



UPRAVA ZA VETERINARSTVO I SIGURNOST HRANE

KLASA: 322-02/18-01/69

URBROJ: 525-10/0246-19-1

Zagreb, 20. veljače 2019. godine

**PROGRAM ENTOMOLOŠKOG ISTRAŽIVANJA POPULACIJE INSEKATA RODA
CULICOIDES, VEKTORA VIRUSA BOLESTI PLAVOG JEZIKA, NA PODRUČJU
REPUBLIKE HRVATSKE TIJEKOM 2019. GODINE**

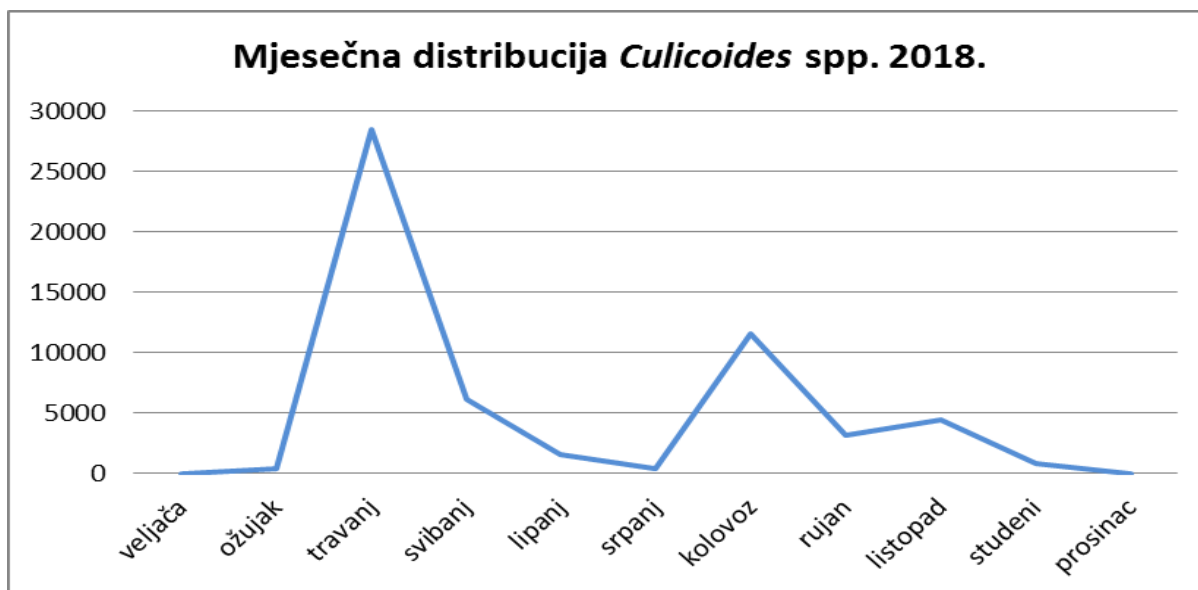
Zagreb, veljača 2019.

Sadržaj

1. Pregled rezultata provedbe programa entomološkog istraživanja u 2018. godini	3
2. Svrha monitoringa insekata <i>Culicoides</i> na području Republike Hrvatske	6
3. Entomološko istraživanje u 2019. godini	7
4. Pravna osnova za provedbu	7
5. Sakupljanje uzoraka insekata	7
6. Dostava uzoraka insekata roda <i>Culicoides</i>	8
7. Lokacije entomološkog istraživanja vektora virusa bolesti plavog tijekom 2018. godine. 8	
8. Laboratorijska dijagnostika.....	9
9. Izvješćivanje o nalazu uzoraka insekata	9
10. Financiranje programa	9
11. Upute za sakupljanje uzoraka insekata <i>Culicoides</i>	10

1. Pregled rezultata provedbe programa entomološkog istraživanja u 2018. godini

Tijekom 2018. godine entomološko istraživanje populacije insekata roda *Culicoides* vektora virusa bolesti plavog jezika provodilo se na unaprijed definiranim lokacijama u 20 županija. Uzorci insekata sakupljeni su jednom mjesečno od veljače do prosinca te su na svim lokacijama uključenim u pretraživanje dokazani vektori virusa bolesti plavog jezika.



Graf 1. Mjesečna distribucija *Culicoides* spp u 2018.

Sakupljeno je i analizirano ukupno 204 uzoraka insekata te je izdvojeno:

- 165 123 jedinki komarčića vektora virusa bolesti plavog jezika.

Provedenom morfološkom identifikacijom *Culicoides* spp. identificirani su:

a) vektori virusa bolesti plavog jezika:

- *C. obsoletus* complex,
- *C. pulicaris* complex: *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi* i *C. lupicaris*,
- *C. nubeculosus* complex: *C. nubeculosus* i *C. riethi*,

b) ostale vrste *Culicoides* spp. koji nisu vektori.

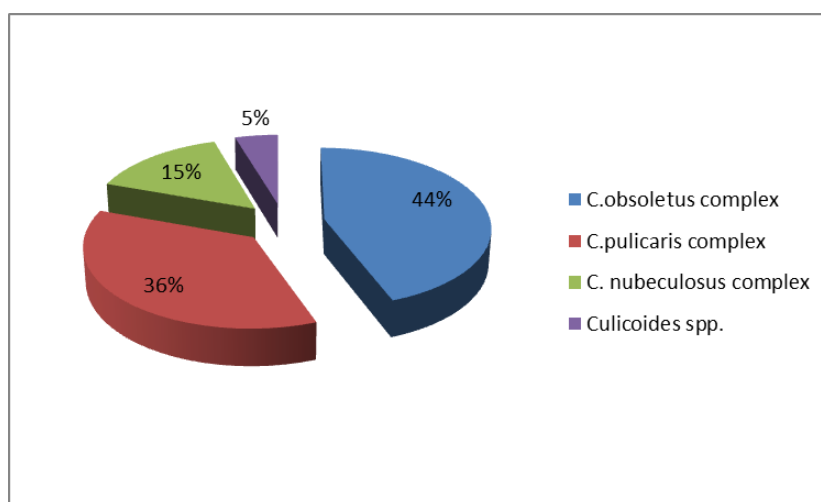
Zbog nemogućnosti razlikovanja vrsta unutar *C. obsoletus* grupe i morfoloških sličnosti drugih vrsta, u svrhu dokazivanja vrsta prisutnih na području Hrvatske, provedena je analiza

950 pojedinačnih uzoraka vektora metodom lančane reakcije polimerazom i sekvencioniranjem.

Rezultatima pretraživanja u 2018. godini potvrđena je prisutnost 19 do sada poznatih vrsta i dokazana prisutnost šest novih vrsta koje su imale sličnost od 87% do 94% s dostupnim sekvencama u bazi gena NCBI te jedna nova vrsta *Culicoides spp.*.

Provedenim sekvencioniranjem vektora:

- *C. obsoletus* complexa dokazano je prisustvo vrsta *C. obsoletus* i *C. scoticus*,
- *C. pulicaris* complexa dokazano je prisustvo vrsta *C. pulicaris*, *C. punctatus*, *C. newsteadi* i *C. lupicaris*,
- *C. nubeculosus* complex dokazano je prisustvo vrsta *C. nubeculosus* i *C. riethi*,
- ostalih vrsta *Culicoides* dokazano je prisustvo vrsta :
 - *C. flavipulicaris*, *C. fagineus*, *C. circumscriptus*, *C. fascipennis*, *C. achrayi*, *C. parroti*, *C. griseidorsum*, *C. festivipennis*, *C. brunnicans*, *C. fagineus*, *C. alazanicus*,
 - po jedan *Culicoides* imao je utvrđenu sličnost u 87% omjeru sa *C. arakawae* i *C. salinarius*,
 - jedan *Culicoides* imao je utvrđenu sličnost u 88% omjeru sa *C. fagineus*,
 - jedan *Culicoides* imao je utvrđenu sličnost u 91% omjeru sa *C. saharensis*,
 - jedan *Culicoides* imao je utvrđenu sličnost u 92% omjeru sa *C. subfagineus*,
 - jedan *Culicoides* imao je utvrđenu sličnost u 94% omjeru sa *C. fascipennis*,
 - dokazana je jedna nova vrsta *Culicoides spp.*

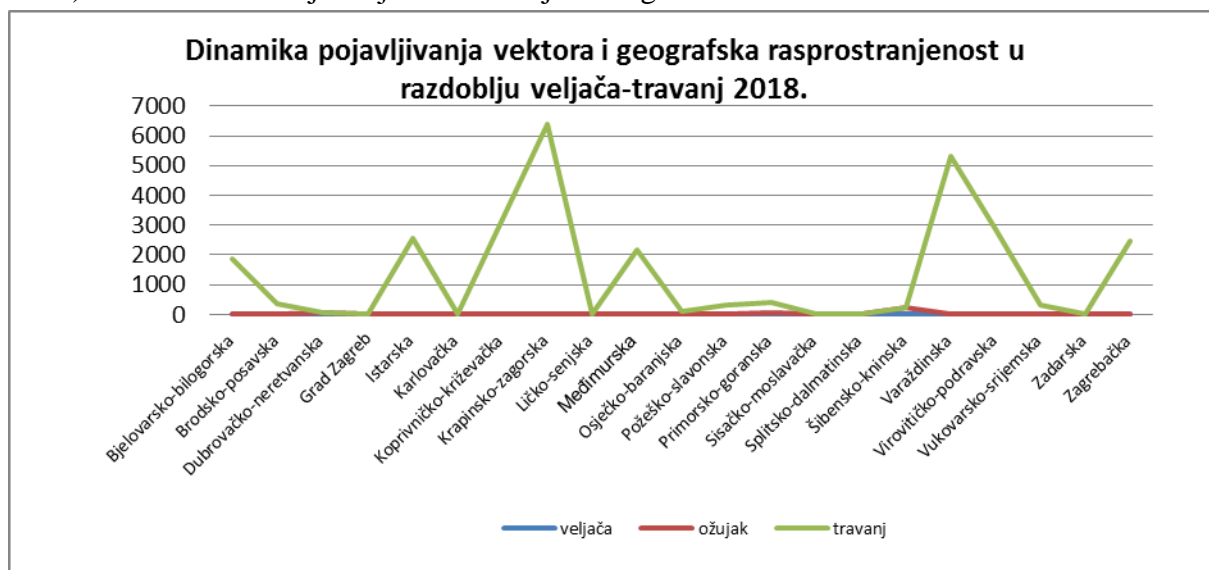


Graf 2. Zastupljenost *Culicoides spp.* po grupi u pretraženom uzorku

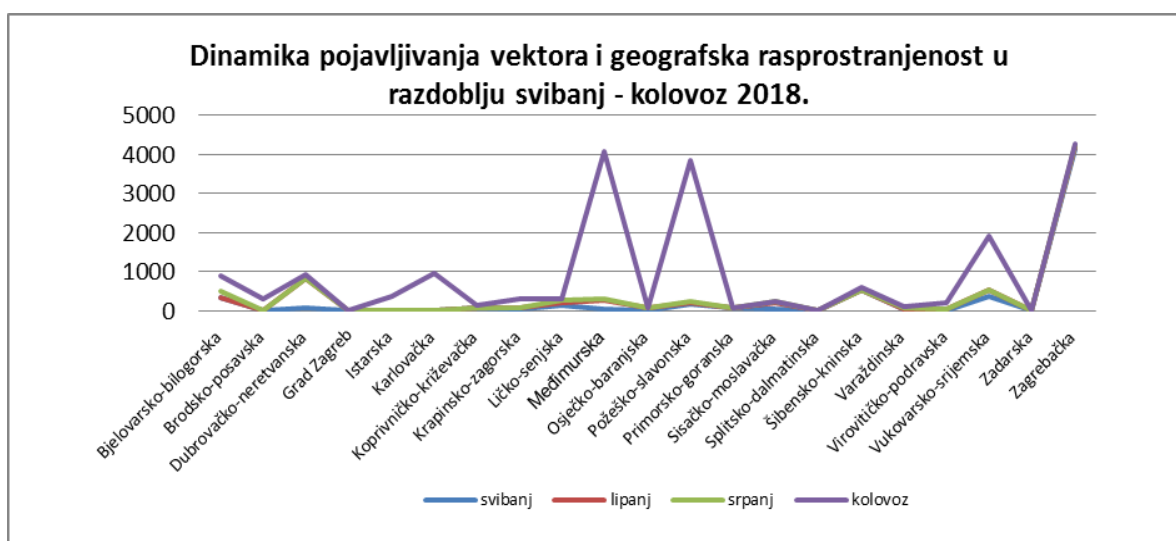
Prikupljenim podacima prati se prisutnost i dinamika pojavljivanja insekata roda *Culicoides* te njihove zemljopisne rasprostranjenosti, a višegodišnji rezultati koriste se u svrhu utvrđivanja područja i razdoblja godine od najvećeg rizika za pojavu i širenje virusa bolesti plavog jezika kao i određivanja razdoblja sezonski slobodnog od vektora virusa BPJ, odnosno razdoblja kada nisu aktivni adulti insekata roda *Culicoides*.

Dinamika pojavljivanja vektora i geografska rasprostranjenost prema županijama u 2018. godini iskazana je u kvartalnim razdobljima i to za:

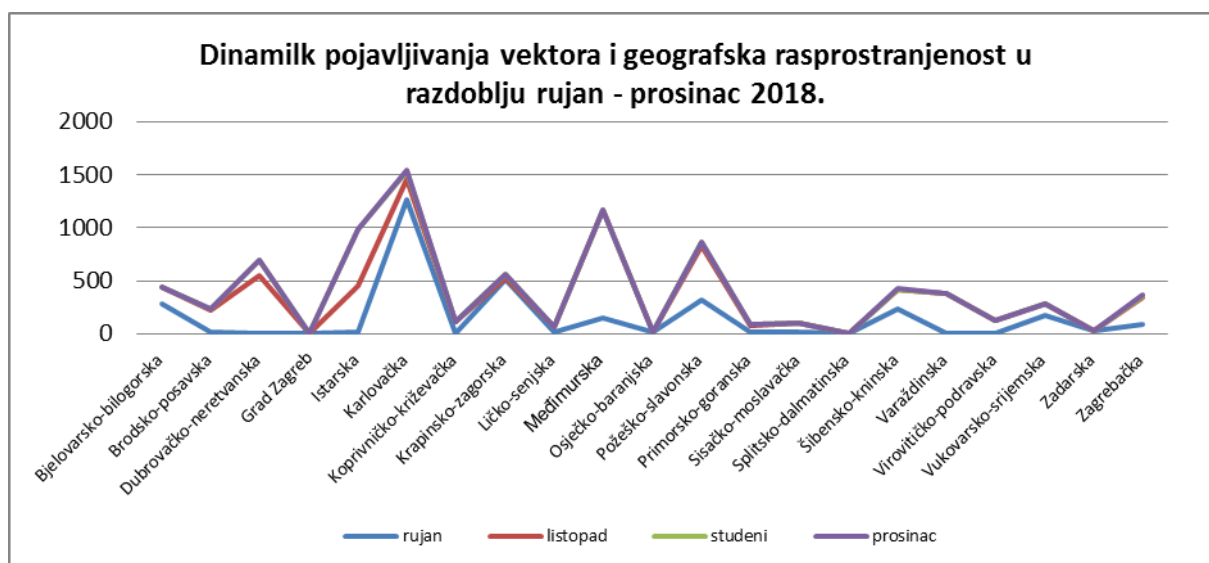
a) Graf 3. Razdoblje veljača – travanj 2018. godine



b) Graf 4. Razdoblje svibanj – kolovoz 2018. godine



c) Graf 5. Razdoblje rujan – prosinac 2018. godine



2. Svrha monitoringa insekata *Culicoides* na području Republike Hrvatske

Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede i Hrvatski veterinarski institut Zagreb izradili su Program entomološkog istraživanja populacije insekata roda *Culicoides*, vektora virusa bolesti plavog jezika, koji se provodi na području Republike Hrvatske sa slijedećim ciljevima:

- utvrđivanja prisutnosti i dinamike pojavljivanja insekata roda *Culicoides* te njihove zemljopisne rasprostranjenosti,
- utvrđivanja područja i razdoblja godine od najvećeg rizika za pojavu i širenje virusa bolesti plavog jezika,
- određivanja razdoblja sezonski slobodnog od vektora virusa BPJ, odnosno razdoblja kada nisu aktivni adulti insekata roda *Culicoides*.

Analizom uzoraka insekata utvrditi će se ukupan broj prisutnih odraslih insekata roda *Culicoides*, identificirati vrste vektora i virološkim pretraživanjem vektora utvrditi moguća cirkulacija virusa.

Entomološko istraživanje provodi se u skladu s Uredbom Komisije 1266/2007 o provedbi pravila za Direktivu Vijeća 2000/75/EZ s obzirom na kontrolu, praćenje, nadziranje i ograničenje premještanja određenih životinja prijemljivih vrsta u odnosu na bolest plavog jezika.

Program je donesen temeljem članka 16. stavka 1. točke 10. Zakona o veterinarstvu („Narodne novine“, br. 82/13, 148/13 i 115/18) te se istim provodi Dio II, članak 4., stavak 8. Naredbe o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2019. godini („Narodne novine“ br. 5/19).

3. Entomološko istraživanje u 2019. godini

Uzorci insekata moraju se sakupljati dva puta mjesečno, od ožujka do prosinca 2019. godine.

Ovlaštena veterinarska organizacija iz točke 6. ovog Programa nasumično odabire jedno gospodarstvo sa govedima, ovcama ili kozama te provodi uzorkovanje tokom cijelog perioda trajanja programa na tom gospodarstvu.

Ovlaštena veterinarska organizacija s područja Zadarske, Splitsko-dalmatinske, Šibensko-kninske, Primorsko-goranske i Istarske županije za uzorkovanje mora odabrati gospodarstvo koje se nalazi što bliže granici obalnog područja.

4. Pravna osnova za provedbu

Pravna osnova za provedbu entomološkog istraživanja obuhvaća:

- Zakon o veterinarstvu („Narodne novine“ br. 82/13,148/13, 115/18).
- Pravilnik o mjerama za kontrolu i iskorjenjivanje bolesti plavog jezika („Narodne novine“ br. 73/09, 44/13).
- Uredba Komisije 1266/2007 o provedbi pravila za Direktivu Vijeća 2000/75/EZ s obzirom na kontrolu, praćenje, nadziranje i ograničenje premještanja određenih životinja prijemljivih vrsta u odnosu na bolest plavog jezika
- Naredba o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u 2019. godini („Narodne novine“ br. 5/19).

5. Sakupljanje uzoraka insekata

Uzorci insekata moraju se sakupljati dva puta mjesečno s razmakom od najmanje 15 dana u periodu od ožujka do prosinca 2019. godine. Uzorci se prikupljaju na način da se prvi uzorak mora uzeti najkasnije do 10. u mjesecu, a drugi uzorak najranije 15 dana nakon prvoga.

Uzorci insekata sakupljaju se pomoću lampi hvataljki s ultravioletnim svjetlom (8 W). Koristiti će se lampe hvataljke s akumulatorom ili priključene na izvor struje. Lampe hvataljke postavljaju se u stajama gdje borave preživaci (ovce, koze, goveda). Vrlo je važno da za vrijeme sakupljanja uzoraka insekata životinje borave u staji tijekom noći, jer su hematofagni insekti roda *Culicoides* aktivni tijekom noći.

Lampa hvataljka uključuje se sat vremena prije sumraka, a sutradan ujutro se isključuje sat vremena nakon izlaska sunca, nakon čega se uzimaju uzorci insekata i dalje postupa prema uputama iz točke 10. ovog Programa. Prilikom sakupljanja uzoraka, potrebno je zabilježiti vrste i broj životinja u staji.

Veterinarima iz ovlaštenih veterinarskih organizacija i vlasnicima životinja prezentirati će se i dati detaljne upute za prikupljanje uzoraka, pokazati pribor potreban za hvatanje insekata i objasniti detaljno na koji način se uključuje lampa hvataljka, uzima uzorak insekata i ispunjava Obrazac za dostavu uzoraka na laboratorijsko pretraživanje.

Zbog obrade entomoloških podataka za svaku lokaciju gdje je bila postavljena lampa hvataljka potrebno je navesti dnevnu temperaturu zraka prema podatcima Državnog hidrometeorološkog zavoda na dan prikupljanja uzorka insekta (na temelju podataka iz najbliže mjerne stanice ili sa linka http://meteo.hr/naslovnica_aktpod.php?tab=aktpod).

6. Dostava uzoraka insekata roda *Culicoides*

Uzorci insekata moraju biti dostavljeni na identifikaciju u Laboratorij za parazitologiju Hrvatskog veterinarskog instituta, Savska cesta 143, Zagreb. Uzorke dostavljaju ovlaštene veterinarske organizacije iz Tablice 1. ovoga Programa. Uzorci se dostavljaju dva puta mjesečno, uz napomenu da između dva uzrokovanja treba proteći najmanje 15 dana.

7. Lokacije entomološkog istraživanja vektora virusa bolesti plavog tijekom 2018. godine

Lampe hvataljke postaviti će se na području ovlasti veterinarskih organizacija kako je navedeno u Tablici 1. ovog Programa.

Tablica 1.: Popis ovlaštenih veterinarskih organizacija koje sudjeluju u programu

Županija	Nadležna ovlaštena veterinarska organizacija
Zagrebačka	Veterinarska stanica Jastrebarsko d.o.o.
Krapinsko-zagorska	Veterinarska ambulanta Pregrada d.o.o.
Sisačko-moslavačka	Veterinarska stanica Anima Vet
Karlovačka	Veterinarska ambulanta Ogulin d.o.o.
Varaždinska	Veterinarska ambulanta Cestica d.o.o.
Koprivničko-križevačka	Veterinarska stanica Križevci d.o.o.
Bjelovarsko-bilogorska	Veterinarska ambulanta Karaula d.o.o.
Primorsko-goranska	Veterinarska ambulanta Debelić j.d.o.o.
Ličko-senjska	Veterinarska ambulanta Gospić d.o.o.
Virovitičko-podravska	Veterinarska stanica Slatina d.o.o.
Požeško-slavonska	Veterinarska stanica Pakrac d.o.o.
Brodsko-posavska	Veterinarska ambulanta Cvitan d.o.o.
Zadarska	Veterinarska stanica Zadar d.o.o.
Osječko-baranjska	Veterinarska stanica Mihael d.o.o.
Šibensko-kninska	Veterinarska ambulanta More d.o.o.
Vukovarsko-srijemska	Veterinarska stanica Vukovar d.o.o.
Splitsko-dalmatinska	Veterinarska stanica Split d.o.o.
Istarska	Veterinarska ambulanta Rovinj d.o.o.
Međimurska	BIOINSTITUT d.o.o.
Dubrovačko-neretvanska	Veterinarska ambulanta Metković J. d.o.o.

8. Laboratorijska dijagnostika

Laboratorijska dijagnostika provodi se prema sljedećem hodogramu:

- Iz sakupljenih uzoraka izdvojiti će se insekti *Culicoides* od ostalih vrsta insekata. Morfološkom analizom sakupljenih uzoraka odraslih insekata *Culicoides* identificirati će se na nivou vrste vektora i odrediti njihov spol.
- Identificirati će se i druge vrste *Culicoides* koji nisu vektori te prikazati kao *Culicoides* spp.
- Za vrste *Culicoides* koje nije moguće identificirati na osnovu morfoloških karakteristika primijeniti će se molekularna identifikacija lančanom reakcijom polimerazom. U tu svrhu je potrebno ženke *Culicoides* determinirati po razvojnim stadijima. Na taj način će se molekularno razlikovati i potvrditi sve vrste vektora. Ženke vektora *C. obsoletus* i *C. scoticus* morfološki se ne razlikuju, stoga će se nakon morfološke identifikacije, vrste dokazati lančanom reakcijom polimerazom (PCR) i sekvencioniranjem umožnenih odsječaka.
- U svrhu molekularne potvrde vrste izabrati će se po 50 uzoraka iz svake županije uključene u program.
- Prikazati će se ukupan broj prisutnih odraslih vektora i *Culicoides* spp., odnosno gustoća populacije *Culicoides* na određenim lokacijama.
- Utvrditi će se koje su vrste *Culicoides* dominantne.
- Ustanoviti će se obitava li u Hrvatskoj *Culicoides imicola* kao i ostali vektori koji još nisu dokazani, a za njihovo dokazivanje neophodno je korištenje molekularnih metoda.
- Provesti će se virološko pretraživanje u vektorima radi utvrđivanja cirkulacije virusa bolesti plavog jezika.

9. Izvješćivanje o nalazu uzoraka insekata

Nakon analize uzoraka, za svaku lokaciju i svako prikupljanje uzoraka insekata, Hrvatski veterinarski institut dostavlja Upravi za veterinarstvo i sigurnost hrane izvješće o dobivenim entomološkim podacima, koje sadrži sljedeće podatke:

- Ukupni broj sakupljenih insekata *Culicoides* spp.
- Ukoliko ih ima i broj sakupljenih:
 1. *C. imicola C. obsoletus* Complex
 2. *C. obsoletus sensu strictu C. scoticus*
 3. *C. pulicaris* Complex
 4. *C. nubeculosus* Complex
 5. *C. dewulfi*

10. Financiranje programa

Troškovi provedbe prikupljanja uzoraka komarčića, prijevoza i trošak poštarine za dostavu uzoraka brzom poštom u HVI – Laboratorij za parazitologiju, Savska cesta 143, Zagreb sukladno važećem Cjeniku veterinarskih usluga koje se podmiruju iz državnog proračuna.

11. Upute za sakupljanje uzoraka insekata Culicoides

Pribor potreban za hvatanje

- lampa hvataljka (8 W) s mrežom i uže pomoću kojeg se objesi lampa;
- akumulator;
- punjač za akumulator;
- 2 čaše;
- 70% etanol;
- voda i tekući sapun (bez mirisa);
- cjediljka;
- gaza (10x10 cm),-plastična čaša s poklopcem (100 ml) u koju se ulije 70% etilni alkohol;
- produžni električni kabel.

Način postavljanja lampe hvataljke

- Lampu hvataljku potrebno je objesiti u staji u blizini životinja, na visini od 160-200 cm;
- U čašu uliti 200-300 ml vode i 1-2 ml tekućeg sapuna;
- Čašu (s otopinom sapuna) staviti na mrežicu lampe hvataljke;
- Lampu hvataljku uključiti 1 sat prije sumraka.

Uzimanje uzorka insekata

- Sutradan ujutro isključiti lampu hvataljku 1 sat nakon izlaska sunca;
- Procijediti sakupljene insekte;
- Gazu s insektima staviti u čašu sa 70% etanol i zatvoriti poklopcem;
- Napisati na etiketu čaše broj Obrazca za dostavu uzoraka na laboratorijsko pretraživanje;
- Čašu s insektima držati na hladnom mjestu (hladionik), do transporta u Laboratorij za parazitologiju;
- Ispuniti Obrazac za dostavu uzoraka na laboratorijsko pretraživanje (Labnar).