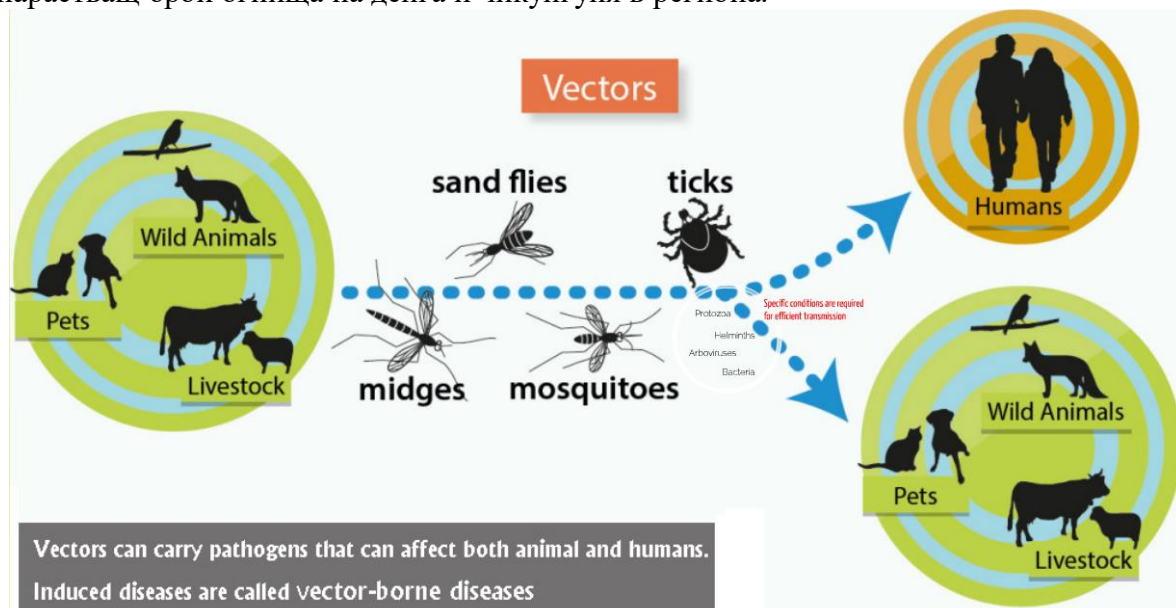


Определяне на компетентни векторни причинители посредством морфологични и молекулярно-биологични методи

Увод:

Векторно преносимите заболявания и установяването на компетентни вектори в европейския регион според СЗО (Световна здравна организация) е сериозен проблем. Фактори като глобализацията, увеличаващите се търговия и пътувания на населението, транспорта и търговията с животни, продължаващата урбанизация и промените в околната среда/климата допринасят за разпространението на компетентните вектори. *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* са примери за компетентни вектори, които са отговорни за тежки инфекциозни заболявания като денга и чикунгуня треска. Пътуващите мигранти от ендемични за такива инфекциозни болести страни, все по-често стават причина за изолиране на тези компетентни вектори в европейските региони и наличие на тези инфекциозни заболявания в Европа. През последните пет години СЗО отчита нарастващ брой огнища на денга и чикунгуня в региона.



Фиг. 1: Схематично представяне на предаване на инфекциозните заболявания посредством различни видове вектори

1. Значение и контрол на векторно предаваните заболявания и компетентните вектори, отговорни за инфекциите:

Векторно предаваните заболявания заемат сериозен процент от всички инфекциозни заболявания (> 17% от всички инфекциозни заболявания и са регистрирани 1 милион смъртни случая годишно). Контролът и ограничаването на компетентните вектори (артроподи) често е най-добрата стратегия, а понякога и единственият начин за защита на хората и животните от тези разрушителни заболявания.

Все по-често става ясно, че ефективният векторен контрол изисква мултидисциплинарен, базиран на общността и екологично устойчив подход, който отговаря на условията на отделните ДЧ (държави членки).

Vectors and the diseases that they can transmit	
Vector	Diseases
Mosquitoes:	
<i>Aedes aegypti</i>	Dengue, yellow fever, chikungunya, Zika virus
<i>Aedes albopictus</i>	Chikungunya, dengue, West Nile virus
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Lymphatic filariasis
<i>Anopheles</i> (more than 60 known species can transmit diseases)	Malaria, lymphatic filariasis (in Africa)
<i>Haemagogus</i>	Yellow fever
Sandflies	Leishmaniasis
Triatomine bugs	Chagas disease
Ticks	Crimean-Congo haemorrhagic fever, tick-borne encephalitis, typhus, Lyme disease
Fleas	Plague, Murine typhus
Flies (various species)	Human African trypanosomiasis, onchocerciasis

Фиг. 2: Вектори и инфекциозните заболявания, които могат да причинят

Необходима е работа по хармонизиране на методите и процедурите за мониторинг и активен контрол на компетентните вектори на ниво ДЧ в Европейски съюз (ЕС), за да се постигне по-добра превенция, наблюдение и контрол на инфекциозните заболявания. Трябва да се разработят подобрени методи за контрол на компетентните вектори и вирусните причинители на молекулярно ниво с цел по-доброто разбиране етиологията на инфекциите и поведението на компетентните вектори, както и движението на популациите и разпространението им в Европа.

1.2. Значимост на генетичните изследвания за по-широкообхватното разбиране на векторите и епидемиологията на заболяванията, предизвикани от тях и ефективните методи за контрол на заболяванията

В този мултидисциплинарен контекст, молекулярнобиологичните изследвания на векторните причинители играят основна роля за изясняване на епидемиологията на инфекциозните векторно преносими заболявания, разработването на успешни методи за контрол. Филогенетичните анализи на основните видове векторни причинители са помогнали за идентифициране, категоризиране и таксономично определяне на новооткрити видове и подвидове.

Молекулярната генетика и новоразработените инструменти за геномен и протеомен анализ са обещаващи методи в разбирането на генетиката и капацитета на векторите, включително охарактеризиране: предпочитани местообитания и гостоприемници, вроден имунитет, устойчивост на суша, инсектицидна резистентност и при разработване на нови атрактанти и репеленти.

2. Морфологично определяне на компетентни векторни причинители:

2.1. Видове капани и методи за лов на куликоиди, комари и пясъчни мухи като векторни преносители на много инфекциозни заболявания

Методите за вземане на проби за комари могат да бъдат разделени в четири основни категории: методи за събиране на възрастни индивиди, гнездящи възрастни индивиди, ларви и яйца. Комбинираното използване на тези методи зависи от целта на надзора или мониторинговата кампания, целевите видове, условията на околната среда в избраните места за вземане на проби и наличните ресурси.

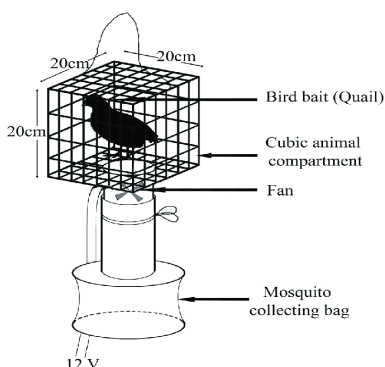
- **Метод за пробовземане посредством кацане върху човешки гостоприемник (Human landing collection (HLC)):**



HLC е вероятно най-старият и най-простият метод за събиране на женски комари. Антропофилните видове могат да бъдат ефективно събрани, когато HLC методът се прилага по време на пиковите на активност на векторните видове. Вземането на проби от комари през деня трябва да се извършва в сенчести райони. Тази методика на пробовземане крие доста недостатъци като: разходи за труд, риск от заразяване, дълъг период на пробовземане и трудоемкост. Заради тези неудобства се препоръчва фиксирана продължителност на вземане на проби (например 15 минути). Продължителността би могла да бъде намалена до пет минути, ако комарите са многобройни ($\geq 5 / 5$ мин). Резултатите зависят особено от уменията на колекционерите и от привличането на комарите

от гостоприемника. Пробовземането се извършва с аспиратор за уста (подобен е на аспираторът за нос за бебетата).

- **Капани с животни (Animal-baited traps):**



Комарите са привлечени от различни сигнали на редица гостоприемници, като те се различават при отделните видове вектори. Например *Culex* spp. предпочитат основно земноводни, *Culex pipiens* по литературни данни предпочита като гостоприемник птици, други животни и хора; някои видове *Anopheles* spp. предпочитат основно като гостоприемник хора и животни. Капаните с животни-гостоприемници включват различни животински видове: говеда, коне, кози, прасета, гризачи и различни птици. Векторите се

отстраняват директно от вързаното животно с помощта на аспиратор или се събират от стените на животинския обор. Животинските примамки често се използват в проучвания

за наблюдение на вируси на западно-нилската треска, но по-малко се използват в широкомащабни схеми за наблюдение.

- **Капани с CO₂:**



Капаните с CO₂, са най-често използваните капани за комари. Те се използват в комбинация със сух лед (произвеждащ въглероден диоксид чрез сублимация) или резервоар с въглероден диоксид и са много ефективен атрактант. Тези капани се хранят с батерии или имат самостоятелно хранене и могат да се доставят със или без източник на светлина. Те имат предимството, че са

прости, здрави, преносими, често работят с 3 x 1.2 V батерии и не се влияят значително от фоновата светлина в урбанизирани зони. Основният недостатък е необходимостта от достъп до сух лед или газообразен въглероден диоксид. Когато се използват със светлина, те събират повече мъжки комари, но това увеличава замърсяването на пробата с други нощни насекоми, главно *Lepidoptera* и нехематофазни *Dipterans*. Това увеличава времето за сортиране на улова и често забавя идентифицирането. Капаните с въглероден диоксид събират и други насекоми като *Phlebotominae* (пясъчни мухи), *Simuliidae* (черни мухи) и *Ceratopogonidae* (молци). Времето на работа на тези капани обикновено е ограничено от зареждането с CO₂ (максимум 24 часа) или от капацитета на батерията (12V, 10A, максимум 48 часа). Капаните, базирани на CO₂, са по-ефикасен инструмент за вземане на проби при наблюдение на патогени, пренасяни от комари, където са необходими живи индивиди. Допълнително предимство е, че сухият лед, оставен в изолирани контейнери, е отлична среда за съхраняване на улова по пътя към лабораторията. За настройка и управление на капаните са необходими опитни техници, а когато са необходими голям брой капани, за да обхванат голяма площ, може да са необходими няколко екипа.

- **Светлинни капани (Light traps):**

Светлинните капани най-често се използват при наблюдение на маларийните



преносители, но са използвани и при наблюдение на преносителите на арбовирусни инфекции. Светлинните капани работят през нощта и са най-ефективни, когато има малко осветеност на мястото. Предимствата на светлинния капан са, че е леснопреносим и лесно се хранят от 6-волтова батерия (или 3 x 1.2V батерии в светлинни капани, базирани на

CO₂). Недостатъците са, че тези капани привличат основно видовете, които ловуват през

деня и други видове насекоми, нецелени за определеното проучване. Въглероден диоксид обаче може да бъде добавен допълнително като атрактант, което може да бъде смятано за плюс. Заловените насекоми могат да бъдат тествани за арбовируси. Тъй като батериите на светлинните капани издържат само една нощ, е необходим достатъчен брой техники, ако светлинните капани трябва да се използват в мащабни проучвания или за по-дълъг период от време.

- **Стационарни капани (Gravid traps):**



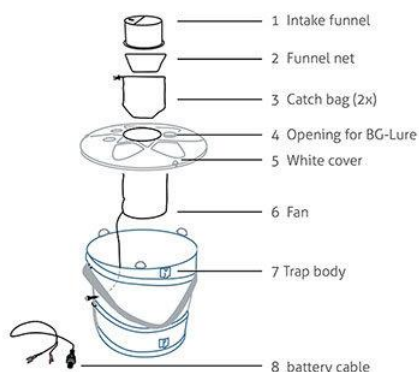
Тези капани се състоят от черна кофа с вода, сено или листа, и са предназначени за женски комари. Тези капани се използват при проучвания, свързани с разпространение на арбовируси чрез векторни преносители, тъй като вероятността за откриване на вирусни инфекции в напил се с кръв комар е по-висока, отколкото в проби, получени от капани с CO₂. По литературни данни тези капани не са особено ефективни за *Aedes spp.*, но тяхната ефективност може да бъде подобрена като се използват шума от дъбови листа или трева *Poa sp.*

- **Лепкави капани (sticky traps):**



Този вид капани могат да бъдат употребявани за събиране на яйца от комари или за флеботоми. Пробите могат да бъдат използвани за идентифициране на вида и скрининг на патогени. Пробите трябва да се събират ежедневно.

- Капани за комари *BG-Sentinel* и *Biogents*:



Тези капани са проектирани да привличат *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* със специфична химическа примамка (BG-Lure или Sweetscent).



Тяхната ефективност може да се увеличи чрез добавяне на примамка в капана (например животно в клетка) или чрез добавяне на източник на въглероден диоксид. Въглеродният диоксид прави капана привлекателен за широк спектър от видове комари (например *Culex pipiens* и *Anopheles plumbeus*). Капаните могат да работят непрекъснато, когато е налично захранване, но могат да работят и на една 12V батерия (което ограничава времето за работа).

- Капани за комари Magnet:



машабни проучвания.

Капаните за комари Magnet са смукателни капани, базирани на CO₂, които произвеждат въглероден диоксид чрез изгаряне на бутан. По този начин те могат да се използват на отдалечени места без захранване и до три седмици. Могат да се добавят химически атрактанти като Lurex (L-млечна киселина) и октенол (1-октен-3-ол). Няколко проучвания са потвърдили ефективността на капаните като *Mosquito Magnet Liberty Plus* за широко неспецифично вземане на проби. Основни недостатъци на тези капани са, че те са големи, тежки и сравнително скъпи, което може да бъде сериозно ограничение за използването им в

2.2. Сортиране на уловите:

Уловите биват сортирани по морфологични признаци и по видове. Биват отделени нецелевите видове от целевите с цел избягване на „замърсяване“ на пробата.

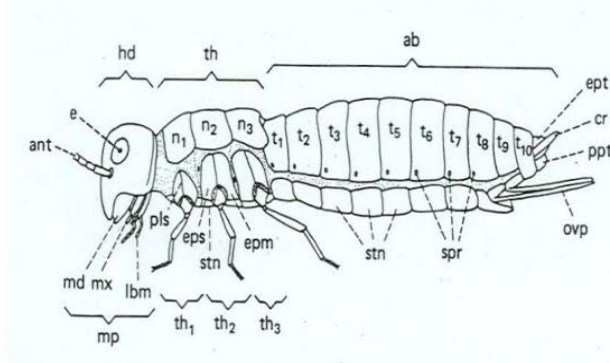


Пробите пристигат в лабораторията в етанол и в специални колекторни контейнери. Всяка проба щателно се изсипва/излива в петриева паничка и под стереоскоп започва същинското сортиране по видове и определяне по морфологични признаци.



2.3. Морфологично определяне на векторите посредством наблюдение под стереоскоп:

Морфологичното определяне на компетентните вектори стандартно се извършва посредством таксономични идентификационни ключове (определители) - **TAXONOMIC KEY**, включващи морфологичните характеристики на всеки таксономичен вид инсекти и наблюдение на пробите под стереоскоп.



hd = head
th = thorax
ab = abdomen
ant = antenna
e = compound eye
t = terga (tergum)
stn = sterna (sternum)
spr = spiracles
mp = mouthparts
md = mandible
mx = maxilla
lbm = labium

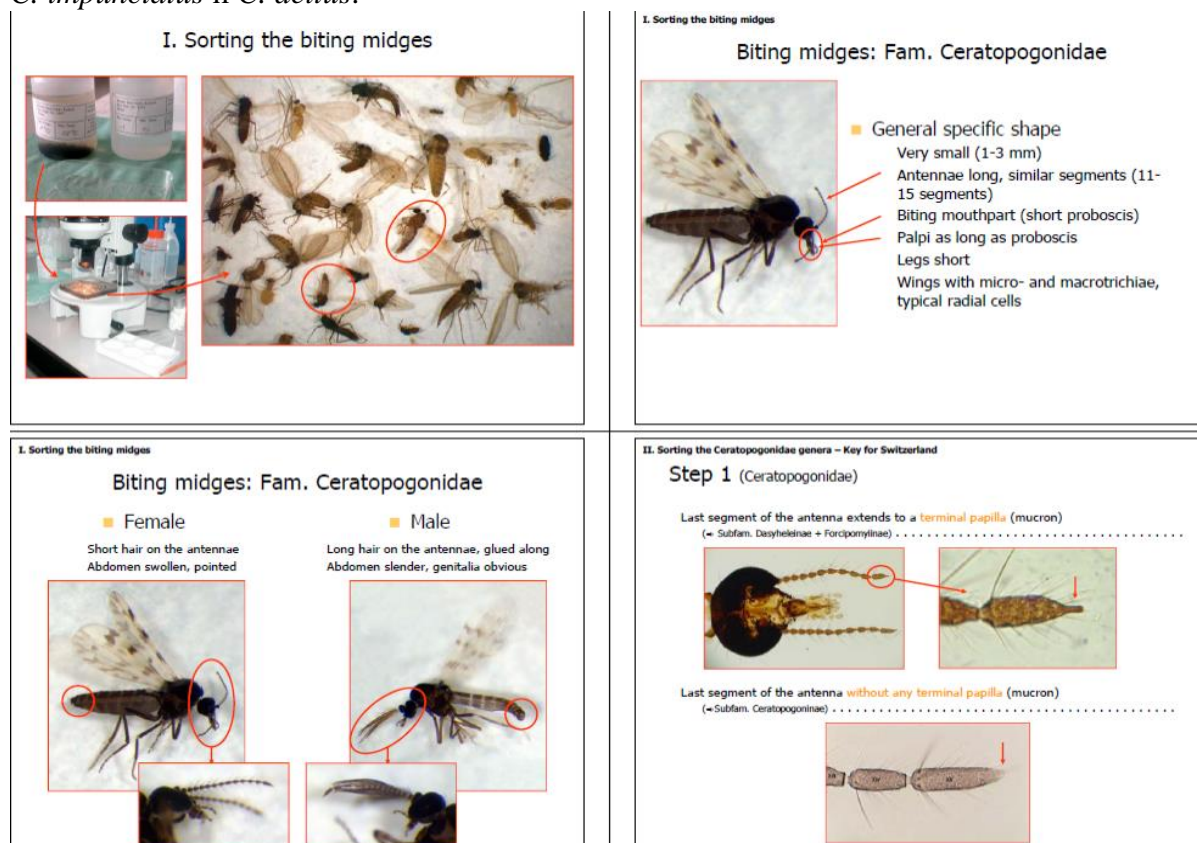
Фиг. 3: Морфология на насекоми

2.3.1. Морфологично определяне на куликоиди:

Куликоидите (*Diptera: Ceratopogonidae*) са вектори на редица патогени от медицинско и ветеринарно значение. Въпреки икономическото им значение, идентифицирането на видовете посредством само морфологично идентифициране и посредством разглеждане само на еволюционните връзки между видовете от този род остава проблематично. През последните години молекулярното баркодиране е допринесло значително за идентифицирането на видовете от род *Culicoides* spp. в многобройните проекти за ентомологично проучване, които са инициирани в много европейски страни след епидемията от син език през 2006–2009 г. Тези изследвания и проекти спомагат разкриването, определянето и типизирането на потенциално нови видове или класифицирането им във „видови комплекси/групи“ с голяма генетична и морфологична вариабилност.

Culicoides spp. е силно разнообразен род с повече от 1300 вида, разпространени по целия свят. Един от подродовете с много видове, представени в Европа, е *Culicoides*. Броят на видовете, които включва подродът *Culicoides* не е определен морфологично напълно, тъй като различни автори използват термина „видови комплекси/групи“ с голяма морфологична вариабилност, която комбинира свързани таксони и вероятно не включва няколко неописани видове.

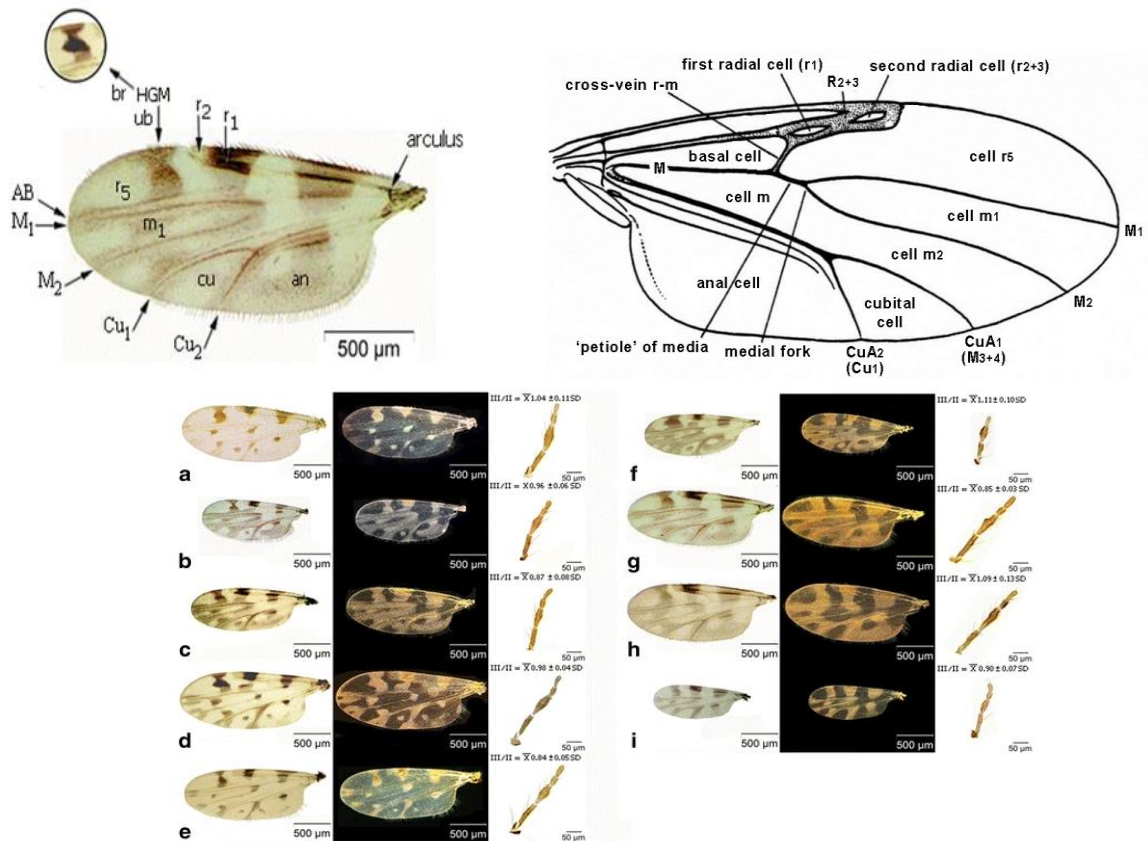
Според Кембъл и Пелхам-Клингтън подродът *Culicoides* е морфологично характеризирани с крила с тъмни петна на светъл фон, а апикалната трета от вторите радиални клетки са включени в бледа област. В клетката на крилото присъства тъмно петно във формата на часовниково стъкло (r5). Клетката във формата на часовниково стъкло може да бъде прекъсната или непрекъсната. Кубиталната клетка (cu) може да бъде със или без тъмно петно. При някои видове, които обикновено нямат петно в кубиталната клетка, петно може да се появи при някои от екземплярите на видове, напр.: *C. impunctatus* и *C. deltus*.



Фиг. 4: Основни морфологични признаци и пример за морфологичен ключ/определител за *Culicoides* spp.

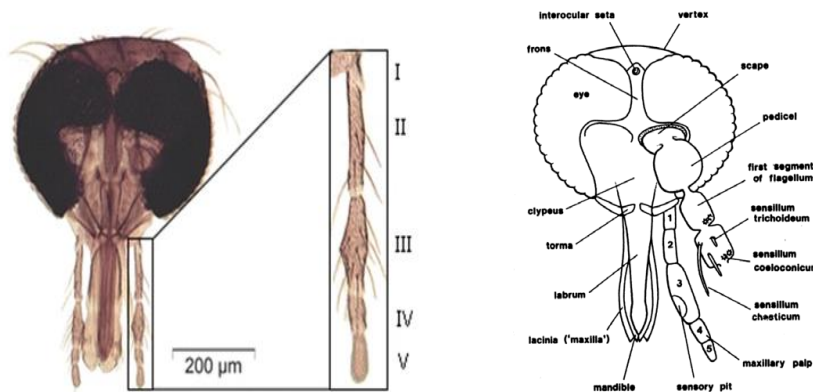
За събиране на куликоиди най-ефективни по литературни данни са така наречените light traps / OVI traps. Капанът *Onderstepoort* се произвежда в Южна Африка (ARC - Институт за селскостопанско инженерство). От 1996 г. този тип капани се използва основно за лов на *Culicoides* spp. в няколко страни в Европа, напр. Италия, Гърция, Швейцария, също във Франция и България.

Все пак определянето на *Culicoides* на ниво видове е трудно дори за специалисти таксономи. Доказано е, че родствените видове във видовете комплекси са трудно разграничими по морфология. За да се преодолее това, се прилагат молекулярни методи (COI-баркодинг или други молекулярни маркери) за определяне и типизиране на видове от род *Culicoides*, особено тези, отговорни за разпространението на заболявания по домашните животни.



Wings (bright and dark field images) and maxillary palpa of female *Culicoides* (*Culicoides*) from Scandinavia. a: *C. boyi*; b: *C. selandicus*; c: *C. kalix*; d: *C. punctatus*; e: *C. pulicaris*; f: *C. newsteadi*; g: *C. deltus*; h: *C. grisescens*; i: *C. impunctatus*.

Фиг. 5: Морфологичен изглед на крила при различните видове куликоиди



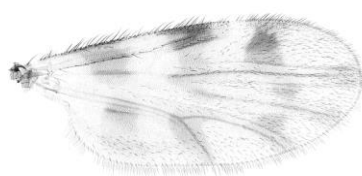
Фиг. 6: Изглед на главата при куликоиди

В много проучвания е трудно да се разграничат тясно свързаните видове куликоиди, което затруднява разбирането за това кои видове участват като вектори. Например във Великобритания популациите от групата на *Obsoletus* и *Pulicaris*, от различни географски места, се характеризират с различна чувствителност към един и същи щам на вируса на болестта син език, което може да отразява различна чувствителност между различни видове (*sensu stricto*). Следователно е необходимо с помощта на морфологични и молекулярно биологични методи да можем да различаваме различните видове.

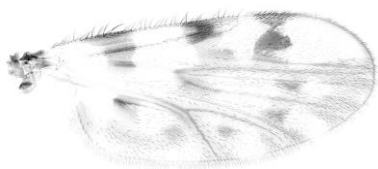
Видови комплекси според окраската на крилата:

Повече от 1250 вида са идентифицирани до момента. Повечето от тях са с чернокафяв цвят на тялото с характерни бели и тъмни петна по крилата

- ***C. obsoletus* група:** най-разпространеният вид на ниска надморска височина. *C. obsoletus* групата включва 4 морфологично сходни видове (*C. obsoletus*, *C. scoticus*; *C. dewulfi* и *C. Chiopterus*).



- ***C. pulicaris* група:** много често и широко разпространена и преобладаваща на голяма надморска височина. *C. pulicaris* групата включва основно два обособени вида: *C. pulicaris* и *C. punctatus*).



- ***C. impunctatus* група:** често срещана в северната част на Европа, където е много разпространена и в големи популации. Видовете от *C. impunctatus* групата са отговорни за предаването на животински вируси като: син език (BTV), африканска чума по конете (AHSV), епизотична хеморагична болест (EHFV).

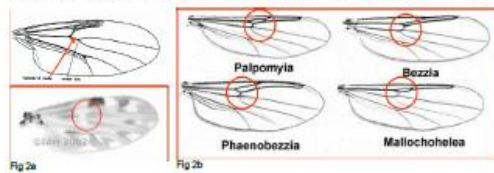


4. Identification key to adult Ceratopogonidae genera observed in Switzerland

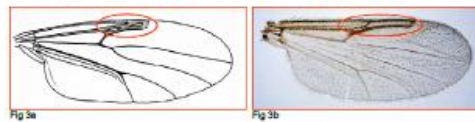
1. Last segment of the antenna extends to a terminal papilla (mucron, Fig 1a-b) 2
 (= Subfam. *Dasyheleinae* + *Forcipomyiinae*)
 - Last segment of the antenna without any terminal papilla (Fig 1c) (= Subfam. *Ceratopogoninae*) 4



2. Obvious empodium between claws, claws markedly curved, wings with long macrotrichia, second radial cell not square-ended (= Subfam. *Forcipomyiinae*) 3
 - Small empodium between claws, claws not markedly curved, wings without long macrotrichia, second radial cell square-ended (= Subfam. *Dasyheleinae*) *Dasyhelea*
3. Wings with large and conspicuous macrotrichia, macrotrichia when present scattered, second radial cell elongated; fringe on posterior border in single row of short hairs *Abitichopogon*
 - Wings with minute macrotrichia, macrotrichia abundant on greater part of the wing, first radial cell narrow, fringe complex with several rows of hairs, tibia often bearing scales *Forcipomyia*
4. Wing: media petiolate, forking distal to level of r-m cross-vein (Fig 2a) 5
 - Wing: media sessile, forking at or proximal to level of r-m cross-vein (Fig 2b) 11



5. Claws small, equal and simple; empodium small; macrotrichia usually abundant; two more or less equal radial cells usually present (Fig 3a) *Culicoides*
 - Claws usually large (small for males); empodium absent; macrotrichia absent or scanty; one or two radial cells, if two, the second usually larger (Fig 3b) 6



6. Second radial cell elongated and much longer than the first 7
 - Second radial cell small, not or little longer than the first 9
7. Hind femur enlarged or greatly swollen 8
 - Hind femur slender *Ceratopogon*
8. Hind femur greatly swollen and arcuate, and armed with numerous ventral spines; female claws equal on fore and mid legs *Serromyia*
 - Hind femur enlarged; female claws greatly unequal *Kolencholela*
9. Female claws equal on all legs; radial cells obsolete or short 10
 - Female claws equal and small on fore and mid legs, single and long with basal tooth on hind leg; radial cells narrow *Schizolela*
10. Female claws equal and large on all legs, usually with one or two basal teeth; radial cells usually obsolete, sometimes one or both present, then short and of equal size *Brachypogon*
 - Female claws equal and small at least on hind legs, without basal tooth; first radial cell obsolete, second present but small *Ceratoculicoides*
11. Fifth tarsomere armed ventrally with stout, black, blunt spines (batonnets); two radial cells *Mallocholela*
 - Fifth tarsomere unarmed or provided only with slender, sharp-tipped spines; one or two radial cells 10
12. Two radial cells; fore femur often swollen *Palpomyia*
 - One radial cell *Bezzia*

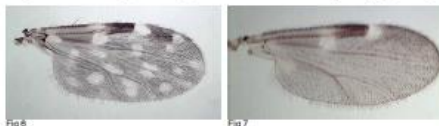
In bold: characters to be checked for a rapid identification of *Culicoides* spp.
 Wings of males are slightly slender and patches are less visible.

5. Identification key to relevant adult *Culicoides* species or groups for Switzerland

1. Wing with a distinct pattern of pale and dark spots (Fig 4) 2
 Wing without a distinct pattern (Fig 5) Group VI



2. Wing with more than 10 light or dark spots; second radial cell partly or entirely dark (Figs 4, 5) 3
 Wing with less than 10 light or dark spots; second radial cell entirely dark (Fig 7) Group V



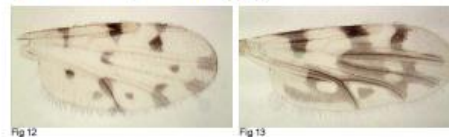
3. Wing with well-defined light and dark spots; macrotrichia covering the whole wing or at least extending into the anal cell (Fig 8) 4
 Wing without well-defined light and dark spots; macrotrichia confined to the apical area (Fig 9) 6



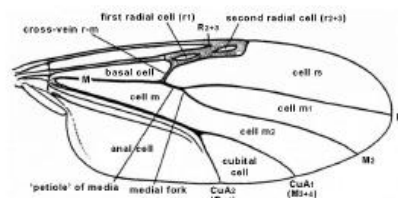
4. Wing with dark spots on a pale ground; second radial cell only partly dark (Fig 8,10) 5
 Wing with pale spots on a dark ground; 2nd radial cell partly or entirely dark (Fig 11) Group IV



5. Wing without pale spots at the apex of veins M1 and M2; diabolo-shaped dark spot in cell r5 with complete distal border (Fig 12) Group I – *Pulicaris* s.l.
 Wing with pale spots at the apex of veins M1 and M2; diabolo-shaped dark spot in cell r5 with incomplete distal border (Fig 13) Group II – *Punctatus*



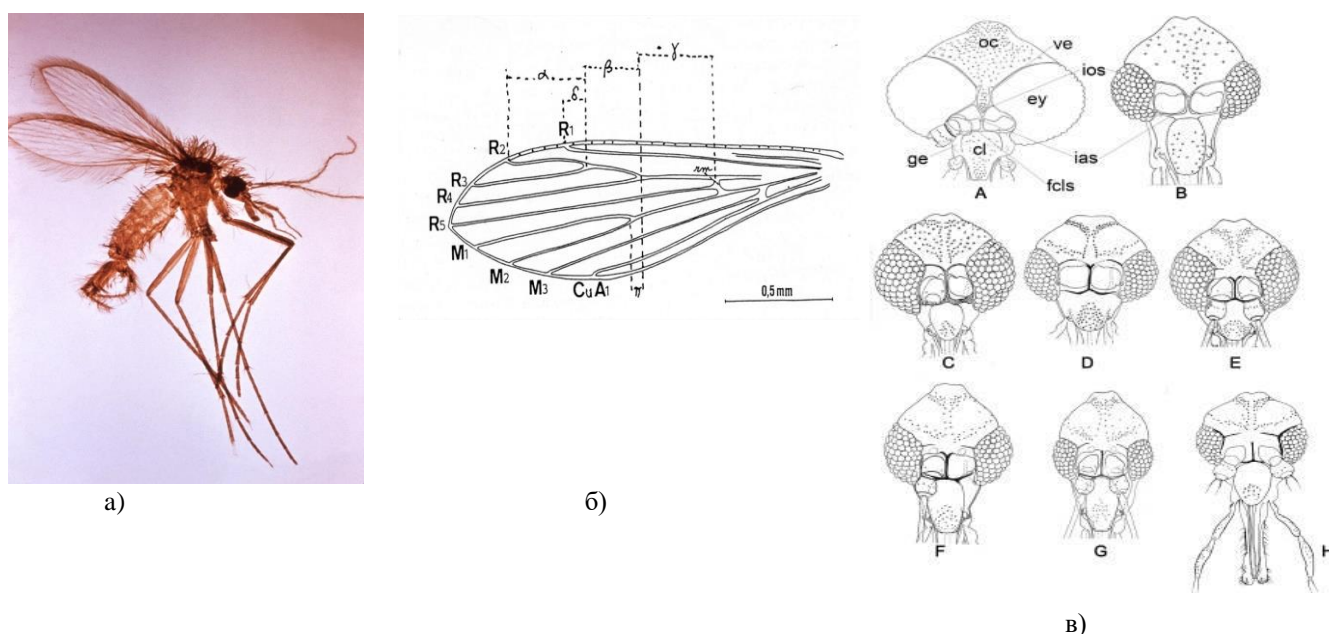
6. Pale spot in the apex of cell r5 from being small/weakly defined to large/better defined, but sometimes absent; this spot either ovoid, round or square in shape; vein M2 without a distinct preapical excision (Fig 14) Group III – *Obsoletus*
 Pale spot in apex of r5 large/well-defined, its anterior margin distinctly pointed; vein M2 with a distinct preapical excision (Fig 15) *C. imicola*



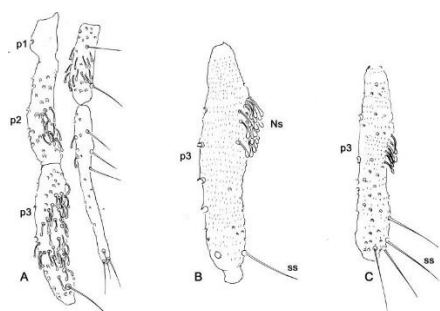
Фиг. 7: Идентификационен морфологичен ключ/определител за *Culicoides* spp.

2.3.2. Морфологично определяне на флеботоми:

Пясъчните мухи (*Diptera: Psychodidae, Phlebotominae*) са от съществено значение за общественото здраве и в много части на света играят роля на векторни причинители на лайшманиозата, бартонелозата и треска на пясъчната муха. Пясъчните мухи са единствените доказани вектори на лайшманиозата, като приблизително 800 вида са регистрирани в пет основни рода: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* и *Warileya*. Лайшманиозата остава една от най-пренебрегваните болести в целия свят. Ендемична е в 98 страни, като са изложени на риск 350 милиона души, с около два милиона нови случая всяка година. Проучвания върху флеботомите (*Diptera: Psychodidae*) показват, че циркулират основно два рода: *Phlebotomus* и *Sergentomyia*, включващи 44 вида. Следователно идентифицирането на пясъчните мухи с цел борба с векторните преносители на лайшманиозата и контрола на инфекциозното заболяване е критично. Три вида капани се използват за събиране на пясъчни мухи: лепкави капани, миниатюрни светлинни капани на CDC и ръчен аспиратор.

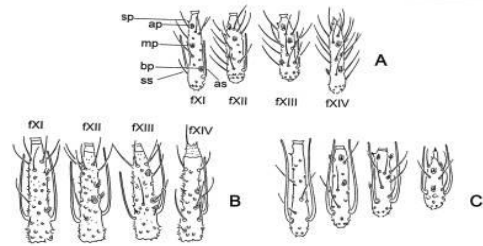


Фиг. 8 а) Снимка на *Phlebotominae* под стереоскоп, б) Разположение на вените на крилата, в) Дорзален изглед на главата на *Bruchomyiinae* и *Phlebotominae* (A – G): (A) *Bruchomyiinae* (*Bruchomyia* sp.); (B) *Phlebotominae: Warileya phlebotomanica*; (C) *Brumptomyia brumpti*; (D) *Sergentomyia (Sergentomyia) minuta*; (E) *Pintomyia - Pifanomyia maranonensis*; (F) *Lutzomyia - Helcocyrtomyia tejadai*; (G) *Lu- Helcocyrtomyia blancasi*; (H) *Phlebotomus- Euphlebotomus barguesae*.

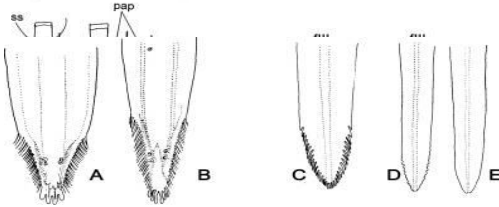


Фиг. 9: Палти на *Phlebotominae*. (A) 1-ви и 5-ти палпален сегмент на флеботомините: сенсилата на Нюстед (Ns) се разпръсна на p3 и присъства от 2-ри до 5-ти сегмент - *Psathyromyia nastalekatzi*. (B) Сенсилата на Нюстед се концентрира върху основната част на сегмента и само една единствена сетя - *Microcyrtomyia echinathorax*. (C) Няколко сети на p3 - *Warileya phlebotomanica*.

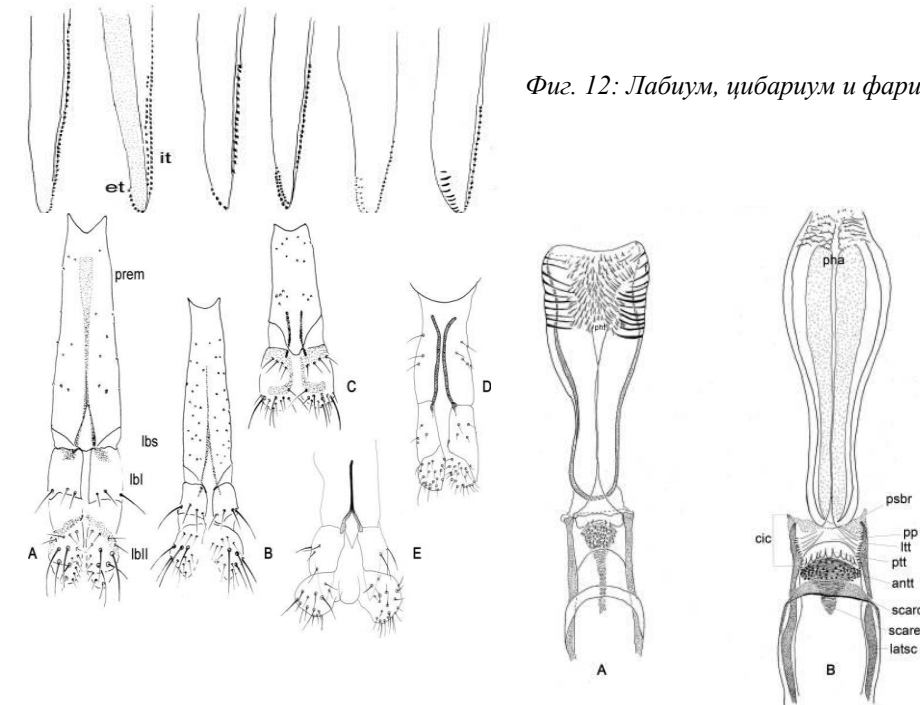
Фиг. 10: Схематично представяне на флагелумите на *Phlebotominae*



Фиг. 11: Схематично представяне на устно-челюстния апарат на *Phlebotominae*.



Фиг. 12: Лабрум, цибариум и фаринкс на женски *Phlebotominae*.



Фиг. 13: Пример за дихотомичен идентификационен ключ за морфологично определяне на флеботоми

Structures	Characters	Measurements	Description	Drawing
Gentalia (M)	Clusters of setae: presence and position/absence	L, W	X	X
	Sclerotized band in the ventral margin/presence/absence		X	X
Gonostyle	Spines: number, position, and aspects (size and thickness)	L	X	X
Parameres	Dorsal and ventral margin	L	X	X
	Shape and covering bristle		X	X
Parameral sheath	Dorsal and ventral margin	L	X	X
	Shape		X	X
Epandrial lobes	Permanent setae: presence/absence	L, W		X
Cerei; cercus (sing.)		L, W	X	X
Sperm pump		L, W	X	X
Ejaculatory apodeme		L, W	X	X
Aedeagal ducts	Tip shape	L	X	X
	Presence/absence		X	X
Gentalia (F)				
VIII tergite	Setae: presence (number)/absence		X	X
IX tergite	Protuberance: presence/absence		X	X
Spermathecae	Shape	L	X	X
Terminal knob	Shape		X	X
Spermathecal individual ducts	Aspects: sclerotization, striation	L, W	X	X
Spermathecal common duct	Aspects: sclerotization, striation	L, W	X	X
Genital fork	Aspects of chamber and stem		X	X
Cerei; cercus (sing.)		L, W	X	X
X sternite	Number of setae		X	X

Structures	Characters	Measurements	Description	Drawing
Head (MF)				
Occiput and clypeus	Distribution of the setae			X
Clypeus		L, W		X
Eyes		L, W		
Eye facets				X
Interantennal suture			X	X
Interocular sutures			X	X
Flagellomeres	f1, f2, f3, f12, f13, f14	L		X
	Position of the internal and external ascoids on f1		X	X
	Ascoidal formula		X	
	Number and position of papilla(e)		X	X
	Simple setae: position		X	X
Palpi	p1, p2, p3, p4, p5	L		X
	Palpal formula		X	
	p2, p3 – Newstead's sensilla: presence and position/absence		X	X
	p3, p4: Numbers of spiniform setae		X	X
Labrum-epipharynx		L		X
Hypopharynx (F)	Apical teeth		X	X
Maxillary lacinia (F)	External and internal teeth: position		X	X
Labium (MF)	Labial suture: open or in furca		X	X
Cibarium (F)	Anterior teeth: horizontal/vertical/lateral position		X	X
	Posterior teeth: numbers		X	X
	Lateral teeth: presence/absence		X	X
	Sclerotized arch		X	X
	Sclerotized area		X	X
	Teeth: presence/absence		X	X
Pharynx (MF)				
Cervix (MF)				
Cervical sensilla	Number		X	
Ventro-cervical sensilla	Presence/absence		X	
Thorax (MF)		L		
Sclerites	Coloration		X	
Mesonotum	Post-alar setae: presence/absence		X	
Pleural sclerites	Paratergital setae: presence/absence		X	
	Proepimeral setae: presence/absence		X	
	Upper anepisternal setae: presence/absence		X	
	Lower anapisternal setae: presence/absence		X	
	Anepimeral setae: presence/absence		X	
	Metaepisternal setae: presence (number)/absence		X	
	Metaepimeral setae: presence/absence		X	
	Setae on the anterior region of the katepisternum: presence/absence		X	
	Suture between mesepimeron and metaepisternum: presence/absence		X	
Metafurca: vertical arms	United/separated		X	
Wing	r5	L		
	Alpha, beta, gamma, delta, pi	L		
Legs	Coxa, femur, tibia, tarsomeres (ti, sum of ti, tiii, tiv, tv)	L		
	Metafemur-spines: presence/absence		X	
	Metatarsomere iii number of verticils with spines		X	
Abdomen		L		
Tergites ii-v (MF)	Setae forming or not two bands		X	
Tergites ii-vii (M)	Tergal papillae: presence/absence		X	

Морфологичните определители за флеботоми, които най-често се използват и са включени в проекта VectorNet са: *Theodor O*; *Artemiev MM*; *Lewis DJ*; *Lane RP*; *Niang AA*, *Hervy J-P*, *Depaquit J*, *Bousses P*, *Davidson I*, *Geoffroy B*, et al.; *Killick-Kendrick R.*, *Tang Y*, *Killick-Kendrick M*, *Sang DK*, *Sirdar MK*, *Ke L*, et al.; *Perfiliew PP*.

Става все по-ясно, че за да се разграничат флеботомите по видове и да се определят в отделни таксони, е необходимо използването на съвременни техники, а не да се разчита единствено на морфологичното типизиране. Използването на статистически подходи, като модели, основаващи се на дискриминантни или многовариантни анализи, използвани в морфометричните проучвания, също може да допринесат за идентифициране на вътрешно- и междуспецифични разлики.

По отношение на идентифицирането на видове с помощта на методи, различни от традиционните дихотомични ключове, разработването на кибертаксономични определители може да улесни тази задача за неспециалисти или когато е необходимо да се идентифицират много екземпляри или при работа на терен.

Често използваните морфологични и морфометрични параметри за определяне на възрастни индивиди трябва да се допълват постоянно, вземайки предвид и други данни като поведенчески, биохимични, екологични и молекулярни данни. Силно се препоръчва използването на молекулярни техники за видово определяне на уловите като например баркодинг методиката. Желателно е маркерите, използвани в молекулярния

анализ да бъдат стандартизирани и генните последователности да бъдат депозирани в бази данни със свободен достъп, за да се разшири и обогати морфологичното определяне на видовете и да се достигне и до филогенетичен анализ и определяне на произхода им.

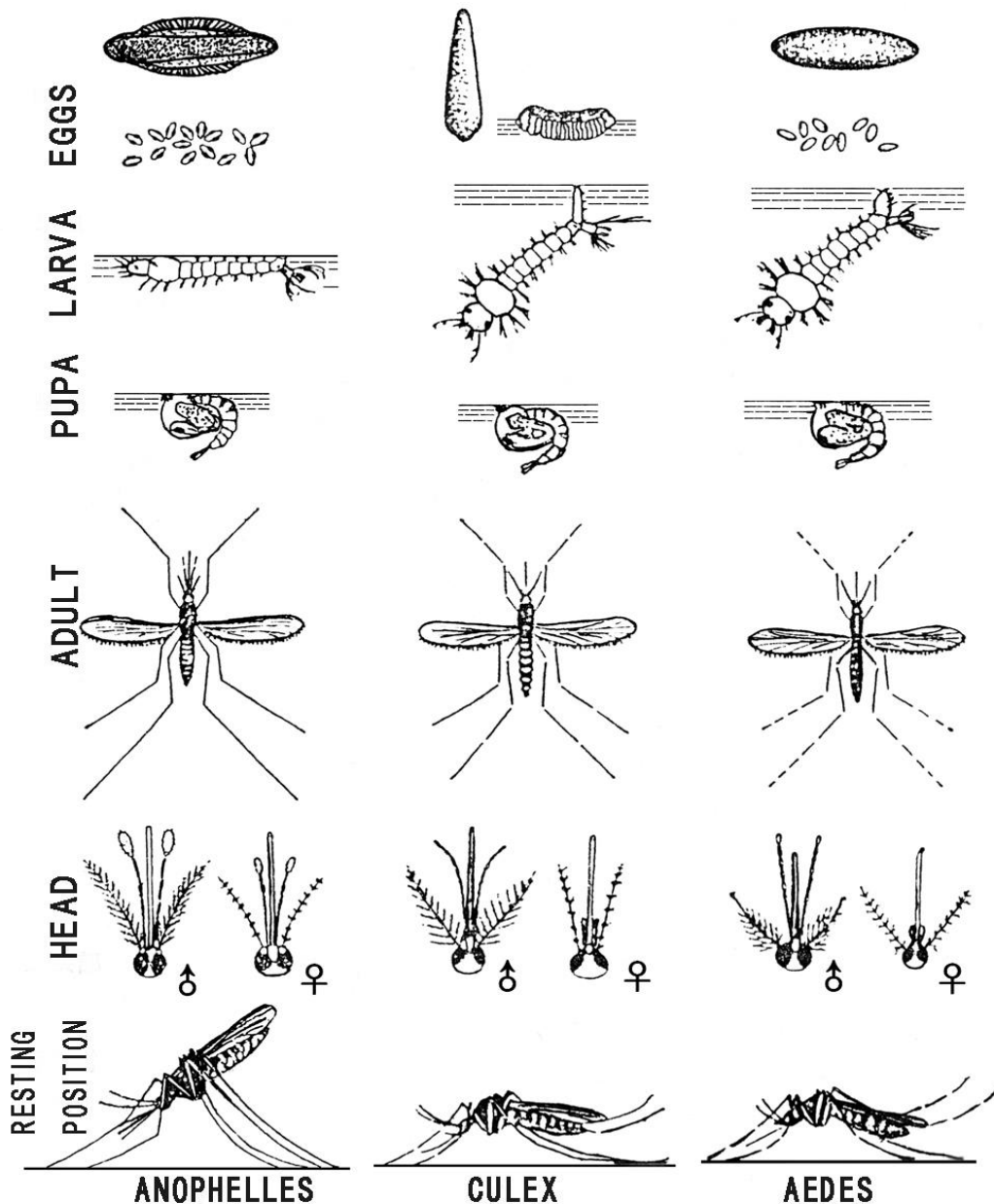
2.3.3. Морфологично определяне на комари:

Комарите принадлежат към род *Diptera*, семейство *Culicidae* и са представени от 3490 признати до момента видове, групирани в 44 рода.

Идентификацията на рода и вида може да се извърши чрез стандартни ентомологични признаци като фенотип, яйца, ларви, хабитат и др. По-новите техники за видово определяне включват биохимични техники като MALDI-TOF, баркодинг и секвентен анализ. Те успешно се използват за разграничаване на морфологично подобни видове във видов комплекс (например *Anopheles gambiae* -комплекс, *Culex pipiens*-комплекс).

Повечето традиционни морфологични идентификационни ключове са организирани в серия от алтернативни признаци, които могат да бъдат дихотомични (всеки признак/параметър има две алтернативи) или политомични (две или повече опции при всеки избор). На практика повечето от тях са смесица от дихотомен и политомен последователен избор.

В рамките на тези два типа ключове, дихотомичните ключове от *Becker et al.* и компютърни програми като *MosKeyTool* са сред най-често използваните за идентифициране на комари в Европейски регион.



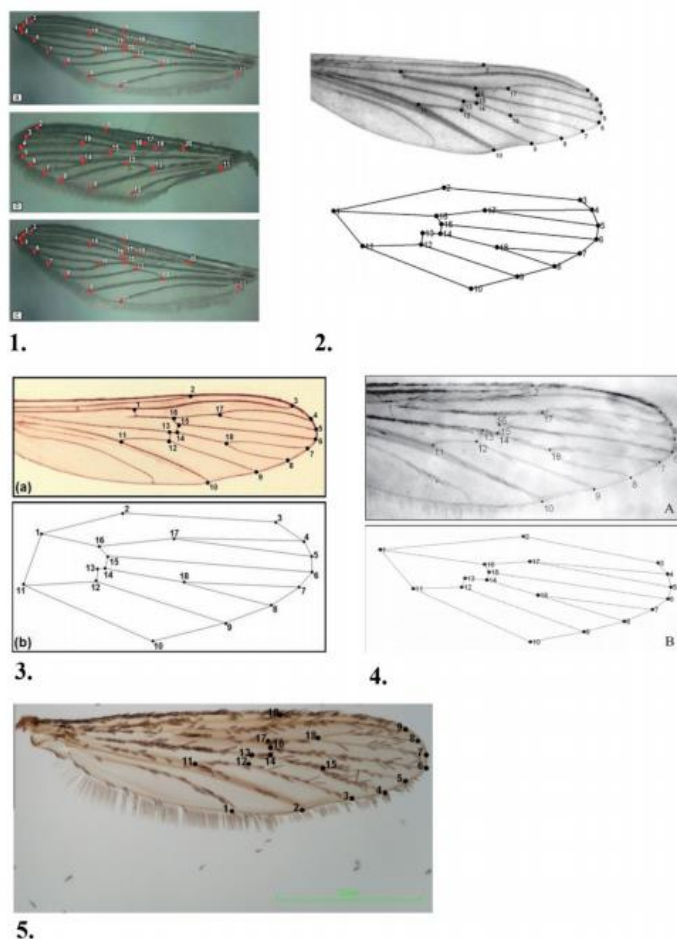
Фиг. 14: Схематично представени морфологични различия при комари от трите основни рода *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* в различни етапи от жизненият им цикъл

Морфология на крилата:

Крилата на комарите имат някои отличителни белези, които вече са били използвани за разграничаване на родовете, между видовете от един и същи род, между популациите от даден вид и между полове от един вид. Геометричните морфометрични анализи се провеждат чрез сравняване на ориентировъчни точки между крилата с помощта на техники като прокрустов анализ. Ориентирите са точки на разклонение на вените на крилата и пресечни точки между вените или между вена и ръб на крилото. Следователно крилата на комарите могат да бъдат подходящ фокус за автоматизиран компютърен софтуерен инструмент за идентификация, основан на разпознаване на изображения. Тези изображения биват публикувани в бази данни и чрез анализ и използвайки различни алгоритми за разпознаване на изображения, биха могли да бъдат таксономично определени до род и вид. Има вече създадени мобилни приложения за

смартфони, които след заснемане с мобилното устройство на уловения екземпляр и публикуване на снимката в базата данни, дават обратна връзка с информация за фотографирания екземпляр- род, вид и др.

Фиг. 15: Сравнение между различни точки при морфометрични изследвания на крилото на комари:
1: Белези по крилата на *Aedes aegypti* (отгоре), *Aedes albopictus* (в средата) и *Aedes pseudotaeniatius* (отдолу); 2: белези на *Aedes aegypti*; 3: Белези на *Anopheles bellator*; 4: Белези на *Culex quinquefasciatus*; 5: Белези по крилата на *Aedes albopictus*.



При възрастните индивиди друг определящ признак може да бъде различие в поведението между различните родове – например - в кой часови диапазон се хранят различните видове – например много видове *Aedes* и *Ochlerotatus* хапят през деня или привечер, докато възрастните от много видове *Culex*, повечето видове *Mansonia* и *Coquillettidia* хапят през нощта. Подробното разграничаване на единичните родове на *Culicinae* е представено от *Borror* и *DeLong*, 1971г.

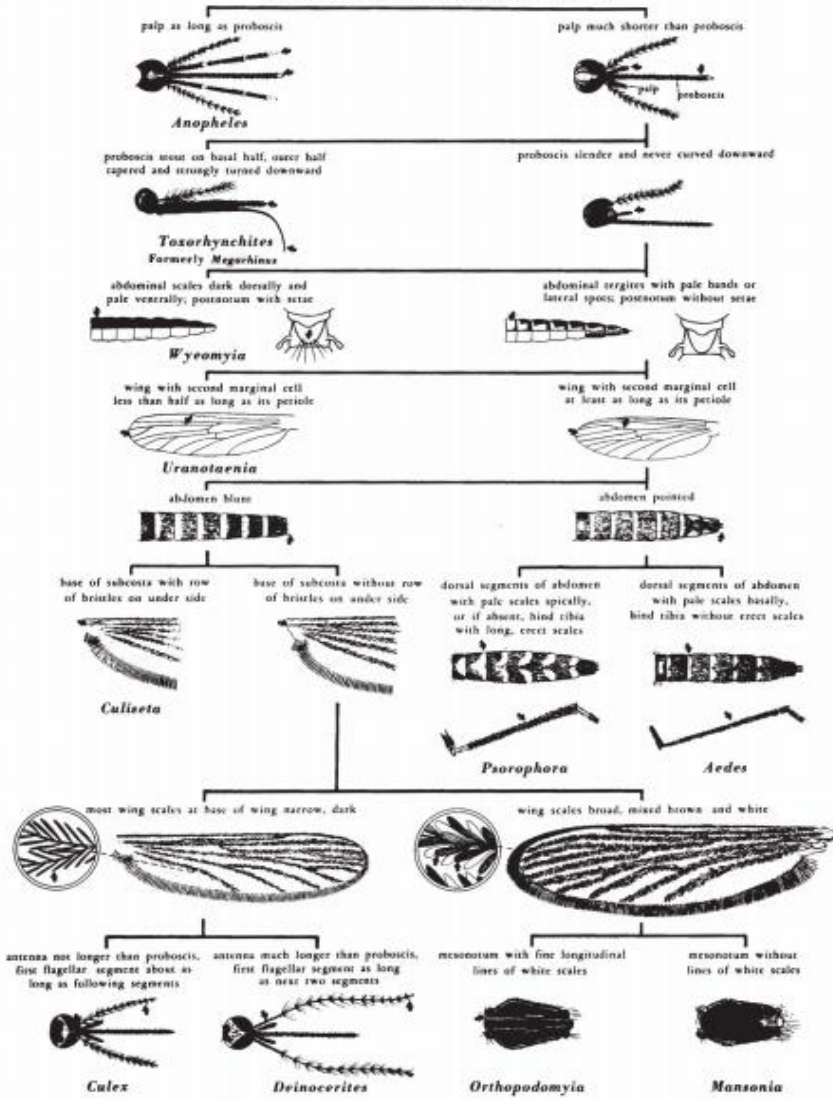
Често използвани определители (морфологични ключове) за комари са: *Neotropical Culicidae* (Lane, 1953; Mattingly, 1971; Forattini, 2002) и за родовете и подродовете на *Anopheles* (González & Carrejo, 2009; Harrison et al., 2012), *Culex* (Bram, 1967), *Haemagogus* (Levi-

Castillo, 1954; Arnell, 1973), *Aedes* (*Howardina*) (Berlin, 1969), *Aedes* (*Ochlerotatus*) (Arnell, 1976), *Trichoprosopon* (Stone, 1944; Zavortink, 1979) и *Wyeomyia* (Judd, 1998; Motta & Lourenço-de-Oliveira, 2000). Родовите и субгенеричните имена на комарите следват по-новата класификация, предложена от *Wilkerson et al.* (2015), наличен в Систематичен каталог на *Culicidae*, *Walter Reed Biosystematics Unit* (WRBU, 2017).

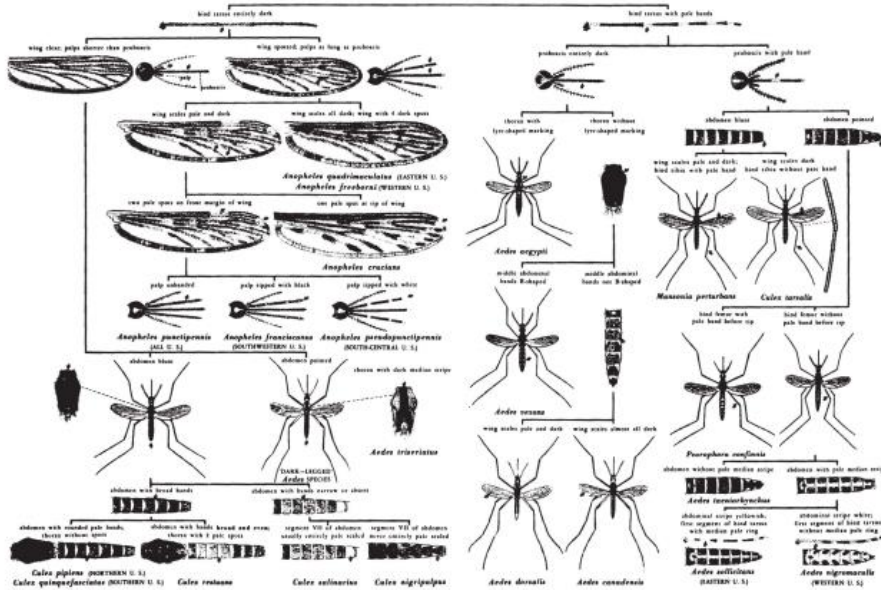
Най-подходящи за ловене на комари са капаните тип: улов чрез кацане върху гостоприемник, капани с жива животинска примамка – птици, коне и др., CO₂ капани, капани с химически атрактанти и най-вече light traps (OVI traps).

MOSQUITOES: PICTORIAL KEY TO UNITED STATES GENERA OF ADULTS (FEMALE)
 Harry D. Pratt and Chester J. Stojanovich

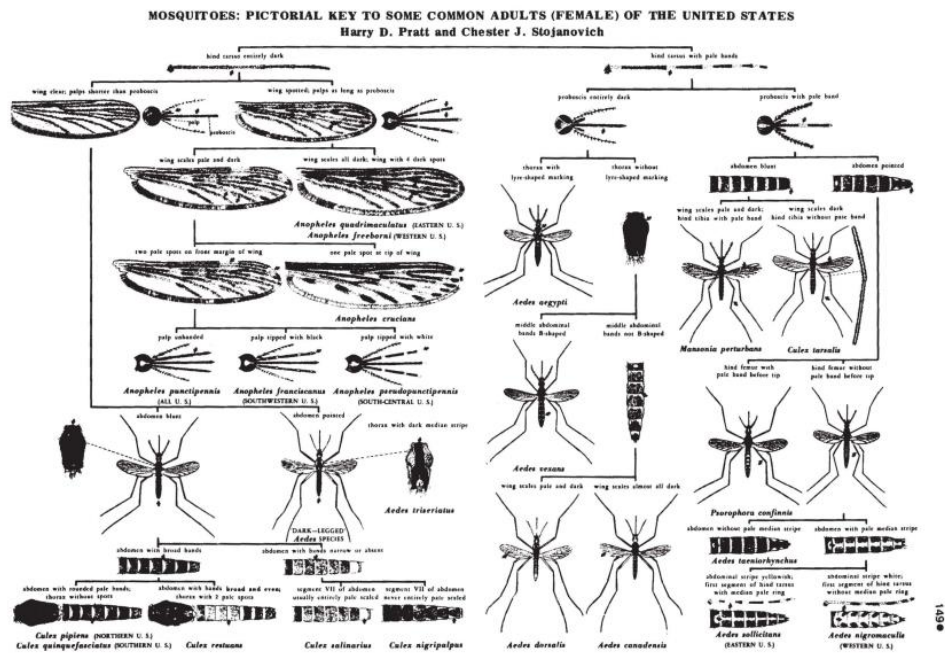
a)



MOSQUITOES: PICTORIAL KEY TO SOME COMMON ADULTS (FEMALE) OF THE UNITED STATES
 Harry D. Pratt and Chester J. Stojanovich



b)



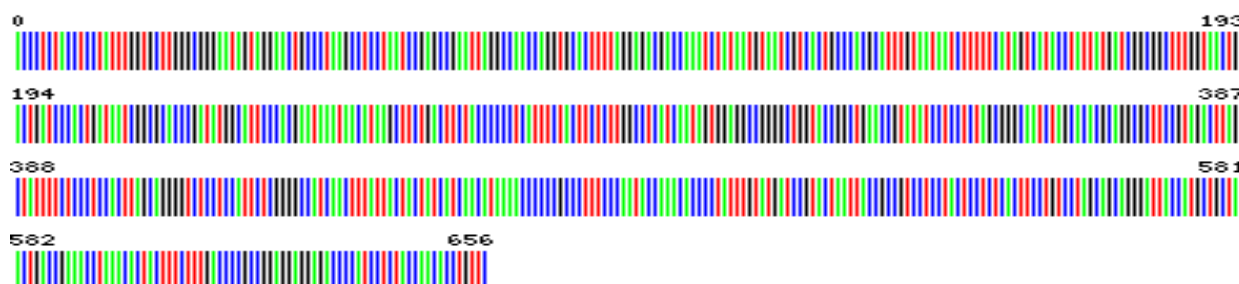
B)

Фиг. 16 а, б, в: Пример за илюстриран определител за Culicidae на CDC

В обобщение, морфологичната таксономия и молекулярната характеристика са двата основни подхода, използвани при идентифицирането на видове. Таксономичните ключове, използвани при морфологична идентификация на комарите, зависят главно от външните признаци на възрастните индивиди и ларви от четвърти стадий, при които екземплярите трябва да се обработват и съхраняват внимателно, без да се увреждат външните им характеристики, което практически не е възможно през цялото време. Освен това този подход се нуждае от експертен опит и е много времеемък, а като резултатност - не идентифицира факторите като генетични вариации и фенотипна пластичност, които могат да окажат влияние върху идентифицирането на индивидите на ниво видове. Като алтернатива, ДНК баркодингът или молекулярният подход при охарактеризиране и определяне на видовете, са ефективен метод за идентификация на видове и таксономично определяне, тъй като за кратък период от време се получават резултати с висока точност и информативност на данните. Молекулярната таксономия позволява на изследователите да идентифицират индивиди на ниво вид или подвид, да разберат повече информация за генетичното разнообразие и да направят прогнози за еволюцията и филогенетичните взаимосвързки между изолатите. Сред всички групи насекоми, по научни данни комарите са най-интензивно изследваната група посредством методите на баркодинг и геномен секвентен анализ, поради изключително голямото им значение като вектори на много животозастрашаващи заболявания при животни и хора.

3. Молекулярно биологични методи:

3.1. Баркодинг:



ДНК базираните методи за таксономично идентифициране на компетентните вектори значително повишават чувствителността и специфичността на морфологичното идентифициране на членестоногите. ДНК баркодирането е молекулен подход за идентифициране на видове, който включва използването на къса ДНК последователност (баркод), която има малка вариабилност в рамките на вида. Към днешна дата молекулярните изследвания на артроподите демонстрират потенциала на ДНК баркодинга чрез по-нататъшно включване в анализа и на географско разпределение и генетично разнообразие на видовете. Понастоящем най-често използваният баркод регион за животни е 5-сегмент от митохондриалния ген цитохром оксидаза I (COI), наречен "универсален" или „фолмер“ регион. Този регион е стандартният маркер, избран от базата данни Barcode of Life (BOLD), която е онлайн платформа за събиране и утвърждаване на информация за баркодиране на ДНК от цял свят (*Ratnasingham and Hebert, 2007*). Използването на множество гени може да помогне да се разграничат членовете на видови комплекси и подгрупи, които са тясно свързани видове, които може да не са генетично разграничени при използване само на един баркодиращ регион (*Foster et al. 2013; Jiang et al. 2014*).

ДНК баркодът за животинските видове най-често включва локуси, намиращи се в mtДНК и в общият случай е фрагмент от 658 базови двойки от гена, кодиращ цитохромоксидаза I (COI или COX1).

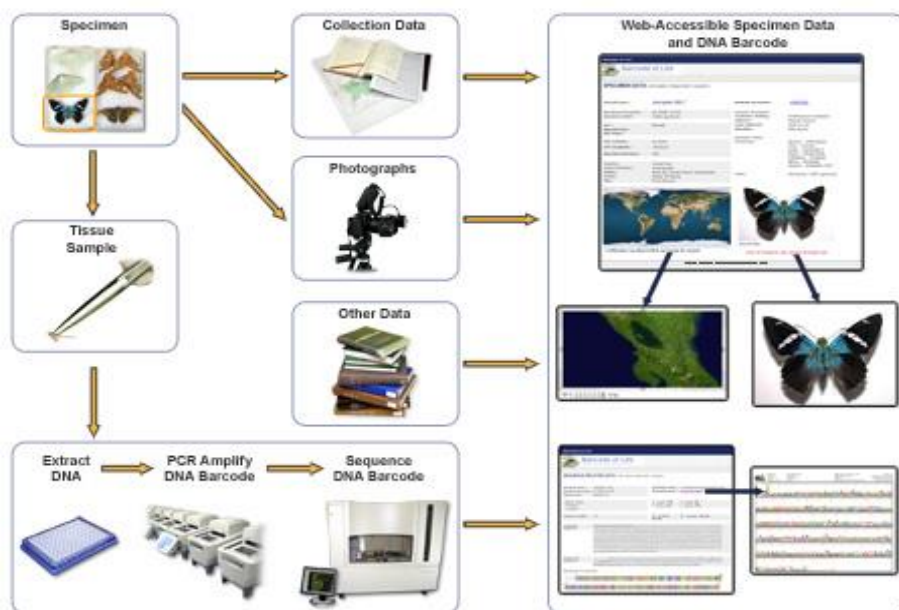
„Глобалната система за биоидентифициране“, наречена така от Hebert et al., се управлява чрез базата данни Barcode of Life Data Systems (BOLD), която по данни от месец юни 2017 г. съдържа почти 5 500 000 генерирани баркодове на над 265 000 вида животни, растения и гъби. Системата BOLD е уеб базирана работна среда и база данни, обхващаща генерирането, съхранението, анализа и публикуването на ДНК баркодове и може да служи като референтна библиотека за ДНК баркодове. BOLD е най-видимо използваният софтуер за баркодиране и е свободно достъпен за всеки изследовател с интереси в тази област.



Фиг. 17: Последни данни от системата за броя генерирани баркодове към 01.2019г.

Процесът на ДНК баркодинг включва два основни етапа:

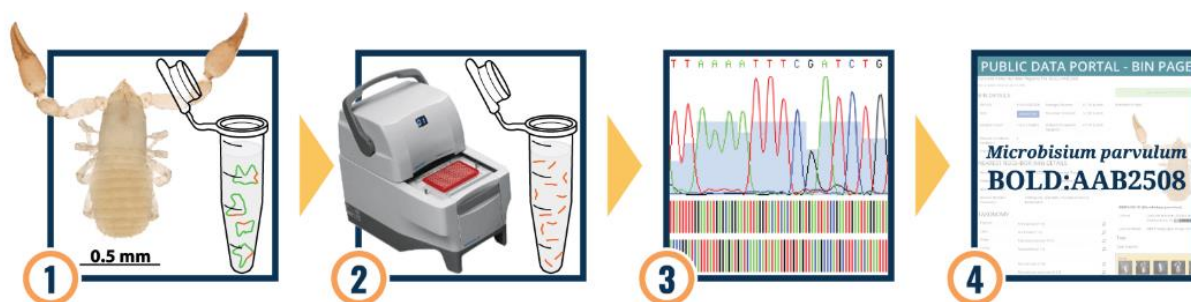
1. Събиране на база данни от баркодове на таксономично познати видове, които да служат като референтни.
2. Съпоставяне на референтните ДНК баркодове на видовете от базата данни с такива, които са неидентифицирани или са непознати видове животни, растения и други организми.



Фиг. 18: Схематично представен процес по „генериране“ на баркод

Първият етап включва таксономична експертиза при избора на няколко индивида от вид, служещи като еталонни проби в базата данни с ДНК баркодове. Тези проби могат да бъдат взети както от хербарии и музейни експонати, така и от живи животни и растения на терен. След като референтната библиотека за ДНК баркодове е подготвена за изследваните организми, независимо дали е включена информация за географския регион, от който са събрани, таксономична група или целева група, тогава ДНК баркодовете, генерирани за неидентифицираните изследвани проби се сравняват с референтните баркодове, като се използва алгоритъм на съпадение. Повечето алгоритми включват сравняване на две ДНК последователности с цел измерване на разстоянието между секвенциите. В ДНК баркодинга, обикновено се използва алгоритъм за намиране на най-близката до неизвестната последователност в базата данни. BLAST (Basic local alignment search tool) е инструмент за търсене на съпадение на нуклеотидни или пептидни последователности, който се предоставя от GenBank базата данни за търсене на съответствие между две секвенции, в случая два ДНК баркода. Два други често използвани алгоритми са Kimura-2-Parameter Distance и Smith–Waterman Algorithm, подобни на BLAST.

Стандартната оперативна процедура по баркодинга включва няколко основни етапа:



1. Събиране на проби;
2. Подготвителен етап на пробата и процес на лизиране на пробата;
3. ДНК екстракция;
4. Мерене на количество екстрахирана ДНК посредством Nanodrop и разделяне на фрагментите посредством електрофореза;
5. Полимеразно верижна реакция – амплификация на таргетния участък, кодиращ цитохромоксидаза I (COI или COX1);
6. PCR за пречистване на продуктите;
7. Секвентен анализ;
8. Пречистване на продукта след секвентния анализ;
9. Анализ на резултатите от секвенирането;
10. Подравняване и сравняване на секвенциите посредством програми като BioEdit и BLAST в бази данни като BOLD и NCBI;

Относно събирането на пробите, те могат да бъдат, цели организми, части от организми, тъкани, кръв и др. Пробите могат да бъдат замразени (-20°C/-80°C), поставени в сух лед или в течен азот, съхранявани в спирт или формалин, с цел да бъдат транспортирани до лаборатория или да бъдат съхранени за определен период от време.

При мониторинг на векторно предаваните заболявания таргетната цел при пробовземането е събиране на самите вектори, преносители на заболяването, а именно – комари, мухи, пясъчни мухи, табаниди и кърлежи. При този вид проби първоначалната обработка преди екстракцията на ДНК е много важна – необходимо е разделяне на насекомите в отделни епруветки и замразяване с течен азот и лизиране на хитиновата обвивка на насекомите. При инсектите качеството и количеството на екстрахираната ДНК е от съществено значение за последващите стъпки по генериране на баркод. Установено е, че инкубация на насекомите в 95% етанол или замразяването им в течен азот спомага по-бързото лизиране на клетките. Необходима е и механична хомогенизация посредством ръчен пестик или автоматичен такъв.

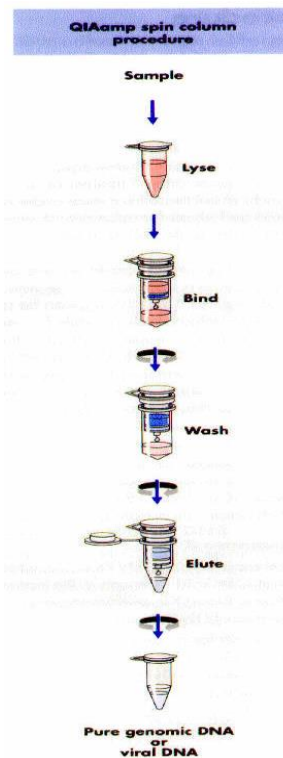
Екстракция на ДНК

Извличането на ДНК може да се извърши по много и различни протоколи за екстракция и посредством различни търговски китове. Методите на екстракция могат да бъдат, както мануални, така и автоматизирани чрез роботи за екстракция. За екстракция на ДНК, методите на базата на мембрана от силикагел са доказали, че дават добър добив ДНК с високо качество. В сравнение с други технологии за екстракция, тези методи са лесни за работа, сравнително евтини и позволяват висока производителност (96-ямков формат).

Процесът по екстрахиране на ДНК най-общо включва няколко подетапа: лизиране на клетките/тъканите, пречистване на екстрахирания продукт и елуиране на ДНК. Готови китове като *prepGEM® Insect* на фирма *ZyGEM* или *ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit* на фирма *Thermo Fisher SCIENTIFIC*, *DNeasy Blood and Tissue Kit* на фирма *Qiagen* са най- често препоръчвани в научните среди за процеса на изолиране на ДНК от инсекти.

При спин колонковият метод на екстракция, предложен от Qiagen, екстракцията на ДНК отнема около 45 мин и включва следните стъпки:

Предварително хомогенизирана тъканта се прехвърля в 1,5 мл микроцентрифужна конична епруветка и към нея се добавя 180 µl буфер ATL. След това се добавят 20 µl протеиназа К и се вортексират, след което се инкубират при 56°C, с цел лизис на хомогената от насекомите, което изисква 1–3 ч. Времето на инкубацията варира според вида и състоянието на пробите от насекоми. След инкубацията към лизата се добавя буферен разтвор (200 µl буфер AL + 200 µl 96% - 100% етанол). След това всяка проба се прехвърля в DNeasy Mini spin колонка, която се поставя в 2 мл събирателна епруветка и пробите се центрофугират в продължение на 1 минута при скорост 8000 об/мин. След тази стъпка се изхвърля събирателната епруветка и спин колонката се прехвърля в нова събирателна епруветка и се добавят 500 µl миеш буфер AW1 и етапът на центрофугиране се повтаря. Следва второ „миене“ с 500 µl миеш буфер AW2 и центрофугиране със скорост от 14,000 об./ мин, за да се изсуши мембраната с ДНК на спин колонката. Спин колонката с ДНК се премества в нова епандорфка от 1,5 мл добавят се 200 µl буфер АЕ (елуиращ буфер) и пробите се центрофугират на 8000 об./мин, за да се елуира ДНК.



Лабораторията „Animal Production and Health“ към ИАЕА в Зайбърсдорф, Виена има разработен и верифициран свой протокол за екстракция на ДНК от инсекти.

Предложеният от ИАЕА протокол включва предварителна подготовка на няколко разтвора:

- Екстракционен буфер: 0.1 M NaCl
 - 6.8% захароза
 - 0.1 M Tris-Cl pH 9.1
 - 0.05 M EDTA pH 8.0
 - 0.5 % SDS
- 6M KAc pH 6.5 (8 M) буфер
- Наситен разтвор фенол/ хлороформ (1:1)
- Хлороформ/изоамилов алкохол (24:1)
- 70% етанол

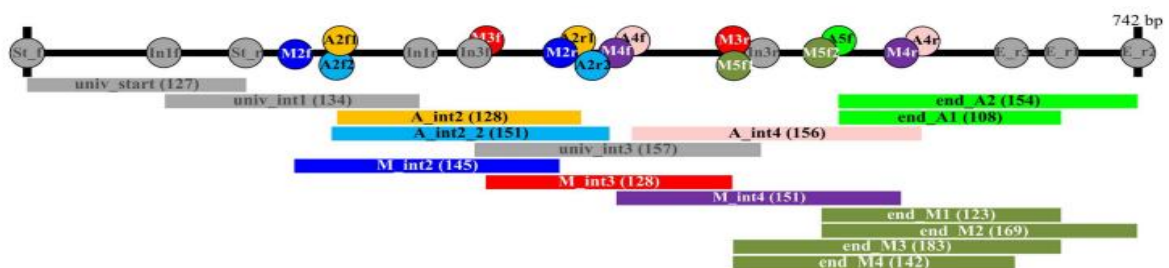
За по-лесно хомогенизиране на инсектите се препоръчва предварителна подготовка на пробите: замразяване на инсектите в течен азот или поставянето им в 96% етанол. Екстракционният буфер се загрява при 68°C. Епандорфките с инсектите се изваждат от

течния азот и към тях се добавя половината от количеството екстракционен буфер. Следва стъпка на хомогенизиране на пробите. След това се добавя останалото количество буфер и пробите се инкубират при 68°C на водна баня за минимум час до максимум 24 часа (ON) с цел разграждане на хитиновата обвивка на насекомите и пълно лизиране на клетките. Добавя се разтвора на 6М КАС към лизираните проби, след което епендорфките с пробите се разклащат внимателно и се поставят върху лед за най-малко 1 час до максимум 24 часа (ON). Следваща стъпка от екстракцията е центрофугиране за 10 мин при максимална скорост 15 000 об./мин. Супернатантата се прехвърля в чиста епендорфка. Незадължителна последваща стъпка е: Добавяне на наситен разтвор 1:1 фенол/хлороформ към супернатантата и центрофугиране, с цел разделяне на фазите. Това е етапа на пречистване на ДНК. Извършва се второ пречистване с хлороформ/изоамилов алкохол и супернатантата се прехвърля след последващо центрофугиране в нова стерилна епендорфка. Добавя се равен обем изопропанол или 2.5 обемни единици етанол. ДНК пробите се оставят за около 15 минути (най-малко) при стайна температура да се инкубират и след това се центрофугират при 15,000 об./мин в продължение на 15 – 20 минути. Следва промиване на пелетата със 70% етанол и центрофугиране на максимална скорост. Предпоследна стъпка е отстраняване на етанола и сушене на пробите. Последната стъпка в този протокол на екстракция е добавяне на елуирация буфер ТЕ 50 µl.

Полимеразно верижна реакция (PCR):

Полимеразно верижната реакция (PCR) на локусите, кодиращи митохондриалната цитохром С оксидаза I (COI) за повечето групи животни е много сходна. Основната разлика е изборът на специфични праймери за отделните таксони. Затова преди намножаване на целевите фрагменти от ДНК е необходим предварителен дизайн на праймери, които да амплифицират точните фрагменти от генома, кодиращи митохондриалния цитохром С оксидаза I (COI) баркодиращ регион. При дизайна на праймерите трябва да се съблюдават няколко условия:

1. Праймерите трябва да са с дължина между 20 и 30 bp.
2. Съдържанието на G/C трябва да бъде приблизително 50%.
3. Трябва да бъде избягвано повторение на моно- или динуклеотиди в праймерите.
4. Праймерът трябва да завършва на G или C.
5. Температурата на топене на двойките праймери трябва да бъде съобразена с цел избягване на неспецифично свързване.
6. С цел най-прецизен дизайн на праймери за COI гена за определена таксономична група е необходимо да се сравнят колкото се може повече последователности от близки видове, като за целта би могло да се направи проучване в GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
7. Праймерите е хубаво да бъдат маркирани с опашки M13.



Name	Sequence	Use with	Direction
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	HCO2198	F
HCO2198	TAAACTTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	LCO1490	R
LepF1	ATTC AACCAATCATAAAGATATTGG	LepR1	F
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	LepF1	R
MLepF1	GCTTTCCACGAATAAATAATA	LepR1	F
MLepR1	CCTGTCCAGCTCCATTTTC	LepF1	R
M13F (-21)	TGTAAACGACGGCCAGT		F
M13R (-27)	CAGGAAACAGCTATGAC		R

Фиг. 18: Често използвани праймери за инсекти в литературата

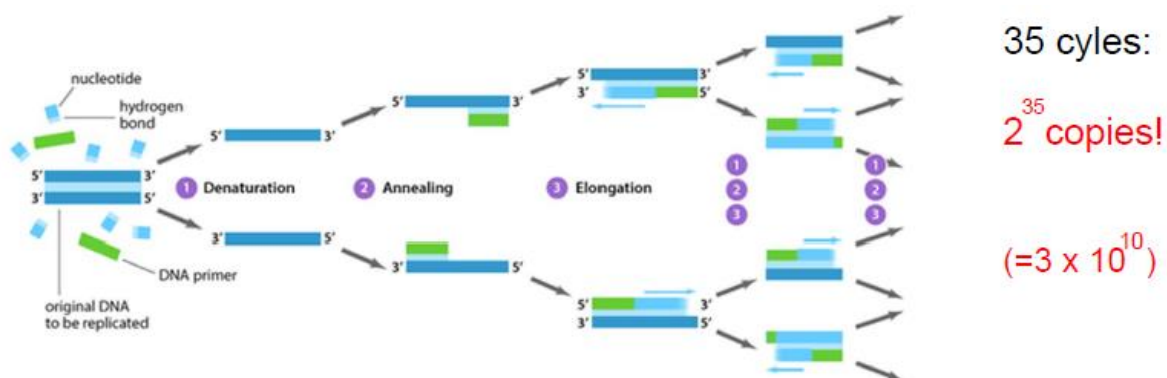
Други праймери, които могат да бъдат използвани при баркодинг на компетентни вектори са:

C1J1781_mod – 5'-GGA GGA TTT GGA AAT TGA TTA G-3'

C1N2191_mod – 5'-TGA AAA TTA AAA TAT AAA CTT CTG-3'

C1J1781_deg - 5'-GGW GGR TTT GGW AAY TGA YTA-3'

CW1_R – 5'-AGH WCC AAA AGT TTC YTT TTT CC-3'



Фиг. 19: Схематично представяне на етапа на намножаване на целевите участъци от генома на инсектите (multiplex PCR)

Първа стъпка преди същинската полимеразно верижна реакция е приготвяне на разтвори с точна концентрация на праймерите. В повечето случаи праймерите са в лиофилизирано състояние и следва да бъдат възстановени/ресуспендирани в съответно количество 10 mM Tris буфер. За да бъдат приготвени сток разтвори на праймерите, след добавяне към криоепруветката с лиофилизирания праймер на 10 mM Tris буфер, следва кратко центрофугиране и инкубиране на разтворените праймери на 65 °C за 5 мин. След това праймерът трябва да се направи на аликвоти (работни разтвори с определена концентрация) от по 10 µM (10 µl разтвор на праймер и 90 µl Tris буфер). Готовите работни аликвоти с праймерите трябва да бъдат съхранявани при -20°C във фризер.

За информация, в базата данни BOLD systems са регистрирани 2127 праймера, но трябва да се знае, че няма универсални праймерни двойки, които да полимеризират всички групи насекоми. Основните праймери, както е показано и на фигура 18 са: LCO1490 / HCO2198 и LepF / LepR. Обикновено за комари (*Culicidae*) се използва най-често: C1-J-1718mod/C1-N-2191mod (хващат участък от 585bp); за куликоиди (*Culicoides*): C1-J-1718mod/CW1_R (хващат участък от 585bp); а за флеботоми (*Phlebotomous*): LCO1490 / HCO2198 (хващат участък от 700bp).

Протоколът за PCR, по който обикновено се работи е QIAGEN multiplex PCR kit.

QIAGEN® Multiplex PCR Kit		
Catalog no.	206143	206145
No. of 50 µl reactions	100	1000
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, containing: HotStarTaq® DNA Polymerase, Multiplex PCR Buffer*, dNTP Mix	3 x 0.85 ml	1 x 25 ml
Q-Solution, 5x	1 x 2.0 ml	1 x 10 ml
RNAse-Free Water	2 x 1.7 ml	1 x 20 ml

Таблица 1: Съдържание на кит за мултиплексен PCR

QIAGEN Multiplex PCR Master Mix съдържа HotStarTaq ДНК полимераза, модифицирана форма на QIAGEN Taq ДНК полимераза. HotStarTaq ДНК-полимераза е в неактивно състояние при стайна температура. Това предотвратява образуването на неправилно намножени продукти и праймери-димери по време на настройка на реакцията и първия етап на денатурация, което води до изключително висока PCR специфичност. ДНК полимеразата HotStarTaq лесно се активира чрез 15-минутна стъпка на инкубация при 95 ° C, която е лесно да бъде включена в програмата на термосайкълъра.

QIAGEN Multiplex PCR буферът улеснява амплификацията на множество PCR продукти. Продължителните процедури за оптимизация, като например коригиране на количествата Taq ДНК полимераза, Mg₂Cl, допълнителни реагенти и праймери, са практически елиминирани. За разлика от конвенционалните PCR реагенти, QIAGEN Multiplex PCR буферът съдържа балансирана комбинация от соли и добавки, за да се осигури сравнима ефективност за отгряване и удължаване на всички праймери в реакцията.

QIAGEN Multiplex PCR Kit е снабден с Q-Solution, иновативна PCR добавка, която улеснява амплификацията на трудни шаблонни ДНК чрез промяна на поведението на топене на ДНК. За разлика от други често използвани PCR добавки, като DMSO, Q-разтворът се използва само с една работна концентрация, която е оптимизирана за изискванията на мултиплексния PCR. Той е нетоксичен и не компрометиращ чистотата на PCR продукта.

Важни бележки преди да бъде стартирана полимеразно верижната реакция:

- Времето за анилинга трябва да бъде 90 секунди.
- Използвайте равни концентрации (0,2 µM) от всички праймери.
- PCR трябва да започне със стъпка на активиране от 15 минути при 95 ° C, за да се активира HotStarTaq ДНК полимераза.

Стандартната оперативна процедура за мултиплексния PCR включва няколко стъпки:

1. Размразяване на 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (ако се съхранява при -20 ° C), екстрахираните ДНК проби, водата, свободна от РНК- ДНК-ази и Q-разтворът. Разбъркайте разтворите преди употреба на вортекс. Важно е разтворите да се смесят преди употреба, за да се избегне локализиране на соли в микса.
2. Приготвяне на реакционната смес (мастер микс) съгласно **таблица 2**. Реакционната смес обикновено съдържа всички компоненти, необходими за мултиплексния PCR с изключение на ДНК пробата. Желателно е да бъде приготвен обем на микса с 10% по-голям от този, необходим за общия брой реакции, които трябва да бъдат извършени

(тоест тестваните брой проби + 2 допълнителни – за негативна контрола и още една резерва).

Component	Volume/reaction	Final concentration
Reaction mix		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 µl	1x
10x primer mix, 2 µM each primer (see Table 2)	5 µl	0.2 µM [†]
RNase-free water	Variable	–
Template DNA		
Added at step 4	Variable	≤1 µg DNA/50 µl
Total volume	50 µl[†]	

Таблица 2: Приготвяне на мастер микс съгласно инструкциите на производителя

3. Смесване добре на реакционната смес и разпределяне на подходящите обеми в PCR епендорфки или плаки. Смесването на микса и праймерите се осъществява чрез пипетиране няколко пъти нагоре и надолу. Поради горещия старт не е необходимо пробите да се държат на лед по време на настройка на температурния режим на реакцията.

4. Добавяне на екстрахираното ДНК (≤1 µg / 50 µl реакция) в отделните PCR епруветки, съдържащи реакционната смес. Обикновено се работи с 5 µl ДНК. За мултиплексна RT-PCR обемът на добавената кДНК (от RT реакцията) като шаблон не трябва да надвишава 10% от крайния PCR обем.

5. Програмирайте термосайкълъра в съответствие с инструкциите на производителя и съгласно долупосочената таблица.

			Additional comments	<i>Culicidae spp.</i> , <i>Culicoides spp.</i>	<i>Phlebotomus</i>
Initial activation step:	15 min	95°C	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step.	15 min - 95° C	15 min - 95° C
3-step cycling:					
Denaturation	30 s	94°C		30 s - 94° C	30 s - 94° C
Annealing	90 s	57–63°C	If a gradient PCR cannot be performed, use 60°C as the starting annealing temperature. If the lowest T_m^* of your primer mixture is below 60°C, use 57°C as starting annealing temperature.	90 s - 50° C	90 s - 45° C
Extension	90 s	72°C	Optimal for targets up to approximately 1.5 kb in length. [†]	60 s - 72° C	60 s - 72° C
Number of cycles	30–45		The number of cycles is dependent on the amount of template DNA and the required sensitivity of your detection method. See Appendix C, page 36 for guidelines.	35 цикъла	35 цикъла
Final extension:	10 min	72°C		10 min - 72° C	10 min - 72° C

Таблица 3 с температурен режим, съгласно инструкциите на производителя и температурни режими и брой цикли, специфични за *Culicidae spp.*, *Culicoides spp.* и *Phlebotomus spp.*

7. Поставяне на PCR епендорфките/плаката в термосайкълъра и стартиране на програмата, както е описано в таблицата. Всяка PCR програма трябва да започне с начален етап на активиране на HotStarTaq ДНК полимераза при 95° С за 15 минути. След приключване на полимеразно верижната реакция, ампликоните могат да се съхраняват за една нощ при 2 – 8° С или при –20° С за дългосрочен период.

Амплифицираните продукти след това могат да бъдат секвенирани или те могат да бъдат обработени допълнително чрез добавяне на рестрикционни ензими (PCR-RFLP) към амплифицирания продукт. Последната техника често се използва за бързо разграничаване между тясно свързани видове (например *Phlebotomus major kompleks*).

Мерене на количество ДНК:

Следваща стъпка след полимеразно верижната реакция и намножаването на целевите участъци от генома на инсектите е мерене на големината на фрагментите ДНК посредством агарозна гел електрофореза. За да се използва този метод, са необходими хоризонтална вана за гел електрофореза, агароза, 1X TAE буфер, молекулен маркер и багрило (етидиев бромид или SYBR® Green). По-малките ДНК фрагменти мигрират по-бързо и така изолираната ДНК се разделя по размер. Фрагментите могат да се заснемат чрез фотодокументираща система. Съгласно протокола, смесват се 5 µl PCR разтвор с 2 µl loading буфер; трябва първо да се накапе молекулният маркер на ДНК и в следващите ямки на гела да се накапят ампликоните ДНК, чиито дължини и качество трябва да бъдат тествани. Обикновено времето, което отнема електрофорезата според напрежението и градусите варира, но стандартно е около 40 мин. За информация, размери на ДНК фрагментите, които са намножили праймерите: C1-J-1718mod / C1-N-2191mod (комари): 585 bp; C1-J-1718deg / CW1_R (куликоиди): 585bp; LCO1490 / HCO2198 (флеботоми): 700 bp.



Следваща стъпка по молекулярната идентификация на вектори е **пречистване**

MinElute PCR Purification Kits Catalog no.	(50) 28004
MinElute Spin Columns	50
Buffer PB*	30 ml
Buffer PE (concentrate)	2 x 6 ml
Buffer EB	15 ml
pH Indicator	800 µl
Collection Tubes (2 ml)	50
Loading Dye	110 µl

на ДНК фрагментите посредством MinElute PCR purification kit на фирма QIAGEN.

По последователни стъпки и по същество този кит много наподобява екстракционния кит на същата фирма. Работният протокол за този кит включва няколко стъпки.

Таблица 4: Съдържание на кит за пречистване на ДНК

Протокол за прочистване на MinElute PCR purification kit:

Този протокол е предназначен да пречиства двувъзможни фрагменти от ДНК от PCR реакции, което води до високи крайни концентрации на ДНК. Фрагменти, вариращи от 70 bp до 4 kb, се пречистват от праймери, нуклеотиди, полимерази и соли, използвайки спинколонков метод MinElute в микроцентрифуга.

Важни бележки преди стартиране на протокола:

- Добавяне на етанол (96–100%) към буфер РЕ преди употреба.
- Всички етапи на центрофугиране се провеждат при 17 900xg (13 000 об/мин) в конвенционална микроцентрифуга при стайна температура.
- Добавяне на 1: 250 обем рН индикатор I към буфер РВ (т.е. добавяне на 120 µl рН индикатор I към 30 ml буфер РВ или добавяне на 600 µl рН индикатор I към 150 ml буфер РВ). Жълтият цвят на буфер РВ с рН индикатор I показва рН 7,5. Добавянето на индикатор за рН I трябва да се осъществи към цялото съдържание на буфера.
- Ако пречистеният PCR продукт трябва да се използва при секвентен анализ, може да не бъде използван буфер - индикатор за рН I.

Процедура:

1. Добавяне на 5 обемни единици буфер РВ към 1 обемна единица от PCR продукта и миксиране (например: 200 µl РВ към 40 µl ДНК продукт или 250 µl буфер РВ към 50 µl PCR продукт).

2. Ако индикаторът за рН е добавен към буфер РВ, проверете дали цветът на сместа е жълт. Ако цветът на сместа е оранжев или виолетов, добавете 10 µl 3 М натриев ацетат, рН 5,0 и миксирайте. Цветът на сместа ще се превърне в жълт. Целта е корекция на рН.

3. Поставяне на спин колоната MinElute в осигурена 2 ml събирателна епруветка.

4. Накапване на пробата в спин колоната MinElute и центрофугиране за 1 мин.

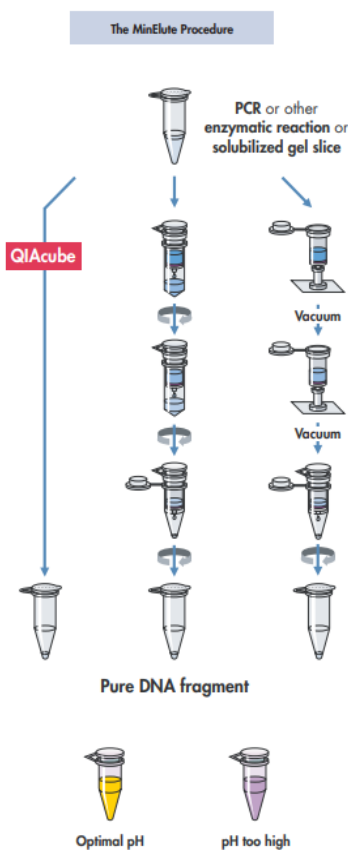
5. Изхвърляне на елуата и събирателната епруветка и прехвърляне на спин колонката в нова събирателна епруветка.

6. Следва етап на миене/ промиване на мембраната на спин колонката, посредством добавяне на 750 µl миеш буфер РЕ към колоната MinElute и центрофугиране за 1 мин.

7. Изхвърляне на събирателната епруветка със съдържанието и прехвърляне на колоната MinElute в нова събирателна епруветка. ВАЖНО: Следва центрофугиране на колоната за още 1 минута при максимална скорост с цел сушене на мембраната и отстраняване на остатъци от миешия буфер РЕ с етанол.

8. Поставяне на колоната MinElute в чиста 1,5 ml епендорфка за центрофугиране.

9. За да се елуира пречистеното ДНК, се добавят 10 µl буфер ЕВ (10 mM Tris-Cl, рН 8.5) или вода в центъра на мембраната, оставя се колоната да престои 1 минута и след това се центрофугира в продължение на 1 минута. ВАЖНО: Уверете се, че елуирацията буфер е разпределен директно в центъра на мембраната, поради малкото количество за пълно елуиране на свързаната към мембраната ДНК. Средният обем на елуата е около 9 µl от 10 µl обем на елуирация буфер. Ефективността на елуирането зависи от рН.



Максималната ефективност при елуиране се постига при рН между 7,0 и 8,5. Когато се елуира с вода, е желателно предварително да се провери стойността на рН и тя трябва да е в този диапазон. Пречистените ДНК ампликони се съхраняват при -20 ° С. Пречистената ДНК може също да бъде елуирана в ТЕ буфер (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, рН 8.0), но EDTA може да инхибира последващи ензимни реакции.

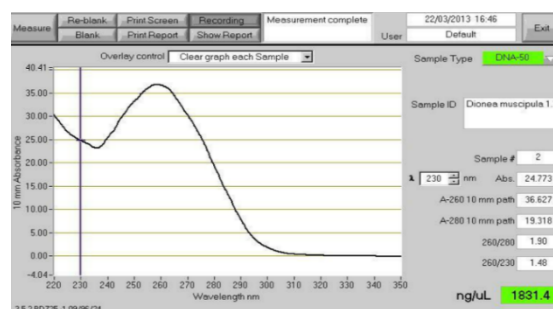
10. Ако на пречистените ДНК фрагменти трябва да се прави гел електрофореза, се добавя 1 обем от loading буфер към 5 обема пречистена ДНК. Пипетира се с цел размесване на буфера с ДНК и се накапва в ямките на гела. Често пъти тази стъпка се пропуска, а се преминава директно към **мерене на добив ДНК посредством спектрофотометър** - най-често се използва NanoDrop, или посредством електрофореза за разделяне на фрагментите по размер, които дават количествена оценка на добитата нуклеинова киселина. Бисбензимидазоловите багрила като PicoGreen® и QuantiFluor™ dsDNA се използват при меренето на концентрация ДНК и се свързват селективно с двойноверижната ДНК. Концентрацията на ДНК от неизвестни проби се изчислява на базата на сравняване със стандартна крива, получена от проби с известна ДНК концентрация или буфер. Факторът на разреждане трябва да се вземе предвид при изчисляване на концентрацията на ДНК. Материалите, необходими за флуоресцентните методи са: флуоресцентно ДНК свързващо багрило, флуорометър и подходящи стандарти за ДНК.

При много високи добиви ДНК е желателно пробите да бъдат разреждени преди изпращане за секвениране. Например при добив на ДНК, измерен посредством NanoDrop, 302,3 ng/ µl, а се изисква крайна концентрация за секвентен анализ от 9 ng/ µl (при Culicidae и Culicoides), трябва пробата да се разрези с ЕВ буфер, както следва: 0,9 µl ДНК + 29,1 µl буфер.

Предпоследен етап преди секвентният анализ е **подготовка на пробите за секвениране и баркодинг**. Етапът изисква концентрация 18 ng/100 bp на PCR продукта в общ обем 12 µl за реакция. За примерен размер на ампликон: 585 bp, изчисленията са по следният начин:

$$585 \text{ bp} \times 18 \text{ ng} / 100 \text{ bp} = 105,3 \text{ ng}$$

$105,3 \text{ ng} / 12 \mu\text{l} = 8,775 \text{ ng} / \mu\text{l}$, което означава приблизително 9 ng/µl концентрация трябва да бъде постигната за *Culicidae* и *Culicoides* и 10,5 ng/µl при ампликон 700 bp при *Phlebotomus*. Това се постига чрез разреждане на пречистените и намножени ДНК фрагменти до краен обем 12 µl. След това към всяка епендорфка с разреденото количество ДНК се добавя от всеки специфичен праймер по 3 µl (при концентрация 10 µM). Така подготвените проби за изпращане за секвентен анализ се съхраняват замразени до изпращането им на фирмата за секвениране.



Step-by-Step Protocol for Sequencing at Microsynth

High Flexibility Regarding Use and Storage of Sequencing Primers
Extensive and Professional Troubleshooting
Easy-to-Use Online Shop with Lots of Useful Tools

Easy Sample Preparation (see also our User Guide)

1. Purify your PCR product with a suitable protocol (e.g. columns) or extract the plasmid using commercial kits.
2. Pipette **480 - 1200 ng of the plasmid DNA or 18 ng/100 bp of the PCR product** (e.g. 72 ng for a 400 bp product) in a 1.5 ml tube (please use either screw cap or safe-lock tubes to avoid accidental opening of your samples during transport) and fill the tube **to a total volume of 12 µl**.
3. Add either **30 pmol** of your sequencing primer or ask Microsynth to add your desired primer*.
4. Login to our webshop at www.microsynth.ch and click on **Single Tube Sequencing** in the green DNA Sequencing area. Then click on **Fill Order Form** for our Barcode Economy Run Service. Please follow the further instructions in the webshop.
5. Finally, put your sample(s) into a transparent plastic bag and drop it into the closest sample drop box. Alternatively, use our prepaid and preaddressed envelopes for mail shipment.
6. Your sequencing results will be available for download or will be sent by email in the morning of the next day.

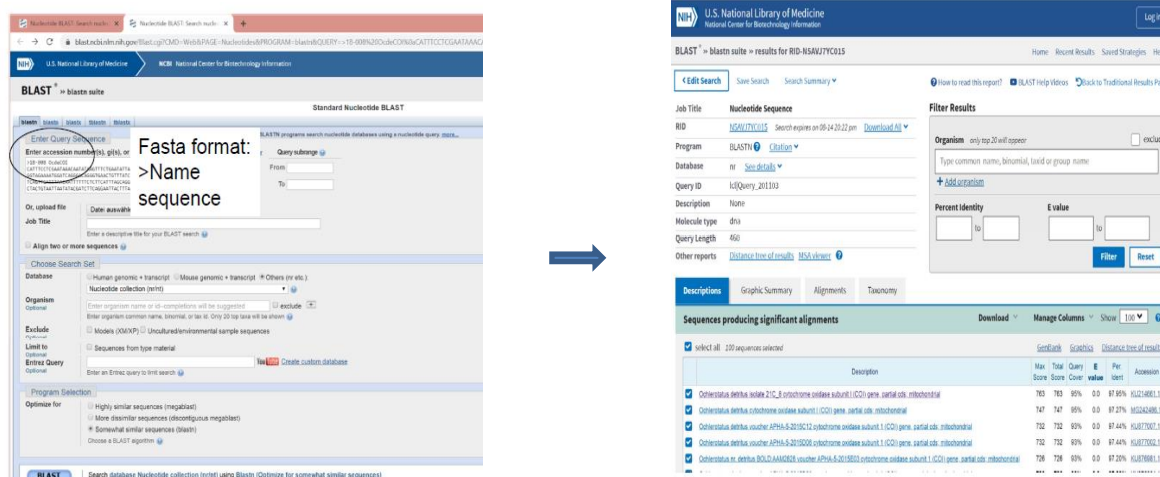
* Please note that Microsynth offers a high degree of flexibility with respect to utilization, storage and online stock management of your specific sequencing primers. If you want us to add a specific primer, just send it along with your sample and it will be stored for at least 6 months (or for 12 months in case you have added them to your Custom Primer List). If plasmids shall be sequenced, you can select from a list of >90 standard primers.

Фиг. 20: Протокол с изисквания за вида, концентрацията и пластмасарията, необходими за изпращане на проби за секвентен анализ

На фиг. 20 е представен протокола и изискванията на фирмата, извършваща секвентен анализ, в случая *Microsynth*. Значително условие, макар и на пръв поглед не толкова важно е това, че е необходимо пробите да бъдат изпратени в епендорфки от по 1,5 мл с конично дъно и с винтови капачки, поради факта, че единствено те са съвместими с робота за предварителна обработка на пробите и секвенатора и така правилно окомплектовани бива избегната необходимостта от прехвърляне на пробите в други епендорфки и загуби от количеството на пробата. Колкото по-малка човешка намеса има при този вид анализ, толкова по-малка е вероятността за контаминация и некоректни резултати. В рамките на 8 часа до едно денонощие резултатите от секвентния анализ биват публикувани в индивидуалния профил на купувача на сайта на компанията и потребителят би могъл да ги изтегли във формат “.fasta” или .ABI.

Следваща стъпка е **секвентният анализ**, който включва подравняване на секвенциите и анализ на последователностите посредством сравняването им с референтни такива в двете световни бази данни NCBI GenBank и BOLD Systems.

Схематично стъпка по стъпка процесът по сравняване на секвенциите е показан на следните графики:



Фиг. 21: След получаване на готовите секвенции от фирмата за секвениране, всяка секвенция във fasta формат бива копирана и сравнена със световните бази данни, в случая NCBI.

След подравняване на секвенциите и сравняването им с базата данни резултатите, които се получават и видовете, които биват определени, се подбират по няколко критерия:

- **Query coverage** – Процент припокриване на секвенцията – процент нуклеотиди от дължината на секвенцията, който е включен в подравнените фрагменти.
- **E(xpect) value** – Очаквана стойност – Очакваната стойност е показателят за сортиране по подразбиране и обикновено дава същия ред за сортиране като максималния резултат на съвпадение.
- **Max score** – highest alignment score - максимален резултат от подравняване
- **Total Score** – sum of alignment scores - сбор от точки на подравняване

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Ochlerotatus detritus isolate 21C_8 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	763	763	95%	0.0	97.95%	KU214661.1
Ochlerotatus detritus cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	747	747	95%	0.0	97.27%	MG242466.1
Ochlerotatus detritus voucher APHA-5-2015C12 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	732	732	93%	0.0	97.44%	KU877007.1
Ochlerotatus detritus voucher APHA-5-2015D00 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	732	732	93%	0.0	97.44%	KU877002.1
Ochlerotatus nr. detritus BOLD:AAM2826 voucher APHA-5-2015E03 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial	726	726	93%	0.0	97.20%	KU876981.1

Фиг. 22: Резултати от сравняване на секвенции

Метод за генериране на баркод съгласно платформата VectorNet 2014–2018:

Платформата VectorNet има разработена своя стандарта оперативна процедура по генериране на баркод. Използваният кит за екстракция е *QIAGEN BioSprint DNA Tissue Kit (QIAGEN, Crawley, England, UK)* чрез автоматизиран робот за екстракция на ДНК на QIAGEN, като всички разтвори са на половината от препоръчителните от производителите обеми. Универсалните LCO и HCO праймери на *Folmer et al.* са използвани за амплифициране на баркод региона на mtDNA - COI гена (658-bp). PCR реакциите се извършват с 1 µl шаблонна ДНК, 1 µl 10 × NH₄ буфер, 129 0,5 µl 2,5 mM dNTPs, 0,3 µl от всеки праймер с 10 µM концентрация, 0,4 µl 50 mM MgCl₂ и 0,2 µl Taq полимераза (*BioLine, London, England*) и 10 µl ddH₂O. Реакциите включват първоначална денатурация при 95 °C в продължение на 5 минути, след това 34 цикъла от 95°C за 30 минути, 48°C за 30 минути и 72°C за 45 секунди, последвани от 5 мин. удължаване при

72°C и задържане 10°C. PCR продуктите се визуализират върху 2% агарозен гел, оцветени с етидиев бромид. Продуктите се пречистват с помощта на вакуум колекторната система *Millipore*, следвайки инструкциите на производителя. Двойноверижните ДНК последователности се секвенират с помощта на *Big Dye Terminator Kit (PE Applied BioSystems, England)* и се изпълняват на автоматизиран секвенатор ABI 3730 (*PE Applied BioSystems*).

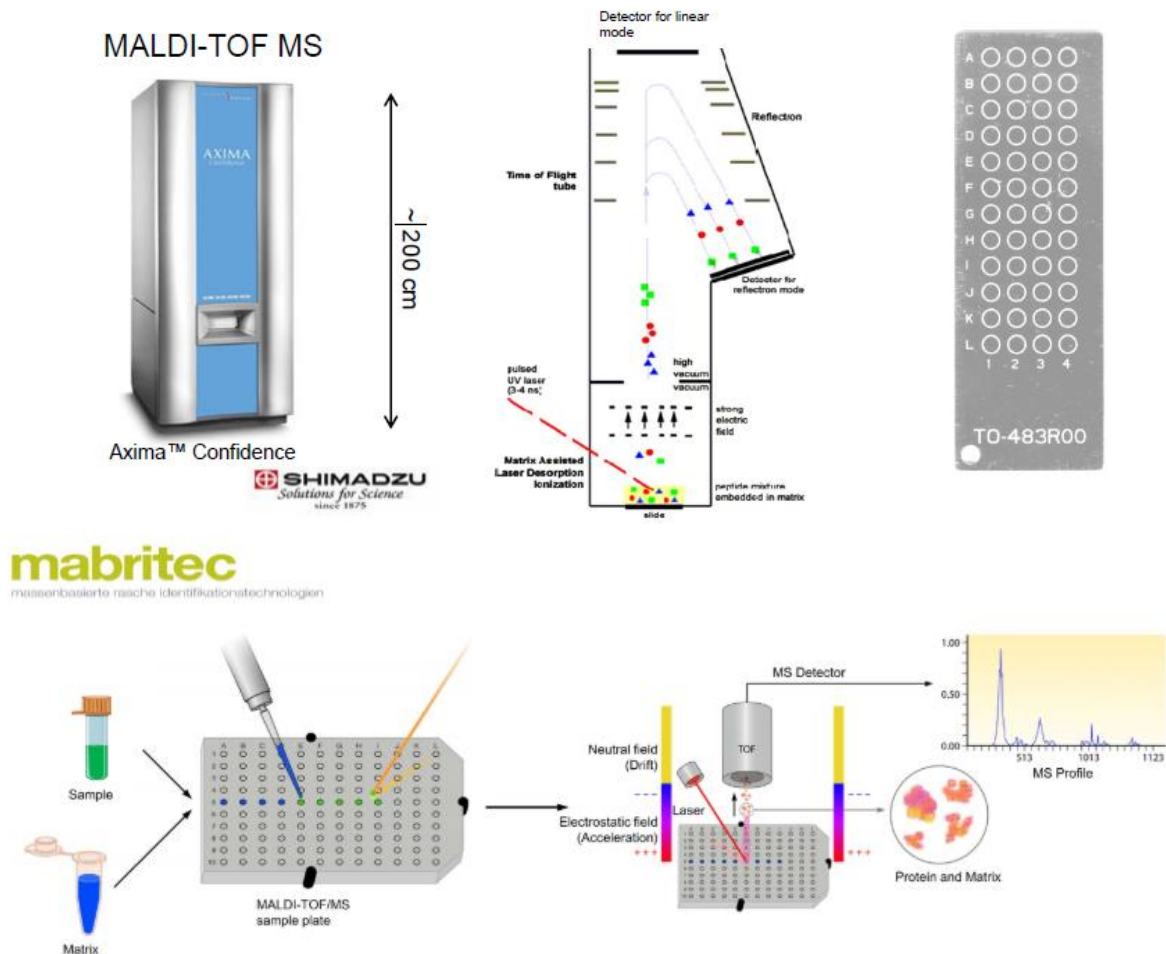
Последователностите се редактират с помощта на *Sequencher* версия 4.8 (*Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI*) и подравняват чрез *CLUSTAL X*. *Clustal X* е пригодена за Windows програма за подравняване на няколко секвенции. Той предоставя интегрирана среда за извършване на подравняване на множество последователности/секвенции и анализ на резултатите. Може да се извърши анализ на качеството на подравняването и да се подчертаят сегменти с ниска специфичност или остатъци.

Подравнените, генерирани баркодове се сравняват с тези, които са публично достъпни в GenBank, използвайки BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) и BOLD. Филогенетичните дървета се построяват с помощта на MEGA версия 5.2.2. Повече информация за тази стандартна оперативна процедура може да бъде достъпна на следният линк: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Vector-sampling-field-protocol-2018.pdf>

3.2. Друг препоръчан в литературата молекулярен метод за таксономично определяне на компетентни вектори е метода MALDI-TOF мас спектрометрия:

Абревиатурата MALDI-TOF означава **Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry**. MALDI е съкращението за "Матрична асистирана лазерна десорбция/йонизация." Пробата за MALDI се смесва равномерно в голямо количество матрица. Матрицата абсорбира ултравиолетовата светлина (лазерна светлина, дължина на вълната 337 nm) и я преобразува в топлинна енергия. Малка част от матрицата (до 100 nm от горната външна повърхност на анализа) се загрява бързо (за няколко нано секунди) и се изпарява, заедно с пробата. Какво е TOF MS? TOF MS е съкращението за Time of Flight Mass Spectrometry. Заредените йони с различни размери се генерират върху примерния слайд. Потенциалната разлика V_0 между горната част на пробата и работната повърхност привлича йони в посоката, показана на диаграмата. Скоростта на привлечените йони се определя от закона за запазване на енергията. Тъй като потенциалната разлика V_0 е постоянна по отношение на всички йони, йони с по-малка m/z стойност (по-слабо заредени йони) и по-силно заредени йони се движат по-бързо през дрейф пространството, докато стигнат до детектора. Следователно, йонното време на полет се различава според съотношението маса/заряд (m/z) на йона.

По своята същност новоразработената техника за идентифициране на компетентни вектори MALDI-TOF MS представлява анализиране на белтъчен профил. Този метод се прилага все по-често в рутинната диагностика и идентификация на микроорганизми в микробиологичните клинични лаборатории, но също е подходящ за надеждна, евтина, бърза и високо специфична идентификация на векторни преносители. Тази техника е особено подходяща за изследване на големи улови от смесени видове инсекти и на различни етапи от жизненият им цикъл (т.е. яйца, ларви, възрастни). Таксономичното идентифициране на видовете посредством MALDI-TOF MS по научни данни и вече постигнати практически резултати е ново и обещаващо средство за подобряване на молекулярно-биологичните и епидемиологични изследвания върху тези значими за хуманната и ветеринарната медицина насекоми.



Фиг. 23: Принцип на работа, снимка на матрица за апарата и последователност на етапите на MALDI-TOF MS на SHIMADZU

MALDI TOF MS включва няколко стъпки:

1. Вземане на проба върху специално проектирана метална плоча, наречена таргетна плоча или работна плоча,
2. Измервания на MALDI TOF MS и
3. Дедукция на видовете чрез съответствие на модела на спектрите с базата данни от спектри, получени от известни и/или добре проучени видове.

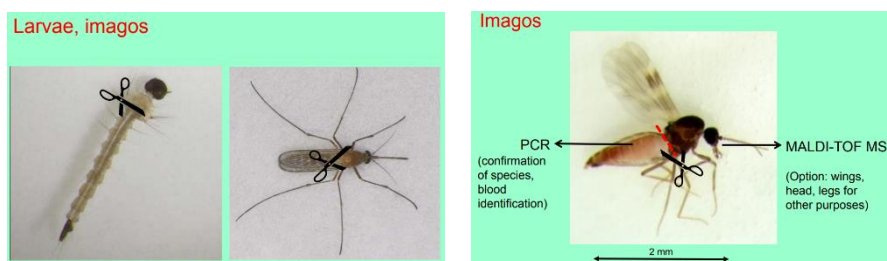
Малка част от биологичния материал се добавя директно върху работната плоча и се оставя да изсъхне на стайна температура. След това петното от пробата се наслаждава с капка свръх концентрирани малки органични съединения, абсорбиращи UV, играещи роля на матрица. Има няколко варианта на химични съединения, използвани за матрица: α -циано-4-хидроксицинаминова киселина (HCCA/CHCA), синапинова киселина (3,5-диметокси-4-хидроксицинаминова киселина) (SA) и 2,5-дихидроксибензоена киселина (DHB), като HCCA е най-често използваната матрица.

В инструмента MALDI малък участък от кристалното петно на матричната проба (обикновено 0,05–0,2 mm в диаметър) се облъчва с помощта на импулсен лазерен лъч с дължина на вълната 337 nm. Матрицата абсорбира лъча и бързо се нагрява, което води до десорбция (изпаряване) или структурно разлагане на протеините и протониране, за да се образува горещ плътен шлаг от отвлечени газове и йони (Clark et al., 2013). С помощта на електрическо поле йоните се ускоряват във вакуумна тръба, която завършва с йонен детектор. Йоните обикновено са с еднакъв заряд и ускоряващото напрежение

води до една и съща кинетична енергия, приложена към всеки един зареден йон, което води до разделяне на йоните въз основа на съотношението маса/заряд (m/z) в дрейфа или вакуумната тръба.

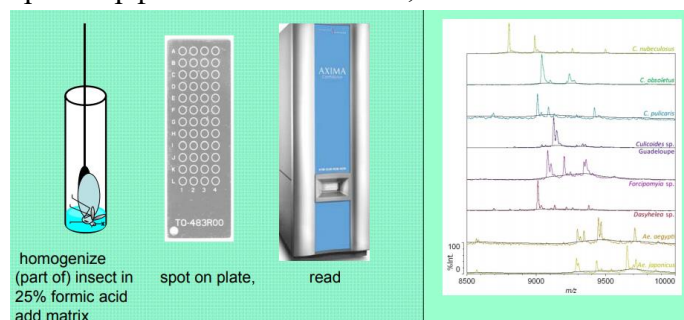
Времето на полет „TOF“ на йоните се записва като MALDI спектри, където x-оста представлява съотношението m/z , а y-оста представлява интензитета (или броя) на еднакви/подобни йони. Полученият спектър е прост и следователно неизвестният тестови вид може да бъде лесно определен след обработка на данните и директно сравняване на спектрите с тези, установени при вече таксономично определени видове или референтни индивиди в бази данни. Идентичността на спектралните пикове или информацията за протеиновата последователност не е важна, тъй като определянето на видът се осъществява чрез съвпадение на протеиновите профили обикновено в диапазон 2–20 kDa (2 000–20 000 m/z).

Методиката MALDI-TOF MS, използвана и препоръчана от VectorNet включва няколко стъпки:



Телата на насекомите, съхранявани в етанол или замразени в течен азот, както е описано по-горе, се дисектират,

отрязвайки главата и абдомена, така че останалите части на тялото да бъдат използвани при морфологичния анализ; останалата част от абдомена е определена за ДНК



екстракция. Останалите торакси се хомогенизират ръчно в 1,5 ml микроепруветки с 10 μ l разтвор за хомогенизация, използвайки пелети и пестици за еднократна употреба. Два са хомогенизиращите разтвори: стерилна дестилирана вода и 25% мравчена киселина. В епруветка се смесват 2 μ l от етанолния или

водния протеинов екстракт с 2 μ l MALDI матрица. Върху плаката на MALDI TOF се накапва 1 μ l от реакционната смес и се оставя да изсъхне на стайна температура. MALDI матрицата се приготвя всеки ден под формата на воден разтвор на синапинова киселина 60% и ацетонитрил 0,3% TFA (30 mg/ml; Sigma). Положителните йонни масспектри се измерват в линеен режим на *Ultraflex III MALDI-TOF* спектрофотометър (Bruker Daltonics, Бремен, Германия) в граници 2–25 kDa и калибриран външно посредством използване на Bruker протеинов калибриращ стандарт I. Всеки спектър съответства на натрупване от 1000 лазерни снимки (5 \times 200 лазерни снимки от различни позиции на целевото място). Спектрите се анализират чрез софтуер *MALDI Biotyper 3.1* за обработка на данни (нормализиране, изглаждане, изваждане на базовата линия, избор на пикове) и оценка чрез клъстер анализ. Само максимум 100 пика със съотношение сигнал/шум > 3 и относителен интензитет най-малко 0,1% от най-интензивния пик от спектрите се счита за сравним пик. За създаване на MSP дендрограма, индивидуален основен спектър се генерира от всеки придобит спектър.

Референтна база данни, идентифициране на видове компетентни вектори:

	Организъм	Проба/база данни	Екстракция на протеини	Матрица	Софтуер и бази данни		Източник
					Bruker BioTyper	SARAMIS	
1	<i>Culicoides spp.</i>	Цели инсекти или торакси	(1) Вода и (2) FA (5-50%)	SA, DHB		+	<i>Kaufmann et al., 2011</i>
		Торакси с глава, крила и крака	10% FA	SA		+	<i>Kaufmann et al., 2012</i>
						+	<i>Steinmann et al., 2013</i>
				HCCA		+	<i>Sambou et al., 2015</i>
2	<i>Culicidae spp.</i>	Глава и торакси		SA		+	<i>Muller et al., 2013</i>
		Крака	70% FA и 50% ACN	HCCA	+		<i>Yssouf et al., 2013b; Yssouf et al., 2014a; Tandina et al., 2016</i>
		Цял индивид	70% FA		+		<i>Dieme et al., 2014</i>
		Яйца		SA		+	<i>Schaffner et al., 2014</i>
		Абдомен	70% FA и 50% AC	HCCA	+		<i>Niare et al., 2016</i>
		Глава и торакс	Вода		+		<i>Laroche et al., 2017</i>
3	<i>Phlebotomine spp.</i>	Торакси	(1) Вода и (2) 25% FA	SA	+		<i>Dvorak et al., 2014</i>
		Торакси, крила и крака	70% FA and 50% ACN	HCCA	+		<i>Lafri et al., 2016</i>
		Торакси с крила и крака	10% FA	SA, DHB		+	<i>Mathis et al., 2015</i>

Екстракция на протеини посредством хомогенизация с: FA (мравчена киселина); ACN (ацетонитрил); TFA (трифлуороцетна киселина);

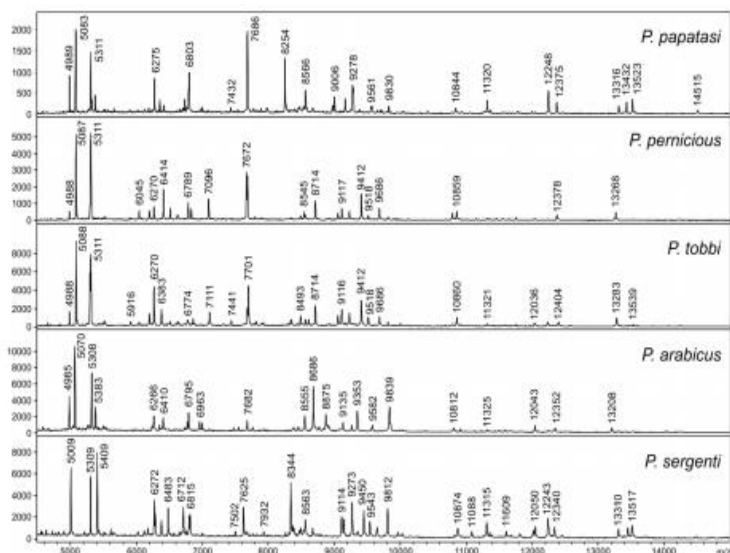
Матрици: HCCA (α -циано-4-хидроксицинаминова киселина); SA (синапинова киселина); DHB (2,5-дихидроксибензоена киселина);

Софтуер и бази данни (символът + означава комерсиален софтуер с който е създадена базата данни и с който е инкорпорирана):

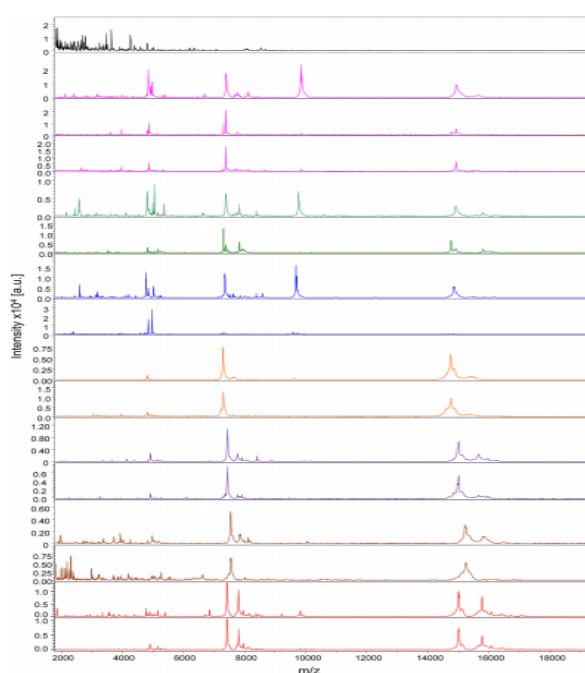
BioTyper[™]—софтуерен продукт на компанията *Bruker Daltonics, Bremen*, Германия.

SARAMIS[™] - софтуер (*Spectral. ARchive And Microbial Identification System*, първоначално разработен от *AnagnosTec, Potsdam-Golm*, Германия, а сега доразработена и оптимизирана под наименованието *Vitek-MS* от *bioMérieux, Marcy L'Etoile, Франция*).

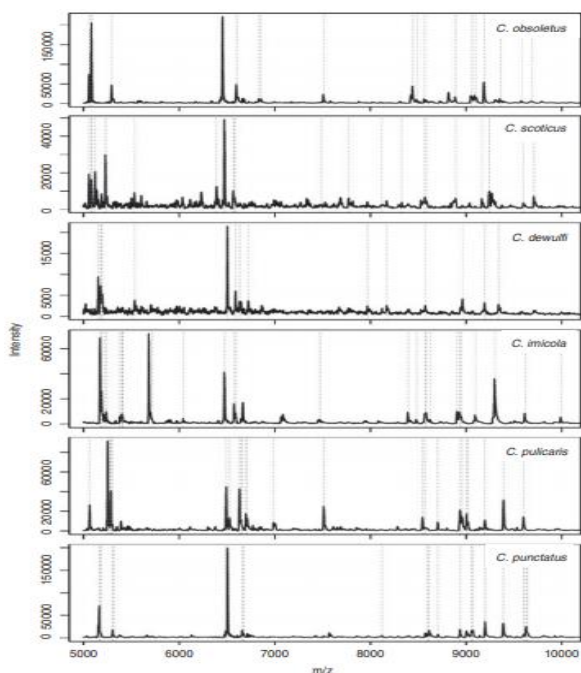
Как изглеждат спектри, получени, посредством MALDI-TOF мас спектрометрия на белтъци, изолирани от компетентни вектори:



MALDI TOF мас спектрометрия на протеини, екстрахирани от пясъчни мухи



А)



Б)

А) MALDI-TOF мас спектрометрия на белтъци в диапазон 5-10 kDa от *Culicoides* spp. Използваният софтуер е SARAMIS. Б) MALDI-TOF мас спектрометрия на белтъци от *Culicoides* spp., тили кръв от различни гостоприемници (хора, коне, овце, мишки, зайци или кучета). Използваният софтуер е SARAMIS.

MALDI MS спектрите, които се генерират за даден вид се сравняват и се търси съвпадение със спектралната база данни на добре дефинираните вече видове за типизиране на видовете. Съпоставянето на спектралните модели се извършва с помощта на автоматизирани пакети от търговски софтуер, като *Bruker Biotyper* (*Bruker Daltonics*, Бремен, Германия), *VITEK MS* (*BioMérieux, Nuertingen*, Германия: по-ранни системи *Axima* (*Shimadzu*) - *SARAMIS* (*AnagnosTec*)), *Andromas* (*Andromas SAS*) или *MicrobeLynx* (*Waters*) (*Sogawa et al., 2011; Bille et al., 2012; Patel, 2013; Cassagne et al., 2016*). Търговските софтуерни инструменти обикновено са интегрирани със собствена

референтна спектрална база данни и използват уникален алгоритъм за обработката на получените спектри и предлагат интерпретация на резултатите.

Изводи:

Компетентните вектори продължават да играят значителна роля за разпространението на инфекциозни болести, затова точната и бързата им идентификация е изключително важна за по-доброто разбиране на епидемиологията, за разработването на по-ефективни мерки за справяне с популациите вектори и за контрол на инфекциозните заболявания, причинени от тях, за оптимизиране на мониторинговите програми и не на последно място за разработване на нови молекулярно биологични методи, които да осигуряват своевременно, бърза, акуратна и точна диагноза и бързо и лесно таксономично определяне на видовете векторни причинители на различни инфекциозни заболявания при животните и хората.

Таксономите и ентомолозите все още използват морфологично определяне на компетентните вектори, но се доказва в практиката все повече, че този метод е изключително времеемък, изисква високо специализиран и подготвен персонал, би могло да възникне грешка при идентификацията на видовете, при повредени проби не би могло да бъдат морфологично определени, трудно се определят близкородствени видове и видове, различаващи се по незначителни морфологични характеристики и често този морфологичен метод за определяне на вектори е неточен, непълен, ограничава се до видов комплекс и е недостатъчно информативен. Молекулярните методи, които са разработени и вече внедрени в рутинната диагностика, като MALDI-TOF, баркодинг и WGS са точни, бързи, информативни, надеждни и приложими за всички етапи от жизнения цикъл на видовете. От друга страна, тези методи също изискват добре подготвен персонал за последващият анализ на резултатите, скъпоструващи са и изискват техника, която е скъпоструваща инвестиция.

Съпоставяйки плюсовете и минусите на различните методи, в крайна сметка става ясно, че независимо от скъпоструващата инвестиция в апаратура и обучения, молекулярните методи доказаха и доказват все повече ефективността, новаторството, високата специфичност и информативността си и огромният им принос в диагностиката, таксономичното определяне и категоризиране на видовете. Необходимо е класическите методи да отстъпят пред молекулярно биологичните методи и е нужно по-нататъшното включване и на прогнозни статистически модели и биоинформатика за още по-иновативни, пълни и информативни проучвания.

Този значителен научен прогрес в молекулярната диагностика няма да означава много, ако не бъде използван ефективно за цели като: „Едно здраве“, прецизна и безпристрастна оценка на риска, опазване на общественото здраве и здравето на животните, както и за намаляване тежестта на инфекциозните заболявания, причинени от различни патогени.

Библиография:

- Culicoides biting midges: ecology and their role as vectors of pathogens” Eva Veronesi, National Centre for Vector Entomology (NZVE), Institute of Parasitology, University of Zürich (Switzerland)
- Regional framework for surveillance and control of invasive mosquito vectors and re-emerging vector-borne diseases 2014–2020 – WHO
- **Vector entomology group:** Alexander Mathis, Niels Verhulst, Tim Timber, Francis Schaffner, Anca Paslaru, Lena Maurer, Jeannine Hauri, Jasmin Linder, Uros Glavinic, Alexandra Brendle, Nicole Pauli - <https://vectornet.ecdc.europa.eu/>
- Training course on identification of arthropod vectors, Bulgaria, 2019 - Molecular identification of arthropods (barcoding, DNA amplification, mass spectrometry) - Alexander Mathis, University of Zurich

- Identification of wild-caught phlebotomine sand flies from Crete and Cyprus using DNA barcoding - Emmanouil Dokianakis, Nikolaos Tsirigotakis, Vasiliki Christodoulou, Nikos Poulakakis and Maria Antoniou
- Sampling insects: general techniques, strategies and remarks - Patrick Grootaert, Marc Pollet, Wouter Dekoninck, Cees van Achterberg
- Comparison of the efficiency of five suction light traps under field conditions in South Africa for the collection of Culicoides species - G.J. Venter a,*, K. Labuschagne a, K.G. Hermanides, S.N.B. Boikanyo, D.M. Majatladi, L. Morey
- Delineation of Culicoides species by morphology and barcode exemplified by three new species of the subgenus Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) from Scandinavia - Soren Achim Nielsen and Michael Kristensen
- TECHNICAL REPORT Field sampling methods for mosquitoes, sandflies, biting midges and ticks - VectorNet project 2014–2018, ECDC
- HANDBOOKS FOR THE IDENTIFICATION OF BRITISH INSECTS - <https://www.royensoc.co.uk/publications/index.htm>
- High-throughput sorting of mosquito larvae for laboratory studies and for future vector control interventions - Eric Marois, Christina Scali, Julien Soichot, Christine Kappler, Elena A Levashina and Flaminia Catteruccia
- Identification and morphological characterization of some species of beneficial insects from the region Amethi, UP, India - Saleem Ahamad, Rajneesh Tripathi, Indu singh
- <http://www.knowyourinsects.org/Database.html>
- Insect Identification and Biology - Canadian Grain Commission, 2014, Brent Elliott
- Morphological Identification of Sandflies and Their Species' Diversity - Amin Baharshahi, Mahmoodreza Behravan, Alireza keykhosravi
- Molecular and Morphological Identification of Local Sand Fly Species (Diptera: Psychodidae) in Saudi Arabia- Reem A. Al-Ajmi, Tahany H. Ayaad, Mashael Al-Enazi and Ahmed A. Al-Qahtani
- Morphological and Molecular Identification of Phlebotomus mascittii Grassi, 1908 Populations From Slovenia - Eva Praprotnik, Sara Zupan, and Vladimir Ivočić
- Morphological keys for the identification of Italian phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) - Filipe Dantas-Torres, Viviana Domenica Tarallo and Domenico Otranto
- The attraction range of the Onderstepoort 220 V light trap for Culicoides biting midges as determined under South African field conditions - G.J.Venter, D.M.Majatladi, K.Labuschagne, S.N.B.Boikanyo, L.Morey
- The range of attraction for light traps catching Culicoides biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) - Carsten Kirkeby, Kaare Græsbøll, Anders Stockmarr, Lasse E Christiansen and Ren´e Bødker
- Traps for Capturing Insects - Wendell Morrill, Richard W. Mankin, Nancy D. Epsky
- A global brief on vector-borne diseases – WHO
- http://boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine
- <https://www.bento.bio/product/bento-lab/>
- From Bugs to Barcodes: Using Molecular Tools to Study Biodiversity - Hamilton, et al. 2010. Quantifying uncertainty in estimation of tropical arthropod species richness. The American Naturalist 176: 90-95
- Hebert PDN, Gregory TR. (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol 54(5):852-859.
- Stoeckle MY, Hebert PDN. (2008) Bar Code of Life: DNA Tags Help Classify Animals. Scientific American 299(4): 66-71
- Methods in Molecular Biology - DNA Barcodes - Methods and Protocols - W. John Kress and David L. Erickson - <https://link.springer.com/bookseries/7651>
- <https://dnabarcoding101.org/resources/>
- DNA Subway - Fast-track to Gene Annotation and Genome Analysis - <https://dnasubway.cyverse.org/>
- Distributed Research with DNA Barcoding - Democratizing Species Identification - DNA Learning Center, Cold Spring Harbor Laboratory
- www.tnagenomics.com
- DNA Barcoding - Kandhan. S, M. Tech (Biotechnology) - PSG College of Technology

- DNA Barcoding - Johannes Bergsten, Swedish Museum of Natural History, Department of Entomology
- DNA Barcode Analysis of Mosquito Species from Pakistan - Muhammad Ashfaq, University of Guelph, Canada
- Disentangling Vector-Borne Transmission Networks: A Universal DNA Barcoding Method to Identify Vertebrate Hosts from Arthropod Bloodmeals - Miguel Alcaide, Ciro Rico, Santiago Ruiz, Ramo' n Soriguer, Joaquín Muñoz, Jordi Figuerola
- BIOINFORMATICS ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES - Avellaneda Vergara Adrian Gustavo, Yarasca Cerna Withney Aracely, Zegarra Aguinaga Janeth Alexandra, Farfan Hernandez Kevin Jhonny, Graham Angeles Laura Andrea
- DNA Barcoding and the Consortium for the Barcode of Life (CBOL) - David E. Schindel, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution
- Use of DNA Barcoding in Insect Taxonomy - SHWETA PATEL, Id No.- 42537
- Field Collecting for DNA Barcoding - Sarah Adamowicz & Alex Borisenko, Biodiversity Institute of Ontario & Dept. Integrative Biology, University of Guelph
- Identification of phlebotomine sand flies using one MALDI-TOF MS reference database and two mass spectrometer systems - Alexander Mathis, Jérôme Depaquit, Vit Dvořák, Holly Tuten, Anne-Laure Bañuls, Petr Halada, Sonia Zapata, Véronique Lehrter, Kristýna Hlavačková, Jorian Prudhomme, Petr Volf, Denis Sereno, Christian Kaufmann, Valentin Pflüger and Francis Schaffner
- Identification of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) by matrixassisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry - Vit Dvorak, Petr Halada, Kristyna Hlavackova, Emmanouil Dokianakis, Maria Antoniou and Petr Volf
- Comparison of Rapid Biodiversity Assessment of Meiobenthos Using MALDI-TOF MS and Metabarcoding - Sven Rossel, Sahar Khodami l and Pedro Martínez Arbizu
- MALDI-TOF MS for the identification of insect vectors - Christian Kaufmann, Francis Schaffner, Valentin Pflüger, Alexander Mathis
- The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology - FERNANDO COBO, University Hospital Virgen de las Nieves, Instituto Biosanitario, Granada, Spain
- Principles and mechanism of MALDI-ToF-MS analysis - Samira Hosseini and Sergio O. Martinez-Chapa
- Identification of blood meal sources in the main African malaria mosquito vector by MALDI-TOF MS - Sirama Niare, Jean-Michel Berenger, Constantin Dieme, Ogobara Doumbo, Didier Raoult, Philippe Parola and Lionel Almeras

Изготвил:

Красимира Захариева,
главен експерт в дирекция ОРХВ,
ЦОРХВ
10.01.2020г.