

Badania nad występowaniem wirusa gorączki Zachodniego Nilu u komarów (Diptera: Culicidae) na wybranych terenach Polski¹

A study on the occurrence of West Nile virus in mosquitoes (Diptera: Culicidae) on the selected areas in Poland

Beata Kubica-Biernat, Wiesława Kruminis-Łozowska, Joanna Stańczak, Stella Cieniuch

Zakład Parazytologii Tropikalnej, Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Powstania Styczniowego 9B, 82-519 Gdynia

Adres do korespondencji: Beata Kubica-Biernat; E-mail: bebe@amg.gda.pl

ABSTRACT. West Nile virus (WNV), the etiologic agent of West Nile Fever (WNF), an emerging infectious disease that lately has been rapidly extending its range of occurrence from Africa to Middle East, and to Asia and Southern Europe. In Europe, cases of isolating WNV from mosquitoes representing four genera have been reported from Romania, Portugal, France, southern Russia and what is the most important, from Poland's neighbouring countries as the Czech Republic, Slovakia and southern Ukraine. These data, as well as human and equine cases in the Czech Republic and Belarus, support hypothesis that WNV has already been present also in Poland, the more so, specific antibodies were detected in the sera of birds collected at the Kampinos and Białowieża Primeval Forests and in human from the vicinity of Białystok. Mosquitoes were collected in 2004–2009 at indoor and outdoor collection sites in districts: Kujawsko-Pomorskie, Mazowieckie, Podlaskie and Warmińsko-Mazurskie. In total 15400 female mosquitoes were collected in the cow sheds and overwintering in the cellars, and from human bait and CO₂ traps. Mosquitoes were sorted by the collecting site, species and sex, and placed in pools of not in more than 50 specimens in special mixture of phenol and chaotropic salts and frozen in –20°C. Altogether, 15400 females were examined. Total RNA were extracted according to protocol of A&A Biotechnology. RT reaction was performed with random primers and 217-nucleotide fragment from the NS5 coding sequence was amplified by heminested PCR. PCR products were analysed on 1.5% agarose gel. The predominant species was *Culex pipiens*, accounting for over 42% of total insects collection. All obtained results were negative. Further investigations are needed.

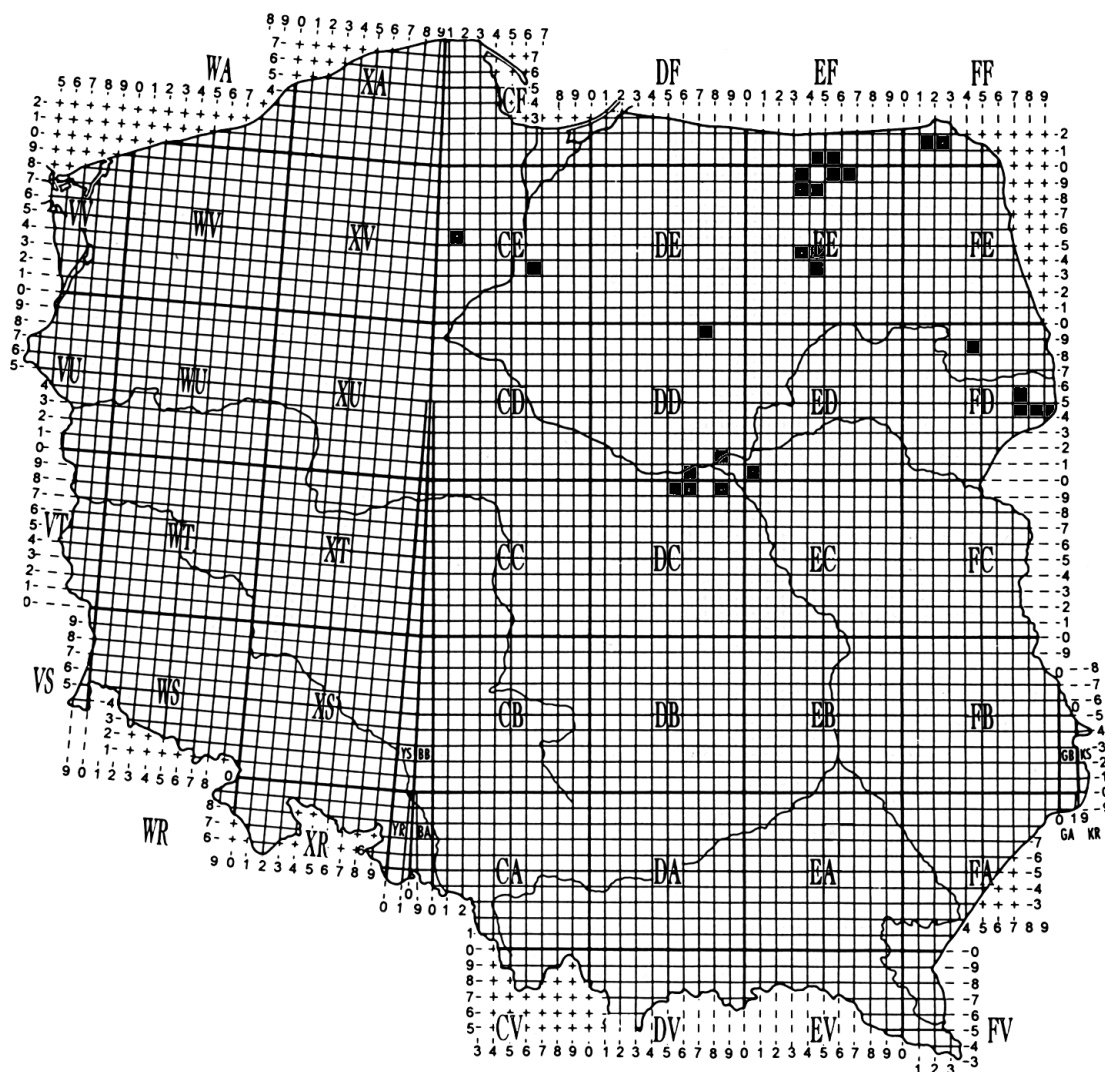
Key words: mosquitoes, WNV, West Nile virus, Poland, RT-PCR

Wstęp

Wirus gorączki Zachodniego Nilu (WNV) to arbowirus z rodzaju *Flavivirus*, należący do rodziny Flaviviridae, blisko spokrewniony z wirusami japońskiego zapalenia mózgu i zapalenia mózgu St. Louis [1]. Po raz pierwszy wyizolowany został z surowicy krwi ludzkiej w prowincji West Nile w Ugandzie w 1937 roku [2], a obecnie szeroko roz-

przestrzeniony jest również w Eurazji i dynamicznie obejmuje nowe obszary w Ameryce Północnej, wykazany też w Australii, pod nazwą Kunjin virus. Wirus gorączki Zachodniego Nilu znany jest w środkowej Europie od ponad 30 lat i wykazywany był w wielu krajach u komarów, migrujących ptaków, koni, a ponadto notowane były zachorowania ludzi z przypadkami śmiertelnymi [3].

¹ Praca finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: projekt nr 2 P04C 130 29



Rys. 1. Stanowiska zbioru komarów
Fig. 1. Mosquito collecting sites

Rezerwuarem wirusa są wodno-błotne lub preferujące środowiska wilgotne ptaki dziko żyjące oraz hodowlane. Wykazano, że WNV przenosi około 135 gatunków ptaków, głównie wędrujących. Ssaki nie odgrywają tak istotnego znaczenia w krążeniu patogenu, tylko u ludzi i koni wykazano wiremę na poziomie umożliwiającym podtrzymanie krążenia wirusa w naturalnym ognisku [3]. U ludzi większość zakażeń (ok. 80%) przebiega bezobjawowo, u pozostałych notuje się występujące nagle objawy grypopodobne. W mniej niż 1% przypadków występują objawy neurologiczne: *meningitis*, *meningoencephalitis* często z wysoką gorączką [4,5]. Pomimo, że ciężki przebieg WNF występuje u zaledwie około 1% chorych, notowana jest aż 5–15% śmiertelność, przede wszystkim u osób z upośledzoną odpowiedzią immunologiczną i w podeszłym wieku [6]. Wirus gorączki Zachodniego Nilu jest przenoszony głównie przez komary (Diptera, Culi-

cidae). Wydaje się, że najważniejszą rolę w transmisji wirusa odgrywają gatunki poligeneracyjne, zimujące w stadium imago (np. *Anopheles* sp., *Culex* sp., *Culiseta* sp.), gdyż jak wykazano, wirus tej gorączki zimuje w ciele komarów, co zwiększa prawdopodobieństwo rozszerzenia się naturalnego ogniska tej choroby [7]. Spośród 46 gatunków komarów, z których na świecie wyizolowano omawianego wirusa, aż 12 występuje w Polsce i są to gatunki pospolite lub występujące plagowo (np. *Culex pipiens*) [8,9].

W przeciwieństwie do Słowacji i Czech, w Polsce jak dotąd nie wyizolowano tego wirusa [10,11]. Na terenach sąsiadujących z Polską, w Czechach, po powodzi i pladze komarów na Morawach w 1997 r., WNV izolowano zarówno z wektorów (*Culex pipiens*) jak i od 13 pacjentów [10]. Izolacji dokonano też na Ukrainie, w graniczącym z Polską obwodzie Zakarpackim [3]. Pojawienie się tego patoge-

Tabela 1. Skład gatunkowy zebranego materiału entomologicznego
Table 1. Species composition of collected insects

Gatunek Species	Wolna przyroda outdoors	Piwnice Indoors (cellars)	Pomieszczenia Indoors (rooms)	Suma (% zbioru) Total (% of collection)
<i>Anopheles (An.) claviger</i> s.l.	1	8	45	54 (<1)
<i>Anopheles (An.) maculipennis</i> s.l.	65	35		100 (<1)
<i>Aedes (Ae.) cinereus</i>	63			63 (<1)
<i>Aedes (Ad.) vexans</i>	1230			1230 (7,9)
<i>Ochlerotatus (Oc.) cantans</i>	3754			3754 (24,3)
<i>Ochlerotatus (Oc.) communis</i>	842			842 (5,4)
<i>Ochlerotatus (Oc.) sticticus</i>	1031			1031 (6,6)
<i>Culex (Cx.) pipiens</i>	444	6004	29	6477 (42,0)
<i>Culiseta (Cs.) annulata</i>	13			13 (<1)
<i>Coquillettidia (Cq.) richiardii</i>	1			1 (<1)
<i>Ochlerotatus</i> sp.	1765		70	1835 (11,9)
Razem/Total	9209	6047	144	15400

na na Słowacji oraz wywołane przez niego zachorowania koni w obwodzie Brzeskim na Białorusi, tuż przy granicy z Polską [12,13] sugerują, że WNV dotarł już do naszego kraju, tym bardziej, że wykazano swoiste przeciwciała dla tego patogena w surowicy wróbla i mazurków, złowionych w okolicach Warszawy [14].

Materiał i metody

Badania terenowe przeprowadzono w latach 2004–2009 na terenie województw: kujawsko-pomorskiego, mazowieckiego, podlaskiego oraz warmińsko-mazurskiego. Komary odławiano na 43 stanowiskach rozlokowanych na powierzchni 27 kwadratów siatki UTM (Rys. 1). Zbierano owady zimujące w piwnicach, nalatujące do pomieszczeń oraz w wolnej przyrodzie. Do zbioru komarów wykorzystano ekshaustory Nabokova-Zeiferta, pułapki CO₂ oraz aspirator elektryczny. Owady zabijano poprzez ich zamrożenie w temperaturze –20°C. Do momentu izolacji RNA materiał przechowywany był w fenozolu (A&A Biotechnology, Polska). Owady sortowano według gatunku, płci, stanowiska i daty zbioru, i badano w pulach liczących maksymalnie do 50 osobników. W badaniach morfologicznych korzystano z klucza do oznaczania komarów Skierskiej [15].

Komary homogenizowano szklanymi perełkami w 2 ml fenozolu (A&A Biotechnology, Polska) za pomocą homogenizatora próbówkowego ST–20

(IKA, Niemcy). Izolację totalnego RNA przeprowadzono za pomocą zestawu Total RNA (A&A Biotechnology, Polska). Uzyskane izolaty RNA przechowywane były do dalszych badań w temp. –80°C. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z zastosowaniem przypadkowych starterów reakcji (Random Primers, Invitrogen) wg Huang i wsp. [16]. Kontrolę dodatnią (K+) stanowił szczep B596 WNV, uzyskany z Instituto de Higiene e Medicina Tropical Universidade Nova de Lisboa w Lizbonie. Do kontroli ujemnej (K–1) użyto destylowanej i dejonizowanej wody, wolnej od RNA-az. Do kontroli ujemnej (K–2) używano RNA wyizolowanego z komarów *Aedes aegypti* pochodzących z własnej hodowli insektaryjnej Zakładu Parazytologii Tropikalnej. Uzyskane w ten sposób cDNA służyło do dalszych badań metodą polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR). Reakcję heminested PCR przeprowadzono stosując opublikowane startery i warunki reakcji [17] specyficzne dla regionu genu NS5 wybranych Flaviviridae z modyfikacją zwiększającą specyficzność w kierunku szczepów WNV [18].

Wyniki i ich omówienie

Pomimo zbioru komarów również w miejscach prawdopodobnego występowania WNV, tj. w Puszczy Białowieskiej, Kampinoskiej, Piskiej (odnotowanie przeciwciał anty-WNV u ptaków) [14,19], w obecnych badaniach nie wykazano wyników pozytywnych. Odłowiono 15400 samic komarów na-

leżących do 10 gatunków i 6 rodzajów (Tabela 1), w tym pięć gatunków było notowanych jako wektory wirusa gorączki Zachodniego Nilu w Europie. Dominował *Culex pipiens* (42% zbioru) – gatunek znany jako najbardziej efektywny wektor WNV [20].

Wcześniej opublikowane badania komarów na obecność WNV przeprowadzone w województwie pomorskim, przede wszystkim hibernujących samic *Cx. pipiens* w Gdańsku, nie wykazały obecności WNV, pomimo sprzyjającej po powodzi rozwojowi WNV struktury fauny w tym mieście [8, 21]. Okazuje się, że wykazanie przypadków zarażenia WNV ludzi tylko w nieznacznym stopniu może przekładać się na detekcję tego patogenu u wektorów. Na przykład w okolicach Wołogrodu zachorowały na gorączkę Zachodniego Nilu 394 osoby, natomiast na przebadanych ponad 9000 komarów omawianego wirusa wykazano jedynie w dwóch pulach liczących do 50 osobników: *Culex pipiens* i *Cx. modestus* [22]. Jedyny opisany przypadek gorączki Zachodniego Nilu w Polsce u człowieka, został zdiagnozowany serologicznie testem ELISA [23], nie można zatem wykluczyć w tym przypadku reakcji krzyżowych z innymi wirusami z rodziny Flaviviridae [24,25]. W świetle uzyskanych wyników, pojawienie się na terenie naszego kraju epidemii gorączki Zachodniego Nilu wydaje się być wątpliwe. Istnieją przesłanki [14,19,23], że w naszym kraju wirus gorączki Zachodniego Nilu występuje i prawdopodobnie mogą pojawiać się pojedyncze przypadki zachorowań ludzi, jednak wystąpienie epidemii wiązałoby się ze znacznym wzrostem temperatury i pojawieniem się komarów w liczebnościach plagowych, jak np. ma to miejsce po powodzi. Sytuacje takie już w Polsce miały miejsce, dlatego też występowanie WNV w wektorach powinno być monitorowane, tym bardziej, iż w przypadku wykrycia tego wirusa, możliwa będzie identyfikacja szczepu.

Podziękowania

Autorzy pragną gorąco podziękować Prof. Aidzie Esteves-Simoes za udostępnienie kontroli dodatniej WNV do badań molekularnych, jak również mgr Elżbiecie Wegner za pomoc w zbiorze materiału.

Literatura

- [1] Murphy F.A., Fauquet D.H.L., Bishop S.A., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. 1995. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. *Archives of Virology* 10 (suppl.): 1–586.
- [2] Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H. 1940. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 20: 471–492.
- [3] Hubálek Z., Halouzka J. 1999. West Nile Fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* 5: 643–650.
- [4] Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S., Gubler D. 2002. West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases* 2: 519–529.
- [5] Klein C., Kimiagar I., Pollak L., Gandelman-Marton R., Itzhaki A., Milo R., Rabey J. M. 2002. Neurological features of West Nile infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *Journal of the Neurological Sciences* 200: 63–66.
- [6] Hayes C. G. 1989. West Nile fever. In: *The arboviruses: epidemiology and ecology*. (Ed. T. P. Monath). V CRC Press, Boca Raton: 59–88.
- [7] Nasci R. S., Gottfried K. L., Burkhalter K. L., Kula-sekera V. L., Lambert A. J., Lanciotti R. S., Hunt A. R., Ryan J. R. 2002. Comparison of vero cell plaque assay, TaqMan reverse transcriptase polymerase chain reaction RNA assay, and VecTest antigen assay for detection of West Nile virus in field-collected mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 18: 294–300.
- [8] Kubica-Biernat B., Kowalska-Ulczyńska B., Stańczak J. 2007. Komary (Diptera: Culicidae) Trójmiasta. W: *Stawonogi. Środowisko, patogeny i żywicieli*. (Red. A. Buczek, Cz. Błaszak). Koliber, Lublin: 61–66.
- [9] Wegner E. 2000. Występowanie komarów (Diptera: Culicidae) – ważnych wektorów chorób ludzi w wybranych miastach Polski. W: *Stawonogi pasożytnicze i alergogenne* (Red. A. Buczek, Cz. Błaszak). Liber, Lublin: 65–72.
- [10] Hubálek Z., Halouzka J., Juricova Z, Sebesta O. 1998. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virologica* 42: 119–120.
- [11] Labuda M. Kožuch O, Gresikova M. 1974. Isolation of West Nile virus from *Aedes cantans* mosquitoes in West Slovakia. *Acta Virologica* 18: 429–433.
- [12] Knap J. P., Kubica-Biernat B. 2003. Czy gorączka Zachodniego Nilu (WNV) dotarła do Polski? Stanowisko zespołu ekspertów powołanych przez Głównego Inspektora Sanitarnego. *Przegląd Epidemiologiczny* 57: 399–404.
- [13] Lvov D. K., Butenko A. M., Gromashevsky V. L., Larichev V. Ph., Gaidamovich S. Y., Vyshehirsky O. I., Zhukov A. N., Lazorenko V. V., Salko V. N., Kovtunov A. I., Galimzyanov K. M., Platonov A. E., Morozova T. N., Khutoretskaya N. V., Shishkina E.

- O., Skvortsova T. M. 2000. Isolation of two strains of West Nile virus during an outbreak in southern Russia, 1999. *Emerging Infectious Diseases* 6: 373–376.
- [14] Juricova Z., Pinowski J., Literak I., Hahm K. H., Romanowski J. 1998. Antibodies to Alphavirus, Flavivirus and Bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian Diseases* 42: 182–185.
- [15] Skierska B. 1977. Klucze do oznaczania owadów Polski. Część XXVIII. Muchówki – Diptera. Zeszyt 9b. Komary – *Culicidae*. PWN, Warszawa.
- [16] Huang C., Slater B., Campbell W. 2001. Detection of arboviral RNA directly from mosquito homogenates by reverse-transcription-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 94: 121–128.
- [17] Scaramozzino N., Crance J-M., Jouan A. 2001. 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. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1922–1927.
- [18] Esteves A., Almeida A. P. G., Galão R. P., Parreira R., Piedade J., Rodrigues J. C., Sousa C. A., Novo M. T. 2005. West Nile virus in southern Portugal, 2004. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 5: 410–413.
- [19] Hubálek Z., Wegner E., Halouzka J., Tryjanowski P., Jerzak L., Šikutova S., Rudolf I., Kruszewicz A. G., Jaworski Z., Włodarczyk R. 2008. Serologic survey of potential host for West Nile virus in Poland. *Viral Immunology* 21: 247–253.
- [20] Zeller H. G., Schüffnecker I. 2004. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and Mediterranean Basin in contrast to its spread in the Americas. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23: 147–156.
- [21] Kubica-Biernat B., Chrzanowska A., Kowalska-Ulczyńska B., Stańczak J., Racewicz M. 2008. Badania nad występowaniem arbowirusów z rodziny Flaviviridae u komarów (Diptera: Culicidae) z terenu województwa pomorskiego. W: *Stawonogi. Oddziaływanie na żywiciela*. (Red. A. Buczek, Cz. Błaszak). Koliber, Lublin: 125–135.
- [22] Fyodorova M. V., Savage H. M., Lopatina J. V., Bulgakova T. A., Ivanitski A. V., Platonova O. V., Platonov A. E. 2006. Evaluation of potential West Nile vectors in Volgograd region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): Species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* 43: 552–563.
- [23] Hermanowska-Szpakowicz T., Grygorczuk S., Kondrusik M., Zajkowska J., Pancewicz S. 2006. Zakażenie wirusem zachodniego Nilu. *Przegląd Epidemiologiczny* 60: 93–98.
- [24] Weingartl H. M., Drebot M. A., Hubálek Z., Halouzka J., Andonova M., Dibernardo A., Cottam-Birt C., Larence J., Marszal P. 2003. Comparison of assays for the detection of West Nile virus antibodies in chicken serum. *Canadian Journal of Veterinary Research* 67: 128–132.
- [25] Hubálek Z., Halouzka J., Juricova Z., Šikutova S., Rudolf J., Honza M., Jankova J., Chytil J., Marec F., Sitko J. 2008. Serologic survey of birds for West Nile Flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 8: 659–666.

Wpłynęło 3 czerwca 2009

Zaakceptowano 5 lipca 2009