

METODIKA (N_{METS}) JAKO VÝSLEDEK VÝZKUMU, EXPERIMENTÁLNÍHO VÝVOJE A INOVACÍ, NAVRŽENÁ K VYUŽÍVÁNÍ V RÁMCI PŮSOBNOSTI MINISTERSTVA ZDRAVOTNICTVÍ

Předkladatel: doc. RNDr. Ivo Rudolf, Ph.D.

Název metodiky:

Monitoring invazních druhů komárů se zaměřením na *Aedes albopictus* pomocí pastí typu „ovitrap“

Místo zpracování:

Ústav biologie obratlovců AVČR, v.v.i., Klášterní 212, 691 42, Valtice

Datum: 21.10. 2022

Autorský kolektiv:

Silvie Šikutová, Oldřich Šebesta, Kristína Mravcová, Ivo Rudolf

Poděkování: Jakub Vojtíšek

Pracoviště:

Ústav biologie obratlovců AVČR, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno

Dedikace (Odkaz na výzkumnou aktivitu):

Metodika vznikla v rámci projektu reg. číslo NV19-09-00036 s názvem Připravenost na introdukci exotických virových nákaz přenášených komáry – přístup One Health financovaného Agenturou pro zdravotnický výzkum MZČR.

Návrh uživatelů: pracoviště krajských hygienických stanic, Státní zdravotní ústav

Úvod do problematiky

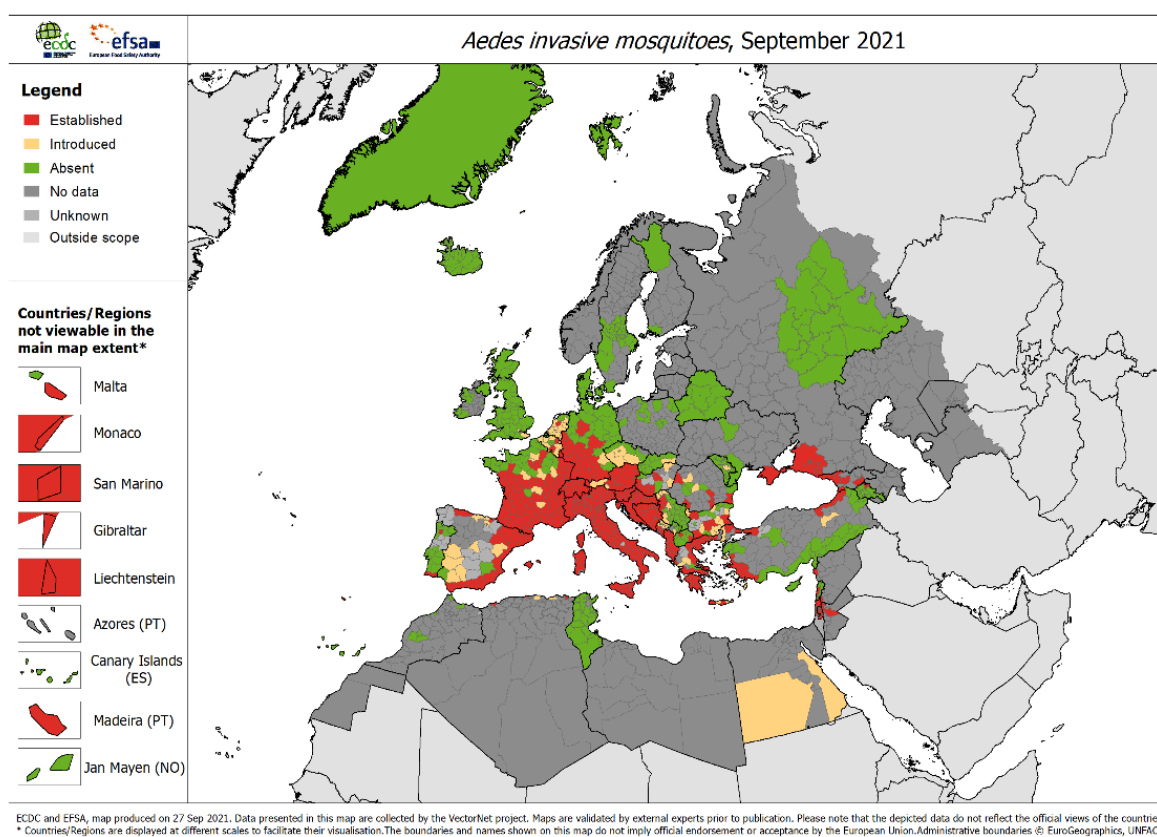
V Evropě byl dosud zaznamenán výskyt šesti invazních druhů komárů, u kterých byla prokázána vektorová kompetence k patogenům způsobujícím onemocnění u člověka. Jde o druhy *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. japonicus*, *Ae. koreicus*, *Ae. atropalpus* a *Ae. triseriatus*. Tito komáři se v důsledku globalizace a schopnosti přizpůsobit se podmínkám blízkosti člověka úspěšně šíří mimo své původní biotopy (Obrázek 1). K rozmnožování jsou schopni využívat i velmi malých objemů vody (především dešťové) a různých artefaktů vzniklých lidskou činností (vázy, barely, konve, láhve, staré pneumatiky, plechovky, plastové odpadky), které jim slouží jako umělá líhniště. Jejich vajíčka jsou odolná vůči vysychání i nižším teplotám. Dospělí komáři se pomocí automobilové, kamionové, lodní, ale i letecké dopravy pasivně přesunují na velké vzdálenosti nejen mezi státy, ale i kontinenty. Komáři jsou pasivně transportováni v prostorech dopravních prostředků a na odpočívadlech (parkovištích, čerpacích stanicích) je opouštějí a vyhledávají přirozené úkryty. Vajíčka a larvy mohou být importovány se zbožím, zejména s exotickými květinami (např. *Dračinec pruhovaný*) anebo v rámci obchodu s ojetými pneumatikami. Významný vliv na šíření komárů má jejich ekologická plasticita, díky níž se za relativně krátkou dobu i teplomilné druhy adaptovaly na podmínky mírného pásma. Schopnost zimní diapauzy, široká hostitelská specifita i změny klimatu umožňují trvalé usídlení těchto druhů ve střední Evropě i následné šíření do severnějších oblastí.

Nejúspěšněji se šíří druh *Ae. albopictus* známý také jako "asian tiger mosquito" (asijský tygří komár nebo komár tygrovaný). Pochází z jihovýchodní Asie, odkud se rozšířil prakticky po celém světě a v současnosti patří mezi 100 nejvýznamnějších invazních druhů. U evropských populací *Ae. albopictus* již byly zjištěny geny pro rezistenci vůči specifickým insekticidům, což komplikuje kontrolu šíření a jejich následnou eliminaci v postižených lokalitách (Pichler a kol., 2022). V České republice byl tento druh poprvé prokázán v roce 2012 (Šebesta a kol., 2012) a později při dlouhodobém monitoringu (Rudolf a kol., 2018).

Vědecky byla prokázána úspěšná laboratorní infekce *Ae. albopictus* více než 36 medicínsky významnými arboviry (Pereira-dos-Santos a kol., 2020). *Aedes albopictus* je významným vektorem horeček dengue, chikungunya, zika a žlutá zimnice. Především narůstající incidence autochtonních lidských případů horeček chikungunya, zika, dengue v jižní

Evropě nabádá ke zvýšené entomologické surveillance komářích vektorů (Rezza a kol., 2007; Roiz a kol., 2015; Calba a kol., 2017; ECDC, 2019; Riccardo a kol., 2019; Lazzarini a kol., 2020).

Dalšími invazními druhy prokázanými v České republice jsou *Ae. japonicus* (Vojtíšek a kol., 2022) a *Ae. koreicus* (Vojtíšek a kol., 2022). Tyto druhy však z medicínského pohledu nejsou považovány za významné.



Obrázek 1. Aktuální rozšíření invazních druhů komárů v Evropě <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>.

Vlastní popis metodiky

Cíl monitoringu

Zhodnocení rizika introdukce a následného usídlení komárů druhu *Ae. albopictus* na území České republiky. Metodiku lze použít i pro záchyt dalších invazních druhů komárů (např. *Ae. japonicus* a *Ae. koreicus*).

Způsob monitoringu

Při monitoringu se využívá pastí typu ovitrap (simulujících vhodné podmínky pro naklazení vajíček oplodněnými samičkami komárů), které se instalují na místech příhodných pro introdukci *Ae. albopictus*.

Popis pasti:

- tmavá, nejlépe černá, plastová nádoba s víkem (např. PS Plasty CZ s.r.o., Kralice na Hané, kbelík kat.č. 10056 a víčko kat.č. 10879) o objemu cca 1300 ml vody. Při instalaci je past naplněna cca do 3/4 výšky nádoby (1000 ml vody) a špachtle pro naklazení vajíček je minimálně z poloviny pod vodou;
- past je instalována bez víčka, víčko slouží k uzavření pasti pro převoz do místa líhnutí; přibližně ve výšce 2 cm pod okrajem pasti je vhodné vytvořit odtokový otvor (asi 2mm), aby bylo zabráněno přetečení pasti v případě vydatných srážek;
- pro naklazení vajíček slouží samičkám komárů lékařské špachtle (15 cm dlouhé a 1,7 cm široké) obalené přírodní polohustou jutou 305g/m² (např. BPP s.r.o., Brno) připevněnou ke špachtli nábytkářskou sešivací sponou (např. BeACS s.r.o., Praha, kat.č. 10003509), nejlépe používat podporu pro kladení vajec z přírodního materiálu bez jakékoliv impregnace;
- jako alternativní podklad pro kladení vajíček lze využít dřívko pouze zdrsňené hlubokými rýhami přímo do dřeva, či surové dřevovláknité HDF desky s drsným povrchem o podobných rozměrech jako špachtle. Po celou sezónu je jako podklad pro kladení vajíček používán stejný materiál ve všech ovitrapech,
- špachtle je připevněna k nádobě ovitrapu např. kancelářskou sponou RON 19mm;

- past je naplněna vlažnou odstátou pitnou vodou (lze obohatit senným nálevem), z důvodu simulace přírodních podmínek již na počátku pokusu;
- pro zavěšení pasti lze využít např. zahnutého drátu;
- špachtle, víčka i ovitrapy jsou označeny kódem lokality a každý ovitrap i informační etiketou stručně popisující účel monitoringu (Obrázky 2 a 3). Popis účelu monitoringu má za úkol informovat veřejnost a tím omezit možné zničení pasti.

Instalace ovitrapu

- monitoring by měl být zpravidla prováděn na více vhodných lokalitách současně, aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu komárů. Mezi vhodné oblasti pro monitoring řadíme především místa, kde zastavují automobily, kamiony nebo autobusy jedoucí z jižní nebo jihovýchodní Evropy, např. čerpací stanice s odpočívadly, ale i zahrádkářské kolonie v příhraničních oblastech, městské parky a odpočinkové zóny;
- na každou lokalitu je vhodné instalovat více ovitrapů s ohledem na rozlohu lokality a množství vegetace (nejmenší vzdálenost mezi ovitrapy by měla být cca 10 m, záleží však na možnostech dané lokality a množství vegetace);
- ovitrapy by měly být instalovány do stinných míst (zamezení odparu a přehřátí vody) chráněných před silným větrem. Pasti mohou být položeny na zemi nebo zavěšeny nízko nad zemí např. v keřích či na stromech. Vyskytují-li se na lokalitě přirozená líhniště (periodické tůně) či nádoby s vodou, pneumatiky jsou ovitrapy instalovány i do jejich blízkosti. Pozice ovitrapů by neměly být během monitoringu měněny (pokud však nedochází k rychlému odparu vody, ničení a ztrátě pastí či změně prostředí např. vysekáním křovin). Ukázka vhodného a nevhodného umístění pastí viz (Obrázky 4 a 5);
- při použití ovitrapů s objemem vody menším než 1000 ml je vhodné pasti kontrolovat 2x týdně. V případě zvýšeného odparu je nutno pasti dolít vodou;
- časově by měl monitoring pokrývat výskyt invazních komárů od začátku do konce jejich sezóny, v České republice na základě dlouhodobých dat z monitoringu výskytu *Ae. albopictus* na jižní Moravě a v jižní Evropě navrhuje provádět monitoring v období od 1.6. do 31.10. dané sezóny (Žitko a Merdić, 2014; Šebesta a kol., 2021).

Záznam dat o instalaci ovitrapu

Data o instalaci by měla obsahovat:

- název a mapu lokality s vyznačenými pozicemi jednotlivých ovitrapů, ideálně GPS souřadnice každého ovitrapu (meziroční dodržení pozic a lokalit monitoringu, pokud lze);
- datum instalace ovitrapů ze všech lokalit;
- datum sběru ovitrapů z dané lokality ve všech termínech;
- problematický stav pasti: past chybí nebo je rozbitá / past bez vody / past bez špachtle či jiné technické problémy ovlivňující případný záchyt komárů daným ovitrapem;
- je vhodné sledovat i denní či týdenní meteorologické parametry monitorovaných lokalit (max., min., průměrná teplota, srážky či významné povětrnostní vlivy).

Sběr a výměna ovitrapu

- sběr a výměna všech ovitrapů probíhá v týdenních intervalech. U sebraných pastí je uvolněna špachtle odepnutím kancelářské spony, poté je ponořena volně do vody a past je vodotěsně uzavřena víčkem (Obrázek 6). Sebrané ovitrapy jsou vyměněny za nové pasti bez víčka s novou špachtlí a čerstvou odstátou pitnou vodou (Obrázek 3);
- při sběru pastí není vhodné odstraňovat napadaný přírodní materiál (např. listí, kůra, plody, jehličí apod.) (Obrázek 7), neboť vajíčka mohou být nakladena nejen na špachtli s jutou, ale i na těchto přírodních podkladech nebo dokonce na stěnách ovitrapu;
- vzhledem k možnosti kontaminace vody v pasti třetí osobou (moč, hygienické pomůcky, cigarety apod.) je vhodné pasti senzoricky při sběru zkontrolovat a případně z pokusu vyřadit. Kontaminované pasti by znehodnotily celý následný proces vývoje vajíček a larev;
- sebrané uzavřené pasti jsou převezeny do podmínek simulujících vhodné prostředí pro líhnutí komárů.

Líhnutí komárů v laboratoři

- místnost simulující podmínky pro vývoj *Ae. albopictus* by měla mít okno pro přístup denního světla a být temperovaná na 26°C, alternativně (pokud nejsme schopni teplotu místnosti externě kontrolovat), je možné ponechat vývoj v pokojové/venkovní teplotě bez její kontroly. Délka vývoje se však může prodloužit.

- k líhnutí komárů lze jako umělých líhnišť využít bílých plastových nádob o objemu 10 000 ml (např. PS Plasty CZ s.r.o., Kralice na Hané, kbelík kat.č. 107 30) při instalaci cca 10 ovitrapů na lokalitu. Počet nádob odpovídá počtu lokalit. S každým termínem sběru je nutné použít novou sadu nádob (1 nádoba = 1 lokalita a jeden termín sběru). Bílá barva nádoby je vhodná z důvodu snazší kontroly vylíhlých larev a dospělců;
- uzavřené sebrané pasti jsou odvíčkovány, jejich obsah včetně špachtlí slit do nádoby pro líhnutí a to tak, aby všechny ovitrapy z jedné lokality a daného termínu sběru byly slity do jedné nádoby. Špachtle s jutou jsou ponořeny na dně nádoby (Obrázek 8). V případě většího objemu vody v pastech než je objem nádoby pro líhnutí je pro danou lokalitu nutno použít více nádob (pro redukci množství vody nelze využít cedník z důvodu možné ztráty vajíček či larev). Všechna umělá líhniště by měla být naplněna max. 5 cm pod okraj, aby vylíhlí komáři měli prostor pro létání. K zabránění úniku dospělých komárů jsou nádoby překryty gázou a ta připevněna např. kloboukovou gumou nebo kolíky na prádlo tak, aby byla vypnutá a těsně přiléhala k nádobě (Obrázek 9). Všechna umělá líhniště jsou označena štítkem označujícím název lokality a termín sběru pastí. **NIKDY NESLÍVÁME PASTI Z VÍCE LOKALIT DO JEDNÉ NÁDOBY K LÍHNUTÍ. TOTÉŽ PLATÍ I PRO VÍCE TERMÍNŮ SBĚRU NA JEDNÉ LOKALITĚ;**
- podmínky líhnutí by měly být po celou dobu neměnné. V umělých líhništích by měla být kontrolována hladina vody a tato v případě doplněna vlažnou odstátou pitnou vodou;
- kontrola umělých líhnišť by měla být prováděna dle vývojové fáze komárů (při výskytu kukel denně) po dobu minimálně pěti týdnů od slití nebo do ukončení líhnutí komárů. Ke kontrole lze použít i svítilnu. Po vylíhnutí dospělců je vhodné je odsát co nejdříve např. exhaustorem, aby nedošlo k jejich utonutí. Z důvodu možného úniku komárů mimo laboratoř je nutné být při jejich odsávání obezřetný, aby komáři neuletěli. Proto je gáza při odsávání nadzvednuta jen v jednom místě a těsně obepíná trubici exhaustoru (Obrázek 10). Do exhaustoru se nesmí nasát voda. V tomto případě je před dalším odsáváním třeba trubici nejdříve vysušit;
- odsátí dospělci jsou uloženi do -20°C pro další zpracování. Následně je provedena identifikace do druhu, určení pohlaví a v případě potřeby jsou vybraní jedinci označeni a předáni k dalším analýzám. Protokol by měl obsahovat název lokality, data instalace a sběru pastí, datum odsátí vylíhnutého jedince a pohlaví;

- v případě zkažení vody v umělém líhništi je nutno zvážit likvidaci obsahu nádoby dříve než po pěti týdnech (*Ae. albopictus* je schopen přežít i ve velmi znečištěných vodách). Před likvidací zkažené vody je nutno vyjmout (např. kapátkem) nepoškozené larvy (Obrázek 11), determinovat je do druhu dle entomologického klíče, a případné živé kukly přenést do čisté odstáté vlažné pitné vody k dokončení vývoje. Příklad zkažené vody v umělém líhništi je uveden na Obrázku 12;
- po ukončení líhnutí je voda z umělých líhnišť vylita, špachtle zlikvidovány do odpadu a umělá líhniště důkladně umyta čistou vodou pro další použití;
- pro každou lokalitu jsou používány ovitrapy i víčka opakovaně. Proto jsou tyto označeny a po každém použití důkladně umyty včetně víček čistou vodou bez použití mycích prostředků, aby na stěnách nezůstávala vajíčka. Na umývání se používají pro každou lokalitu zvlášť oddělené pomůcky (houbičky), aby nedošlo k přenesení vajíček mezi lokalitami. Po umytí jsou pasti osušeny, doplněny novou špachtlí označenou názvem lokality a připraveny pro novou instalaci. Po celou sezónu je na každou lokalitu třeba 2 sad pastí (jedna sada je instalována a druhá sada sebrána a po vylití nachystána k výměně). Tento postup je časově i logisticky ověřený, významně snižuje časovou náročnost i finanční náklady.

Determinace komárů

Determinace dospělců *Ae. albopictus* je možná pouhým okem. Jedná se o výrazně černého komára s bílými pruhy na těle. Sameček má bohatě zpeřená tykadla, makadla stejně dlouhá jako sosák a zadeček ukončený hypopygiem (kopulační orgán). Samička má tykadla jemně zpeřená a makadla kratší než sosák. U obou pohlaví jsou nápadné výrazné bílé pruhy na zadečku, bílé prstýnky na člancích končetin i na makadlech, výrazný bílý pruh na svrchní části hrudi. Na štítku (scutellum) se nacházejí nápadné, široké, jasné bílé šupiny (u našich druhů komárů jsou tyto šupiny světlé, úzké) (Obrázky 13 a 14). Larvy III. a IV. instaru je nutné determinovat pod stereomikroskopem (Obrázek 11 a 15). Determinační znaky uvedeny na Obrázku 16). Determinace kukel je obtížná a je třeba ponechat vylíhnout dospělé. K přesné determinaci odchycených komárů lze použít vhodný entomologický klíč (Becker a kol., 2010).

Použitá literatura

- Becker N., Petrič D., Zgomba M., et al. 2010. Mosquitoes and their control. 2nd ed. Heidelberg: Springer.
- Becker N., Petrič D., Zgomba M., et al. 2020. Mosquitoes: identification, ecology and control. 3rd. ed. Heidelberg: Springer.
- Calba C., Guerbois-Galla M., Franke F., et al. 2017. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Eurosurveillance*.22:17-00647. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment: Autochthonous cases of dengue in Spain and France, 1 October 2019. Stockholm: ECDC; Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-autochthonous-cases-dengue-spain-and-france>.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Mosquito maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2021. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>.
- Kramář J. 1958. Fauna ČSR. Komáři bodaví-Culicinae. Československá akademie věd.
- Lazzarini L., Barzon L., Foglia F., et al. 2020. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Eurosurveillance*.25:2001606. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606.
- Pereira-dos-Santos T., Roiz D., Lourenço-de-Oliveira R., et al. 2020. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens*. 9:266. doi:10.3390/pathogens9040266.
- Pichler V., Caputo B., Valadas V., et al. 2022. Geographic distribution of the V1016G knockdown resistance mutation in *Aedes albopictus*: a warning bell for Europe. *Parasites and Vectors*. 15: 280. doi: 10.1186/s13071-022-05407-3.
- Rezza G., Nicoletti L., Angelini R., et al. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*. 370:1840-1846. doi:10.1016/S0140-6736(07)61779-6.

- Riccardo F., Venturi G., Di Luca M., et al. 2019. Secondary Autochthonous Outbreak of Chikungunya, Southern Italy, 2017. *Emerging Infectious Diseases*. 25:2093-2095. doi: 10.3201/eid2511.180949.
- Roiz D., Boussès P., Simard F., et al. 2015. Autochthonous Chikungunya Transmission and Extreme Climate Events in Southern France. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 9:e0003854. doi: 10.1371/journal.pntd.0003854.
- Rudolf I., Blažejová H., Straková P., et al. 2018. The invasive Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*) in the Czech Republic: Repetitive introduction events highlight the need for extended entomological surveillance. *Acta Tropica*. 185: 239-241. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.05.02.
- Šebesta O., Rudolf I., Betášová L., et al. 2012. An invasive mosquito species *Aedes albopictus* found in the Czech Republic, 2012. *Eurosurveillance*. 17: 20301. doi.org/10.2807/ese.17.43.20301-en.
- Šebesta O., Šikutová S., Vojtíšek J., et al. 2021. Dlouhodobý monitoring invazních druhů komárů na jižní Moravě z pohledu rizika přenosu exotických virových nákaz. *Hygiena*. 66: 80-86. doi: 10.21101/hygiena.a1786.
- Vojtíšek J., Janssen N., Šikutová S., et al. 2022. Emergence of the invasive Asian bush mosquito *Aedes (Hulecoeteomyia) japonicus* (Theobald, 1901) in the Czech Republic. *Parasites and Vectors*. 15:250. doi:10.1186/s13071-022-05332-5.
- Vojtíšek J., Šebesta O., Šikutová S., et al. 2022. First record of the invasive mosquito species *Aedes koreicus* (Diptera: *Culicidae*) in the Czech Republic. *Parasitology Research*. doi:10.1007/s00436-022-07658-6.
- Žitko T., Merdić E. 2014. Seasonal and Spatial Oviposition Activity of *Aedes albopictus* (Diptera: *Culicidae*) in Adriatic Croatia. *Journal of Medical Entomology* 51: 760-768. doi:10.1603/ME13071.

Obrazová příloha



Obrázek 2: Komponenty pro sestavení ovitrapu (vlevo) a ukázka sestaveného ovitrapu (vpravo)



Obrázek 3: Ovitrapy připravené k zavěšení v terénu (vlevo) a detail naplněného ovitrapu (vpravo).



Obrázek 4: Ukázka vhodného umístění ovitrapů (preferujeme stinná a závětrná místa).



Obrázek 5: Ukázka nevhodného umístění ovitrapu (slunná a otevřená místa).



Obrázek 6: Sběr ovitrapu, uvolnění špachtle do vody (vlevo) a uzavření pasti k převozu (vpravo).



Obrázek 7: Příklad znečištění pasti přírodním materiálem (ponechává se v pasti) a ukázka sebrané pasti před uvolněním špachtle a uzavřením víčka (vpravo).



Obrázek 8: Nádoby k líhnutí po slití ovitrapů (vlevo) a po pěti týdnech inkubace vajíček (vpravo).



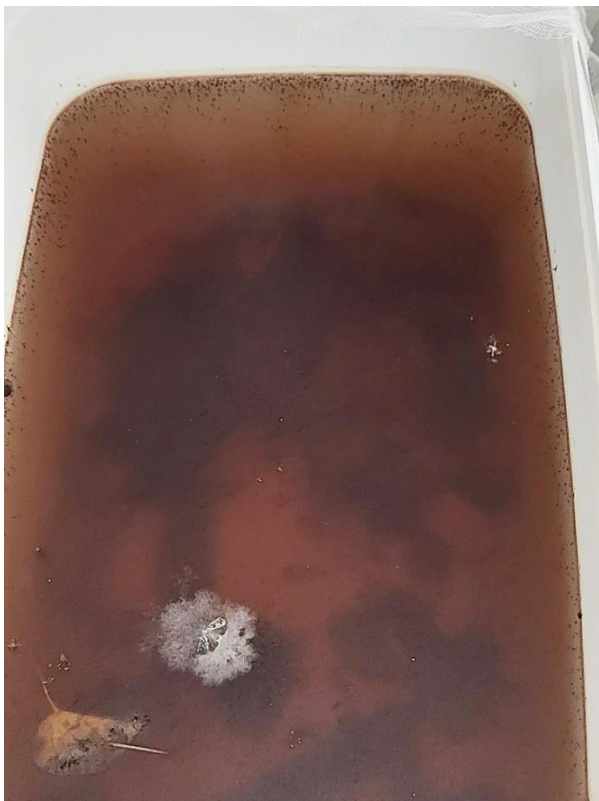
Obrázek 9: Umělá lýchniště (vlevo) a detail vypnuté gázy utěsněné kloboukovou gumou (vpravo).



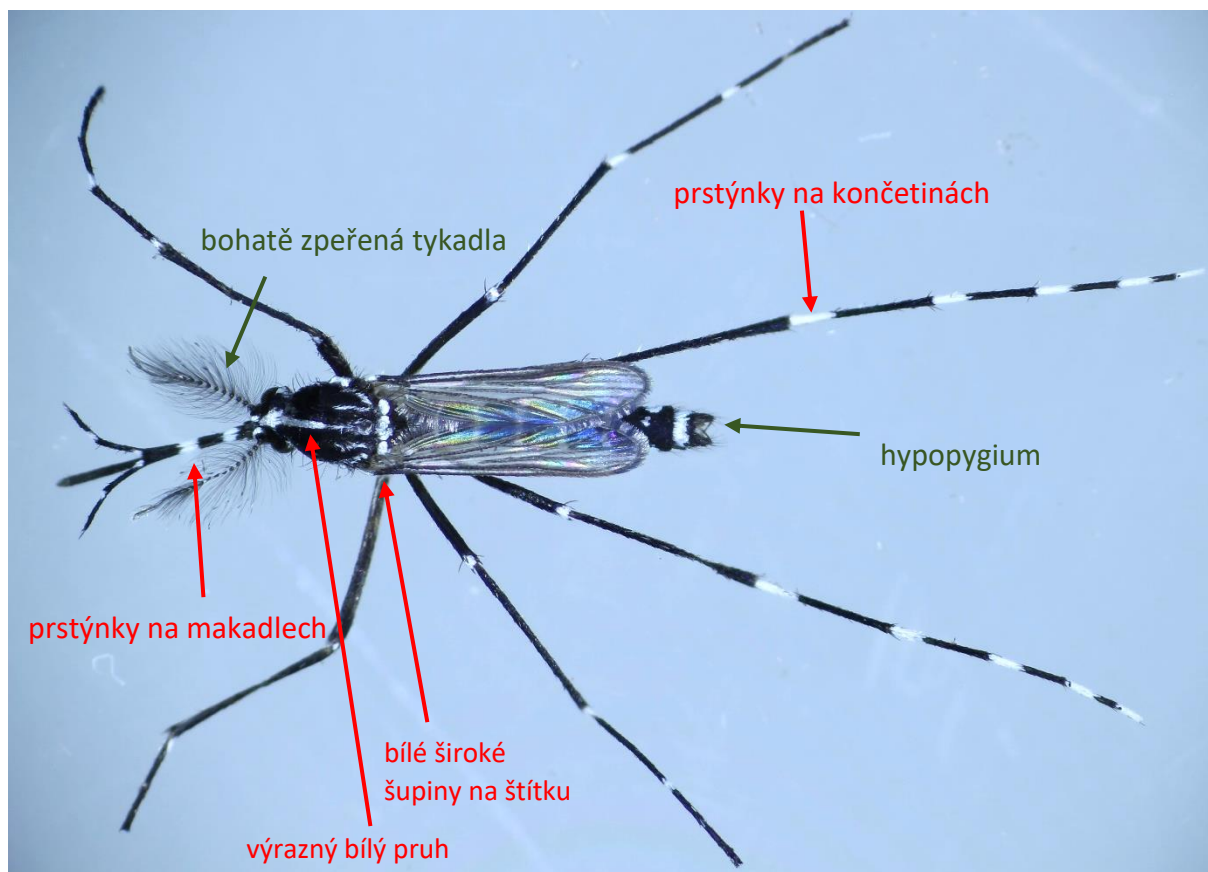
Obrázek 10: Ukázka utěsnění gázy při odsávání.



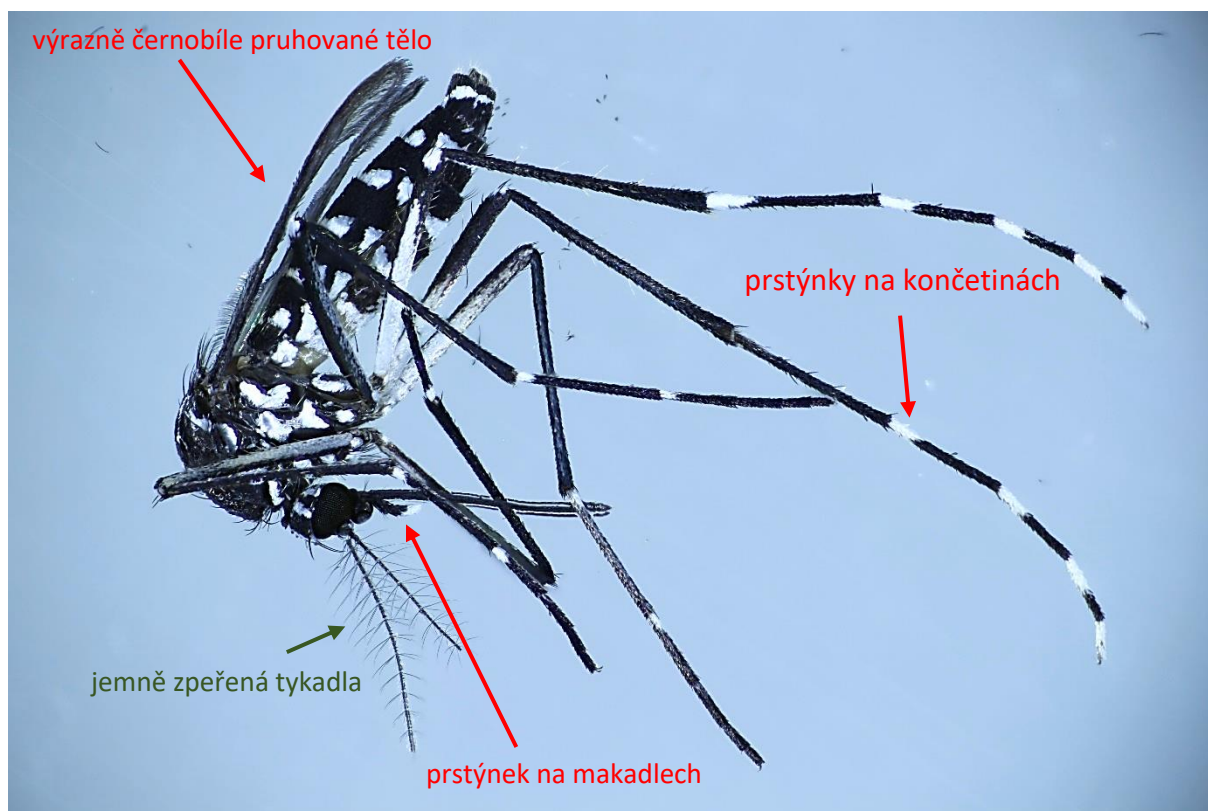
Obrázek 11: Larva *Aedes albopictus* v umělém líhništi.



Obrázek 12: Ukázka zkažené vody v umělém líhništi dříve než po pěti týdnech od slití.



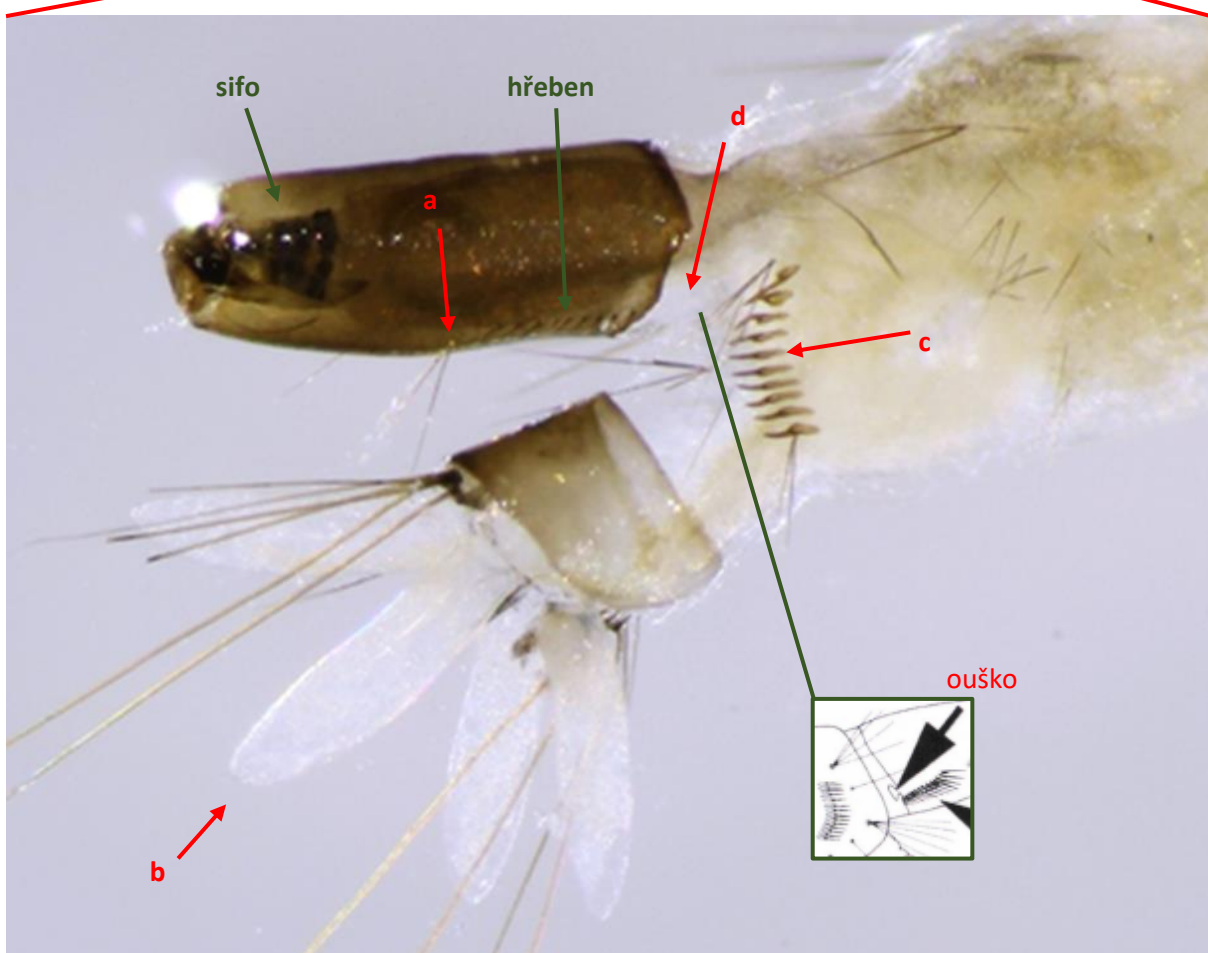
Obrázek 13: *Aedes albopictus*, sameček.



Obrázek 14: *Aedes albopictus*, samička.



Obrázek 15: Larva *Aedes albopictus* (celkový pohled)



Obrázek 16: Detail determinačních znaků larvy *Ae. albopictus*. (a) svazek sifonálních chlupů za posledním zubem hřebene na sifu; (b) anální papily nápadně dlouhé a rovnoměrně široké, na konci zaoblené; (c) šupiny v šupinové skvrně rozloženy v jedné řadě; (d) na bázi sifa není vytvořeno ouško