West Nile virus (WNV-2) from Culex modestus mosquitoes collected in the fishpond area situated in the Třeboň Basin in South Bohemia during mosquito season 2018. A total of 5816 mosquito females in 116 pools were investigated, and WNV RNA was detected in one pool. The WNV strain shares genetic homology with other WNV strains isolated in South Moravia as well as with viral strains causing outbreaks in southern and central Europe. The results highlight the need for entomological surveillance of WNV even in areas not yet affected (WNV-free areas). The South Bohemian Region, similarly to South Moravia, is becoming a potential risk zone for an autochthonous occurrence of West Nile fever in the Czech Republic.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2019; 28(2): 64–66

Klíčová slova: West Nile virus, arboviry, emergentní zoonózy, komáři, Jižní Čechy, *Culex modestus*

Keywords: West Nile virus, arboviruses, emerging zoonoses, mosquitoes, Jižní Čechy, South Bohemia, *Culex modestus*

ÚVOD

Původně africký arbovirus West Nile (WNV; *Flavivirus, Flaviviridae*) je v současnosti již kosmopolitně rozšířený. V přírodě cirkuluje mezi ptáky (hostiteli) a ornitofilními komáři, v Evropě jde především o druhy *Culex pipiens* a *Cx. modestus*. Lidé a koně jsou konečnými hostiteli viru, který u nich způsobuje tzv. západonilskou horečku. U lidí infekce tímto virem probíhá asi v 80 % případů asymptomaticky, ve 20–40 % případů je však charakterizována horečnatým onemocněním doprovázeným bolestmi hlavy, svalů, kloubů, nauzeou, faryngitidou, lymfadenitidou a někdy vyrážkou (10 % případů), v 1–2 % případů se může vyvinout dokonce neuroinvasivní onemocnění provázené meningitidou, encefalitidou nebo paralýzami [1, 5].

Od roku 2004 se především jižní a střední Evropou šíří nebezpečná neuroinvasivní linie 2 viru (WNV-2) [2]. V České republice byla poprvé po povodních v roce 1997 na Břeclavsku izolována z komárů *Cx. pipiens* méně

virulentní linie viru 3 (WNV-3; Rabensburg), současně zde bylo zaznamenáno několik autochtonních infekcí západonilské horečky u lidí, pravděpodobně způsobené linií 1 (WNV-1), která v tomto období cirkulovala v Evropě [3,4]. Přelomovým nálezem byl záchyt WNV-2 v roce 2013 u komárů *Cx. modestus* na rybnících Lednicko-valtického areálu [5] a také následný záchyt WNV u komárů *Cx. pipiens*, který z hlediska přenosu představuje vyšší riziko převážně v urbánním biotopu. V září a říjnu 2018 byly zaznamenány první autochtonní lidské případy západonilské horečky v jihomoravském regionu. Česká republika se tak přiřazuje k zemím s endemickým výskytem tohoto dříve exotického onemocnění [6, 7].

Protože jihočeský a jihomoravský region jsou svými geograficko-klimatickými podmínkami velmi podobné, včetně hojného výskytu komárů, bylo cílem naší studie provést monitoring komárů a virů jimi přenášených v severní části Třeboňské pánve, a posoudit tak možné riziko přenosu WNV i v tomto regionu České republiky.

MATERIÁL A METODY

Studijní plochy

Samice komárů byly v roce 2018 odchytávány v litorálních biotopech s porosty rákosu (*Phragmites australis*) rybníků Velký a Malý Tisý, Služebný, Velký Dubovec,

Tabulka 1: Počty druhů komárů odchytených v rákosinách rybníků na Třeboňsku roku 2018

Druh	červen	červenec	srpen	září	celkem
<i>Culex modestus</i>	1 210	14 578	6 477	2 477	24 742
<i>Cx. pipiens/torrentium</i>	879	659	206	5	1 749
<i>Anopheles maculipennis s.l.</i>	292	141	210	3	646
<i>Anopheles. hyrcanus</i>	1	0	6	0	7
<i>Culiseta annulata</i>	11	24	10	1	46
<i>Coqueilletidia richiardii</i>	112	162	3	4	281
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	1	3	11	2	17
<i>Aedes spp.</i>	1 356	302	67	2	1 727
Celkem odchyteno	3 862	15 869	6 990	2 494	29 215

Koclířov a Černičný nalézajících se jižně od Lomnice nad Lužnicí. Oblast leží ve významné národní přírodní rezervaci (NPR) Velký a Malý Tisý na západním okraji CHKO Třeboňsko. Jde o významnou ptačí rezervaci, která slouží jako hnízdiště mnoha druhů ptáků i shromaždiště migrujících druhů.

Sběr a determinace komárů

Samice komárů byly odchyteny pomocí elektricky poháněných EVS pastí s CO₂ jako atraktantem. Pasti byly exponovány v pravidelných intervalech od 12. června do 21. září 2018 a v našem skrínungu jsme se zaměřili na odchyt druhu *Cx. modestus*. Tento druh se hojně vyskytuje v rákosinách. V evropských podmínkách je ideálním vektorem WNV – saje na ptácích i lidech [5]. Pasti byly zavěšeny na dřevěných trojnožkách ve výšce 50–70 cm nad hladinou vody. Zachycené samice komárů byly odebírány po 4 hodinách při expozici pastí ve dne (od 8.00 do 20.00) a po 12 hodinách při expozici v noci (20.00–8.00). Pro molekulární analýzy byly selektovány vzorky ze srpna a září 2018, tedy z období nejvyšší incidence lidských případů. Odchytení komáři byli na místě zchlazeni a transportováni do laboratoře, kde byli uchováni v hluboko mrazicím boxu (–60 °C) do dalšího zpracování. Poté byli pomocí stereolupy identifikováni do druhů, roztrženi do směsí obsahujících 1–50 jedinců (odpovídající datu, lokalitě, druhu komáru), homogenizováni v PBS (pH 7,4) doplněným 0,4% hovězím sérovým albuminem (BSA) a centrifugováni. Supernatant byl využit pro následné molekulární analýzy [5].

Extrakce virové RNA a molekulární identifikace WNV

QIAamp Viral RNA Mini Kit. Konvenční PCR byla provedena s využitím kitu One-step RT-PCR kitu a se specifickými primery zacílenými do oblasti genu pro obalový protein WNV. Pozitivní vzorky byly sekvenovány dle Sangera a sekvence poté vyhodnoceny pomocí bioinformatických nástrojů [5].

VÝSLEDKY A DISKUSE

V roce 2018 bylo odchyteno celkem 29 215 samic komárů. *Culex modestus* byl zastoupen v 84,7 % sběrů, *Cx. pipiens* v 6,0 % sběrů a *Anopheles maculipennis s.l.* v 2,2 % sběrů (tabulka 1). Dosud bylo celkem molekulárně vyšetřeno 5 816 komárů druhu *Cx. modestus/torrentium* ve 116 směsích samic komárů odchytených v době od 13. srpna do 21. září 2018. Pouze jediná směs obsahovala RNA WNV-2 (pozitivní lokalita: Velký Tisý-východ [N 49°4'4,7" E 14°42'25,2"'], sběr: 12. září 2018; 50 samic ve směsi, tabulka 2). Minimální prevalence WNV tedy byla 0,02 % v celém sběru ze všech lokalit. Sekvenací bylo potvrzeno, že se jedná o WNV-2 kmen totožný s kmeny cirkulujícími v jihomoravském regionu i s kmeny, které v současnosti způsobují epidemický výskyt ve střední či jižní Evropě. Nevyšetřené vzorky odchytených dalších druhů komárů, možných přenašečů viru a to *Cx. pipiens* a *Coqueilletidia richardii*, budou vyšetřeny v nejbližší době.

Tabulka 2: Prevalence WNV v komárech *Culex modestus* na studijních plochách (pozitivní plocha je zvýrazněna tučně)

Číslo lokality	Název lokality (rybník)	Počet vyšetřených komárů/ Počet vyšetřených poolů/ Počet pozitivních poolů
1	Velký Tisý-západ	2 203/44/0
2	Velký Tisý-východ	1 786/36/1
3	Služebný	790/16/0
4	Velký Dubovec	582/12/0
5	Koclířov	240/4/0
6	Malý Tisý	125/2/0

Západonilská horečka je dnes z pohledu veřejného zdraví nejdůležitějším komáry přenášeným onemocněním v Evropě. V roce 2018 byl ECDC zaznamenán dosud

nejvyšší počet případů západonilské horečky v Evropě, bylo hlášeno celkem 2083 autochtonních případů z 11 zemí EU: nejvíce z Itálie (576 případů) a z Řecka (311), Celková suma autochtonních infekcí v roce 2018 je vyšší než součet počtu infekcí zaznamenaných za posledních 7 let a statisticky jde až o 7,2násobný nárůst v počtu klinických případů ve srovnání s rokem 2017 [6]. Navíc byly poprvé popsány klinické případy západonilské horečky způsobené WNV-2 linií u lidí na našem území, včetně hlášení jednoho úmrtí. Všechny autochtonní infekce u nás měly dosud svůj původ v jihomoravském regionu.

Komáři v České republice již tedy nepředstavují pouze tzv. „obtížný hmyz“, který v období kalamitních stavů působí nadměrné napadání obyvatelstva a zvířete, ale to, že kromě viru Ťahyňa způsobujícího valtickou horečku mohou přenášet vysoce virulentní linii 2 WNV, proti které není v současnosti dostupné očkování ani cílená antivirová léčba. Současně je nezbytné upozorňovat infektology a praktické lékaře v oblastech možného výskytu WNV, aby při diferenciální diagnostice nejasných letních horečnatých stavů a meningitid brali v úvahu i možnou nákazu tímto pro nás dosud exotickým virem [8].

V naší studii jsme potvrdili výskyt WNV v komárech v oblasti jižních Čech a tím i zvýšené riziko nákazy západonilskou horečkou v nadcházejících sezónách. Jižní Čechy (podobně jako jižní Morava) představují významnou rekreační a památkovou oblast a tudíž tu v letních měsících lze předpokládat zvýšenou návštěvnost turistů spojenou se zvýšeným kontaktem s místní populací komárů. Studie nabádá ke zvýšené entomologické surveillanci WNV i v dalších oblastech s výskytem komárů v letních měsících zvláště v těch oblastech, kde dochází ke zvýšenému kontaktu komárů (přenašečů viru) a divokých (migrujících) vodních ptáků, rezervoárů WNV.

ZAJÍMAVÉ NÁLEZY PRO FAUNU KOMÁRŮ ČR

Během sezony 2018 byly na Třeboňsku zachyceny dva druhy komárů nové pro Čechy. Jedná se o termofilní, původně středomořské komáry *Uranotaenia unguiculata*

a *Anopheles hyrcanus (pseudopictus)*. V případě *An. hyrcanus* se jedná pravděpodobně o nejsevernější výskyt dosud zjištěný v Evropě.

Práce byla podpořena interním grantem SZÚ (MH CZ-DRO, NIPH, 75010330)

LITERATURA

1. Hubálek Z, Rudolf I. *Microbial Zoonoses and Saprinoses*. Dordrecht: Springer; 2011.
2. Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, et al. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health*. 2014; 2: 271.
3. Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z. West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5: 594–595.
4. 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.
5. 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 & Vectors, 2017 area to the North? *Euro Surveill*. 2014; 19(31): pii=20867.
6. ECDC. Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe. 2018, dostupné na <http://ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever>
7. Orlíková H, Špačková M, Liptáková M, et al. Západonilská horečka v Evropě, místní přenos v České republice- aktualizace k 5. říjnu 2018. *Zprávy CEM (SZÚ)*. 2018; 27(9): 222–226
8. Vlčková J, Rupeš V, Horáková D, et al. Rizika šíření viru západonilské horečky v České republice. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*. 2015; 64: 80–86.

RNDr. František Rettich, CSc.

Kateřina Imrichová

Národní referenční laboratoř dezinfekce a deratizace,
CEM, SZÚ

Doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Ing. Lenka Betášová,

Mgr. Jan Mendel, Ph.D.

Prof. RNDr. Zdeněk Hubálek, DrSc.

Mgr. Silvie Šikutová, Ph.D.

Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i, Brno