

**Uplatněná metodika vznikla za podpory projektu MŠMT 2B08003
Změny biodiversity komárů - vektorů patogenních agens,
v souvislosti se změnami klimatu**



**Zpřesnění a standardizace metodiky
monitoringu výskytu komárů
a postupu pro detekci flavivirů a bunyavirů**

I. Gelbič, O. Šebesta, D. Růžek, P. Kilian

ISBN 978-80-86668-26-0



9 788086 668260



Biologické Centrum AV ČR v.v.i., Entomologický ústav
podle zřizovací listiny má být malé c

Zpřesnění a standardizace metodiky monitoringu výskytu komárů a postupu pro detekci flavivirů a bunyavirů

UPLATNĚNÁ METODIKA

Autorský kolektiv

I. Gelbič, O. Šebesta, D. Růžek, P. Kilian

vložit mezeru za tečkou

České Budějovice
2012

***Uplatněná metodika vznikla za podpory projektu MŠMT 2B08003
Změny biodiversity komárů - vektorů patogenních agens,
v souvislosti se změnami klimatu***

OPONENTI:

doc. RNDr. Peter Fedor, PhD,

Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

MVDr. Martin Beňka,

Státní veterinární správa, Praha

ABSTRACT

This publication provides information on the methods of mosquito monitoring and detection of viruses. Capturing of mosquitoes, vectors of many diseases of men and domestic animals, depends on the type of the trap and attractant used. Another important factor is the height at which the trap is situated. Classical methods for arboviruses detection (suckling mouse brain inoculation, CPE in cell culture, etc.) are laborious and are biased towards viruses that grow well in vitro or in vivo. Therefore they are not always suitable for large-scale surveillance. PCR-based techniques have been shown to be efficient and sensitive in surveillance for individual virus species. Moreover, RT-PCR amplification using primers targeting conserved regions of the main arbovirus families has the potential to detect novel viruses. We hope that this guide describing methods of monitoring of mosquitoes and detection of viruses by RT-PCR will be helpful for the authorities for public health protection. Use of these methods will enable optimization of mosquitoes eradication by methods which are economically advantageous and considerate to the nature.

OBSAH

I.	CÍL METODIKY	4
II.	UPLATNĚNÍ METODIKY	4
III.	ÚVODNÍ DEFINICE	4
1.	Význam komárů na jihovýchodní Moravě	4
1.1.	Záplavové a kalamitní druhy komárů	4
1.2.	Komáři jako vektory onemocnění člověka a zvířat	4
1.3.	Invazivní druhy komárů	5
1.4.	Možnosti regulace výskytu komárů	5
2.	Metody odběru vzorků	6
2.1.	Metodika odchyty larválních stádií	6
2.2.	Metodika odchyty imag komárů	6
3.	Pasti na odchyt imag komárů	7
3.1.	Pasti využívající chemické atraktanty, nebo světlo	7
3.2.	Pasti využívající sentinelová zvířata	10
3.3.	Pasti pro odchyt samiček kladoucích vajíčka	10
4.	Srovnání jednotlivých druhů pastí	10
5.	Navržená metoda monitoringu komárů	12
6.	Změna aktivity samiček komárů v průběhu dne a během roku	13
6.1.	Denní aktivita komárů	13
6.2.	Sezónní dynamika	14
7.	Využití univerzálních degenerovaných prumerů k detekci flavivirů a bunyavirů v komárech	15
7.1.	Význam komárů pro šíření patogenů – původců řady onemocnění	15
7.2.	Popis metodiky	16
IV.	SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	18
V.	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	19
VI.	SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	20

I. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je maximálně zefektivnit monitoring výskytu komárů a detekci flavivirů a bunyavirů v jejich tělech. Důkladný monitoring je nedílnou součástí strategie, směřující k regulaci výskytu komárů. Je nezbytný pro správný výběr a načasování preventivních opatření proti larvám komárů a pro volbu optimální ochrany obyvatelstva i hospodářských zvířat před nadměrným obtěžováním komáry a přenosem původců onemocnění.

II. UPLATNĚNÍ METODIKY

Nová metodika je důležitá především pro orgány ochrany veřejného zdraví, které ji mohou využít v systému včasného varování obyvatelstva před hrozcím nebezpečím přemnožení komárů, v případě ohrožení zdraví obyvatelstva k získávání podkladů nezbytných pro přijímání optimálních rozhodnutí a k včasnému zjištění výskytu možných nových vektorů. Důkladný monitoring výskytu komárů je rovněž nutný pro organizaci opatření proti přemnoženým komárům ze strany místních samospráv, zemědělských podniků, správců lesů apod. S jejím použitím lze optimalizovat opatření, správnou volbu a načasování tak, aby byly maximálně účinné, ekonomicky výhodné a šetrné vůči přírodě

III. ÚVODNÍ DEFINICE

1. Význam komárů na jihovýchodní Moravě

1.1. Záplavové a kalamitní druhy komárů

V případě vzniku záplav, především v letním období, dochází téměř pravidelně k zvýšenému výskytu komárů. Za kalamitní výskyt se považuje situace, kdy je v intravilánu obce zaznamenáno mimo čas nejvyšší aktivity 10 a více útoků samiček komárů na osobu za minutu. Nejdůležitějšími kalamitními druhy komárů u nás jsou *Aedes vexans*, *Ochlerotatus sticticus*, *Ae. cinereus*, *Ae. rossicus* a *Oc. cantans*.

1.2. Komáři jako vektory onemocnění člověka a zvířat

Zcela opomíjet zde nelze ani komáry jako vektory onemocnění člověka. Na jižní Moravě bylo izolováno několik druhů virů přenášených komáry, především virus Ťahyňa (TAHV) a virus západonilské horečky (WNV) (Hubálek

a kol. 1998. 1999), u psů byl zjištěn v posledních letech výskyt dirofilárií (Svobodová a kol. 2006). Do poloviny minulého století se v ČR vyskytovala endemicky malárie. Za důležité vektory je zde považován především *Ae. vexans* (TAHV), *Cx. pipiens* a *Cx. modestus* (WNV).

1.3. Invazivní druhy komárů

V posledních létech byl na některých místech Evropy zaznamenán výskyt exotických druhů komárů. Jsou to druhy *Ae. albopictus*, *Oc. japonicus* a *Oc. koreicus*. Jedná se o významné vektory. *Aedes albopictus* se na mnoha místech již rozšířil (např. Itálie, Španělsko, Chorvatsko). Je třeba počítat s tím, že se některý z uvedených druhů může objevit i na našem území.

1.4. Možnosti regulace výskytu komárů

Výskyt komárů lze do jisté míry regulovat, a to několika způsoby. Opatření lze rozdělit do 3 skupin.

- a) Úpravy terénu, které umožní ohroženou oblast odvodnit, zamezit záplavám, nebo alespoň účinně regulovat vodní stav. Úplné vysušení lánů umožní výrazné snížení výskytu komárů, představuje však vždy vážný zásah do krajiny a proto jej nelze realizovat všude. V našich podmínkách je často kritická situace především v zaplavovaných oblastech při dolních tocích řek. Včasným vypuštěním vody ze zaplavených ploch dojde k zahubení velkého množství larev a k zmenšení plochy pro případnou aplikaci larvicidních přípravků. Použití této metody však vyžaduje často nákladné terénní úpravy a v době vysokých průtoků v řekách jí lze provést jen v omezené míře.
- b) Použití larvicidních přípravků přímo do tůní s larvami komárů je do budoucna nejperspektivnějším opatřením. Jedná se obvykle o biologické přípravky, využívající schopnosti bakterie *Bacillus thuringiensis* var. *izraelensis* selektivně zabíjet larvy komárů. Tato metoda žádným způsobem nepoškozuje přírodu, přípravek je však účinný jen na larvy a proto je nezbytné stanovit dobu aplikace velmi přesně
- c) Při aplikaci insekticidů proti imágům se používají chemické přípravky, kde jsou účinnou složkou syntetické pyreroidy, které jsou neselektivní a proto je snahou použití této metody minimalizovat.

2. Metody odběru vzorků

2.1. Metodika odchyту larválních stádií

- a) Odběr pomocí misky se známou plochou umožňuje odhadnout hustotu larev a kulek. Ve spojení s informacemi o velikosti a charakteru zaplavených ploch nám tyto znalosti umožňují s předstihem signalizovat hrozící nebezpečí přemnožení komárů.
- b) Odběrem pomocí hustého sítko (cedníku) se získá dostatečné množství jedinců pro stanovení druhového složení. K determinaci se používají především larvy IV. stadia.
- c) Kukly jsou sbírány pomocí sítko, často spolu s larvami. Identifikace kulek je však obtížná a proto jsou obvykle v laboratoři dochovány do stadia dospělců.

2.2. Metodika odchyту imag komárů

- a) Sběr komárů entomologickou sítkou
 - Smykem z vegetace, provedeném v blízkosti líhnišť před rozlétnutím do okolí, získáme samce i samice komárů. Metoda je vhodná zvláště brzy po vylétnutí imag. V těsné blízkosti líhnišť se v té době nachází velké množství samců i samic. Takto sebraný materiál dává velmi dobrý obraz o druhovém složení vylíhlých komárů a doplňuje výsledky, získané sběrem larev. Později, když se imaga komárů rozletí často i na velké vzdálenosti, je tento sběr méně efektivní. V průběhu času se navíc výrazně snižuje zastoupení samců. Rozlišení některých našich druhů komárů je možné pouze u samců na základě stavby jejich hypopygií.
 - Sběr naletujících samiček sítkou v těsné blízkosti těla po předem stanovenou dobu umožňuje odhadnout aktivitu samiček zvláště v době komářích kalamit, kdy je sběr pomocí exhaustoru obtížný.
- b) Sběr sedících samiček exhaustorem ... tělo sběr exhaustorem ...
 - Po dosednutí na **tělo exhaustorem** umožňuje odhadnout aktivitu samiček. Pro objektivní stanovení aktivity je nutno dodržovat standardní podmínky (na chráněném místě, definovat čas odběru atd.). S výhodou lze použít bateriové exhaustory, které mají stabilní sání a lépe se s nimi manipuluje.
 - Na stěnách objektů se chytají nejčastěji samičky *An. maculipennis* s. l. (ve stájích v letním období obvykle za účelem zpřesnění identifikace druhů podle morfologie nakladených vajíček), nebo *Cx. pipiens* (v zimě ve sklepích, převážně pro izolační pokusy).

- c) Odchyt imag pomocí pastí
- Komerčně lze zakoupit celou řadu standardních pastí různých typů a modifikací, zpravidla s využitím atraktantů. Tato metoda nejlépe umožňuje učinit si přehled o skutečném výskytu komárů a alespoň částečné kvantitativní analýzy.

3. Pasti na odchyt imag komárů

3.1. Pasti využívající chemické atraktanty nebo světlo

- a) CDC Miniature Light Trap
CDC pasti byly vyvinuty Centers for Disease Control za účelem odchytu komárů a jiných vektorů především v noci. Jako atraktant je zde využito miniaturní světlo. Naletující komáři jsou nasáváni ventilátorem do sběrného vaku. Pro zvýšení účinnosti je možné přidat kontejner se suchým ledem, případně i jiný chemický atraktant. Past se vyrábí v různých modifikacích, které se liší například druhem světla.
- b) CDC **Fay, Prince** Trap místo tečky zřejmě pomlčka
Tento typ pasti vyvinuli Fay a Prince (1970). Past byla vyzkoušena na odchyt druhu *Aedes aegypti*. Používá se k odchytu komárů v denních hodinách a je zde využíváno kontrastu lesklé černé a bílé barvy. Některé typy jsou doplněny miniaturním světlem a lze je pak použít i pro noční odchyt. Pro zvýšení účinnosti se může přidat nádobka se suchým ledem. Past je opatřena krytem proti větru.
- c) EVS Trap (Encephalitis Vector Survey)
Tento druh pasti (Obr. 1.) byl představen v roce 1979. Jako atraktant se používá primárně oxid uhličitý, který je ve formě suchého ledu umístěn v kontejneru, tvořícím horní část pasti. Ve střední části je miniaturní světlo, sloužící jako sekundární atraktant a ventilátor, nasávající komáry do spodní části pasti, tvořené sběrným vakem. Ventilátorek je poháněn monočláňky.
- d) Zumba Trap with Tarp
Zumba trap patří k velmi účinným pastem. K lákání komárů se zde využívá jednak kombinace kontrastních barev (černá a zelená) a velikosti připomínající výšku člověka, především ale chemické atraktanty. Jako atraktant je použit CO₂ uvolňující se z kontejneru se suchým ledem, umístěným vedle pasti a další návnady (oktenol, BG lure aj.)
- e) BG-Sentinel Trap
BG sentinel Trap byla vyvinuta na univerzitě v Regensburgu v Německu a měla sloužit k odchytu především komárů *Ae. aegypti* a *Ae. albopictus*.



Obr. 1 *Instalovaná EVS Trap*



Obr. 2 Instalovaná Lard-can traps baited



Obr. 3 Otevřená Lard-can traps baited se sentinelovým zvířetem

Jako atraktant lze použít CO₂, pro tuto past však byly speciálně vyvinuty 2 druhy návnad. Je to Human Skin Non-Toxic Chemical Lure (BG lure), která použitím amoniaku, mléčné kyseliny a mastných kyselin simuluje pach lidské kůže, a Octenol Lure. Obě návnady lze použít i pro dříve uvedené pasti

f) Mosquito Magnet Traps

Pasti se vyrábějí v celé řadě modifikací (např. Mosquito Magnet Liberty – MML, Mosquito Magnet Freedom – MMF), Mosquito Magnet-X – MMX). Jako atraktant zde neslouží světlo, ale teplo, vlhkost, CO₂ a případně další atraktanty (např. oktenol). Vykazují vysoký záchyt samic komárů, jsou však poměrně neskladné a nákladné a nejsou vhodné pro mobilní použití.

3.2. Pasti využívající sentinelová zvířata

g) Lard-can traps baited

Tato past byla vyvinuta za účelem odchytu komárů naletujících na živá zvířata (LePore a kol. 2004). Jako atraktant se používají různá sentinelová zvířata. Past nemá žádné zařízení na nasávání komárů a chytány jsou samičky, snažící se aktivně proniknout ke zvířeti (Obr. 2.,3.).

3.3. Pasti pro odchyt gravidních samic, nebo sběr jejich vajíček

a) Mosquito Gravid Trap

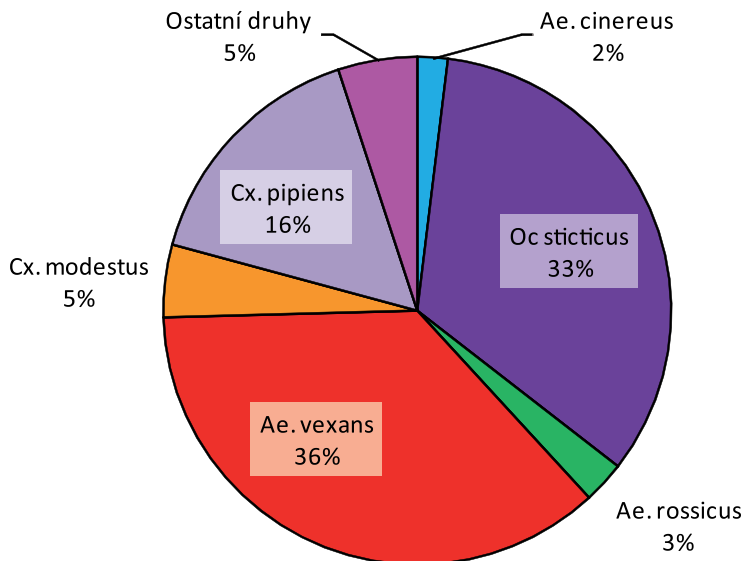
Past je určena k odchytu gravidních samic komárů, které hledají vhodné místo na kladení vajíček. Jako atraktant je použita voda, která je upravena tak, aby co nejvíce lákala samičky ke kladení. Naletující samičky jsou pak nasávány ventilátorem do sběrného vaku (Reiter 1987)

b) Ovitrap

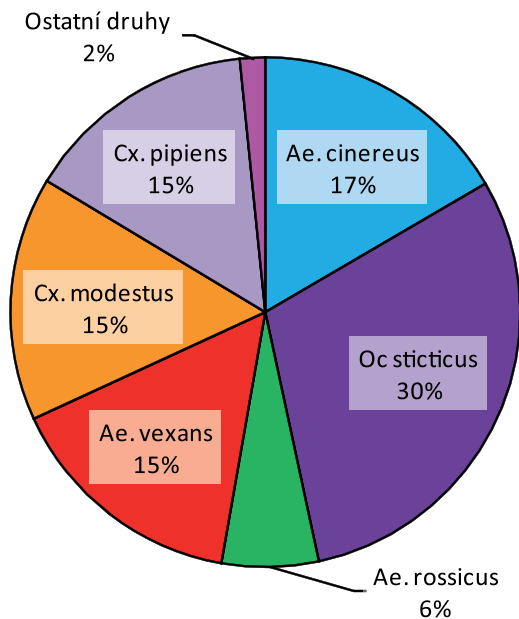
Rovněž Ovitrap využívá jako atraktant upravenou vodu. Samičky však nejsou chytány do vaku, ale nechají se vyklást vajíčka, která jsou následně identifikována, nebo se dochovají do stádia larvy. Tato metoda je vhodná zvláště pro záchyt invazivních druhů, například *Ae. albopictus* a *Oc. japonicus* (Audrey a kol 2005)

4. Srovnání jednotlivých druhů pastí

Jednotlivé druhy pastí vykazují značné rozdíly v záchytu komárů, a to jak po stránce kvantitativní, tak kvalitativní (viz Obr. 4., 5.). Svou roli zde hraje nejen druh použitého atraktantu, ale i vlastní konstrukce pasti (Bhalala a kol. 2006). Bylo provedeno srovnání dvou pastí, používaných ve výzkumu komárů na jižní Moravě - EVS pastí a Lard-can traps baited (Šebesta a kol. 2012a).



Obr. 4 Druhové složení komárů chycených v letech 2009 a 2010 do EVS pasti



Obr. 5 Druhové složení komárů chycených do lard-can traps baited se suchým ledem jako atraktantem

Pasti byly umístěny souběžně na stejné lokalitě. Byly zjištěny značné rozdíly v záchytu a druhovém složení, a to nejen v souvislosti s použitým druhem atraktantu, ale i na základě rozdílné konstrukce.

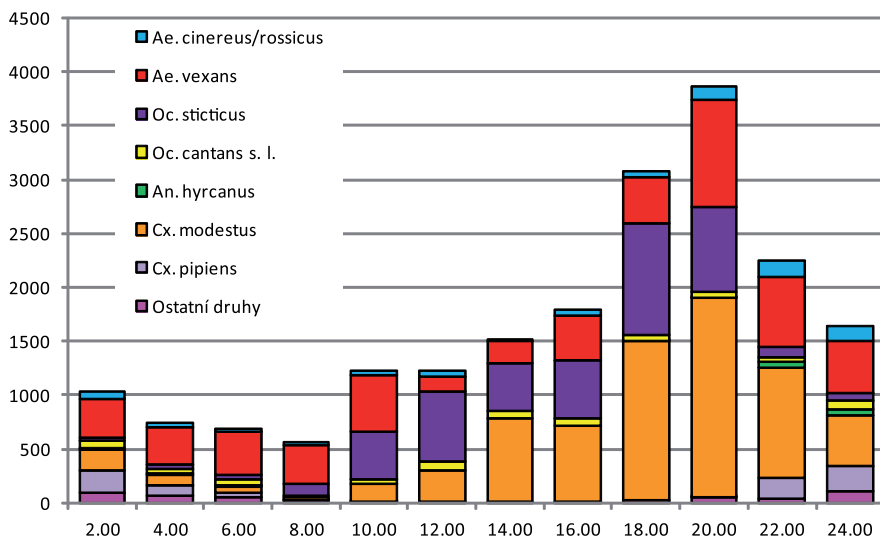
5. Navržená metoda monitoringu komárů

Navržená metodika monitoringu komárů spočívá ve využití kombinace více metod. Metoda odběru larev hustým sítkem a použitím misky přímo v tůních je používána již od samého počátku provádění pravidelného monitoringu. Pomocí bílé misky o známé ploše se z tůně odebere vzorek komárů, spočítá se jejich množství a přepočítá na vhodnou jednotku plochy, nejlépe 1 dm². Při odběru se musí postupovat tak, aby hustota larev na misce odpovídala skutečnosti. Podle velikosti zaplavené plochy a hustoty larev lze odhadnout budoucí množství komárů. Dále je nutné z tůní odebrat větší množství larev komárů pomocí hustého sítka. Vhodné je sítko o průměru asi 16 cm. Z takto získaného vzorku zjistíme druhové složení komárů a stadium převládajících larev. Tyto znalosti jsou nutné pro prognózu dalšího vývoje. Odběry larev je nutno provádět od počátku zaplavení líhnišť. Získáváním imag smykem z vegetace si průběžně ověřujeme výskyt a druhové složení dospělých komárů, odchtem naletujících samiček exhaustorem nebo sítkou provádíme odhad aktivity samiček.

Vedle výše uvedených standardně používaných postupů navrhuje předkládaná metodika rozšíření monitoringu o odchyt imag pomocí komerčních, standardních pastí. Tím se výrazně objektivizuje odhad množství komárů, zvýší znalosti o jejich druhovém složení, poměrném zastoupení jednotlivých druhů a při dlouhodobém sledování i o případných změnách výskytu, jejich sezónní dynamice a denní aktivitě. Výrazně se tím rovněž zvyšuje pravděpodobnost záchytu nových invazivních druhů komárů, které se v současné době v Evropě šíří a za určitých okolností mohou znamenat zvýšené riziko pro obyvatelstvo.

Protože je záchyt komárů výrazně ovlivněn druhem pastí, použitým atraktantem a podmínkami jejich použití (výška umístění pastí nad terénem, čas expozice atd.), je účelné postup sjednotit. Jedině standardizovaným postupem získáme výsledky, které nám umožní srovnání výskytu komárů na jednotlivých lokalitách, ale i v různých letech a v průběhu sezóny a tím vytipování nejvíce rizikových oblastí a období. Navrhovaná metodika vychází z použití EVS pastí s použitím suchého ledu jako atraktantu. Při jejím zpracování se vycházelo z potřeby získat co nejpřesnější výsledky za přiměřenou cenu. Pasti jsou zavěšovány do výše 1 m nad zemí, na místo maximálně chráněné před sluncem a větrem. Odběry jsou prováděny ve 14-ti denních intervalech, vždy 2 po sobě následující dny a to od počátku

března do konce října. Čtrnáctidenní interval je dostatečný pro sledování sezónní dynamiky výskytu komárů, odběr v dvou po sobě následujících dnech by měl minimalizovat chyby, způsobené nenadálými výkyvy počasí, nebo jinými faktory negativně ovlivňujícími výsledky. Expozice pastí je od 16:00 do 8:00 následujícího dne. Při stanovování času expozice se vycházelo z výsledků sledování denní aktivity komárů (viz kapitola 6.1.). Instalace pastí na dobu 24 hodin je technicky obtížně proveditelná, výše uvedený čas by měl umožnit dostatečný záchyt všech skupin komárů. EVS pasti jsou finančně dostupné, manipulace s nimi je jednoduchá a mají dostatečný záchyt komárů i druhové spektrum.



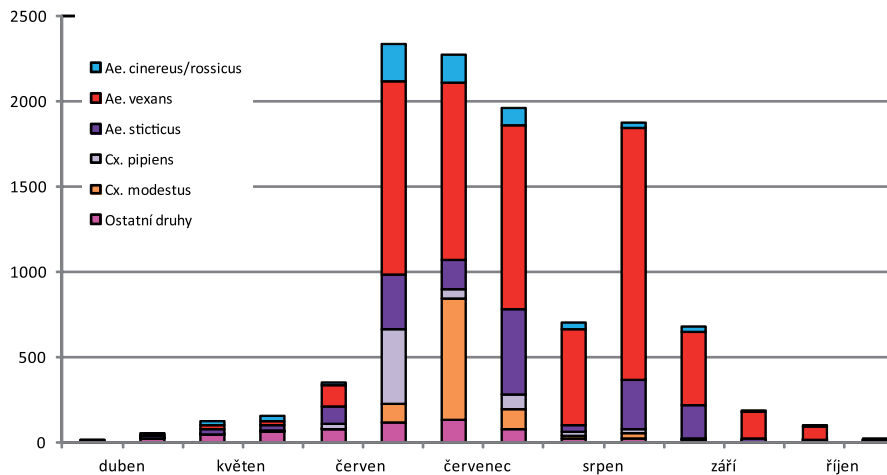
Obr. 6 Denní dynamika komárů, zjištěná v roce 2010 na jižní Moravě

6. Změna aktivity samiček komárů v průběhu dne a během roku

Pro účinnou ochranu obyvatelstva před komáry jsou důležité znalosti o biologii komárů, jako je jejich denní aktivita a sezónní dynamika.

6.1. Denní aktivita komárů

Jednotlivé druhy komárů vykazují značné rozdíly v denní aktivitě (viz. Obr. 6.). Kalamitní druhy komárů rodu *Aedes* a *Ochlerotatus* vykazovaly aktivitu obvykle po celých 24 hodin. Komáři *Aedes vexans*, *Ae. cinereus* a *Ae. rossicus*



Obr. 7 Sezónní dynamika výskytu komárů na jižní Moravě v letech 2009–2011

byli neaktivnější v pozdních odpoledních hodinách, poměrně vysokou aktivitu si však podrželi po celou noc. *Ochlerotatus sticticus* byl nejčastěji chytán v odpoledních hodinách a jeho výskyt po západu slunce rychle klesal a v nočních hodinách byl jeho výskyt poměrně nízký. Aktivita samic *Oc. cantans* vykazovala během dne jen malé výkyvy. Naopak důležité vektory *Cx. pipiens* a komáři rodu *Anopheles* byli aktivní téměř výhradně v noci. *Culex modestus* byl neaktivnější v pozdních odpoledních hodinách a na počátku noci (Šebesta a kol. 2011). *Culex pipiens* je v našich podmínkách převážně ornitofilní a člověka napadá jen zřídka.

6.2. Sezónní dynamika

Na jižní Moravě byly prokázány rozdíly v rozsahu komářích kalamit v případech jarních a letních záplav. Jarní záplavy jsou na jižní Moravě velmi časté a nastávají zde téměř každoročně. Druhové složení komárů je v jejich průběhu rozmanité, celkový výskyt komárů je však výrazně nižší. Zvýšený nález můžeme očekávat již na přelomu dubna a května. Při letních záplavách byl zaznamenán výskyt komárů zhruba 10x vyšší a v lužních lesích se na něm podílely v rozhodující míře pouze druhy *Ae. vexans* a *Ae. sticticus*, místy i *Ae. rossicus* a *Ae. cinereus*. Příklad sezónní dynamiky, zaznamenaný v letech 2009–2011 uvádí Obr. 7. Letní druhy komárů, zvláště *Ae. vexans* mají rovněž daleko větší tendenci rozletovat se do okolí a pronikat do obytné zóny. Ochrana obyvatelstva před komáry je proto v letních měsících mnohem naléhavější.

7. Využití univerzálních degenerovaných primerů k detekci flavivirů a bunyavirů v komárech

7.1. Význam komárů pro šíření patogenů – původců řady onemocnění

Komáři jsou nejpočetnější skupinou hmyzu sajícího krev a obecně nejvýznamnější skupinou přenašečů arbovirových nákaz. Význam komárů jako přenašečů arbovirových infekcí potvrdil již Walter Reed před 110 lety, kdy se podařilo vědecké komisi pod jeho vedením prokázat virovou etiologii žluté zimnice a způsob jejího přenosu komáry. Z nejvýznamnějších, komáry přenášených arbovirových nákaz, uveďme vedle žluté zimnice infekci virem západního Nilu, horečku dengue, či japonskou encefalitidu. V České republice se vyskytují především viry Ťahyňa (Bárdoš & Danielová, 1959), Čalovo (Batai) a Lednice (Hubálek, 2008). Na jižní Moravě byl v nedávné době izolován virus označený jako virus Rabensburg, který zřejmě představuje samostatnou linii viru západního Nilu (Bakonyi et al., 2005).

Klasické metody pro průkaz arbovirů z komárů jsou pracné, nákladné a časově náročné. Jedná se povětšinou o metody, založené na inokulaci materiálu do mozku sajících myší nebo na inkubaci v buněčné kultuře. Navíc málokdy je možno pomocí klasických metod detekovat málo virulentní či zcela nepatogenní viry.

Metody založené na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) jsou mnohem vhodnější pro rozsáhlejší studie, neboť umožňují rychlou analýzu velkého množství materiálu v krátkém čase. Existuje celá řada prací, zavádějící metody průkazu nejrůznějších patogenů pomocí PCR. PCR metodiky, které využívají univerzálních čeledově specifických primerů, rozšiřují spektrum detekce možných patogenů a navíc umožňují detekci nových, dříve neznámých patogenů nebo patogenů, u kterých není známa ani částečná genomická sekvence.

V naší práci jsme ověřovali využitelnost dříve publikovaných sekvencí primerů pro detekci flavivirů a bunyavirů v komárech. K detekci flavivirů jsme použili primery o sekvenci 5'- AAC ATG ATG AAR AGR GAR AA - 3' a 5'- GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC - 3', které jsou zacíleny na konzervovaný úsek genu pro nestrukturní protein 5 (Scaramozzino et al., 2001); k detekci bunyavirů byly využívány primery 5'-ATG ACT GAG TTG GAG TTT CAT GAT GTC - 3' a 5'- TGT TCC TGT TGC CAG GAA AAT hybridizující s částí vysoce konzervovaného malého genomického segmentu a dávající produkt asi 251 párů bází (Kuno et al., 1996).

7.2. Popis metodiky

Pro velký počet vyšetřovaných komárů a poměrně nízkou prevalenci virových agens v komárech jsme odchytené komáry po identifikaci rozdělili do směsí o 50-ti jedincích. Komáři byli homogenizováni v 500 µl sterilního PBS pomocí kovové kuličky v homogenizátoru Tissue Lyser II (Qiagen) při 30 Hz po dobu 2 minut. Následovala centrifugace na stolní centrifuze (Eppendorf minispin plus) při 6500 g po dobu 45 sekund. Supernatant byl dále přenesen do nové, sterilní mikrozkušavky a klarifikován druhou centrifugací při 20 000 g po dobu 10 minut a 4° C. Takto připravený supernatant byl skladován až do dalších analýz při -76° C.

odstranit
mezeru

K získání **templář**, vhodného pro následnou analýzu pomocí jedнокrokové RT-PCR jsme použili komerčně dostupný kit Viral RNA mini kit (Qiagen). Izolace byla provedena přesně podle postupu doporučeného výrobcem. Jedná se o několik za sebou následujících kroků, fungujících na principu navázání virové RNA na silikamembránu obsaženou v kolonce a promývání vzorku různými pufrů. V posledním kroku je na membránu napipetován pufr AVE, který rozruší vazby mezi silikamembránou a RNA. Tento krok byl pro větší výtěžek RNA prováděn dvakrát po sobě, přičemž pokaždé bylo použito 40 µl tohoto pufru. Při následné centrifugaci je zachycena izolovaná RNA do sterilní 1,5 ml zkumavky. Takto získaný templát byl skladován při teplotě -76°C.

je to
správně?

K vyšetření vzorků byla použita jednokroková reverzně-transkriptázová polymerázová řetězová reakce. Jako kit byl použit Titan One Tube RT-PCR kit (Roche). Tento kit využívá reverzní transkripce k přepsání RNA do cDNA a ihned následující amplifikaci specifického produktu pomocí DNA polymerázy. Byly použity univerzální primery na detekci virů skupiny California a Bunyamwera (čeleď *Bunyaviridae*) a univerzální primery detekující flaviviry popsané výše. RT-PCR reakce byla provedena přesně podle návodu doporučeného výrobcem, přičemž v každé 0,2 ml mikrozkušavce bylo celkem 25 µl reakční směsi, z toho 2 µl tvořila templátová RNA. Dva použité primery měly ve směsi vždy koncentraci 0,4 µM. Pokaždé byla prováděna také negativní a pozitivní kontrola pro vyloučení falešně pozitivních či falešně negativních výsledků.

Samotná PCR byla prováděna s využitím cycleru Bioer Thermal cycler TC-24/H.

Podmínky PCR: 1. Reverzní transkripce 50°C/ 30 min.

2. Počáteční denaturace 94°C/ 2 min.

3. 35 cyklů: 1. Denaturace 94°C/ 30 s.

2. Nasedání primerů 55°C/ 30 s.

3. Elongace 68°C/ 45 s.
4. Finální elongace 68°C/ 10 min.
5. Udržovací teplota 14°C

K získanému produktu z PCR bylo přidáno 5 µl nanášecího puftru (6X Orange DNA Loading Dye, Fermentas) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR Green (SYBR Green I, nucleic acid stain, Amresco, USA). Následně byl produkt rozdělen elektroforetickou separací (BioRad SubCell® GT + PowerPac HC™) v 1,7% agarózovém gelu (Serva). Separace probíhala po dobu asi jedné hodiny při 120 V. Produkty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Visi-blue™ Transilluminator; Biometra Ti 3). Fotografie byly získány digitálním fotoaparátem Olympus C5060Z a zpracovány programem AlphaEase® RT Software, verze 4.1.0. (Alpha Innotech Corporation).

Pozitivní vzorky (Obr. 8.) byly sterilním skalpelem vyřezány z gelu a eluovány pomocí kitu illustra GFX PCR DNA and Gel band purification Kit (GE Healthcare). Extrakce byla provedena přesně podle postupu, doporučeného výrobcem tohoto kitu, přičemž objem elučního roztoku byl 35 µl.

Identifikace pozitivních nálezů pak probíhá pomocí sekvenční analýzy sangerovou metodou a na základě srovnání získaných sekvencí s údaji v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST.

Uvedená metodika byla využita k rozsáhlé analýze komárů, odchycených na jižní Moravě, ale obdobný protokol byl užít i spolupracujícími pracovišti k testování komárů, pocházejících z Itálie, Španělska, Portugalska a Velké Británie. Co se našich výsledků týče, kromě známých virů (např. bunyavirus Ťahyňa) jsme detekovali zcela nové viry ze skupiny označované jako „mosquito-only flaviviruses“ (MOF). Jeden MOF identifikovaný na jižní Moravě byl identický s předchozím nálezem z Itálie, další představoval zcela nový, unikátní taxon (Calzolari et al., 2012). Podařilo se nám tedy ověřit dříve publikované metodiky, které byly v naší laboratoři částečně modifikovány nejen k základnímu skriningu komárů na známé patogeny, ale metodika se ukázala být velmi vhodnou i pro detekci a identifikaci zcela nových virů. Jsme přesvědčeni, že s využitím dané metodiky mohou být identifikovány další viry, včetně těch, které mohou představovat potenciální hrozbu z hlediska lidského zdraví či veterinární medicíny.

IV. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Problém s nadměrným výskytem komárů a s komáry, jako důležitými vektory onemocnění člověka i hospodářských zvířat je dlouhodobý a jeho řešení je věnováno velké úsilí. Výzkum líhnišť komárů se u nás provádí již řadu let. Systematický monitoring na jižní Moravě probíhá od roku 1995. Většinou se však omezuje na sledování líhnišť komárů formou odběru larev v době zaplavení líhnišť, v menší míře se provádí odběr imag smykem z vegetace a sledování aktivity odchytem samiček, naletujících na člověka. Tímto způsobem lze do jisté míry předpovědět s určitým předstihem nebezpečí přemnožení záplavových a kalamitních druhů komárů a navrhnout opatření pro zmírnění dopadů na obyvatelstvo. Neposkytuje nám však v dostatečné míře informace o celkovém výskytu komárů v oblasti, druhovém složení, chování komárů ve vztahu k obyvatelstvu a hospodářským zvířatům, změnách v druhovém složení a případném výskytu a šíření invazivních druhů komárů. Získání těchto nezbytných informací umožňuje doplnění monitoringu o pravidelný odchyt imag komárů (zpravidla aktivních samiček) pomocí pastí. Odběrem larev se zjistí výskyt hlavně záplavových druhů komárů rodu *Aedes* a *Ochlerotatus*, informace o výskytu dalších druhů, z nichž mnohé představují významé vektory, jsou však nedostatečné. Sledování aktivity komárů odchytem naletujících samiček pomocí exhaustoru nebo sítkou je z důvodů krátké expozice výrazně ovlivněno nejen aktuálním počasím, ale i osobou, provádějící výzkum a proto jsou takto získané výsledky do značné míry nestandardní a jen obtížně srovnatelné. Pasti jsou exponovány v každém termínu 2x po 16 hodinách a proto je tato metoda zatížena mnohem menší chybou, což umožňuje lépe vyhodnotit situaci a navrhnout optimální řešení. Vhodnou volbou pastí a atraktantu (nebo jejich kombinací) lze použít metodu na sledování výskytu i jiných druhů hematofágního hmyzu, jako jsou pakomárci (*Ceratopogonidae*) a muchničky (*Simuliidae*)

Komáři jsou významnými přenašeči celé řady patogenních mikroorganismů. V naší práci jsme adaptovali metody průkazu virových patogenů, založené na principu polymerázové řetězové reakce. Využili jsme univerzálních degenerovaných primerů pro virové čeledě *Flaviviridae* a *Bunyaviridae*. Ukázalo se, že tyto metody jsou velmi vhodné k průkazu nejen známých patogenů, ale že s jejich využitím lze identifikovat i nové, dříve neznámé viry. Tento přístup tedy umožňuje identifikaci potenciálních virových patogenů v předstihu, dříve než budou zaznamenány případy onemocnění člověka nebo hospodářských zvířat.

V. PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- Audrey E. Lenhart A., Walle M, Cedillo H, Kroeger A. (2005) Building a better ovitrap for detecting *Aedes aegypti* oviposition. *Acta Tropica* 96: 56–59
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N. (2005) Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis.* 11:225-31.
- Bárdoš V, Danielová V. (1959) The Ťahyňa virus - a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.*3:264-76.
- Bhalala H., and Jorge R. Arias J. R. (2009) The Zumba Mosquito Trap and Bg-Sentinel Trap: Novel Surveillance Tools for Host-Seeking Mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 25(2):134-139.
- Fay R. W., Prince W. H. (1970). A modified visual trap for *Aedes aegypti*. *Mosquito News* 30: 20-23
- Hubálek Z. (2008) Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res.*103: S29-43.
- Hubálek Z, Halouzka J., Juřicová Z., Příkazský Z., Žáková J., Šebesta O. (1999) Surveillance virů přenosných komáry na Břeclavsku v povodňovém roce 1997. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 48.: 91–96.
- Hubálek Z, Halouzka J., Juřicová Z., Šebesta O. (1998) First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol.*, 42: 119–120
- Kuno G., Mitchell CJ, Chang GJ, Smith GC. Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1184–1188.
- Lepore TJ, Pollack RJ, Spielman A, Reiter P. (2004): A readily constructed lard-can trap for sampling host-seeking mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc.* 20: 321-322
- Reiter P. (1987) A revised version of the CDC Gravid Mosquito Trap. *J Am Mosq Control Assoc.* 3:25-27
- Scaramozzino N, Crance JM, Jouan A, DeBriel DA, Stoll F, Garin D. (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. *J Clin Microbiol.* 39: 1922-1927.
- Svobodová Z. Svobodová V., Genchi C., Forejtek P. (2006) The first report of autochthonous dirofilariasis in dog in the Czech Republic. *Helmintologia*, 43: 242-245

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Calzolari M, Zé-Zé L, Ruzek D, Vázquez A, Jeffries C, Defilippo F, Osório HC, Kilian P, Ruíz S, Fooks AR, Maioli G, Amaro F, Tlustý M, Figuerola J, Medlock JM, Bonilauri P, Alves MJ, Sebesta O, Tenorio A, Vaux AG, Bellini R, Gelbic I, Sánchez-Seco MP, Johnson N, Dottori M. (2012): Detection of mosquito-only flaviviruses in Europe. *J Gen Virol.* 93: 1215-25.
- Šebesta O., Gelbič I., Peško J. (2011): Daily and seasonal variation in the activity of potential vector mosquitoes. *Cent. Eur. J. Biol.* 6: 422–430.
- Šebesta O, Halouzka J., Hubále Z., Juřicová Z., Rudolf I., Šikutová S., Svobodová P. and Reiter P. (2010) : Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in an area endemic for West Nile virus. *J Vector Ecol.* 35:156-162.
- Šebesta O., Gelbič I., Minář J. (2012a): Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of the Lower Dyje River Basin (Podyjí) at the Vzech-Austrian border. *Cent. Eur. J. Biol.* 7: 288 – 298.
- Šebesta, O., Peško J., Gelbič I. (2012b): Influence of Trap Construction on Mosquito Capture. *Journal of Life Sciences* 6: 209-215.
- Šebesta, O., Rettich F., Peško J. (2012): Výzkum komárů na jižní Moravě a jejich význam *Hygiena* 57: 4-9.