

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **Bakalářská práce**

**2014**

**Jana Müllerová**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **Výskyt arbovirů v Grónsku a na Svalbardu**

Bakalářská práce

**Jana Müllerová**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Jiří Černý

České Budějovice 2014

Müllerová J., 2014: Výskyt arbovirů v Grónsku a na Svalbardu [The occurrence of arboviruses in Greenland and Svalbard. Bc. Thesis, in Czech.], Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

**Anotace:**

Arboviruses are a large polyphyletic group of viruses sharing the same ecological niche being transmitted from arthropods vectors to vertebrates hosts. They are important human and animal pathogens, especially in tropical and temperate zones, but their are still neglected in polar areas, despite it was proven that polar arboviruses may be pathogenic to humans. Our research was focused on monitoring of arboviruses in north Atlantic areas. We screened mosquito *Aedes nigripes* from Greenland, the nymphs and adults of tick *Ixodes uriae* from Svalbard archipeago (Kaaq Kalthof, (Bjørnøy), Ossian Sarsfjellet (Spizbergen), and from the island of Jan Mayen. We tested these samples for the presence of arboviruses from the families *Bunyaviridae* (genus Orthobunyavirus, Phlebovirus), *Reoviridae* (genus Orbivirus), *Flaviviridae* (genus Flavivirus), *Togaviridae* (genus Alphavirus).

**Práce byla finančně podpořena granty:**

MŠMT Z60220518, AdmireVet ED006/01/01

GAČR 585410/3155, GAP 302/12/2490

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích

Datum: .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Nejprve bych ráda poděkovala svému školiteli – specialistovi Mgr. Jiřímu Černému za jeho pomoc, odborné rady, konzultace a hlavně vřelý přístup v průběhu celé mé bakalářské práce. Další dík patří mému školiteli a vedoucímu Laboratoře arbovirologie doc. RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D., za umožnění pracovat právě v této laboratoři. Tím také děkuji všem pracovníkům a studentům, obzvláště Mgr. Janě Elsterové za přátelské přijetí, výpomoc v nesnázích, skvělou spolupráci a zaučení při práci v laboratoři. Další poděkování patří prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc za možnost pracovat právě na tomto projektu a poskytnutí prostředků pro mou práci. Dále bych ráda poděkovala Dr. Stevenu Coulsonovi (The University Center of Svalbard, Longyearbyen), Erlendu Lorentzenovi (Norwegian Polar Institute, Longyearbyen, Norway) a Lauren E. Culler (Norway Dartmouth College, Hanover, USA) za poskytnutí vzorků, bez kterých by má práce vůbec nemohla vyjít. Také bych chtěla poděkovat svému spolužákovi a zároveň dobrému kamarádovi Bc. Jiřímu Kyslíkovi. Velké dík patří mému partnerovi, který je mi po celou dobu mého studia oporou, a poslední a největší dík patří celé rodině a hlavně mým rodičům, kteří mě ve studiu podporují a stojí za mnou.

# OBSAH

1. OBECNÝ ÚVOD O ARBOVIRECH V POLÁRNÍCH OBLASTECH.....	1
1.1 Základní charakteristika arbovirů v polárních oblastech.....	1
1.2 Taxonomie a fylogeneze arbovirů .....	1
1.3 Přenašeči arbovirů.....	3
1.4 Charakteristika virových čeledí obsahujících arboviry.....	4
1.4.1 <i>Bunyaviridae</i> .....	4
1.4.2 <i>Flaviviridae</i> .....	5
1.4.3 <i>Reoviridae</i> .....	6
1.4.4 <i>Togaviridae</i> .....	6
1.5 Výskyt arbovirů v polárních oblastech .....	7
2. Členovci přenášející arboviry v polárních oblastech (Svalbard, Grónsko).....	9
2.1 <i>Aedes nigripes</i> , <i>Ixodes uriae</i> .....	9
2.2 <i>Aedes nigripes</i> jako vektor arbovirů .....	10
2.3 <i>Ixodes uriae</i> jako patogenní vektor.....	11
3. CÍLE PRÁCE .....	14
4. MATERIÁL A METODY.....	15
4.1 Materiál.....	15
4.1.1 Sběr a seznam vzorků.....	15
4.1.2 Soupravy.....	19
4.1.3 Primery .....	20
4.1.4 Přístroje .....	21
4.2 Metody .....	22
4.2.1 Metodika laboratorní práce .....	22
4.2.2 Rozdělení a homogenizace vzorků.....	22
4.2.3 Izolace RNA .....	22
4.2.4 RT – PCR .....	22
4.2.5 Separace na agarózovém gelu .....	23
4.2.6 Izolace z gelu.....	24
4.2.7 Sekvenace.....	24
4.2.8 Klonování.....	24
5. VÝSLEDKY.....	25

6. DISKUZE .....	29
6.1 Průběh práce .....	29
6.2 Šíření arbovirů do vyšších zeměpisných šířek.....	30
7. ZÁVĚR.....	32
8. ZDROJE .....	33

# 1. OBECNÝ ÚVOD O ARBOVIRECH V POLÁRNÍCH OBLASTECH

## 1.1 Základní charakteristika arbovirů v polárních oblastech

Arboviry, jejichž název je odvozen z anglického slovního spojení „arthropod-borne viruses“, jsou obsáhlou skupinou virů, přenášených z krev sajících druhů členovců na obratlovce. Jejich výzkum je důležitý zejména proto, že se jedná o lidské i zvířecí patogeny. Mezi arboviry patří velmi známé viry, které u svého hostitele způsobují závažné nemoci, končící v některých případech i smrtí (Reiter, 2010). Mezi základní typy onemocnění vyvolaných arbovirovou infekcí patří zejména encefalitidy, horečnatá onemocnění a hemoragické horečky (Hubálek et al., 2014).

Morfologicky se u arbovirů vyskytují téměř všechny tvary virů (kulovité, tyčinkovité, sférické). Jejich znakem je glykoproteinový obal, neboli glykosilované povrchové proteiny, vznikající v důsledku kontaktu s hostitelem, který je odvozen od hostitelské membrány (Hernandez et al., 2014). Ten může být tvořen jak jedním typem glykoproteinu, tak i více. Celá genetická výbava viru je uzavřena do nukleokapsidu. Z hlediska molekulární struktury má většina arbovirů genom tvořený z jedné nebo více molekul RNA. Výjimku tvoří některé DNA viry, jako například virus Afrického moru prasat (Asfarviridae), (Dixon et al., 2008).

Po mnoho let se arboviry evolučně přizpůsobovaly fungování ve velmi rozdílných buněčných prostředích jak u vektorů (členovci), tak u konečných hostitelů (obratlovci), (Hernandez et al., 2014). Následkem tohoto selekčního tlaku, a také kvůli nutné replikaci v obou typech hostitelů (bezobratlý, obratlovec), si jednotlivé viry vytvořily různé variace a molekulární adaptace. Například, jak se vyhnout imunitě vektora, nebo i tvorbě různých způsobů přechodu do cílových orgánů sloužících k jejich přenosu (Nuttall et al., 1994).

## 1.2 Taxonomie a fylogeneze arbovirů

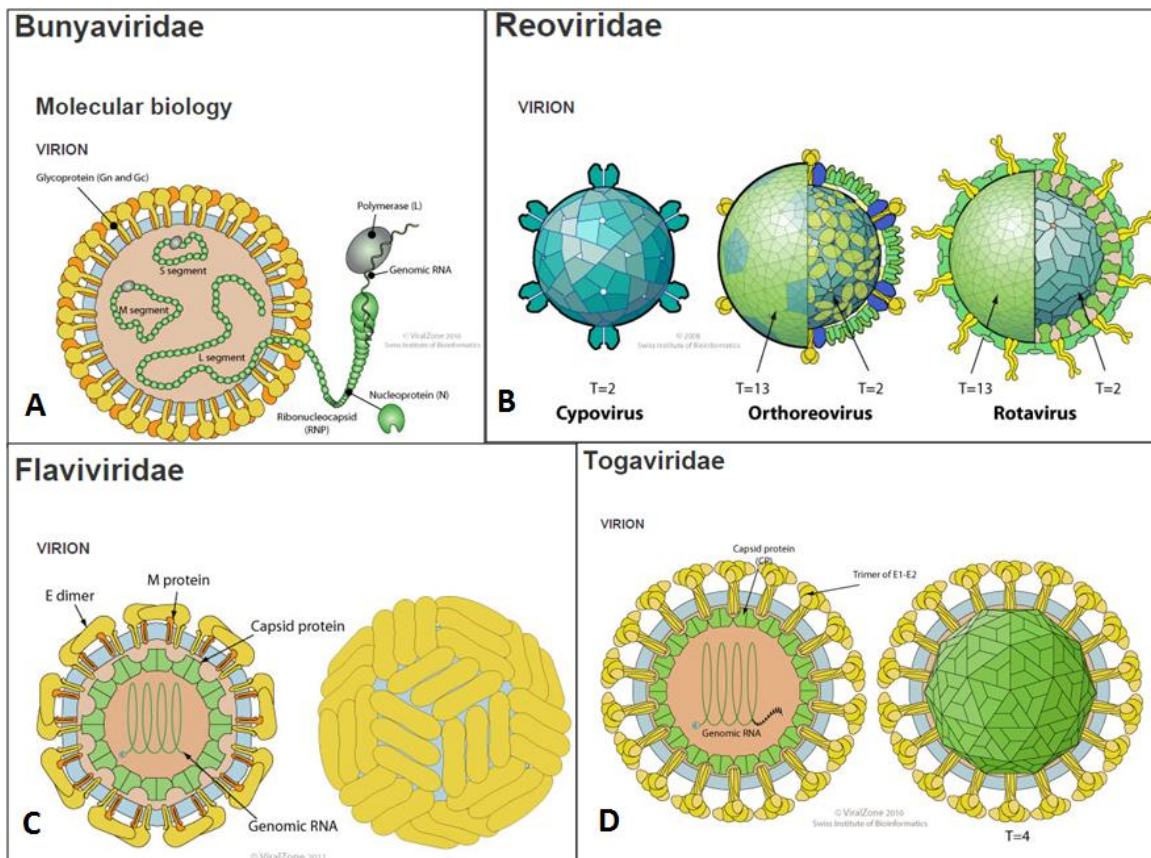
Historická kritéria, podle kterých se při objevu jednotlivé druhy virů rozdělovaly do čeledí a podčeledí, byla dělená podle chemických (struktura viru, velikost virové částice, typ nukleové kyseliny) a biologických (sérologické a antigenní vztahy, požadavky na vektora, apod.) vlastností (Tauraso a Shelokov, 1967).



Klasifikace a taxonomie arbovirů od jejich objevu a výzkumu prodělala značné změny. Na začátku 40. let minulého století byly arboviry uspořádány do čtyř skupin: A, B, C a D. Skupina A, označená členy rodu Alfavirus, (Dalrymple et al., 1973; Tesh et al., 1975), ve skupině B byly zařazeny viry rodu Flavivirus (De Madrid a Porterfield, 1974) a skupina C zůstala jako séroskupina C rodiny Orthobunyavirus (Mezencio et al., 1978). Poslední skupina D byla přejmenována v polovině dvacátého století do séroskupiny Guama a je v současné době zařazena do rodiny Orthobunyavirus (Shope et al., 1988). Organizace arbovirů do těchto skupin se nakonec stala chybnou a byl připuštěn standardní biologický systém klasifikace, založený na příbuznosti nukleových kyselin, který se používá dodnes. Avšak i dnes se objevuje několik druhů publikací, kde definují 7 virových čeledí (Gubler, 1996; Hubálek 2014), někde šest čeledí (Hernandez, 2014; Perng a Chen 2013). Ale všechny hlavní klinicky významné arboviry, vyskytující se v polárních oblastech, patří do jedné z následujících čtyř čeledí: *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Togaviridae* (převzato z <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> - poslední sborník ICTV).

Příkladem klasického evolučního vývoje jednotlivých čeledí arbovirů jsou viry z čeledi *Bunyaviridae*. Byla provedena kompletní fylogenetická analýza této čeledě, u které bylo zjištěno, že za mechanismem jejich vzniku stojí pravděpodobně hromadění bodových mutací (genetický drift) či přeskupování genových segmentů (genetický shift), které zapříčiňují diverzifikaci jednotlivých čeledí arbovirů (Briese et al., 2013).

Aby arboviry dokázaly přežít, vyžadují horizontální přenos z členovčího přenašeče na obratlovčího hostitele. Tento požadavek na replikaci u různorodých hostitelů způsobil neobvyklé evoluční omezení těchto virů na několik čeledí RNA virů (*Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*), (viz. Obr. 1) a pár DNA virů (viz výše.). Prozatímni fylogenetické studie naznačují dominanci purifying (očisťující) selekce v evoluci arbovirů. To souvisí s omezenými rozdílnými prostředními a požadavky replikace u obou typů hostitelů (bezobratlý, obratlovci), (Weaver, 2006). Jelikož jednotlivé rodiny arbovirů vznikly nezávisle na sobě, je skupina arbovirů v současné době definována jako polyfyletická (Mendez et al., 2010).



Obrázek 1: Molekulární struktura virových částic různých čeledí arbovirů (převzato z <http://viralzone.expasy.org/>).

### 1.3 Přenašeči arbovirů

Arboviry jako i všechny ostatní viry vyžadují v průběhu svého životního cyklu replikaci v buňkách svých hostitelů. Během této replikace ve většině případů svého vektorového přenašeče nepoškozují, pouze u některých druhů bylo detekováno určité snížení vitality jedince (Goering et al., 2013). U savců, včetně člověka, je replikace a amplifikace arboviru z velké části asymptomatická (zejména v případě přirozených hostitelů jednotlivých virů). Ale objevují se i infekce letální a to udává patogenní dopad těchto virů (Myint et al., 1999; Kuno a Chang, 2005; Rust, 2012).

Životní cykly jednotlivých druhů virů se liší zejména v odlišné amplifikaci a replikaci své virové RNA/DNA a zároveň v přenosu různými vektory (Weaver, 2005).

Společnou vlastností, kterou tyto zoonotické infekce sdílí, je přenos přes slinné žlázy vektora do hostitele, ale možností způsobu přenášení se nabízí více. Příkladem je transovariální přenos, objevený jak u klíšťat (Socolovschi et al., 2009) tak i u komárů (Hardy et al., 1984), který probíhá během kladení z nakažené matky na vajíčko. Dalším zajímavým způsobem přenosu je z nakažené kozy, případně ovce a skotu, přes mléko na své potomky. Touto cestou se může nakazit i člověk, pokud pozře syrové výrobky či samotné nakažené syrové mléko (Pfeffer a Dobler, 2010). Avšak konsensuální cesta, kterou ve většině případů arboviry využívají, je transmisivní přenos (Kuno a Chang, 2005). Mnozí vektorů jsou aktivní pouze po určitou část roku, což odráží vliv na sezónní výskyt arbovirových onemocnění.

Mezi hlavní vektory arboviróz řadíme klíšťata (Ixodidae) a komáry (Culicidae), dvě velké čeledě členovců. Jejich distribuce kolísá od tropů směrem k polárním oblastem (Sun et al., 2009; Wang et al., 2011; Uyar, 2013). U hlavních zástupců z čeledi klíšťat je možné jmenovat zejména rody *Hyalomma* (tato klíšťata přenášejí například virus Krymsko-konžské hemoragické horečky (CCHF – Crimean-Congo hemorrhagic fever)) a *Ixodes*, jejichž zástupci hostí například velmi rozšířený virus klíšťové encefalitidy (TBEV – Tick-borne encephalitis virus), (Gordon et al., 1993; Labuda et al., 1993). U komárů (Culicidae) jsou to zejména rody *Aedes*, sloužící jako přenašeči pro různé viry hemoragických horeček, kupříkladu horečka Dengue (DENV - Dengue virus) apod., a *Culex*, u kterých byl zjištěn přenos závažného viru západonilské horečky (WNV - West Nile virus), (McLean et al., 2001; Hayes et al., 2005).

## **1.4 Charakteristika virových čeledí obsahujících arboviry**

### **1.4.1 *Bunyaviridae***

Čeď *Bunyaviridae* zahrnuje celkem 5 virových řádů (Hantavirus, Nairovirus, Orthobunyavirus, Phlebovirus, Tospovirus), z nichž některé obsahují velmi patogenní zástupce. Příkladem je Krymsko-konžská hemoragická horečka (CCHF - Crimean–Congo hemorrhagic fever virus) či Rift Valley fever (RVF). Členovci přenášené viry v této čeledi patří do rodů Phlebovirus a Orthobunyavirus. Genom těchto virů je segmentovaný. Tvoří jej tři molekuly RNA označované jako velký, střední a malý segment. Tyto RNA mohou být buďto negativní polarity, nebo částečně negativní a částečně pozitivní polarity. Vzhledem k segmentovanému genomu je u bunyvirů vysoká pravděpodobnost rekombinace mezi

dvěma odlišnými bunyaviry, které infikovaly jednoho hostitele. Tyto rekombinace mohou představovat závažný problém při pokusech o rekonstrukci evoluce této virové čeledě. (Han a Worobey, 2011).

Zajímavostí u této rodiny je, že u rodu Phlebotomus jsou jednotlivé druhy z velké části přenášeny komáry (sandflies) rodu Phlebotomus (Nematocera), které jsou známým vektorem pro onemocnění Leishmanióza (Kinetoplastida).

#### 1.4.2 *Flaviviridae*

Čeď *Flaviviridae* obsahuje viry, jejichž společným znakem je pozitivní nesegmentovaná molekula genomické RNA. Délka genomu, která kolísá v rozmezí od 9-12 kilobází (Turner et al., 2004). Z hlediska patogenity tato rodina obsahuje velmi závažné viry. Tím nejdůležitějším je Hepatitida C (HCV - Hepatits C virus), která však není přenášena členovci.

Zástupci čeledě *Flaviviridae* jsou zahrnuti ve čtyřech rodech (Flavivirus, Hepacivirus, Pegivirus, Pestivirus). Pouze zástupci rodu Flavivirus jsou přenášeni členovci. Uvnitř rodu Flavivirus je další členění, které závisí na druhu vektorového přenašeče. Rozlišujeme ho na tři typy. Prvním z nich je skupina klíšťaty přenášených Flavivirů (Tick-borne viruses). Ta se opět rozpadá na dvě skupiny: 1) viry, které postihují obratlovce (např. TBEV), (viz. Obr. 2 – 1B) a 2) viry, které infikují mořské ptáky a povětšinou jsou přenášeny buďto klíštětem *Ixodes uriae* nebo klíšťáky rodu *Ornithodoros*. Zástupci této skupiny mohli být očekáváni ve vzorcích vyšetřovaných v průběhu této práce. Druhou velkou skupinou jsou viry přenášené komáry, které zahrnují známé patogeny, jako jsou virus západonilské horečky (WNV - West Nile virus), virus žluté zimnice (YFV -Yellow fever virus), (viz. Obr. 2 – 1C), od které získala čeď *Flaviviridae* a rod Flavivirus svůj latinský název (*flavis* – latinsky žlutý), nebo také virus horečky Dengue (DENV - Dengue virus). Poslední skupinou flavivirů jsou viry přenášené neznámým vektorem a viry typické pouze pro komáry (Gaunt et al., 2001).

### **1.4.3 *Reoviridae***

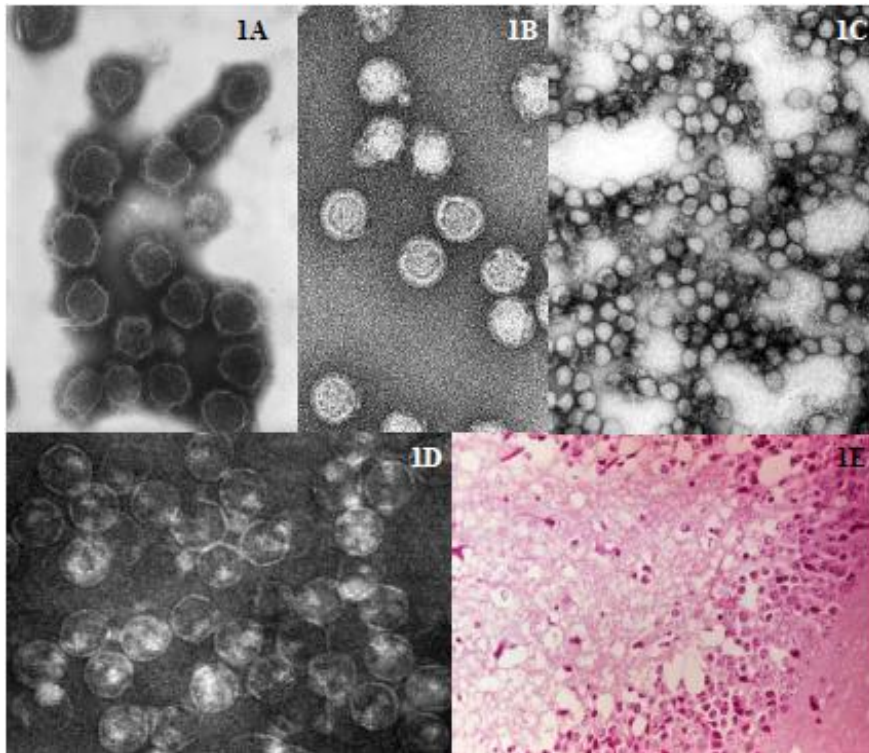
*Reoviridae* je čeleď virů, které ve většině případů postihují gastrointestinální a respirační systém obratlovců. Z hlediska molekulární struktury je jejich genom tvořen dvoušroubovicovou RNA (ds) a skládá se z 10-12 segmentů o maximální velikosti 3 kilobází (Kenneth, 2008).

Taxonomicky je tato čeleď členěna na dvě podčeledě (Sedoreovirinae, Spinareovirinae). První z nich obsahuje 6 rodů, ale jediný rod Orbivirus spadá do kategorie arbovirů. Zástupci tohoto rodu jsou například virus afrického moru koní (AHSV - African horse sickness virus), virus Kemerovo (KEMV – Kemerovo virus) či virus Tribeč (TRBV – Tribec virus). U druhé z podčeledí je definováno 9 rodů, kam patří i Coltivirus s jediným zástupcem viru Coloradské klíšťové horečky (CTF- Colorado tick fever), který je známý z vysokohorské oblasti Colorada a Idaho (Attoui, 2005).

### **1.4.4 *Togaviridae***

Tato čeleď obsahuje 2 rody (Alphavirus a Rubivirus), z nichž pouze Alphavirus řadíme mezi arboviry. Togaviridae se vyznačují nesegmentovaným genomem tvořeným linéární jednořetězcovou RNA (ssRNA(+)) o délce 9-12 kilobází.

Známými zástupci jsou kupříkladu virus venezuelské koňské encefalitisidy (VEEV – Venezuelan equine encephalitis virus), (viz. Obr. 2 – 1E) decimující centrální nervový systém u populací zeber, koní a oslů, nebo virus Chikungunya (CHIKV), (Schilte et al., 2013). Dále sem patří Semliki forest virus (SFV), který byl poprvé izolován z komára na území Ugandy v roce 1944, nyní ho můžeme objevit převážně v Africe či Asii (Atkins et al., 1999).



Obrázek 2: Snímky jednotlivých druhů arbovirů. **1A:** California encephalitis virus ([http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Encephalitis+Virus%2C+California&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Encephalitis+Virus%2C+California&lang=1))/ **1B:** Virus klíšťové encefalitidy (Stiasny et al., 2007)/ **1C:** Yellow fever virus (Centers for Disease Control and Prevention Public Health Image Library.)/ **1D:** Equine encephalosis virus (Centers for Disease Control and Prevention)/**1E:** Venezuelan equine encephalitis virus (CDC's Public Health Image Library).

## 1.5 Výskyt arbovirů v polárních oblastech

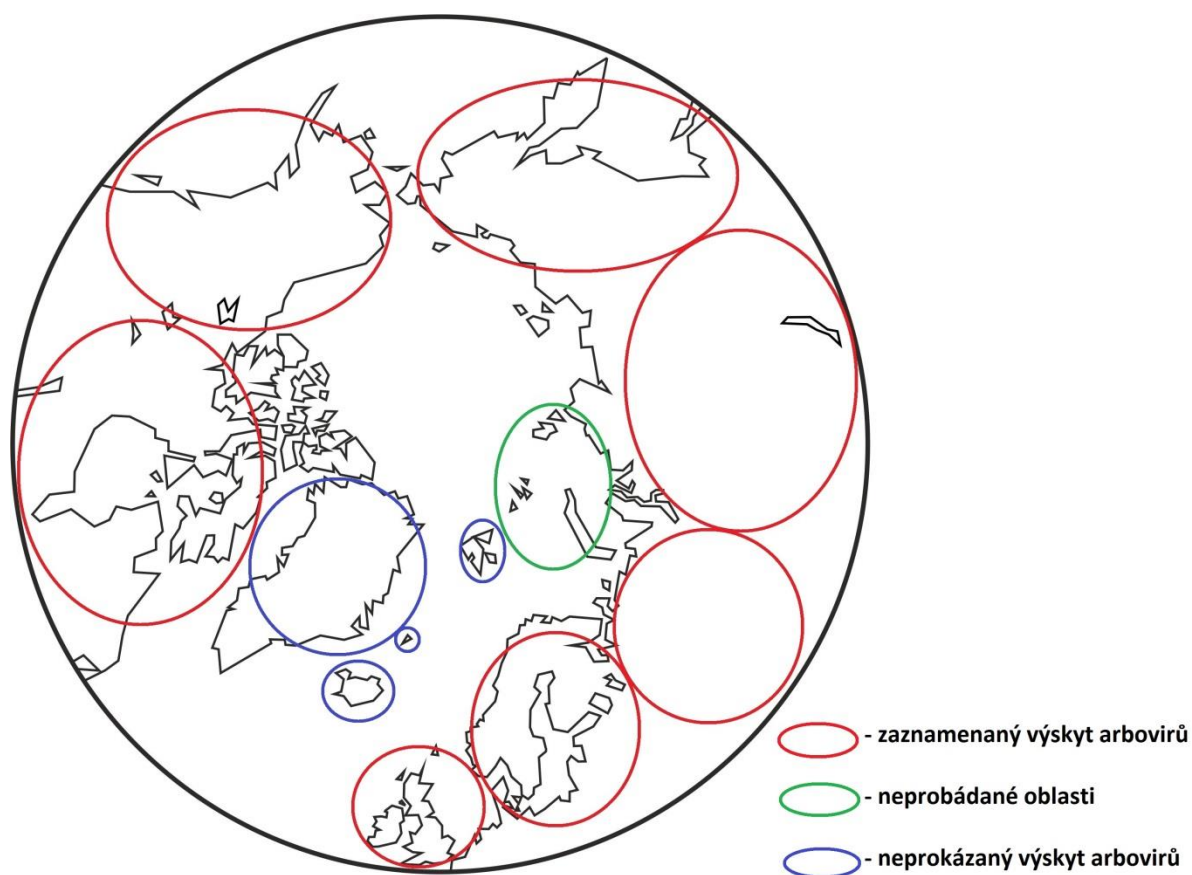
Původně se myslelo, že se arboviry nacházejí pouze v oblastech tropického a mírného klimatu. Postupem času se zjistilo, že jejich výskyt je téměř celosvětový. Následkem globálních klimatických změn (celosvětové změny teploty) dispergují určité druhy arthropodních přenašečů do vyšších zeměpisných šířek a vytváří zde stále větší populace. To má pozitivní efekt na amplifikaci arbovirů a zvyšování jejich prevalence v těchto oblastech. Z hlediska změn distribuce je třeba zároveň zahrnout i možnou antropogenní introdukci arbovirů do nových lokalit (Mehlhorn, 2008).

Co se týče jednotlivých faktorů, které mohou stát za výskytem arbovirů v nových oblastech, lze jmenovat zejména teplotu a vlhkost. Tyto makroklimatické faktory mohou mít přímý vliv na ekologii a biologii arbovirového přenašeče. Interakce mezi vektory a arboviry, které jsou závislé na teplotě, jsou obtížně predikovatelné. V temperátních zónách se arboviry během zimních období můžou uchovávat v samotných členovcích. Může jim k tomu



posloužit transovariální přenos, což definuje určitou preadaptaci arbovirů na přechod do jiných klimatických zón (Rosen, 1983). Nicméně je vysoce pravděpodobné, že tyto faktory jsou ovlivněny právě klimatickými změnami, tudíž výše zmíněná původní hypotéza výskytu pouze v tropických oblastech arbovirů je dnes vyvracována (Mellor a Leake, 2000). Kromě postupné distribuce do polárních oblastí jsou v dnešní době zaznamenávány i výskyty arbovirů v nových lokalitách. Příkladem je West Nile virus (WNV) v Severní a Jižní Americe nebo Usutu virus (USUV) ve Střední Evropě (Pfeffer a Dobler, 2010).

Současná distribuce arbovirů v polárních oblastech je velmi málo probádána. V této práci se omezíme pouze na oblast evropské Arktidy a Grónska. Avšak jsou zaznamenány případy výskytu arbovirů například v subpolárních tundrách Ruska (L'vov et al., 1997) nebo v severních oblastech Kanady a Aljašky (McLean, 1975). Nové výskyty v evropské části Arktidy jsou například ve Švédsku, Norsku a Finsku (viz kapitola 6. Diskuze). U arbovirů přenášných klíšťaty je totiž možné spojení mezi těmito viry a disperzí mořských ptáků (Yunker, 1975).



Obrázek 3: Prozatímní výskyt arbovirů na severní polokouli.

## 2. Členovci přenášející arboviry v polárních oblastech (Svalbard, Grónsko)

### 2.1 *Aedes nigripes*, *Ixodes uriae*

V polárních oblastech, zejména na Svalbardu, v Grónsku a v přilehlých ostrovech, žije několik druhů krev sajících členovců, kteří parazitují na zdejších obratlovcích a mohou přenášet různé arbovirové infekce (Elsterová et al., in prep.) Mezi arktické parazitární meziphostitele patří hlavně komáři rodu *Aedes* (Insecta; Diptera; Culicidae) a klíšťata druhu *Ixodes uriae* (Acari; Ixodida; Ixodidea).

I ve zdejších vysokých zeměpisných šířkách je v každém roce několik měsíců, kdy se teploty přehoupnou přes bod mrazu. V té době migruje do polárních oblastí velké množství mořských ptáků, kteří spolu s živočichy trvale žijícími v těchto oblastech představují ideální hostitele pro krev sající členovce. Ti se museli na tyto polární podmínky (trvalý chlad, dostupnost vody v tekutém skupenství pouze v letních měsících, sezónní přítomnost hostitele) adaptovat. Například v klíštěcích populacích lze pozorovat korelaci mezi sezónní aktivitou sání a přítomností potencionálních hostitelů (viz níže), v tomto případě mořských druhů ptáků (Frenota, 2001). U zástupců komárů je tato představa podpořena například teplotně rezistentními vajíčky a dalšími různými adaptacemi (Danks et al., 1994).

Mezi komáry rodu *Aedes* dominují na ostrovech v severním Atlantiku především dva druhy: *Aedes nigripes* a *Aedes impiger* (Robert et al., 2011). Hlavními hostiteli těchto komárů bývají různé druhy menších savců (Barton, 1996). Komáři *A. nigripes* a *A. impiger* reprezentují holoarktické přenašeče. Areál jejich výskytu se v poslední době rozšiřuje. V tomto může hrát důležitou roli i člověk. Avšak kolonizace různých arktických lokalit je značně variabilní díky klimaticky rozdílným podmínkám panujícím na jednotlivých lokalitách (Robert et al., 2011). Kromě výše zmíněných druhů, se mimo oblast Svalbardu a Grónska vykytují zároveň i další subpolární druhy komárů. Patří sem například druhy *Aedes canadensis*, *A. hexodontus*, *A. communis* a také *A. punctor*. Ti mohou přenášet například virus kalifornské encefalitidy (CEV - California encephalitis virus), (viz Obr. 2 – 1A), (McLean et al., 1970; McLean, 1978). Podle různých ekologických studií se zdá, že populace komárů v polárních oblastech je co do počtu jedinců hojnější než v oblastech tropických (Jablonski et al., 2006; Foley et al., 2007). Je to dáno především specifickými



klimatickými podmínkami (permafrost, konstantní sluneční svit aj.), na které se arktičtí komáři úspěšně adaptovali a které mají pleiotropní účinek na komplexní vývoj komárů.

Co se týče dalších ektoparazitických mezihostitelů (přenašečů) arbovirů, jediným klíštěcím druhem žijícím na Svalbardu je klíště *Ixodes uriae* (Coulson et al., 2009). Dalšími klíštěcími druhy, které žijí v jiných oblastech Arktidy, jsou *I. signatus*, *I. rothschildi*, *I. ricinus*, *I. putus* a *I. marxi* (L'vov, 1978; Dietrich et al., 2011). U většiny těchto zmíněných klíštěcích druhů jsou hlavními hostiteli převážně mořští ptáci.

Všechny výše zmíněné faktory poskytují ideální prostředí pro viry přenášené krev sajícím hmyzem.

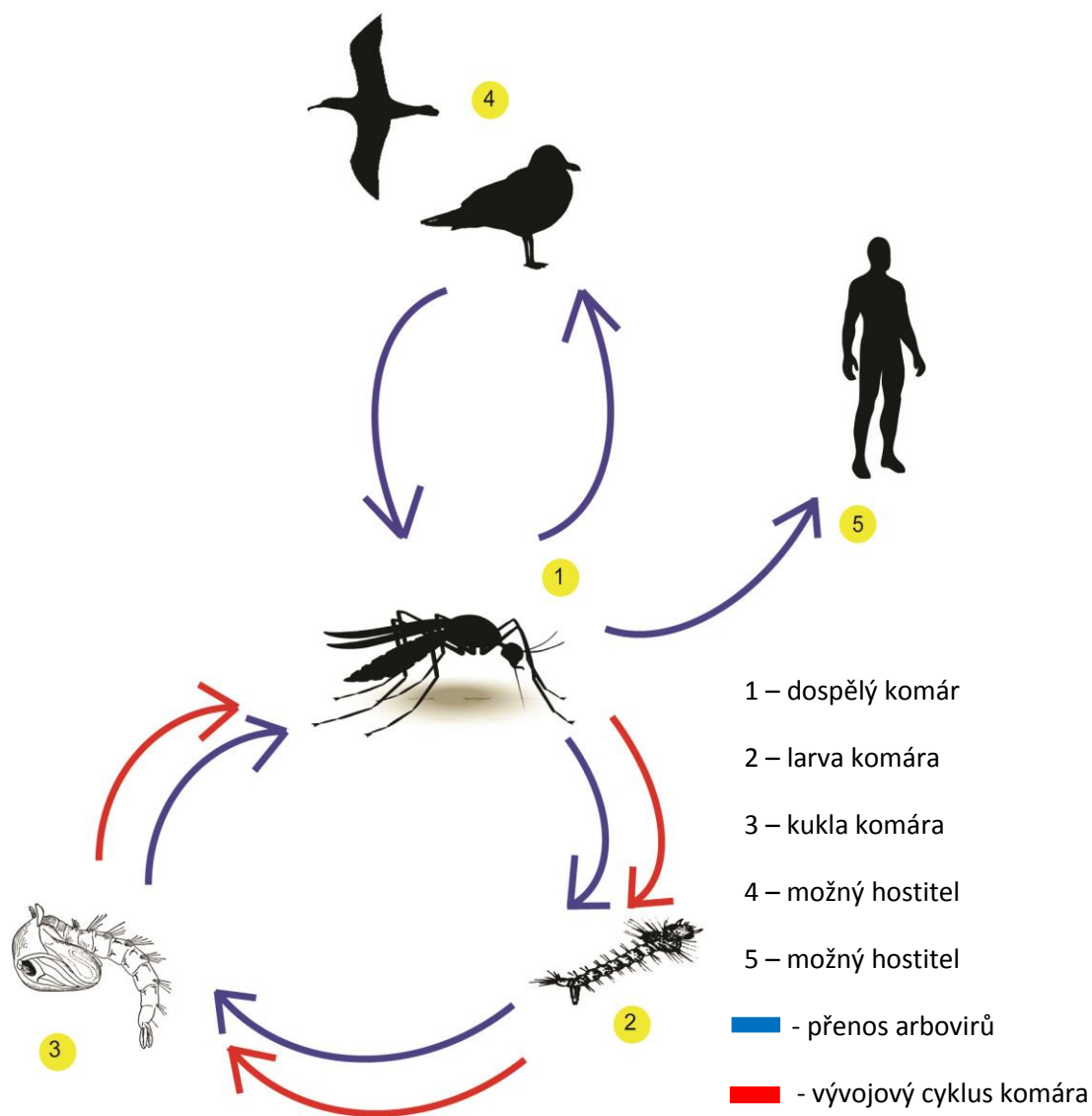
## **2.2 *Aedes nigripes* jako vektor arbovirů**

Komáři druhu *A. nigripes* jsou jediným druhem komára žijícím na Svalbardu (Coulson, 2007). Jsou zároveň i dominantním druhem komára, který se vyskytuje v Grónsku. Tam se navíc vyskytuje i komár *A. impiger*, který byl objeven v severní části tohoto ostrova (Gíslason, 2005). Komáři rodu *Aedes* přenášejí mnoho onemocnění, které mohou být patogenní pro člověka (Hunt, 2010). To platí i pro náš modelový druh *Aedes nigripes*. Bylo prokázáno, že další druhy rodu *Aedes*, vyskytující se především v subpolárních oblastech (Aljaška, Kanada), jsou zároveň důležitými přenašeči pro potencionálně patogenní arboviry. Zejména se jedná o viry z čeledi *Bunyaviridae*, kam například řadíme výše zmíněný CEV (McLean, 1977) a *Togaviridae* (Gheta virus), (L'vov et al., 1995).

Komáři druhu *A. nigripes* mohou přenášet arboviry jak horizontálně, tak pravděpodobně i vertikálně. Transovariální přenos arbovirů nebyl přímo u *A. nigripes* zdokumentován, nicméně byl experimentálně tento přenos arbovirů popsán u jiných příbuzných druhů komárů (Rosen, 1983).

Přesný mechanismus horizontálního přenosu arbovirů komárem *A. nigripes* také nebyl studován. Nicméně je možnost i pro tento druh předpokládat dobře definovaný mechanismus interakce „vektor x arbovirus“, který funguje u jiných typů arbovirových infekcí. Průběh mechanismu tkví ve schématu, kdy je komár nakažen daným arbovirem

během přijímání potravy. Následuje první pomnožení viru ve střevě komára. Poté je virus rozšířen mimo střevo a diseminuje do dalších orgánů, především do slinných žláz. Odtud je virus během sání vyloučen do obratlovčího hostitele. Následně je umožněna další amplifikace viru v konečném obratlovčím hostiteli. Tím je dokončen replikační cyklus (viz Obr. 4), (Gubler, 1998).



Obrázek 4: Vývojový cyklus komára a cycklické znázornění přenosu arbovirů.

### 2.3 *Ixodes uriae* jako patogenní vektor

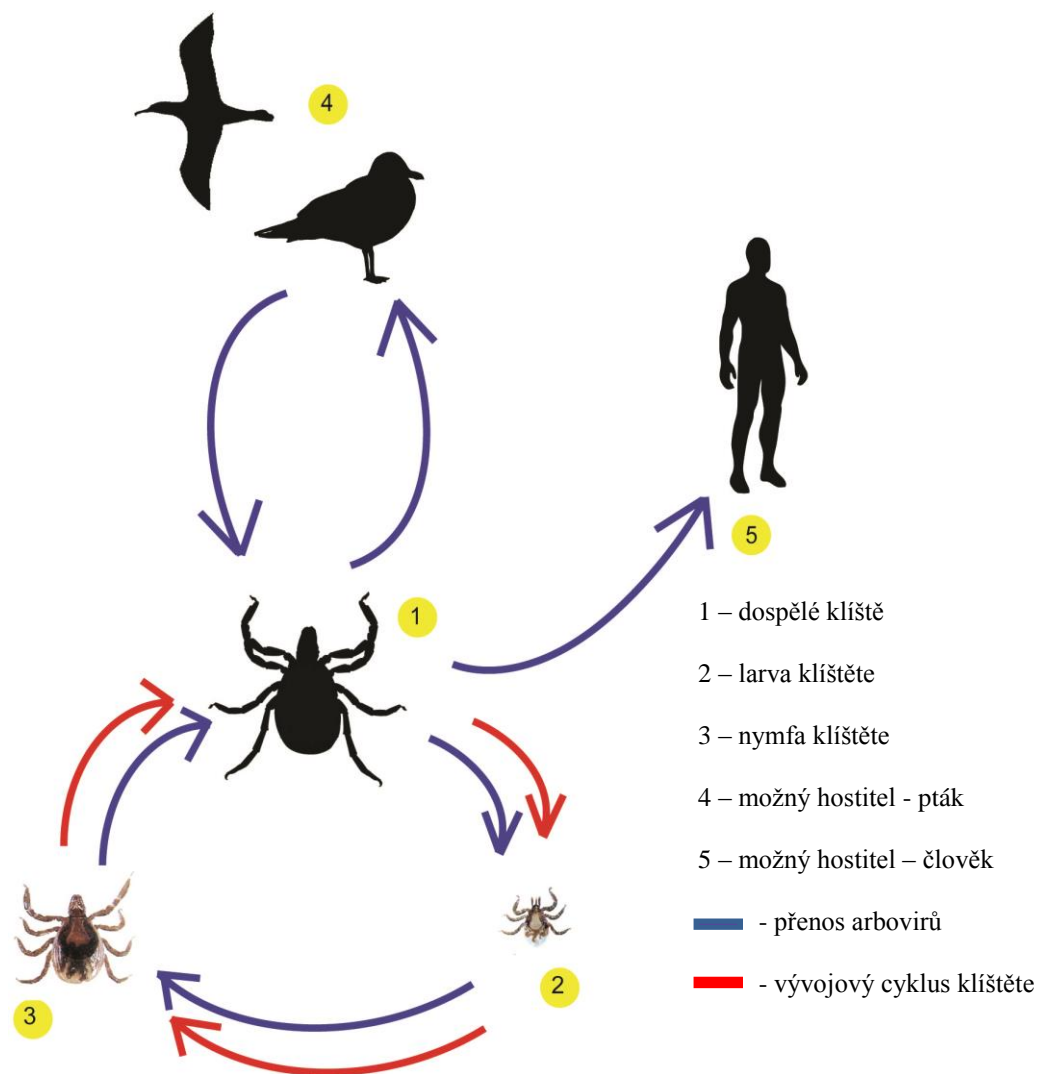
Klíště druhu *I. uriae* je hlavním vektorem klíšťaty přenášených virů, bakterií a protozoárních parazitů v polárních oblastech (Coulson, 2009). Rozšíření tohoto klíštěte je

cirkumpolární, a to jak na severní, tak na jižní polokouli (McCoy et al., 2005). První výskyt tohoto klíštěte na Svalbardu byl zaznamenán v roce 1999 na rackovi, ale pouze jediný kus. Až do roku 2007, i přes intenzivní terénní výzkum, nebyla další klíšťata objevena. Od letopočtu 2007 jsou klíšťata na Svalbardu pravidelně zaznamenávána, ale pouze na alkounovi tlustozobém (*Uria lomvia*), (Descamps, 2013). Populace tohoto druhu byla také objevena i v dalších arktických oblastech, například v Grónsku (Zumpt, 1952) nebo na Faerských ostrovech (Gylfe, 1999). Na jižní polokouli byla klíšťata *I. uriae* objevena například v těchto lokalitách: Jižní Shetlandy (Barbosa et al., 2011) či Chile (Stedt, 2009).

Životní cyklus tohoto druhu je 3-hostitelský a v polárních oblastech se odvíjí výhradně podle zdejších klimatických podmínek a dostupnosti hostitelů. U tohoto polárního druhu klíštěte byla zjištěna korelace mezi aktivitou sání klíšťat a přítomností ptáků během období jejich rozmnožování (Frenota, 2001). Životní cyklus také závisí na klimatických podmínkách, v krátkém, teplém a vlhkém období jsou vhodné podmínky pro rychlý nárůst populace a přeměny ve vyšší vývojová stádia (Descamps, 2013). V zimních měsících klíšťata nesají a zalézají do mezer mezi kameny blízko hnízd ptáků (Barton, 1996).

Existuje totiž preference vývojových stádií klíšťat vůči stáří hostitele. Dospělá stádia samic preferují starší ptáky ve srovnání se stádiem nymfy, pro kterou je zdrojem sání především mládě daného ptáka (Muzaffar a Jones, 2007). Napadení *I. uriae* má vysilující účinky na hostitele, mezi které lze zařadit například redukcí hematokritu či subletální chování hostitele. Tyto negativní dopady nákazy *I. uriae* mají zřejmě přímý vliv na populační dynamiku kolonií mořských ptáků v severních oblastech (Coulson et al., 2009). Jediní klíštěte *I. uriae* byli nalezeni i na oblečení osob, které se pohybovaly v blízkosti ptačích kolonií. Není jisté, zda měl být člověk cíleným hostitelem, nebo zda byl tento výskyt pouze náhodný. Sání klíštěte *I. uriae* na člověku nebylo doposud v literatuře popsáno.

Arboviry se v populaci *I. uriae* mohou šířit jak horizontálně, tak vertikálně (Nuttall et al., 1994). Při horizontálním přenosu začíná nákaza klíštěte *I. uriae* patogenním druhem viru při sání krve na infikovaném zdroji (v tomto případě většinou nějaký druh mořského ptáka, např.: *Uria lomvia*, *Rissa tridactyla*, *Larus hyperboreus*, (H. Strøm, unpubl. data). Cyklus koloběhu viru v klíštěti se podobá obdobnému cyklu u komárů (viz výše), (viz Obr. 5).



Obrázek 5: Znázorněná stadia životního cyklu klíštěte a přenos arbovirů.

### **3. CÍLE PRÁCE**

- a) vypracovat literární rešerši o arbovirech v polárních oblastech
- b) vyšetřit dostupné vzorky na výskyt arbovirů a tím zjistit jejich přítomnost, popřípadě i prevalenci v oblastech našeho výzkumu

## 4. MATERIÁL A METODY

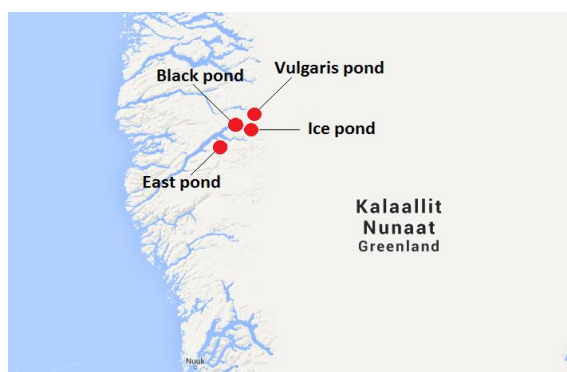
### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Sběr a seznam vzorků

Vzorky komárů *Aedes nigripes* z Grónska byly laskavě poskytnuty Lauren E. Culler (University of Dartmouth, USA). Vzorky byly sbírány na jihozápadě Grónska v okolí města Kangerlussuaq v letech 2012 a 2013 na lokalitách nazvaných East Pond, Black Pond, Vulgaris Pond, Ice Pond (viz. Obr. 6).



Obrázek 6: Lokality sběru komárů *Aedes nigripes* v Grónsku: A) East Pond (67.006 N, 50.671 W), B) Black Pond (67.009 N, 50.672 W), C) Vulgaris Pond (67.086 N, 50.294 W), D) Ice Pond (67.148 N, 50.079 W).



Obrázek 7: Zvětšená část Grónska s přesným uvedením lokalit odběru vzorků.

Vzorky klíšťat *Ixodes uriae* z polárních oblastí byly poskytnuty Dr. Stevenem Coulsonem (The University Center of Svalbard, Longyearbyen, Svalbard, Norway) a Erlendem Lorentzenem (Norwegian Polar Institute, Tromso, Norway). Vzorky byly sbírány na lokalitách Kapp Kalthof (Bjørnøya), Ossian Sarsfjellet (Spitzbergen) a na ostrově Jana Mayena. Poloha lokality je specifikována na Obr. 8.



Obrázek 8: Lokality sběru klíšťat v polárních oblastech.

Seznam všech vzorků, které byly vyšetřeny na výskyt arbovirů, je uveden v Tab. 1 a 2. Číslování vzorků klíšťat bylo zachováno podle norských kolegů.

### Vzorky – Grónsko:

Tabulka 1: Vzorky komárů z rodu *Aedes Nigripes* nasbírané v Grónských oblastech.

Číslo vzorku	Typ vzorků	Počet	Lokalita	Datum sběru
1	<i>Aedes nigripes</i>	30	Black Pond	8.5.2013
2	<i>Aedes nigripes</i>	30	Black Pond	14.5.2013
3	<i>Aedes nigripes</i>	26	Black Pond	21.5.2013
4	<i>Aedes nigripes</i>	30	Vulgaris Pond	8.5.2013
5	<i>Aedes nigripes</i>	30	Vulgaris Pond	14.5.2013
6	<i>Aedes nigripes</i>	37	Vulgaris Pond	21.5.2013
7	<i>Aedes nigripes</i>	35	Ice pond	8.5.2013
8	<i>Aedes nigripes</i>	35	Ice pond	14.5.2013
9	<i>Aedes nigripes</i>	33	Ice pond	21.5.2013
10	<i>Aedes nigripes</i>	30	East Pond	8.5.2013
11	<i>Aedes nigripes</i>	30	East Pond	14.5.2013
12	<i>Aedes nigripes</i>	31	East Pond	21.5.2013

## Vzorky – Svalbard a Jan Mayen

Tabulka 2: Vzorky klíšťat *Ixodes uriae* z polárních oblastí.

Číslo vzorku	Kusy/typ	Z čeho	Datum	Místo odběru
č. 1 – 42	9 kusů, nymfy nebo nenasátý dospělci	z oblečení	24.6.2010	Bjørnøya
č. 2 – 39	1 nasátá samice, 1 nenasátý samec	z oblečení	17.06.2010	Bjørnøya
č. 3 – 37	9 kusů nymfy, z toho 2 samci	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	19.6.2008	Ossian Sarsfjellet
131	1 dospělá samice nasátá, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
132	1 dospělá nasátá samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
133	1 nenasátý dospělec, 1 nymfa	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	6.7.2012	Jan Mayen
134	1 nasáta samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	6.7.2012	Jan Mayen
135	1 dospělý samec, 1 menší samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	6.7.2012	Jan Mayen
136	1 nasátá samice, 1 žlutý samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	12.7.2012	Jan Mayen
137	1 nasátá samice, 1 nenasátá samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	12.7.2012	Jan Mayen
126	1 nasátá samice, 1 samice nenasátá, 1 samec nebo nymfa	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen



Pokračování tabulky 2 ze stránky 17.

Číslo vzorku	Kusy/typ	Z čeho	Datum	Místo odběru
127	1 nasátá samice, 1 menší hnědý samec, 1 žlutá nymfa	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
125	2 menší nasáté samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
128	1 nasátá samice, 1 sv. hnědý samec	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
129	1 samec hnědý, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
130	1 nasátá samice, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
152	1 větší samec, 1 menší samec (oba hnědý proužek na zádech)	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
153	2 hnědí samci, 1 nenasátá žlutá samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
154	1 nymfa, 1 žlutá nasátá samice, 1 hnědý samec s pruhem	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
155	1 žlutá nasátá samice, 1 hnědý samec s pruhem	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
156	2 nasáté samice, 1 nenasátá samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
157	2 nasáté samice, 1 nenasátá samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen
158	1 nymfa, 1 ks nasátá samice, 1 samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen

Pokračování tabulky 2 ze stránky 18.

Číslo vzorku	Kusy/typ	Z čeho	Datum	Místo odběru
159	1 nasátá samice, 1 samec, 1 žlutá samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen
160	2 samci, 1 samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen
161	2 polonasáté samice, 1 samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen
162	3 samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
163	2 polonasáté samice, 1 samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
164	4 samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen

#### 4.1.2 Soupravy

Použité soupravy na izolaci a RT-PCR jsou zapsány v tabulce 3.

Tabulka 3: Výpis souprav na zpracování vzorků.

	Souprava 1	Souprava 2
izolace virové RNA	QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen)	kit RNAGem Tissue (Zygem)
RT-PCR	Qiagen OneStep RT-PCR Kit.	

#### 4.1.3 Primery

Primery použité pro hledání arbovirové RNA ve vzorcích jsou vedeny v Tab. 4.

Tabulka 4: Sekvence používaných primerů.

Primer	Sekvence	Citace	Teplota nasedání [°C]
α -	5' - KYT CYT CIG TRT TIG TIC CIG G - 3'	Sanchez – Seco et al., 2001	61
α +	5' - GAY GCI TAY YTI GAY ATG GTI GAI GG - 3'	Sanchez – Seco et al., 2001	59,5
BCS82C	5' - ATG ACT GAG TTG GAG TTG CAT GAT GTC GC - 3'	Kuno et al., 1996	60,1
BCS332V	5' - TGT TCC TGT TGC CAG GAA AAT - 3'	Kuno et al., 1996	50,5
FlaF1A	5' - AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A - 3'	Schwaiger et al., 2001	49,2
FlaR1	5' - GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA - 3'	Schwaiger et al., 2001	49,7
Orbi F1	5' - TCT GAG ATG TAY GTY GGA GAT GAT A - 3'	Palacios et al., 2011	49,3
Orbi F2	5' - TCT GAG ATG TAY GTY GGT GAT GAC A - 3'	Palacios et al., 2011	50,9
Orbi F3	5' - TCG GAA CAR TAY GTV GGN GAY GAT A - 3'	Palacios et al., 2011	52
Orbi F4	5' - TCN GAR CAR TAY GTK GGN GAY GAC A - 3'	Palacios et al., 2011	53,4
Orbi R	5' - CCY TGY TTN GCR TGN GTY TGY GTY TTY TC - 3'	Palacios et al., 2011	57,1
NPhlebo 1 -	5' - AAR TTR CTI GWI GCY TTI ARI GTI GC - 3'	Charrel et al., 2006	56,4
NPhlebo 1 +	5' - ATG GAR GGI TTT GTI WSI CII CC - 3'	Charrel et al., 2006	53,5
NPhlebo 2 -	5' - TCY TCY TTR TTY TTR ARR TAR CC - 3'	Charrel et al., 2006	41
NPhlebo 2 +	5' - WTI CCCI AAI CCI YMS AAR ATG - 3'	Charrel et al., 2006	43,1
ActRT_F	5' - CGC CAT CCT CCG TCT GGA CTT - 3'	P. Věchtová	58,3
ActRT_R	5' - CGT CGG GAA GCT CGT AGG ACT T - 3'	P. Věchtová	58,6
EFlexexRT F	5' - CGC CTG GGT GTT GGA CAA GCT GAA - 3'	P. Věchtová	60,8
EFlexexRT R	5' - CGC AGT CGG CCT GGG AGG TA - 3'	P. Věchtová	60

#### **4.1.4 Přístroje**

Homogenizátor TissueLyser II (QIAGEN), biohazard box TELSTAR Bio II Advance, PCR cycler (BIOE GENEPRO), UV transiluminátor (BIOMETRA), pipety (EPPENDORF), hluboko mrazicí box (PANASONIC MDF-594).

## **4.2 Metody**

### **4.2.1 Metodika laboratorní práce**

Izolaci a detekci virové RNA jsme prováděli v laboratoři s bezpečnostním standardem BSL2 za využití biohazard boxů (TELSTAR). Při práci byly dodržovány vysoké bezpečnostní standardy, abychom předešli případné infekci pracovníků zkoumaným materiálem.

### **4.2.2 Rozdělení a homogenizace vzorků**

Vzorky klíšťat a komárů jsme rozdělili do zkumavek podle jednotlivých lokalit, vývojových stádií či hostitelů, ze kterých byly odebrány (viz Tab. 1 a 2 se seznamem vzorků). Do homogenizačních zkumavek jsme přidali 1000  $\mu$ l PBS (pH 7,4) a ocelovou kuličku. Homogenizaci jsme provedli v přístroji TissueLyser II (QIAGEN) po dobu 3 minut při rychlosti 3 kmity/s.

### **4.2.3 Izolace RNA**

Na izolaci RNA jsme použili soupravy QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen) či kit RNAGem Tissue (Zygem). Při izolaci RNA jsme postupovali podle pokynů výrobce. Pracovní postupy doporučené výrobcem jednotlivých souprav jsou uvedeny v elektronických přílohách.

### **4.2.4 RT – PCR**

K RT-PCR jsme použili soupravu Kit Qiagen OneStep RT-PCR. Oproti postupu doporučenému výrobcem jsme z důvodu úspory materiálu používali pouze pětinové objemy. Protokol na přípravu RT-PCR reakce je uveden v Tab. 5. Ostatní kroky probíhaly podle pokynů výrobce. Pracovní postupy doporučené výrobcem jednotlivých souprav jsou uvedeny v elektronických přílohách.

Tabulka 5: Příprava RT-PCR reakce.

Látka	Objem [μl]
H <sub>2</sub> O	6
B	2
dNTP <sub>S</sub>	0,4
P <sub>1</sub>	0,6
P <sub>2</sub>	0,6
RNA	2
E	0,4

PCR reakce probíhala za podmínek doporučených výrobcem soupravy. Pouze teplota nasedání primerů byla nastavena na 50 °C. Tato teplota je nižší, než je teplota tání všech primerů. To mělo zajistit nasedání primerů i na ne zcela ideální templáty. Podmínky PCR jsou uvedeny v Tab. 6.

Tabulka 6: Přesně zadané podmínky pro PCR.

Jednotlivé úkony	Teplota [°C]	Čas [min]	Opakování
Reverzní transkripce	50	30	
Iniciační PCR (aktivační krok)	96	15	
Denaturace	94	00:45	40x
Nasedání primerů	50	00:45	40x
Elongace	72	1	40x
Finální elongace	72	10	
Udržování teploty	12		

#### 4.2.5 Separace na agarózovém gelu

Ke vzniklé směsi z PCR (10 μl) jsme přidali 2 μl nanášejícího pufru (orange DNA Loading Dye) s 5x koncentrovaným barvivem SYBER GREEN. Celkový produkt jsme nanесли na 2% (w/v) agarózový gel, zalili 1 x koncentrovaným TAE pufrem (pH 8,3) a nechali molekuly elektroforeticky rozdělit. Následnou vizualizaci jsme prováděli na UV transiluminátoru. Fotografickým aparátem Olympus C5060Z jsme získali snímky jednotlivých gelů, které jsme upravovali v programu Alpha Ease® RT Software, verze 4.1.0.

#### **4.2.6 Izolace z gelu**

Izolaci z agarózového gelu jsme prováděli pomocí soupravy QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) podle přiloženého návodu od výrobce, který je v celém znění uveden v elektronických přílohách.

#### **4.2.7 Sekvenace**

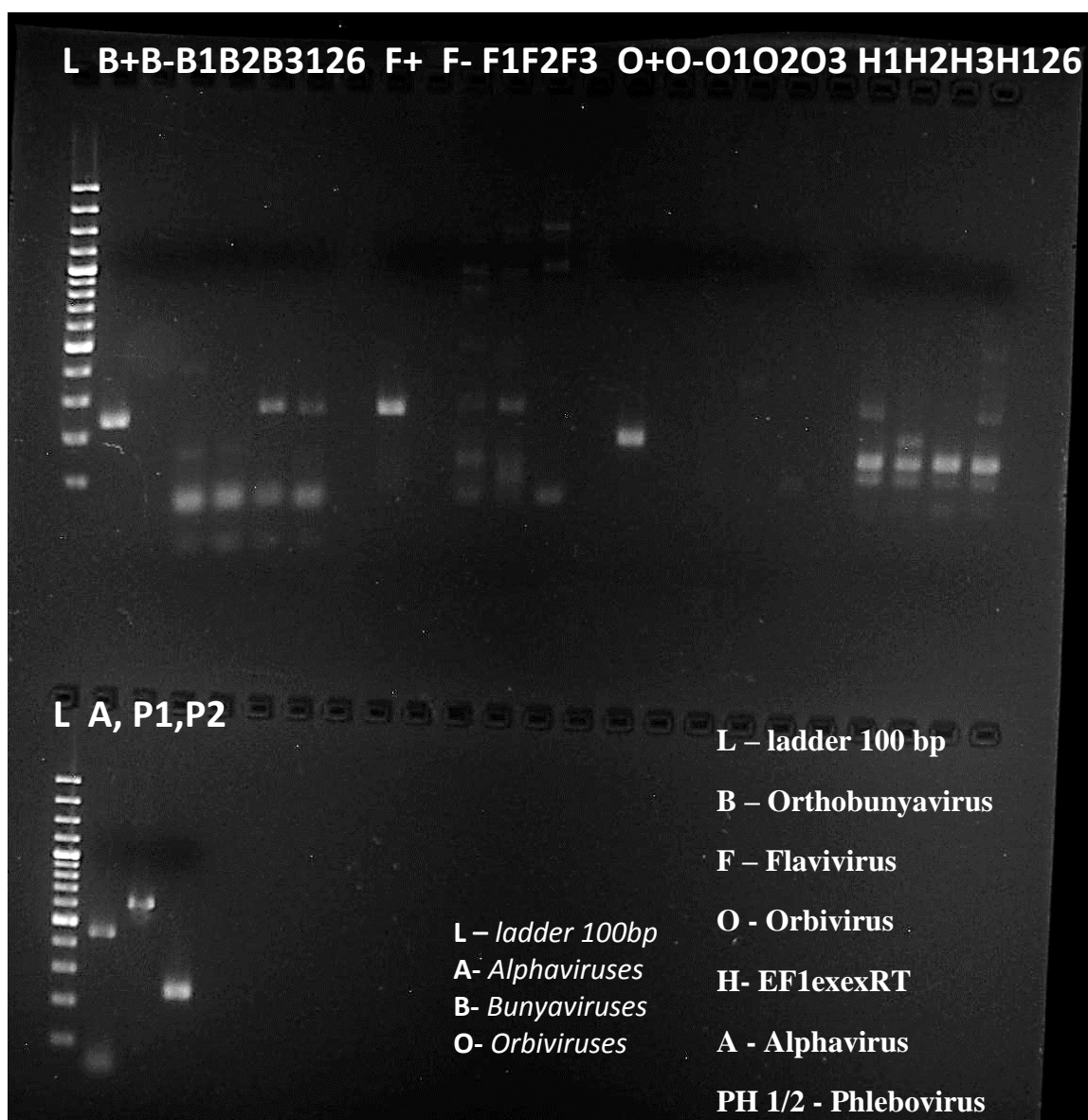
Sekvenaci fragmentů prováděla společnost SEQme s.r.o., Dobříš, Česká republika. Příprava sekvenační reakce probíhala podle návodu od uvedené firmy, tj. na celkový objem vzorku 10  $\mu$ l při velikosti PCR produktu 500-1000 bp bylo potřeba 100 ng templátu a 25 pmol primeru.

#### **4.2.8 Klonování**

Pro klonování jsme využili TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing, postupovali jsme dle přiloženého návodu, který je uveden v elektronických přílohách. Výběr klonů nesoucích vložený inzert byl proveden pomocí „blue/white“ selekce za využití X-Gal.

## 5. VÝSLEDKY

Podařilo se nám vyizolovat pozitivní kontroly pro rody Alphavirus (A) - SFV (Semliki Forest virus), Orthobunyavirus (B) - TAHV (Ťahyňa virus), Flavivirus (F) - TBEV (virus klíšťové encefalitidy), Phlebovirus (Ph) - UUKV (Uukuniemi virus) a Orbivirus (O) - TRIBEC (Tribeč virus) pro kontrolu správnosti PCR. Všechny pozitivní kontroly můžeme vidět na Obr. 9.



Obrázek 9: Gel s ukázkou pozitivních kontrol a také pozitivní kontrolou na přítomnost nukleových kyselin hostitele ve vzorku a některých vyšetřených vzorků.

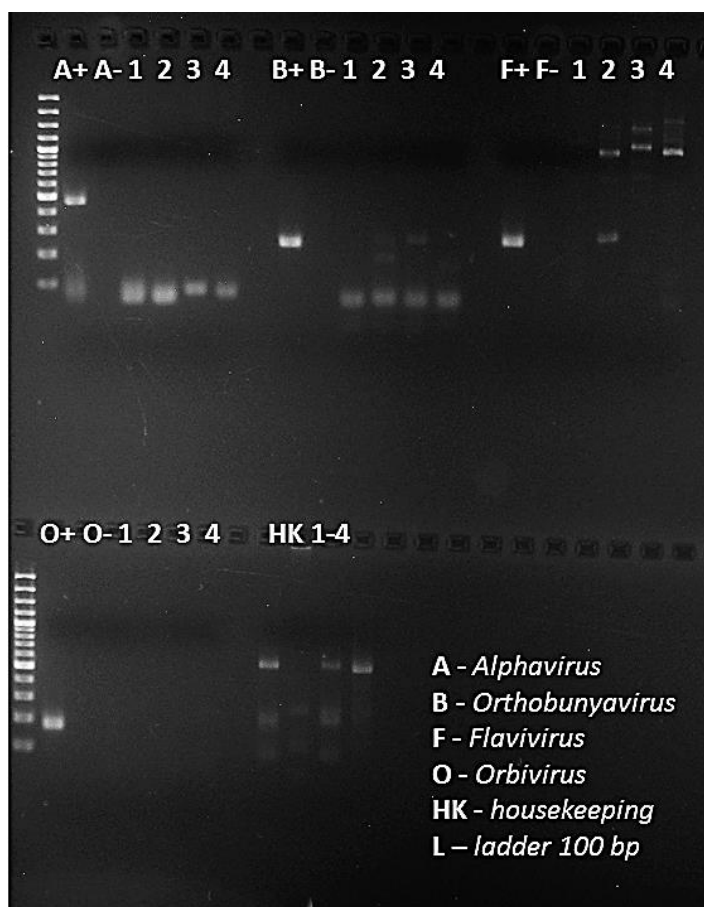


Konečný počet vyšetřených klíšťat *Ixodes uriae* z ostrovů Bjørnøya, Spitzbergen a ostrova Jana Mayena je 89 a 377 komárů z druhu *Aedes nigripes* z Grónských oblastí. Mezi vzorky klíšťat byl počet dospělců 71, z toho 19 nasátých a počet nymf 28. Vzorky byly vyšetřeny na tyto arboviry: **Bunyviridae** (Orthobunyavirus, Phlebovirus), **Reoviridae** (Orbivirus), **Flaviviridae** (Flavivirus), **Togaviridae** (Alphavirus). U žádného vzorku jsme neobjevili žádný z těchto zástupců arbovirů. U některých vzorků vyšetřovaných na přítomnost virů z rodu Orthobunyavirus jsme u meziprojektu PCR našli molekuly se shodnou velikostí, jako byl očekávaný pozitivní výsledek (viz Tab. 7). DNA z těchto vzorků jsme vyizolovali a následně nechali osekvenovat (viz kapitola 4 Metodika). Výsledky ukázaly, že se jedná o směs molekul.

Tabulka 7: Seznam osekvenovaných vzorků.

Číslo vzorku	Druh viru	Kusy/typ	Z čeho získané	Datum sběru	Lokalita
126	Orthobunyavirus	1 nasátá samice, 1 samice nenasátá, 1 samec nebo nymfa	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
131	Orthobunyavirus	1 nasátý dospělec samice, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
132	Orthobunyavirus	1 dospělá nasátá samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
136	Orthobunyavirus	1 nasátá samice, 1 žlutý samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	12.7.2012	Jan Mayen
156	Flavivirus	2 nasáté samice, 1 nenasátá samice	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	16.7.2012	Jan Mayen
157	Orthobunyavirus	2 nasáté samice, 1 nenasátá samice	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	16.7.2012	Jan Mayen
128	Orthobunyavirus	1 nasátá samice, 1 sv. hnědý samec	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
129	Orthobunyavirus	1 hnědý samec, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012	Jan Mayen
136	Orthobunyavirus	1 nasátá samice, 1 žlutý samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	12.7.2012	Jan Mayen
1	Orthobunyavirus	pozitivní kontrola TAHV			

Příklad popisovaných bandů můžeme vidět na Obr. 10., kde vzorky B2, B3 a F2 jsou jedny z našich sekvenovaných a následně klonovaných.



Obrázek 10: Gel vzorků pro - Alphaviruses, Orthobunyaviruses, Flaviviruses a Orbiviruses.

Abychom mohli s jistotou vyloučit výskyt virů z čeledi Orthobunyavirus, vložili jsme DNA ze čtyř z těchto vzorků (Tab. 8) vyizolované po PCR do plazmidu pCR4 pomocí soupravy TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing. Buňky obsahující námi vložený vektor rostly na LB mediu s ampicilinem o koncentraci 50 µg/ml. Získané bakteriální klony byly selektovány na přítomnost plazmidu za využití ampicilinu o koncentraci 50 µg/ml a na přítomnost inzertu pomocí „blue/white“ selekce za využití X-Gal. Plazmidová DNA z deseti náhodně vybraných klonů byla následně vyizolována a osekvenována. Získané sekvence nevykazovaly podobnost s žádnou virovou či jinou nukleovou kyselinou uloženou v databázi GenBank.

Tabulka 8: Klonování vzorků ze dnů 11.6.2014 a 18.6.2014.

Číslo vzorku	Kusy/typ	Odkud	Datum sběru
126	1 nasátá samice, 1 samice nenasátá, 1 samec nebo nymfa	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012
128	1 nasátá samice, 1 sv. hnědý samec	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012
129	1 samec hnědý, 2 nymfy	<i>Uria lomvia</i> – alkoun tlustozobý	8.7.2012
136	1 nasátá samice, 1 žlutý samec	<i>Uria aalge</i> – alkoun úzkozobý	12.7.2012

## 6. DISKUZE

### 6.1 Průběh práce

Cílem této práce bylo vyšetřit celkem 377 komárů a 89 klíšťat ze sledovaných oblastí a zjistit výskyt arbovirů a jejich případnou prevalenci. V žádném ze vzorků nebyl zjištěn výskyt arbovirů.

Odlišností od podobných studií byl malý počet zkoumaných vzorků. V jiných výzkumných pracích se provádí testování minimálně na tisících komárech a stovkách klíšťat (Hubálek et al., 2010; Rudolf et al., 2014; Cisak et al., 2002). Důvodem je obtížné získávání vzorků. Většina míst, odkud jsme vzorky získali, byla označena za přírodní rezervace s co nejnižším zásahem člověka. Zároveň i převoz vzorků a jejich uchování má vliv na jejich potencionální konečný stav. Většina částí pracovního postupu vyžaduje práci s RNA, proto by vzorky měly být ihned po sběru zamrazeny a v tomto stavu doručeny až na místo určení. Následkem nedodržení výše zmíněného pravidla byli například komáři, použítí pro tento výzkum, dopraveni z Grónských oblastí v rozmraženém stavu. Klíšťata z oblastí ostrova Jana Mayena, Svalbardu a Bjørnøya byla po celou dobu od data sběru až po vyšetření naložena v lihu, což pro RNA není úplně vhodné uchování. Většina vzorků klíšťat byla sebrána v roce 2012, ale sběry byly provedeny i v předešlých ročnicích (2008, 2010). Tento fakt relativního stáří vyšetřovaných vzorků by mohl mít dopad na naše následné výsledky. Ale použití mnoha pozitivních kontrol a opatrná práce vyloučily masivní degradaci RNA během skladování a zpracování vzorků. Degradaci menších částí nukleových kyselin nelze vyloučit, nicméně by to mělo mít pouze okrajový vliv na eventuální výsledky.

Na izolaci RNA ze vzorků jsme pro tuto studii použili soupravy od dvou různých firem (viz kapitola 4 Metodika). Pro vzorky komárů jsme použili soupravu QIAamp® Viral RNA Mini kit (Qiagen) a pro vzorky klíšťat soupravu RNAGem Tissue (Zygem). V porovnání je souprava od firmy Zygem snazší, rychlejší a izolaci lze provést bez použití kolonky, což může způsobit menší ztrátovost daného produktu. Ale na konečné výsledky nemělo užívání dvou souprav žádný zásadní dopad, jak bylo ukázáno pomocí pozitivních kontrol.

V průběhu práce jsme u některých vzorků po PCR reakci objevili DNA molekuly ve stejné velikosti, jako u pozitivní kontroly. Následné sekvenování ukázalo, že se jedná o směs nesespecifických molekul, ke kterým neexistuje v databázi GenBank žádná homologická

sekvence. Falešně pozitivní výsledek byl pravděpodobně způsoben nespecifickým nasedáním primerů na klíštěcí nukleové kyseliny. Zajímavostí je, že všechny tyto falešně pozitivní výsledky, až na jedinou výjimku, pocházely ze vzorků, které obsahovaly minimálně jedno nasáté klíště (nymfu, dospělce), což znamená, že amplifikovaný úsek mohl pocházet z molekuly RNA, která je exprimována pouze po nasátí klíštěte.

## 6.2 Šíření arbovirů do vyšších zeměpisných šířek

V poslední době byl zaznamenán velký rozmach výzkumů v arktických či antarktických oblastech. Je to díky větší dostupnosti daných míst, objevení nových poznatků, daleko většímu financování na podporu rozvoje atd. Díky těmto progresivním výzkumům se dokázalo, že jak klíšťata, tak komáři se posouvají do vyšších zeměpisných šířek. Důvodem těchto nových poznatků a přibývajících studií bylo zahájení naší studie, jejíž hypotéza předpokládá výskyt arbovirů v těchto oblastech. Tento předpoklad byl navržen zejména na základě změn klimatu v polárních oblastech Arktidy a také globálního oteplování, tání ledovců, či mírnějšího zimního období (Sumilo et al., 2007). Tyto podmínky totiž umožňují zdejším vektorům přizpůsobit jejich životní cyklus a vytvářet tak významné populace (viz kapitola 2 Vektoři).

Příkladem může být zaznamenaný výskyt klíšťat ve Švédsku (Lindgren et al., 2000) s čímž souvisí první výskyt klíšťové encefalidity (2001) v této oblasti (Lindgren a Gustafson, 2001). Dále sem lze zařadit také upozornění na první případ výskytu viru klíšťové encefalidity v Norsku (Skarpaas et al., 2004). V roce 2002 byl taktéž zaznamenaný výskyt klíšťové encefalidity v další severské zemi Evropy, ve Finsku (Jääskeläinen et al., 2006). Dalším faktorem ovlivňujícím výskyt vektorů ve vyšších zeměpisných šířkách může být zvyšování populace vysoké zvěře, která je hostitelem pro dospělá stádia klíšťat. Vysoká zvěř přečkává zimní období spíše v nižších nadmořských výškách a v jarním období migruje zpět do horských oblastí (Materna et al., 2005).

Změna klimatických podmínek má evidentně vliv na výskyt populací klíštěte. Příkladem je druh klíštěte *Ixodes uriae* (Insecta; Diptera; Culicidae) na Svalbardu, u něhož byl proveden výzkum zabývající se závislostí mezi tímto parazitem a jeho hostitelem. Ukázalo se, že výskyt ptáků Alkouna tlustozobého (*Uria lomvia*) s tímto ektoparazitem v dalším rozmnožovacím období je o 5 % vyšší, pokud se teplota zvýší pouze o 1°C

(Descamps, 2014). To znamená, že se zvyšováním teploty se v Arktidě budou zvyšovat kolonie ptáků, tím pádem i počty klíšťat, z čehož vyplývá i vyšší procento možnosti výskytu arbovirů. Jestliže jsou nakažená klíšťata rodu *Ixodes* (*Ixodes uriae*) pravidelně nacházena v nižších zeměpisných šířkách až po sever atlantských ostrovů, je jen otázkou času, kdy i některé klíšťové patogeny budou zavlečeny do Arktidy s nimi.

## 7. ZÁVĚR

Byla vypracována literární rešerše na téma výskyt arbovirů v Grónsku a na Svalbardu. Během práce byly vyšetřeny klíšťata a komáři z polárních oblastí na výskyt arbovirů. Získané sekvence některých vzorků byly porovnány s již známými sekvencemi v databázi GenBank. Bylo provedeno i klonování 4 vybraných vzorků. Díky všem provedeným úkonům, byl následně jakýkoliv výskyt daných virů v našich vzorcích vyloučen. Ale kvůli malému počtu studovaných vzorků nelze vyloučit výskyt těchto patogenů v oblasti. Do budoucna bude tedy nutné zopakovat tentýž typ studie na větším množství jedinců.

## 8. ZDROJE

**Atkins G. J.; Sheahan B. J.; Liljeström P. (1999).** The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *Journal of General Virology*. 80:9:2287-2297.

**Attoui H.; Jaafar F. M.; Micco de P.; Lamballerie de X. (2005).** Coltiviruses and Seadornaviruses in North America, Europe, and Asia. 11:11:1673-1679.

**Barton T. R.; Harrisa M. P.; Wanlessa S.; Elstona D. A. (1996)** The activity periods and life-cycle of the tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) in relation to host breeding strategies. *Parasitology*. 112:06:571-580.

**Barbosa A.; Benzal J.; Vidal V.; D'Amico V.; Coria N.; Diaz J.; Motas M.; Palacios M. J.; Cuervo J. J.; Ortiz J.; Chitimia L. (2011).** Seabird ticks (*Ixodes uriae*) distribution along the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*. 34:1621-1624.

**Briese T.; Calisher Ch. H.; Higgs S. (2013).** Viruses of the family Bunyaviridae: Are all available isolates reassortants? *Virology*. 446:207–216.

**Cisak E.; Chmielewska-Badora J.; Rajtar B.; Zwolinski J.; Jablonski L.; Dutkiewicz J. (2002).** Study on the occurrence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks collected in Lublin region (eastern Poland). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 9:1:105-110.

**Coulson S. J. (2007).** Terrestrial and freshwater invertebrate fauna of the high Arctic archipelago of Svalbard. *Zootaxa*. 1448: 41-58.

**Coulson S. J.; Lorentzen E.; Strøm H.; Gabrielsen G. W. (2009).** The parasitic tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) on seabirds from Spitsbergen, Svalbard. *Polar Research*. 28:399-402.

**Dalrymple, J. M.; Vogel, S. N.; Teramoto, A. Y.; Russell, P. K. (1973).** Antigenic components of group A arbovirus virions. *Journal of virology*. 12:5:1034-1042.

**Danks H. V.; Kukul O.; Ring R. A. (1994).** Insect Cold-Hardiness: Insights from the Arctic. *ARCTIC*. 47:391-404.

**De Madrid A. T.; Porterfield J. S. (1974).** The Flavivirus (Group B Arboviruses): a Cross-neutralization Study. *Journal of General Virology*. 23:91-96.

**Descamps S. (2013).** Winter Temperature Affects the Prevalence of Ticks in an Arctic Seabird. *PLOS one*. 10:1371.

**Dietrich, M.; Go´mez-Di´az, E.; McCoy, K. D. (2011).** Worldwide Distribution and Diversity of Seabird Ticks: Implications for the Ecology and Epidemiology of Tick-Borne Pathogens. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 11:5:453-470.

**Dixon et al. (2008).** "African Swine Fever Virus". *Animal Viruses: Molecular Biology*. Caister Academic Press.



**Elsterová J.; Černý J.; Müllerová J.; Šíma R.; Coulson S.; Lorentzen E.; Grubhoffer L.; Růžek D.** Search for tick-borne pathogens on Svalbard archipelago and Jan Mayen. in preparation.

**Foley D. H.; Weitzman A. L.; Miller S. E.; Faran M. E.; Ruede M. L.; Wilkerson R. (2007).** The value of georeferenced collection records for predicting patterns of mosquito species richness and endemism in the Neotropics. *Ecological Entomology*. 33:12-23.

**Frenota Y.; Oliveiraa E.; Gauthier-Clercb M.; Deunffc J.; Bellidoa A.; Vernona P. (2001).** Life cycle of the tick *Ixodesuriae* in penguin colonies: relationships with host breeding activity. *International Journal for Parasitology*. 31:1040-1047.

**Gaunt M. W.; Sall A. A.; Lamballerie X.; Falconar A. K.; Dzhivianian T. I.; Gould E. A. (2001).** Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*. 82:1867-1876.

**Gíslason G. M. (2005).** „Why are there no mosquitoes in Iceland, when they live on both sides of Greenland?“. The Icelandic Web of Science.

**Goering R. V.; Dockrell H. M.; Zuckerman M; Chiodini P. L.; Roitt I. (2013).** *Mim's Medical Mikrobiology*, 5th edition published by Elsevier Mims.

**Gordon S. W.; Linthicum K. J.; Moulton J. R. (1993).** Transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in two species of *Hyalomma* ticks from infected adults to cofeeding immature forms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 48:4:576-580.

**Gubler D. J. (1996).** Arboviruses as imported disease agents: the need for increased awareness. *Archives of Virology*. 11:21-32.

**Gubler, D. J. (1998).** Dengue a dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*. 11:3:480-496.

**Gylfe O. B.; Strasevicius D.; Marti Ras N.; Weihe P.; Noppa L.; Ostberg Y.; Baraton G.; Bergstrom S. (1999).** Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins (*Fratercula arctica*) and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:4:890-896.

**Han G. Z.; Worobey M. (2011).** Homologous Recombination in Negative Sense RNA Viruses. *Viruses*. 3:8:1358-1373.

**Hardy J. L.; Rosen L.; Reeves W. C.; Scrivani R. P.; Presser S. B. (1984).** Experimental transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus by *Culex* *Aedes* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 33:1:166-175.

**Hayes E. B.; Komar N.; Nasci R. S.; Montgomery S.; O'Leary D. R.; Campbell G. L. (2005).** Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile Virus Disease. *Perspective*. 11:8.

**Hernandez R.; Brown D. T.; Paredes A. (2014).** Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. *Advances in Virology*. Article ID 259382. 24 pages.

**Hunt M.** Virology – chapter twenty one. Arboviruses.  
<http://www.microbiologybook.org/mhunt/arbo.htm>.

**Hubálek Z.; Rudolf I.; Bakonvi T.; Kazdová K.; Halouzka J.; Sebesta O.; Sikutová S.; Juricová Z.; Nowotný N. (2010).** Mosquito (Diptera: Culicidae) surveillance for arboviruses in an area endemic for West Nile (Lineage Rabensburg) and Tahyna viruses in Central Europe. *Journal of Medical Entomology*. 47:3:466-472.

**Hubálek Z.; Rudolf I.; Nowotný N. (2014).** Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Advances in Virus Research*. 89:201-275.

**Jablonski D.; Kaustuv R.; Valentine W. J. (2006).** Out of the Tropics: Evolutionary Dynamics of the Latitudinal Diversity Gradient. *Science*. 6:102-106.

**Jääskeläinen A. E.; Tikkakoski T.; Uzcátequi N. Y.; Alekseev A. N.; Vaheri A.; Vapalahti O. (2006).** Siberian subtype tickborne encephalitis virus, Finland. *Emerg Infect Dis*. 12:1568-1571.

**Kenneth T. (2008).** Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology. *The Lancet Infectious Diseases*. 8:4:224.

**Kuno G.; Chang G. J. (2005).** Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology reviews*. 18:4:608-637.

**Labuda M.; Jones L. D.; Williams S T.; Nutall P. A. (1993).** Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology*. 7:193-196.

**Lindgren, E.; Gustafson R. (2001).** Climate change - the new bioterrorism. *The Lancet*. 358:9294:16-18.

**Lindgren, E.; Tälleklint L.; T. Polfeldt. (2000).** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ Health Perspect*. 108:119-123.

**L'vov D. K. (1978).** In *Arctic and Tropical Arboviruses*. Edit by Edouard Kurstak. Academic Press, New York. 21-38.

**L'vov S. D.; Gromashevskii V. L.; Morozova T. N.; Aristova V. A.; Skvortsova T. M.; Galkina I. V.; L'vov D. K.; Butenko A. M.; Mitchell K. D.; Savage H. M.; Selivanov I. a M.; Egorov N. Ia.; Androsov I. A.; Tugutov L. D.; Cherniavskii V. F.; Mikhaïlova N. B.; Mayer V. A.; Galimov V. R.; Sokolova N. G.; Andronova O. N.; Semenov V. B.; Baïluk F. N.; Pogorelyĭ Iu. D.; Fadeev E. S.; Grekov E. I. (1997).** Distribution of viruses from the Californian encephalitis serogroup (Bunyaviridae, Bunyavirus) in the northern expanses of Russia. 42:5:229-235.

**L'vov S. D.; Gromashevskij V. L.; Skvortsova T. M.; Aristova V. A.; Golobinskij E. P.; Gorin O. Z.; Kolobukhina L. V.; Morozova T. N.; Feoktistov A. Z. (1995).** Mosquito-borne arboviruses in the Baikal region. Voprosy virusologii. 40:4:170-172.

**L'vov S. D.; L'vov D. K.; Kilmenko S. M.; Gaidarnovich S. Y. (1989).** Arboviruses in high latitudes, in Arboviruses and Arboviral Infections.

**L'vov D. K.; Tsyarkin Y. M.; Karas, F. R.; Timopheev E. M.; Gromashevski V. L.; Veselovskay O. V.; Osipova N. Z.; Fomina K. B.; Grebenyuk Y. I. (1973).** 'Sokuluk' Virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1775, bat in the Kirghiz S.S.R". Archiv für die gesamte Virusforschung. 41:3:170.

**Materna J.; Daniel M.; Danielova V. (2005).** Altitudinal distribution limit of the tick *Ixodes ricinus* shifted considerably towards higher altitudes in central Europe: results of three years monitoring in the Krkonose Mts. (Czech Republic). Central European Journal Public Health. 13:24-28.

**McCoy K. D.; Chapuis E.; Tirard C.; Boulinier T.; Michalakis Y.; Le Bohec C.; Le Maho Y.; Gauthier-Clerc M. (2005).** Recurrent evolution of host-specialized races in a global distributed parasite. Proceedings of the Royal Society of London. 272:2389–2395.

**McLean D. M. (1975).** Mosquito-borne arboviruses in arctic america. Biology and Medicine. 53:5:264-70.

**McLean D. M. (1978).** Transmission of Northway and St. Louis encephalitis viruses by arctic mosquitoes [*Aedes communis*]. The National Agricultural Library.

**McLean D. M.; Crawford M. A.; Ladyman S. R.; Peers R. R.; Purvin-Good K. W. (1970).** California encephalitis and Powassan virus activity in British Columbia. American Journal of Epidemiology. 92:266-272.

**McLean D M.; Grass P. N.; Judd B. D.; Ligate L. V.; Peter K. K. (1977).** Bunyavirus isolations from mosquitoes in the western Canadian Arctic. Journal of Hygiene. 79:1: 61–71.

**McLean R. G.; Ubico S. R.; Docherty D. E.; Hansen W. R.; Sileo L.; Mcnamara T. S. (2001).** West Nile Virus Transmission and Ecology in Burda. Annals of the New York Academy of Science. 951:54–57.

- Mehlhorn, H. (2008).** Encyclopedia of Parasitology 3rd edition. 114-117.
- Mellor P. S.; Leake C. J. (2000).** Climatic and geographic influences on arboviral infections and vectors. Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties. 19:1:41-54.
- Mendez J. A.; Usme-Ciro J. A.; Domingo C.; Rey J. G.; Sanchez J. A.; Tenorio A.; Gallego-Gomez J. C. (2010).** Phylogenetic history demonstrates two different lineages of dengue type 1 virus in Columbia. Virology Journal. 7:226.
- Mezencio J. M. S.; Peixot M. L. P.; Ferreira, P. C. P.; Golgher R. R. (1978).** Induction of interferon by group C arboviruses. Archives of Virology. 58:4:355.
- Muzaffar S. B.; Jones I. L. (2007).** Activity periods and questing behavior of the seabird tick *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) on Gull Island, Newfoundland: the role of puffin chicks. Journal of Parasitology. 93:2: 258-264.
- Myint K. S.; Raengsakulrach B.; Young G. D.; Gettayacamin N.; Ferguson L. M.; Innis B. L.; Hoke Jr. C. H.; Vaughn D. W. (1999).** Production of lethal infection that resembles fatal human disease by intranasal inoculation of macaques with Japanese encephalitis virus. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 60:3:338-342.
- Nuttal P. A.; Jones L. D.; Labuda M.; Kaufman W. R. (1994).** Adaptations of Arboviruses to Ficka. Journal of Medical Entomology. 31:1-9.
- Perng G. C.; Chen W. J. (2013).** Arboviral Encephalitis. Dr. Sergey Tkachev (Ed.), ISBN: 978-953-51-0925-9.
- Pfeffer M.; Dobler G. (2010).** Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. Parasites & Vectors. 3:35.
- Reiter P. (2010).** Yellow Fever and Dengue: A threat to Europe? Eurosurveillance. 15:10:19509.
- Robert V.; Rocamora G.; Julienne S.; Goodman S. M. (2011).** Why are anopheline mosquitoes not present in the Seychelles? Malaria Journal. 10:10-31.
- Rosen L.; Shroyer D. A.; Tesh R. B.; Freier J. E.; Lien J. C. (1983).** Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. The American journal of tropical medicine and hygiene. 32:5:1108-1119.
- Rudolf I.; Bakonyi T.; Sebesta O.; Mendel J.; Peško J.; Betaskova L.; Blazejova H.; Venclikova K.; Straková P.; Nowotny N.; Hubalek Z. (2014).** West Nile Virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech republic, 2013: Expansion of the european WNV endemic area to the north? Eurosurveillance. 19:31.
- Rust R. S. (2012).** Human arboviral encephalitis. Semin Pediatr Neurol. 19:3:130-151.

- Schilte C.; Staikowsky F.; Couderc T.; Madec Y.; Carpentier F.; Kassab S.; Albert M. L.; Lecuit M.; Michault A. (2013).** Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS neglected tropical diseases*. 7:31:12.
- Shope, R. E.; Woodall, J. P.; da Rosa, A. T. (1988).** Monath, T. P., ed. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology* 3. CRC Press. pp 38.
- Socolovschi C.; Huynh T. P.; Davoust B.; Gomez J.; Raoult D.; Parola P. (2009).** Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:2.
- Stiasny K.; Kössl C.; Lepault J.; Rey F. A.; Heinz FX - Stiasny K.; Kössl C.; Lepault J.; Rey F. A.; Heinz F. X. (2007).** Characterization of a Structural Intermediate of Flavivirus Membrane Fusion. *PLOS Pathogens*. 3:2:20.
- Sted J. (2009).** Parasitizing behavior of *Ixodes uriae* ticks on Chilean Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) and their importance as pathogen vectors. *Biology 240hp*. Degree Project Work, Biology. pp 30.
- Sun X.; Fu S.; Gong Z.; Ge J.; Meng W.; Feng Y.; Wang J.; Zhai Y.; Wang H.; Nasci R.; Wang H.; Tang Q.; Liang G. (2009).** Distribution of arboviruses and mosquitoes in northwestern Yunnan Province, China. *Vector Borne Zoonotic*. 9:6:623-630.
- Sumilo D.; Asokliene L.; Bormane A.; Vasilenko V.; Golovljova I.; Randolph S. E. (2007).** Climate Change Cannot Explain the Upsurge of Tick-Borne Encephalitis in the Baltics. *PLOS one*. 2:6.
- Tauraso N. M.; Shelokov A. (1967).** Arboviruses — A problem in classification. *Archiv für die gesamte Virusforschung*. 22:1-2:273-27.
- Tesh, R. B.; Gajdusek, D. C.; Garruto, R. M.; Cross, J. H.; Rosen, L. (1975).** The distribution and prevalence of group A arbovirus neutralizing antibodies among human populations in Southeast Asia and the Pacific islands. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 24:4:664–675.
- Turner C.; Witwer Ch.; Hofacker I. L.; Stadler P. F. (2004).** Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes. *Journal of General Virology*. 85:1113–1124.
- Uyar Y. (2013).** Arboviral Infections around the World. *Journal of Tropical Diseases*. 1:4:105.
- Wang J.; Zhang H.; Sun X.; Fu S.; Wang H.; Feng Y.; Wang H.; Tang Q.; Liang G. D. (2011).** Distribution of mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in Yunnan Province near the China-Myanmar-Laos border. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 84:5:738-746.
- Weaver S. C. (2005).** Host range, amplification and arboviral disease emergence. *Archives of Virology*. 19:33-44.

**Weaver S. C. (2006).** Evolutionary influences in arboviral disease. *Current Topic in Microbiology and Immunology*. 299:285-314.

**Yunker C. E. (1975).** Tick-borne viruses associated with seabirds in North America and related islands. *Medical Biology*. 53:5:302-311.

**Zumpt F. (1952).** The Ticks of sea birds. Australian National Antarctic Research Expedition. Reports. 1:12-20.