



Projekti „Putuksiirutajate roll SAK epidemioloogias põhja-parasvõotme tingimustes,, lõpparuanne:

Projekti juht:

ARVO VILTROP
(*ees- ja perekonnanimi*)

Asutus:

EESTI MAAÜLIKOOL
(*programmis lubatud taotleja*)

Projekti juhi kontaktandmed: 7313210, Kreutzwaldi 62, 51014 Tartu; arvo.viltrop@emu.ee
(*telefon, posti ja e-posti aadress*)

Projektitulemuste lühikokkuvõte:

Käesolev uuringu käigus kogusime putukaid sigalatest, metssigade söödaplatsidelt Saaremaal ning SAK viirusega nakatunud metssigade korjustelt Raplamaal. Sigalatest kogutud verdimevate kahetiivaliste mitmekesisus oli suurem kui eeldatud toa- ja laudakärbsed. Otseselt SAK positiivsetelt metssea korjustelt kogutud putukatest osutusid viiruse suhtes positiivseteks ka ainult seaga põgusalt kokkupuutuvad liigid. Tugevam signaal ning viirustüve sekveneerimine (Genotüüp 2 alatüüp CVR1) osutus võimalikuks vaid osadest kogutud seatäidest. Viiruse levikualadel paiknevate metssigade söödaplatsidelt kogutud putukatest SAK viiruse DNAd tuvastada ei õnnestunud.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektitulemuste lühikokkuvõte inglise keeles:

To study the potential spread of African swine fever virus (ASFV) via arthropod vectors, blood-sucking insects from 12 pig farms, from 3 wild boar feeding areas in Saaremaa and from 3 carcasses of ASFV-positive wild boar in Raplamaa were collected. The diversity of blood-sucking dipteran species in pig farms was higher than expected, consisting also forest species. None of the insects collected from relevant wild boar feeding areas tested ASFV-positive. Most of the insects collected from dead wild boar carcasses tested ASFV DNA-positive. Virus subtype (Genotype 2 subtype CVR1) sequencing succeeded only in case of 3 hog lice.

(tulemused, soovitusel, kuni 600 tähekohta)

Projektis esitatud eesmärkide saavutamine (sh kasutatud meetodika):

Uuringu lähteülesanne sisaldas kahte peamist eesmärki:

1. Selgitada seafarmides esinevaid kahetiivaliste - kärkse, parmu ja sääseliike ning hinnata nende võimalikku levimist metsakeskkonnast sigalasse.

Selle eesmärgi saavutamiseks koguti kärkse- ja muude farmis leiduvate kahetiivaliste proove 12 seafarmist augustis – septembris 2016 ja maist kuni augustini 2017. Kõik farmid ei osalenud kõigil proovikogumiskordadel. Kokku tuli proove viiest kogumiskorrast 45. Proove koguti lautades kasutamiseks mõeldud liimiga kaetud kärksepaperitega, 60x30cm lehed, tootja DeLaval. 3D kujundus, ruumiline muster ja helenduvate värvide kombinatsioon on varasemalt osutunud tõhusaks putukate püüdmisel, mis on ka uuringutega tõestatud. 3D kärksepaper toimib nii päevavalguses kui ka hämaruses. 100 m² laudaruumi kohta arvestatud üks paber. Paber paigutati seinale loomadele võimalikult lähedale. Kui laudaruumides kasutati kärksestõrjemeetodina nn. kiskjakärbest, siis pandi kärkselõks üles laudaga seotud olmeruumi. Liimiga kaetud lõksud olid väljas ühe püügikorra raames 3 ööpäeva (3x24h). Paberite üles panekut ja maha võtmist organiseerisid farmitöötajad. Bioturvalisuse nõuete tõttu katse läbiviijaid seafarmide territooriumile ei lubatud. Seega leiti igast farmist kontaktisik, kelle vahendusel proove koguti. Iga sigala kohta täideti ka ankeet andmetega sigala tüübi, farmis rakendatud pidamissüsteemi, õhutussüsteemi, sõnnikuladustamise meetodi ja muu sarnase kohta.

Püütud putukad toimetati peale 3 ööpäevast kogumisperioodi nii kiiresti kui võimalik laborisse ja hoiti -20°C kuni putukaliikide määramiseni. Koostati farmidest püütud putukaliikide nimekirjad.

2. Hinnata SAK viiruse olemasolu võimalikes putuksiirutajates ning viiruse ülekandumise riski putukate vahendusel.

Antud eesmärgi saavutamiseks koguti putukaid

- a) SAK positiivseks kinnitatud metssigade korjuste pealt. Putukaid õnnestus koguda 2016 aasta sügisel, oktoobris, projekti alguses kolmelt metssea korjuselt Raplamaal (leiukohad: Orguse küla, Juuru vald; Hageri küla, Kohila vald ja Sooniste küla, Märjamaa vald).
- b) SAK uutest levikupiirkondadest Saaremaal. Proove koguti kolmest püügikohast: Salme jahipiirkonna metssigade söödaplats, Hindu küla lähedal; Pärsama jahipiirkonna söödaplats Haeska küla lähedal ja Orissaare jahipiirkonna söödaplats Järveküla lähedal (aruandele lisatud ka fotod püügipaikadest). Üles seati eraldi püünised parmudele ja pistesääskedele. Proovikogumisperioode 2017 suvehooaja jooksul oli kokku kolm: 26.06-02.07; 24.-29.07 ja 4.-9.09. Esimene proovikogumine lükkus juuni lõppu, kuna kevad oli külm ja muudes kogumiskohtades jäi putukaid püünistesse erakordselt vähe.

Kogutud putukad määrati võimalusel liigini. Saaremaalt püütud putukate mass jagati pooleks sugukonna gruppide kaupa (kärbsed, parmud, sääsed) ja määrati vähemalt perekonnani.

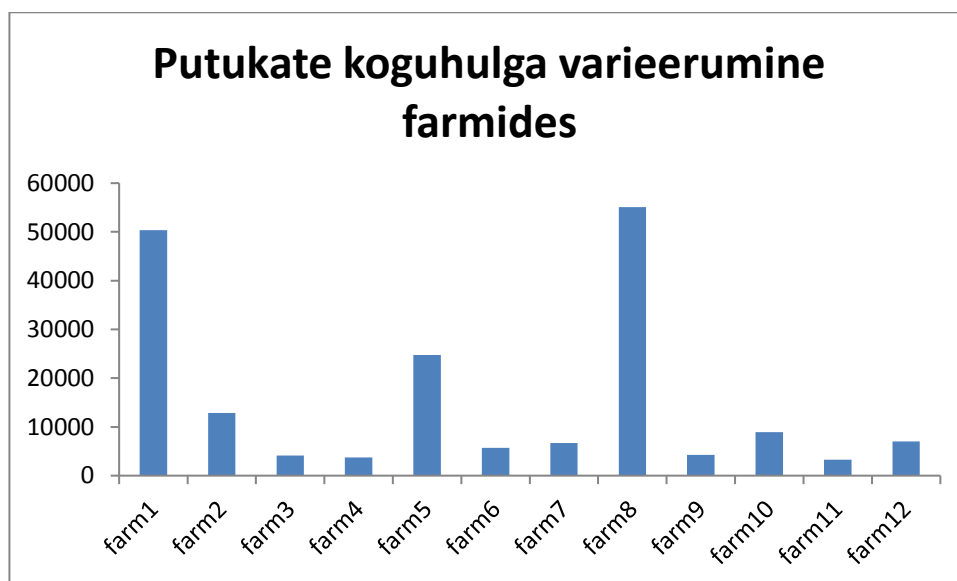
Sarnastest leidudest tehti koondproovid (kuni 25 sääske või kuni 5 parmu; kärbeste massi määramiseni hetkel jõutud ei ole).

Putukaproovidest eraldati kogu mikroobne DNA. Testiti eraldatud DNA materjali SAK – spetsiifiliste geenijärjestuste suhtes (Metoodika avaldatud: Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, et al. 2011. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J Virol Methods* 178: 161-170). Kui proov osutus positiivseks, siis proov sekveneeriti (Metoodika avaldatud: Gallardo C, Anchuelo R, Pelayo V, Poudevigne F, Leon T, Nzoussi J, et al. 2011. African Swine Fever Virus p72 Genotype IX in Domestic Pigs, Congo, 2009. *Emerg Infect Dis.* 17(8):1556-1558.) ja määrati viirustüvi. Viiruse alagruppide eristamiseks valiti SAK viiruse *B602L* geeni keskse varieeruva piirkonna (*CVR*, *central variable region*) spetsiifilised praimerid.

Uuringu tulemused:

1) Seakasvatushoonetega seotud kahetiivaliste liigid

Farmiti varieerus kogutud putukate arv 55109 kuni 3294 isendini (vt. joonis 1). Suurema osa putukate massist moodustasid toakärbsed ja puuviljakärbsed, arvukalt esines ka laudakärbsed. Liimipaberile jäi ka eriti väikeseid putukaid ning ämblikulaadseid, kelle liike ei määratud. Vt. täpsemalt tabel 1.



Joonis 1. Kogutud putukate üldise arvukuse varieerumine uuritud 12 farmis.

Testimaks, millised tegurid võisid mõjutada putukate arvukust lautades, kasutasime regressioonimudelit. Mudelis analüüsitud teguriteks olid: kärbsetõrjevahendite (k.a. kiskjakärbes) kasutamine, lahtiste õhusõjavade olemasolu ning lahtine lägahoidla sigala territooriumil. Mitte ükski uuritud parameetritest ei osutunud statistiliselt oluliseks ($p= 0,08 - 0,1$), mille tõenäoline põhjus on uuringu väike valim. Kõige lähemal statistilisele olulisusele oli

oodatult kärbsetõrjevahendite kasutamine farmis, millel oli kärbeste arvukusele negatiivne mõju.

Tabel 1. Seafarmidest kogutud lüljalgsete liigiline mitmekesisus

Leitud liigid	Eestikeelne liiginimi või täpsustus	Isendite arv	Lautade arv, kus liiki leidis
<i>Musca domestica</i>	toakärbes	165205	12
<i>Drosophila funebris</i>	puuviljakärbse liik	12306	12
<i>Hydrotaea dentipes</i>	kärbseliik; e.k. liiginimetus puudub	541	7
<i>Stomoxys calcitrans</i>	Harilik pistekärbes (laudakärbes)	2156	5
<i>Pyrellia cadaverina</i>	e.k. liiginimetusega laibakärbes	4	2
<i>Haematopota pluvialis</i>	Harilik sõgelane (parmlane)	4	2
<i>Chrysops relictus</i>	metsakibun (parmlane)	1	1
Pistesääsed (määramata)	verdimevad sääsed	207	9
Muud lüljalgsed, liigini määramata (ämblikud, lestad, liblikalised, mardikad, kakandid, sipelgad)		6277	12

Tabeli 1 andmetest selgub, et enamikus uuritud sigalates domineerivad mitte verest toituvad kärbseliigid. Sagedamini esinev verdimeva kärbse liik on Harilik pistekärbes, keda leidis suhteliselt arvukalt viies sigalas (42%). Lisaks leiti kolmest sigalast (25%) üksikuid parmlaste esindajaid (Harilik sõgelane, ja metsakibun). Tegemist on suuremate kärbeste mõõtu parmlaste liikidega, keda mõlemat loetakse potentsiaalseks viiruste siirutajaks ja kes peamiselt elavad looduslikus keskkonnas. Uuringu tulemusel ei saa väita, et SAK-viiruse ülekande toimub metssigadelt kodusigadele parmude vahendusel, kuid see viitab vajadusele küsimust edasi uurida.

2) SAK viiruse võimalik ülekandete nakatunud metssigadega kokkupuutunud putuksiirutajate kaudu.

Surnud metssigade (3 isendit) pealt või kohalt vahetult kogutud putukatest osutusid SAK positiivseiks järgmised – vt. tabel 2.

Tabel 2. Nakatunud metssigadega kontaktis olnud putukad, kes osutusid PCR analüüsil SAK positiivseteks

Putukaliik (isendite arv)	Eestikeelne täpsustus	Viirustüve sekveneerimine
<i>Haematopinus suis</i> (6)	Seatäi; leitud metssea küljest	Õnnestus 3 isendi puhul; Genotüüp 2 alatüüp CVR1
<i>Phiopila vulgaris</i> (2)	Harilik juustukärbes; metssea peal ja kohal	Ei õnnestunud
<i>Calliphora erythrocephala</i> (1)	Kärbes; e.k. liiginimetus puudub	Ei õnnestunud

Sekveneerida õnnestus SAK viirustüvi ainult kolmelt SAK-positiivselt seatäilt, kuid teistelt sigade ja viirusega kokkupuutunud putukatelt mitte. See on ka ootuspärane, kuna viirusmaterjali saamiseks on seaga otsekontaktis elavatel ja verdimevatel täidel eelis leitud kärbseliikide ees. Sekveneerimisel määrati putukatest leitud SAK viirustüvi genotüübi 2 alatüübiks CVR1.

Saaremaal nakatunud seafarmis epidemioloogilise uuringu käigus kogutud putukatelt õnnestus tuvastada SAK viiruse DNAd. Vt. tabel 3. Viirustüve sekveneerimine ei õnnestunud mitte ühegi farmist püütud SAK viiruspositiivse putuka puhul.

Saaremaalt metssigade söödaplatside lähedusest kogutud putukatest tehtud 62 koondproovist (47 sääseproovi ja 15 parmuproovi) osutusid kõik SAK viiruse DNA suhtes negatiivseks. Kogutud putukate liigiline määramine ei olnud aruande esitamise ajaks lõpule viidud.

Tabel 3. SAK nakatunud sigalast püütud putukate uurimise tulemused SAK viiruse DNA suhtes

Putukaliik (isendite arv)	Eestikeelne täpsustus	SAK PCR analüüsi tulemus
Määramata pistesääsed (2)	Verdimevad sääsed	positiivne
<i>Musca domestica</i> (1)	Harilik toakärbes	positiivne
<i>Musca domestica</i> (8)	Harilik toakärbes	negatiivne
<i>Drosophila spp.</i> (1)	Määramata puuviljakärbse liik	positiivne
<i>Drosophila spp.</i> (3)	Määramata puuviljakärbse liik	negatiivne

Soovitused ja ettepanekud:

Meie pilootuuringu tulemused näitavad, et putukad saavad nakatunud sigade peal toitudes või lihtsalt mehhaaniliselt nendega kokku puutudes suure tõenäosusega viirusega saastatud. Samas ei õnnestunud enamusel juhtudest putukatest nii palju viiruse DNAd saada, et sekveneerimisanalüüsi läbi viia.

Näitasime, et seafarmidest on võimalik leida päris palju otseselt metsaga seotud putukaliike (näiteks suur osa leitud pistesääse liikidest ja parmud). Meie uuringu tulemustest ei saa aga järeldada, kas need putukad, kes metsast farmi satuvad, ka viirust edasi kannavad. Samas viitab see vajadusele küsimust edasi uurida.

Muud olulised asjaolud:

Putukate arvukus ja liigiline koosseis on otseselt mõjutatud konkreetse aasta ilmastikutingimustest. Ehk siis tulemusi mõjutavad tugevasti antud aasta ilmastikuolud. Objektiivsemate tulemuste saamiseks tuleks andmeid koguda rohkem kui ühel aastal. Antud asjaoluga on vaja arvestada käesolev uurimistöo tulemuste tõlgendamisel.