

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	3
ABSTRAKT ČESKY.....	4
ABSTRAKT ANGLICKY	4
1 ÚVOD.....	5
1.1 KOMÁŘI.....	7
1.1.1 Definice základních pojmů	9
1.2 PŘEHLED VIRŮ PŘENÁŠENÝCH KOMÁŘI NA ÚZEMÍ ČR.....	10
1.2.1 Čeleď: <i>Togaviridae</i>	11
1.2.1.1 Virus Sindbis.....	11
1.2.2 Čeleď: <i>Bunyaviridae</i>	13
1.2.2.1 Virus Batai	13
1.2.2.2 Virus Lednice.....	15
1.2.3 Čeleď: <i>Flaviviridae</i>	17
1.3 BUNĚČNÉ KULTURY	18
1.3.1 Definice základních pojmů	18
1.3.2 Iniciační buněčné linie.....	18
1.3.3 Fáze, kterými buňky procházejí během růstu in vitro:.....	19
1.3.4 Konzervace a uchovávání BK.....	20
1.3.5 Buněčné kultury vhodné pro pěstování arbovirů	20
1.3.6 Média pro buněčné kultury	21
2 CÍL PRÁCE.....	22
3 MATERIÁL A METODY	23
3.1 SBĚR KOMÁŘŮ.....	23
3.1.1 Lokality sběru komárů	23
3.1.2 Metody sběru komárů	24
3.2 VIROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KOMÁŘŮ.....	24
3.2.1 Kultivační média	24
3.2.2 Ostatní roztoky a chemikálie.....	25
3.2.3 Kultivační nádoby a pomůcky	26
3.2.4 Přístroje	26
3.2.5 Práce s buněčnými kulturami	26
3.2.6 Příprava suspenzí z komárů	27
3.2.7 Očkování kultur komářími suspenzemi	28
3.2.8 Identifikace virových izolátů.....	30
4 VÝSLEDKY	34
5 DISKUZE.....	41

5.1 VIRUS WEST NILE	41
5.1.1 Obecné informace	41
5.1.2 Srovnání dosavadních údajů o viru West Nile s výsledky mé diplomové práce	45
5.2 VIRUS ŤAHYŇA	47
5.2.1 Obecné informace	47
5.2.2 Srovnání dosavadních údajů o viru Ťahyňa s výsledky mé diplomové práce	51
6 ZÁVĚR.....	55
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56

SEZNAM ZKRATEK

BATV	virus Batai
BK	buněčná kultura
CDC	Centers for Disease Control and Prevention, U.S.A.
CPE	cytopatický efekt
LEDV	virus Lednice
SINV	virus Sindbis
s.l.	sensu lato
TAHV	virus Ťahyňa
WHO	Světová zdravotnická organizace
WNF	západonilská horečka
WNV	virus horečky West Nile

Komáři – zkratky rodů:

<i>Ae.</i>	rod <i>Aedes</i>
<i>Oc.</i>	rod <i>Ochlerotatus</i>
<i>An.</i>	rod <i>Anopheles</i>
<i>Cs.</i>	rod <i>Culiseta</i>
<i>Cx.</i>	rod <i>Culex</i>
<i>Cq.</i>	rod <i>Coquillettidia</i>

ABSTRAKT ČESKY

Lužní ekosystémy jižní Moravy jsou občas vystaveny komářími kalamitám, během kterých může docházet k nákaze místního obyvatelstva některým z komáry přenášených virů. Jedná se především o virus Ťahyňa, není však vyloučena infekce dalšími arboviry (např. Batai a nově i virus West Nile, zejména jeho méně patogenní kmen Rabensburg). Tato práce se zabývá virologickým vyšetřením komárů odchycených na jižní Moravě a identifikací z nich vyizolovaných agens pomocí virus neutralizačního mikrotestu. Celkem bylo vyšetřeno 9 742 komárů třinácti druhů, ze kterých se podařilo vyizolovat dva kmeny orthobunyaviru Ťahyňa a jeden kmen flaviviru West Nile.

ABSTRAKT ANGLICKY

Floodplain ecosystems of Southern Moravia are occasionally exposed to mosquito overpopulation. During these episodes, infection of local inhabitants with mosquito-borne viruses may occur, mostly with Ťahyňa virus. Other potential arboviral agents could involve e.g. Batai and recently also West Nile (including its less pathogenic strain Rabensburg) viruses. Main goal of the thesis was to carry out isolation experiments from mosquitoes captured in South Moravia, and to identify potential isolates using virus neutralization microtest. A total of 9,742 mosquitoes belonging to 13 species were examined, and three viral strains were isolated: two were identified as Ťahyňa *Orthobunyavirus*, while the third one was West Nile *Flavivirus*.

1 ÚVOD

Viry přenášené komáry patří do velké ekologické skupiny virů, kterou nazýváme **arboviry**. Termín arbovirus pochází z anglického **arthropod-borne viruses** a označuje viry, které jsou v přírodě udržovány tzv. **biologickým přenosem**.

Biologický přenos probíhá mezi vnímavými obratlovci (**hostiteli**) a krevsajícími členovci (**vektory**) (Obr. 1). Viry se množí ve svých hostitelích, pro které je charakteristický vznik různě dlouhé a dostatečně intenzivní virémie postačující k nákaze vektora. Příznaky onemocnění jsou u nich obvykle velmi mírné nebo vůbec žádné.

Aby určitý druh komára mohl být virovým vektorem, musí mít specifické receptory na své střevní stěně, které umožní viru vstup do hemolymfy a replikaci do vysokého titru. Po infekci vektora dojde v prvních 24h k **fázi eklipse**, kdy virus nelze prokázat v žádné části jeho těla. Doba od nasání viru komárem na infikovaném hostiteli až po okamžik, kdy je komár schopen přenést nákazu na jiného hostitele, se nazývá „**extrinsic incubation period**“ a bývá dlouhá několik dní, mimo jiné v závislosti na teplotě prostředí. Nejdříve je virus detekovatelný v abdomenu komára. V trávicím traktu komára zůstane i po rozšíření do dalších orgánů. Šíří se odtud hemolymfou do slinných žláz, později do vaječníků a zbytku těla včetně nohou. Bylo prokázáno, že virus přežívá v komárovi až 51 dní tzn. celý život (Danielová 1962, 1968, 1992). Jeden vektor je schopen přenést virus na více hostitelů i během jediného sání (Labuda a Kožuch 1989).

Do přírodního cyklu arbovirů mohou vstoupit ještě další obratlovci, kteří neslouží jako hostitelé, ale rozvine se u nich onemocnění. Člověk se nakazí zpravidla náhodou, když vstoupí do přírodního ohniska cirkulace viru, a bývá pro většinu virů koncovým hostitelem.

Arbovirózy patří mezi přírodně ohniskové nákazy. Učení o přírodní ohniskovosti nákaz poprvé přednesl E.N. Pavlovskij 29.5. 1939 na Valném shromáždění Akademie věd SSSR (Bárdoš 1965). **Přírodní ohnisko** je definováno jako větší či menší část krajiny ohraničená geograficky i sezónně. Sestává z biocenózy, ve které cirkuluje patogen nezávisle na člověku, kterého může příležitostně infikovat (Rosický 1976). **Elementární přírodní ohnisko** je součástí každého přírodního ohniska, geomorfologicky oddělená, dochází zde k nepřetržité cirkulaci patogena. Podmiňuje existenci přírodního ohniska. Může mít pouze několik metrů čtverečních, nebo i stovky čtverečních kilometrů a existovat jak v krajině člověkem nedotčené, tak i silně ovlivněné (Rosický 1969).

Arboviry jsou rozšířeny po celém světě, většinou v tropickém a subtropickém pásmu. Mohou se nečekaně objevovat v nových oblastech. Mechanismy těchto přesunů jsou různé, často souvisejí s tažnými ptáky. Ale hlavním faktorem se zdá být člověk a jeho působení na přírodu, zejména zásahy do přírodních ohnisek, pohyby populace a neustále se zvyšující cestovní ruch (Januška a kol. 1990). V úvodních kapitolách vycházím ze své bakalářské práce (Kazdová 2007), není-li uvedeno jinak.

1.1 Komáři

Čeleď komárovití je řazena v systému bezobratlých živočichů následovně (Sedlák 2006):

Kmen: *Arthropoda* (členovci)

Podkmen: *Hexapoda* (šestinozí)

Třída: *Insecta* (hmyz)

Podtřída: *Pterygota* (křídlatí)

Řád: *Diptera* (dvoukřídlí)

Podřád: *Nematocera* (dlouhorozí)

Čeleď: *Culicidae* (komárovití)

Medicínsky významné jsou dvě podčeledi: *Anophelinae* a *Culicinae*. Ústní ústrojí komárů je **bodavé**. Dospělé samice se živí krví, sameci sají šťávu z květů. Některé druhy komárů sají pouze na savcích, jiné na ptácích, na nižších obratlovcích

nebo i na obratlovcích několika tříd. Za ornitofilní je považován např. *Cx. pipiens*, za mamalofilní *Ae. vexans* a *Oc. sticticus* (Danielová 1992, Sedlák 2006).

Po nasátí krve kladou samice **vajíčka** buď jednotlivě na vodní hladinu (*Anopheles*) nebo v plovoucích člunkovitých shlucích (*Culex*, *Culiseta*), případně na vlhkou zem (*Aedes*, *Ochlerotatus*). **Larvy** žijí ve vodě, živí se detritem a dýchají stigmaty atmosférický vzduch. Pohyblivé kukly žijí rovněž ve vodě, ale potravu nepřijímají. Při optimální dostupnosti potravy a za vhodné teploty může vývoj larev trvat pouhých 7 dní, kukel 2 dny. Na jaře, kdy jsou teploty nižší, trvá vývoj larev až několik týdnů (Šebesta a Hubálek 2004, Sedlák 2006).

Na území ČR žije 43 druhů komárů (Minář a Halgoš 1997). Jižní Morava, místo vypracování této diplomové práce, je oblastí občasných komářích kalamit. Za hlavní kalamitní druhy jsou považovány *Ae. vexans*, *Ae. cinereus*, *Oc. sticticus* a *Oc. cantans*. Z nich nejdůležitější je *Ae. vexans*, mívá 2-3 generace za sezónu.

V časném jaře dominuje *Oc. communis*, zhruba do poloviny května. Od poloviny května do začátku června jsou dominantními druhy *Oc. cantans* a *Oc. sticticus*. Od začátku června jsou vystřídány druhy *Ae. vexans* a *Ae. cinereus*. *Oc. cantans*, *Oc. sticticus*, *Ae. cinereus* a *Ae. vexans* přežívají do konce vegetačního období. Největší množství komárů se tedy vyskytuje v druhé polovině června, kdy ještě jarní druhy přežívají a letní druhy se už líhnou. Někteří dospělci mohou přežívat v létě i déle než 3 měsíce (Hájková a Minář 1970, Hájková 1966, 1969).

Nejvyšší aktivitu vykazují komáři na jižní Moravě při teplotě 19-24 °C, klesne-li teplota pod 10 °C, jejich aktivita ustává (Minář 1969).

V lužních lesích jižní Moravy a jejich okolí bylo zjištěno přes 30 druhů komárů šesti rodů (Tab.1).

Tab.1. Přehled komárů vyskytujících se v jihomoravském luhu a virových agens z nich izolovaných (podle Šebesty a Hubálka 2004).

Druh komára	Četnost výskytu	Izolované viry
<i>Anophelinae</i>		
<i>Anopheles atroparvus</i>	velmi vzácný	-
<i>An. claviger</i>	vzácný	Batai*
<i>An. maculipennis</i>	nehojný	Batai, West Nile*
<i>An.messeae</i>	nehojný	-
<i>An. plumbeus</i>	velmi vzácný	-
<i>Culicinae</i>		
<i>Ae. cinereus</i>	dosti hojný	Ťahyňa, Sindbis*
<i>Ae. rossicus</i>	nehojný	-
<i>Ae. vexans</i>	velmi hojný	Ťahyňa

<i>Ochlerotatus cantans</i>	hojný	Řahyňa, West Nile*
<i>Oc. caspius</i>	nehojný	Řahyňa
<i>Oc. cataphylla</i>	nehojný	-
<i>Oc. annulipes</i>	dosti hojný	-
<i>Oc. communis</i>	nehojný	Řahyňa*, Sindbis*
<i>Oc. dorsalis</i>	nehojný	Řahyňa
<i>Oc. excrucians</i>	dosti hojný	Řahyňa*
<i>Oc. flavescens</i>	nehojný	Řahyňa*
<i>Oc. geniculatus</i>	nehojný	-
<i>Oc. intrudens</i>	vzácný	-
<i>Oc. leucomelas</i>	velmi vzácný	-
<i>Oc. nigrinus</i>	velmi vzácný	-
<i>Oc. punctor</i>	vzácný	-
<i>Oc. refiki</i>	vzácný	-
<i>Oc. sticticus</i>	velmi hojný	Řahyňa
<i>Culex martinii</i>	velmi vzácný	-
<i>Cx. modestus</i>	nehojný (rákosiny)	Řahyňa, West Nile*, Lednice
<i>Cx. territans</i>	nehojný	-
<i>Cx. pipiens</i>	velmi hojný	West Nile, Sindbis*
<i>Culiseta annulata</i>	nehojný	Řahyňa
<i>Cs. alaskaensis</i>	vzácný	-
<i>Cs. morsitans</i>	velmi vzácný	-
<i>Coquillettidia richardii</i>	vzácný (rákosiny)	Batai*, West Nile*, Sindbis*
<i>Uranotaenia unguiculata</i>	velmi vzácný	-

*virus byl z daného komára izolován v Evropě mimo území Česka

Hlavním líníštěm komárů v lužním lese jsou periodické tůně a pravidelně zaplavované plochy lesa a luk. Množství larev často převyšuje 100 jedinců na dm². Ke kalamitám dochází při dostatečně dlouhém zaplavení líníšť jak na jaře, tak i v létě (Šebesta a Hubálek 2004). Rozsah komářích kalamit je určován hydrologickými a teplotními podmínkami zejména na začátku vegetačního období (Hájková a Minář 1970).

V této práci se držím taxonomického zařazení komárů podle (Snow a Ramsdale 2003).

1.1.1 Definice základních pojmů

Prahová hodnota infekce (treshold of infection) je nejnižší hodnota viru v krvi potřebná k infekci alespoň 5 % komárů daného druhu.

Infikovatelnost (infection rate, IR) je procento komárů, kteří se infikují při sání na hostiteli s dostatečně vysokým titrem viru.

Přenositelnost (transmission rate, TR) je procento komárů schopných přenést virus po sání na infikovaném hostiteli s vysokým titrem viru (Rosický a Málková 1980).

Titř viru je jeho koncentrace, která se stanovuje pomocí sériového ředění a následným očkovaním na vhodný substrát (buněčná kultura, laboratorní zvířata aj.).

Minimální infikovanost (Minimum infection rate, MIR) je počet infikovaných komárů na 1000 jedinců. Předpokládá se přitom, že v každé infikované směsi (poolu) je pozitivní pouze jeden komár (Sudia a kol. 1971, Danielová 1992).

1.2 Přehled virů přenášených komáry na území ČR

Na území ČR se vyskytují viry náležící do čeledí *Bunyviridae*, *Togaviridae* a *Flaviviridae* (Tab. 1 a 2).

Tab.2. Přehled virů přenosných komáry jejichž přítomnost byla přímo nebo nepřímo prokázána v ČR (Januška a kol. 1990).

Čeľed'	Rod	Virus
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Sindbis*
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	West Nile
<i>Bunyviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	Ťahyňa
		Batai
		Lednice

* prokázány pouze protilátky k viru u obratlovců

Virů přenášené komáry na území ČR mají různý klinický význam: **Potenciální** medicínský význam mají viry, které izolujeme přímo z vektora. **Pravděpodobný** medicínský význam prokážeme přítomností specifických protilátek u člověka sérologickými testy. **Velmi pravděpodobný** medicínský význam prokážeme zjištěním signifikantního vzestupu protilátek u nemocných párovými sérologickými testy. A za **prokázaný** lékařský význam se považuje izolace z krve nebo likvoru nemocného, signifikantní vzestup protilátek nebo sérokonverze u nemocných, sérologické vyloučení jiné etiologie u podobných syndromů a izolace z tkání zemřelých (Januška a kol. 1990). Z virů uvedených v Tab. 2 mají prokázaný medicínský význam viry Sindbis, West Nile a Ťahyňa, pravděpodobný medicínský význam má virus Batai, zatímco virus Lednice je pro savce včetně člověka nepatogenní.

1.2.1 Čeleď: *Togaviridae*

Skládá se ze dvou rodů: *Alphavirus* a *Rubivirus*. Rod *Alphavirus* je tvořen malými obalenými viriony (60-70 nm) s pozitivní ssRNA. Patří mezi nejjednodušší živočišné viry. Alfaviry jsou na základě sekvenace genomu tříděny do tří skupin, z nichž jednou je skupina Sindbis (Harley a kol. 2001).

1.2.1.1 Virus Sindbis

Synonyma a první izolace: Babanki (Y-251), Kyzylagach (LEIV-65A), Ockelbo (Edsbyn 5/82) a Karelská horečka. První izolaci prototypového kmene EgAr-339 tohoto viru provedl Taylor a kol. roku 1952 ve vesnici Sindbis v Egyptě z *Culex univitattus* (Theiler a Downs 1970). V Evropě byl nejdříve izolován evropský topotyp R-33 z CNS a jater rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*) chyceného roku 1971 blízko Malacek na Slovensku (Ernek a kol. 1973). V červenci 1975 byl na stejné lokalitě izolován ze skokana *Rana ridibunda* (Kožuch a kol. 1978) a z křečka *Cricetus cricetus* (Málková a kol. 1986).

Ekologie:

- Výskyt

Virus je rozšířen obvykle v mokřadních ekosystémech kosmopolitně kromě Ameriky. V rámci Evropy se nachází v Itálii (na Sicílii), na Slovensku, v Maďarsku, Polsku, Estonsku, ruské Karélii, Finsku a Švédsku (Hubálek a Halouzka 1996). Protilátky byly nalezeny u obratlovců na jižní Moravě, v jižních Čechách, v Maďarsku a Rakousku (Málková a kol. 1986). V ČR nebyl tento virus dosud izolován (Šebesta a Hubálek 2004). Do Evropy byl pravděpodobně zanesen tažnými ptáky z Afriky a není zřejmé, zda zde opravdu cirkuluje respektive přezimuje, nebo je občasné zanášen tažnými ptáky (Málková a kol. 1986). Podle zjištění Erneka a kol. (1973/1974) virus ve střední Evropě cirkuluje.

- Vektoři

Ve snaze najít vektora viru bylo na Slovensku vyšetřeno v letech 1971-1978 73 361 komárů, žádný SINV se z nich ale nepodařilo vyizolovat. Virus se podařilo izolovat ze sentinelových zvířat, která byla nejčastěji atakována *Cq. richiardii* a *Cx. pipiens*. U *Cx. pipiens* byla prokázána 26 denní hibernace s virem a *Cq. richiardii* je pravděpodobným vektorem v Rusku (Málková a kol. 1986). Dalšími vektory jsou

zřejmě *Cx. modestus*, *Oc. communis*, *Ae. cinereus*, *An. hyrcanus* (Hubálek a Halouzka 1996).

- **Hostitelé viru**

Hlavními hostiteli viru v přírodě jsou ptáci. V Evropě: *Corvus corone*, *Motacilla alba*, *Ardeola ralloides*, *Gallinago gallinago*, *Fulica atra*, *Acrocephalus scirpaceus*, *Sturnus vulgaris* a řada dalších druhů (Hubálek a Halouzka 1996). Při odchytu ptáků během podzimní migrace roku 1984 na rybníce Sedlec blízko Břeclavi, mělo protilátky 6,4 % z 295 jedinců (Juřicová a kol. 1987), roku 1997 2 % volně žijících ptáků (Hubálek 1999). Ptáci, např. 2 měsíce stará kuřata a káčata jsou vhodnými sentinelovými zvířaty. Příležitostnými hostiteli mohou být žáby (*Rana ridibunda*) a křečci (*Cricetus cricetus*) (Grešíková a Nosek 1981). V obojživelnících *R. ridibunda* a *Bufo bufo* se virus dokáže množit a po nějakou dobu perzistovat. Protilátky byly nalezeny u dobytka, prasat, psů a volně žijících savců (*Capreolus capreolus*, *Dama dama*, *Cervus elaphus*, *Ovis musimon*, *Sus scrofa*, *Lepus europaeus*, *Erinaceus erinaceus*) (Málková a kol. 1986).

Patogenita:

- **Onemocnění zvířat**

Je popsáno onemocnění holubů s příznaky podobnými encefalitidě (Hubálek 2000). Pravděpodobně dochází také k onemocnění hovězího dobytka, ovcí a koz (Theiler a Downs 1970). Epizootologický význam viru ve střední Evropě ještě není zcela jasný, u sentinelových zvířat příznaky onemocnění pozorovány nebyly. U experimentálně naočkovaných jedinců byla pozorována virémie a produkce protilátek, ale úhyn jen příležitostně u kuřat a holubů (Málková a kol. 1986).

- **Lidské infekce**

Virus u lidí vyvolává horečku Sindbis, projevující se 3-4 denní horečkou, bolestmi hlavy a pohybového ústrojí (Grešíková a Nosek 1981). Někdy se také vyskytuje vyrážka na hrudníku a končetinách, zatímco obličej zůstává nezasažen. Akutní nemoc trvá do 10 dnů, ale únava, bolest šlach a kloubů může přetrvávat po několik týdnů až měsíců. U některých pacientů se může rozvinout chronická artritida (Hubálek a Halouzka 1996). Po povodni v roce 2002 bylo na přítomnost protilátek vyšetřeno 497 osob a proti SINV mělo protilátky pouze 1 % z nich (Hubálek a kol. 2005). V České republice ani ve střední Evropě zatím nebyl zdokumentován žádný případ onemocnění (Málková a kol. 1986, Januška a kol. 1990).

- Epidemie

1981: stovky případů se objevily ve Skandinávii, od té doby se epidemie opakují v sedmiletých intervalech. Průměrná roční incidence dosahovala ve Finsku v letech 1995-2003 až 25,7 případů na 100 000 obyvatel. Značný počet případů je znám ze severní Afriky, Ugandy, Austrálie (Hubálek 2008).

1.2.2 Čeleď: *Bunyaviridae*

Čeleď *Bunyaviridae* je největší a nejdiverzifikovanější skupinou arbovirů. V rodu *Orthobunyavirus* je 16 antigenních skupin (Calisher 1983). Viriony čeledi *Bunyaviridae* jsou (-) ssRNA, 80-120 nm velké, složené ze 3 segmentů (L, M, S). Mají dva povrchové glykoproteiny G1 a G2, nukleoprotein N a transkriptázový protein L (Hubálek 2000). Z této čeledi se u nás vyskytují viry Ťahyňa a Batai. O viru Ťahyňa pojednávám v kapitole Diskuze.

1.2.2.1 Virus Batai

Taxonomie: rod *Orthobunyavirus*. Patří do antigenní skupiny Bunyamwera (Hubálek a Halouzka 1996).

Synonyma a první izolace: Batai je poměrně široce rozšířeným bunyavirem. Prototypovým kmenem je AMM 2222. Synonyma jsou Čalovo (Slovensko, Česko), Olyka (Rusko) a Chittoor virus (Indie). Poprvé virus izoloval roku 1955 B. Elisberg a E. L. Buescher z komárů *Culex gelidus* posbíraných v blízkosti Kuala Lumpur v Malajsii (Theiler a Downs 1970, Briese a kol. 2006). Antigenně identický evropský Čalovo virus byl izolován Bárdošem a Čupkovou z komárů *Anopheles maculipennis* s. l. chycených blízko Čalova na jižním Slovensku roku 1960 (Bárdoš a Čupková 1962). Na jižní Moravě byl virus Batai zachycen 13. 8. 1963 z komárů *Anopheles maculipennis* s. l. (2 izoláty) (Smetana a kol. 1967).

Ekologie:

Virus se vyskytuje v agroekosystémech, pravděpodobně v cyklu mezi domácími přežvýkavci a komáry (Hubálek a Halouzka 1996).

- Výskyt

Je známý z Evropy, Asie a střední Afriky (Hubálek a Halouzka 1996). Byl izolován na jižní i severní Moravě a opakovaně na Slovensku. V Rakousku byl několikrát izolován z *Anopheles maculipennis* s. l. a jednou z *Coquillettidia richardii*, protilátky zde byly nalezeny u domácích a divokých zvířat. V Maďarsku byly nalezeny protilátky u lidí. Byl izolován také v bývalé Jugoslávii a protilátky byly detekovány ve Finsku (Málková a kol. 1986).

- Vektoři

Hlavním vektorem byl opakovanými izolacemi prokázán *An. maculipennis* s. l. (skupina zahrnuje u nás se vyskytující druhy: *An. maculipennis* a *An. messeae*). Experimentálně tito komáři mohou přezimovat s virem a mohou tedy hrát roli virového rezervoáru. Bylo vyšetřeno 10 901 *An. maculipennis* s. l. a z těchto byly izolovány 2 kmeny BATV. Pozitivní komáři byli odchyceni v příbytku pro telata v Rakvicích. *An. maculipennis* je typickým obyvatelem hospodářských budov v blízkosti lidských sídlišť. Ve volné přírodě se vyskytuje jen vzácně, v prostředí podobném lidským příbytkům jako jsou např. seníky, oblouky kamenných mostů atd. (Smetana a kol. 1967, Danielová a kol. 1966, 1978). Dalšími vektory jsou jiní příslušníci podčeledi *Anophelinae* a případně i *Culicinae*: *Ae. vexans*, *Oc. punctor*, *Oc. communis*, *Cq. richardii* (Hubálek a Halouzka 1996, Málková a kol. 1986).

- Hostitelé viru

Primární roli hrají velká domácí zvířata jako prase domácí, kůň a dobytek. V šíření viru mohou hrát roli selata, která vyvíjí vysokou virémii. Sentinelovými zvířaty jsou králíci, zatímco zajáci nejsou k experimentální infekci vnímaví. Mezi divokými zvířaty byly protilátky nalezeny u srnce (*Capreolus capreolus*), jelena (*Cervus elaphus*) a divokého prasete (*Sus scrofa*). Protilátky byly také nalezeny u 12,1 % pěvců na rybníce Nesyt u Mikulova. Údajnými hostiteli jsou tyto ptačí druhy: *Corvus corone*, *Fulica atra*, *Perdix perdix*, *Anser anser*. U *Anas platyrhynchos*, *Vanellus vanellus*, *Parus coeruleus*, *Tringa ochropus* byly detekovány protilátky. Ptáci se možná podílejí na šíření viru mezi Evropou, Asií a Afrikou, ale *An. maculipennis* se zdá být v evropských podmínkách spíše zoofilní než ornitofilní, takže nevíme jakou roli u nás

ptáci hrají (Málková a kol. 1986, Juřicová a kol. 1987, Hubálek a Halouzka 1996, Hubálek a kol. 1993, Halouzka a kol. 2008).

Patogenita:

- Onemocnění zvířat

Kmen Chittoor viru Batai způsobuje mírné onemocnění ovcí a koz, potraty a poporodní anomálie u dobytka (Hubálek 2008). Přestože je u nás dobytek napadán komáry poměrně často, nebyla dosud popsána žádná jeho onemocnění virem Batai. Ovšem onemocnění u oslabených jedinců nelze vyloučit (Málková a kol. 1986).

- Lidské infekce:

Symptomy infekce jsou podobné „valtické horečce“ (nákaze virem Ťahyňa). Nástupu předchází celková slabost, pocení, ztráta chuti k jídlu. Následuje prudký vzestup teploty (39-40 °C), někdy spojený s bolestmi hlavy, dýchacími obtížemi, suchým kašlem, bolestmi kloubů a svalů, příležitostně zvracením a průjmem (Sluka 1969a). Na Moravě se pravděpodobně může podílet na etiologii sezónních horečnatých onemocnění v oblastech přemnožení komárů rodu *Anopheles*. V porovnání s TAHV je jeho význam však menší (Januška a kol. 1990).

- Epidemie

1960-1964: ve valtické nemocnici hospitalizovali a vyšetřili řadu pacientů s horečnatým onemocněním; u 17 z nich prokázali signifikantní vzestup protilátek k viru Batai (Bárdoš a kol. 1969).

2002: protilátky nalezeny u 0,2% ze 497 vyšetřených osob po povodních v Čechách (Hubálek a kol. 2005).

2008: byl izolován z krve osob s horečnatým onemocněním v Thajsku a Súdánu (Hubálek 2008).

Málková a kol. (1986) se domnívá, že vzhledem k nízké incidenci protilátek u lidí a negativní sérologii u klinických případů v oblasti izolace viru je nepravděpodobné, že by virus u nás představoval závažné zdravotní riziko.

1.2.2.2 Virus Lednice

Taxonomie: rod *Orthobunyavirus*, čeleď *Bunyaviridae*. Společně s virem M'Poko patří do antigenní skupiny Turlock. Původně byl označen jako virus Yaba I

(Jelínková a kol. 1980). Dnes víme, že virus Lednice je samostatný virus, odlišný od viru Yaba-1, který je podtyp M'Poko viru (Calisher a kol. 1984).

Synonyma a první izolace: Virus byl poprvé v Evropě izolován na jižní Moravě roku 1963 v oblasti Lednických rybníků z komárů *Cx. modestus* Málkovou a kol. (1972). Jeho existence byla potvrzena roku 1972 ve stejné oblasti šesti dalšími izoláty ze stejného druhu komára. Virus se podařilo izolovat pouze z komárů (Málková a kol. 1986).

Ekologie:

- Výskyt

Zatím byl zjištěn výskyt pouze na území České republiky a v Rumunsku v deltě Dunaje (Lundstrom 1999). V České republice se vyskytuje jen na jižní Moravě. Pokud izolovat virus v mokřadních oblastech na jižním Slovensku a v Maďarsku (Balaton) se nezdařil (Málková a kol. 1986).

- Ohnisko viru v ČR

Přírodní ohnisko viru na jižní Moravě se nalézá v oblasti Pohořelických a Lednických rybníků. Jejich břehy jsou pokryty litorální vegetací sestávající z *Phragmites communis* a *Typha angustifolia*, což tvoří vhodné podmínky pro hnízdění a zimování mnoha druhů tažných ptáků. Dominantním druhem komára v rákosinách bývá *Cx. modestus*, který pobřežní mokřiny v podstatě nikdy neopouští. Na rozdíl od většiny druhů tohoto rodu však neváhá atakovat člověka, dokonce ani ve dne (Málková a kol. 1986).

- Vektoři

Jediným známým vektorem, ze kterého byl kdy tento virus izolován je *Cx. modestus*. Schopnost přenosu viru u něj byla laboratorně prokázána. Mezi lety 1962 a 1975 bylo vyšetřeno 205 000 komárů 18 druhů, LEDV byl izolován jen z *Cx. modestus* (Málková 1980, Málková a kol. 1974, Málková a kol. 1986). *Ae. vexans* se sice infikuje při sání na infikovaném hostiteli, ale virus se v něm nereplikuje (Danielová 1984).

- Hostitelé viru

Hlavními hostiteli viru jsou vodní ptáci. Protílátky byly nalezeny v přírodním ohnisku viru LED zejména u *Anas platyrhynchos* (31,9%), *Anser anser* (17,2%), jedné *Cygnus olor* a u vrány šedé (Kolman 1974, Kolman a kol. 1976, Málková a Danielová 1977, Málková a kol. 1986). V Rumunsku byly protílátky nalezeny u *Anas*

querquedula, *Anas strepera*, *Fulica atra*, *Larus ridibundus* (Málková a kol. 1986). Po experimentálním naočkování vykazují virémii kuřata, káčata, housata a také bažant. Kuřata nebo káčata lze použít jako indikátory přítomnosti viru v oblasti. Role bažanta jako hostitele je diskutabilní (Málková a Danielová 1977, Málková a Danielová 1978, Danielová a Málková 1976). Protilátky u domácích zvířat na jižní Moravě byly nalezeny u hus a kachen z farem na zmíněných rybnících (Málková a kol. 1986). Experimentální naočkování ježků, křečků, zajíců a frettek prokázalo, že savci nejsou hostiteli tohoto viru, žádný z nich nevyvinul virémii (Málková 1980).

Patogenita:

Během několika studií bylo potvrzeno, že u lidí se protilátky proti viru Lednice nevyskytují a proto je považován za nepatogenní pro člověka (Kolman a kol. 1979, Kolman 1974). Pro mladá housata je virus patogenní. Nemoc se u nich projevovala sníženou pohyblivostí, nekoordinovanými pohyby, ztuhlým krkem a svalstvem, tonickými křečemi (krk ve tvaru S), ztíženým dýcháním a bradykardií (Danielová a Málková 1976).

1.2.3 Čeleď: *Flaviviridae*

Viriony této čeledi jsou malé (40-60 nm) a obsahují (+) ssRNA. Čeleď se dělí na tři rody: *Flavivirus*, *Pestivirus* a *Hepacivirus* (Votava a kol. 2003). Rod *Flavivirus* obsahuje 74 virů, většina z nich je přenosná členovci (Poindinger a kol. 1996). Do této čeledi patří u nás se vyskytující virus West Nile, o kterém pojednávám v kapitole Diskuze.

1.3 Buněčné kultury

Rozmnožování viru v buňkách *in vitro* jako první pozorovali Steihardt, Israeli a Lambert roku 1913. Buněčné kultury se snadněji udržují a vyžadují méně prostoru a péče než laboratorní zvířata a drůbeží vejce. Jejich široké praktické využití však bylo umožněno až zavedením antibiotik a antimykotik do živných médií. V této kapitole čerpám z příruček: Leško a kol. (1975), Lennette a kol. (1974), Januška a kol. (1990), pokud není uvedeno jinak.

1.3.1 Definice základních pojmů

Buněčná kultura (cell culture), BK – jedná se o buňky, které rostou *in vitro* a nejsou organizované jako tkáň.

Tkáňová kultura (tissue culture), TK – označení pro tkáň a fragmenty orgánů explantované ze zvířat a udržované ve funkčním stavu *in vitro* déle než 24hodin. Toto označení je někdy nepřesně používáno místo termínu buněčná kultura.

Jednovrstvevná kultura (monolayer) – jedna vrstva buněk rostoucích na povrchu určitého podkladu. Tato metoda umožňuje vypěstovat standardní populaci buněk.

Primární kultura buněk (primary culture) – buněčná populace oddělená od tkáně nebo orgánu, které jsme odebrali přímo z organismu. Existuje zpravidla několik dní, do první subkultivace.

Stabilizovaná buněčná kultura (established cell line) – buněčná kultura, která má potenciální schopnost se nekonečně dlouho subkultivovat *in vitro*.

Subkultivace (subculture) = pasáž (passage) – přenos buněk z jedné kultivační nádoby do druhé, obvykle po trypsinizaci.

1.3.2 Iniclace buněčné linie

Buněčná linie vzniká z migrujících tkáňových buněk, nebo enzymatickým štěpením tkáně. Přežívají jen buňky odolné vůči disagregačním technikám. Jejich počet se zvyšuje do vytvoření jednovrstvy. Častým pasážováním udržujeme standardní hustotu

buněk a jejich fenotyp. S každou následující pasáží dochází k vyředění buněk, které nejsou schopny dostatečně rychle proliferovat. Po třetí pasáži se může buněčná kultura stát stabilní a tvořenou rychle proliferujícími buňkami.

Schopnost kultury růst kontinuálně je spojená s delecí nebo mutací v p53 genu, který zastavuje buněčný cyklus v případě nahromadění mutací v DNA nebo overexpresi telomerázových genů. Alterace dávající vznik kultuře kontinuální se nazývá ***in vitro* transformace** a může se objevit spontánně, nebo být virově či chemicky indukována. Kontinuální buněčné kultury bývají aneuploidní (nejčastěji di až tetraploidní). Není jasné zda buňky, které dají vznik kontinuální kultuře, se vyskytují v malém množství již v explantátech, nebo vznikají později jako důsledek transformace.

Vlastnosti kontinuálních buněčných kultur jsou např. snížená spotřeba séra, snížená vnímavost k limitaci růstu hustotou buněk, aneuploidie, růst v polotuhých médiích, zvýšená tumorigenicita. Kultura se stává kontinuální po 150-200 generacích (Freshney 2005).

1.3.3 Fáze, kterými buňky procházejí během růstu *in vitro*:

a) Disperzní fáze – jedná se o samostatné buňky kulovitěho tvaru, které vznikají po oddělení z rodičovského tkaniva nebo trypsinizaci.

b) Fáze přichycení – buňky jsou velmi metabolicky aktivní, mění se jejich tvar na vřetenovitý, mnohoúhelníkovitý nebo hvězdčovitý.

c) Fáze množení (logaritmická) – vyznačuje se intenzivním dělením, převážně mitotickým.

d) Degenerační fáze (stacionární) – dochází ke změnám v morfologii buněk. Vakuolizace, lýze jader, zakulacování a odpadávání od stěny nádoby.

1.3.4 Konzervace a uchovávání BK

A. Snížení inkubační teploty

V podobě souvislé jednovrstvy lze buňky uchovávat až několik týdnů např. při 28°C.

B. Konzervace buněk ve zmrazeném stavu

Slouží k zajištění homogenního materiálu, odpovídajícího původnímu v libovolném čase a stavu např. kvůli kontaminaci. Zmražované buňky by měly být ze zdravé, nepoškozené a sterilní populace na vrcholu logaritmické fáze. Savčí buňky lze uchovávat i roky ve zmrazeném stavu. Je nutno dodržet 4 faktory:

1) Použití ochranné látky jako je dimetylsulfoxid nebo glycerol

Tyto látky omezují vznik intracelulárních ledových krystalů tím, že na sebe poutají vodu a zamezují tak jejímu intracelulárnímu hromadění. Pro dlouhodobou konzervaci většiny buněčných typů je vhodnější dimetylsulfoxid než glycerol.

2) Zmrazovat buňky pomalu

Pomalým zmrazováním se krystaly ledu tvoří spíše extracelulárně a neporušují buňky. Optimální rychlost zmrazování je 1 °C za minutu minimálně do -26 °C.

3) Zmrazené buněčné suspenze uchovávat při teplotě -70 °C nebo nižší

Teplota -70 °C může být pro konzervaci některých buněčných typů nedostatečná. Preferujeme kapalný dusík, kde uchováváme buňky v teplotě -150 až -196 °C. Při této teplotě je veškerá fyzikální a chemická aktivita buněk minimální.

4) Buňky rozmrazovat rychle

Postupná dekrystalizace ledu buňky poškozuje. Proto ampule s buňkami vyjmeme z mrazu a okamžitě je ponoříme do vodní lázně 37 °C teplé až do úplného zkapalnění obsahu.

1.3.5 Buněčné kultury vhodné pro pěstování arbovirů

Univerzální buněčný kultivační substrát pro arboviry neexistuje. Z primárních linií bývají používány kuřecí embryonální buňky (KEB). Z kontinuálních linií se pro práci s arboviry úspěšně používají ty, které byly připraveny z ledvinných buněk:

- opic: VERO, GMK, CV-1

- prasat: PK, PS, SPEV
- křečků: BHK-21

Výhodou použití kontinuálních buněčných linií je možnost jejich snadného pasážování a vznik výraznějšího CPE. Primární kultury si zase lépe zachovávají morfologii.

1.3.6 Média pro buněčné kultury

Dnes se pro kultivaci BK používají téměř výhradně média chemicky definovaná. Dodávají buňkám živiny v dobře využitelné podobě a udržují fyziologicky vyvážené podmínky, zejména osmotický tlak a pH.

K médiím přidáváme sérum a antibiotika. Nejčastěji komerčně dostupné fetální telecí sérum inaktivované tj. bez gama globulinů. Sérum dodává buňkám hormony a růstové faktory v preferované, netoxické formě. Poskytuje přichycovací faktory zvyšující adhezi k podkladu a má pufrovací kapacitu (Doyle a Griffiths 1998). Uchovává se ve zmraženém stavu.

Antibiotika chrání BK před kontaminací mikroorganismy. Nejčastěji se do médií přidávají penicilín a streptomycin. Pro úplnou eliminaci mikroflóry se používají širokospektrá antibiotika jako je kanamycin, tylosin a antimykotika např. mykostatin nebo fungizon (amfotericin B).

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem mé diplomové práce bylo virologicky vyšetřit komáry nasbírané na jižní Moravě. Tato práce měla přispět k poznání současné aktivity přírodního ohniska nákazy viru Ťahyňa a ozřejmit, zda se v této oblasti případně nenacházejí ještě další viry přenosné komáry. Bylo také žádoucí srovnat dosažené výsledky s výsledky jiných autorů.

3 MATERIÁL A METODY

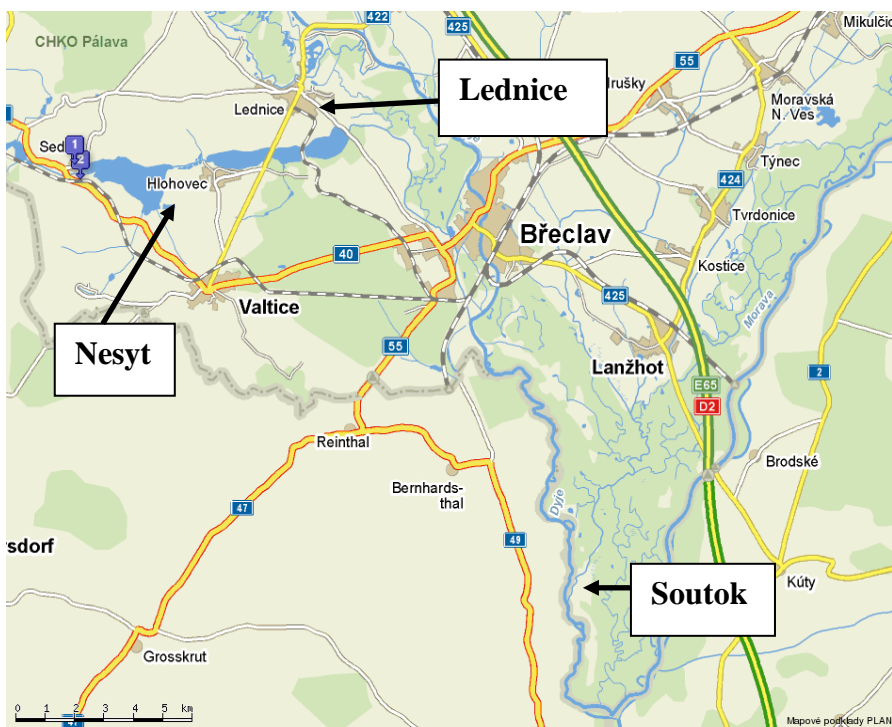
3.1 Sběr komárů

3.1.1 Lokality sběru komárů

Komáři byli odchyceni na třech lokalitách v okolí Břeclavi: Nesyt, Soutok a Lednice (Mapové schéma 1).

- **Nesyt** ($48^{\circ}46'33.124''S$, $16^{\circ}42'21.126''V$; 169m.n.m): rybník o rozloze 320 ha, břehy jsou zarostlé rozsáhlými rákosinami.
- **Lednice** ($48^{\circ}48'1.134''S$, $16^{\circ}48'13.276''V$; 171m.n.m): ve vlhkých sklepích v březnu byly sbírány přezimující samice hlavně druhu *Cx. pipiens* a ojediněle *Cs. annulata*.
- **Soutok** ($48^{\circ}39'6.803''S$, $16^{\circ}55'54.314''V$; 155m.n.m): zaplavovaný lužní les tvořený duby, jasaný a vrbami, střídajícími se s lučnými porosty.

Mapové schéma 1. Lokality sběru komárů.



3.1.2 Metody sběru komárů

V roce 2006 byly použity entomologické sítě, zatímco v letech 2007 a 2008 CDC komáří pasti s miniaturním světlem a suchým ledem (CO₂) a pasti s nastraženým živým holubem. Komáři byli odsáváni z pastí pomocí bateriového aspirátoru.

3.2 Virologické vyšetření komárů

3.2.1 Kultivační média

Medium Leibovitz L-15 (Sigma L 5520, 100 ml) (Tab. 3)

Médium pro kultivaci buněk. Glukóza je v něm nahrazena galaktózou, proto nemusí být přítomen bikarbonátový pufr (H₂CO₃ a HCO₃⁻), jehož vysoká koncentrace některým virům brání v růstu. Obsahuje nadbytek aminokyselin, některé z nich jako volné báze, umožňuje uchovávat dlouhodobě buněčnou kulturu bez výměny média.

Tab.3. Složení média L-15.

Složení	mg/1000 ml
L-alanin	225
L-arginin	500
L-asparagin	250
L-cystein HCl.H ₂ O	120
L-glutamin	292
glycin	200
L-histidin HCl.H ₂ O	250
L-izoleucin	125
L-leucin	125
L-lysin	75
L-methionin	75
L-fenylalanin	125
L-serin	200
L-threonin	300
L-tryptofan	20
L-tyrosin	300
L-valin	100

pantotenát vápenatý	1
cholínchlorid	1
kyselina listová	1
i-inozitol	2
nikotinamid	1
pyridoxin HCl	1
riboflavin-5fosfát (sodná sůl)	0,1
tiamín monofosfát	1
galaktóza	900
fenolová červeň	17
pyrohroznán sodný	550
chlorid vápenatý.2 H ₂ O	140
chlorid draselný	400
síran hořečnatý.7 H ₂ O	400

chlorid sodný	8000
kyselý fosforečnan sodný	60

kyselý fosforečnan sodný bezvodý	190
-------------------------------------	-----

Médium L-15 bylo používáno pro BK jako růstové i udržovací. **Růstové médium** obsahovalo 5-10% fetálního telecího séra a bylo používáno pro zakládání buněčných kultur. Před očkovaním kultury virovým agens bylo růstové médium odstraněno. **Udržovací médium** s koncentrací séra 2% udržovalo kulturu ve sníženém metabolickém stavu během celého období pomnožování virů. Do obou typů médií jsme přidávali antibiotika a antimykotika, po očkování buněk komářími suspenzemi také gentamycin. Konečná koncentrace antibiotik v médiu byla: penicilin 200 m.j./ml; streptomycin 200 µg/ml; gentamycin 100 µg/ml; amfotericin B 3 µg/ml.

3.2.2 Ostatní roztoky a chemikálie

PBS (Phosphate buffered saline solution) fosfátový pufr 10x koncentrovaný, Sigma, P-5493

FTS (Fetal bovine serum) fetální telecí sérum, Sigma, 100 ml F9665

Trypsin-EDTA solution, Sigma T3924

Antibiotic-antimycotic solution (100x), stabilizovaný roztok s antibiotiky s 10 000 jednotkami penicilinu, 10 mg streptomycinu a 25 µg amfotericin B v 1 ml, Sigma

Gentamicin, Pharmachim Bulgaria, 10 ampulí x 2ml, 80 mg gentamycinu ve 2 ml

MPB (Nutrient Broth w/1 % Peptone), masopeptonový bujon 25 g/1 000 ml vody, Hi Media Laboratories, M 244

TB (Fluid Thio Glycolate Medium), thioglykolátový bujon 29,8 g/1 000 ml vody, Hi Media Laboratories, M 009

CMC přeliv, 1,5 % karboxymethyl celulóza smíchaná se stejným objemem L-15 s 3 % FTS.

Směs pro barvení buněk na mikrodestičkách, 94 ml destilované vody, 0,1 g amidočerni B (Naphthol Blauschwarz FLUKA), 1,36 g octanu sodného, 6 ml kyseliny octové.

Hovězí sérový albumin (BSA), Sigma

3.2.3 Kultivační nádoby a pomůcky

Müllerova láhev, Nuclon TM delta surface (Nunc)

Leightonovy zkumavky, Nuclon TM delta surface (Nunc)

Mikrotitrační destičky s 96 jamkami s plochým dnem a víčkem, Sarstedt

Pipety a pasteurovy pipety

Pipetory: Pipetus, Hirschmann Laborgerate, SRN

3.2.4 Přístroje

Box s laminárním prouděním pro sterilní práci s buněčnými kulturami (B 36, Tuccini, Italy)

Biohazard box pro práci s viry, Ceag Schirp Reinraum technik, SRN

Inkubátory ECHO term, Chemos (pro sterilní práci)

Stabili Therm, Thermo Electron corporation (pro infekční práci)

Chladnička: Electrolux Intuition Space Plus

Mrazicí box: Elektrolux (-25 °C)

Hlubokomrazicí box (-65 °C) Sanyo MDF 192AT

Inverzní světelné mikroskopy CKX 41, Olympus, Zeiss Jena, NDR

3.2.5 Práce s buněčnými kulturami

S buňkami pracujeme asepticky v boxu s laminárním prouděním vzduchu. Pracovní plochu bylo potřeba před započítím práce vydezinfikovat lihem s 1 % benzínu. Pracovník pracující ve sterilním boxu musí mít čistý pracovní plášť a důkladně umyté ruce.

Byly použity buňky kontinuální buněčné linie VERO konkrétně VERO E6, dar od MUDr. O. Kožucha CsC., Virologický ústav SAV, Bratislava. Jedná se o ledvinné buňky kočkodana zeleného (*Cercopithecus aethiops*).

Kultivace probíhala v Müllerových plastových nádobách. V těchto lahvích buňky narostly do podoby souvislé jednovrstvy a poté byly přepasážovány a byla nasazena nová Müllerova láhev.

Při určování virového izolátu 06-222 byla použita další buněčná linie SPEV (linie prasečí embryonální ledviny, příbuzná buňkám PS a PK), poněvadž tento izolát netvořil dokonalý CPE na buňkách VERO.

Buňky v Müllerově láhvi narostly do podoby jednovrstvy zhruba po 5 dnech. Po mikroskopickém zhodnocení byly přeneseny do Flow boxu a omyty ve 3-5 cm³ roztoku PBS. Do láhve byl přidán roztok trypsinu v požadované koncentraci dle návodu výrobce a působil na buňky 1 minutu. Poté byl trypsin odsán pipetou a láhev v poloze „buněčnou kulturou nahoru“ byla uložena do termostatu na deset minut (tzv. suchá trypsinizace). Po vyjmutí z termostatu byly buňky mikroskopicky zkontrolovány. Působením trypsinu se zakulatily a začaly se odchlípnout od podkladu. Byly resuspendovány ve 2 ml média L-15 bez séra. Do nové láhve s 10 ml čerstvého média byly buňky nasazeny ve štěpném poměru podle potřeby. Nejčastěji 1:10, tj. ze 2 ml resuspendované buněčné suspenze bylo 0,2 ml buněčné suspenze přeneseno do nové láhve a kultura pak rostla 5 dní. Na závěr byla přepasážovaná láhev označena popiskem (datum pasáže, číslo pasáže, štěpný poměr) a umístěna do termostatu při 37 °C.

Počet Leightonových zkumavek, v nichž probíhal izolační pokus, závisel na počtu komářích suspenzí, které bylo potřeba v jednotlivých dnech očkovat (10-40). Do zkumavek bylo napipetováno 2 ml růstového média L-15 a přidáno 0,2 ml buněk resuspendovaných po jejich trypsinizaci v Müllerových nádobkách. Po znovuvytvoření buněčné jednovrstvy byly buňky očkovány komářími suspenzemi v biohazard boxu.

3.2.6 Příprava suspenzí z komárů

Komáři byli až do zpracování uchovávaní v hlubokomrazícím zařízení Sanyo při -65 °C. Poté byly samičky roztříděny podle druhu a lokality do směsí po zhruba 50 ks a homogenizovány ve sterilním PBS s 0,4 % hovězím sérumalbuminem. Suspenze byla centrifugována 20 minut při 2500 ot./min. (1800 g) a supernatant byl použit do pokusu a uchováván při - 65 °C až do zahájení pokusu. Přípravou suspenzí se zabývali pracovníci ÚBO AVČR.

U každé suspenze byla testována její případná bakteriální kontaminace v masopeptonovém a thioglykolátovém bujonu pětidenní inkubací při 37 °C.

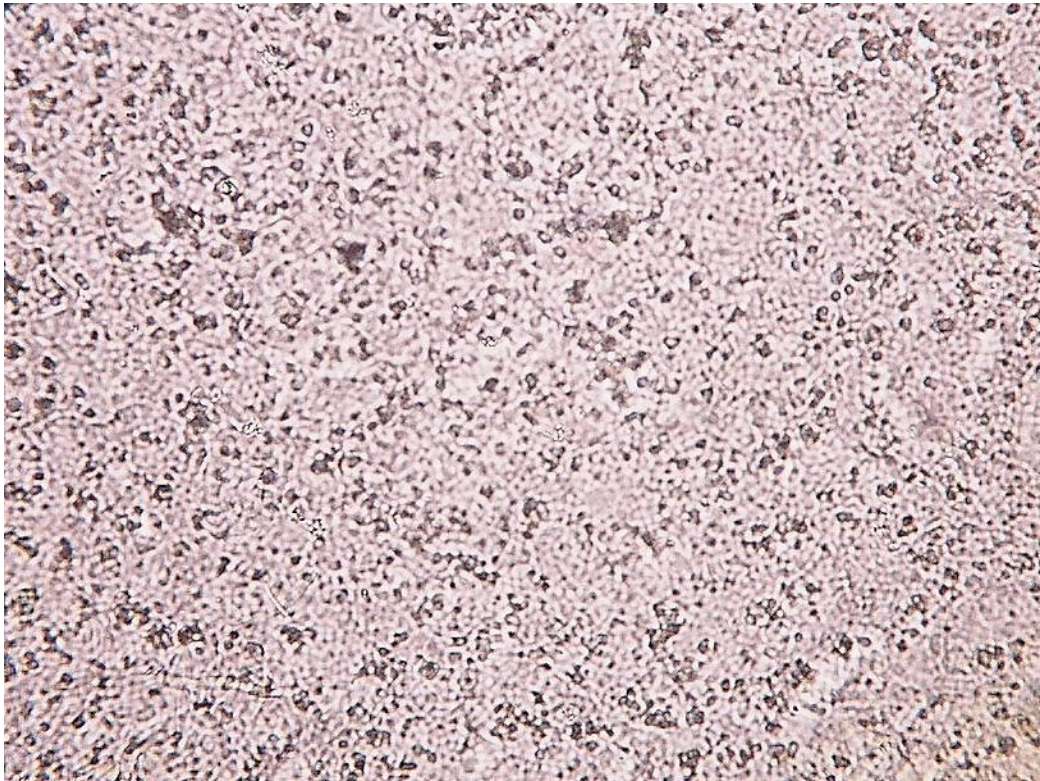
3.2.7 Očkování kultur komářími suspenzemi

Před prací v biohazard boxu bylo potřeba se převléci do oblečení pro práci v infekčním prostředí a vzít si ochranné pomůcky: roušku a rukavice. Biohazard box byl ponechán před vlastní prací několik minut puštěný, abychom předešli případné kontaminaci. A po ukončení práce byl vyzářen 15 minut germicidním zářením.

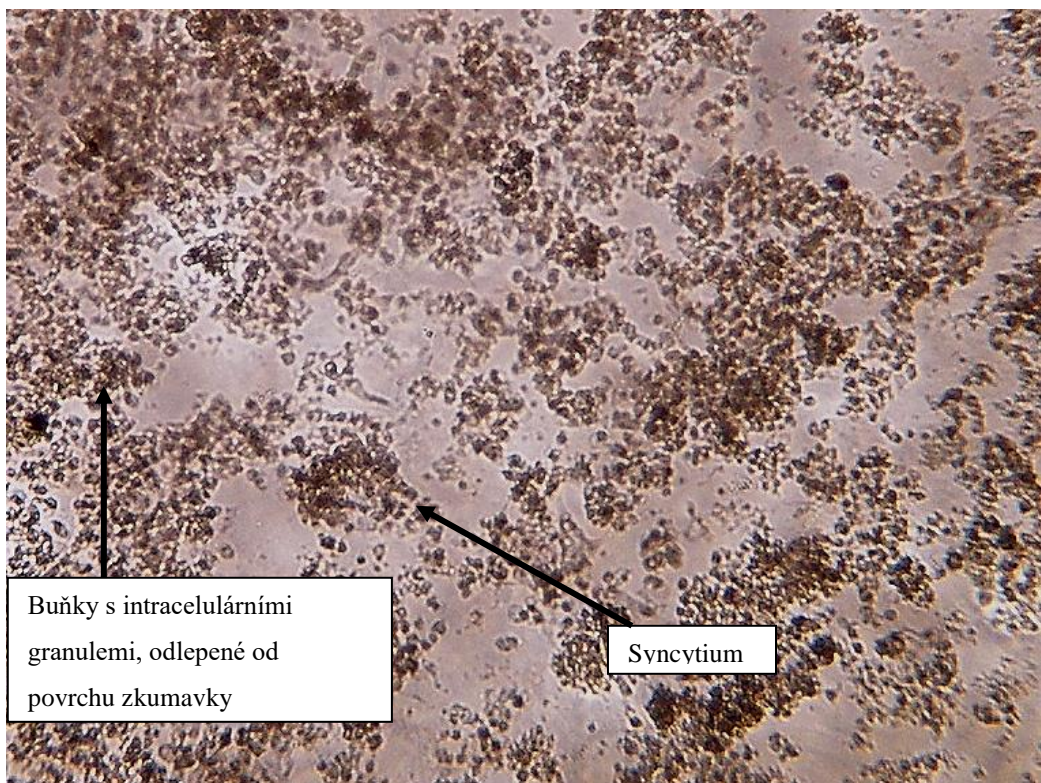
Zmražené komáří suspenze byly prudce rozmrazeny v teplé lázni (37-40 °C) a dokud ve zkumavce zbývala ještě stopa ledu, byly přemístěny do ledové lázně. Leightonovy zkumavky s narostlou buněčnou kulturou byly popsány čísly suspenzí. Vždy byla jedna zkumavka ponechána jako kontrola buněk. Každá suspenze byla vyšetřena ve dvou opakováních. Médium ze zkumavek bylo odsáto, bylo do nich napipetováno 100 µl příslušné komáří suspenze (do kontrolní zkumavky 100 µl PBS) a rozlito po celém povrchu buněčné jednovrstvy. Takto připravené zkumavky byly umístěny do termostatu při 37 °C po dobu 1 h. Po proběhlé inkubaci byly komáří suspenze opatrně odsáty sterilní pasteuovou pipetou do roztoku 2% chloraminu. Do Leightonových zkumavek bylo sterilně napipetováno 2 ml čerstvě připraveného udržovacího média a zkumavky byly přemístěny do termostatu nastaveného na teplotu 37 °C.

Kontrola naočkovaných Leightonových zkumavek probíhala pod inverzním světelným mikroskopem vždy obden po celý týden. Pátralo se po případném cytopatickém efektu (CPE), který se projevoval narušením buněčné jednovrstvy, odchlípnutím buněk od povrchu, změnou jejich tvaru, přítomností intracelulárních granulí a syncytií (Obr. 2, 3). Při silném CPE docházelo ke změně barvy média oproti kontrole, způsobené změnou pH média v důsledku zastavení buněčného růstu (indikátorem pH je fenolová červeň přítomná v médiu). Podobný mikroskopický obraz však může být příležitostně způsoben cytotoxicitou suspenze nebo bakteriální kontaminací.

Obr. 2. Kontrolní buněčná kultura SPEV (před barvením, 6 dní inkubace).



Obr. 3. CPE izolátu 06-222 na buněčné kultuře SPEV (před barvením, 6 dní inkubace).



Po 2-4 dnech bylo potřeba vyměnit médium. Výměna udržovacího média probíhala opět v biohazard boxu. Staré médium bylo opatrně odsáto pasteurovou pipetou do 2% roztoku chloraminu a do zkumavky bylo přidáno 2 ml čerstvého udržovacího média. V případě příliš rychlého buněčného růstu už jen s 1% fetálního telecího séra. Leightonovy zkumavky byly poté vráceny do termostatu nastaveného na 37 °C. Po týdnu byly negativní Leightonovy zkumavky zautoklávovány, zkumavky s CPE byly zmrazeny při -65 °C.

3.2.8 Identifikace virových izolátů

Zkumavky, umístěné do hlubokomrazícího boxu, jsme 3x prudce rozmrazili a zmrazili, aby se intracelulárně umístěné viriony uvolnily z buněk. Poté byl jejich obsah prudce rozmražen a 100 µl bylo naočkováno na další buněčnou kulturu. Takto pasážovány byly 1-3x. V případě nevýrazného CPE byla originální komáří suspenze opakována. Tímto způsobem jsme se ujistili, které suspenze obsahují živý virus. Tyto suspenze byly následně naočkovány na myši pracovníky ÚBO AVČR, v jejich mozcích došlo k namnožení viru do vysokých titrů a pro nás byla myší smrt potvrzením, že se skutečně jedná o patogenní virus.

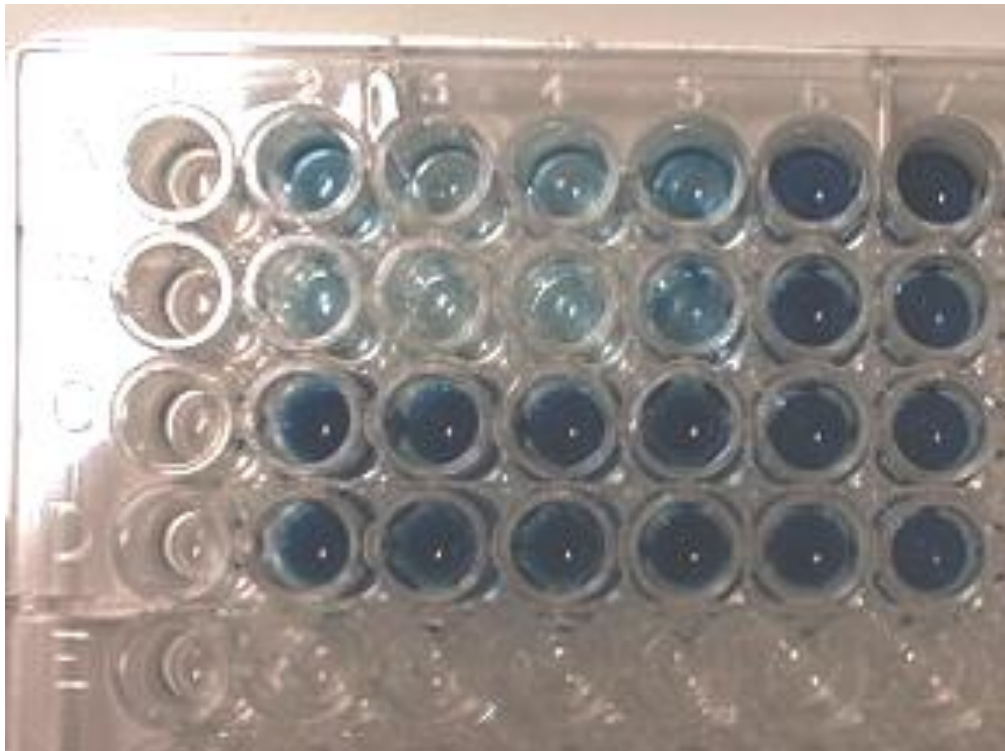
Virové izoláty byly určovány neutralizačním mikrotestem (micro-PRNT). Metodiku tohoto testu původně navrhli Madrid a Porterfield (1974), a pro použití na mikrotitračních destičkách upravili Hubálek a kol. (1979).

Princip neutralizačního testu:

Sériově 10x ředěný virus (většinou 10^{-2} až 10^{-8}) inkubujeme 60 min. při 37 °C se stejným dílem konstantně naředěných (obvykle 1:5) specifických myších imunních sér, inaktivovaných 30 min/56 °C a paralelně inkubujeme též ředění viru s negativním myším sérem. Obojí naočkujeme na buněčnou kulturu a srovnáváme titr viru inkubovaného bez protilátek a s protilátkami. **Titr** je nejvyšší ředění viru, při kterém ještě dochází k CPE. **Neutralizační index (NI)** je potom rozdíl mezi titrem viru v přítomnosti normálního séra a imunního séra: **log NI ≥ 2** znamená pozitivní výsledek, tj. že použité imunní sérum neutralizovalo a tím identifikovalo virus (Obr. 4). Identifikaci neznámého viru lze provádět jak na buněčných kulturách, tak i na zvířatech

(Lennette a kol. 1974, Januška 1990), my jsme ji prováděli na buněčných kulturách VERO a SPEV metodou výše zmíněného testu.

Obr. 4. Příklad virus neutralizačního mikrotestu s virovou suspenzí.



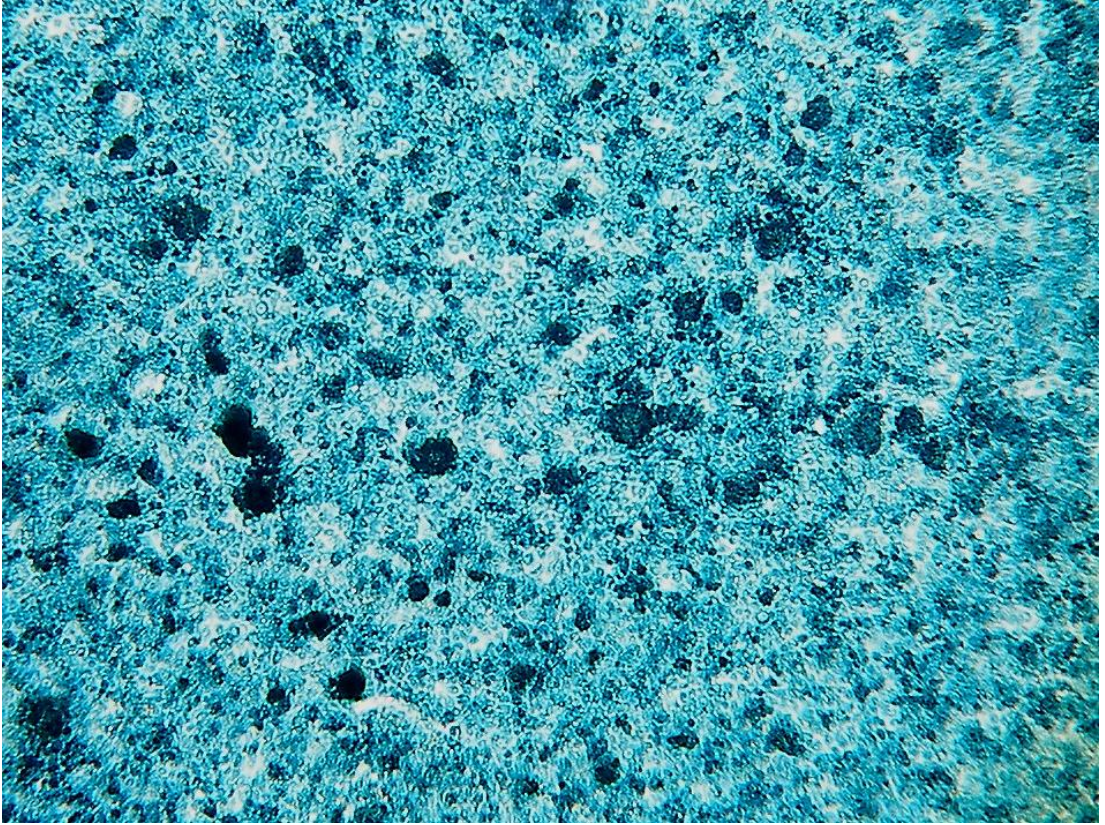
řádky A,B: normální myší sérum
řádky C,D: imunní myší sérum
titr viru s NS je 10^{-5} , titr viru s IS $< 10^{-2}$, log NI > 3

- 1) Nejdříve byla mikrotitrační destička zchlazena v ledničce. Virová suspenze byla rychle rozmrazena a dokud v ní zbývala ještě trocha ledu, byla vložena do ledové lázně.
- 2) Virová suspenze byla naředěna od 10^{-2} - 10^{-8} v L-15 se 3% FTS.
- 3) Do jednoho řádku mikrotitrační destičky bylo napipetováno normální sérum (NS) (35 μ l /jamka), do druhého imunní sérum (IS) (35 μ l /jamka) a do obou řádků byl nadávkován po 35 μ l /jamka určovaný virus v ředění od 10^{-2} - 10^{-8} .
- 4) Mikrotitrační destička byla inkubována v termostatu 60 minut při 37 °C zabalená v uzavřeném polyetylenovém sáčku.
- 5) Z narostlé buněčné kultury byla připravena suspenze se 3% FTS a antibiotiky. Do každé obsazené jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno 70 μ l suspenze buněk, tj. asi 25 000 buněk na jamku. Dále byla použita kontrola buněk bez viru s normálním sérem a s imunním sérem, do které byly přidány 2 kapky L-15 se 3% FTS a antibiotiky.
- 6) Mikrotitrační destička byla inkubována 4 h v termostatu při 37 °C v uzavřeném polyetylenovém sáčku.

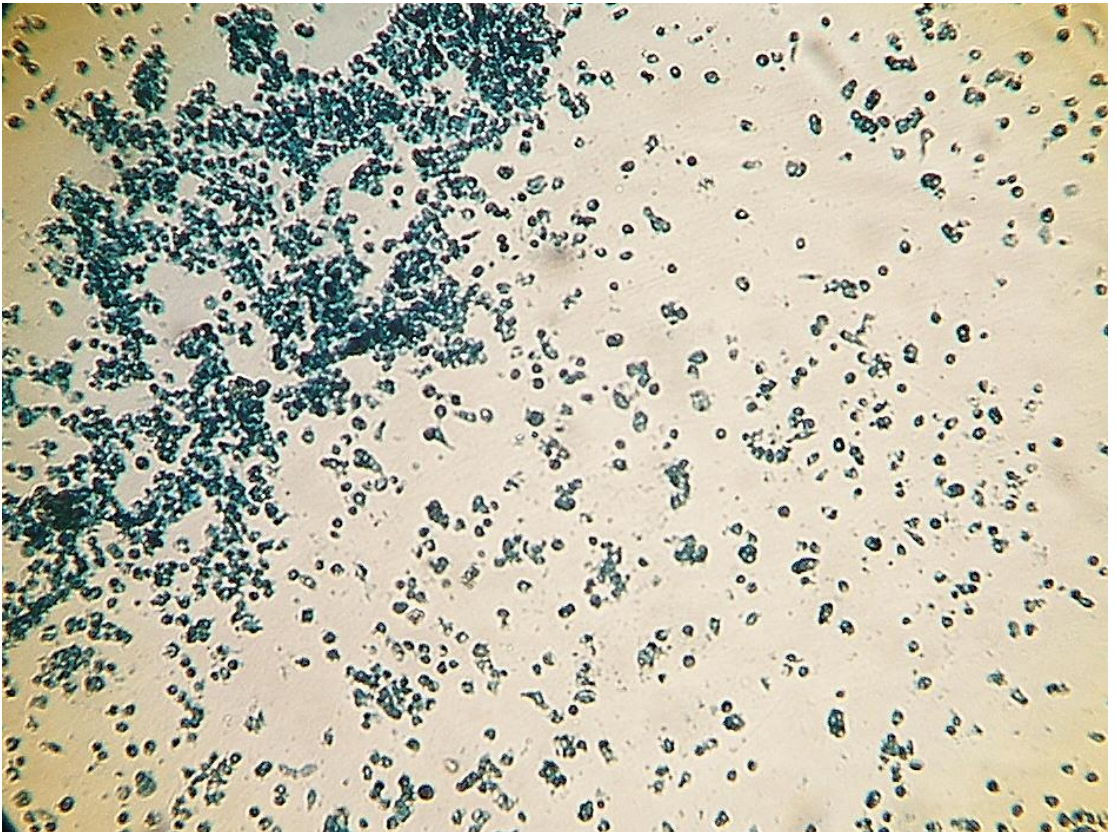
- 7) Poté bylo do všech jamek napipetováno 120 μ l CMC přelivu.
- 8) Inkubace buněk probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 4-6 dní, mikrotitrační destička byla v hermeticky uzavřeném plastovém sáčku.
- 9) Po 4 a 6 dnech inkubace byla mikrotitrační destička mikroskopicky hodnocena (Obr. 2, 3, 5, 6), a posléze buněčná kultura nabarvena tak, že v biohazard boxu byl opatrně odsáto médium ze všech jamek a do každé bylo přidáno 280 μ l barvicí směsi.
- 10) Barvení probíhalo po dobu 40 min. při laboratorní teplotě v biohazard boxu pod germicidní lampou.
- 11) Barvicí směs byla odsáta a destička důkladně propláchnuta vodou.
- 12) Test byl vyhodnocen odečtením neutralizačního indexu s jednotlivými séry (Obr. 4).

Séra použitá v testu byla inaktivována zahřátím na 56 °C po dobu 30 minut a naředěna 1:5. Jednalo se o myší séra, připravená v laboratoři ÚBO AVČR (anebo získaná z jiných pracovišť) proti virům Ťahyňa, Batai, Sindbis, West Nile a West Nile-Rabensburg, Usutu, klíšťové encefalitidy, Lednice a Sedlec. Kontrolní (negativní) sérum bylo normální myší sérum.

Obr.5. Nabarvená kontrola buněk VERO po 6 dnech inkubace.



Obr. 6. CPE izolátu TAHV na nabarvených buňkách VERO (6 dní inkubace).



4 VÝSLEDKY

Během této diplomové práce bylo vyšetřeno na buněčných kulturách VERO 202 suspenzí komárů, připravených z celkového počtu 9 742 samic třinácti druhů komárů (Tab. 4, Tab. 5, Obr. 7). Komáří suspenze byly vyšetřovány v období od 12. 11. 2007 do 3. 11. 2008. U všech suspenzí byla testována také bakteriální sterilita naočkováním do thioglykolátového (TB) a masopeptonového (MPB) bujónu (Tab. 4). Počet vyšetřených druhů komárů byl 13, jejich druhové zastoupení je vyjádřeno v Tab. 5 a Obr. 7. Získala jsem tři virové izoláty a určila je pomocí virus neutralizačního testu do druhů (Tab. 6).

Tab.4. Seznam vyšetřených suspenzí a výsledek sledování cytopatického efektu (CPE).

Číslo prot.	Druh komára	Počet (♀)	Datum sběru	Lokalita	CPE	Kontrola bakteriální sterility	
						MPB	TB
06-04	<i>Cx.pipiens</i>	19	20.3.2006	Soutok	–	–	–
06-05	<i>An.maculipennis</i>	50	20.3.2006	Soutok	–	–	–
06-33	<i>Oc.cantans</i>	50	18.5.2006	Nesyt	–	++	+
06-122	<i>Cx.modestus</i>	32	1.9.2006	Nesyt	–	–	–
06-128	<i>Oc.sticticus</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	+	(+)
06-131	<i>Ae.vexans</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	+	+
06-135	<i>Ae.vexans</i>	50	25.7.2006	Soutok	+	++	++
06-141	<i>Ae.vexans</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	++	++
06-142	<i>Oc.sticticus</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	+	+
06-143	<i>Ae.rossicus</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	++	++
06-154	<i>Oc.sticticus</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	(+)	++
06-157	<i>Ae.vexans</i>	50	25.7.2006	Soutok	+	+	+
06-162	<i>Ae.vexans</i>	50	25.7.2006	Soutok	–	+	+
06-173	<i>Ae.vexans</i>	50	30.8.2006	Soutok	–	chybí	
06-179	<i>Ae.vexans</i>	50	30.8.2006	Soutok	–	(+)	+
06-183	<i>Ae.vexans</i>	50	30.8.2006	Soutok	–	++	+
06-189	<i>Oc.sticticus</i>	50	30.8.2006	Soutok	–	–	–
06-191	<i>Ae.cinereus</i>	50	30.8.2006	Soutok	–	–	–
06-197	<i>Ae.rossicus</i>	43	30.8.2006	Soutok	–	+	+
06-222	<i>Ae.rossicus</i>	50	30.6.2006	Soutok	+	–	–
06-245	<i>Ae.rossicus</i>	42	26.9.2006	Soutok	–	+	++
06-250	<i>Ae.vexans</i>	50	26.9.2006	Soutok	–	++	++
06-261	<i>Ae.vexans</i>	50	26.9.2006	Soutok	–	++	++
06-267	<i>Ae.vexans</i>	50	26.9.2006	Soutok	–	++	++
06-286	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	–	–	–

06-287	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	++	++
06-288	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	++	+
06-289	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	+	++
06-290	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-291	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-292	<i>Ae.vexans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-293	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-294	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-295	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-296	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-297	<i>Ae.vexans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	++
06-298	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	+	-
06-299	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-300	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-301	<i>Ae.cinereus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-302	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-303	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-304	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-305	<i>Ae.vexans</i>	50	16.5. 2006	Soutok	-	-	-
06-306	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-307	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-308	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-309	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	+	++
06-310	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-311	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	+
06-312	<i>Ae.vexans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	++	+
06-313	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-314	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	+	++
06-315	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-316	<i>Ae.cinereus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-317	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-318	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-319	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-320	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-321	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-322	<i>Ae.rossicus</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-323	<i>Ae.vexans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-324	<i>Oc.cantans</i>	50	16.5.2006	Soutok	-	-	(+)
06-333	<i>Ae.cinereus</i>	17	18.5.+1.9.06	Nesyt	-	+	+
06-334	<i>Cx.pipiens</i> (7), <i>Cx.modestus</i> (2)	9	1.9.+ 26.10.2006	Nesyt	-	-	-
06-335	<i>Oc.cataphylla</i>	24	16.5.2006	Soutok	-	-	-
06-336	<i>Oc.cantans</i>	35	30.8.+26.9.06	Soutok	-	++	++
06-337	<i>Ae.cinereus</i>	39	16.5.+26.9.06	Soutok	-	++	++
06-338	<i>Ae.cinereus</i>	44	16.5.+26.9.06	Soutok	-	++	++
06-339	<i>Cx.pipiens</i> (9), <i>Cx.modestus</i> (3)	12	30.6.+26.9.06	Soutok	-	-	-
06-340	<i>An.maculipennis</i>	9	30.6.-26.9.06	Soutok	-	++	++
06-341	<i>Ae.vexans</i>	47	27.10.2006	Soutok	-	++	++
06-342	<i>Ae.vexans</i>	66	27.10.2006	Soutok	-	++	++
07-01	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	++	++
07-02	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	++	+

07-03	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	+	++
07-05	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	+	++
07-06	<i>Cx.pipiens</i>	70	8.3.2007	Lednice	-	++	++
07-07	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	-	-
07-08	<i>Cx.pipiens</i>	70	8.3.2007	Lednice	-	+	++
07-09	<i>Cx.pipiens</i>	70	8.3.2007	Lednice	-	-	-
07-10	<i>Cx.pipiens</i>	70	8.3.2007	Lednice	-	-	-
07-13	<i>Cx.pipiens</i>	70	8.3.2007	Lednice	-	++	++
07-14	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	++	++
07-15	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	+	+
07-16	<i>Cx.pipiens</i>	50	8.3.2007	Lednice	-	-	-
07-17	<i>Cs. annulata</i>	8	8.3.2007	Lednice	-	-	-
07-18	<i>Cx.pipiens</i>	49	12.6.2007	Nesyt	-	-	-
07-19	<i>Cx.pipiens</i>	49	13.6.2007	Nesyt	-	-	-
07-20	<i>Cx.pipiens</i>	50	13.6.2007	Nesyt	-	+	+
07-21	<i>Cx.pipiens</i>	53	27.6.2007	Nesyt	-	+	++
07-22	<i>Cx.pipiens</i>	58	28.6.2007	Nesyt	-	-	-
07-23	<i>Cx.pipiens</i>	50	28.6.2007	Nesyt	-	++	++
07-24	<i>Cx.pipiens</i>	58	12.-28.6.2007	Nesyt	-	-	++
07-25	<i>Cx.pipiens</i>	29	29.5.-28.6.07	Soutok	-	-	-
07-26	<i>Oc.cantans</i>	33	12.-28.6.2007	Nesyt	-	++	++
07-27	<i>Ae.vexans</i>	41	květen 2007	Soutok	-	-	-
07-28	<i>Cx.pipiens</i>	43	10.7.2007	Nesyt	-	-	-
07-29	<i>Cx.pipiens</i>	33	11.7.2007	Nesyt	-	-	-
07-30	<i>Cx.pipiens</i>	50	11.7.2007	Nesyt	-	-	++
07-31	<i>Cx.pipiens</i>	50	24.7.2007	Nesyt	-	(+)	++
07-32	<i>Cx.pipiens</i>	54	7.8.2007	Nesyt	-	++	++
07-33	<i>Cx.pipiens</i>	50	7.8.2007	Nesyt	-	+	-
07-34	<i>Cx.pipiens</i>	50	25.7.-7.8.2007	Nesyt	-	-	-
07-35	<i>Cx.pipiens</i>	45	25.7.-7.8.2007	Nesyt	-	-	-
07-36	<i>Cx.pipiens</i>	49	8.8.2007	Nesyt	-	-	(+)
07-37	<i>Ae.vexans</i>	42	27.6.-11.7.07	Soutok	-	++	++
07-38	<i>Ae.vexans</i>	51	24.7.-8.8.2007	Soutok	-	++	++
07-39	<i>Cx.pipiens</i>	41	21.-22.8.2007	Nesyt	-	-	-
07-40	<i>Cx.pipiens</i>	48	4.-19.9.2007	Nesyt	-	++	++
07-41	<i>Ae.vexans</i>	63	4.9.-3.10.2007	Soutok	-	++	++
07-42	<i>Ae.vexans</i>	57	17.10.2007	Soutok	-	-	-
07-43	<i>Ae.vexans</i>	58	16.-31.10.2007	Soutok	-	++	++
07-44	<i>Ae.vexans</i>	38	říjen 2007	Nesyt	-	++	++
07-45	<i>Cx.pipiens</i>	47	2.-31.10.2007	Nesyt	-	++	+
07-46	<i>Cx.pipiens</i>	26	22.8.-31.10.07	Soutok	-	++	+
07-47	<i>Oc.caspicus</i>	28	18.9.-17.10.07	Nesyt	-	-	(+)
07-48	<i>Ae.rossicus</i>	37	13.6., 31.10.07	Soutok+Nesyt	-	+	+
07-49	<i>An.plumbeus</i> (4), <i>An.maculipennis</i> (8)	12	12.6.-2.10.07	Soutok+Nesyt	-	-	-
07-50	<i>Oc.cantans</i> (8), <i>Oc.stisticus</i> (21), <i>Ae.rossicus</i> (9), <i>Ae.cinereus</i> (2)	40	12.6.-2.10.2007	Soutok+Nesyt	-	-	-
08-01	<i>Cx.pipiens</i>	50	12.3.2008	Lednice	-	-	-
08-02	<i>Cx.pipiens</i>	50	12.3.2008	Lednice	-	-	-

08-03	<i>Cx.pipiens</i>	50	12.3.2008	Lednice	-	-	-
08-04	<i>Cx.pipiens</i>	50	12.3.2008	Lednice	-	-	-
08-05	<i>Cx.pipiens</i>	50	12.3.2008	Lednice	-	-	-
08-06	<i>Cx.pipiens</i>	61	12.3.2008	Lednice	-	-	(+)
08-07	<i>Cx.pipiens</i>	62	12.3.2008	Lednice	-	+	-
08-08	<i>Ae.vexans</i>	50	10.5.2008	Soutok	-	-	-
08-09	<i>Ae.vexans</i>	50	10.5.2008	Soutok	-	-	-
08-10	<i>Ae.vexans</i>	50	10.5.2008	Soutok	-	-	-
08-11	<i>Ae.vexans</i>	50	10.5.2008	Soutok	-	-	-
08-12	<i>Ae.vexans</i>	50	10.5.2008	Soutok	-	-	-
08-13	<i>Oc.cantans</i>	50	11.6.2008	Nesyt	-	++	++
08-14	<i>Ae.vexans</i>	50	10.6.2008	Soutok	-	-	-
08-15	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	+	-
08-16	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-17	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	+	++
08-18	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-19	<i>Cx.pipiens</i>	50	11.6.2008	Nesyt	-	-	-
08-20	<i>Ae.vexans</i>	47	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-21	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-22	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-23	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-24	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-25	<i>Ae.vexans</i>	47	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-26	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-27	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	++
08-28	<i>Ae.vexans</i>	50	11.6.2008	Soutok	-	-	-
08-58	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	++
08-59	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	++	++
08-60	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	-	-
08-61	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	-	+
08-62	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	-	-
08-63	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	-	+
08-64	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	+	++
08-65	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	-	-
08-66	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Nesyt	-	-	-
08-67	<i>Oc.cantans</i>	50	9.7.2008	Nesyt	-	++	++
08-68	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-69	<i>Ae.vexans</i>	50	22.7.2008	Soutok	-	+	++
08-70	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-71	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-72	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-73	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-74	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-75	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-76	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	++	++
08-77	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-78	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-79	<i>Ae.vexans</i>	50	23.7.2008	Soutok	-	-	++
08-80	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	-	-
08-81	<i>Oc.cantans</i>	50	24.6.2008	Nesyt	-	(+)	+
08-82	<i>Ae.vexans</i>	50	9.7.2008	Soutok	-	++	++

08-83	<i>Ae.vexans</i>	47	25.6.2008	Soutok	-	-	-
08-84	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Nesyt	-	-	-
08-85	<i>Oc.cantans</i>	50	25.6.2008	Nesyt	-	++	++
08-86	<i>Ae.vexans</i>	50	25.6.2008	Soutok	-	++	++
08-87	<i>Ae.vexans</i>	50	23.7.2008	Soutok	-	-	-
08-88	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	++	++
08-89	<i>Ae.vexans</i>	50	5.8.2008	Soutok	-	++	++
08-90	<i>Ae.vexans</i>	50	6.8.2008	Nesyt	-	(+)	-
08-91	<i>An.hyrceanus</i>	49	24.6.-2.9.2008	Nesyt	-	-	-
08-92	<i>Ae.vexans</i>	50	24.6.2008	Soutok	-	+	++
08-93	<i>Ae.cinereus</i>	60	27.5.-25.6.08	Nesyt	-	-	-
08-94	<i>Oc.cantans</i>	49	14.5-10.6.2008	Nesyt	-	+	++
08-95	<i>Cx.pipiens</i>	69	13.5.-10.6.08	Nesyt	-	-	-
08-96	<i>Cx.pipiens</i>	53	8.7.2008	Nesyt	-	+	-
08-97	<i>Cx.pipiens</i>	45	8.-9.7.2008	Nesyt	-	-	-
08-98	<i>Cx.pipiens</i>	46	9.7.2008	Nesyt	-	-	-
08-99	<i>Cx.pipiens</i>	63	13.5.-8.7.2008	Soutok	-	-	-
08-100	<i>Cx.pipiens</i>	66	11.6.-25.6.08	Nesyt	-	-	-
08-101	<i>Cx.pipiens</i>	49	23.7.-6.8.2008	Nesyt	-	-	-
08-102	<i>Cx.pipiens</i>	57	22.7.-23.7.08	Nesyt	-	-	-
08-103	<i>Cx.pipiens</i>	49	6.8.-20.8.2008	Nesyt	-	-	-
08-104	<i>Cx.pipiens</i>	45	20.8.-21.10.08	Nesyt	-	++	++
08-105	<i>Cx.pipiens</i>	68	9.7.-1.10.2008	Soutok	-	-	-
08-106	<i>Cx.modestus</i>	45	24.6.-9.7.2008	Nesyt	-	-	-
08-107	<i>Cx.modestus</i>	39	23.7.2008	Nesyt	-	-	-
08-108	<i>Cx.modestus</i>	45	22.7.-2.9.2008	Nesyt	-	-	-
08-109	<i>Cs.annulata</i>	23	14.5.-25.6.08	Nesyt	-	-	-
08-110	<i>Cs.annulata</i>	37	8-9.7.2008	Nesyt	-	+	(+)
08-111	<i>Cs.annulata</i>	43	22.7.-2.9.2008	Nesyt	-	-	-

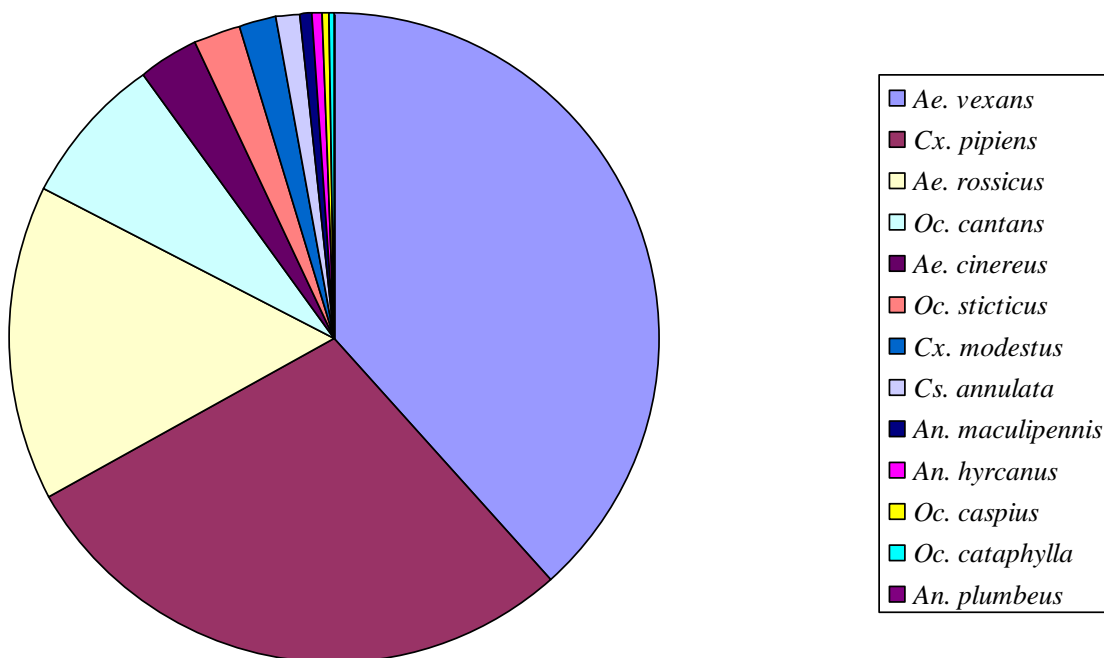
Kontrola bakteriální sterility: - sterilní; + kontaminovaná suspenze

Tab. 5. Druhové zastoupení vyšetřených komárů.

	Druh komára	Počet suspenzí	Počet jedinců	Procento z celkového počtu
1.	<i>Ae. vexans</i>	75	3754	38,53%
2.	<i>Cx. pipiens</i>	56	2800	28,74 %
3.	<i>Ae. rossicus</i>	31	1481	15,20%
4.	<i>Oc. cantans</i>	16	725	7,44%
5.	<i>Ae. cinereus</i>	8	312	3,20%
6.	<i>Oc. sticticus</i>	5	221	2,27%
7.	<i>Cx. modestus</i>	6	166	1,70%
8.	<i>Cs. annulata</i>	4	111	1,14%
9.	<i>An. maculipennis</i>	3	67	0,68%
10.	<i>An. hyrcanus</i>	1	49	0,5%
11.	<i>Oc. caspius</i>	1	28	0,29%
12.	<i>Oc. cataphylla</i>	1	24	0,26%
13.	<i>An. plumbeus</i>	1	4	0,041%
	celkem	208	9 742	99,99%

Pozn.: 4 suspenze byly druhově směsné, proto počet suspenzí ve kterých se vyskytují vyšetření komáři neodpovídá celkovému počtu vyšetřených suspenzí uvedenému v úvodu této kapitoly.

Obr.7. Kvantitativní druhové zastoupení vyšetřených komárů.



Tab.6. Identifikační neutralizační test (metoda sériově ředěného viru – konstantního ředění imunního séra) tří virových izolátů podle logaritmu neutralizačního indexu (log NI) jednotlivých antisér. Myší séra byla poskytnutá Laboratoří medicínské zoologie ÚBO AVČR. Je-li $\log NI \geq 2,0$, pak je virus tímto sérem identifikován.

Izolát číslo	Imunní sérum	log NI	Virus
06-135	TAH	>2,0	TAH
06-157	TAH	>2,0	TAH
06-222	TAH	<0,3	-
06-222	BAT	0,3	-
06-222	SIN	0,3	-
06-222	USU	1,5	-
06-222	WN-Eg	3,0	WN
06-222	WN-RAB	3,5	WN
06-222	DEN-1	1,0	-
06-222	SED	0,8	-

Použitá imunní séra proti viru: Ťahyňa, Batai, Sindbis, Usutu, West Nile - Egypt 101, West Nile – Rabensburg, Dengue sérotyp I a Sedlec.

Z celkového počtu 9 742 komárů byl minimální infekční poměr (MIR) pro virus Ťahyňa 1:4 871 tj. 0,21 komárů na 1 000 vyšetřených jedinců bylo pozitivních. Ze 3 754 vyšetřených *Ae. vexans* byly 2 suspenze pozitivní tj. specifický MIR pro druh *Ae. vexans* je 1:1 877 a 0,53 komára na 1 000 vyšetřených jedinců bylo pozitivní.

Z celkového počtu 9 742 komárů byl minimální infekční poměr (MIR) pro virus West Nile 1:9 742 a 0,10 komára na 1 000 vyšetřených jedinců bylo pozitivních. Specificky pro 1 481 odchycených jedinců komára *Aedes rossicus* byl MIR 1:1 481 a 0,68 komára na 1 000 vyšetřených jedinců bylo pozitivní.

5 DISKUZE

Cílem této práce bylo virologicky vyšetřit komáry nasbírané na jižní Moravě. Izolace jsme prováděli na kontinuálních buněčných kulturách VERO. O virech vyskytujících se na jižní Moravě je známo, že na kontinuálních buněčných kulturách rostou a tvoří CPE, kromě viru Lednice. Virus Lednice se množí na sajících myších, kuřecích embryích a primárních buněčných kulturách z ptáků (hus, kachen a kuřecích embryí). Na žádné z testovaných kontinuálních buněčných kultur se tento virus nereplikuje včetně buněk GMK a Vero (Marhoul a kol. 1976, Šefčovičová 1969, Málková a kol. 1986, Lu a kol. 2009), takže tento virus, který je ovšem považován za nepatogenní pro savce, jsme zachytit nemohli.

Pro záchyt arbovirů obecně jsou nejvhodnějším substrátem novorozené myši, na nichž se množí všechny na jižní Moravě se vyskytující viry. O vyšší úspěšnosti záchytu virů na laboratorních myších oproti buněčným kulturám jsme se při práci sami přesvědčili. Během vyšetřování našich 202 komářích suspenzí bylo 5 z nich pozitivních na myších, ale přitom negativních na buněčných kulturách.

Celkem se nám podařilo zachytit dva viry: West Nile (1 izolát) a Ťahyňa (2 izoláty).

5.1 Virus West Nile

5.1.1 Obecné informace

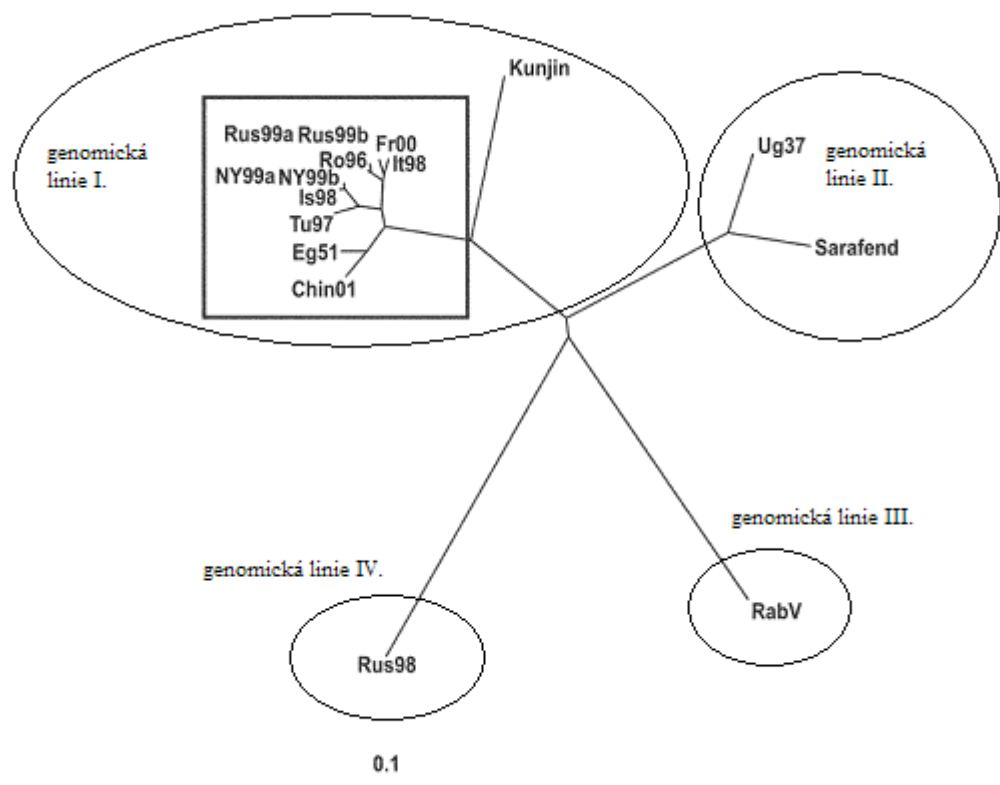
Taxonomické zařazení: rod *Flavivirus*, člen skupiny virů japonské encefalitidy. Existuje několik genomických linií viru, které se dělí do shluků podle geografické distribuce. V ČR byl izolován kmen „Rabensburg“ (Hubálek a kol. 1998, 2000), patřící do nové genomické linie III.

Synonyma a první izolace: Prototypový kmen B-956 byl izolován roku 1937 ze vzorků séra pacientky s horečkou v Ugandské provincii West Nile (Hubálek a Kříž 2003). Ve střední Evropě byl poprvé izolován roku 1972 blízko Malacek (SR) Labudou a kol. (1974) z komára *Oc. cantans*. V České republice byl poprvé izolován Hubálkem

a kol. (1998) po povodních 17. září 1997 izolát 97-103 z komárů *Cx. pipiens* (11 334 komárů, 5 druhů) blízko Lanžhota. Jednalo se o druhou izolaci WNV ve střední Evropě, český i slovenský ekosystém jsou si podobné a vzdušná vzdálenost je pouhých 25km. Byl podroben srovnávacímu zkříženému PRNT s kmenem Eg-101 (topotypový kmen WNV). Test prokázal vysokou vzájemnou podobnost, ale sníženou neurovirulenci izolátu 97-103. Tento byl určen jako Rabensburg, s liniemi WNV I a II sdílí pouze 75-77% nukleotidové a 89-90% aminokyselinové homologie (Obr. 8), což odpovídá vzdálenosti mezi jednotlivými genomickými liniemi (Bakonyi a kol. 2005).

Velice blízký kmen byl na stejném místě stejnými pracovníky izolován opět z *Cx. pipiens* (14 354 jedinců) o dva roky později (Hubálek a kol. 2000). Na jižním Slovensku byl WNV izolován také z krve ptáků (*Tringa ochropus*, *Vanellus vanellus* a *Streptopelia turtur*) chycených r. 1973 (Grešíková a kol. 1975, Ernek a kol. 1977).

Obr. 8. Fylogenetický vztah mezi vybranými kmeny WNV založený na kompletních sekvencích genomů. Přímka zobrazuje genetickou vzdálenost (Bakonyi a kol. 2005).



Russia 99a, 99b, France 00, Romania 96, Italy 98, New York 99a, New York 99b, Israel 98, Tunisia 97, Egypt 51, China 01, Uganda 37, Rabensburg

Ekologie:

Základní životní cyklus je přírodně ohniskový. Zahrnuje divoké, převážně mokřadní a vodní ptáky jako hostitele a amplifikátory viru a ornitofilní komáry (*Cx. pipiens*, *Cx. modestus*) jako vektory (Hubálek a Kříž 2003).

- Výskyt

WNV je nejrozšířenějším členem čeledi *Flaviviridae*, vyskytuje se v Africe, Asii, Austrálii a Americe (Hubálek 2008). V rámci Evropy byl virus zjištěn v jižním Rusku, Ukrajině, Moldávii, Bělorusku, Rumunsku, Francii, Španělsku, Portugalsku, Maďarsku, Slovensku a v Česku (Hubálek a Halouzka 1996, Hubálek 2000a). V České Republice se vyskytuje přírodní ohnisko u Lanžhota, situováno na levém břehu Dyje naproti rakouské obci Rabensburg a u rybníka Nesyt u Valtic blízko Břeclavi (Hubálek a kol. 1999).

- Vektoři

Celkově byl na světě izolován minimálně ze 43 druhů komárů, 4 druhů klíšťat a 2 druhů klíšťáků - *Argas hermanni* a *Ornithodoros capensis* (Hubálek a Halouzka 1999). Hlavním vektorem viru u nás jsou *Culex* spp., především *Cx. pipiens* (Hubálek a kol. 2000).

- Hostitelé viru

Ptáci slouží jako hlavní hostitelé viru a jeho amplifikátoři. Po infekci se u nich objevuje virémie o délce 3-7 dnů. Tažní ptáci mohou transportovat virus mezi Evropou a Afrikou a jsou považováni za příčinu jeho šíření po severoamerickém kontinentě (Hubálek a Kříž 2003). Virus byl v Evropě izolován z 11 druhů vodních i suchozemských, převážně tažných ptáků zimujících v subsaharské Africe nebo v oblasti Středozevního moře (Hubálek 2000a). Během surveillance mezi lety 2004-2006 se na jižní Moravě protilátky nacházely u 3,3% z 391 vyšetřených divokých ptáků, např. u druhů *Fulica atra*, *Alcedo atthis*, *Acrocephalus scirpaceus*, *A. schoenobaenus*, *A. palustris*, *Locustella luscinioides*, *Sturnus vulgaris*, *Parus coeruleus*. U domácí drůbeže protilátky nebyly nalezeny (Hubálek a kol. 2008a). Během odchytu roku 1984 byly protilátky zjištěny u 9,7% pěvců na rybníce Sedlec blízko Břeclavi (Juřicová a kol. 1987). Ze savců se podařilo WNV v Evropě izolovat u následujících druhů: *Apodemus flavicollis* a *Clethrionomys glareolus* (Maďarsko), *Lepus europaeus* (jižní Rusko), koně (jižní Francie). V Česku byly nalezeny protilátky u 2 % ze 113 kusů dobytka a 63 koní, 5 % z 398 zajíců (*Lepus europaeus*), 8 % divoké zvěře a 10 % kormoránů (*Phalacrocorax carbo*) (Hubálek a kol. 2000). Fredericksen a kol. (2004) se domnívá,

že kromě ptáků mají ostatní živočichové virémii pod prahovou hodnotou infekce a slouží jen jako koncoví hostitelé viru. Hubálek (2000a) zmiňuje 3 izoláty WNV pocházející z *Rana ridibunda* (Tádžikistán) a experimentální ověření schopnosti tohoto obojživelníka vyvinout dostatečnou virémii pro přenos viru. Role obojživelníků a plazů v cirkulaci WNV zůstává nejasná.

- Přezimování viru v mírném klimatickém pásu

Je teoreticky umožněno v zásadě těmito mechanismy: 1) v hibernujících samicích *Culex* spp.; 2) transovariálním přenosem samicemi *Culex* spp. do potomstva; 3) chronicky infikovanými obratlovci. Alternativní hypotézou je, že virus v mírném pásu nepřezimuje a je občas reintrodukován tažnými ptáky ze subtropických ohnisek (Hubálek a Kříž 2003).

Patogenita:

- Onemocnění zvířat

U koní vzniká encefalomyelitida s horečkou a úmrtností přibližně 25 % (Francie, Portugalsko, Itálie, Egypt, Severní Amerika). Virus se dále projevuje jako fatální systémové onemocnění ptáků, zejména v Severní Americe (Hubálek 2008). Onemocnět může méně často také dobytek a psi (Hubálek 2000, Hubálek a Halouzka 1996). Izrael roku 1998 zaznamenal 40 % úmrtnost na husích farmách, spojenou i s lidským onemocněním (263 nemocných, 3 mrtví) (Hubálek 2000a).

- Lidské infekce

Lidské onemocnění po nákaze WNV je nazýváno západonilská horečka (WNF). Inkubační doba je 3-6 dní. Charakteristický je prudký nástup horečky trvající 3-5 dní spojený s bolestmi hlavy, v krku, pohybového aparátu, makulopapulózní vyrážkou na trupu a končetinách, únavou, nechutenstvím, nutkání ke zvracení, bolestmi břicha a průjmem. U 15 % případů se objevuje meningismus, encefalitida, zánět jater, slinivky břišní a srdečního svalu. Rekonvalescence bývá u dětí rychlá, zatímco u dospělých bývá často provázena dlouhodobou bolestí svalů a slabostí. Trvalé následky nebývají pozorovány. Mortalita bývá 5-10 % a ohrožuje spíše pacienty starší šedesáti let (Hubálek a Kříž 2003). Kromě přenosu bodnutím komára se virus může přenášet transplantacemi, transfúzemi, a z matky na plod intrauterinně (Julander a kol. 2006). Hlavní sezóna WNF se v mírném pásu omezuje na období červenec-říjen, s maximem v srpnu a v září (Hubálek a Kříž 2003).

Epidemie

- Epidemie v Evropě jsou asociovány s populační explozí komárů *Culex* spp. způsobených povodní a následným teplým a suchým počasím. V urbánních oblastech se jako vektor uplatňuje *Cx. pipiens* biotyp *molestus*. Do roku 1990 byl WNV považován za virus způsobující lehké horečnaté onemocnění u člověka (Rossi a Mason 2008). V posledních patnácti letech způsobil epidemie u koní a lidí s těžšími příznaky a vyšší mortalitou: v Evropě (Rumunsko: 500 nakažených, 10 % mortalita, Rusko: 1000 nakažených, 40 mrtvých; Francie, Itálie), Africe (Alžír, Tunis, Maroko) a Asii (Izrael) (Bakonyi a kol. 2005, Hubálek 2000a, Hubálek a Halouzka 1999, Fredericksen a kol. 2004).
- 1999-2002 se šířil po severoamerickém kontinentě a způsobil tam největší epidemii arbovirové encefalitidy na západní polokouli (Davis a kol. 2004).
- 1997: po povodních byla na Břeclavsku zjištěna akutní infekce virem WNV u tří dospělých a dvou dětí. U dospělých probíhala bez příznaků, u dětí se projevovala horečkami, bolestmi svalů, břicha, nechutenstvím a vyrážkou. Všech 5 osob vykázalo sérokonverzi anebo průkazné zvýšení titru protilátek v párových vzorcích sér. Jedná se o první průkaz lidských případů onemocnění WNV ve střední Evropě (Hubálek a kol. 1999). Další případy byly popsány nedávno v Maďarsku (Bakonyi a kol. 2005).

5.1.2 Srovnání dosavadních údajů o viru West Nile s výsledky mé diplomové práce

K identifikaci izolátu 06-222 jsme použili virus neutralizační mikrotest na buňkách SPEV a VERO. Za techniky vhodné pro identifikaci arbovirů považuje Lennette a kol. (1974) virus neutralizační test, komplement-fixační test a hemaglutinačně-inhibiční test. Z těchto je virus neutralizační test sice nejstarší, ale nejčastěji užívaný, nejspolehlivější, nejsnadněji interpretovatelný a typově nejspecifičtější. Izolát 06-222 byl v neutralizačním testu identifikován jednoznačně jako virus West Nile, přičemž ze dvou použitých imunních sér WNV vykázalo vyšší neutralizační index to, které bylo připraveno proti kmeni 97-103 (WNV-Rabensburg; genomická linie III), nežli sérum připravené proti topotypovému egyptskému kmeni Eg-101 (WNV-Eg) z genomické linie I. Je tedy pravděpodobné, že tento izolát bude mít antigenně blíže k linii WNV-III než linii WNV-I, případně WNV-II. Není však jisté,

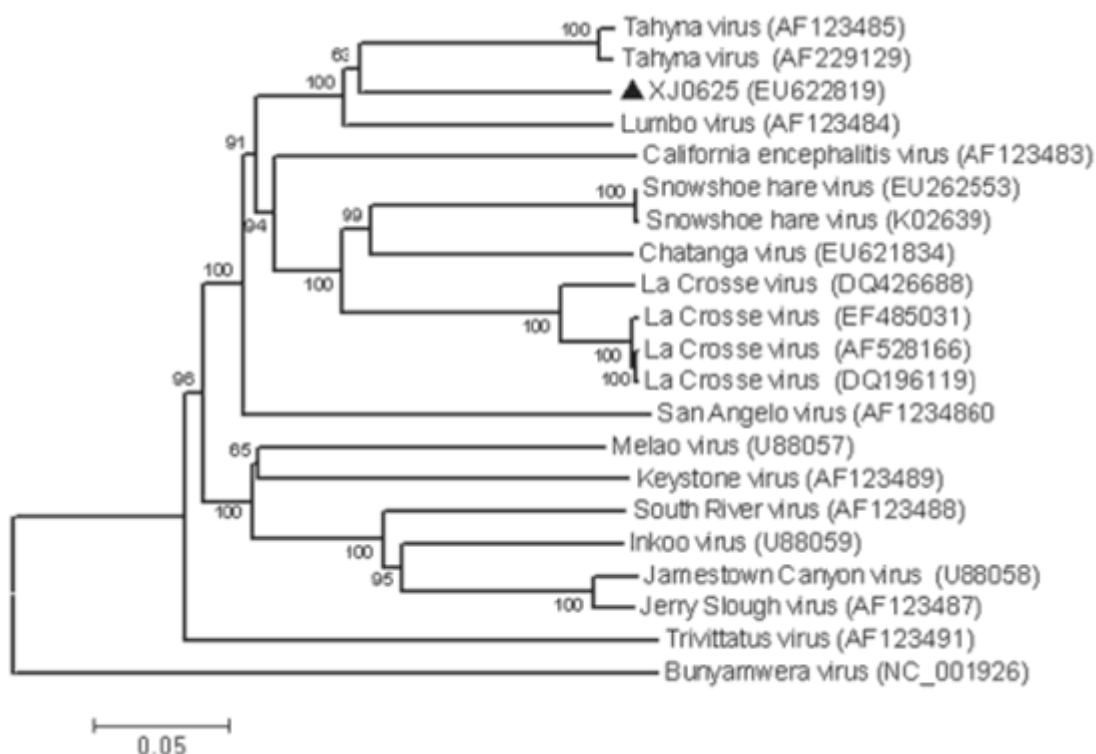
zda nepatří k WNV-II. Definitivní vyhodnocení fylogenetické příbuznosti izolátu a jeho zařazení do určité genomické linie může ovšem poskytnout jen částečná nebo úplná sekvenace jeho genomu.

Pozoruhodné je, že tento virus se nám podařilo izolovat z komára *Ae. rossicus*; pokud je autorce známo, není v našich podmínkách ani v Evropě popsána žádná další izolace z tohoto druhu komára. Hlavním vektorem WNV je *Cx. pipiens pipiens* jehož MIR na jižní Moravě v roce 1997 činila 1:232 (Hubálek a kol. 1999). Ačkoliv my jsme vyšetřili 2 800 jedinců tohoto druhu, žádný virus se nám z nich nepodařilo izolovat. Náš MIR pro *Ae. rossicus* činil 1:1 481 a pro WNV všeobecně 1:9 742. Podle výsledků zjištěných Hubálkem a spolupracovníky (1999) byl MIR pro WNV v roce 1997 pro všechny odchycené komáry všeobecně 1:11 334. V roce 1999 byl MIR pro WNV nižší. Pro *Cx. pipiens* specificky 1:3 546, všeobecně pro všechny druhy komárů 1:14 354 (Hubálek a kol. 2000). Srovnávání zjištěných hodnot MIR je samozřejmě diskutabilní, protože podle autorčina názoru vždy záleží na proporcí cílového druhu komára. V práci Hubálka a spolupracovníků (1999) tvořil *Cx. pipiens pipiens* pouhých 2,05 % vyšetřených komárů. *Oc. cantans*, ze kterého je popsána izolace WNV na Slovensku (Labuda a kol. 1974) byl zastoupen počtem 11 jedinců, *Ae. rossicus* nebyl vyšetřován vůbec, zatímco v naší práci tvořily cílové druhy komárů tj. *Ae. rossicus*, *Cx. pipiens* a *Oc. cantans* dokonce 51,38 % z celkového počtu vyšetřených jedinců. Proto byla podle autorčina názoru šance na záchyt viru nesrovnatelně vyšší než v práci Hubálka a kol. (1999).

V roce 1997 byly protilátky proti WNV nalezeny u 2,1 % osob na Břeclavsku (Hubálek 1999). Otázka, zda tento virus u nás perzistuje, nebo je pravidelně reintrodukován, zůstává stále nejasná. Pokud je ale správné schéma předpokládající reintrodukci, můžeme kvůli nynější zvýšené epidemické aktivitě viru v Africe očekávat také zvýšenou epidemickou aktivitu v Evropě v příštích letech. Navíc se zdá, že v posledních letech virulence WNV stoupá. Epidemie v Rumunsku 1996-1997 s více než 500 případy a mortalitou blížící se 10 % byla největší arbovirovou epidemií v Evropě od roku 1980. Ujistila svět, že arbovirové epidemie mohou probíhat ve velkém měřítku i v mírném pásu. Pokud je teorie globálního oteplování pravdivá a počasí v Evropě se bude měnit na teplejší a vlhčí, může to vést k příchodu nových druhů komárů a ke zvýšení početnosti některých druhů stávajících. Proto je surveillance WNV víc než vhodná (Hubálek a Halouzka 1999).

Druhý virus, který se nám podařilo zachytit dokonce dvakrát, je virus Ťahyňa. Jeho postavení v čeledi *Bunyaviridae* znázorňuje obr. 9.

Obr. 9. Fylogenetický strom skupiny California včetně TAHV založený na kompletní nukleotidové sekvenci M segmentu, přímka znázorňuje genetickou vzdálenost (Lu a kol. 2009).



5.2 Virus Ťahyňa

5.2.1 Obecné informace

Taxonomické zařazení: rod *Orthobunyavirus*. Patří do skupiny virů kalifornské encefalitidy (Hubálek a Halouzka 1996).

Synonyma a první izolace: Jedná se o první virus izolovaný z komárů v Evropě, příbuzný je virus Inkoo vyskytující se ve Finsku (Rosický a Málková 1980). Synonymem jsou viry Lumbo a Trojica (Hubálek a Halouzka 1996). Virus v Evropě poprvé izolovali Bárdoš a Danielová roku 1958, celkem 5 kmenů z komárů *Oc. caspius* (2) a *Ae. vexans* (3) na slovenské lokalitě Ťahyňa (Bárdoš a Danielová 1959). Na jižní Moravě byl poprvé izolován roku 1962 z komárů *Aedes vexans* Kolmanem a kol.(1964).

Dále v 60. a 70 letech minulého století zachytili mnoho kmenů TAHV z komárů na jižní Moravě Danielová a kol. (1966, 1969, 1970, 1972, 1978). V letech 1962-1964 bylo izolováno 16 kmenů viru TAH na lokalitě Drnholec z *Ae. vexans* a 1 na lokalitě Nejdek z *Oc. cantans* (Danielová a kol. 1966). Z krve nemocného člověka byl poprvé izolován Šimkovou a Slukou v roce 1972 na jižní Moravě (Šimková a Sluka 1972) a Bárdošem a kol. (1975a). V roce 1997 bylo na jižní Moravě u Lanžhota izolováno 6 kmenů Hubálkem a kol. (2000) z *Ae. vexans* a *Ae. cinereus*, poté roku 1999 jeden kmen z *Ae. vexans*.

Ekologie:

- Výskyt

Virus se nachází na třech kontinentech: Evropě, Asii a Africe (Lumbo) (Hubálek a Halouzka 1996). Protilátky jsou nacházeny ve většině evropských států, zejména u dospělého obyvatelstva žijícího v oblasti přírodních ohnisek – např. v Německu (10-47 % v okolí středního toku Rýna), severní Itálii, jižní Francii, Rakousku (až 62 %), Maďarsko (až 50 %), (Rosický a Málková 1980, Heinz a kol. 1972, Bárdoš a Sluka 1963).

- Přírodní ohniska viru v ČR

Ohniska viru TAH mají jádro (nucleus), charakteru zaplavovaného luhu, ve kterém se komáři líhnou i po opadnutí vody. Plášť (coat) ohniska tvoří lesy, louky, pole a pastviny, kde se žijí hostitelé viru - savci (Rosický 1969). V Česku se přírodní ohniska TAHV nacházejí na jižní Moravě, Ostravsku, v povodí Vltavy a Ohře, podél Labe (v okolí města Neratovice), na Mostecku (Hubálek a kol. 2004, Málková a kol. 1984). Na severní Moravě byly nalezeny protilátky u 20,6% vyšetřených obyvatel povodí Odry, 10,1% obyvatel na Karvinsku a dokonce 5,5% obyvatel z Beskyd (Heinz a kol. 1972). Na jižní Moravě se jedná zejména o oblast Dyjsko-Svratecké pánve: soutok řek Jevišovka a Dyje, lužní les kolem vesnice Drnholec, Novosedly, Jevišovka, Nejdek, Rakvice, Moravská Nová ves, Kostice, Tvrdonice, okolí Lednice, Pohořelické rybníky, soutok Dyje a Moravy a k němu přiléhající lužní lesy. Lokalita Drnholec je považována za elementární přírodní ohnisko viru na jižní Moravě. Definoval ho a popsal Minář (1969), a detailněji Rosický a Málková (1980). Jedná se o malou plochu lužního lesa obklopenou kultivovanou stepí v přímém kontaktu s lidmi. Komáři zde nacházejí pravidelně potravu a jejich MIR je pravidelně vyšší i v období, kdy v jiných oblastech klesá (Rosický a Málková 1980, Danielová 1992, Danielová a kol. 1976). Přírodní

podmínky vhodné pro vznik tohoto přírodního ohniska TAHV jsou následující: masový výskyt komárů, vnímavá populace hostitelů, suché a teplé klima s mírnými zimami (průměrná roční teplota kolem 9 °C). Oblast je charakteristická v rámci ČR nejnižším ročním množstvím srážek a bouřek. Nedostatek srážek je nahrazován pravidelnými záplavami. K cirkulaci viru napomáhá také chov domácích zvířat (Rosický a Málková 1980).

- Vektoři

Hlavním vektorem tohoto viru je *Ae. vexans*, byl u něj prokázán transovariální přenos (Danielová a Ryba 1979). Virus je v přírodě detekovatelný nepřímo pomocí sérologických přehledů sentinelových zvířat vždy až po vylíhnutí a rozmnožení komárů tohoto druhu (Danielová 1972, Danielová a kol. 1976).

Virus byl dále izolován z komárů: *Ae. cinereus*, *Oc. cantans*, *Oc. caspius*, *Oc. sticticus*, *Oc. communis*, *Oc. dorsalis*, *Oc. excrucians*, *Oc. flavescens*, *Cx. modestus* a *Cs. annulata* (Málková a kol. 1974, Bárdoš 1974, Bárdoš a kol. 1975, Danielová a Holubová 1977, Danielová 1966, 1972a, 1992). A z larev *Cs. annulata*, což potvrzuje transovariální přenos (Bárdoš a kol. 1978, Danielová a Minář 1969).

Dominantními vektory mohou být: *Ae. cinereus* (Málková a Marhoul 1976), *Oc. cantans*. Naopak příležitostnými vektory jsou: ornitofilní *Cx. modestus* a málo početná *Cs. annulata*. Oba hibernují jako imaga, což je důležité epidemiologicky (Danielová a Holubová 1977, Danielová 1992). Virus je schopen se v *Cs. annulata* udržet po 181 dní bez snížení titru (Danielová a kol. 1970). *Oc. caspius* se uplatňuje zejména při přenosu viru mezi domácími zvířaty (Danielová 1992).

- Hostitelé viru

Hostiteli viru jsou nejčastěji zajícovití (řád *Lagomorpha*), zejména zajíci, méně často divocí i domácí králíci. Na jižní Moravě mělo dokonce 55% testovaných zajíců protilátky proti TAHV. Je však vyloučeno, že by v nich virus přezimoval, protože jejich imunitní systém jej eliminuje. Mladé lišky mohou příležitostně přispívat k udržení viru v přírodě, zatímco role srnců a divokých prasat je nejistá. Někteří hibernující obratlovci jako např. ježek, hadi a ještěrky by teoreticky mohli sloužit jako rezervoár viru v zimním období. Z domácích zvířat jsou neamplifikujícími hostiteli viru zřejmě koně, prasata, dobytek, králíci a drůbež (Rödl a kol. 1979, Minář 1969a, Bárdoš 1975, Hubálek a kol. 1993, Danielová a kol. 1969, Rosický a Málková 1980, Halouzka a kol. 2008). Ptáci se jako amplifikující hostitelé viru neuplatňují, ačkoliv u nich byly nalezeny protilátky (Juřicová a kol. 1987, Hubálek a Halouzka 1996, Rosický a

Málková 1980). Experimentální virémie byla prokázána u *Citellus citellus*, *Glis glis*, *Ondatra zibethicus*, *Sciurus vulgaris*, *Martes foina*, *Putorius evermanni*, *Vulpes vulpes*, *Meles meles*, *Vespertilio murinus* a selat (Hubálek a Halouzka 1996, Bárdoš 1975, Rödl a kol. 1977, 1987).

Patogenita:

- Onemocnění zvířat

U divokých zvířat není onemocnění známé (Hubálek 2000). Podařilo se experimentálně nakazit 4 z 5 šimpanzů při expozici infikovaným komárům *Cs. annulata*, nikoliv při vdechování aerosolu (Rosický a Málková 1980).

- Lidské infekce

Virus Ťahyňa je nejvýznamnější lidský patogen mezi komáry přenášenými virem u nás (Januška 1990). Způsobuje „valtickou horečku“ s příznaky podobnými chřipce a inkubační dobou 1-2 dny. Onemocnění je provázeno celkovou slabostí, bolestmi hlavy, svalů a kloubů, faryngitidou, příznaky meningeálního dráždění, gastrointestinálními obtížemi, ztrátou chuti k jídlu, nauzea až vomitus. Trvá většinou 3-8 dnů a má sezónní charakter, související s výskytem přenašečů v přírodě (květen-září). Lidé jsou infikováni TAHV často, ale většina nálezů probíhá inaparentně nebo s nevýraznou klinickou odezvou. Nejvyšší procento séropozitivních osob je nalézáno v oblastech s kalamitním přemnožením komárů např. na jižní Moravě, 30-60% mezi dospělým obyvatelstvem. Rozdílů jsou i mezi profesemi, u pracovníků v zemědělství, lesnictví, rybářství dochází k nákaze častěji. Prevalence je závislá na věku, u starších osob je vyšší procento promořenosti (Januška a kol. 1990, Sluka 1969).

- Epidemie

TAHV působí lidská onemocnění ve větší části Evropy a v Asii (Lu a kol. 2009). V ČR připadá nejvyšší incidence tohoto onemocnění právě na jižní Moravu (Rosický a Málková 1980). První případ „valtické horečky“ byl zdokumentován roku 1960 ve valtické nemocnici, odtud název onemocnění (Sluka 1969). Přinejmenším 200 případů bylo zdokumentováno na Slovensku a na Moravě od roku 1963 (Hubálek a Halouzka 1996). Některé uvádím v Tab. 7.

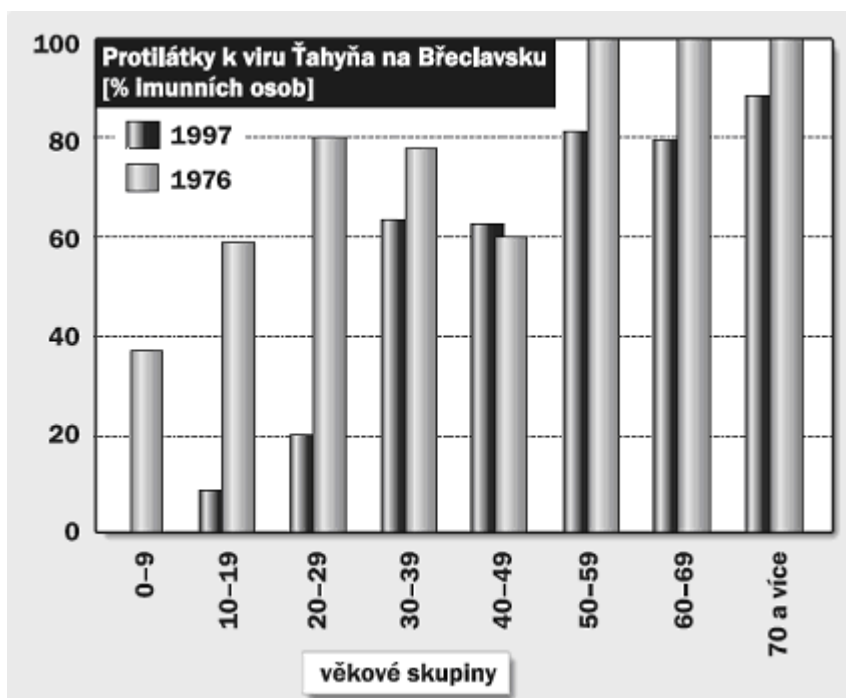
Tab.7. Přehled případů valtické horečky v Česku a na Slovensku.

Rok	Místo	Počet nemocných + příznaky	Zdroj
1960	ČR, Valtice	8; chřipkovitá forma	(Bárdoš a Sluka 1963)
1960- 1964	ČR, Valtice	58; 23 chřipkovitá forma, 17 plicní forma, 6 revmatická forma, 6 abdominální forma, 2 forma napadající CNS	(Sluka 1969)
1969- 1972	ČR jižní Morava	35; 25 chřipkovitá forma, 8 bronchopneumonie, 2 meningitida	(Rosický a Málková 1980).
1970	ČR, Ostrava	6; případů aseptické meningitidy	(Heinz a kol. 1972)
1974 - 1975	ČR,	9; chřipkovité + zasažení CNS, 2 izolace z krve	(Bárdoš a kol. 1980), (Bárdoš a kol. 1975a)
1976	ČR	VTAH způsobil 15 % letních horečnatých onemocnění dětí	(Hubálek a kol. 1979)
2002	ČR, jižní Morava	1; protilátky nalezeny u 16 % ze 497 osob	(Hubálek a kol. 2005)
1961- 1962	SR	12; chřipkovitá forma, případně myalgie a konjunktivitida	(Mittermayer a kol. 1964)
1962- 1963	SR	8; chřipkovitá forma	(Mayerová a kol. 1966)

5.2.2 Srovnání dosavadních údajů o viru Ťahyňa s výsledky mé diplomové práce

Na obr. 10 je vidět srovnání protilátek proti TAHV v letech 1976 a 1997. Z grafu lze vyčíst, že v roce 1997 byly protilátky nalezeny u menšího počtu osob a především u starší generace. Počet mladších osob, které se s virem již setkaly, výrazně poklesl.

Obr. 10. Protilátky k viru Ťahyňa na Břeclavsku po povodni v roce 1997 (Hubálek 1999).



Hubálek a kol. (1999) zjistili, že v uplynulých 19-23 letech byla aktivita ohniska na Břeclavsku nízká. Důvodem byly zajisté vodohospodářské úpravy dolního toku Dyje, které zabraňují častým inundacím a způsobily pokles hladiny spodní vody o 1 m, čímž došlo k vysušení niv a poklesu populací komárů. Rosický a Danielová (1980) uvádí jako důvod poklesu aktivity TAHV na jižní Moravě rozsáhlé eradikace komárů použitím insekticidů včetně DDT, které probíhaly během let 1961-1977 a epidemii myxomatózy, která zdecimovala populaci divokých králíků. Dále se zmenšil počet zvířat i lidí pracujících na polích a v lese, došlo k přesunu roztroušených chovů zvířat do velkých chovných jednotek a ke kácení lesa kvůli rekreačním účelům. S tímto zjištěním korespondují i výsledky mé diplomové práce. Nalezený MIR pro *Ae. vexans* byl 1:1 877, tedy o něco nižší než MIR udávaný Danielová (1992) který se na jižní Moravě v letech 1962-1975 byl v průměru činil 1:1 685.

MIR v roce 1997 podle Hubálka a kol. (1999) byl pro *Ae. vexans* 1:1 820, což je číslo velmi blízké tomu mému. Pro všechny vyšetřené komáry byl MFIR v roce 1997 1:1 889. Mnou zjištěný MFIR pro všechny vyšetřené komáry byl mnohem nižší, pouze 1:4 871. To odpovídá všeobecnému názoru, že se aktivita ohniska na jižní Moravě snižuje.

Na našem území jsou popsány izolace viru TAH z následujících komárů: *Ae. vexans*, *Ae. cinereus*, *Oc. cantans*, *Oc. caspius*, *Oc. sticticus*, *Oc. communis*, *Oc. dorsalis*, *Oc. excrucians*, *Oc. flavescens*, *Cx. modestus* a *Cs. annulata* (Málková a kol. 1974, Danielová a Holubová 1977, Danielová 1966, Danielová 1992, Málková a kol. 1984). Nám se podařilo virus 2x izolovat z *Ae. vexans*, který je všeobecně považován za nejdůležitějšího přenašeče viru, ačkoliv *Oc. cantans* dosahuje v některých sezónách vyšší hodnot MIR kvůli své experimentálně zjištěné vyšší schopnosti přenést virus. *Ae. vexans* však má nízkou prahovou hodnotu infekce a může se nakazit i na hostitelích tvořících nízké hladiny virémie (Danielová 1992).

Dlouhodobý výzkum přírodního ohniska viru na jižní Moravě v 60. letech prokázal, že infekční je 0,01-0,4 % komáří populace v závislosti na druhu komára, lokalitě, sezóně a roku. To znamená, že infekční je 1 z 250-10 000 samic komára v této oblasti (Hubálek 1999). Podle mých výsledků jsou infekční minimálně 2 samičky z necelých 10 000 komárů v oblasti odchyty.

TAHV patří do čeledi *Bunyaviridae*. Bunyaviry jsou známé svou genetickou reasortací mezi svými třemi genomovými segmenty a to i při smíšené infekci ve vektorovi (Hubálek a Halouzka 1996). Důkazem této genetické reorganizace je např. virus Ngari, reasortant S, L segmentu z viru skupiny Bunyamwera a M segmentu viru Batai, zodpovědný za epidemii hemoragické horečky ve východní Africe v letech 1997-1998. Čeleď obsahuje 330 virů a má obrovský potenciál pro vznik různých emergentních nálezů přenášených členovci (Gerrard a kol. 2004, Yanase a kol. 2006, Briese a kol. 2006). Zdá se, že kdyby nebylo geografických a ekologických bariér, jednalo by se o jeden genový pool, který mezi sebou může volně hybridizovat (Iroegbu a Pringle 1981). Také WHO varuje před podceňováním infekce virem TAH pro jeho značný emergentní potenciál a v Evropě hojně rozšířené přenašeče (Quinan a kol. 2008). Nakonec nedávná epidemie v Číně, spojená s meningitidami a pneumoniemi by měla být důrazným varováním před nebezpečím, které tento virus představuje (Lu a kol. 2009).

Posledním překvapením, které tato práce přinesla, je skutečnost, že se viry podařilo izolovat jen z komárů nasbíraných v roce 2006, zatímco z komárů nasbíraných během let 2007 a 2008 se nám nepodařilo žádný virus získat, ačkoliv tvoří nadpoloviční většinu z celkového počtu odchycených komárů. Na tuto skutečnost jsem nenalezla žádné uspokojivé vysvětlení. Zvažovali jsme hypotézu, že díky suchu bylo v letech 2007-2008 málo komárů, ale hlavního vektora TAHV (*Ae. vexans*), jsme vyšetřili

v roce 2006 913, v roce 2007 352, zatímco v roce 2008 celkem 2491, tedy daleko nejvíc. Tato otázka proto nadále zůstává otevřená, je možné, že odpověď by mohla souviset s vyhasínáním aktivity přírodního ohniska valtické horečky na jižní Moravě.

6 ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo vyšetřeno 202 komářích suspenzí, zahrnujících celkem 9 742 komářích samiček třinácti druhů. Z těchto komárů byly vyizolovány tři virové kmeny, z nichž dva byly virus neutralizačním mikrotestem identifikovány jako virus Ťahyňa a jeden jako virus West Nile. Žádný další virus se nám zachytit nepodařilo.

Srovnáním s literaturou vyšlo najevo, že aktivita ohniska viru Ťahyňa na jižní Moravě se pravděpodobně v posledních letech snižuje. Odpověď na otázku, zda virus West Nile u nás trvale cirkuluje, nebo zda je k nám periodicky zanášen tažnými ptáky zůstává předmětem dalšího bádání.

Fakt, že se nám z téměř deseti tisíc komárů podařilo vyizolovat tři virové kmeny by měl být důkazem, že surveillance virových vektorů na jižní Moravě je i nadále potřebná. Tento fakt potvrzuje i práce, zmiňující se o viru Ťahyňa jako možném agens epidemie v Číně, kde došlo k nákaze několika stovek obyvatel provázené závažnými symptomy jako je pneumonie a zasažení nervové soustavy.

U viru West Nile se v poslední době zdá, že se příznaky u epidemií způsobených tímto virem v Evropě zhoršují a na našem území se jeho záchyt pomalu stává pravidlem. Proto by bylo vhodné v jeho surveillanci i nadále pokračovat.

Tato práce splnila cíle, které si kladla před započítím, a přinesla aktuální pohled na problematiku virů přenášených komáry vyskytujících se na jižní Moravě.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Bakonyi T., Hubálek Z., Rudolf I., Nowotny N. (2005): Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 225-231.
- Bárdoš V. (1965): O ekológii arbovírusov v Československu. Vydav. SAV, Bratislava. 200 s.
- Bárdoš V. (1974): Recent state of knowledge of Ťahyňa virus infections. *Folia Parasitol.* 21: 1-10.
- Bárdoš V. (1975): The role of mammals in the circulation of Ťahyňa virus. *Folia Parasitol.* 22: 257-264.
- Bárdoš V., Danielová V. (1959): The Ťahyňa virus – a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J. Hyg. Epidem.* 3: 264-276.
- Bárdoš V., Čupková E. (1962): The Čalovo virus – the second virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J. Hyg. Epidem.* 6: 186-192.
- Bárdoš V., Sluka F. (1963): Akútne infekcie ľudí vyvolané vírusom Ťahyňa. *Čas. Lék. čes.* CII: 394-402.
- Bárdoš V., Sluka F., Čupková E. (1969): Serological study on the medical importance of Čalovo virus. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 333-335. Vydav. SAV, Bratislava.
- Bárdoš V., Ryba J., Hubálek Z. (1975): Isolation of Ťahyňa virus from field-collected *Culiseta annulata* (Schrk.) larvae. *Acta Virol.* 19: 446.
- Bárdoš V., Medek M., Kania V., Hubálek Z. (1975a): Isolation of Ťahyňa virus from the blood of sick children. *Acta Virol.* 19: 447.
- Bárdoš V., Ryba J., Hubálek Z., Olejníček J. (1978): Virological examination of mosquito larvae from Southern Moravia. *Folia Parasitol.* 25: 75-78.
- Bárdoš V., Medek M., Kania V., Hubálek Z., Juřicová Z. (1980): Das klinische Bild der Tahyna-virus (California-gruppe)-Infektionen bei Kindern. *Pädiat. Grenzgeb.* 19: 11-23.
- Briese T., Bird B., Kapoor V., Nichol S.T., Lipkin W.I. (2006): Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J. Virol.* 80: 5627-5630.

- Calisher C.H (1983): Taxonomy, classification, and geographic distribution of California serogroup bunyaviruses. In Calisher C.H, Thompson W.H (ed.), California serogroup viruses, 1-16. Alan R. Liss, New York.
- Calisher C.H., Lazuick J.S., Wolff K.L., Muth D.J. (1984): Antigenic relationship among Turlock serogroup Bunyaviruses as determined by neutralization tests. *Acta Virol.* 28: 148-151.
- Danielová V. (1962): Multiplication dynamics of Ťahyňa virus in different body parts of *Aedes vexans* mosquito. *Acta Virol.* 6: 227-230.
- Danielová V. (1966): The relation of the virus Ťahyňa to some species of mosquitoes of the genera *Aedes*, *Culex* and *Anopheles*. *Folia Parasitol.* 13: 97-102.
- Danielová V. (1968): Penetration of the Ťahyňa virus to various organs of the *Aedes vexans* mosquito. *Folia Parasitol.* 15: 87-91.
- Danielová V. (1972): To the seasonal occurrence of the virus Ťahyňa. *Folia Parasitol.* 19: 189-192.
- Danielová V. (1972a): The vector efficiency of *Cs. annulata* mosquito in relation to Ťahyňa virus. *Folia Parasitol.* 19: 250-262.
- Danielová V. (1984): To the problem of the vector of Lednice virus. *Folia Parasitol.* 31: 379-382.
- Danielová V. (1992): Relationship of mosquitoes to Ťahyňa virus as determinant factors of its circulation in nature. *Studie ČSAV (Academia, Praha) č.3:* 1-102.
- Danielová V., Hájková Z., Kolman J.M., Málková D., Minář J., Smetana A. (1966): Výsledky virologického šetření komárů na jižní Moravě v letech 1962-1964. *Čs. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 15: 178-183.
- Danielová V., Minář J., Rosický B. (1968): Experimental survival of the virus Ťahyňa in hibernating mosquitoes *Theobaldia annulata*. *Folia Parasitol.* 15: 183-187.
- Danielová V., Kolman J.M., Málková D., Marhoul Z., Smetana A. (1969): Natural focus of Ťahyňa virus in South Moravia. Results of virological investigation. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 147-150. Vydav. SAV, Bratislava.
- Danielová V., Minář J. (1969): Experimental overwintering of the virus Ťahyňa in mosquitoes *Culiseta annulata* (Schrk.) (*Diptera, Culicidae*). *Folia Parasitol.* 16: 285-289.
- Danielová V., Minář J., Ryba J. (1970): Isolation of Ťahyňa virus from mosquitoes *Culiseta annulata*. *Folia Parasitol.* 17: 281-284.

- Danielová V., Hájková Z., Minář J., Ryba J. (1972): Virological investigation of mosquitoes in different seasons of the year at the natural focus of the Ťahyňa virus in Southern Moravia. *Folia Parasitol.* 19: 25-31.
- Danielová V., Málková D. (1976): Studies on viremia and antibody formation in ducklings and goslings after experimental infection with Lednice (Yaba 1) virus. *Folia Parasitol.* 23: 367-372.
- Danielová V., Málková D., Minář J., Ryba J. (1976): Dynamics of the natural focus of Ťahyňa virus in Southern Moravia and species succession of its vectors, the mosquitoes of the genus *Aedes*. *Folia Parasitol.* 23: 243-249.
- Danielová V., Holubová J. (1977): Two more mosquito species proved as a vectors of Ťahyňa virus in Czechoslovakia. 24: 187-189.
- Danielová V., Málková D., Minář J., Rehse-Küpper, Hájková Z., Halgoš J., Jedlička L. (1978): Arbovirus isolation from mosquitoes in South Slovakia. *Folia Parasitol.* 25: 187-191.
- Danielová V., Ryba J. (1979): Laboratory demonstration of transovarial transmission of Ťahyňa virus in *Aedes vexans* and the role of this mechanism in overwintering of this arbovirus. *Folia Parasitol.* 26: 361-366.
- Davis C.T., Beasley D.W.C., Guzman H., Siirin M., Parsons R.E., Tesh R.B., Barrett A.D.T. (2004): Emergence of attenuated West Nile virus variants in Texas, 2003. *Virology.* 330: 342-350.
- Doyle A., Griffiths J.B. (1998): *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology.* John Wiley & Sons, Chichester. 332 p.
- Ernek E., Kožuch O., Grešíková M., Nosek J., Sekeyová M. (1973): Isolation of Sindbis virus from the reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) in Slovakia. *Acta Virol.* 17: 359-361.
- Ernek E., Kožuch O., Nosek J., Labuda M. (1973/1974): Evidence for circulation of Sindbis virus and other arboviruses by using sentinel animals in Western Slovakia. *Intervirology.* 2: 186-192.
- Fredericksen B.L., Smith M., Katze M.G., Shi P.Y., Gale M.J. (2004): The host response to West Nile virus infection limits viral spread through the activation of the interferon regulatory factor 3 pathway. *J. Virol.* 78: 7737-7747.
- Freshney R.I. (2005): *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Techniques.* Wiley-Liss, Hoboken N.J. 642 p.

- Gerrard S.R., Li L., Barrett A.D., Nichol S.T. (2004): Ngari virus is a bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J. Virol.* 78: 8922-8926.
- Grešíková M., Sekeyová M., Prazniaková E. (1975): Isolation and identification of group B arboviruses from the blood of birds captured in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 19: 162-164.
- Grešíková M., Nosek J. (1981): *Arbovírusy v Československu*. Vydav. SAV, Bratislava. 140 s.
- Hájková Z. (1966): A study of gonotrophic cycles of the mosquito *Aedes vexans* Meig. in South Moravia. *Folia Parasitol.* 13: 361-370.
- Hájková Z. (1969): The age and repeated blood-feeding of mosquitoes in the natural focus of Ťahyňa virus. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 155-158, Vydav. SAV, Bratislava.
- Hájková Z., Minář J. (1970): Bionomy of mosquitoes (*Diptera, Culicidae*) in the inundated region of Southern Moravia. *Folia Parasitol.* 17: 239-256.
- Halouzka J., Juřicová Z., Janková J., Hubálek Z. (2008): Serologic survey of wild boars for mosquito-borne viruses in South Moravia (Czech Republic). *Vet. Med.* 53: 266-271.
- Harley D., Sleigh A., Ritchie S. (2001): Ross River virus transmission, infection and disease: a cross-disciplinary review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 909-932.
- Heinz F., Herzig P., Ašmera J., Gawlas W., Šeděnka B. (1972): Příspěvek k otázce epidemiologického a klinického významu viru Ťahyňa v podmínkách Severomoravského kraje. *Čs. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 21: 149-158.
- Hubálek Z. (1999): Viry přenášené komáry. Ohlédnutí za povodní roku 1997 na jižní Moravě. *Vesmír.* 78: 432-434.
- Hubálek Z. (2000): *Mikrobiální zoonózy a sapronózy*. Masarykova univerzita, Brno. 153 s.
- Hubálek Z. (2000a): European experience with the West Nile virus ecology and epidemiology: Could it be relevant for the New World? *Viral Immunol.* 11: 415-426.
- Hubálek Z. (2008): Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol. Res.* 103: S29-S43.
- Hubálek Z., Bárdoš V., Medek M., Kania V., Krychler L., Jelínek E. (1979): Ťahyňa virus-neutralizační protilátky pacientů na jižní Moravě. *Čs. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 28: 87-96.

- Hubálek Z., Juřicová Z., Svobodová Š., Halouzka J. (1993): A serologic survey for some bacterial and viral zoonosis in game animals in the Czech Republic. *J. Wildl. Dis.* 29: 604-607.
- Hubálek Z., Halouzka J. (1996): Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Acta Sc. Nat. Brno.* 30: 95 p.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z., Šebesta O. (1998): First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol.* 42: 119-120.
- Hubálek Z., Halouzka J. (1999): West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5: 643-650.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z., Příkazský Z., Žáková J., Šebesta O. (1999): Surveillance virů přenosných komáry na Břeclavsku v povodňovém roce 1997. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 48: 91-96.
- Hubálek Z., Savage H.M., Halouzka J., Juřicová Z., Sanogo Y.O., Lusk S. (2000): West Nile virus investigations in South Moravia, Czechland. *Viral Immunol.* 13: 427-433.
- Hubálek Z., Kříž B. (2003): Západonilská horečka. *Klin. mikrobiol. inf. lék.* 9: 59-68.
- Hubálek Z., Zeman P., Halouzka J., Juřicová Z., Šťovíčková E., Bálková H., Šikutová S., Rudolf I. (2004): Protilátky k virům přenosným komáry u středočeské populace z oblasti zasažené povodní v roce 2002. *Epidem. Mikrobiol. Imunol.* 53: 112-120.
- Hubálek Z., Zeman P., Halouzka J., Juřicová Z., Šťovíčková E., Bálková H., Šikutová S., Rudolf I. (2005): Mosquitoborne viruses, Czech Republic, 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 116-118.
- Hubálek Z., Halouzka J., Juřicová Z., Šikutová S., Rudolf I., Honza M., Janková J., Chytil J., Marec F., Sitko J. (2008): Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in Southern Moravia (Czech Republic). *Vector-Borne Zoonot. Dis.* 8: 659-666.
- Iroegbu C.U., Pringle C.R. (1981): Genetic interactions among viruses of the Bunyamwera complex. *J. Virol.* 37: 383-394.
- Januška J., Daneš L., Heinz F. (1990): Laboratorní vyšetřovací metody arbovirových nákaz a virových nákaz šířených hlodavci, Avicenum, Praha. 143 s.
- Jelínková A., Málková D., Holubová J., Novák M. (1980): Electron microscopy of Lednice virus in chick embryo cells. *Acta Virol.* 24: 76-78.

- Julander J.G., Winger Q.A., Rickords L.F., Shi P.Y., Tilgner M., Bidunga-Gajewska I., Sidwell R.W., Morrey J.D. (2006): West Nile virus infection of the placenta. *Virology*. 347: 175-182.
- Juřicová Z., Mitterpák J., Prokopič J., Hubálek Z. (1986): Circulation of mosquito-borne viruses in large-scale sheep farms in Eastern Slovakia. *Folia Parasitol.* 33: 285-288.
- Juřicová Z., Hubálek Z., Halouzka J., Pellantová J., Chytil J. (1987): Haemagglutination-inhibiting antibodies against arboviruses of the families *Togaviridae* and *Bunyaviridae* in birds caught in Southern Moravia, Czechoslovakia. *Folia Parasitol.* 34: 281-284.
- Kazdová K. (2007): Přehled významných virů přenášených komáry. Bakalářská práce, PřF MU Brno, 59 s.
- Kohl A., Hart T.J., Noonan C., Royall E., Robert L.O., Elliott R.M. (2004): A Bunyamwera virus minireplicon system in mosquito cells. *J. Virol.* 78: 5679-5685.
- Kolman J.M. (1974): Serological examination of a sample of human population and some animal species for the presence of antibodies to Yaba 1 virus. *Folia Parasitol.* 21:160.
- Kolman J.M., Málková D., Němec A., Smetana A., Hájková Z., Minář J. (1964): The isolation of the Ťahyňa virus from the mosquito *Aedes vexans* in Southern Moravia. *J. Hyg. Epidem.* 12: 380-386.
- Kolman J.M., Folk Č., Hudec K., Reddy G.N. (1976): Serologic examination of birds from the area of Southern Moravia for the presence of antibodies against arboviruses of the groups Alfa, Flavo, Uukuniemi, Turlock and Bunyamwera supergroup. II. Wild living birds. *Folia Parasitol.* 23: 251-255.
- Kolman J.M., Kopecký K., Rác O. (1979): Serologic examination of human population in South Moravia (Czechoslovakia) on the presence of antibodies to arboviruses of the *Alfavirus*, *Flavivirus*, Turlock groups and Bunyamwera supergroup. *Folia Parasitol.* 26: 55-60.
- Kožuch O., Labuda M., Nosek J. (1978): Isolation of Sindbis virus from the frog *Rana ridibunda*. *Acta Virol.* 22: 78.
- Kuno G., Chang G.J.J. (2005): Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 608-637.

- Labuda M., Kožuch O., Grešíková M. (1974): Isolation of West Nile virus from *Aedes cantans* mosquitoes in West Slovakia. *Acta Virol.* 18: 429-433.
- Labuda M., Kožuch O. (1982): Ťahyňa virus in the districts of Bratislava. *Acta Virol.* 26: 407.
- Labuda M., Kožuch O. (1989): Amplification of arbovirus transmission by mosquito intradermal probing and interrupted feeding. *Acta Virol.* 33: 63-67.
- Lennette E.H., Schmidt N.J. a kol. (1974): Laboratorní vyšetřovací metody virových a rickettsiálních nákaz. Avicenum. Praha. 592 s.
- Leško J., Veber P., Hána L. (1975): Práce s tkanivovými kultúrami. Veda - vydav. SAV. Bratislava. 212 s.
- Lu Z., Lu X.J., Fu S.H., Zhang S., Li Z.X., Yao X.H., Feng Y.P., Lambert A.J., Ni D.X., Wang F.T., Tong S.X., Nasci R.S., Feng Y., Dong Q., Zhai Y.G., Gao X.Y., Wang H.Y., Tang Q., Liang G.D. (2009): Ťahyňa virus and human infection, China. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 306-309.
- Lundstrom J.O. (1999): Mosquito-borne viruses in Western Europe: A review. *J. Vector Ecol.* 24: 1-39.
- Málková D. (1980): Experimental infection of hedgehogs, hamsters, rabbits and ferrets with the virus Lednice. *Folia Parasitol.* 27: 69-70.
- Málková D., Danielová V., Minář J., Rosický B., Casals J. (1972): Isolation of Yaba 1 arbovirus in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 16: 93.
- Málková D., Danielová V., Minář J., Ryba J. (1974): Virological investigations of the mosquitoes in some biotopes of Southern Moravia in summer season 1972. *Folia Parasitol.* 21: 363-372.
- Málková D., Marhoul Z. (1976): Influence of temperatures corresponding to those of the host animals on Ťahyňa virus. *Acta Virol.* 20: 486-493.
- Marhoul Z., Danielová V., Holubová-Krobová J., Málková D. (1976): Cultivation of Lednice (Yaba-1) virus in goose, duck and chick embryo cells. *Acta Virol.* 20: 499-505.
- Málková D., Danielová V. (1977): Experimental infection of pheasants with Lednice (Yaba 1) virus. *Folia Parasitol.* 24: 382-384.
- Málková D., Danielová V. (1978): Experimental infection of chickens with Lednice (Yaba 1) virus. *Folia Parasitol.* 25: 255-256.

- Málková D., Holubová J., Marhoul Z., Černý V., Hájková Z., Rödl P. (1984): Průzkum arbovirů na Mostecku v letech 1981-1982. Izolace viru Ťahyňa. Čs. Epidem. Mikrobiol. Imunol. 33: 88-96.
- Málková D., Danielová V., Holubová J., Marhoul Z. (1986): Less Known Arboviruses of Central Europe. Rozpravy ČSAV, ř. mat. přír. věd 96(5): 1-75.
- Mayerová A., Hružík J., Mayer V. (1966): Významný vzostup protilátok, neutralizujúcich virus Ťahyňa u osôb s klinickou diagnózou „akútne horúčnaté ochorenie“. Čs. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 15: 48-53.
- Minář J. (1969a): Food sources of some mosquito species in the natural focus of Ťahyňa virus in Southern Moravia. Folia Parasitol. 16: 81-92.
- Minář J. (1969): Natural focus of the Ťahyňa virus in South Moravia: ecological investigation of mosquitoes. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group, 139-145. Vydav. SAV, Bratislava.
- Minář J., Hájková Z. (1966): Knowledge on the hibernation of mosquitoes in our territory, especially in South Moravia. Folia Parasitol. 13: 237-247.
- Minář J., Halgoš J. (1997): *Culicidae* (Komárovití). In Chvála M. (ed.), Checklist of Diptera (Insecta) of Czech and Slovak Republic, 34. Charles University Press, Praha.
- Mittermayer T., Bilčíková M., Jašš J., Tarabčák M. (1964): Klinické prejavy infekcií vyvolaných vírusom Ťahyňa u ambulantných pacientov na východnom Slovensku. Bratis. Lek. Listy 44: 636-639.
- Poidinger M., Roy A.H., Mackenzie J.S. (1996): Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the *Flavivirus* genus. Virology 218: 417-421.
- Quinan B.R., Magalhaes C.L. de Brito, Novaes R.F.V., dos Santos J.R., Kroon E.G., Bonjardim C.A., Ferreira P.C.P. (2008): Sequence and phylogenetic analysis of the large (L) segment of the Ťahyňa virus genome. Virus Genes 36: 435-437.
- Rödl P., Bárdoš V., Hubálek Z., Juřicová Z. (1977): Experimental infection of foxes with Ťahyňa virus. Folia Parasitol. 24: 373-376.
- Rödl P., Bárdoš V., Ryba J. (1979): Experimental transimission of Ťahyňa virus (California group) to wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) by mosquitoes. Folia Parasitol. 26: 61-64.

- Rödl P., Bárdoš V., Hubálek Z. (1987): Experimental infection of the squirrel (*Sciurus vulgaris*) and the muskrat (*Ondatra zibethicus*) with Ťahyňa virus. *Folia Parasitol.* 34: 189-191.
- Rosický B. (1969): On the ecology of arboviruses of the California complex and the Bunyamwera group. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 99-105. Vydav. SAV, Bratislava.
- Rosický B. (1976): National surveillance of vectors and animal reservoirs. *Folia Parasitol.* 23: 1-14.
- Rosický B., Málková D. (1980): Ťahyňa virus natural focus in Southern Moravia. *Rozpravy ČSAV, ř. mat. přír. věd* 90(7): 1-107.
- Rossi S.L., Mason P.W. (2008): Persistent infections of mammals and mammalian cell cultures with West Nile virus. *Future Virol.* 3: 25-34.
- Sedlák E. (2006): *Zoologie bezobratlých*. Masarykova Univerzita, Brno. 337 s.
- Sluka F. (1969a): The clinical picture of the Čalovo virus infection. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 337-339. Vydav. SAV, Bratislava.
- Sluka F. (1969): The clinical picture of the Ťahyňa virus infection. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 311-314. Vydav. SAV, Bratislava.
- Smetana A., Danielová V., Kolman J.M., Málková D., Minář J. (1967): The isolation of the Čalovo virus from the mosquitoes of the group *Anopheles maculipennis* in Southern Moravia. *J. Hyg. Epidem.* 11: 55-59.
- Snow K.R., Ramsdale C.D. (2003): A revised checklist of European mosquitoes. *Eur. Mosq. Bull.* 15: 1-5.
- Sudia W.D., Newhouse V.F., Calisher C.H., Chamberlain R.W. (1971): California group arboviruses: isolation from mosquitoes in North America. *Mosq. News* 31: 576-600.
- Šebesta O., Hubálek Z. (2004): Komáři - fenomén lužního lesa. In Hrib (ed.) *Lužní les v Dyjsko-moravské nivě*, 335-343. Moraviapress, Břeclav.
- Šefčovičová L. (1969): Cytopathic activity of viruses – members of Californian complex – in Green monkey kidney cells. In Bárdoš V. and co-workers (ed.), *Arboviruses of the California Complex and Bunyamwera Group*, 65-69. Vydav. SAV, Bratislava.

- Šimková A., Sluka F. (1972): Demonstration of human infection in the natural focus of the Valtice fever. *Folia Parasitol.* 19: 358.
- Theiler M., Downs W.G. (1970): *The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates*, Yale Univ. Press, New Haven and London. 578 p.
- Votava M., Černohorská L., Heroldová M., Holá V., Mezlíková L., Ondrovčík P., Růžička F., Dvořáčková M., Woznicová V., Zahradníček O. (2003): *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, Brno. 495 s.
- Yanase T., Kato T., Yamakawa M., Takayoshi K., Nakamura K., Kokuba T., Tsuda T. (2006): Genetic characterization of Batai virus indicates a genomic reassortment between orthobunyaviruses in nature. *Arch. Virol.* 151: 2253-2260.