

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA PARAZITOLOGIE**

**CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE, FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PARASITOLOGY**

Doktorský studijní program: Parazitologie

Ph.D. study program: Parasitology

Autoreferát dizertační práce

Summary of the Ph.D. Thesis



Komáři a tiplíci jako přenašeči v České republice

Mosquitoes and biting midges as vectors in the Czech Republic

Mgr. Jana Rádrová

Školitel / Supervisor: Doc. RNDr. Jan Votýpka Ph.D.

Praha 2015

CURRICULUM VITAE

Mgr. Jana Rádřová

Date and place of birth: 05. 06. 1982, Strakonice, Czech Republic

Address: Laboratory of Department of Parasitology

Charles University in Prague, Faculty of Science

Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic

tel.: +420 221 951 814

Education

2002 – 2008: Master degree in Parasitology, Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague

Master thesis: Incidence and prevalence of West Nile virus vectors in the Czech Republic

2008 – present: Postgraduate student and researcher at the Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University in Prague

Internships

2012: internship at the Department of Invertebrate Zoology and Parasitology, University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

2012 : internship in the laboratory UMR 190, Emerging Viral Diseases, IRD-Université de la Méditerranée Aix-Marseille 2, Marseille, France

2010, 2011: internship in the laboratory UMR15, Emerging and exotic animal disease control, CIRAD, Montpellier, France

2006: internship in the laboratory UMR 177 Intertryp, IRD-CIRAD, Montpellier, France

Participation at conferences

- Rádrová J., Šeblová V., Votýpka J.:** Virus západonilské horečky a jeho přenašeči v České republice. 2006. Czech Section of Protozoology Meeting, Sedlice at Blatna, Czech Republic
- Rádrová J., Šeblová V., Votýpka J.:** Feeding preferences of *Culex* mosquitoes and spreading of West Nile virus in the Czech Republic. 2009. Labuda days, Bratislava, Slovakia
- Rádrová J., Šeblová V., Galková Z., Votýpka J.:** Distribution and feeding preferences of WNV and BTV vectors in the Czech Republic. 2009. E-SOVE, 5th International Congress of Vector Ecology, Belek-Antalya, Turkey
- Rádrová J., Šeblová V., Votýpka J.:** Feeding preferences of WNV vectors and diversity of trypanosomatids of *Culex* mosquitoes. 2010. Emerging vector-borne Diseases in a Changing European Environment, EDEN 2010, Montpellier, France
- Rádrová J., Galková Z., Šeblová V., Votýpka J.:** Monitoring krevsajících dvoukřídlých a jimi přenášených patogenů na území ČR. 2010. IX Slovak and Czech days of parasitology, Liptovský Ján, Slovakia
- Rádrová J., Klepetková H., Mračková M., Galková Z., Barták P., Lamka J., Votýpka J.:** UV-light trap survey of *Culicoides* in the Czech Republic. 2012. 18th E-SOVE Conference Montpellier, France
- Rádrová J., Klepetková H., Mračková M., Galková Z., Barták P., Lamka J., Votýpka J.:** Monitoring přenašečů viru Bluetongue na území České republiky. 2012. IX Czech and Slovak days of parasitology, Brno, Czech Republic
- Rádrová J., Votýpka J.:** Pathogens in vectors attacking primates in Tanzania and Central African Republic. 2013. SOVE, 6th International Congress in La Quinta, California
- Rádrová J., Jirků M., Petrželková K.J., Modrý D., Lukeš J., Votýpka J.:** Trypanosomes of African great apes and their insect vectors. 2014 19th E-SOVE Conference Thessaloniki, Greece

Publications

- Rádrová J., M. Vlková, V. Volfová, P. Sumová, C. Cêtre-Sossah, S. Carpenter, K. Darpel, I. Rakotoarivony, X. Allène, J. Votýpka, and P. Volf. 2015. Hyaluronidase Activity in Saliva of European *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*.(under review).
- Votýpka, J., J. Rádrová, T. Skalický, M. Jirků, D. Jirsová, A. D. Mihalca, G. D'Amico, K. J. Petrželková, D. Modrý, J. Lukeš. 2015. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.06.005>. in press.
- Mapua, M. I., M. A. Qablan, K. Pomajbíková, K. J. Petrželková, Z. Hůzová, J. Rádrová, J. Votýpka, A. Todd, M. Jirků, F. H. Leendertz, J. Lukeš, C. Neel, and D. Modrý. 2015. Ecology of malaria infections in western lowland gorillas inhabiting Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *Parasitology*. 142: 890–900.
- Rádrová, J., V. Šeblová, and J. Votýpka. 2013. Feeding behavior and spatial distribution of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Wetland Areas of the Czech Republic. *Journal of Medical Entomology*. 50: 1097–1104.
- Ramilo, D., C. Garros, B. Mathieu, C. Benedet, X. Allène, E. Silva, G. Alexandre-Pires, I. P. Da Fonseca, S. Carpenter, J. Rádrová, and J.-C. Delécolle. 2013. Description of *Culicoides paradoxalis* sp. nov. from France and Portugal (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa*. 3745: 243–56.
- Bobeva, A., P. Zehtindjiev, S. Bensch, and J. Rádrová. 2013. A survey of biting midges of the genus *Culicoides* Latreille, 1809 (Diptera: Ceratopogonidae) in NE Bulgaria, with respect to transmission of avian haemosporidians. *Acta Parasitologica*. 58: 585–91.

- Votýpka, J., J. Szabová, J. Rádrová, L. Zídková, and M. Svobodová. 2012.
Trypanosoma culicavium sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 745–754.
- Votýpka, J., V. Šeblová, and J. Rádrová. 2008. Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *Journal of Vector Ecology*. 33: 269–277.
- Herder, S., J. Votýpka, M. Jirků, J. Rádrová, C. J. Janzen, and J. Lukeš. 2007.
Trypanosoma brucei 29-13 strain is inducible in but not permissive for the tsetse fly vector. *Experimental Parasitology*. 117: 111–114.

English version / anglická verze

Abstract

Insect is the largest and the most diverse class of animals and many species have significant impact to people and his activities, whether positive or negative. Since the late 19th century it is known, that bloodsucking insects can serve as vectors of pathogens, causative agents of many infection diseases. As climate change, the distribution and abundance of arthropods including bloodsucking insects can be affected. Emergence of new vector-borne diseases in Europe is likely to be among the most important effects of global changes. In recent years, several vector-borne diseases affecting humans and domestic animals have (re)emerged and spread in Europe with major health, ecological and socio-economical consequences. For example mosquito-borne West Nile virus affects human and animal health, as well. On the other hand, two newly emerged zoonosis, caused by Bluetongue and Schmallenberg viruses and transmitted by biting midges, affect mainly small domestic ruminants.

In the frame of broader projects, two epidemiological and entomological surveys focused on mosquitoes and biting midges as possible vectors of West Nile virus, Bluetongue or Schmallenberg virus were carried out in the Czech Republic. New mosquito and biting midges species were recorded for the Czech Republic, the presence of West Nile virus was found in mosquitoes as well as a new trypanosome species, *Trypanosoma culicavium*. Beside the faunistic studies, and screening for pathogen presence in insect, we studied also feeding preferences of mosquitoes, which strongly correlate with parasite transmissions as they influence the spectrum of the host contacts.

Introduction

Mosquitoes are one of the most studied groups of insect worldwide, while they are known as vectors of many serious infectious diseases like malaria, yellow fever or dengue. In recent decades, several vector-borne diseases affecting human, livestock and also wild animals, have emerged in Europe (Halouzka and Hubálek 1996, Hubálek 2008). Several faunistic studies were undertaken also by several authors within the Czech and Slovak Republics. The most complete study of mosquito fauna of the former Czechoslovakia was published in 1958 (Kramář 1958) then some local studies were done (Minář and Halgoš 1997, Országh et al. 2006, Dvořák 2012). In previous studies,

42 mosquito species have been recorded in our territory, 37 in Bohemia and 37 in Moravia (Országh et al. 2006). Regular trapping of females has been extensive only in two studies in the last few years, 22 species of mosquitoes were trapped, including *Anopheles hyrcanus* and *Uranotaenia unguiculata* (Šebesta et al. 2009, Šebesta et al. 2010). The most recent study from the Lower Dyje basin confirmed 30 species from six genera present in our territory, with the two same most frequent species *Ochlerotatus sticticus* and *Aedes vexans* (Šebesta, et al. 2012). As the region of the South Moravia is known to have a mild climate the most favourable habitat for breeding of mosquitoes within the Czech Republic (Šebesta et al. 2012), can be also favourable for local mosquitoes as potential vectors of pathogens, from which the Ťahyňa, Batai, Lednice, and West Nile viruses have been recorded (Danielová et al. 1972, Hubálek et al. 1998, Juricová et al. 2009, Radrova et al. 2013). Outbreaks and sporadic cases of West Nile fever were reported mainly in Mediterranean countries and in south-eastern Europe (Hubálek and Halouzka 1999, Zeller and Schuffenecker 2004). Human cases of West Nile fever also occurred in the Czech Republic in July 1997, after heavy rains caused extensive floods along the Morava River (Hubálek and Halouzka 1999). The Flavivirus strain isolated in the Czech Republic isolated from *Culex pipens* mosquitoes in 1997 was named as Rabensburg virus (RabV), but exhibited a close antigenic relationship to WNV as well as the complete nucleotide and putative amino acid sequence (Bakonyi et al. 2005).

Transmission of pathogens between vertebrate hosts is achieved by the blood-feeding habit of the mosquitoes, which enables the disease agents to successfully become established in and be transmitted by their arthropod hosts. Especially feeding preferences and spatial distribution of host-seeking mosquitoes are critical aspects of pathogen transmission. These characteristics influence the spectrum of host contacts and consequently the role of mosquitoes as vectors of pathogens. Mainly two mosquitoes species have been also involved in WNV transmission: *Cx. modestus* in France (Mouchet et al. 1970) and *Cx. pipiens* in Israel (Goldblum et al. 1954), Romania (Savage et al. 1999), and the United States (Bernard et al. 2000). These two species are strongly ornithophilic and good enzootic vector candidates. *Cx. modestus* aggressively fed on people and horses and is a "bridge" vector candidate in wet areas of Camargue. *Cx. pipiens* (more ornitophilic than *Cx. modestus*) also fed on horses and acts as a "bridge" vector according to some authors (Kilpatrick et al. 2005).

Avian trypanosomes are transmitted by a wide variety of blood-sucking arthropods belonging to the Simuliidae, Culicidae, Ceratopogonidae or Hippoboscidae (Baker 1976, Linley 1985, Votýpka and Svobodova 2004, Votýpka et al. 2012, Zídková et al. 2012). In invertebrate vectors, trypanosomes multiply in intestine and transmission is completed by ingestion of infected insect or by contaminative

transmission, through feces (Votýpka and Svobodova 2004). Also transmission by predation among birds, by eating of contaminated prey by a raptor is assumed (Dirie et al. 1990). The up-to date study split avian trypanosomes into 11 separate lineages, three of them in accordance of previously described life-cycle data. The *T. corvi* lineage was formed by isolates from hippoboscid flies, songbirds and newly by raptors, the *T. culicavium* lineage was formed by mosquitoes and insectivorous songbirds, and isolates from black flies, songbirds and raptors were found in the *T. cf. avium* lineage (Zídková et al. 2012).

Not only mosquitoes are important vectors of infectious diseases. Biting midges of the genus *Culicoides* are frequently studied as an important subject in human and veterinary medicine and the interest was markedly increased in recent years in relation to outbreaks of their transmitted viral diseases as Bluetongue and Schmallenberg virus. The first study introducing the complete list of *Culicoides* species listed 56 species for the whole territory of the former Czechoslovakia (Országh and Chalupský 1987). The last and the most actual list of *Culicoides* species report 49 species for the lands comprising Bohemia and Moravia (Tóthová and Knoz 2009). For our neighbours and former part of the Czechoslovakia, Slovak republic, was known 55 species of *Culicoides* (Tóthová and Knoz 2009).

Aims of the thesis

- To describe mosquito species occurring in selected wetland localities of the Czech Republic.
- To study feeding preferences of selected mosquito species.
- Detection of transmitted pathogens in mosquitoes with focus on West Nile virus and trypanosomatids.
- To describe biting midges fauna attacking livestock and hoofed game in the frame of Bluetongue virus surveillance programme.

Materials and methods

Materials and methods are described in detail in the original publications, only briefly mainly used these methods:

Insects catching of using CDC traps with different types of attractants

Insects determination using different identification keys

DNA or RNA isolation, cDNA transcription

PCR, nested PCR detection of blood and pathogens

Barcoding

Results and discussion

Mosquito faunal studies were carried out in five separate wetland regions in the Czech Republic during 2004–2007, sampling with dry ice-baited and sentinel host-baited CDC traps. A total of 51,834 mosquitoes from dry ice-baited CDC traps, and 27,411 mosquitoes from sentinel host-baited traps were collected, representing 23 mosquito species that belonged to the genera *Anopheles*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Aedes*, and *Culex*. The dominant species collected using both type of CDC traps during 2004–2007 was *Cx. modestus* (58.5%), followed by *Cx. pipiens* (27.5%) and *Ae. vexans* (4.5%), respectively. With reference to genera, *Culex* spp. comprised 86.4%, *Aedes* spp. 12.1%, *Cq. richiardii* 0.9%, *Anopheles* 0.5%, and *Culiseta* spp. 0.2% of the mosquito fauna. No significant differences were observed in a total number of mosquitoes collected by traps baited either with animals or with CO₂, although species abundance differed. A relatively higher proportion of *Cx. modestus* was collected in the sentinel-baited traps, while the proportion of *Cx. pipiens* was higher in the CO₂-baited traps.

In previous studies, 42 mosquito species have been recorded in our territory, 37 in Bohemia and 37 in Moravia (Országh et al. 2006). Our findings reveal that the mosquito fauna is enriched by new elements from the Mediterranean region. New species, *Anopheles hyrcanus* was found in southern Moravia and this finding represents the northernmost point of *An. hyrcanus* occurrence in Europe. Our findings correspond with the previous findings in Slovakia (Halgos and Benková 2004) and clearly demonstrate further spreading of this Mediterranean species within the temperate zone of central Europe. Finding of this thermophilic species *Anopheles hyrcanus* can be related to the presumed climatic changes (Šebesta 2012). During the last three years, *An. hyrcanus* was repeatedly found in relatively high densities in all studied sites in southern Moravia and it is capable of becoming established in new territories. Some of the recorded mosquito species were earlier considered as rare in the Czech Republic, for example *Culex modestus* or *Coquillettidia richiardii* (Kramář 1958). *Culex modestus* was previously reported only from 3 localities in south Bohemia and in low numbers (Kramář 1958, Rettich et al. 1978). Based on our findings, we can confirm that thermophilic *Cx. modestus* became common in wetland areas in Bohemia during recent years and in many places it constitutes the major species of mosquito fauna.

To measure the role of *Culex* mosquitoes as WNV vectors, host-seeking females were collected using animal-baited traps containing live birds (quail) or mammals (rabbits) and CO₂-baited CDC traps placed in wetlands in the Czech Republic. *Culex pipiens* and *Culex modestus* were the most frequently collected species. Although *Cx. modestus* did not distinguish between baits, *Cx. pipiens* was collected significantly

more frequently in bird-baited traps. In France, *Cx. modestus* fed on birds and also on humans and horses (Balenghien et al. 2006). Similarly in our study, *Cx. modestus* does not exhibit a preference for either rabbits (53 %) or Japanese quail (47). On the contrary, higher shift to ornitophilia was described in Russian population (Fyodorova et al. 2006), and same observation was made on south Moravia using sentinel hosts, *Cx. modestus* mosquitoes preferred ducks and chickens, while rabbits were ignored (Minar 1969). Using animal baited traps in Sweden high willingness of Nordic populations of *Cx. pipiens* feed on birds was proved (Jaenson 1990). Similar study was performed also in Israel (Braverman et al. 1991) where *Cx. pipiens* preferred mammalian hosts. In north-eastern Italy, 77 % of *Cx. pipiens* mosquitoes fed on broad spectre of birds, but some willingness to feed on mammals is clear (23 %) (Rizzoli et al. 2015), similar patterns were observed in Spain (Muñoz et al. 2012). Some studies describe also feeding on cold-blooded vertebrates like frogs, lizards or snakes (Apperson et al. 2002, Medlock et al. 2005). The mixed host preferences of the Czech *Cx. pipiens* populations (Radrova et al. 2013) support the hypothesis of a north-south gradient of *Cx. pipiens* mosquito host preferences, ranging from strictly ornithophilic populations in the north to mammaliophilic populations in the south.

Based on mitochondrial DNA analysis of bloodmeals from engorged females collected by CO₂-baited traps situated within reed beds, a diverse group of birds were the predominant hosts (94 %), followed by mammals (4%) including humans, and amphibians (2 %). These results indicate a broad range of avian blood sources exploited by *Culex* mosquitoes. Significant differences in the proportion of bird orders Anseriformes and Passeriformes in *Cx. pipiens* and *Cx. modestus* blood meals were detected. Whereas *Cx. pipiens* prefers Passeriformes (e.g. *Turdus* and *Sturnus*), *Cx. modestus* focuses on Anseriformes (e.g. *Anas* and *Anser*). The differences could be explained by different mosquito occurrence in various biotopes. *Cx. modestus* is more abundant in reeds where Anseriformes occurs frequently, while Passeriformes preferred distant biotopes where a higher proportion of *Cx. pipiens* were collected. This hypothesis is supported by several studies (Magnarelli 1977, Ngo and Kramer 2003, Apperson et al. 2004), describing Passeriformes as the most frequent host of *Cx. pipiens*. Both *Culex* species were observed to feed on both, birds and mammals with different proportion in different countries, and in both West Nile virus was detected, they may be considered as potential WNV “bridge vectors” between birds and humans as well as main vectors in sylvatic avian cycle (Platonov et al. 2008).

In total, WNV was detected in ten pools of both studied *Culex* species, four *Cx. modestus* from south Bohemia and six *Cx. pipiens* from south Moravia, and our findings support the previous hypothesis that *Cx. pipiens* and *Cx. modestus* are the principal vectors of WNV in the Czech Republic. Based on sequence analysis, our

RNA positive pools belong to Rabensburg virus (RabV; subtype of WNV; lineage 3) previously isolated in southern Moravia from *Cx. pipiens* in 1997, 1999 and 2006 from *Ae. rossicus*. (Hubálek et al. 1998, Hubalek et al. 2010). In 2013, WNV lineage 2 were isolated from *Culex modestus* (Rudolf et al. 2014). Obtained isolates suggest the occurrence of the virus in another localities, WNV was detected for the first time in mosquitoes captured in Bohemia (four pools of *Cx. modestus*)(Radrova et al. 2013). The first detection of WNV (subtype RabV) in *Cx. modestus* in Bohemia and confirmation of WNV presence in *Cx. pipiens* in Moravia together with observed feeding behaviour supports the presumed role of both *Culex* species in the avian-to-avian enzootic WNV cycle and in avian-to-mammal transmission in the Czech Republic.

In conjunction with trypanosome PCR screening among mosquitoes captured around fishponds in southern Moravia and Bohemia during WNV study, 129 pools representing 5565 individuals of *Culex (Culex) pipiens* and *Culex (Barraudius) modestus* were tested. Altogether, 11 pools were positive for trypanosome DNAs and of those, only seven (5.5% of the total) were *T. culicavium* by sequencing of part of the SSU rRNA gene. The prevalence of tested mosquitoes was 0.3% for *C. pipiens* and 0.05% for *C. modestus*. The presence of parasites found by dissection and by PCR demonstrates that *T. culicavium* occurs in *Culex* mosquitoes at various localities (forest areas and wetlands) in Bohemia and Moravia. Our data, based on naturally infected mosquitoes, indicate that *T. culicavium* is able to infect at least two different subgenera of the genus *Culex*. Molecular detection of avian trypanosomes (belonging to the *T. avium* and *T. corvi* groups) in wild-caught vectors was reported in USA (Van Dyken et al. 2006), who found three (0.2%) positive *Culex pipiens* and *Culex tarsalis* mosquitoes.

Insect sampling using CDC black-light suction traps near domestic livestock and hoofed game provides the first comparison of *Culicoides* fauna attacking these two groups of hosts inhabiting different environments. From almost a half million biting midge specimens collected at 41 sampling sites, 34 species were identified. The biting midge fauna was well described by Országh (1980) who enumerated 63 *Culicoides* species for the area of the former Czechoslovakia. After this study, several papers appeared on diversity, biology and abundance of biting midges or describing new species for the Czech Republic (Országh and Chalupský 1987, Knoz and Vaňhara 1991, Knoz 1997, 1998, Knoz et al. 2004, Tóthová et al. 2004, 2005, Knoz and Tóthová 2008); however the majority of these studies focused only in particular regions part of the country. The last and the most up-to-date checklist of *Culicoides* species reported with 49 species in the Czech Republic and 55 species in Slovakia (Tóthová and Knoz 2009). Recently, five new species were added and the checklist of

Culicoides species found in SK has been updated to 63 species (Sarvašová et al. 2014). Our study updates the number of *Culicoides* species in the Czech Republic to the current 52 species the adding three new species: *Culicoides clastrieri*, *C. odiatus*, and *C. saevus*. Several *Culicoides* species were common for both types of localities, including *C. obsoletus*, a proven vector of the bluetongue and Schmallenberg viruses. On the other hand, a clear difference was found in the total species number caught at localities with livestock (26 species) versus hoofed games (16 species). The *Culicoides obsoletus* species complex, incriminated as a bluetongue virus vector, was predominant in both domestic livestock (91%) and hoofed game (52%). Biting midges were found to be largely absent during at least three winter months, which indicates that the virus overwinters by an alternative mechanism, e.g. in vertebrate hosts or in vector larval stages. Several peaks in *C. obsoletus* abundance suggest several consecutive generations during the year and indicate that *C. obsoletus* is a multivoltine species, as described earlier (Országh 1980, Meiswinkel et al. 2014). The first and usually highest peak appeared in the second half of May, as the first generation emerged. The same tendency was also observed in hoofed game samples. Similarly in Sweden, the first *Culicoides* midges emerge in May to June, depending on locality, and are last caught in August to September (Ander et al. 2012). On the contrary, in Belgium the vector free period is limited to just January (De Regge et al. 2015). We studied also seasonal dynamics of parous and we found that the proportion of parous females in the studied population of biting midges at both types of localities was relatively high, fluctuating between 30 to 40% in average. Parity rates varied during the year at both livestock and hoofed game localities, as *Culicoides obsoletus* is a multivoltine species with more generations per year; its parity rate decreased with the disappearance of the old generation and then increased again with feeding of the new generation. Just a few studies have focused on seasonal dynamics of parous biting midge females. In California, *Culicoides vairiipennis* tend to have a highest proportion of nulliparous females in the early season and later the proportion fluctuated around 50% (Linhares and Anderson 1989) and also in Virginia the proportion of *C. obsoletus* parous females varied throughout the seasons (Zimmerman and Turner 1983).

Bloodsucking diptera are very interesting group of insects, as they serve as vectors of several diseases. There is many criterions for possible transmission of pathogens as presence on the locality, host preferences of possible vectors, vector competence, vector capacity and others natural conditions. And as the climate change, new species of blood sucking insects are spreading into new localities, introducing new pathogens. Continuous monitoring and analysing of bloodsucking insect can predict possible risks of disease outbreaks, and can elucidate unknown or uncertain vector-host relation.

Publications

Votýpka J., Šeblová V., and Rádrová J. 2008. Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *Journal of Vector Ecology*. 33: 269–277.

Rádrová, J., Šeblová V., and Votýpka J. 2013. Feeding behavior and spatial distribution of *Culex* mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Wetland Areas of the Czech Republic. *Journal of Medical Entomology*. 50: 1097–1104.

Votýpka, J., Szabová J., Rádrová J., Zídková L., and Svobodová M. 2012. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 745–754.

Rádrová J., Galková Z., Mračková M., Barták P., Lamka J., and Votýpka J. 2015. Diversity of biting midges attacking wild and domestic ruminants. *Journal of Medical Entomology*. (submitted).

Financial support

This study was supported by Grant agency of Charles University (GAUK24109, GAUK426211), Czech Science Foundation (PhD Grant No. 206/09/H026), and Ministry of Education (projects 0021620828 and LCo6009, COST Action TD1303 EurNegVec, COST-CZ LD14076), EU funds through the European Social Fund under the OP VK project and the state budget of the Czech Republic (CZ.1.07/2.3.00/20.0300).

Česká verze /czech version

Abstrakt

Hmyz je jednou z nejrozmanitějších a nejrozšířenějších skupin živočichů, v rámci které nalézáme mnoho druhů ovlivňujících lidi, ať už pozitivně či negativně. Již od konce 19. století je známo, že krevsající hmyz může hrát roli v přenosu patogenů působících různá onemocnění. Spolu se změnami klimatu dochází také k šíření členovců, včetně krevsajícího hmyzu na nová území, kde může sloužit jako vektor, díky čemuž došlo v uplynulých letech k šíření hmyzem přenosných onemocnění postihujících lidi i domácí zvířata na území Evropy, s dopadem nejen na zdraví, ale také ekologickými a sociálně-ekonomickými důsledky. Jedná se například o komáry přenášený virus západonilské horečky infekční pro lidi i zvířata, nebo dvě zoonózy postihující zejména ovce, Katarální horečka ovcí a virus Schmallerberg, přenášené tiplíky.

V rámci širších projektů byly na území České republiky zpracovány dvě epidemiologické a entomologické studie cílené na komáry a tiplíky jako možné přenašeče viru západonilské horečky, katarální horečky ovcí či viru Schmalenberg. Díky tomu byly na našem území zaznamenány nové druhy komárů i tiplíků, byla prokázána přítomnost viru západonilské horečky v komárech a také byl nalezen nový druh trypanosomy, *Trypanosoma culicavium*. Kromě faunistických studií a detekce patogenů v krevsajícím hmyzu byly studovány i hostitelské preference komárů, které úzce souvisí s přenosem patogenů mezi hostiteli, jelikož ovlivňují druhové spektrum možných hostitelů.

Úvod

Komáři jsou celosvětově jednou z neprostudovanějších skupin hmyzu, zejména proto, že přenášejí mnoho vážných infekčních onemocnění jako je malárie, žlutá zimnice, či horečka dengue. V posledních dekáдах se v Evropě rozšířilo několik hmyzem přenosných onemocnění lidí, hospodářských i volně žijících zvířat (Halouzka and Hubálek 1996, Hubálek 2008). V rámci České republiky a Slovenska bylo publikováno mnoho faunistických studií, nejkompletněji popsaná fauna komárů někdejšího Československa vyšla v roce 1958 (Kramář 1958), později se objevují hlavně lokální studie (Minář and Halgoš 1997, Országh et al. 2006, Dvořák 2012).

Celkem bylo pro naše území popsáno 42 druhů komárů, 37 pro Čechy a 37 pro Moravu (Országh et al. 2006). Během posledních let byly prováděny pravidelné intenzivní odchyty pouze u dvou studií a bylo zaznamenáno 22 druhů komárů včetně *Anopheles hyrcanus* a *Uranotaenia unguiculata* (Šebesta et al. 2009, Šebesta et al. 2010). Nejnovější studie z dolního povodí Dyje potvrzuje 30 druhů komárů z šesti rodů vyskytujících se v České republice, s dominantními druhy *Ochlerotatus sticticus* a *Aedes vexans* (Šebesta, et al. 2012). Region jižní Moravy je znám svým mírným klimatem, který je příhodný pro mnoho druhů komárů (Šebesta et al. 2012) a také jimi přenášených patogenů jako viry Ťahyňa, Batai, Lednice či virus západonilské horečky (virus West Nile, WNV), které zde byly detekovány (Danielová et al. 1972, Hubálek et al. 1998, Juricová et al. 2009, Radrova et al. 2013). Výskyt případů západonilské horečky byl hlášen zejména z oblasti mediteránu a jihovýchodní Evropy (Hubálek and Halouzka 1999, Zeller and Schuffenecker 2004), ale lidské případy byly zaznamenány i na našem území, po silných deštích a záplavách v okolí řeky Moravy v roce 1997 (Hubálek and Halouzka 1999). Flavivirus izolovaný v České republice z komára *Culex pipiens* v roce 1997 byl pojmenován Rabensburg virus (RabV), nicméně vykazoval blízkou příbuznost s virem West Nile (Bakonyi et al. 2005).

Přenos patogenů mezi savčími hostiteli je nejčastěji uskutečněn během sání krevsajícího hmyzu. Zejména hostitelské preference či výskyt komárů a dalších přenašečů jsou kritické aspekty přenosu. Tyto vlastnosti ovlivňují spektrum kontaktů s hostitelem a následně i roli komárů v přenosu. Zejména dva druhy komárů byly popsány jako přenašeči WNV: *Cx. modestus* ve Francii (Mouchet et al. 1970) a *Cx. pipiens* v Izraeli (Goldblum et al. 1954), Rumunsku (Savage et al. 1999), a Spojených státech (Bernard et al. 2000). Oba tyto druhy jsou silně ornitofilní a velmi dobří enzootiční vektorů. *Culex modestus* saje agresivně na ptácích a také na koních a lidech (Balenghien et al. 2006), je tedy ideálním vektorem mezi ptačími a savčími hostiteli. *Culex pipiens* je více ornitofilní než *Cx. modestus*, nicméně podle některých autorů bylo pozorováno sání i na savcích (Kilpatrick et al. 2005).

Ptačí trypanosomy jsou přenášeny širokým spektrem krevsajícího hmyzu ze skupin Simuliidae, Culicidae, Ceratopogonidae či Hippoboscidae (Baker 1976, Linley 1985, Votýpka and Svobodova 2004, Votýpka et al. 2012, Zídková et al. 2012). V bezobratlém hostiteli se trypanosomy namnoží ve střevě a přenos je dokončen pozřením infikovaného vektora či kontaminativně, výkaly obsahujícími prvoky

(Votýpka a Svobodova 2004). Další možností je predace mezi ptačími hostiteli (Dirie et al. 1990). Aktuální studie rozděluje ptačí trypanosomy do jedenácti samostatných linií, přičemž tři z nich jsou v souladu s již dříve popsány životními cykly. Linie *T. corvi* je poskládána z izolátů klošů, pěvců a dravců, do *T. culicavium* linie spadají izoláty z komárů a hmyzožravých pěvců a izoláty z muchniček, pěvců a dravců formují *T. cf. avium* linii (Zídková et al. 2012).

Nejen komáři jsou důležitými vektory infekčních onemocnění. V posledních letech se do popředí zájmu dostávají také tiplíci rodu *Culicoides*, spolu s jimi přenášenými viry Bluetongue (katarální horečka ovcí) a Schmallenberg. První studie kompletní fauny tiplíků popisuje celkem 56 druhů pro území bývalého Československa (Országh and Chalupský 1987a), poslední a nejaktuálnější seznam rodu *Culicoides* čítá 49 druhů pro Čechy a Moravu a 55 druhů pro Slovensko (Tóthová and Knoz 2009).

Cíle práce

- Popsat druhy komárů vyskytující se na vybraných rybníčných lokalitách v České republice
- Prostudovat hostitelské preference vybraných druhů komárů
- Detekovat přenášené patogeny se zaměřením na West Nile virus a trypanosomatida
- Popsat faunu tiplíků v okolí dobytka a oborové zvěře v rámci programu na sledování vektorů katarální horečky ovcí

Materiál a metodika

Materiál a metodika jsou detailně popsány v jednotlivých publikacích, pouze stručně hlavní používané metody:

- odchyt hmyzu pomocí CDC pastí s různými typy lákadel
- determinace hmyzu pomocí různých determinačních klíčů
- izolace DNA a RNA, přepis do cDNA
- PCR, nested PCR detekce krve a patogenů
- barcoding

Výsledky a diskuze

Fauna komárů České republiky byla studována na pěti různých rybníčných lokalitách v letech 2004-2007. Odchyty probíhaly pomocí CDC pastí s CO₂ atraktantem nebo s hostitelským zvířetem. Celkem bylo pomocí CO₂ odchyceno 51,834 komárů a pomocí hostitelského zvířete 27,411 komárů, patřících do podrodů *Anopheles*, *Culiseta*, *Coquillettidia*, *Aedes* a *Culex*. Dominantními druhy pro oba typy lákadel byly *Cx. modestus*, *Cx. pipiens* a *Ae. vexans*. Co se týče rodů, *Culex* spp. představoval 86,4%, *Aedes* spp. 12,1%, *Coquillettidia* 0,9%, *Anopheles* 0,5%, a *Culiseta* spp. 0,2% z celkové komáří fauny. Mezi typy atraktantů (CO₂ vs hostitelské zvíře) nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl v počtu odchycených jedinců na past, nicméně procentuální zastoupení jednotlivých druhů se lišilo. Pastí se zvířetem nachytaly více komárů druhu *C. modestus*, naopak pastí s CO₂ více zástupců *Cx. pipiens*.

V předchozích studiích bylo na území České republiky zaznamenáno 42 druhů komárů, 37 pro Čechy, 37 pro Moravu (Országh et al. 2006). Během našich odchytů jsme zaznamenali průnik a šíření teplomilných druhů na naše území, například nový druh *Anopheles hyrcanus* byl nalezen na jižní Moravě, což je zatím jeho nejsevernější evropský nález. Náš poznatek koresponduje s předchozím objevem tohoto druhu na Slovensku (Halgos and Benková 2004) a dokazuje šíření tohoto mediteránního druhu do mírného pásu střední Evropy, což může být způsobeno předpokládaným globálním oteplováním. V posledních třech letech byl *An. hyrcanus* opakovaně zaznamenán na několika lokalitách na jižní Moravě, což naznačuje jeho schopnost etablovat se na nových lokalitách a postupně se šířit na další území. Některé z odchycených druhů komárů byly u nás dříve považovány spíše za vzácné, jako například *Culex modestus* nebo *Coquillettidia richiardii* (Kramář 1958). *Culex modestus* byl nalezen pouze na třech lokalitách v Čechách a navíc v nízkých počtech (Kramář 1958, Rettich et al. 1978). Nicméně během naší studie se tento druh jevil jako velmi hojný, zejména v rybníčných oblastech, kde je majoritním druhem.

Abychom zhodnotili roli komárů rodu *Culex* v přenosu viru West Nile, zaměřili jsme se na odchyt nasátých samic v rybníčných oblastech České republiky. *Culex modestus* a *Cx. pipiens* byly nejpočetnější druhy odchycené pomocí pastí se zvířecím jako atraktantem. Ve Francii je popisováno sání *Cx. modestus* ptácích, koních a lidech (Balenghien et al. 2006), což potvrzuje i naše studie, v níž *Cx. modestus* nepreferoval

ani králíka (53 %) ani křepelku (47 %). Posun k ornitofilii je naopak popisován u ruské populace (Fyodorova et al. 2006) a podobné pozorování je zaznamenáno také na jižní Moravě, kdy *Cx. modestus* vyhledával především kuřata a kachny, zatím co králíci byli ignorováni (Minar 1969). Druhý studovaný druh *Cx. pipiens* signifikantně častěji naletoval do pastí s ptačím hostitelem. Ve Švédsku byla díky pastem se zvířecími hostiteli prokázána ochota nordických populací k sání na ptácích (Jaenson 1990), zatím co v podobné studii v Izraeli *Cx. pipiens* preferoval spíše savčí hostitele (Braverman et al. 1991). Na severovýchodě Itálie preferovalo 77 % *Cx. pipiens* na ptácích, nicméně jistá tendence k sání na savcích je zřetelná (Rizzoli et al. 2015), stejně tak ve Španělsku (Muñoz et al. 2012). Smíšené hostitelské preference české populace *Cx. pipiens* (Radrova et al. 2013) podporují hypotézu severo-j jižního gradientu, kdy striktně ornitofilní severské populace postupně přecházejí v mamaliofilní populace na jihu Evropy.

Na základě analýzy mitochondriální DNA z krve nasátých samic odchycených pomocí CO₂ pastí instalovaných zejména v rákosinách okolo rybníků, se jako hlavní hostitel ukázala různorodá skupina ptáků (94 %) následovaná savci včetně lidí (4 %) a obojživelníky (2 %). Signifikantní rozdíl byl zaznamenán v zastoupení ptačích řádů Anseriformes a Passeriformes u *Cx. pipiens* a *Cx. modestus*. Zatím co *Cx. pipiens* preferoval pěvce (např. drozd, špaček), *Cx. modestus* se zaměřoval spíše na vrubozobé (kachna, husa). Rozdíl je možné vysvětlit výskytem jednotlivých druhů v lehce odlišných biotopech. *Culex modestus* se vyskytuje hlavně v rákosí, kde jsou lehce dostupní vrubozobí ptáci, zatím co pěvci preferují biotopy dále od rákosí, kde se více vyskytuje i *Cx. pipiens*. Tuto teorii podporuje několik dalších studií (Magnarelli 1977, Ngo and Kramer 2003, Apperson et al. 2004), v nichž jsou pěvci popisováni jako nejčastější hostitelé *Cx. pipiens*. Oba tyto druhy sají s různou četností jak na ptácích, tak na savcích, a zároveň byl u obou detekován virus West Nile. Mohou být tedy považovány za potenciální přenašeče onemocnění z ptačích hostitelů na lidi, stejně jako hlavní vektorů v sylvatickém cyklu mezi ptáky (Platonov et al. 2008).

Virus západonilské horečky byl detekován v deseti vzorcích komárů rodu *Culex*. Získané izoláty (4 x *Cx. modestus*) z Čech naznačují rozšíření viru na nové lokality a zároveň podporují hypotézu, že *Cx. pipiens* a *Cx. modestus* jsou hlavními vektory viru West Nile v České republice. Na základě sekvenční analýzy se naše izoláty řadí do linie Rabensburg viru (RabV; subtype WNV; linie 3), dříve izolovaného

na jižní Moravě z *Cx. pipiens* v letech 1997, 1999 a 2006 z *Ae. rossicus*. (Hubálek et al. 1998, Hubalek et al. 2010). V roce 2013 byl z *Cx. modestus* nově izolován také WNV spadající do linie 2 (Rudolf et al. 2014). Detekce WNV (subtyp RabV) v jižních Čechách a potvrzení přítomnosti viru v *Cx. pipiens* na jižní Moravě spolu s pozorovanými hostitelskými preferencemi potvrzují roli obou druhů, *Cx. pipiens* a *Cx. modestus*, v ptačím enzootickém cyklu viru West Nile a zároveň možnost jeho přenosu na savce v České republice.

Během detekce trypanosomatid v komárech odchycených v rybníčných oblastech České republiky, bylo testováno celkem 129 vzorků (5,565 komárů) druhů *Culex pipiens* a *Cx. modestus*. Celkem bylo pozitivních 11 vzorků, z toho sedm bylo potvrzeno jako *Trypanosoma culicavium*. Prevalence v komárech byla 0.3% pro *C. pipiens* a 0.05% pro *C. modestus*. Přítomnost parazitů prokázána jak pitvami, tak PCR detekcí a sekvenční analýzou, ukázala, že *T. culicavium* se vyskytuje v komárech rodu *Culex* v různých biotopech (lesy, rybníčné oblasti) v Čechách a na Moravě a je schopná infikovat minimálně dva druhy komárů. Molekulární detekce ptačích trypanosom v komárech byla publikována také v USA, kde byla pozitivita 0,2 % u druhů *Cx. pipiens* a *Cx. tarsalis* (Van Dyken et al. 2006).

Odchyty hmyzu pomocí CDC pastí s UV světlem v blízkosti dobytka a oborové zvěře poskytlo první srovnání fauny tiplíků rodu *Culicoides* vyskytujících se v těchto dvou odlišných habitatech. Z více jak půl milionu odchycených jedinců na 41 odchyťových lokalitách bylo identifikováno 34 druhů tiplíků rodu *Culicoides*. Fauna tiplíků byla velmi dobře popsána Országhem (1980), který napočítal celkem 63 druhů tiplíků na území bývalého Československa. Následovalo několik studií cílených na diverzitu, biologii a výskyt, či popis nových druhů tiplíků (Országh and Chalupský 1987, Knoz and Vaňhara 1991, Knoz 1997, 1998, Knoz et al. 2004, Tóthová et al. 2004, 2005, Knoz and Tóthová 2008), nicméně většina těchto studií byla zaměřena pouze na omezenou část území. Nejnovější seznam uvádí 49 druhů pro Čechy a 55 pro Slovensko (Tóthová and Knoz 2009) a recentně bylo popsáno pět nových druhů pro Slovensko (Sarvašová et al. 2014). Výsledky našich odchytů uvádějí pro Českou republiku tři nové druhy *Culicoides clastrieri*, *C. odiatus*, a *C. saevus*. Mnoho druhů bylo pro oba typy hostitelů shodných, včetně *C. obsoletus*, prokázанého vektora katarální horečky ovcí a viru Schmollenberg. Zřetelný rozdíl byl zaznamenán v celkovém počtu odchycených druhů mezi dobytkem (26) a oborovou zvěří (16).

Culicoides obsoletus komplex dominoval jak u dobytka (91 %) tak u oborové zvěře (52 %). Během několika sezon byla sledována sezonní dynamika nejhojnějšího druhu *C. obsoletus* u dobytka i oborové zvěře. Během sezony bylo pozorováno několik vrcholů výskytu *C. obsoletus*, což odpovídá multivoltinímu druhu s několika generacemi do roka (Országh 1980, Meiswinkel et al. 2014). První a obvykle nejvyšší výskyt se objevuje v polovině května s vylétnutím první generace. Během zimních měsíců nebyli tiplíci nalézáni, což naznačuje alternativní mechanismus přezimování viru. Stejná tendence se objevuje i u oborové zvěře. Podobně se ve Švédsku objevují první tiplíci během května a června a poslední v srpnu a září (Ander et al. 2012), naopak v Belgii je beztiplíkové období limitováno pouze na leden (De Regge et al. 2015). Sledovali jsme také dynamiku parních (již sátých) samic druhu *C. obsoletus*. Procento parních samic bylo po celou sezonu poměrně vysoké, mezi 30 a 40% v průměru bylo pozorováno jak u dobytka, tak u oborové zvěře od jara do podzimu. Jelikož je *C. obsoletus* multivoltinní druh s více generacemi do roka, počet parních samic klesal s vymizením staré generace a naopak stoupal po nasátí generace nové. Pouze několik studií je věnuje sezónní dynamice parních samic. Stejně jako v naší studii, ve Virginii počet parních *C. obsoletus* fluktuuje během sezony (Zimmerman and Turner 1983). Kalifornský *Culicoides vairiipennis* vykazuje vyšší procento nulliparních samic na začátku sezony a později se pohybuje okolo 50 % (Linhares and Anderson 1989).

Krevsající Diptera jsou jednou z nejzajímavějších skupin hmyzu, jelikož mimo jiné slouží jako přenašeči mnoha onemocnění. Existuje mnoho podmínek pro uskutečnění přenosu patogenu, jako je jeho přítomnost na dané lokalitě, kapacita a kompetence vektora a další přírodní podmínky. V souladu s globálními změnami klimatu se nové druhy nejen krevsajícího hmyzu šíří na nové lokality a spolu nimi i nová onemocnění. Kontinuálním sledováním a testováním krevsajícího hmyzu je možné předpovědět riziko propuknutí epidemie, či objasnit vztahy patogen-hostitel.

Publikace

Votýpka J., Šeblová V., and Rádrová J. 2008. Spread of the West Nile virus vector *Culex modestus* and the potential malaria vector *Anopheles hyrcanus* in central Europe. *Journal of Vector Ecology*. 33: 269–277.

Rádrová, J., Šeblová V., and Votýpka J. 2013. Feeding behavior and spatial distribution of *Culex mosquitoes* (Diptera: Culicidae) in Wetland Areas of the Czech Republic. *Journal of Medical Entomology*. 50: 1097–1104.

Votýpka, J., Szabová J., Rádrová J., Zídková L., and Svobodová M. 2012. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 745–754.

Rádrová J., Galková Z., Mračková M., Barták P., Lamka J., and Votýpka J. 2015. Diversity of biting midges attacking wild and domestic ruminants. *Journal of Medical Entomology*. (submitted).

References

- Ander, M., R. Meiswinkel, and J. Chirico. 2012.** Seasonal dynamics of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*), the potential vectors of bluetongue virus, in Sweden. *Vet. Parasitol.* 184: 59–67.
- Apperson, C. S., B. A. Harrison, T. R. Unnasch, H. K. Hassan, W. S. Irby, H. M. Savage, S. E. Aspen, D. W. Watson, L. M. Rueda, B. R. Engber, and R. S. Nasci. 2002.** Host-Feeding Habits of *Culex* and Other Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with Characters and Techniques for Identification of *Culex* Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 39: 777–785.
- Apperson, C. S., H. K. Hassan, B. A. Harrison, H. M. Savage, S. E. Aspen, A. Farajollahi, W. Crans, T. J. Daniels, R. C. Falco, M. Benedict, M. Anderson, L. McMillen, and T.**

- R. Unnasch. 2004.** Host Feeding Patterns of Established and Potential Mosquito Vectors of West Nile Virus in the Eastern United States. 4: 71–82.
- Baker, J. 1976.** Biology of the trypanosomes of birds in W.H.R. Lumsden, D.A. Evans (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, London/New York/San Francisco. 131–174.
- Bakonyi, T., Z. Hubálek, I. Rudolf, and N. Nowotny. 2005.** Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 11: 225–231.
- Balenghien, T., F. Fouque, P. Sabatier, and D. J. Bicout. 2006.** Horse-, Bird-, and Human-Seeking Behavior and Seasonal Abundance of Mosquitoes in a West Nile Virus Focus of Southern France. *J. Med. Entomol.* 43: 936–946.
- Bernard, K. A., J. G. Maffei, S. A. Jones, E. B. Kauffman, G. Ebel, A. P. Dupuis, K. A. Ngo, D. C. Nicholas, D. M. Young, P. Y. Shi, V. L. Kulasekera, M. Eidson, D. J. White, W. B. Stone, and L. D. Kramer. 2000.** West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 679–85.
- Braverman, Y., U. Kitron, and R. Killick-Kendrick. 1991.** Attractiveness of Vertebrate Hosts to *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and Other Mosquitoes in Israel. *J. Med. Entomol.* 28: 133–138.
- Danielová, V., Z. Hájková, J. Minár, and J. Ryba. 1972.** Virological investigation of mosquitoes in different seasons of the year at the natural focus of the Tahyna virus in southern Moravia. *Folia Parasitol. (Praha).* 19: 25–31.
- Dirie, M., R. Ashford, M. LM, M. DH, and E. Green. 1990.** Avian trypanosomes in *Simulium* and sparrowhawks (*Accipiter nisus*). *Parasitology.* 101: 243–247.
- Dvořák, L. 2012.** *Culiseta glaphyoptera* (Schiner, 1864): a common species in the southwestern Czech Republic. *Eur. Mosq. Bull.* 30: 66–71.
- Van Dyken, M., B. Bolling, C. Moore, C. Blair, B. Beaty, W. Blackiv, and B. Foy. 2006.** Molecular evidence for trypanosomatids in *Culex* mosquitoes collected during a West Nile virus survey. *Int. J. Parasitol.* 36: 1015–1023.
- Fyodorova, M. V., H. M. Savage, J. V. Lopatina, T. A. Bulgakova, A. V. Ivanitsky, O. V. Platonova, and A. E. Platonov. 2006.** Evaluation of Potential West Nile Virus Vectors in Volgograd Region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): Species Composition, Bloodmeal Host Utilization, and Virus Infection Rates of Mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 43: 552–563.
- Goldblum, N., V. Sterk, and B. Paderski. 1954.** West Nile fever; the clinical features of the disease and the isolation of West Nile virus from the blood of nine human cases. *Am. J. Epidemiol.* 59: 89–103.
- Halgos, J., and I. Benková. 2004.** First record of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) from Slovakia. *Biológia Bratislava.* 59: S68.

- Halouzka, J., and Z. Hubálek. 1996.** Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Acta Scientiarum Nat. Acad. Sci. Bohemicae.* 30: 56.
- Hubálek, Z. 2008.** Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 103 Suppl : S29–43.
- Hubálek, Z., and J. Halouzka. 1999.** West Nile fever--a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643–50.
- Hubálek, Z., J. Halouzka, Z. Juricova, and O. Sebesta. 1998.** First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol.* 42: 119–120.
- Hubalek, Z., I. Rudolf, T. Bakonyi, K. Kazdova, J. Halouzka, O. Šebesta, S. Šikutova, Z. Juricova, and N. Nowotny. 2010.** Mosquito (Diptera: Culicidae) Surveillance for Arboviruses in an Area Endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and other Viruses in Central Europe. *J. Med. Entomol.* 47: 466–472.
- Jaenson, T. G. T. 1990.** Vector roles of Fennoscandian mosquitoes attracted to mammals, birds and frogs. *Med. Vet. Entomol.* 4: 221–226.
- Juricová, Z., Z. Hubálek, J. Halouzka, and S. Šikutová. 2009.** Serological examination of songbirds (Passeriformes) for mosquito-borne viruses Sindbis, Tahyna, and Batai in a south Moravian wetland (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 295–9.
- Kilpatrick, a. M., L. D. Kramer, S. R. Campbell, E. O. Alleyne, A. P. Dobson, and P. Daszak. 2005.** West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 425–429.
- Knoz, J. 1997.** Ceatopogonidae (Diptera, Nematocera) recorded firstly in the Czech and Slovak Republics. In: Vaňhara J, Rozkošský R (eds), *Dipterologica bohemoslovaca* 8. *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun. Biol.* 95: 77–87.
- Knoz, J. 1998.** Ceatopogonidae. In: Rozkošný R, Vaňhara J (eds), *Diptera of the Pálava Biosphere Reserve of UNESCO*, I. *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun. Biol.* 99: 113–121.
- Knoz, J., J. Olejníček, and I. Gelbič. 2004.** Biting midges (Diptera, Ceratopogonidae) in the late domestic refuse dump Švábův Hrádek near České Budějovice. *Acta Musei Bohemiae Meridionalis, České Budějovice.* 44: 83 – 85.
- Knoz, J., and A. Tóthová. 2008.** Pakomárcovití (Diptera: Ceratopogonidae) Jizerských hor a Frýdlantska. In: Vonička P, Preisler J (eds), *Results of the entomological survey in the Jizerské hory Mts and Frýdlant region I.* *Acta Musei Bohemiae Boreal. Sci. Nat. Lib.* 26: 157 – 172.
- Knoz, J., and J. Vaňhara. 1991.** The effects of changes in moisture conditions on a community of haematophagous Diptera and ticks in a floodplain forest. In: Penka M, Vyskot M, Klimo E, Vašíček F (eds). *Floodplain For. Ecosyst. after Water Manag. Meas.* 2: 469 – 504.
- Kramář, J. 1958.** *Fauna ČSR.* ČSAV, Praha.

- Linhares, A., and J. Anderson. 1989.** *Culicoides variipennis* (Coquillett): seasonal abundance, voltinism, parity rates, and fecundity in northern California (Diptera: Ceratopogonidae). Bull. Soc. Vector Ecol. 14: 319–335.
- Linley, J. 1985.** Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) as vectors of nonviral animal pathogens. J. Med. Entomol. 22: 589–599.
- Magnarelli, L. A. 1977.** Host feeding patterns of Connecticut mosquitoes (Diptera: Culicidae). Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 547–52.
- Medlock, J. M., K. R. Snow, and S. Leach. 2005.** Potential transmission of West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors. Med. Vet. Entomol. 19: 2–21.
- Meiswinkel, R., F. Scolamacchia, M. Dik, J. Mudde, E. Dijkstra, I. J. K. Van Der Ven, and A. R. W. Elbers. 2014.** The Mondrian matrix: *Culicoides* biting midge abundance and seasonal incidence during the 2006–2008 epidemic of bluetongue in the Netherlands. Med. Vet. Entomol. 28: 10–20.
- Minar, J. 1969.** Contribution to the bionomy of *Culex modestus* Fic.(Diptera, Culicidae) in Southern Moravia. Folia Parasitol. 16: 93–96.
- Minář, J., and J. Halgoš. 1997.** Zoogeographically significant mosquitoes in the territory of Bohemia and Slovakia. Dipterologica Bohemoslov. 8: 129–132.
- Mouchet, J., J. Rageau, C. Laumond, C. Hannoun, D. Beytout, J. Oudar, B. Corniou, and A. Chippaux. 1970.** Epidemiology of West Nile virus: study of a focus in Camargue. V. The vector: *Culex modestus* Ficalbi Diptera; Culicidae. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 118: 839–55.
- Muñoz, J., S. Ruiz, R. Soriguer, M. Alcaide, D. S. Viana, D. Roiz, A. Vázquez, and J. Figuerola. 2012.** Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. PLoS One. 7: e39549.
- Ngo, K. a, and L. D. Kramer. 2003.** Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. J. Med. Entomol. 40: 215–222.
- Országh, I. 1980.** Ceratopogonidae. In: Chvála M (ed), Krevsající mouchy a strecci – Diptera., Fauna CSSR 22, Acad. Praha.
- Országh, I., and J. Chalupský. 1987.** Ceratopogonidae (Heleidae). Acta Entomol. Musei Natl. Pragae. 18: 48–52.
- Országh, I., J. Minář, and J. Halgoš. 2006.** Culicidae Meigen, 1818. In: Jedlička L., Stloukalová V., Kúdela M. (eds.). In Checkl. Diptera Czech Repub. Slovakia. Comenius Univ. Bratislava, Slovakia.

- Platonov, A. E., M. V Fedorova, L. S. Karan, T. A. Shopenskaya, O. V Platonova, and V. I. Zhuravlev. 2008.** Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol. Res.* 103 Suppl : S45–53.
- Radrova, J., V. Seblova, and J. Votypka. 2013.** Feeding behavior and spatial distribution of *Culex mosquitoes* (Diptera: Culicidae) in Wetland Areas of the Czech Republic. *J. Med. Entomol.* 50: 1097–1104.
- De Regge, N., R. De Deken, C. Fassotte, B. Losson, I. Deblauwe, M. Madder, P. Vantieghem, M. Tomme, F. Smeets, and A. B. Cay. 2015.** *Culicoides* monitoring in Belgium in 2011: analysis of spatiotemporal abundance, species diversity and Schmallenberg virus detection. *Med. Vet. Entomol.* 29: 263–75.
- Rettich, F., J. Albert, and J. Kadlčík. 1978.** A study on the mosquitoes (Diptera, Culicidae) of the Třeboň basin. *Dipterologia Bohemoslov. Bratislava.* 1: 225–241.
- Rizzoli, A., L. Bolzoni, E. A. Chadwick, G. Capelli, F. Montarsi, M. Grisenti, J. M. de la Puente, J. Muñoz, J. Figuerola, R. Soriguer, G. Anfora, M. Di Luca, and R. Rosà. 2015.** Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit. Vectors.* 8: 213.
- Rudolf, I., T. Bakonyi, O. Šebesta, J. Mendel, J. Peško, L. Betášová, H. Blažejová, K. Venclíková, P. Straková, N. Nowotny, and Z. Hubálek. 2014.** West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? *Eurosurveillance.* 19: 2–5.
- Sarvašová, A., A. Kočíšová, M. Halán, and J. Delécolle. 2014.** Morphological and molecular analysis of the genus *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in Slovakia with five new records. *3872: 541–560.*
- Savage, H., C. Ceianu, G. Nicolescu, N. Karabatsos, R. Lanciotti, A. Vladimirescu, L. Laiv, A. Ungureanu, C. Romanca, and T. Tsai. 1999.** Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 61: 600–611.
- Šebesta, O., F. Rettich, J. Minár, J. Halouzka, Z. Hubálek, Z. Juricová, I. Rudolf, S. Šikutová, I. Gelbic, and P. Reiter. 2009.** Presence of the mosquito *Anopheles hyrcanus* in South Moravia, Czech Republic. *Med. Vet. Entomol.* 23: 284–6.
- Šebesta, O., I. Gelbič, and J. Minář. 2012.** Mosquitoes (Diptera: Culicidae) of the Lower Dyje River Basin (Podyjí) at the Czech-Austrian border. *Cent. Eur. J. Biol.* 7: 288–298.
- Šebesta, O., J. Halouzka, Z. Hubálek, Z. Juřicová, I. Rudolf, S. Šikutová, P. Svobodová, and P. Reiter. 2010.** Mosquito (Diptera: Culicidae) fauna in an area endemic for West Nile virus. *J. Vector Ecol.* 35: 156–162.
- Tóthová, a., J. Knoz, M. Barták, and S. Kubík. 2005.** Biomonitoring of Ceratopogonidae (Diptera: Nematocera) using car nets. *Entomol. Fenn.* 16: 124–128.

- Tóthová, A., M. Barták, and J. Knoz. 2004.** Ceratopogonidae of the Bílina and Duchcov environs. In: Kubík Š, Barták M (eds), *Dipterologica bohemoslovaca*, 11. Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun. Biol. 109: 305–313.
- Tóthová, A., and J. Knoz. 2009.** Ceratopogonidae Newman, 1834. In: Jedlička L., Kúdela M. & Stloukalová V. (eds): Checklist of Diptera of the Czech Republic and Slovakia. Electron. version 2. <<http://zoology.fns.uniba.sk/diptera2009>>.
- Votýpka, J., and M. Svobodová. 2004.** *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitol. Res.* 92: 147–151.
- Votýpka, J., J. Szabová, J. Rádrová, L. Zídková, and M. Svobodová. 2012.** *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 745–54.
- Zeller, H. G., and I. Schuffenecker. 2004.** West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23: 147–56.
- Zídková, L., I. Cepicka, J. Szabová, and M. Svobodová. 2012.** Biodiversity of avian trypanosomes. *Infect. Genet. Evol.* 12: 102–12.
- Zimmerman, R. H., and E. C. Turner. 1983.** Seasonal abundance and parity of common *Culicoides* collected in Blacklight traps in Virginia pastures. *Mosq. News.* 43: 63 – 69.