

# Πρωτόκολλο MX

V.01.(01/2025) Albin Fontaine

*Μονάδα αναδυόμενων ιών (UVE: Aix-Marseille Univ, Università di Corsica, IRD 190, Inserm 1207, IRBA), Γαλλία.*

*Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA), Μονάδα Ιολογίας, Μασσαλία, Γαλλία.*

## Πλαίσιο :

Η μοριακή ανίχνευση των αρμποϊών στις εκκρίσεις των κουνουπιών που συλλαμβάνονται στο πεδίο προσφέρει μια καινοτόμο, μη επεμβατική προσέγγιση για την παρακολούθηση της κυκλοφορίας τους σε μια περιοχή. Γνωστή ως *Μοριακή Ξενοπαρακολούθηση* (MX), η μέθοδος αυτή έχει αποδείξει την αποτελεσματικότητά της στην ανίχνευση διαφόρων αρμποϊών και παρασίτων χωρίς την ανάγκη σύλληψης ή χειραγώγησης σπονδυλωτών ξενιστών.

Τα μολυσμένα κουνούπια εκκρίνουν πολύ υψηλότερο ιικό φορτίο στα κόπρανά τους από ό,τι στο σάλιο τους, βελτιώνοντας σημαντικά την ευαισθησία της μοριακής ανίχνευσης. Ένα μόνο μολυσμένο θηλυκό μπορεί να απελευθερώσει μεταξύ 3 και 5  $\log_{10}$  αντιγράφων ιικού RNA ανά ημέρα (Fontaine et al., 2016) , καθιστώντας τα εκκρίματα ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση του ιού σε πραγματικό χρόνο. Αξιοποιώντας αυτά τα εκκρίματα, η στρατηγική MX βρίσκεται στη διεπαφή μεταξύ εντομολογικής και περιβαλλοντικής επιτήρησης, καθιστώντας δυνατή την παρακολούθηση της εμφάνισης και της κυκλοφορίας των αρμποϊών σε πραγματικό χρόνο, με χαμηλό κόστος, διατηρώντας παράλληλα καλή ευαισθησία (Ramírez et al., 2018) .

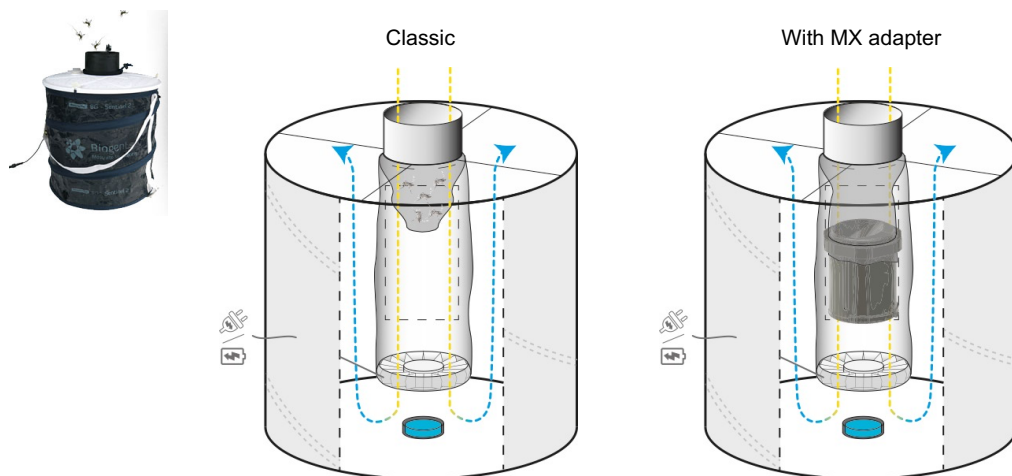
Για να βελτιστοποιήσουμε αυτή την προσέγγιση, σχεδιάσαμε έναν τρισδιάστατα εκτυπωμένο *προσαρμογέα MX*, συμβατό με τις εμπορικές παγίδες BG-Sentinel, BG Pro και CDC light. Η συσκευή αυτή αντικαθιστά το δίκτυο συλλογής και παρέχει υγρό περιβάλλον και πηγή τροφής για τα κουνούπια που συλλαμβάνονται, παρατείνοντας την επιβίωσή τους και αυξάνοντας την παραγωγή περιττωμάτων. Αυτή η καινοτομία προσφέρει μια σειρά από πλεονεκτήματα:

- (i) **Παρατεταμένα διαστήματα συλλογής**, μειώνοντας τη συχνότητα των επεμβάσεων στο πεδίο.
- (ii) **Αυξημένες πιθανότητες ανίχνευσης του ιού**, χάρη στη συσσώρευση των περιττωμάτων για αρκετές ημέρες.
- (iii) **Μειωμένο κόστος παρακολούθησης**, καθώς η ανίχνευση παραμένει ανεξάρτητη από τον αριθμό των δειγμάτων που έχουν παγιδευτεί.

Τα δείγματα περιττωμάτων, που συλλέγονται σε αλουμινόχαρτο, μπορούν να μεταφερθούν σε θερμοκρασία δωματίου για μοριακή ανάλυση, ακολουθούμενη από ταχεία γονιδιωματική αλληλουχία των ανιχνευθέντων ιών. Σε αντίθεση με τις συμβατικές μεθόδους, η στρατηγική MX επιτρέπει :

- **Οικονομικά αποδοτική παρακολούθηση**, με τη δυνατότητα ελέγχου εκατοντάδων δειγμάτων με το κόστος μερικών δεκάδων.
- **Αποτελεσματική ανίχνευση**, που περιλαμβάνει μια ολόκληρη κοινότητα εντόμων-φορέων.
- **Απλοποιημένη εφοδιαστική**, με εύκολη συλλογή και μεταφορά χωρίς την ανάγκη ειδικού εξοπλισμού.
- **Συμβατότητα με συμπληρωματικές αναλύσεις**, όπως η ταυτοποίηση των ειδών φορέων, η εκτίμηση του επιπολασμού της λοίμωξης και η απομόνωση του ιού.

Χάρη σε αυτές τις τροποποιήσεις της παγίδας, η MX επιτρέπει τη συνεχή παρακολούθηση του ιού με εκτεταμένα διαστήματα συλλογής, βελτιώνοντας την αποτελεσματικότητα της επιτήρησης και μειώνοντας παράλληλα το λειτουργικό κόστος. Αυτή η ταχεία, επεκτάσιμη και προσαρμοσμένη στο πεδίο προσέγγιση ενισχύει την έγκαιρη ανίχνευση των αναδυόμενων ιικών απειλών (Bigeard et al., 2024- L'Ambert et al., 2023) .



Σχήμα1. Άποψη και απεικόνιση της παγίδας BG-Sentinel (Biogents) στην κλασική της διαμόρφωση και βελτιστοποιημένη για τη συλλογή εκκρίσεων με τον προσαρμογέα MX.

## 1. Προετοιμασία και εγκατάσταση της παγίδας κουνουπιών :

### 1.1 Εξοπλισμός που απαιτείται στο πεδίο :

- BG Pro / BG Sentinel ή CDC light Trap.
- Τρισδιάστατα εκτυπωμένοι προσαρμογείς (MosquitoBox) για τη συλλογή κουνουπιών και περιττωμάτων.

- Ζάχαρη αραιωμένη σε ποσοστό 10% (10g σε 100 mL νερού) για τον εμποτισμό βαμβακιού που θα τοποθετηθεί στον τροφοδότη μέσα στον προσαρμογέα.
- Καταφύγιο για την προστασία της παγίδας από κακές καιρικές συνθήκες (άνεμος και βροχή).
- Προκομμένο φύλλο αλουμινίου για τη συλλογή περιττωμάτων.
- (Προαιρετικά) Φιάλες διοξειδίου του άνθρακα υπό πίεση.
- (Προαιρετικά) Μπαταρίες 12V για παροχή ρεύματος σε περίπτωση απουσίας πριζών.

*Σημείωση για τον χρήστη* Συνιστάται να προετοιμάσετε εκ των προτέρων τον τρισδιάστατα εκτυπωμένο προσαρμογέα τοποθετώντας έναν κύκλο από αλουμινόχαρτο στο κάτω μέρος και βαμβάκι εμποτισμένο σε ζαχαρόνερο στον τροφοδότη. Ο προσαρμογέας μπορεί στη συνέχεια να αποθηκευτεί στους 4°C για αρκετές ημέρες πριν από τη χρήση. Έτσι εξοικονομείται χρόνος στο πεδίο και αποφεύγεται η τοποθέτηση ζαχαρόνερου στο έδαφος, το οποίο μπορεί να προσελκύσει τα μυρμήγκια.

## 1.1 Προετοιμασία του προσαρμογέα MX :

### 1.1.1 Παρουσίαση της τρισδιάστατης εκτυπωμένης συσκευής

Ο προσαρμογέας είναι ένας κύλινδρος κλειστός και στα δύο άκρα με έναν κοίλο σωλήνα που τον διαπερνά κάθετα. Αποτελείται από 4 μέρη:

- Ένας σωλήνας με σπείρωμα (το σώμα του προσαρμογέα)
- Βάση (τμήμα από το οποίο διέρχεται ο μικρότερος σωλήνας και το οποίο κλείνει με πλέγμα)
- Μια κορυφή (το μέρος από το οποίο περνάει ο μακρύτερος σωλήνας)
- Μια φάτνη
- Ένα δίχτυ (για να το συγκρατήσει στο στόμιο της παγίδας)

Όλα τα εξαρτήματα είναι διαθέσιμα [εδώ](#) με οδηγίες εκτύπωσης.



Εικ2. Όψεις του προσαρμογέα MX με το σπείρωμά του.

### 1.1.2 Δημιουργία του δικτύου

- a. Ετοιμάστε ένα πρότυπο με κύκλο 16,5 εκατοστών, με μια τρύπα 4 εκατοστών στο κέντρο. Κρατήστε τη γωνία στις 165 μοίρες και προσθέστε μια λωρίδα 1,5 cm στη μία πλευρά για το ράψιμο.



- b. Χρησιμοποιήστε το πρότυπο για να χαράξετε το περίγραμμα των τμημάτων στο ύφασμα (κουνουπιέρα ή ύφασμα που αφήνει τον αέρα να περάσει, αλλά όχι τα έντομα).
- c. Κόψτε τμήματα πλεκτού κορδονιού από πολυεστέρα (περίπου 50 cm) και κάψτε τις άκρες τους με αναπτήρα.
- d. Χρησιμοποιήστε πένσα για να σχηματίσετε μια υδρορροή με το κορδόνι στο εσωτερικό της
- e. Ράψτε την υδρορροή, αφαιρώντας τους συνδετήρες, και ράψτε την ευθεία άκρη για να σχηματίσετε έναν κώνο.
- f. Το δίχτυ μπορεί να τοποθετηθεί στον προσαρμογέα (ξεβιδώστε το πάνω καπάκι, τοποθετήστε το στη βάση του διχτυού (μικρή τρύπα) και βιδώστε το συγκρότημα.

### 1.1.3 Προετοιμασία τροφίμων (10% ζαχαρόνερο)

- Ξεκινήστε ξεβιδώνοντας τη βάση για να αποκτήσετε πρόσβαση στο εσωτερικό και αφαιρέστε τον τροφοδότη τραβώντας τον προς τα κάτω.

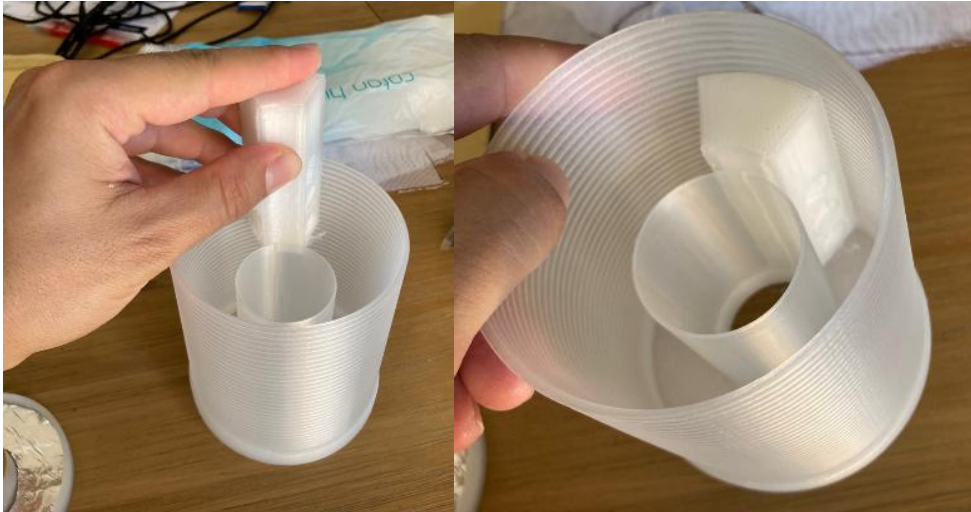




- Γεμίστε τον τροφοδότη με βαμβάκι εμποτισμένο με 10% ζαχαρόνερο (10g ανά 100 mL). Η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί την προηγούμενη ημέρα, οπότε οι τροφοδότες θα πρέπει να διατηρηθούν στους 4°C.



- Σύρετε τον τροφοδότη πίσω στον προσαρμογέα, ανοίγοντας προς τα πάνω, κατά μήκος του τοίχου.



#### 1.1.4 Προετοιμασία δοχείων περιττωμάτων από φύλλο αλουμινίου

- Κόψτε το αλουμινόχαρτο χρησιμοποιώντας το πρότυπο κοπής (ντόνατς). Μπορείτε να κόψετε πολλά κάθε φορά.



*Θα φτιάξουμε μερικούς κόφτες μπισκότων για να διευκολύνουμε αυτό το έργο.*

- Τοποθετήστε ένα φύλλο, με τη ματ πλευρά προς τα πάνω, στο κάτω μέρος του προσαρμογέα. Βιδώστε τη βάση πίσω στον κύλινδρο για να κλείσετε τον προσαρμογέα.



## 1.2 Εγκατάσταση της προσαρμοσμένης παγίδας ΜΧ :

- Τοποθετήστε την παγίδα μακριά από τον άνεμο και τη βροχή (κάτω από μια στέγη, κάτω από ένα τραπέζι κ.λπ.). Το ΜΧ μισεί τη βροχή- ξεπλένει το γενετικό υλικό που έχει εναποτεθεί στο αλουμινόχαρτο.
- Συναρμολογήστε την παγίδα BG Pro σύμφωνα με τις παρεχόμενες οδηγίες.
- Τοποθετήστε τον προσαρμογέα ΜΧ μέσα στην παγίδα





Ο προσαρμογέας μπορεί να συνδεθεί στο στόμιο της παγίδας χρησιμοποιώντας το δίχτυ όπως φαίνεται στη φωτογραφία. Εναλλακτικά, μπορείτε πρώτα να τοποθετήσετε τον προσαρμογέα μέσα στην παγίδα, να ανοίξετε το δίχτυ και να το αφήσετε να επεκταθεί γύρω από την είσοδο της παγίδας, και στη συνέχεια να στερεώσετε το στόμιο της παγίδας πάνω από αυτό. Εν ολίγοις, είστε μόνοι σας όσο τα κουνούπια περνούν και ο ανεμιστήρας λειτουργεί, όλα είναι καλά. 😊

- Εγκαταστήστε δόλωμα BG (Biogents) ή (προαιρετικά) φιάλη διοξειδίου του άνθρακα για την προσέλκυση κουνουπιών.
- Ελέγξτε ότι η παγίδα λειτουργεί σωστά και ότι διαθέτει τροφοδοσία ρεύματος (μπαταρία ή δίκτυο). *Ελέγξτε ότι το περύγιο ανοίγει.*

## 2. Συλλογή περιττωμάτων και κουνουπιών :

### 2.1 Διαδικασία συλλογής :



- Συλλαμβάνετε ενήλικα κουνούπια για περίοδο 3 έως 7 συνεχόμενων ημερών.
- Κατά τη συλλογή, αφαιρέστε προσεκτικά τον προσαρμογέα MX από την παγίδα BG Pro, ενώ ο ανεμιστήρας εξακολουθεί να λειτουργεί, για να αποφύγετε τη διαφυγή.
- Μεταφέρετε ζωντανά κουνούπια στον προσαρμογέα διπλώνοντας το δίχτυ μέσα στο σωλήνα του προσαρμογέα για να αποτρέψετε τη διαφυγή.
- Τα κουνούπια μπορούν να διατηρηθούν έτσι σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετές ημέρες.
- Μόλις βρεθούν στο εργαστήριο, τοποθετήστε τους προσαρμογείς στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τουλάχιστον 30 λεπτά, ώστε να σκοτωθούν τα έντομα που έχουν συλληφθεί.
- Μεταφέρετε τα εξουδετερωμένα κουνούπια σε σωληνάριο 50 ml. Τοποθετήστε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Αφαιρέστε το αλουμινόχαρτο που είναι καλυμμένο με περιττώματα και τοποθετήστε το σε μια σφραγισμένη πλαστική σακούλα (ή ανάμεσα σε δύο φύλλα χαρτιού, που είναι πιο φιλικό προς το περιβάλλον).



*Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί να αφαιρέσετε περιττώματα εντόμων ή σαλιγκαριών, νεκρά φύλλα κ.λπ. με τσιμπιδάκια για να χαλαρώσετε το αλουμινόχαρτο. Αυτές οι φωτογραφίες δείχνουν πώς μοιάζουν τα περιττώματα των κουνουπιών.*

- Αναγνωρίστε σαφώς κάθε δείγμα με την ημερομηνία και τον τόπο συλλογής. Είναι σημαντικό να μπορείτε να ανατρέξετε στις συλλογές μόλις ανιχνευθεί ο ιός στα περιττώματα.

### 3. Μεταφορά δείγματος :

- Στείλτε το φύλλο αλουμινίου που περιέχει τα περιττώματα ταχυδρομικώς στο εργαστήριο ανάλυσης, σε θερμοκρασία δωματίου. Το ικό RNA μπορεί να αποθηκευτεί για αρκετές ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου, ακόμη και το καλοκαίρι.

### 4. Επεξεργασία δειγμάτων στο εργαστήριο :

#### 4.1 Υποδοχή και εγγραφή :

- Κατά την παραλαβή των δειγμάτων, καταγράψτε κάθε δείγμα σε μια βάση δεδομένων με τα στοιχεία συλλογής (ημερομηνία, τοποθεσία κ.λπ.).

## 4.2 Προετοιμασία φύλλου αλουμινίου καλυμμένου με περιττώματα :

- Χρησιμοποιείτε γάντια και ατομικό προστατευτικό εξοπλισμό κατά το χειρισμό των δειγμάτων.
- Τυλίξτε το αλουμινόχαρτο σε χοντρό τσιγάρο. Το ίδιο καλά λειτουργεί και η κατασκευή ενός χοντρού σφαιριδίου. Τοποθετήστε το σε ένα σωληνάριο 14 ml με πώμα.

## 4.3 Εκχύλιση ιικού RNA από περιττώματα :

- Προσθέστε 800 uL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης RAV1 (NucleoSpin 96 virus core kit, Macherey-Nagel) και 10 μL φάγου MS2 (εσωτερικός έλεγχος εκχύλισης) σε κάθε σωληνάριο

*Σε αυτό το στάδιο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άλλο ρυθμιστικό διάλυμα λύσης ή PBS*

- Αναδεύστε δυνατά για 1 λεπτό για να διαλυθούν τα περιττώματα στο υγρό ρυθμιστικό διάλυμα.
- Προσθέστε 800 uL αιθανόλης 96-100% και, στη συνέχεια, φορτώστε τις στήλες NucleoSpin Virus σε διάφορα στάδια για την εκχύλιση του RNA/DNA σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- *[ΠΡΟΑΙΡΕΤΙΚΟ] Είναι δυνατή η έκλουση σε μεγαλύτερο όγκο, η αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος λύσης ή του κιτ εκχύλισης ή η έκλουση σε PBS. Όλα λειτουργούν και έχουν ήδη δοκιμαστεί. Προσαρμόστε το στο τοπικό σας πρωτόκολλο. Στόχος είναι η έκλουση στερεών εκκρίσεων σε υγρό για εκχύλιση. Οι δόσεις του ιικού RNA είναι υψηλές, επομένως να θυμάστε ότι ο όγκος στον οποίο εκχυλίζεται το δείγμα δεν θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ευαισθησία ανίχνευσης.*
- Διατηρήστε τα εκλύματα στους 4°C μέχρι την ανίχνευση ή στους -20°C για μακροχρόνια αποθήκευση.

## 5. Ανίχνευση του ιού με RT-PCR :

### 5.1 Προετοιμασία RT-PCR :

Χρησιμοποιούμε μια ποικιλία μεθόδων εξαγωγής και ανίχνευσης. Όλες οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης χρησιμοποιούν Q-RT-PCR με ένα σύστημα εκκινήτων και ανιχνευτών από [το EVAg](#), το Ευρωπαϊκό Αρχείο Ιών. Εδώ θα βρείτε όλα τα συστήματα ανίχνευσης που διαθέτουμε, καθώς και μια ευρεία επιλογή εσωτερικών ελέγχων και πρωτοκόλλων.

Από το 2008, το Ευρωπαϊκό Αρχείο Ιών (EVA) είναι μια υποδομή αφιερωμένη στον χαρακτηρισμό, την παραγωγή και τη διανομή ικών πόρων αναφοράς για την υποστήριξη

της ιολογικής έρευνας στην Ευρώπη. Συγκεντρώνει εργαστήρια της ΕΕ και τρίτων χωρών που ασχολούνται με την ιολογία του ανθρώπου, των ζώων και των φυτών, σύμφωνα με την έννοια "One Virology". Παρόμοια με την έννοια "Μία Υγεία", η οποία συνδέει την υγεία του ανθρώπου, των ζώων και του περιβάλλοντος, η "Μία Ιολογία" τονίζει τον κεντρικό ρόλο των ιών σε αυτά τα συστήματα, καθιστώντας τη ιολογία έναν κλάδο-κλειδί.

Το EVA παρέχει συνεχή πρόσβαση σε ιικά στελέχη, διαγνωστικά εργαλεία και ερευνητικό υλικό. Η διαθεσιμότητα αυτή ενισχύει την ετοιμότητα για επιδημίες, τονώνει την καινοτομία στα εμβόλια, τα αντιικά και τα διαγνωστικά και διευκολύνει τη μεταφορά γνώσεων. Η δράση της υποστηρίζει τη δημόσια υγεία και την παγκόσμια ασφάλεια και ενισχύει την κυριαρχία της ΕΕ απέναντι στις απειλές πανδημίας.



[Κατάλογος πύλης EVAg](#) [EVAg](#) |

## Αναφορές

- Bigéard, C., Pezzi, L., Klitting, R., Ayhan, N., L'Ambert, G., Gomez, N., Piorkowski, G., Amaral, R., Durand, G. A., Ramiara, K., Migné, C., Grard, G., Touzet, T., Zientara, S., Charrel, R., Gonzalez, G., Duvignaud, A., Malvy, D., De Lamballerie, X., & Fontaine, A. (2024). *Η μοριακή ξενοπαρακολούθηση (MX) επιτρέπει την επιτήρηση σε πραγματικό χρόνο του ιού του Δυτικού Νείλου και του ιού Usutu σε πληθυσμούς κουνουπιών*. <https://doi.org/10.1101/2024.04.10.588707>
- Fontaine, A., Jiolle, D., Moltini-Conclois, I., Lequime, S., & Lambrechts, L. (2016). Η απέκκριση RNA του ιού του δάγκειου πυρετού από το *Aedes aegypti* επιτρέπει τη μη καταστροφική παρακολούθηση της διάδοσης του ιού σε μεμονωμένα κουνούπια. *Scientific Reports*, 6, 24885. <https://doi.org/10.1038/srep24885>
- L'Ambert, G., Gendrot, M., Briolant, S., Nguyen, A., Pages, S., Bosio, L., Palomo, V., Gomez, N., Benoit, N., Savini, H., Pradines, B., Durand, G. A., Leparac-Goffart, I., Grard, G., & Fontaine, A. (2023). Ανάλυση παγιδευμένων περιττωμάτων κουνουπιών ως μη επεμβατική μέθοδος για την αποκάλυψη της βιοποικιλότητας και της κυκλοφορίας των

αρμποΐών. *Molecular Ecology Resources*, 23 (2), 410-423.

<https://doi.org/10.1111/1755-0998.13716>

Ramírez, A. L., Hall-Mendelin, S., Doggett, S. L., Hewitson, G. R., McMahon, J. L., Ritchie, S. A., & van den Hurk, A. F. (2018). Εκκρίματα κουνουπιών: Ένας τύπος δείγματος με πολλές πιθανές εφαρμογές για τη διερεύνηση της οικολογίας του ιού του ποταμού Ross και του ιού του Δυτικού Νείλου. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12 (8), e0006771.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006771>