

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy

Diplomová práce

Bc. Jana Müllerová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., Hon. D.Sc.

Konzultant: RNDr. Jana Elsterová

České Budějovice, 2018

Müllerová, Jana., 2018: Detekce virů v biologických vzorcích pocházejících z polárních oblastí [Detection of zoonotic infection in samples from Arctic. Mgr. Thesis, in Czech] – 87 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis is focused on monitoring of zoonotic viruses in samples from North Atlantic areas. The research area of this thesis is divided into two main topics: i) detection of arboviruses in mosquitoes *Aedes nigripes* from Greenland and Svalbard; ii) detection of antibodies against avian influenza virus (AIV) from blood sera of black-legged kittiwakes *Rissa tridactyla* from Svalbard. The mosquitoes were tested on the presence of 5 genera of arboviruses (*Orthonyavirus*, *Orbivirus*, *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Phlebovirus*), using RT-PCR. For evidence of the presence of AIV in blood sera were performed two immunodetection methods (ELISA and hemagglutination inhibition tests (HI)). Within the detection of AIV, we formulated a metanalysis of occurrence of AIV in polar areas using statistical tests. From obtained results, no presence of arboviruses in mosquitoes were detected, whereas detection of AIV revealed occurrence of antibodies against avian influenza in blood sera from black head kittiwakes from Svalbard. No detection of arboviruses in two studied areas suggested either no presence or low detectable prevalence of viruses. Nevertheless, positive results from research of AIV point out that black-legged kittiwakes from Svalbard were infected with AIV in the past. Thus, outputs of this thesis bring a new and exceptional insight into the occurrence of arboviruses and AIV in polar areas.

Práce byla finančně podpořena granty:

MŠMT Z60220518, AdmireVet ED006/01/01

GAČR 585410/3155, GAP 302/12/2490

MŠMT LM2015078, Czech Polar

CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708 Ecopolaris

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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

Velice ráda bych touto cestou poděkovala mému školiteli prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc., Hon. D.Sc. za odborné vedení, konzultace, pomoc, za velmi vřelý přístup a poskytnutí prostředků pro mou diplomovou práci. Neméně důležité poděkování patří mé konzultantce RNDr. Janě Elsterové za její trpělivost, cenné rady, vedení, a hlavně velmi laskavý a přátelský přístup. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Jiřímu Černému, Ph.D. za odbornou pomoc, rady, připomínky a skvělou spolupráci. Další poděkování patří všem členům Laboratoře molekulární ekologie vektorů a patogenů, zvláště Mgr. Zuzce Vavruškové za vlídné prostředí a pomoc při práci v laboratoři.

Také bych ráda na tomto místě poděkovala všem za pomoc při sbírání materiálu a poskytnutí vzorků pro mou diplomovou práci a členům Centra polární ekologie za umožnění cesty na Špicberky a získání dalších vzorků. Jmenovitě děkuji Mgr. Jakubovi Žárskému, Ph.D., RNDr. Václavu Pavlovi, Ph.D., doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc., doc. Ing. Josefu Elsterovi, CSc.

A současně obrovské díky patří rodičům, celé mé rodině, přátelům a partnerovi za projevenou podporu nejen při studiu.

OBSAH

1	OBEČNÝ ÚVOD	1
1.1	Zoonózy	3
1.1.1	Způsob přenosu vybraných zoonóz	3
1.2	Arboviry	4
1.2.1	Taxonomie a charakteristika.....	5
1.2.1.1	<i>Bunyvirales</i>	5
1.2.1.2	<i>Reoviridae</i>	5
1.2.1.3	<i>Togaviridae</i>	6
1.2.1.4	<i>Flaviviridae</i>	6
1.2.2	Přenos arbovirů.....	7
1.2.2.1	Vektoři	7
1.2.2.2	Cirkulace viru ve vektorovi	7
1.2.2.3	Přenos arbovirů z vektora na hostitele.....	8
1.2.2.4	Mezihostitelský přenos	9
1.2.3	Výskyt v polárních oblastech	10
1.3	Virus chřipky.....	14
1.3.1	Molekulární struktura a variability viru.....	17
1.3.2	Subtypy.....	19
1.3.3	Výskyt a šíření viru	20
2	CÍLE PRÁCE.....	22
3	MATERIÁL A METODY	23
3.1	Polární oblasti a vymezení Arktidy	23
3.2	Vyšetřování arbovirů.....	24
3.2.1	Přehled vzorků a popis oblasti.....	24
3.2.2	Izolace RNA	26
3.2.3	Reverzní transkripce (RT-PCR)	26
3.2.4	Elektroforéza	28
3.2.5	Purifikace DNA z PCR reakce	29
3.2.6	Sekvenování	29
3.3	Detekce chřipky	29
3.3.1	Metaanalýza výskytu AIV v polárních oblastech severní polokoule	29
3.3.2	Statistické vyhodnocení.....	30
3.3.3	Získané vzorky a charakteristika místa odběru	31

3.3.4	ELISA test	34
3.3.5	Hemaglutinačně inhibiční test	34
3.3.6	Grafické zpracování.....	34
4	VÝSLEDKY	35
4.1	Arboviry	35
4.1.1	Vzorky	35
4.1.2	Optimalizace metodiky pro detekci arbovirových sekvencí u vzorků komárů <i>Ae.nigripes</i>	36
4.1.2.1	Charakteristika pozitivních kontrol	36
4.1.2.2	Kontrola kvality RNA.....	40
4.1.2.3	Detekce arbovirů z komárů.....	40
4.2	Porovnání výskytu ptačí chřipky ve vymezené lokalitě polárních oblastí	44
4.2.1	Taxonomické rozdělení ptačích hostitelů AIV v polárních oblastech.....	44
4.2.2	Rozdělení ptačích hostitelů AIV v polárních oblastech do kategorií	47
4.3	Detekce protilátek proti AIV v séru racků tříprstých ze Svalbardu	49
4.3.1	Původ vzorků k analýze výskytu AIV v dané kolonii	49
4.3.2	Detekce specifických protilátek proti viru ptačí chřipky typu A pomocí metody ELISA	49
4.3.3	Subtypizace AIV	50
5	DISKUZE	52
5.1	Arboviry	52
5.1.1	Vzorky komárů	52
5.1.2	Arboviry a polární oblasti.....	53
5.1.3	Následná práce a analýzy	54
5.2	Metaanalýza	55
5.3	Ptačí chřipka.....	56
5.3.1	Získané vzorky	56
5.3.2	Vliv klimatických změn na virus ptačí chřipky	57
5.3.3	Pokračující analýzy	58
6	ZÁVĚR	59
7	SEZNAM ZKRATEK	60
8	CITACE.....	63
9	PŘÍLOHY	78

1 OBECNÝ ÚVOD

Tato diplomová práce vznikla v Laboratoři molekulární ekologie vektorů a patogenů pod vedením prof. RNDr. Libora Grubhoffera, CSc., Hon., D.Sc v Biologickém centru Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích ve spolupráci s Laboratoří arbovirologie ze stejného institutu a Centrem polární ekologie z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity.

Výjimečností instituce Centra polární ekologie je arktická vědecká infrastruktura Josefa Svobody v Arktidě, která zahrnuje základnu v Longyearbyenu nazvanou Payerův dům a terénní stanici v zátocě Petuniabukta. Centrum polární ekologie každoročně umožňuje několika vybraným studentům a vědeckým pracovníkům pobyt a vypracování předem vybraných projektů v místech vědecké infrastruktury Josefa Svobody či jejich okolí. Díky této výhodě vzniká možnost každoročně navštívit oblasti Svalbardu, pohybovat se ve stejných místech, sledovat možné změny daného prostředí a sbírat vzorky z každé sezóny. Z těchto vzorků poté provádět studie a získat nové informace o zatím neprobádaném území co se virů týče. Já jsem byla jedním ze studentů, který mohl podniknout cestu na Svalbard, vypracovat svůj projekt, nasbírat další vzorky a tím rozšířit studii o virových zoonózách v Arktidě.

Tématem této diplomová práce je detekce virů v biologických vzorcích pocházejících z polárních oblastí. Nejprve jsme se zaměřili na výskyt arbovirů ze vzorků komárů nachytaných a získaných z oblastí Svalbardu a Grónska a poté se věnovali výskytu viru ptačí chřipky v kolonii mořských ptáků, racků tříprstých (*Rissa tridactyla*), v osadě Pyramiden (Svalbard).

Polární oblasti (Arktida a Antarktida) jsou specifické zejména studenými teplotními podmínkami a přítomností ledu, sněhu a vody ve zmrzlém skupenství po celý rok. Hlavní rozdíl mezi těmito oblastmi je, že Arktida je oblast zmrzlého oceánu obklopena ostrovy a pobřežím, zatímco Antarktida je zmrzlý kontinent obklopený oceány. Obě oblasti mají významný vliv na Světový oceán a také klimatické podmínky, jejichž změny výrazně ovlivňují hladinu moře.

Jedním z výrazných znaků polárních oblastí je proměnlivost sluneční radiace během roku od minimální v zimě až po 24 hodin trvajícího slunečního svitu v létě. Typickým jevem je také vysoké albedo sněhu a ledu a vysoké ztráty dlouhovlnného záření kvůli čisté

atmosféře. Další vlastností je nízká evaporace z obrovské zaledněné plochy moře a ledovce a s tím také související nízký počet srážek. Obrovské zaledněné plochy vytvářejí z polárních oblastí nehostinné prostředí pro mnoho druhů živočichů, zahrnující i lidi. Avšak existují druhy, které se dokáží na tyto specifické podmínky adaptovat jak v mořském, tak terestriálním ekosystému. Díky všem těmto podmínkám jsou oblasti Arktidy a Antarktidy charakterizovány jako zóny s výrazným biotem a hrají velmi důležitou roli pro mnoho migrujících živočichů. Oblast Arktidy disponuje velkým bohatstvím nerostných surovin, je nově osidlována a má vliv na ekonomickou aktivitu díky rybaření, lovu a lodní dopravě (Anisimov a spol., 2007).

Mezi velmi diskutovaná témata posledních let, která přispívají k měnícím se podmínkám v polárních oblastech, patří zejména změna klimatu a rozvoj migrace. Změna klimatu způsobuje v Arktidě mnohem rychlejší oteplování než ve zbytku světa, zmenšování, ztenčování a ústup mořského ledu, ale také rozmrzání permafrostu a uvolňování metanu do atmosféry, což vede k dalšímu urychlování oteplování. Dalším aspektem podporující případné šíření virů a jejich hostitelů do nových oblastí je velký nárůst migrace a rozvoj letecké dopravy.

Mimo již zmíněné okolnosti je významným důvodem pro mapování výskytu arbovirů na Svalbardu jejich celosvětové rozšíření a fakt, že jsou známy jako velmi významné patogeny nejen pro živočichy, ale hlavně pro lidi. Z dosavadní literatury je známo, že studium arbovirů v polárních oblastech je velice zanedbané téma a existuje málo publikací a studií, které se touto záležitostí zabývají. Tato konkrétní část diplomové práce navazuje na moji bakalářskou práci „Výskyt arbovirů v Grónsku a na Svalbardu,“ která se týká analýzy 89 klíšťat a 377 komárů ze stejných oblastí. Tato diplomová práce předešlou studii rozšiřuje a obohacuje o vzorky z dalších sezón a oblastí.

Navazující část práce pojednává o výskytu viru ptačí chřipky v osadě Pyramiden (Svalbard), kde sídlí kolonie mořských ptáků racků tříprstých. Tato kolonie se zdá být vhodným rezervoárem a hostitelem pro snadný přenos a cirkulaci viru ptačí chřipky. Pro tuto část práce se nám podařilo získat povolení (je uvedeno v přílohách) na odchyt racků, odběr krevních sér a stěrů a získat tak jedinečné vzorky a výsledky ze sezóny 2014.

Dále byla do této práce zahrnuta vytvořená metaanalýza na výskyt ptačí chřipky v polárních oblastech.

1.1 Zoonózy

Zoonotická onemocnění neboli zoonózy jsou definována jako onemocnění přirozeně přenosné ze zvířat na člověka. Mezi jejich původce se řadí viry, bakterie, houby, prvoci, paraziti a další (Hubálek, 2011). Za oblasti s největším počtem zoonóz jsou považována místa, kde je vysoká druhová diverzita živočichů a zároveň velká hustota zalidnění. Příkladem je Střední Amerika, Mediterán či subsaharská Afrika (Han a spol., 2016). Nicméně, zoonotické infekce se také nacházejí v oblastech méně obydlených, osídlených menším počtem živočichů, s méně vhodnými klimatickými podmínkami, jako je Arktida a Antarktida (Revich a spol., 2012). I v těchto konkrétních oblastech s extrémními podmínkami a omezenou dostupností se vyskytují příležitosti pro vznik a šíření zoonóz. V Antarktidě jsou vyhovujícími hostiteli obrovské kolonie tučňáků, v Arktidě jsou to početné kolonie hnízdících mořských ptáků na izolovaných ostrovech. Díky husté agregaci zvířat na jednom místě je přenos infekcí mezi jednotlivci snazší a může vést k tvorbě infekčních zoonóz, obzvláště při zavlečení nového patogenu (Hubálek, 2003).

Ke zvýšení počtu zoonotických infekcí přispívají aspekty, jako jsou klimatické podmínky, zeměpisné rozdělení a migrace. Ta usnadňuje zavlečení infekčních agens do nových oblastí a umožňuje celosvětové rozšíření virových infekcí (Mavroidi, 2008). Je ale nutné dodat, že i migrace zvířat je velmi důležitá, jmenovitě přirozená migrace ptáků. Mořští ptáci jsou jedním z dobře popsaných a prostudovaných rezervoárů pro virové zoonózy, které ohrožují lidské zdraví. Miliardy ptáků migrují každý rok přes celý svět a jsou velmi úspěšným hostitelem a rezervoárem například pro virus ptačí chřipky (AIV) či virus západonilské horečky (WNV), (Reed a spol., 2003).

1.1.1 Způsob přenosu vybraných zoonóz

Prvním způsobem přenosu virových zoonóz je přenos přes vektory. Toto téma bude podrobněji rozvedeno v kapitole Přenos přes vektory (1.2.3.1.). Je důležité zmínit, že infekce přenášené vektory se staly a stávají celosvětovým problémem. Příčinou je obrovské množství vektorů (např. členovců) a jejich celosvětové rozšíření, poměrně snadné rozmnožování a schopnost migrace (Gubler, 2002). Příkladem jsou epidemie, či dokonce pandemie žluté zimnice, (Gubler, 1998), horečky dengue, (Pushpa a spol., 1998), nebo poměrně nedávná epidemie viru Zika (ZIKV), (Teixieria a spol., 2016).

Druhým a poměrně snadným způsobem přenosu jsou zoonózy přenášené kapénkami přes vzduch. Tento způsob lze považovat za nejnebezpečnější a také touto cestou byly způsobeny obrovské pandemie závažné pro lidstvo. Příkladem je virus ptačí chřipky, který se v historii několikrát opakoval a způsobil úmrtí několika miliónů lidí (Kilbourne, 2006). Nebezpečné epidemie může způsobit například virus SARS (LeDuc a Barry, 2004).

Mezi další možnosti přenosu virových zoonóz se zahrnuje přenos přes kontaminovanou vodu nebo potraviny (orofekální přenos). U potravin byl zaznamenán případ přenosu viru hepatitidy E přes nedostatečně tepelně zpracované maso (Pavio a spol., 2010). Cesta šíření přes kontaminovanou vodu je typická pro infekci ptačí chřipky (Brown a spol., 2009).

1.2 Arboviry

Arboviry jsou různorodou polyfyletickou skupinou virů, sdílející podobnou ekologickou niku a s důležitým společným znakem - jsou přenášeny z krev sajících členovců na obratlovce (odvozeno od *arthropode – borne viruses*). Hlavními přenašeči jsou komáři rodu *Culex* a *Aedes*, pakomáři (*Chironomidae*) a roztoči (*Acari*), (Mellor, 2000). Většina arbovirů jsou RNA viry a jejich genom je tvořen jednou, nebo více molekulami RNA. Existuje výjimka - virus afrického moru prasete (ASFV), který je zatím jediným známým DNA arbovirem (Kleiboeker a Scoles 2001). Do arbovirů patří například virus dengue (DENV), virus žluté zimnice (YFV), chikungunya virus (CHIKV), virus klíšťové encefalitidy (TBEV) a v poslední době velmi studovaný virus Zika (ZIKV). Tyto viry způsobují závažná lidská onemocnění, jako jsou horečnatá onemocnění, hemoragické horečky a encefalitidy (Gould a spol., 2017).

Arboviry jsou vysoce patogenní také pro živočichy (savce, hlodavce, přežvýkavce, masožravce i ptáky), (Forrester a spol., 2012). Virus afrického moru koní (AHSV) způsobuje onemocnění jak u koní, tak u psů (Mellor a Boorman, 2016). Dalším příkladem je virus katarální horečky ovcí (BTV), který zabil více než 179 000 jedinců při poslední epidemii v Evropě (Mellor, 2000).

1.2.1 Taxonomie a charakteristika

Arboviry byly v historii několikrát rozdělovány a klasifikovány do čeledí a podčeledí podle několika kritérií, většinou podle chemických vlastností či molekulární struktury. Dnes se nejvíce připouští klasifikace podle evoluční příbuznosti spočítané na základě sekvenční podobnosti genomové nukleové kyseliny, ale existují i jiná rozdělení, která se vyskytují v odborné literatuře. Arboviry, které byly předmětem této diplomové práce, se rozdělují do následujících čeledí: *Reoviridae*, *Flaviviridae*, *Togaviridae* a *Peribunyaviridae* a *Phenuviridae* (převzato z <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> - poslední sborník ICTV - 2017).

1.2.1.1 *Bunyavirales*

Řád *Bunyavirales* se dělí do 9 čeledí, jednou z nich je *Peribunyaviridae*, kam se řadí rod *Orthobunyavirus*, a druhou pro nás důležitou čeledí je *Phenuviridae*, kam se zařazuje rod *Phlebovirus*. Genom tohoto řádu je tvořen RNA negativní polarity (Hughes a spol., 2017) a skládá se ze třech cirkulárních segmentů – L segment, který kóduje gen pro transkriptázu (Endres a spol., 1989), M segment pro povrchové virové glykoproteidy (Fazakerley a spol., 1988) a S segment, který kóduje gen pro nukleokapsidový protein (Fuller a spol., 1983). Genom je zabalen do lipidického obalu sférického tvaru a celý virus má velikost 90 – 100 nm, na povrchu se nacházejí glykoproteinové peplomery.

Příkladem virů z tohoto řádu, jež byly detekovány ve vysoké zeměpisné šířce v Rusku, jsou Zaliv Terpenia virus (ZTV) a Sakhalin virus (SAKV) (Kurstak, 1979).

1.2.1.2 *Reoviridae*

Čeď *Reoviridae* se dělí na 2 podčeledě, *Spinareovirinae* a *Sedoreoviridae*, kam se řadí rod *Orbivirus*. Zbylé rody z těchto dvou podčeledí se nezařazují mezi arboviry. Onemocnění, které je způsobeno arboviry z této čeledě, jsou horečnatá onemocnění s vyrážkou a artritidou, meningitidy, encefalitidy a encefalomyelitidy či hemoragické horečky. Viriony Reovirů měří 60 – 80 nm, mají dvojitou kapsidu, nejsou obalené a genom tvoří dvouvláknová RNA o 10 -12 segmentech (Winton a spol., 1989). Mezi významné zástupce rodu *Orbivirus* patří Tribeč virus (TRBV), který byl poprvé nalezen v roce 1963 na Slovensku v horách u klíšťat rodu *Ixodes ricinus* z malých hlodavců (Gresikova a spol., 1965), nebo Kemerovo virus (KEMV), který byl poprvé detekován v roce 1962 v Rusku z klíšťat *Ixodes persulcatus* (Chumakov, 1963). Právě Kemerovo virus byl objeven v ruských oblastech, zejména v provinciích Uralu (Sverdlovská oblast) nebo na západě a

východě Sibíře u klíšťat rodu *Ixodes persulcatus*, *Ixodes ricinus* a *Ixodes pavlovskyi* (Dedkov a spol., 2014).

1.2.1.3 *Togaviridae*

Čeď *Togaviridae* zahrnuje 2 rody – *Alphavirus* (který spadá do arbovirů) a *Rubivirus* (kam řadíme virus Rubeolla). Viry z rodu *Alphavirus* jsou malé obalené viry o velikosti 60 – 70nm s nesegmentovaným genomem tvořeným jednovláknovou RNA pozitivní polarit (Jose a spol., 2009).

Arboviry z rodu *Alphavirus* jsou přenášeny komáry až na výjimku, Southern elephant seal virus (SESV), který byl izolován ze vši rodu *Lepidophthirus macrorhini* na ostrově Macquarie (La Linn a spol., 2001). Arboviry přenášené komáry se podle literatury rozdělují do dvou skupin dle geografie – na viry Starého a Nového světa. Skupina virů Nového světa zahrnuje virus venezuelské koňské encefalomyelitidy (VEEV), virus koňské encefalomyelitidy východního typu (EEEV) a virus koňské encefalomyelitidy západního typu (WEEV), (Garmashova a spol., 2007). Viry z této skupiny jsou patogenní pro člověka, koně a některé ptáky. Druhá skupina je spojená s revmatickým onemocněním a způsobuje vyrážky u lidí. Zahrnuje například Sindbis virus (SINV), který byl zachycen ve Skandinávii a způsobuje onemocnění „Pogosta disease“ ve Finsku. Klinickými příznaky této infekce jsou artritida, svědění, únava, mírná horečka, bolest hlavy a svalů (Kurkela a spol., 2008).

1.2.1.4 *Flaviviridae*

Viry z čeledi *Flaviviridae* jsou velikostí kapsidy a genomu podobné virům z čeledě *Togaviridae*. Jedná se o malé viry o velikosti 40 -50nm, obal tvoří lipidová dvojrstva a genom je (+)ssRNA v rozmezí od 9 – 12 kb. Řadí se sem 4 rody, ale pouze viry z rodu *Flavivirus* jsou přenášeny členovci. Avšak název celé čeledě je odvozen od viru žluté zimnice (YFV). Podle typu přenašečů lze rod *Flavivirus* rozdělit na 3 skupiny. První zahrnuje viry přenášené komáry, druhá viry přenášené klíšťaty a třetí viry s neznámými bezobratlými hostiteli (Parreira a spol., 2012). Zástupcem, který se běžně vyskytuje v Arktidě, je Tuleniy virus, který je izolován z klíšťat rodu *Ixodes uriae* a *Ixodes putus*. Hostitelem v této oblasti bývají mořští ptáci, především alkoun úzkozobý (*Uria aalge*), ale protilátky byly nalezeny i u lachtanů (*Arctocephalus forsteri*) a lidí (Lvov a spol., 1972). U člověka způsobuje horečnatá onemocnění (Kurstak, 1979).

1.2.2 Přenos arbovirů

1.2.2.1 Vektoři

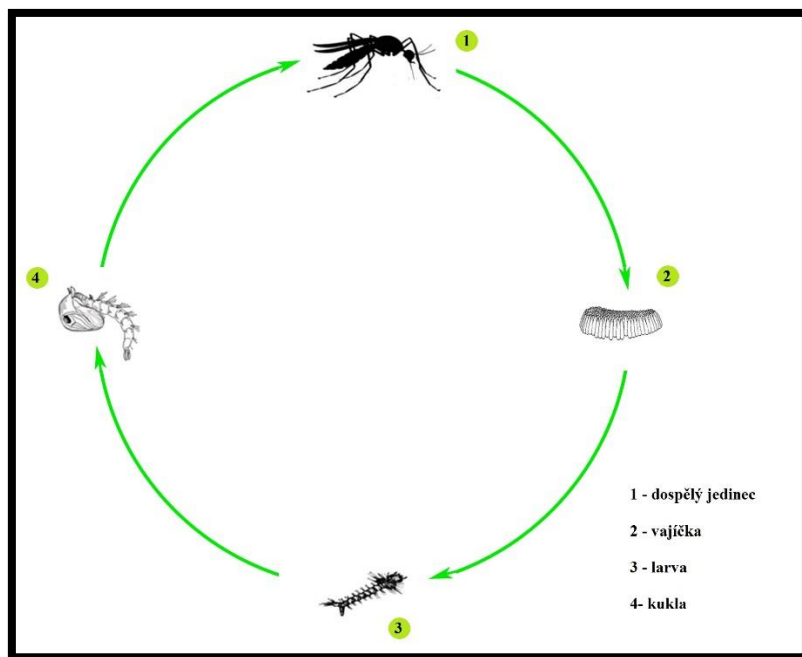
Mezi přenašeče arbovirových infekcí patří zástupci členovců (*Arthropoda*). Z řádu dvoukřídlých (*Diptera*) jsou to především komáři rodu *Aedes* a *Culex*, z řádu roztočů (*Acari*) jsou to klíšata rodu *Ixodes* a také zástupci vši z řádu *Phthiraptera*. V polárních oblastech, zejména v místech našeho zájmu, se vyskytuje několik krev sajících členovců. Především tam žijí komáři rodu *Aedes* (Culler a spol., 2015). Komáři rodu *Aedes* nejsou nijak významně biotopově specifictí, žijí v různých klimatických podmínkách v hojném počtu a nejsou ani výrazně hostitelsky zaměřeni. Podstatným zástupcem tohoto rodu je *Ae. egypti*, který se vyskytuje zejména v tropických a subtropických oblastech a je přenašečem závažných onemocnění, jako je žlutá zimnice či horečka dengue (Mutebi a spol., 2004). Mezi další zástupce patří například *Ae. vexans*, *Ae. caspius*, *Ae. punctator*.

V polárních oblastech jsou jedinci z rodu *Aedes* trvalými členy arktického ekosystému, a tak představují potenciální rezervoár pro mnoho infekčních onemocnění nebo snadnou cestu přenosu nákazy na další hostitele. Tito jedinci se však museli přizpůsobit zdejšími rozdílnými podmínkám, jako je trvalý chlad, větrné počasí, proměnná přítomnost hostitele, velký rozdíl teplot a slunečního záření v zimních a letních měsících (Hueffer a spol., 2011). U komárů byly také pozorovány zvláštní adaptace na arktické podmínky v kanadské Arktidě. Bylo zjištěno, že jejich páření probíhá bez rojení a oba druhy jsou schopny dokončit vývoj vajíček bez nutnosti nasátí krve (Somme, 1995). Na území ostrovů za polárním kruhem se vyskytují dva druhy komárů, kteří tu dominují – *Ae. impiger* a *Ae. nigripes* (Schäfer a Lundström, 2001). *Ae. nigripes* je zatím jediným monitorovaným komárem žijícím v oblastech ostrovů Svalbard a Jan Mayen (Coulson, 2007). V Grónsku se vyskytuje i druh *Ae. impiger* (Gíslason, 2005).

1.2.2.2 Cirkulace viru ve vektorovi

Pro přenos arbovirových infekcí je důležitý životní cyklus vektora (v tomto případě komára rodu *Aedes*). Samičky komárů *Ae. nigripes* kladou vajíčka buď na vodní hladinu, na mech, nebo vlhkou zem (James, 1966). Po 2 až 7 dnech se z vajíček vyvinou beznohé larvy komárů rodu *Aedes*, které žijí ve vodě, kde se živí mikroorganismy a organickým materiálem. Zůstávají blízko vodní hladiny a dýchají atmosférický vzduch přes dýchací sifo (Eldridge, 1990). Dalším vývojovým stadiem jsou pohyblivé kukly, které žijí také ve vodě, ale nepřijímají potravu. Pokud panují dostatečně vhodné podmínky, jsou larvy schopny vývoje za pouhých 7 dnů, a kukly dokonce za 2 dny, ale také to může trvat až několik týdnů,

dle okolních podmínek (Šebesta a Hubálek, 2004). Na konci stadia se poruší povrch kukly a vylézá dospělý jedinec. V dospělém stadiu se samička na rozdíl od samce živí krví, ten se živí nektarem z květů. Sání a živení se krví má pro samičku důležitý význam při kladení a dozrávání vajíček. Pokud se samička živí nektarem, snese méně vajíček (tzv. autogenie), (Sedlák, 2000). Všechna životní stádia a životní cyklus komára rodu *Aedes* jsou na Obr. 1.



Obrázek 1: Životní cyklus komára rodu *Aedes*.

K přenosu arbovirů neodmyslitelně patří aktivní množení viru v hmyzím přenašeči. Arboviry jsou definovány jako viry, které mohou běžně infikovat hematofágní členovce po nasátí krve z viremického obratlovce. Pokud vektor saje na infikovaném jedinci, virus se musí dostat do lumenu střeva. Poté proběhne fúze virového obalu s buněčnou membránou, tím virový genom vstoupí do cytoplazmy hostitelské buňky a může proběhnout jeho namnožení. Následuje rozšíření, nebo rozsev virionů ze střeva do haemocoelu. Následuje replikace viru ve slinných žlázách a přesun do slinných kanálků. Takto namnožený virus je schopen při následném kousnutí infikovat hostitele (Mellor, 2000).

1.2.2.3 Přenos arbovirů z vektora na hostitele

Hlavním typem přenosu arbovirů je horizontální přenos. Charakterizuje se jako přenos mezi hostitelem (obratlovcem) a krev sajícím bezobratlým vektorem (Lequime a Lambrechts, 2014). Infikovaný vektor přenáší virus na hostitele, ale také jsou známy případy, kdy neinfikovaný přenašeč se může nakazit během sání na infikovaném jedinci

(Kuno a Chang, 2005). Tímto druhem přenosu se přenášejí viry jako WNV, YFV nebo TBEV (Andayi a spol., 2014).

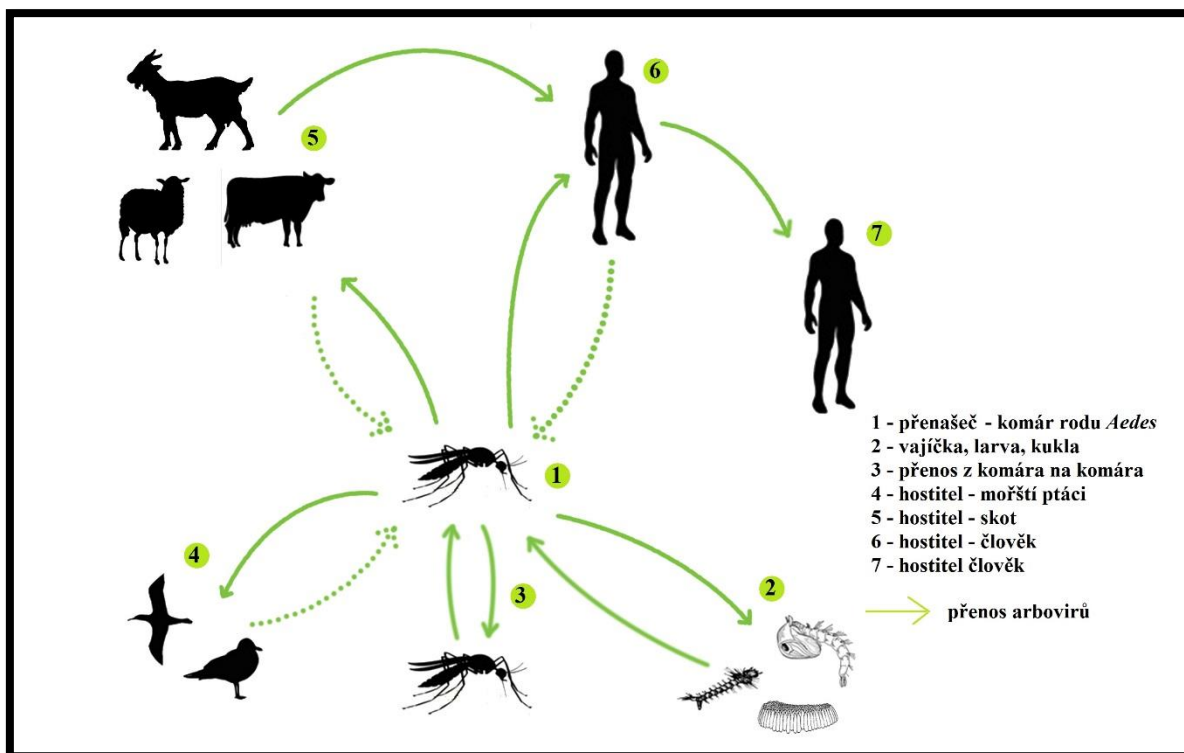
Druhý typ přenosu arbovirů je vertikální přenos. Do této kategorie se řadí transovariální přenos, kdy se virus musí namnožit a infikovat buňky reprodukčního systému. Při tomto způsobu se virus přenáší během kladení z nakažené matky na vajíčko (Hardy a spol., 1984). Tímto způsobem byl zaznamenán přenos Dengue viru (Costa a spol., 2017).

Další cestou nákazy larev komárů je možnost nakažení v kontaminované vodě během jejich krmení. Evidovaný případ tohoto způsobu přenosu byl u viru Rift Valley Fever (RVFV, *Phenuviridae*), (Turell a spol., 1990). Přenos infekce byl prokázán u komárů i při oplození, kdy neinfikovaná samička byla nakažena infikovaným samečkem (Mavale a spol., 2010).

1.2.2.4 Mezihostitelský přenos

Mimo výše zmíněné přenosy přes vektory existuje i přenos mezihostitelský. Jedním ze známých způsobů přenosu je nákaza přes mléko u koz, ovce, případně skotu. Takto se může infekce přenést na jejich potomky, nebo dokonce přes mléčné výrobky až na lidi (Pfeffer a Dobler, 2010). Další možná cesta nákazy je přes kontaminovanou potravu, například když se zvíře nakrmí na infikovaném uhynulém jedinci. Infekce se také může přenášet přes infikované tělní látky, jako je moč a výkaly (Kuno a Chang, 2005).

V nedávné době byl objeven přenos přes sperma u lidí a to se týká viru Zika (ZV), (Mansuy a spol., 2016). Všechny způsoby přenosu jsou zobrazeny na Obr. 2.



Obrázek 2: Grafické znázornění způsobů přenosů arbovirů popsanych v kapitole Přenos arbovirů (1.2.3.)

1.2.3 Výskyt v polárních oblastech

Arboviry v polárních oblastech byly zaznamenány v minulosti již několikrát. Byly objeveny v různých oblastech a také u mnoha druhů odlišných hostitelů. Byly detekovány buď asymptomaticky, nebo naopak s velmi širokou škálou klinických příznaků. Mnohé vědecké studie potvrdily výskyt protilátek proti již výše zmíněným arbovirům u hlodavců, savců či dokonce u lidí (Pierson a Graham, 2016; Descamps, 2013).

Mezi viry, které byly nalezeny po sérologických testech na protilátky u lidí, patří Northway virus (NWV, *Peribunyaviridae*), který byl detekován v oblastech Severní Ameriky (Sahu a spol., 2002), Sindbis virus (SINV, *Togaviridae*), který byl zaznamenán jak u savců, tak u lidí na Aljašce, Švédsku a Finsku (Walters a spol., 1999). Také byla zaznamenána detekce protilátek proti virům z čeledě *Flaviviradae*, jako je St. Louis encephalitis virus (SLEV) a West Nile virus (WNV), u různých druhů hostitelů ze skupiny obratlovců na Aljašce a v Kanadě (Pedersen a spol., 2016).

Arboviry byly zaznamenány na všech světových kontinentech vyjma kontinentální Antarktidy (Mc Lean, 1975; La Linn a spol., 2001). V minulosti byly ale opakovaně detekovány na jižní polokouli na ostrově Macquarie, ležícím v jihozápadní části Tichého oceánu, který se nachází přibližně v polovině vzdálenosti mezi Austrálií a Antarktidou (Doherty a spol., 1975; Major a spol., 2009). V této oblasti bylo zaznamenáno velké množství arbovirů z několika čeledí, například Catch me cave virus (CMCV, *Phenuviridae*), který byl nalezen u tučňáka skalního (*Eudyptes chrysocome*). Tučňáci představují jedny z nejhojnějších hostitelů na jižní polokouli (Major a spol., 2009).

Na severní polokouli je výskyt arbovirů pestřejší a arboviry zde byly zaznamenány na arktických územích několika států, a to například - Snowshoe hare virus (SSHV) z čeledě *Bunyviridae*, který byl objeven na Aljašce či v Kanadě (McLean, 1983; Mitchell a spol., 1993; Carson a spol., 2017). Nejhojnější výskyt arbovirů je v oblastech Arktického Ruska, Kanady, Aljašky, nebo Skandinávie. Zatímco na těchto místech byly arboviry dokumentovány, záznam o výskytu chybí z ostrovů v Arktickém oceánu, jako jsou Grónsko, Island nebo Svalbard. V nedávné době bylo provedeno i první vyšetření komárů rodu *Aedes* a klíšťat rodu *Ixodes* z oblastí Grónska, Svalbardu a ostrova Jana Mayena na výskyt arbovirů, ale zatím v těchto oblastech nebyl výskyt prokázán (Elsterová a spol., 2015; Müllerová a spol., 2018). Pro větší přehlednost byla vytvořena Tab. 1 se zaznamenanými arboviry, které byly detekované na území polárních oblastí.

Tabulka 1: Arboviry zaznamenané v polárních oblastech.

Viry přenášené klíšťaty	Čeďed/ Řád	Rod	Typ viru	Oblast	Přenašeč	Hostitel	Citace
	Reoviridae	Orbivirus	Great Island virus, Tribec virus, Kemerovo virus	S Atlantik, Aljaška, SV Rusko	<i>I. uriae</i> <i>I. signatus</i>	mořští ptáci (<i>Uria aalge</i> , <i>Risa tridactyla</i>) savci lidé	Dedkov a spol., 2005
			Okhotskiy virus	Rusko, USA, Kanada	<i>I. uriae</i> , <i>I. signatus</i>	mořští ptáci (<i>R. tridactyla</i> (<i>U. aalge</i> , <i>F. glacialis</i>)	Lvov a spol 1973
			Bauline virus	Norsko, Kanada	<i>I. uriae</i>	<i>F. arditia</i>	Main et al., 1973, Saikku et al., 1980
	Bunyavirales	Bunyavirus	Sakhalin virus	S Amerika, S Rusko	<i>I. uriae</i> , <i>I. signatus</i>	neznámý	Lvov a spol 1973
		Phlebovirus	Tahyna virus	Kolský poloostrov (SZ Rusko)	<i>Ae.</i> <i>communis</i>	neznámý	Lvov a spol., 1985
			Uukuniemi virus	S Atlantik, SZ Rusko	<i>I. uriae</i> , <i>I. signatus</i> <i>I. rucinus</i> <i>I. rothschildi</i>	mořští ptáci	Thomas L.A. a spol, 1973
			Catch me cave virus	Macquarie	<i>I. uriae</i>	tučňáci (<i>Eudypetes</i> <i>chrysocome</i>)	Major a spol., 2009
			Zaliv Terpeniya virus	Skandinávie, Rusko, Kanada	<i>I. uriae</i>	mořští ptáci (<i>U. aalge</i> (<i>U</i> <i>lomvia</i> , <i>R.</i> <i>tridactyla</i> , <i>Larus</i> <i>marinus</i>)	Lvov a spol 1973
	Flaviviridae	Flavivirus	Tyuleniy virus	Rusko, Aljaška, Norsko (Rost Island)	<i>I. uriae</i> <i>I. putus</i>	mořští ptáci (<i>Uria aalge</i> , <i>Uria lomvia</i> , <i>Fratercula</i> <i>arctica</i> ,	Lvov a spol., 1972 Thomas a spol., 1973

Viry přenášené komáři							
Togaviridae	Bunyvirales	Bunyavirus	California encephalitis virus	S Amerika, Norsko, Arktická Kanada	<i>Ae. canadensis</i> , <i>Ae. communis</i>	hlodavci (<i>Lepus Americanus</i>)	Kurstak a spol., 1979
			Inkoo virus	Skandinávie, Aljaška	<i>Ae. communis</i>	hlodavci (<i>Apodemus sp.</i> , <i>Microtus sp.</i> , <i>Sorex sp.</i>)	Brummer - Korvenk ontio a spol., 1973
			Chatanga virus	Finsko, Švédsko, Rusko	komáři	lidé	Putkuri a spol., 2016
			Snowshoe hare virus	Kanada, Aljaška	<i>Ae. canadensis</i> , <i>Ae. Communis</i> , <i>Culex inornata</i>	hlodavci (<i>Lepus americanus</i>)	McLean a spol., 1975, Mclean a spol., 1977
			Northway virus	Aljaška	komáři rodu <i>Aedes</i>	králíci, hraboši	Ritter a Feltz., 1974
	Alphavirus	Ghate virus	Bajkal	komáři	neznámý	Lvov a spol., 1995	
		Sindbis virus	Skandinávie	Komáři rodu <i>Culex</i>	ptáci lidé	Kurkela a spol., 2008	

1.3 Virus chřipky

Chřipka je vysoce infekční onemocnění způsobované chřipkovými viry typu A, B, C, které se řadí do čeledě virů *Orthomyxoviridae* (Rappole a Hubálek, 2006). Ptačí chřipka (Aviární influenza) je nakažlivé onemocnění především ptáků, ale i prasat či mořských savců, způsobené virem ptačí chřipky (*Avian influenza virus*, AIV). Způsobuje závažná onemocnění u volně žijícího ptactva, převážně u ptáků z řádu dlouhokřídlých (*Charadriiformes*) a vrubozobých (*Anseriformes*), (Curran a spol., 2014). Může také infikovat domestikovanou drůbež nebo savce včetně člověka (Vandegrift a spol., 2010).

Ptačí chřipce je v dnešní době věnováno mnoho pozornosti, nejvíce zkoumané jsou vysoce patogenní formy ptačí chřipky označované jako HPAIV (z anglického slovního spojení Highly Pathogenic Avian Influenza Virus), (Toennessen a spol., 2011). Tento typ byl poprvé objeven u volně žijícího ptáka rybáka obecného (*Sterna hirundo*) v roce 1961, (Becker, 1966). Druhým typem formy AIV jsou nízko patogenní formy neboli LPAIV (Low Pathogenic Avian Influenza Virus), které cirkulují hlavně u vodního ptactva (Verhagen a spol., 2015). Klasifikace vysoce a nízko patogenní formy chřipky se uvádí na základě virulence, kterou způsobuje u kuřat. HPAIV způsobují letální infekce a 100 % úmrtnost v rámci 48 hodin po zahájení infekce. Zatímco LPAIV, kterých je většina, způsobují výskyt infekce s nižší úmrtností a zřídka zapříčiní vypuknutí závažného onemocnění u drůbeže (Webster a spol., 1992). Rozdílná je i replikace a přenos viru u obou forem. LPAIV se replikují ve střevech, nebo dýchacích orgánech a jsou vylučovány převážně trusem infikovaných ptáků. Tedy přenos viru je hlavně fekálně-orální cestou (Webster a spol., 1992). V porovnání HPAIV se replikují v celém hostiteli a jsou mnohem snadněji přenášeny cestou přes horní cesty dýchací (Horimoto a Kawaoka, 2005).

Virus chřipky je kategorizován podle hostitele. Jako AIV se označují všechny chřipkové viry, jejichž prvním hostitelem byl pták. Podle hostitele se virus chřipky rozděluje na ptačí, prasečí (swine influenza), (Masic a spol., 2013) či koňský kmen (equine influenza). Mezi další známé hostitele patří velryby, psi, netopýři, lachtani, tygři a leopardi či fretky (Suarez, 2000; Riel a spol., 2007; Keawcharoen a spol., 2004). Virus chřipky se charakterizuje podle určení subtypů na základě dvou povrchových glykoproteinů HA - hemaglutininu a NA – neuroamidázy. Dosud bylo identifikováno 18 forem HA (Dusek a spol., 2014) a 11 typů NA (Sun a spol., 2014). Podle typu těchto proteinů se označují subtypy chřipky. Zjištěné subtypy AIV u různých hostitelů jsou zaznamenány na Obr. 3.

H1		
H2		
H3		
H4		
H5		
H6		
H7		
H8		
H9		
H10		
H11		
H12		
H13		
H14		
H15		
H16		
H17		
H18		

N1		
N2		
N3		
N4		
N5		
N6		
N7		
N8		
N9		
N10		
N11		

Obrázek 3: Souhrn subtypů Influenza viru podle proteinu HA a NA u jednotlivých hostitelů (převzato z <http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM10/GM10E.html> a Webster a Govorkova, 2014 a upraveno).

Z obrázku 3 je zřetelné, že infekce IAV se týká široké škály hostitelů včetně člověka. Chřipkové pandemie, které propukly u lidí, byly způsobeny různými subtypy IAV. První velká pandemie nazvaná španělská chřipka byla způsobená kmenem H1N1 a způsobila smrt nejméně 20 milionů lidí v letech 1918-1919 po celém světě. Druhý případ vzniku pandemie byl v roce 1957, kdy kmen H1N1 nahradil kmen H2N2, pandemie se rozšířila z Asie, a proto dostala název asijská chřipka. Třetí pandemie se vyskytla v roce 1968 v Hong Kongu subtypem H3N2 (Taubenberger a Morens, 2006). Další pandemie propukla v roce 1977, ta byla způsobena obdobným subtypem jako chřipka španělská H1N1, tentokrát se ale pandemie šířila z čínsko-ruského pohraničí a dostala název ruská chřipka (Reed a spol., 2003).

První prokázaný případ lidského onemocnění ptačí chřipkou byl zaznamenán v roce 1977 v Hong Kongu subtypem H5N1. Dále se virus rozšířil do několika oblastí v Asii (Thajsko, Jižní Korea, Čína), (Rappole a Hubálek, 2006). Dalším zjištěným subtypem AIV v lidské populaci byl H9N2. Onemocněly jím děti opět v Hong Kongu na konci 20. století (Peiris a spol., 1999). Od roku 2003 se začal virus šířit do Evropy (Nizozemí, Německo) a Afriky (Rappole a Hubálek, 2006). V České republice byla AIV poprvé objevena v roce 2006 v Hluboké nad Vltavou, kde byla nalezena uhynulá labuť velká (*Cygnus olor*), (převzato z World Health Organization: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_avian_influenza_update20140317).

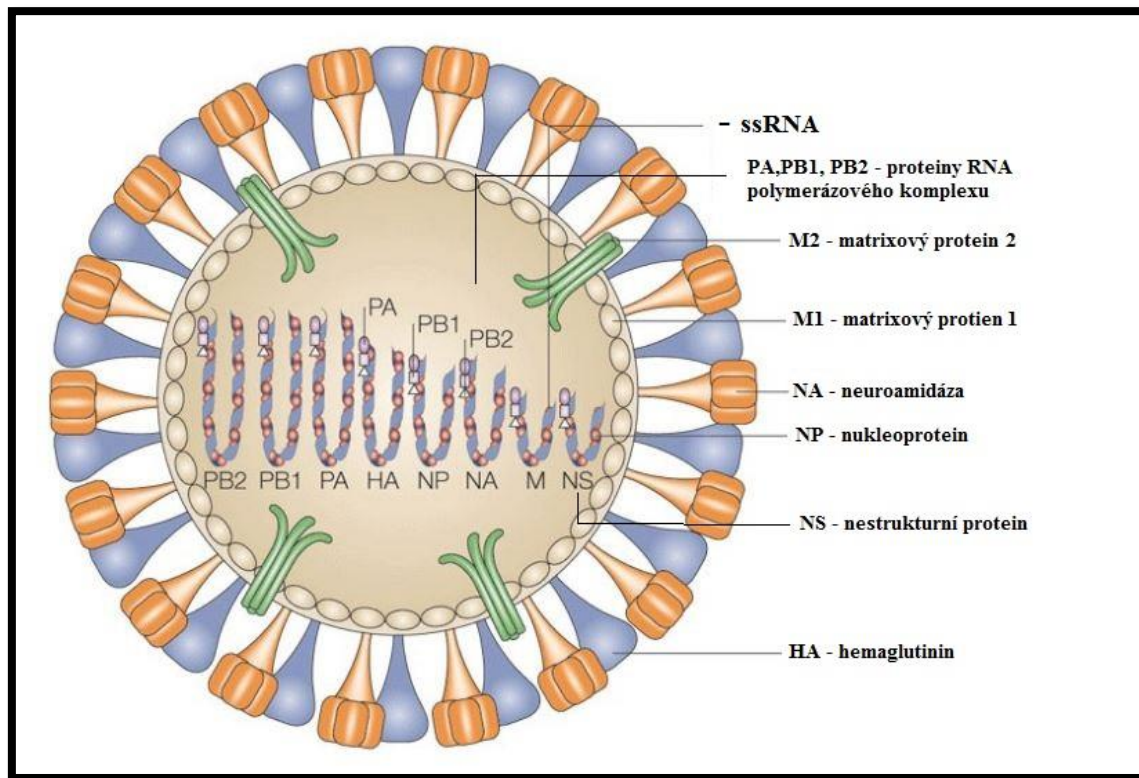
Jedním ze způsobů nákaz člověka je přímý styk s infikovaným zvířetem. Často zaznamenané případy infekce byly v místech chovu drůbeže (Capua a spol., 2010). Vysoké riziko možné nákazy vzniká při usmrcení či přípravě infikované zvěře ke spotřebě. Člověk se může nakazit při požívání infikovaného kusu masa, vajíčka nebo vnitřností (Spickler a spol., 2008).

Další možnost nákazy je respirační cestou, a to inhalací infekčního aerosolu, nebo fekálně orální cestou. Nebezpečným zdrojem je trus z infikovaných jedinců a kontaminovaná voda. Příkladem je každoroční vysoká nákaza mladých kachen na kanadských jezerech (Webster a spol., 1992). Je to také zdroj nákazy pro ostatní zvířata nebo lidi (Hayden a Croisier, 2005). Jsou známy případy přenosu z člověka na člověka. K přenosu může dojít přes stolicí. Těsný kontakt s nemocným člověkem může být dalším zdrojem infekce AIV.

1.3.1 Molekulární struktura a variability viru

Virová částice viru chřipky má sférický tvar o velikosti 80 – 120 nm a lipidový obal je odvozen od plazmatické membrány hostitelské buňky. Jedná se o virus, jehož genom je tvořen osmi segmenty jednořetězcové RNA negativní polaritě (-ssRNA). Genomická RNA slouží i jako templát pro syntézu virových mRNA. Replikační cyklus viru probíhá v jádře hostitelské buňky. Virion musí mít začleněnou RNA-dependentní RNA polymerázu. Tento protein přepisuje negativní RNA na RNA o pozitivní polaritě, ta poté může rovnou sloužit jako mRNA pro hladký průběh translace (Grunt a Brinton, 1986).

Segmentovaný genom viru AIV o celkové délce přibližně 13,6 kb kóduje 11 proteinů (Webster a spol., 1992). Mezi těchto 11 proteinů patří nestrukturní proteiny RNA polymerázového komplexu PA, PB2 , PB1, PB1-F2. Ty zajišťují virovou replikaci a transkripci. Dalšími nestrukturními proteiny jsou NP – nukleoprotein, který kontroluje replikaci virové RNA a NS1/NS2 – nestrukturní proteiny 1 a 2. Mezi další kódované proteiny patří M1/M2 – matrixové proteiny 1 a 2. Klasifikace je založena na posledních 2 povrchových glykoproteinech kapsidy: HA - hemagglutinin, a NA – neuraminidázy. Protein hemagglutinin je důležitý pro vstup viru do hostitelské buňky a interakci s hostitelským imunitním systémem, zatímco protein neuraminidáza katalyzuje opuštění viru hostitelské buňky (Vandegrift a spol., 2010). Všechny výše zmíněné proteiny jsou znázorněny na Obr. 4.



Obrázek 4: Molekulární struktura virové částice *Influenza A viru* (Horimoto a Kawaoka, 2005 - upraveno).

Virus chřipky je specifický svými mechanismy úniku imunitnímu systému hostitele způsobem antigenního shiftu a antigenního driftu.

Prvním způsobem je tzv. antigenní shift (zlom). Tento proces zapříčiňuje změnu v antigenních vlastnostech viru a týká se přeskupení segmentů. K přeskupení dojde, infikují-li společně dva subtypy viru jednu hostitelskou buňku. Důležitými faktory jsou 2 hlavní povrchové proteiny – HA a NA, mezi kterými dochází k přeskupení. Nový subtyp AIV disponuje buďto novým typem HA, NA, nebo novou kombinací HA i NA (Reed a spol., 2003). Toto široké spektrum možných kombinací umožňuje tvorbu nových subtypů = nový virus s odlišnými antigeny, který se vyhýbá hostitelské imunitě. Následkem může být vznik nové pandemie (Reed a spol., 2003).

Antigenní zlom nastává často při mísení ptačího a lidského kmenu chřipky v praseti. V respiračním traktu prasete jsou receptory pro hemagglutinin jak ptačího, tak lidského viru chřipky, na rozdíl od lidí a ptáků. Proto může u prasete během replikace docházet k přeskupení genetické informace a tvorbě nových kmenů (ko-infekce mezi ptačími subtypy a ostatními savčími kmeny chřipkového viru), (Russier a spol., 2017).

Druhým zdrojem variability je odborně nazývaný antigenní drift (posun). Antigenní posun je hromadění drobných mutací vzniklých substitucí či delecí při replikaci genomu v buňce. Dochází k malým antigenním změnám, ale antigenní posun nedává vzniknout novým subtypům. Tento proces umožňuje reinfekci jedinců, kteří již nákazu daným subtypem prodělali (Carrat a Flahault, 2007).

1.3.2 Subtypy

Jak již bylo popsáno výše, virus chřipky se klasifikuje podle subtypů dvou povrchových proteinů – NA a HA. Z Obr. 3 je zřejmé, že subtypy H1-H16 se nacházejí u volně žijících ptáků. Vysoce patogenním subtypem je H5N1. Od roku 2002 tento virový kmen způsobil vysoká úmrť u desítek druhů ptáků z různých řádů (Vandegrift a spol., 2010). Byl detekován i u prasat, cibetek, domácích koček, tygrů, leopardů a lidí.

Zatímco subtypy H3, H6 se objevují především u kachnovitých (*Alcidae*), husovitých (*Anseriinae*) a labutí (*Cygnini*), subtypy H4, H9, H11 a H13 jsou rozšířené u čeledě Slukovitých (*Scolopacidae*), u rybáků a racků (*Charadriiformes*), (Rappole a Hubálek, 2006). AIV cirkuluje u mnoha druhů volně žijícího vodního ptactva. Nejčastěji se objevuje u ptáků z řádu vrubozobých (*Anseriformes*), respektive u kachny divoké (*Anas platyrhynchos*). U vrubozobých byly nalezeny všechny subtypy HA 1-16 a NA 1-9 (Vandegrift a spol., 2010).

Ptáci z řádu dlouhokřídlých (*Charadriiformes*) jsou úzce spjati se subtypy AIV H13 a H16. Tyto kmeny se označují jako „gull-associated“, tzv. úzce spojené s rackovitými (*Laridae*), (Toennessen a spol., 2011). Mimo tyto subtypy byly u ptáků z čeledě *Laridae* detekovány všechny subtypy H1-16 (mimo H15) a N1-9, z toho nejčastěji H4, H5, H6, H9 a N1, N2, N3, N9 (Arnal a spol., 2015). Konkrétně u racka tříprstého se podařilo detekovat subtypy H4, H13, H16 a N2, N3, N6 (Hall a spol., 2013; Toennessen a spol., 2011). Subtypy H13 a H16 jsou ve většině případů detekovány na severní polokouli (Verhagen a spol., 2014). Výjimkou je záchyt subtypu H13N9 z racka jižního (*Larus dominicanus*) v Jižní Americe (Pereda a spol., 2008).

Subtyp H13 AIV byl poprvé objeven u racka delawarského (*Larus delawarensis*), racka vnitrozemského (*Leucophaeus pipixcan*) a racka stříbřitého (*Larus argentatus*) ve Spojených státech amerických v roce 1982 (Hinshaw a spol., 1982). Tento subtyp byl také

nalezen u velryby kulohlavce černého (*Globicephala melaena*) v roce 1986 (Hinshaw a spol., 1986). V roce 2009 byl subtyp AIV H13N9 izolován ze dvou racků šedivých (*Larus hyperboreus*) a z husy sněžné (*Chen caerulescens*) na Aljašce (Ramey a spol., 2010).

Blízce příbuzný subtyp H16 byl poprvé popsán v roce 2015 u racka chechtavého (*Chroicocephalus ridibundus*) ve Švédsku (Fouchier a spol., 2005). Retrospektivní studie probíhající v Severní Americe, které se zabývají sekvenováním izolátů AIV, ukázaly, že subtyp H16N3 byl již v roce 1975 přítomen u testovaných racků tříprstých na Aljašce (Obenauer a spol., 2006). V roce 2011 byla AIV detekována u racků tříprstých v Norsku, kde se po následných HI testech potvrdily subtypy H13 a čteněji H16 (Toennesen a spol., 2011). Podle studií jsou tyto subtypy objevovány především u racků a mořských ptáků.

1.3.3 Výskyt a šíření viru

Jak je již mnohokrát uvedeno výše, AIV způsobuje onemocnění dýchacích cest u široké škály zvířat, i u člověka. Mezi největší rezervoár nákazy ale řadíme volně žijící ptáky (kachny, husy, ale i buňáci, potápky, volavky, raci a rybáci) a drůbež (krocani, perličky, křepelky, kuřata), (Webster a spol., 1992). Replikace samotného viru u ptáků probíhá přednostně v buňkách střevního traktu a poté je vyměšován ve vysoké koncentraci společně s výkaly. Virus je v hojném množství vylučován na jaře (květen až červen) a také na podzim (září až listopad), což je odpovídající čas pro migraci do zimovišť (Tůmová, 2008). V polárních oblastech (Aljaška, Kanada) ptáci hnízdí v letních měsících, a proto k vylučování viru dochází nejvíce právě v tomto období (Ito a spol., 1995). Virus zůstává ve vodním prostředí a RNA dokáže přetrvat v ledu (Zhang a spol., 2006).

Šíření viru mezi ptactvem se rozděluje na dva typy – horizontální (kdy se jedná o přenos infekce mezi chovy drůbeže) a vertikální (to je přenos z volně žijících migrujících ptáků do skupin ptáků suchozemských i vodních), (Brugh a Johnson, 1986). Zdokumentovat a přesně popsat vertikální přenos je velmi obtížné vzhledem k migraci ptactva. Existují sice hlavní migrační linie, ale k nim enormní škála vedlejších migračních cest. Dosud není známá jednoznačná migrace skrz Evropu, na studie, které to upřesní, se stále ještě čeká. Zatím je známo, že Evropská linie vede ze severní části Evropy a severu Ruska a pokračuje do Pyrenejí, Balkánu a Itálie, Sicílie a Afriky. Jsou známy 3 cesty migrace mezi polokoulemi, které každoročně absolvují volně žijící ptáci. První cestu představuje trasa z Aljašky do Východní Asie, kde ptáci z Aljašky každoročně přezimují. Druhou trasou je migrace

z Východní Asie do Pacifiku v Severní Americe, sem ptáci létají a přezimují na pobřeží Pacifiku. Třetí směr migrace vede z Evropy do Severní Ameriky, kam létají ptáci normálně žijící na Islandu. Ti zde přečkávají zimu na pobřeží Atlantiku (Rappole a Hubálek, 2006).

Miliony ptáků ročně migrují jen ze severních oblastí Kanady, Ruska či Evropy. Proto migrace představuje jednu ze snadných cest šíření viru a možnost zavlečení do nových území. Například ptáci, kteří migrují z Orientu, představují potencionální riziko pro přenos nových AIV kmenů do populace, které nemá vytvořené protilátky (Reed a spol., 2003). Výskyt AIV je tedy nejvíce pravděpodobný v místech s vysokou koncentrací ptactva na malém území a jejich společném soužití. Výzkumy, které se zaměřují na odchyt a testování volně žijících a migrujících ptáků, dokazují, že většina z nich je infikována několika subtypy AIV najednou a zároveň mají i různou kombinaci HA a NA subtypů (Ramey a spol., 2010; Toennesen a spol., 2011). To všechno odpovídá shromažďování velkého počtu ptactva, vzájemné infekci blízkým kontaktem či infekcí z kontaminovaného prostředí.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je rozšířit naši předešlou studii zaměřenou na výskyt virových infekcí v oblastech Svalbardu a Grónska.

Cíle této práce jsou:

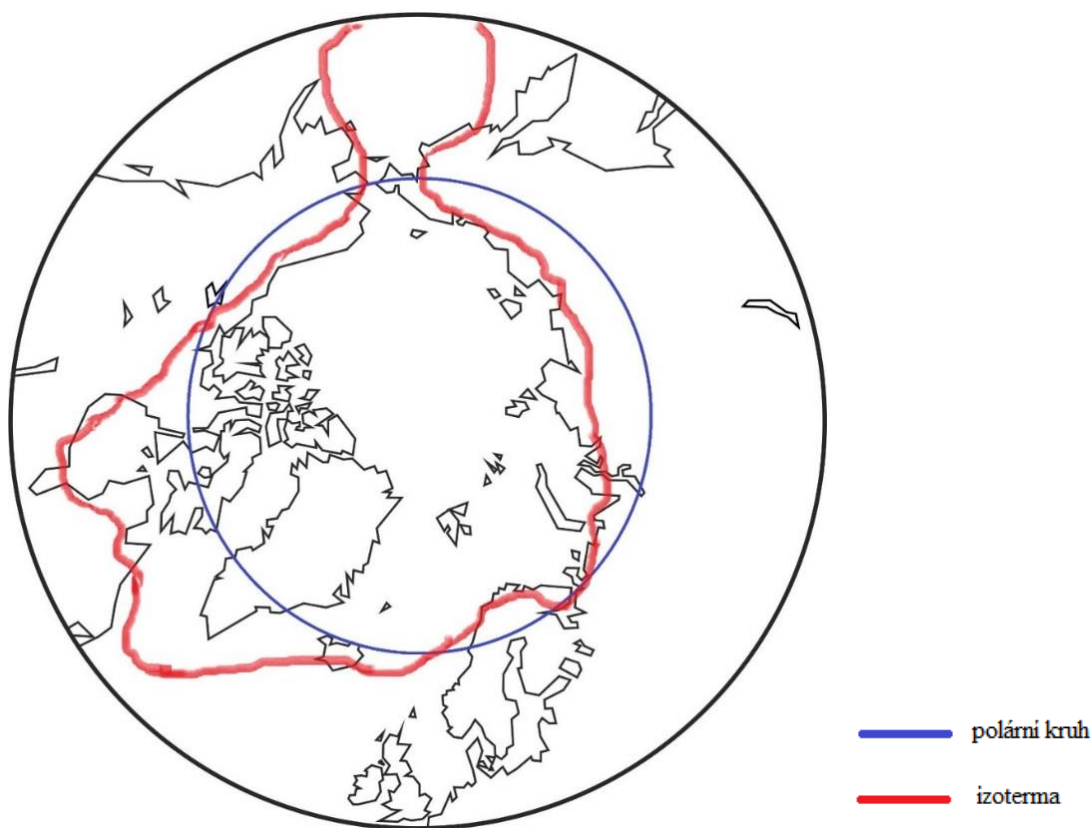
1. Vyšetřit získané a sesbírané jedince komárů rodu *Aedes* na výskyt arbovirů pomocí molekulárních metod.
2. Porovnat dostupná data o výskytu ptačí chřipky ve vybraných polárních oblastech formou metaanalýzy.
3. Otestovat krevní séra na přítomnost protilátek viru chřipky získaná z jedinců v kolonii mořských ptáků *Rissa tridactyla* na Svalbardu.

3 MATERIÁL A METODY

Metodická část této práce je z důvodu větší přehlednosti rozdělena do více částí. V první části této kapitoly jsou popisovány materiály a metody použité pro část práce zabývající se detekcí arbovirů. Druhá část je věnována popisu materiálu a metod pro práci týkající se vyšetření odebraných vzorků sér z mořských ptáků na detekci protilátek ptačí chřipky. Poslední kapitola se věnuje metodám použitých pro metaanalýzu výskytu ptačí chřipky v polárních oblastech.

3.1 Polární oblasti a vymezení Arktidy

Území Arktidy se dá vymežit různými způsoby, pro tuto diplomovou práci byl vybrán způsob definice oblasti Arktidy pomocí izotermy. To znamená, že jde o oblast na severní polokouli, v níž průměrná teplota nepřesahuje ani v nejteplejších letních měsících teplotu 10 °C. V současnosti se do takto vymezeného území zahrnuje Severní ledový oceán, část severního pobřeží Evropy, Asie, Severní Ameriky o celkové rozloze kolem 26,5 mil km², které je zobrazené na obr. 5 (Hueffer a spol., 2011).



Obrázek 5: Mapa zobrazující polární kruh a vymezení Arktidy pomocí izotermy.

3.2 Vyšetřování arbovirů

3.2.1 Přehled vzorků a popis oblasti

Vzorky komárů byly sbírány v letních sezónách mezi lety 2012 až 2016. Celkově bylo nasbíráno a vyšetřeno přes 10 000 jedinců komárů rodu *Aedes nigripes* (přehled získaných vzorků je zaznamenán v Tab. 2). Tyto vzorky byly sbírány v lokalitách, které jsou zobrazeny na Obr. 6 a 7. Konkrétně vzorky ze Svalbardu pocházejí z oblastí okolo místa Petuniabukta (78°41'N 16°32'E, viz Obr. 6) a vzorky získané v Grónsku byly sbírány v okolí místa Kangerslussuaq (67°01'N 50°41'W, viz Obr. 7).

Vzorky byly poskytnuty členy centra polární ekologie, a to jmenovitě Bc. Janou Müllerovou, doc. RNDr. Olegem Ditrichem, CSc.; RNDr. Janou Elsterovou; RNDr. Jiřím Černým, PhD.; a Mgr. Jakubem Žárským, PhD.

Jednotliví komáři byli po sběru roztříděni a seskupeni do jednoho vzorku vždy po 30 kusech dle lokality, data sběru a vývojového stadia do připravených zkumavek s 400 μ l roztoku RNAlater (QIAGEN, Germany). Vzorky byly uchovávány v místě sběru na ledu a poté zamraženy (nikdy ne však později než dva týdny od data sběru) a uchovávány v mrazáku při teplotě -80 °C.

Tabulka 2: Přehled vyšetřovaných vzorků z let 2012- 2016.

Lokalita	Datum sběru	Počet - larvy	Počet – kukly	Počet - dospělci	Celkem
Grónsko	2014	0	0	1829	1829
Svalbard	2012	953	718	378	2049
	2013	0	0	522	522
	2014	0	0	2310	2310
	2015	0	390	1710	2100
	2016	0	0	1871	1871
Svalbard celkem		953	1108	6791	8852
Celkem		953	1108	8620	10681



Obrázek 6: Přesná poloha místa sběru komárů na Špicberkách, GPS souřadnice [78°41'N 16°32'E].



Obrázek 7: Lokalita sběru komárů v Grónsku, GPS souřadnice [67°01'N 50°41'W].

3.2.2 Izolace RNA

Pro získání nukleové kyseliny, v našem případě RNA, byly vzorky nejdříve rozmrazeny na 4 °C a vyjmuty z RNAlater. Postupně byly přendány do zkumavek s 400 µl vychlazeným PBS roztoku, přidanou homogenizační kuličkou a homogenizovány pomocí přístroje Tissue Lyser II (QIAGEN, Germany) po dobu 3min/3000 otáček. RNA byla izolována pomocí soupravy QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN, Germany) a RNAGem Tissue (Zygem), u kterých se postupovalo dle přiloženého protokolu od výrobce, který je uvedený v elektronických přílohách.

3.2.3 Reverzní transkripce (RT-PCR)

Pro detekci arbovirů v získaných vzorcích komárů byla využita jednokroková RT-PCR za použití specifických primerů, které jsou vyjmenované v Tab. 4. Pro přípravu RT-PCR reakce jsme využívali soupravu KAPA SYBR FAST One-step qRT-PCR Kit (Kappa Biosystems, USA) podle přiloženého protokolu, který naleznete v elektronických přílohách. Všechny složky pro RT-PCR reakci jsou uvedeny v Tab. 3.

Tabulka 3: Komponenty PCR reakce.

Komponenty	Finální koncentrace	Množství na 1 reakci
Deionizovaná voda		6,4 µl
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	1x	10 µl
dUTP	1x	0,4µl
Primer forward	0,2 mM	0,4µl
Primer reverse	200 nM	0,4µl
KAPA RT Mix	200 nM	0,4µl
DNA templát	10 ng/µl	2 µl
Výsledný objem vzorků		20 µl

Tabulka 4: Přehled použitých primerů.

Primer	Cílený virový rod	Sekvence	Teplota nasedání	Velikost [bp]	Citace
$\alpha -$	Alphavirus	5' - KYT CYT CIG TRT TIG TIC CIG G - 3'	61	428	Sanchez – Seco a spol., 2001
$\alpha +$		5'- GAY GCI TAY YTI GAY ATG GTI GAI GG - 3'	59,5		
BCS82 C	Orthobunya virus	5'- ATG ACT GAG TTG GAG TTG CAT GAT GTC GC - 3'	60,1	251	Kuno a spol., 1996
BCS332 V		5'- TGT TCC TGT TGC CAG GAA AAT - 3'	50,5		
FlaF1A	Flavivirus	5'- AGC AAA TTT AGG TGC TTT CCA A - 3'	49,2	220	Schwaiger a Cassinotti, 2003
FlaR1		5'-GCA ATC ATT GCC ATT GCA GA - 3'	49,7		
Orbi F1	Orbivirus	5'- TCT GAG ATG TAY GTY GGA GAT GAT A - 3'	49,3	188	Palacios a spol., 2011
Orbi R		5'- CCY TGY TTN GCR TGN GTY TGY GTY TTY TC - 3'	57,1		
NPhlebo 1 R	Phlebovirus	5'- AAR TTR CTI GWI GCY TTI ARI GTI GC - 3'	56,4	526	Charrel a spol., 2006
Nphlebo 1 F		5'- ATG GAR GGI TTT GTI WSI CII CC - 3'	53,5		

Všechny RT - PCR reakce probíhaly za podmínek uvedených v protokolu od výrobce soupravy, které jsou popsány níže:

Reverzní transkripce - 42°C / 5 min

Aktivace enzymu - 95 °C / 3 min

Denaturace - 95 °C / 3 s

Nasedání primerů – 60°C / 20 s

Jako negativní kontrola pro všechny připravené RT-PCR reakce byla použita namíchaná reakce bez přidaného templátu, doplněná deionizovanou vodou do finálního objemu. Jako pozitivní kontroly byly využívány virové suspenze, ze kterých byla izolována RNA stejně jako u vzorků. Pozitivní kontroly pro dané rody jsou vypsány níže:

Alphavirus – Semliki Forest virus

Orthobunyavirus – Ťahyna virus

Flavivirus – virus klíšťové encefalitidy

Phlebovirus - Uukunemi virus

Orbivirus – Tribeč virus

U těchto pozitivních kontrol byla provedena zkouška ředění. U vyzolovaných pozitivních kontrol jsme změřili získaný výsledný objem DNA v reakci a poté vzorek naředili tak, aby výsledná koncentrace odpovídala 1ng/μl. Následně byl vzorek ředěn 10 x ředící řadou (tzn. 10x, 100x, 1000x atd.) a poté byla provedena PCR reakce, gelová elektroforéza a následná vizualizace (všechny metody jsou popsány v této kapitole).

3.2.4 Elektroforéza

Vzniklá směs z PCR reakce byla smíchána s 2 μl vzorkového pufru Orange DNA 6x Loading Dye (Thermo Scientific, USA) s obsahem 5x SYBR Green a takto připravený vzorek byl elektroforeticky rozdělen na připraveném 2 % (w/v) agarózovém gelu/ 1x TAE pufru při napětí 140 V po dobu 45 minut. Vizualizace výsledků byla provedena pomocí UV transiluminátoru (Biometra TI 3, Walman, USA) a digitalizovány byly pomocí

fotografického aparátu Olympus C5060Z. Úprava obrázků byla prováděna v programu Alpha Ease® RT Software, verze 4.1.0.

3.2.5 Purifikace DNA z PCR reakce

Vzorky vhodné k osekvenování byly přečištěny přímo ze směsi z PCR reakce pomocí soupravy QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN, Germany), postup probíhal podle návodu, který je uveden v elektronických přílohách. Jedinou provedenou změnou byl poslední krok – eluce, která místo do poskytnutého pufru byla provedena do PCR vody (QIAGEN, Germany). Po přečištění a změření koncentrace DNA na spektrofotometru (Nano drop Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) byly vzorky odeslány na sekvenování.

3.2.6 Sekvenování

PCR produkty z pozitivních kontrol byly připraveny podle požadavků laboratoře Biogen PRAHA (Czech Republic), která prováděla sekvenování pomocí BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA). Vzorky byly připraveny podle dodaného protokolu od firmy smícháním 5 µl templátu o koncentraci 20-80 ng/µl s 5 µl primeru o koncentraci 10 µM.

3.3 Detekce chřipky

3.3.1 Metaanalýza výskytu AIV v polárních oblastech severní polokoule

Metaanalýza na téma AIV v polárních oblastech byla zpracována z publikací uložených v databázi PubMed. Kritéria pro vyhledávání publikací byla následující: zadané heslo - avian influenza (ptačí chřipka) a oblasti (Arktida, Kanada, Aljaška, Finsko, Švédsko, Norsko, Island, Grónsko). Byly vybrány články pojednávající o ptačí chřipce u volně žijících ptáků v Kanadských provinciích (Yukonské teritorium, Severozápadní teritoria, Nunavut, Québec, Newfoundland, Labrador). U oblastí Ruska, Finska, Švédska a Norska to byly lokality vyskytující se za polárním kruhem. Články z oblastí Aljašky, Islandu a Grónska byly zahrnuty všechny. Dále, aby byla publikace pro nás relevantní, musel být v publikaci určen přesný druh ptáka, u kterého byla provedena detekce viru chřipky a uvedena přesná lokalita

odchytu ptáka. Byly získány publikace z let 1993 až 2016. Ve všech člancích byly vyhledány i ostatní citované publikace a bylo provedeno další hledání dat v těchto publikacích. Výsledné analýzy byly zpracovány pomocí statistických testů a graficky vyobrazeny v kapitole Výsledky (5).

Z vybraných článků byly vyselektovány údaje o výskytu viru ptačí chřipky u různých druhů ptáků. Záznamy o výskytu AIV byly rozdělovány podle 2 kategorií – seroprevalence (detekce protilátek) a PCR prevalence (detekce viru). Údaje o výskytu AIV byly vyhodnoceny podle následujících kategorií, které byly vyselektovány v závislosti na ekologii ptáků hnízdících v polárních oblastech ornitologem RNDr. Václavem Pavlem, Ph.D.:

1. vývojové stadium ptáků (věk)
2. čeledě ptáků
3. pohlaví ptáků
4. způsob hnízdění
5. migrace
6. způsob zimování
7. délka života

3.3.2 Statistické vyhodnocení

Statistická analýza byla provedena pomocí počítačového programu GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., USA). Získaná data byla vyhodnocena pomocí Testu dobré shody, neboli Pearsonův chí-kvadrát test (Pearson's chi - square Test), nebo pomocí Fisherova exaktního testu (Fisher exact test) v závislosti na objemu dat, a tudíž vhodnosti daného typu testu. Výsledky, jejichž hladina významnosti p byla menší než 5 % ($p < 0,005$) byly považovány za statisticky signifikantní.

3.3.3 Získané vzorky a charakteristika místa odběru

V letech 2013 – 2015 byl proveden sběr krevních sér a stěrů z kloaky a oropharyngu u mořských ptáků racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) osidlujících město Pyramiden na Špicberkách (GPS 78°40'59.99" N 16°23'59.99" E, viz Obr. 8). Díky získanému povolení č. 2013/00722-5 bylo v roce 2014 odebráno 100 krevních sér a stěrů. Všechny vzorky byly odebrány RNDr. Janou Elsterovou pod vedením ornitologa RNDr. Václava Pavla, Ph.D z Centra polární ekologie, České Budějovice.

Odchyt ptáků byl prováděn do sítě buď přímo na hnízdě, nebo v jeho těsném okolí, pokud pták odletěl. Jedinci byli znehybněni přidržením zobáku a nohou. Poté mohl být proveden odběr krve (maximálně 0,5 ml) a stěry. Pták, kterému byl proveden odběr, byl označen znamením na hlavě, aby bylo zamezeno opakovanému odběru. Všichni jedinci byli po odebrání krve a provedení stěrů sledováni, žádný z jedinců nejevil pozorovatelné fyziologické změny. Všechny vzorky byly odebírány ve spolupráci se studentkami kurzu centra polární ekologie, Mgr. Zuzanou Literákovou a RNDr. Annou Mynářovou.

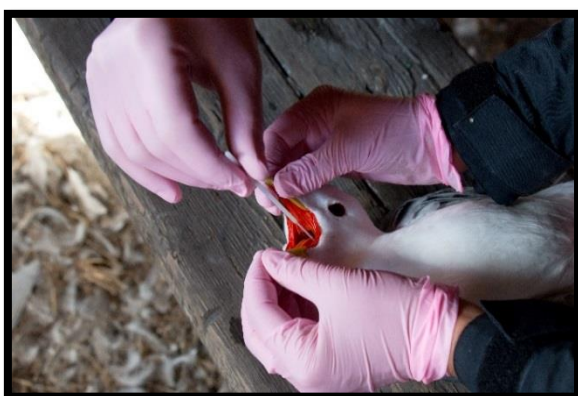
Krevní séra byla odebírána sterilní jehlou s heparinem z křídelní žíly (viz Obr. 9). Místo vpichu bylo před i po odběru desinfikováno roztokem ethanolu. Vzorky krevních sér byly zpracovávány již v terénu či na terénní stanici. Nejdříve byly vzorky krve stočeny (6000 ot./6min.), poté bylo separováno sérum, které bylo odebráno do sterilních zkumavek a poté uchováváno na ledu v terénním chladicím boxu při -2°C a následně uskladněno v mrazáku na -80°C.

Vzorky stěrů z orofaryngu a kloaky byly provedeny sterilním tamponem na plastové tyčince a ihned po setření převedeny do připravených sterilních zkumavek s 500 µl RNAlater (viz výše) a uchovávány v chladicím boxu. Poté také uloženy do mrazicího zařízení na -80°C. Z 20 jedinců byly provedeny výtěry orofaryngu, které byly následně převedeny do 1ml media (L15 + 5% PTS + 1% ATB + 1% GL) ve sterilní zkumavce a uchovávány v chladicím boxu.

Jako vhodné místo pro odběr vzorků byla vybrána osada Pyramiden na Špicberkách. Na daném místě se nachází dostatek dnes již nevyužívaných budov a obydlí, která osídlila kolonie mořských ptáků rodu *Rissa tridactyla* (viz Obr. 10). Celkem se v kolonii nachází 721 hnízd, většina z nich je dostupná pro odchyt. Odběr byl prováděn v době, kdy dospělí jedinci seděli na hnízdě.



Obrázek 8: Mapa s vyznačením oblasti Pyramiden, kde byl proveden odchyt racků [78° 40'N 16° 32'E].



Obrázek 9: Fotografie dokumentující odběr vzorků z mořských ptáků v Pyramiden.



Obrázek 10: Fotografie racků tříprstých z osady Pyramiden.

3.3.4 ELISA test

Byl proveden ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) test za účelem zjištění protilátek chřipkových virů ve vzorcích za pomoci soupravy Kit ID Screen Influenza A Competition Multi-species (IDVet, Francie). Testy byly provedeny přesně podle návodu poskytnutého od výrobce, který je přiložen v elektronických přílohách.

U všech vzorků byla odečtena optická hustota (z angl. Optical density) na spektrofotometru (Infinite M 200, Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 450 nm. Vyhodnocení výsledků bylo provedeno podle návodu, tedy za použití výpočtu:

$$\text{kompetiční ELISA (\%)} = \frac{\text{OD (vzorku)}}{\text{OD (negativní kontroly)}} \times 100$$

Interpretace výsledků byla provedena podle Tab. 5.

Tabulka 5: Rozhraní hodnot zadané od výrobce pro vyhodnocení pozitivních, negativních a hraničních vzorků.

Kompetiční ELISA [%]	Hodnocení
≥ 50	negativní
45 – 50	hraniční
≤ 45	pozitivní

3.3.5 Hemaglutinačně inhibiční test

K analýze antigenních variant u pozitivních vzorků z ELISA testování byl proveden hemaglutinačně inhibiční test. Celé testování bylo zadáno Státnímu veterinárnímu ústavu v Praze (Česká republika) a bylo provedeno ve dvojkové ředící řadě.

3.3.6 Grafické zpracování

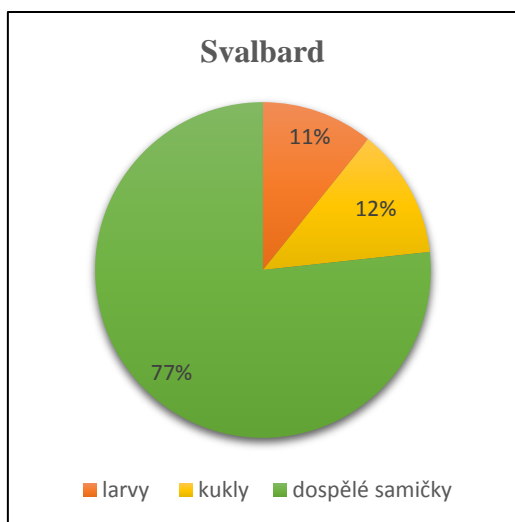
Výsledky byly graficky zpracovány pomocí programu GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, Inc., USA) a Microsoft Excel 2013 (Microsoft, USA).

4 VÝSLEDKY

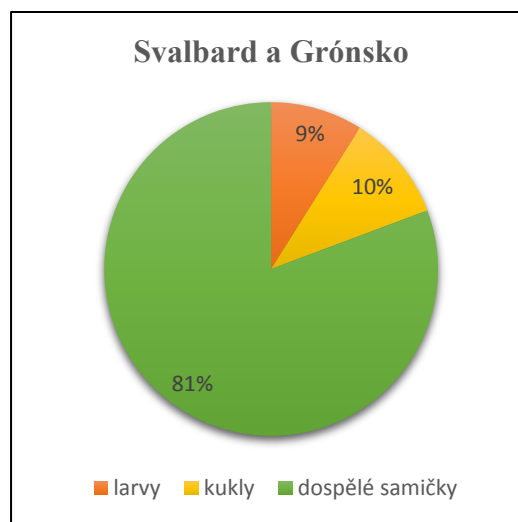
4.1 Arboviry

4.1.1 Vzorky

Celkově bylo nasbíráno a vyšetřeno 10 681 jedinců komárů z oblastí Grónska a Svalbardu z letních sezón 2012-2016. Z celkového počtu je 8852 nasbíraných jedinců ze Svalbardu (953 larev, 1108 kukel a 6791 dospělých samic). Zbylých 1829 dospělých samiček se podařilo získat v letní sezóně 2014 z Grónska. Podíl larev, kukel a dospělých jedinců je graficky znázorněn na Obr. 11 a 12. Všichni jedinci byli identifikováni a určeni jako druh komára *Ae. nigripes* (*Diptera: Culicidae*).



Obrázek 11: Grafické a procentuální znázornění počtu nasbíraných jedinců komárů rodu *Ae. nigripes* na Svalbardu.



Obrázek 12: Celkové rozdělení všech nasbíraných vzorků komárů z letních sezón 2012-2016 ze Svalbardu a Grónska.

4.1.2 Optimalizace metodiky pro detekci arbovirových sekvencí u vzorků komárů *Ae.nigripes*

4.1.2.1 Charakteristika pozitivních kontrol

Pozitivní kontroly, které byly používány pro experimenty, byly získané ze sbírky arbovirů Prazitologického ústavu z Biologického centra Akademie věd ČR (dostupné na: <http://www.arboviruscollection.cz>). Byly dodány ve formě virové suspenze, z které byla vyizolovaná RNA, která byla následně využívána pro další postupy. Přehled pozitivních kontrol je uveden níže:

Alphavirus – Semliki Forest virus

Orthobunyavirus – Ťahyna virus

Flavivirus – virus klíšťové encefalitidy

Phlebovirus - Uukunemi virus

Orbivirus – Tribeč virus

Všechny pozitivní kontroly byly za pomoci metod molekulární biologie popsanych v kapitole Materiál a metody (3) zpracovány a byly získány jejich sekvence. Pomocí programu BLAST a databáze GenBank byly sekvence porovnány, aby mohlo být potvrzeno, že se jedná o požadovaný virus použitý jako pozitivní kontrola pro daný rod. Získané sekvence jsou zaznamenány v Tab. 6.

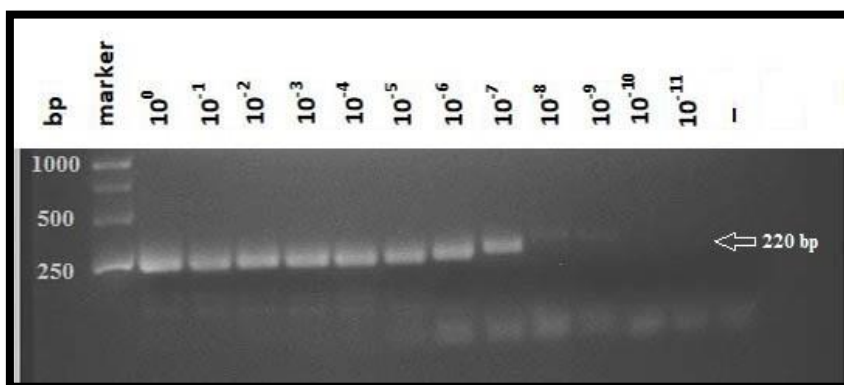
Tabulka 6: Získané sekvence z virových suspenzí.

Rod	Virus	GenBank (citace)
<i>Alphavirus</i>	Semliki Forest virus	Semliki Forest virus nsp4 gene <u>Y14761.1</u>
<i>Orthobunyavirus</i>	Ťahyna virus	Tahyna virus strain 29 segment S, complete sequence <u>GU390669.1</u>
<i>Flavivirus</i>	Virus klíšťové encefalidity	Tick-borne encephalitis virus clone Hypr, complete genome <u>KP716978.1</u>
<i>Phlebovirus</i>	Uukuniemi virus	Uukuniemi virus isolate Potepli 63 segment L, complete sequence <u>KM114246.1</u>
<i>Orbivirus</i>	Tribeč virus	Tribec virus segment 1, complete sequences <u>HQ266581.1</u>

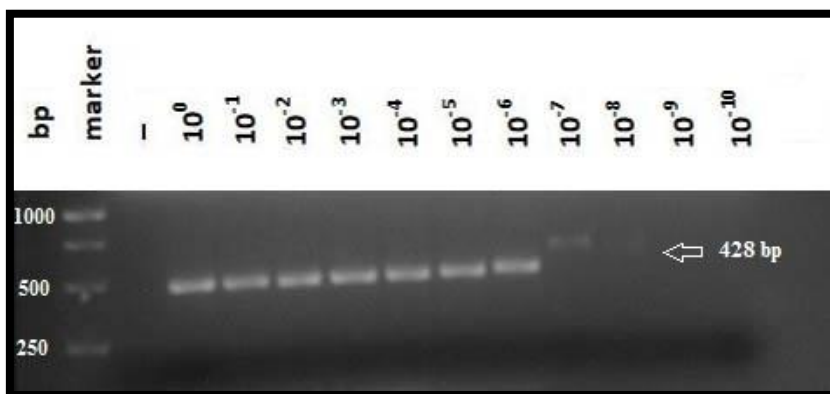
U pozitivních kontrol byla provedena izolace RNA, RT-PCR reakce a pomocí gelové elektroforézy a UV iluminátoru následně vizualizované DNA produkty v očekávaných velikostech amplikonů. Pro zjištění detekčního limitu naší metody byla u všech pozitivních kontrol připravena desítková ředící řada s ředěními 1:10 – 1:10⁻⁹. Nejprve byla zjištěna koncentrace DNA získaného a přečištěného amplikonu u každé pozitivní kontroly. Vzorek byl naředěn tak, aby počáteční koncentrace byla 1 ng/μl. Poté bylo provedeno desítkové ředění a vzorky byly pomocí elektroforézy separaticky rozděleny a následně vizualizovány na agarózovém gelu. Následně byl odečten detekční limit (nejnižší hodnota signálu, kterou

jsme schopni detekovat) každé pozitivní kontroly a výsledky jsou uvedeny v Tab. 7 a na Obr. 13. Pozitivní kontroly byly testovány za pomoci stejných souprav, pomocí stejných metod a v identických podmínkách jako ostatní testované vzorky. Výsledky jsou uvedeny na obrázku 13.

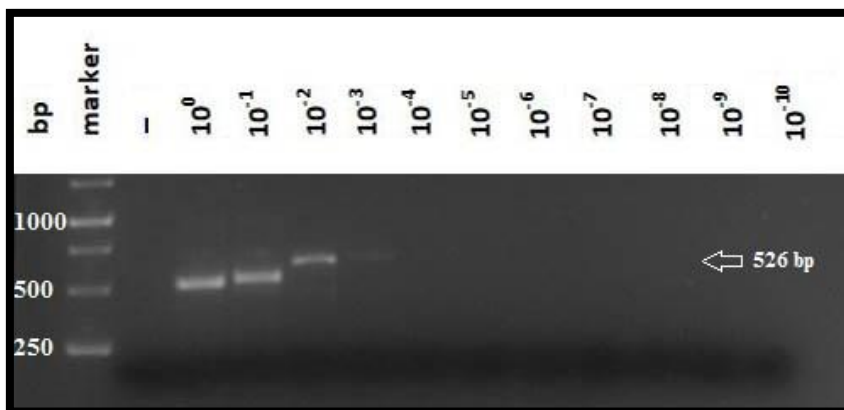
Flavivirus:



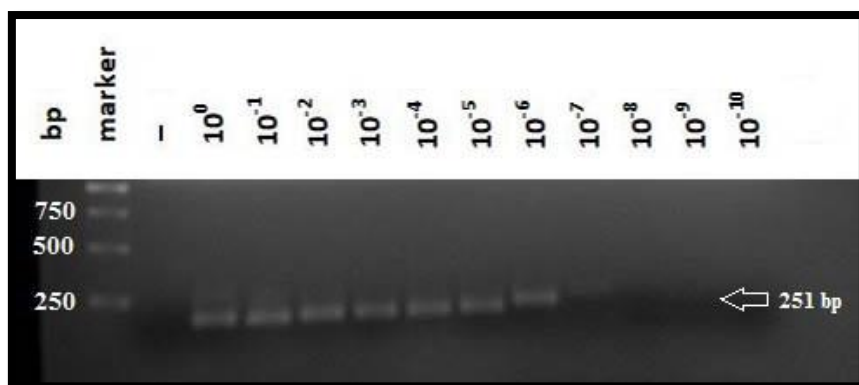
Alphavirus:



Phlebovirus:



Orthobunyavirus:



Orbivirus:



Obrázek 13: Fotografie gelů pro všechny arbovirové rody s vizualizovanou koncentrační řadou.

Legenda:

bp – počet párů bází

- negativní kontrola

10^x - ředění

→ velikost DNA molekuly

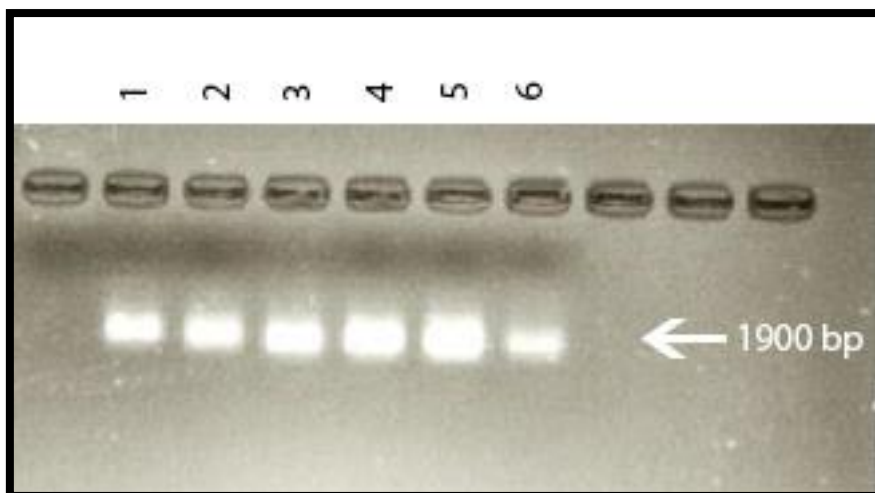
Výsledky ředících řad pozitivních kontrol pro dané rody jsou shrnuty v Tab. 7. Nejmenší detekční limit byl zaznamenán pro rod *Phlebovirus*, naopak u rodu *Flavivirus* byla detekce pozorovatelná až do koncentrace 1×10^{-9} ng/ μ l DNA.

Tabulka 7: Detekční limity pro všechny arbovirové rody.

Rod	Koncentrace DNA [ng/μl]
<i>Alphavirus</i>	1×10^{-7}
<i>Orthobunyavirus</i>	1×10^{-5}
<i>Phlebovirus</i>	1×10^{-3}
<i>Flavivirus</i>	1×10^{-9}
<i>Orbivirus</i>	1×10^{-7}

4.1.2.2 Kontrola kvality RNA

Ze získaných vzorků komárů byla vyizolována RNA. U několika vybraných vzorků byl proveden test přítomnosti RNA po izolaci. Vyizolovaná RNA byla separaticky rozdělena na agarózovém gelu a následně vizualizována (viz metody). Ukázka gelu s vyizolovanou RNA je na Obr. 14.



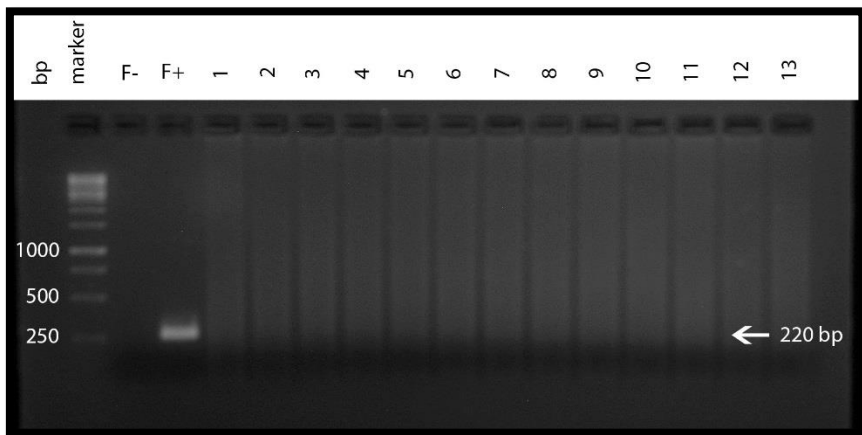
Obrázek 14: Gel s ukázkou vyizolované RNA z komářích jedinců.

4.1.2.3 Detekce arbovirů z komárů

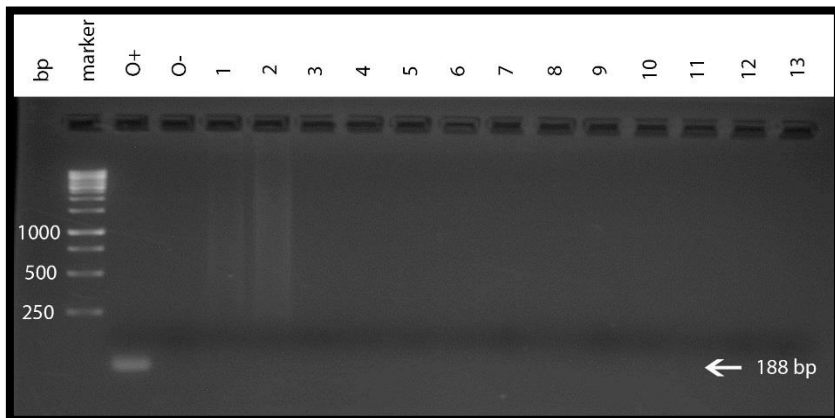
Všechny vzorky komárů byly vyšetřeny pomocí jednokrokové RT-PCR s použitím specifických primerů pro daný rod na výskyt arbovirů z 5 zmiňovaných rodů: *Alphavirus*, *Flavivirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus*, *Orbivirus*. Po provedeném testování všech vzorků se nepodařilo naamplifikovat produkt odpovídající délce očekávaného ampliconu u rodu *Alphavirus* – 446 bp, *Flavivirus* – 220 bp, *Orthobunyavirus* – 251 bp, *Orbivirus* – 188

bp, *Phlebovirus* – 526 bp. I přesto, že proběhla amplifikace pozitivní kontroly v očekávané velikosti amplikonů. Fotografie gelů s ukázkou pozitivní kontroly a negativními vzorky jsou na Obr. 15.

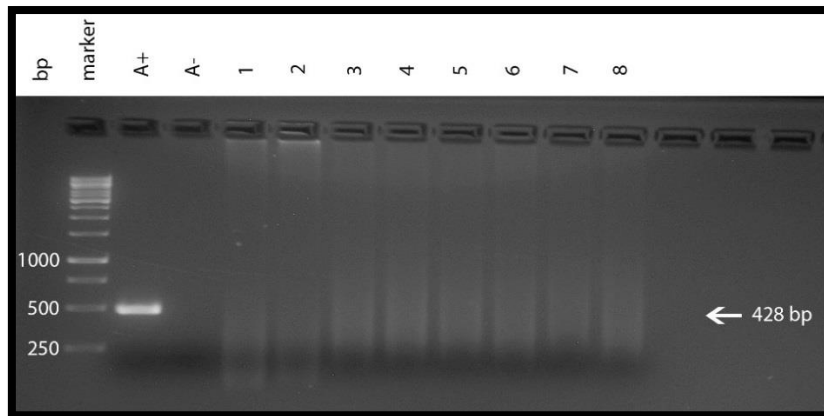
Flavivirus:



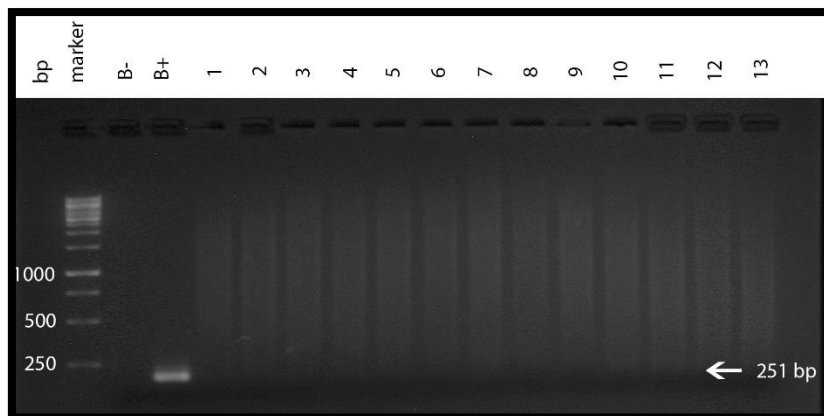
Orbivirus:



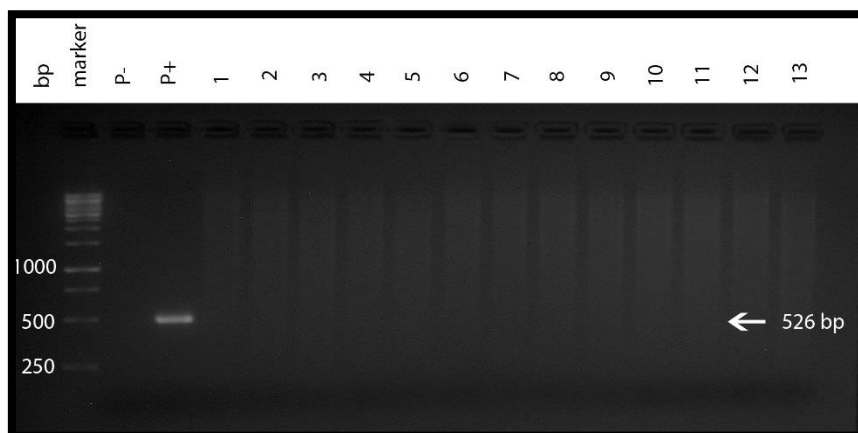
Alphavirus:



Orthobunyavirus:

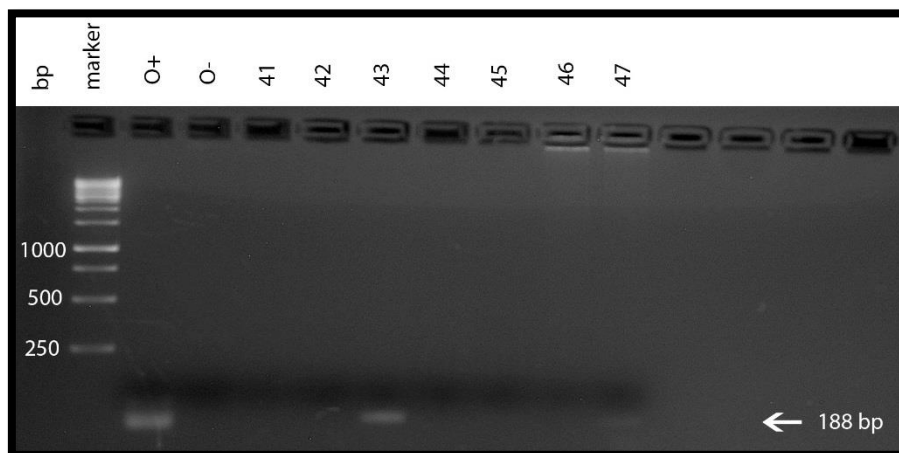
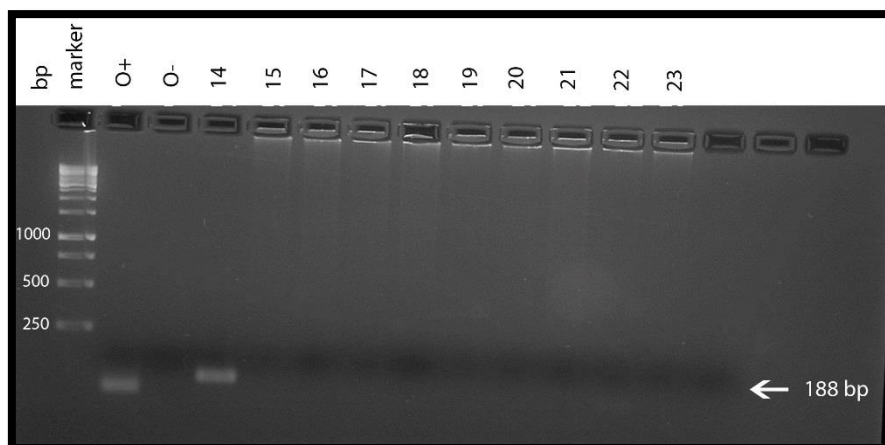


Phlebovirus:



Obrázek 15: Fotografie gelů pro všechny rody arbovirů se vzorky z komárů.

U třech vzorků (č. 14, 43, 47) testovaných na přítomnost virů z rodu *Orbivirus* se u meziprojektu PCR objevily molekuly v přibližně shodné velikosti, jako byla očekávaná velikost amplifikace pozitivní kontroly. U těchto tří vzorků byla izolována DNA z PCR produktu a odeslána na sekvenování. Sekvence byly porovnány v databázi GenBank a výsledky ukázaly, že se jedná o nespecifické směsi molekul. Popisované falešně pozitivní výsledky jsou na Obr. 16.



Obrázek 16: Gely se vzorky z komárů ze Svalbardu testované na přítomnost virů z rodu *Orbivirus*.

Legenda:

bp – počet párů bází

- negativní kontrola

+ pozitivní kontrola

→ očekávaná velikost DNA molekuly

14,15,16.. – čísla vzorků

4.2 Porovnání výskytu ptačí chřipky ve vymezené lokalitě polárních oblastí

Byla vytvořena metaanalýza na výskyt ptačí chřipky v polárních oblastech severní polokoule RNDr. Jiřím Černým, Ph.D., Bc. Janou Müllerovou, RNDr. Janou Elsterovou, Mgr. Václavem Hönigem, Ph.D., RNDr. Václavem Pavlem, Ph.D., (in prep.) Z databáze PubMed byly podle zadaných klíčových slov: „avian influenza, Arctic/Canada/Alasca/Finland/Sweden/Norway/Iceland/Greenland“ získány publikace. Z nalezených publikací byly vybrány publikace podle našich kritérií, které jsou uvedeny v podkapitole Metaanalýza výskytu AIV v polárních oblastech severní polokoule (3.3.5). Z těchto publikací byly vyselektovány údaje o testování různých druhů ptáků na výskyt ptačí chřipky. Výsledné publikace byly z let 1993 až do roku 2016. Početnější objem publikací je až od roku 2005. Data byla zpracována podle vymezených kategorií – čeledě ptáků, pohlaví, odhadnutý věk, krátkodobě x dlouhodobě žijící ptáci, způsob migrace a způsob hnízdění.

Data byla rozdělena do dvou kritérií – detekce viru AIV u ptáků (PCR prevalence) a detekce protilátek proti AIV (seroprevalence).

4.2.1 Taxonomické rozdělení ptačích hostitelů AIV v polárních oblastech

Z publikací byly vybrány všechny druhy ptáků, u kterých bylo prováděno testování na detekci viru, či protilátek viru ptačí chřipky ve stanovených oblastech. Všichni ptáci byli rozděleni do taxonomických kategorií (řád, čeleď, podčeleď) a zapsány do Tab. 8 a jsou uvedeny na Obr. 17.

Tabulka 8: Souhrn všech testovaných ptáků na výskyt AIV v polárních oblastech rozdělených so taxonomických skupin. Zeleně jsou zvýrazněni ptáci, u kterých bylo testováno velké množství jedinců a detekce AIV byla vysoká. Oranžová barva označuje ptáky, u kterých bylo otestováno dostatek jedinců, ale AIV se u nich neobjevila, nebo jen velice málo. Bíle zůstali ptáci, u kterých bylo testováno malé množství jedinců.

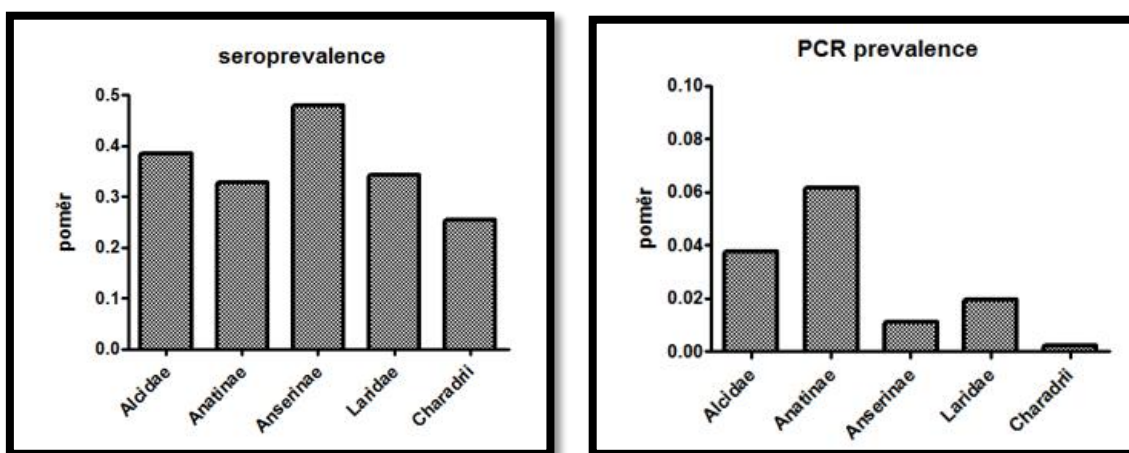
	Počet PCR	PCR pozitivní	Poměr	Počet serologie	Sseropozitivní	Poměr
Alcidae	4822	182	0,037744	156	60	0,384615
Passeriformes	2511	0	0	0	0	0
Phalacrocoracidae	41	1	0,02439	0	0	0
Gruidae	192	2	0,010417	0	0	0
Gaviidae	10	1	0,1	0	0	0
Anatinae	45801	2885	0,06299	1967	645	0,327911
Sulidae	78	0	0	0	0	0
Anserinae	44447	484	0,010889	3520	1689	0,47983
Podicipedidae	1	0	0	0	0	0
Tetraoninae	58	1	0,017241	0	0	0
Laridae	5620	110	0,019573	419	144	0,343675
Strigiformes	2	0	0	0	0	0
Procellariidae	394	0	0	0	0	0
Picidae	1	0	0	0	0	0
Charadrii	6783	15	0,002211	513	130	0,253411

Z Tab. 8 a Obr. 17 je zřejmé, že podle podílu testovaných jedinců a pozitivních výsledků z vymezených publikací byli jako vhodní hostitelé pro chřipku stanoveni jedinci z čeledě rackovití (*Laridae*) a alek (*Alcidae*), z podčeledí kachen (*Anatinae*) a hus (*Anserinae*). Zatímco pěvci (*Paseriformes*), buňňákovití (*Procellariidae*) a bahňáci (*Charadrii*) vhodnými hostiteli nejsou. Pro malý počet testovaných jedinců nelze vyhodnotit jedince z čeledí kormoránovití (*Phalacrocoracidae*), jeřábovití (*Gruidae*), potáplicovití (*Gaviidae*), terejovití (*Sulidae*), potápkovití (*Podicipedia*) a datlovití (*Picidae*), z podčeledě

tetřevi (*Tetraoninae*) a z řádu sovy (*Strigiformes*). Nevyšší PCR prevalenci měli vzorkovaní jedinci z podčeledě hus a kachen.

Protilátky byly nalezeny u všech ptáků, které byly na přítomnost protilátek proti AIV testovány a to jsou jedinci z podřádu bahňáci (*Charadrii*), z čeledě rackovití (*Laridae*) a alky (*Alcidae*), z podčeledí husy (*Anserinae*) a kachny (*Anatinae*). Nejvyšší seroprevalce byla prokázána u hus, alek a racků.

Výsledky PCR prevalence a seroprevalence jsou graficky zpracovány na Obr. 17.



Obrázek 17: Grafické zhodnocení vybraných testovaných druhů ptáků na výskyt AIV v polárních oblastech. Do grafů jsou zahrnuti ptáci, u kterých byl testován dostatečný počet jedinců. Statisticky průkazné výsledky byly vyhodnoceny, pokud byla hodnota $p < 0,05$.

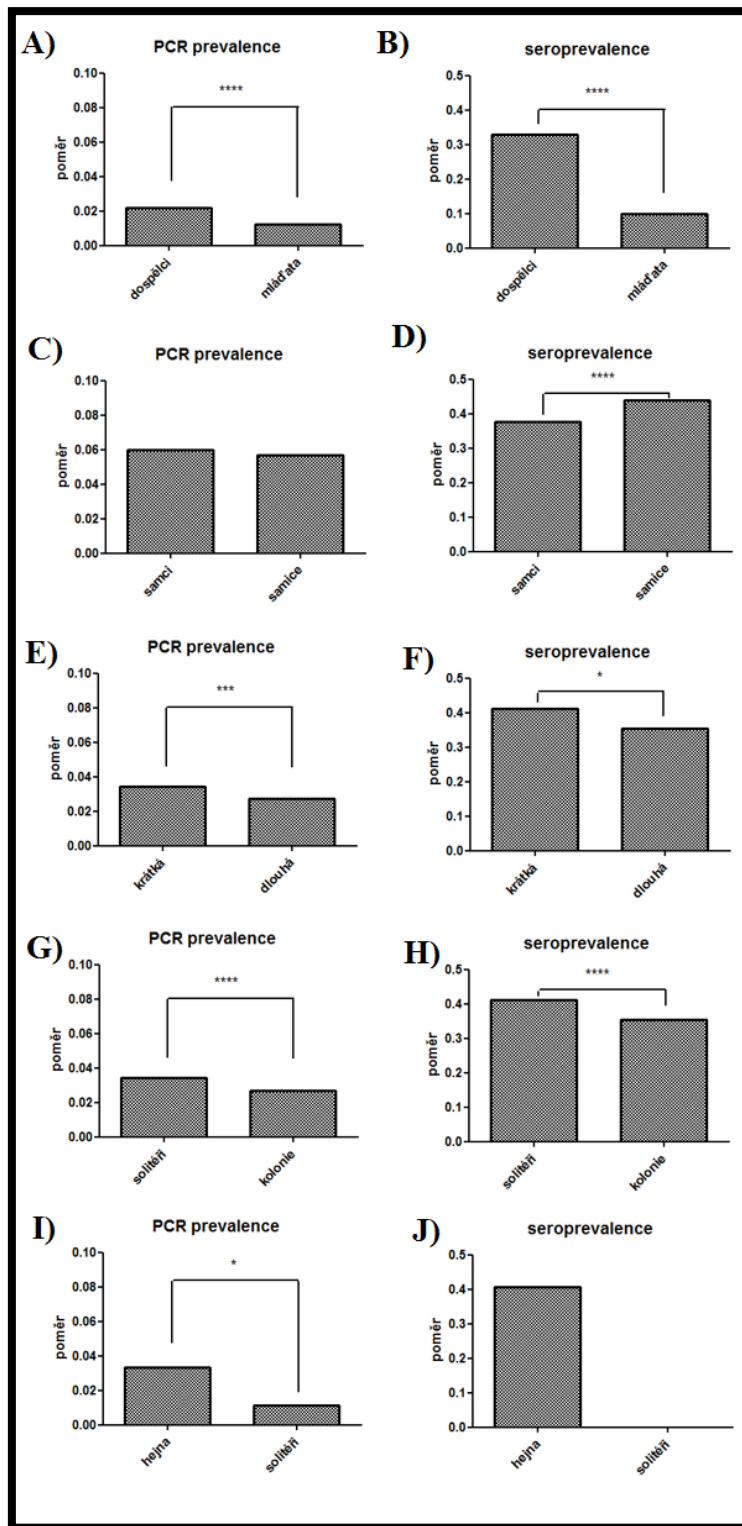
Seroprevalence respektive PCR prevalence AIV se signifikantně liší mezi jednotlivými kategoriemi zařazení za použití chí-kvadrát testu (seroprevalence - $\chi^2 = 185,94$; $p < 0,0001$ a PCR prevalence $\chi^2 = 1976,4$; $p < 0,0001$). Nejvyšší seroprevalenci mají jedinci z podčeledě hus (*Anserinae*), zatímco nejvyšší PCR prevalence je u jedinců z podčeledě kachny (*Anatinae*).

4.2.2 Rozdělení ptačích hostitelů AIV v polárních oblastech do kategorií

Všechna vybraná data z publikací byla rozdělena do dle námi vybraných kategorií. Testované počty jedinců pro každou kategorii jsou uvedeny v Tab 9. Pro každou kategorii byl zvlášť vytvořen graf ukazující podíl ptáků, u nichž byla detekována RNA viru chřipky pomocí RT-(q)PCR ze sěrů a graf ukazující procentuální zastoupení ptáků, v jejichž krvi byly detekovány protilátky AIV. Všechny grafy se statistickým vyhodnocením jsou na Obr. 18.

Tabulka 9: Vyselektovaná data z publikací, která byla rozdělena do kategorií. U každé kategorie je uveden počet testovaných jedinců, počet pozitivních jedinců a podíl mezi pozitivními jedinci ku všem jedincům.

Kategorie	Rozdělení	PCR testování	PCR pozitivní	Poměr	SERO testování	SERO pozitivní	Poměr
Věk	Dospělci	10229	224	0,0219	750	247	0,3324
	Mláďata	5921	74	0,0124	633	63	0,1054
Pohlaví	Samci	1299	78	0,0601	2471	929	0,3760
	Samice	999	47	0,0571	2396	1052	0,4391
Migrace	Jednotlivci	352	4	0,012	0	0	0
	V hejnech	109132	3663	0,0336	6575	2668	0,4058
Hnízdění	Samostatně	98606	3374	0,0342	6000	2464	0,4107
	Kolonie	10876	293	0,0269	575	204	0,3547
Délka života	Krátkodobě.	98784	3376	0,0342	6000	2464	0,4107
	Dlouhodobě.	10700	291	0,0272	575	204	0,3548



Obrázek 18: **A, B** - PCR prevalence a seroprevalence u dospělých ptáků a mláďat, **C, D** – PCR a seroprevalence rozlišená podle pohlaví (samice x samec). **E, F** - PCR prevalence a seroprevalence u krátkodobě a dlouhodobě žijících ptáků. **G, H** – PCR prevalence a seroprevalence rozdělená podle typu hnízdění – solitéři, hnízdění v kolonii. **I, J** – PCR prevalence a seroprevalence u jedinců migrujících samostatně, nebo v hejnu. Statistické zpracování bylo z původních dat. Statisticky průkazné výsledky byly vyhodnoceny, pokud byla hodnota $p < 0,05$.

Ze získaných údajů vyplývá, že prevalence AIV se signifikantně liší mezi mláďaty a dospělci (graf A - PCR prevalence $\chi^2 = 17,78$ $p < 0,0001$; graf B - $p < 0,0001$). Z hlediska pohlaví byl pozorovatelný rozdíl mezi samci a samicemi pouze v seroprevalenci (graf D – $\chi^2 = 19,81$ a $p < 0,0001$). Detekce AIV se mezi samci a samicemi neliší (graf C - $\chi^2 = 0,04520$; $p = 0,8316$). Životní strategie má vliv na seroprevalenci a cirkulaci viru AIV, kde je rozdíl signifikantnější v porovnání s detekcí protilátek. U krátkodobě žijících ptáků je vyšší jak seroprevalence, tak PCR prevalence (graf E - $\chi^2 = 14,31$; $p < 0,0002$ a graf F - $\chi^2 = 6,566$; $p = 0,0104$). Vliv hnízdění na prevalenci AIV je signifikantní jak z hlediska detekce protilátek, tak z hlediska detekce viru. Jedinci hnízdící samostatně mají vyšší PCR i seroprevalenci (graf G - $\chi^2 = 16,02$, $p < 0,0001$; graf H- $\chi^2 = 17,57$, $p < 0,0001$). Statistické vyhodnocení vlivu migrace bylo provedeno jen u PCR prevalence AIV, vzhledem k tomu, že detekce protilátek u samostatně migrujících ptáků nebyla provedena (graf I - $\chi^2 = 4,679$, $p = 0,305$; J).

4.3 Detekce protilátek proti AIV v séru racků tříprstých ze Svalbardu

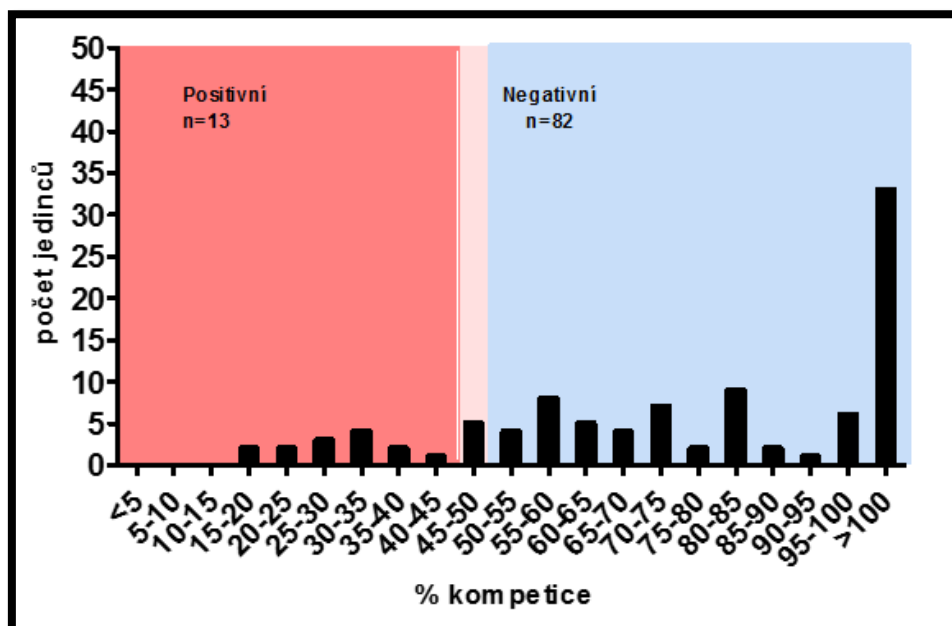
4.3.1 Původ vzorků k analýze výskytu AIV v dané kolonii

Na základě výsledků z předešlé analýzy byla vybrána kolonie mořských ptáků – racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu, sídlící v osadě Pyramiden, jako vhodná kandidátní populace ptáků pro studium prevalence viru ptačí chřipky na Svalbardu. Jedinci v této kolonii jsou snadno přístupní, protože ptáci hnízdí na římsách oken starý budov. Odebírání vzorků tedy probíhá bez jakékoliv nutnosti lézt po skalách a v nepřízní počasí existuje i možnost úkrytu. Zatímco ostatní druhy žijící v dané oblasti hnízdí většinou na skalních útvech na otevřených prostorech. Jejich hnízda jsou nedosažitelná a navíc kvůli ochraně hnízdišť pod podhledem státní správy (Syssemmannen) je potřeba získat povolení. Díky námi získanému povolení byla odebrána krev dospělcům racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) v letní sezóně roku 2014 v oblasti města Pyramiden na Svalbardu.

4.3.2 Detekce specifických protilátek proti viru ptačí chřipky typu A pomocí metody ELISA

U celkového počtu 100 odebraných krevních sér byl proveden kompetitivní ELISA test na přítomnost protilátek viru chřipky. Ze 100 testovaných vzorků bylo 13 vzorků pozitivních, 5 vzorků hraničních a 82 vzorků negativních. Výsledky jsou graficky

znázorněny na Obr. 19. Celková prevalence pozitivních vzorků z ELISA testu byla 13 % (13/100).

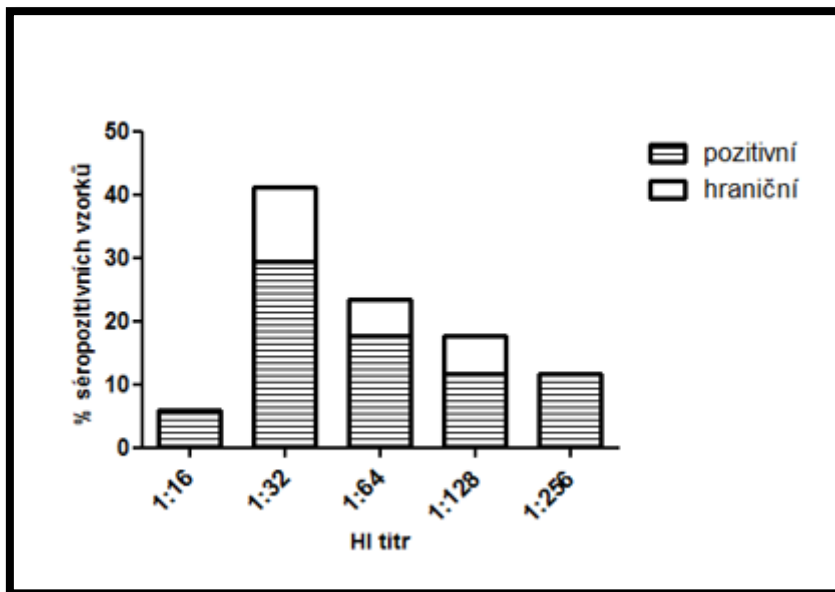


Obrázek 19: Výsledky ELISA testu na detekci protilátek AIV v krevním séru (n = 100) z racků tříprstých odebraných v letní sezóně 2014. Jako pozitivní výsledky byly vyhodnoceny vzorky, pokud kompetiční hodnota byla $\leq 45\%$, hraniční 45 – 50 % a negativní $\geq 50\%$.

4.3.3 Subtypizace AIV

Na analýzu pomocí metody hematoglutinačně inhibičního testu (HIT) bylo odesláno 13 vzorků (pozitivních při ELISA testech) a 4 vzorky s hraničním výsledkem a 1 vzorek negativní, jako kontrola. Celkově tedy bylo odesláno 18 vzorků na otestování výskytu protilátek proti viru ptačí chřipky subtypu H16. HIT byly prováděny dvojkovou ředící řadou s minimálním ředěním 1:16 (dále 1:32, 1:64, 1:128, atd.).

Z celkového počtu 17 krevních sér racků tříprstých (které vyšly pozitivně a hraničně při ELISA testech) byly v 17 vzorcích zjištěny protilátky proti AIV subtypu H16 pomocí HIT. Tedy u 100 % (17/17) vzorků byly prokázány protilátky. Titr jednotlivých vzorků je uveden na Obr. 20. U vzorku, který byl vyhodnocen jako negativní za použití ELISA metody, vyšel HI test též negativně za použití H16 antigenu.



Obrázek 20: Graf distribuce HI titrů proti AIV subtypu H16 v séru (n = 17).

5 DISKUZE

5.1 Arboviry

5.1.1 Vzorky komárů

Cílem první části této práce bylo vyšetřit více než 10 000 kusů komárů rodu *Aedes* na výskyt arbovirů z námi vybraných čeledí. Všichni komáři byli identifikováni jako druh komára *Aedes nigripes*. Určení bylo v souladu s geografickým rozdělením druhů komárů na Svalbardu a v Grónsku a morfologické určení bylo provedeno podle identifikačního klíče od autorů Becker a spol., 2011. Na Svalbardu žije pouze druh komára *Ae. nigripes* (Coulson a Refseth, 2007). V Grónsku sice žije i *Ae. impiger*, ale tento druh se neobjevuje v okolí místa Kangerlussuaq (Jenkins, 1956). Ve všech vyšetřených vzorcích jsme nedetekovali žádný pozitivní výskyt arbovirů. A to i přesto, že jsme byli schopni detekovat všechny pozitivní kontroly, u kterých jsme detekci prováděli za využití stejných metod, a které byly zpracovávány za stejných podmínek jako námi vyšetřované vzorky.

U tří vzorků komárů testovaných na přítomnost arbovirů z rodu *Orbivirus* byly objeveny DNA molekuly v přibližně shodné velikosti, jako je amplifikovaná velikost pozitivní kontroly. Po následném zjištění sekvence a jejím porovnáním se sekvencemi uloženými v databázi GenBank se ukázalo, že se jedná o nespecifické směsi molekul. Může to být způsobeno selháním PCR metody nebo provedenou amplifikací bez templátu.

Vzorky komárů byly sbírány v letních sezónách 2012-2016. Ihned po sběru byly uloženy do pufru RNAlater a dle dostupných podmínek uchovávány v chladícím zařízení. Náročnost uchování, přeprava vzorků z polárních oblastí (Svalbard, Grónsko) a stáří vzorků by mohli mít vliv na degradaci RNA a následné výsledky. Proto byl proveden test přítomnosti a kvality RNA po izolaci vzorků. RNA byla separativně rozdělena na agarózovém gelu pomocí elektroforézy a výsledné amplifikované produkty jsou na Obr. 14 v podkapitole Kontrola kvality RNA (4.1.3.). U RNA, která není izolována z hmyzu, je možné po separaci na gelu vidět 2 produkty ve velikostech 2 podjednotek rRNA (ribosomální RNA - velkou ribosomální podjednotku 28S ve velikosti přibližně 3800 bp a malou ribosomální podjednotku 18S ve velikosti přibližně 1900 bp), (Gillespie a spol., 2006). U hmyzí izolované RNA je 28S rRNA rozdělena na 2 molekuly přibližně stejné velikosti – α a β . Tyto dvě části velké ribosomální podjednotky jsou spojeny pomocí vazby vodíkových můstků. Když dojde k zahřívání hmyzí RNA (při izolaci, denaturaci, během elektroforézy) tak vazba mezi vodíkovými můstky se přeruší a vznikne komplex

podjednotky 28 S a spojí se s malou ribozomální podjednotkou 18S. Tento fragment spojený z obou podjednotek pak společně migruje agarózovým gelem a zobrazí se jako produkt ve velikosti přibližně 1900 bp (což je shodná velikost s malou ribozomální podjednotkou 18S), (Winnebeck a spol., 2010).

5.1.2 Arboviry a polární oblasti

Výskyt arbovirů ve vyšších zeměpisných šířkách v Arktidě je obecně limitovaný. Nejsevernější zeměpisná šířka, kde byly arboviry objeveny je 70° N (McLean 1975; Traavik a spol., 1978). A to i přesto, že se přenašeči postupem času přesouvají do vyšších zeměpisných šířek (Vora, 2008). Důvodem je změna klimatu v Arktidě, což zapříčiňuje mírnější zimy a zvětšující se počet vodních ploch díky tání ledovců (Johannessen a spol., 2004). Nové podmínky jsou vhodné pro rozmnožování komárů a zvyšování počtu jedinců v polárních oblastech. Navíc se díky oteplování, na námi sbírané lokalitě, zvyšuje i počet klíšťat, kteří jsou dalšími potenciálními přenašeči arbovirů v Arktidě (Descampes a spol., 2013).

Podle veškeré dostupné literatury a našich dosavadních výsledků zatím arboviry nebyly detekovány v oblastech Svalbardu a Grónska. Ani v naší předchozí analýze jsme nenalezli žádné arboviry ve vzorcích klíšťat z Grónska a Svalbardu (Elsterová a spol., 2015). Jedním z důvodů proč se arboviry nenacházejí na námi vyšetřovaných místech (Svalbard, Grónsko) může být, že arboviry nejsou schopni se na izolovaných ostrovech usadit kvůli nedostatku zdrojů arbovirových infekcí (infekčních hostitelů). Ačkoliv v Grónsku se vyskytuje zajíc polární (*Lepus arcticulus*), který je vhodným hostitelem pro Northway virus (Bennike a spol., 1989). Tento druh ale nemusí patřit do hostitelského spektra komára druhu *Ae. nigripes* (Corbet a Downe, 1966).

Druhým důvodem může být extrémní klima, ve kterém arboviry nejsou schopny cirkulovat. Replikace viru v přenašeči (komárovi) je velmi citlivá na teplotu, i když u Northway viru bylo dokázáno, že se dokáže replikovat v arktickém vektorovi rodu *Aedes* ve 4 °C (McLean a spol., 1979).

Třetím důvodem může být, že arboviry jsou v severních lokalitách obvykle detekovány v boreálních lesích v severním Norsku, nebo v Yukonském teritoriu (McLean 1975 a Traavik a spol., 1978). Zatímco ve studovaných lokalitách se nachází tundra, ale ne les.

Dalším příčinou je obecně velmi nízká prevalence arbovirů u komárů v Arktidě. Například prevalence dvou virů - Batai virus (BATV, *Orthobunyavirus*) a Getah virus (GETV, *Alphavirus*) na Sibíři se uvádí nižší než 1:24,000 (L'vov a spol., 1995). Z toho vyplývá, že pro nízký počet námi získaných a vyšetřených jedinců, nemusel být virus zachycen.

5.1.3 Následná práce a analýzy

Pro rozšíření znalosti o výskytu arbovirů v polárních oblastech je potřeba získat více informací o výběru hostitelů pro sání u dospělých jedinců komárů druhu *Ae. nigripes* v Grónsku a na Svalbardu. Informací, která by rozšířila znalosti o výskytu arbovirů u v polárních oblastech je zjištění hostitele, na kterém sají komáří samičky. Znamená to nachytat co nejvíce komárů, najít nasáté jedince a pomocí sekvenování cytochrom oxidázy zjistit z jakého hostitele pochází nasátá krev.

Problémem jsou i chybějící data o cirkulaci viru u komára druhu *Ae. nigripes*. Způsob jak lépe porozumět cirkulaci viru u tohoto druhu komára je přivést larvy a kukly komára do naší laboratoře. Nechat tato vývojová stádia vyvinout do dospělců a pokusit se je nakazit virem. Následné pozorování nám může dát odpovědi na otázky, jestli je virus schopný šířit se v komárovi, jestli existuje transovariální přenos a jestli komár dokáže infikovat nové hostitele.

Vysoko nad polárním kruhem ve Švédsku se u komárů objevují ve vysokých prevalencích dva druhy virů – Sindbis virus (*Alphavirus*) a Inkoo virus (*Orthobunyavirus*). U těchto virů byl dokonce detekován transovariální přenos (Tingström a spol., 2016). Je pravděpodobné, že i námi získaní komáři z oblastí Svalbardu a Grónsky by mohli tyto viry přenášet. Do budoucna je předpokládáno, že se vzorky otestují právě na přítomnost těchto dvou virů. Vhodnou metodou by byla PCR zacílené jen na jeden druh viru, která je znatelně citlivější, než PCR se specifickými primery pro celý rod arbovirů. Další možnost, jak v těchto vzorcích zjistit případný výskyt arbovirů je pomocí sekvenování nové generace (např. Illumina sekvenování).

5.2 Metaanalýza

Jak samotný výskyt viru ptačí chřipky, tak i přítomnost protilátek proti němu se u ptáků v polárních oblastech druhově různí. Nejvyšší výskyt protilátek je u podčeledě hus (*Anserinae*), zatímco nejvyšší frekvence výskytu samotného virus je u podčeledě kachen (*Anatinae*). To koresponduje s konstatováním, že kachny jsou hlavními přenašeči AIV ve světě (Stallknecht, 2003). Mezi taxonomickými skupinami se seroprevalence statisticky významně liší, ačkoliv přítomnost protilátek je poměrně vysoká u všech známých hostitelů tohoto viru. Zajímavý je poměrně vysoký výskyt protilátek u podřádu bahňáků (*Charadrii*), u kterých byla RNA viru ptačí chřipky nalezena jen s poměrně malou četností. To pravděpodobně ukazuje na to, že tito ptáci se AIV sice nakazit mohou, ale vzniklá protilátková odpověď je pak u nich dlouhodobá a zabráňuje tak další opětovné infekci. Z tohoto důvodu pak pravděpodobně nehrají v ekologii AIV významnou roli.

Prevalence AIV se významně liší u dospělých ptáků a mladých jedinců (všichni jedinci před druhým pelicháním). U dospělých ptáků byla častěji zaznamenána akutní infekce AIV i přítomnost protilátek. Jedním z důvodů může být, že se dospělí jedinci nakazí virem na vzdálených zimovištích (vhodnější podmínky pro cirkulaci AIV), kam mlád'ata (jedinci před prvním pelicháním) ještě nemigrovala a mladí jedinci (mezi prvním a druhým rokem života) je navštívila jen jednou, (Altizer a spol., 2011). Další potenciální důvod je, že dospělci se častěji shlukují do hejn. Dospělí jedinec se také může nakazit od jiného jedince při shánění potravy v těžce dostupných podmínkách v arktických oblastech.

Signifikantní rozdíl mezi samci a samicemi je pouze v seroprevalenci, kdy častější výskyt protilátek mají samice. Důvodem toho může být například delší výskyt samic některých druhů na zimovištích. Pohlaví ale nemá vliv na frekvenci detekce výskytu samotného viru u ptáků.

Životní strategie je pro výskyt viru velmi důležitá. Krátkou dobu žijící ptáci jsou vhodnými rezervoáry pro výskyt AIV (dožívají se 10-15 let). To je dané zejména tím, že krátce žijící ptáci každý rok vyvedou větší množství potomků, kteří jsou z imunologického hlediska naivní a jsou tedy vhodnými hostiteli pro AIV. Naopak u dlouho žijících jedinců (dožívají se desítky let) dojde k infekci AIV jen jednou v průběhu života a další opakovaná infekce je zablokována přítomností protilátek. Vzhledem k tomu, že replikační cyklus těchto ptáků je obecně pomalejší, mají i méně potomků, kteří pak mohou být AIV infikováni. Pokud tyto výsledky porovnáme s taxonomickým rozdělením ptáků, jak jsme je popsali

dříve, tak jsou výsledky snadno vysvětlitelné. Jelikož ptáci z podčeledě kachny (*Anatinae*) a husy (*Anserinae*) mají krátkodobou životní strategii a u nich byl největší záchyt AIV. Naopak bahňáci (*Charadrii*) jsou většinou dlouho žijící ptáci a nízký výskyt AIV ale vysoká seroprevalence je u nich očekávatelná.

Jedinci hnízdící samostatně jsou významnějšími hostiteli AIV oproti jedincům žijících v kolonii. Tento výsledek podporuje hypotézu, že k infekcím AIV dochází nejvíce na zimovištích, nebo při migraci v hejnech, jakožto infekční choroba, by AIV měla preferovat ptáky sdružující se do skupin, ať už při hnízdění nebo při migraci (Altizer a spol., 2011).

U způsobu migrace máme možnost porovnat pouze PCR prevalenci, u které vychází, že jedinci migrující v hejnech jsou častěji nakaženi AIV. To dokazuje, že shlukování během migrace, nebo na zimovištích kde jsou lepší podmínky pro přenos AIV a infikování nových jedinců je pro ekologii AIV důležitější než cirkulace tohoto viru v polárních oblastech (Reed a spol., 2003).

Výše zmíněné výsledky metaanalýzy naznačují, že Arktida nehraje významnou roli v přenosu AIV. Výsledky poukazují na fakt, že k rozsáhlým infekcím dochází pravděpodobně především na zimovištích, či během migrace.

5.3 Ptačí chřipka

5.3.1 Získané vzorky

Podle výsledků z metaanalýzy na výskyt ptačí chřipky v polárních oblastech bylo potvrzeno, že u racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) byl zaznamenán záchyt protilátek proti viru chřipky v arktických oblastech (Toennesen a spol., 2011). Díky možnosti pobytu na terénní stanici v Petuniabuktě na Svalbardu bylo možné pozorovat a vybrat si dostupnou kolonii racků tříprstých sídlících v Pyramiden, což je osada nacházející se v blízkosti terénní stanice Centra Polární Ekologie na Svalbardu. Tato osada je bývalé sovětské město Pyramiden, které sloužilo pro těžbu nerostných surovin. Z toho důvodu se zde nachází mnoho budov, které poskytovaly ubytování zdejším pracovníkům. Také se zde nacházejí dřevěné tunely a jiné stavby, které sloužily pro přepravu uhlí. Vzhledem k tomu, že byla těžba v této osadě ukončena je Pyramiden opuštěným místem s hojným počtem prázdným budov a tudíž vhodnou lokalitou pro hnízdění kolonie racků tříprstých.

Díky získanému povolení pro sezónu 2014 jsme v této kolonii odebrali 100 krevních sér a stěrů z racků tříprstých. Krevní séra byla otestována na přítomnost protilátek proti viru ptačí chřipky. Z celkového počtu bylo po provedení ELISA testů 14 vzorků pozitivních a 5 vzorků hraničních, zbylé vzorky byly negativní. Po provedeném vyšetření vzorků se ukázalo, že 17 vzorků bylo pozitivních na výskyt ptačí chřipky subtypu H16. Tedy celková prevalence u námi testovaných vzorků byla 17 % (17/100). Bohužel oproti jiným studiím je počet vzorků nízký (Toennesen a spol., 2011), ale množství odebraných vzorků bylo limitováno získaným povolením a velikostí kolonie. Na druhou stranu se jedná o jedinečné a první testované vzorky na výskyt ptačí chřipky z oblasti Svalbardu. Nízké procento prevalence je v souladu s výsledky metaanalýzy, která ukázala, že Arktida není vhodným rezervoárem pro výskyt ptačí chřipky.

Subtyp AIV, na který jsme nechali vzorky otestovat, byl vybrán podle dostupné literatury. Subtyp typu H16 je nejčastěji detekovaným subtypem u racků tříprstých (Obenauer a spol., 2006). Dalším subtypem, který je s racky spojován a je u nich často detekován je H13 (Fouchier a spol., 2005). Pro tyto dva subtypy jsou racci hlavními rezervoáry (Verhagen a spol., 2014). Naším záměrem bylo i nechat otestovat vzorky na subtyp viru ptačí chřipky H13, bohužel tento subtyp nebyl v České republice dostupný. Podařilo se nám ho získat až velmi nedávno a z toho důvodu nejsou tyto výsledky v diplomové práci zahrnuty.

5.3.2 Vliv klimatických změn na virus ptačí chřipky

Během poslední dekády let má na rozšiřování infekcí vliv hned několik věcí – lidská aktivita, změny v přírodě, klimatické změny atd. Tyto změny dávají příležitost k šíření infekcí a patogenů do nových oblastí, nebo možnost infikovat nové hostitele (Arnal a spol., 2014). Příkladem je epidemie SARS z počátku 21. století (Heymann a Rodier., 2004). Dalším vhodným příkladem je virus chřipky, který pochází z volně žijících živočichů a představuje hrozbu pro lidi a ostatní živočichy (Li a spol., 2004). V roce 2005 propukla panzootická vlna viru ptačí chřipky v jihovýchodní Asii a také v tomto roce se začala šířit vysoce patogenní forma chřipky H5N1 západně přes Eurasii (Gilbert a spol., 2008). Od roku 2005 se tak začalo virem chřipky zabývat mnoho laboratoří po celém světě.

Klimatické podmínky mají v několika ohledech významný vliv na virus ptačí chřipky. Změna klimatu může mít za následek větší druhovou rozmanitost ptáků v severních zeměpisných šířkách. Očekává se, že ptáci ze severních oblastí nebudou podnikat daleké

migrační cesty (Lemoine a Böhning-Gaese, 2003). Studie dále ukazují, že změna klimatu má vliv na jarní migraci, která probíhá dříve (Both a spol., 2005). Předpovědi klimatických změn ukazují, že se budou zvyšovat teploty v oblastech blízko Arktidy a to výrazněji než v místech jižní zeměpisné šířky (Gilbert a spol., 2008). To může výrazně ovlivnit migraci ptáků hnízdících v arktických oblastech. Zvýšení podílu a počtu zimujících ptáků v arktických oblastech může mít za následek shlukování ptáků, kteří budou soupeřit o dostupnou potravu. To by mohlo potencionálně zvýšit přenos viru mezi jednotlivci, nebo jednotlivými druhy. Navíc i tání ledovců a zvyšování hladiny moře v arktických oblastech může přispívat ke změnám v ekologii a jeho přežití ve vodě. Klimatické změny můžou mít i významný vliv na migraci zcela nových druhů do Arktidy, které mohou chřipku přenášet efektivněji.

5.3.3 Pokračující analýzy

V praktické části této práce bylo dokončeno testování krevních sér racků tříprstých na přítomnost protilátek proti viru ptačí chřipky. Zatím byla u krevních sér provedena specifikace pro subtyp viru ptačí chřipky na H16. Vzhledem k hojnému výskytu subtypu H13 u racků, budou pozitivní krevní séra otestována i na přítomnost subtypu H13.

Studie, které se zabývají detekcí viru ptačí chřipky u volně žijících ptáků, se zaměřují jak na výskyt protilátek, tak na přímý výskyt viru chřipky. Přímý výskyt viru se provádí ze stěrů, které jsou odebrány ptákům buď z kloaky, nebo z orofaryngu. Proto i během našeho odchytu ptáků na Svalbardu jsme všem jedincům provedli stěr kloaky a orofaryngu a vzorky jsou uchovány a připraveny k testování. Výskyt viru se provádí pomocí izolace RNA a následně kvantitativní jednokrokovou RT-qPCR se specifickými primery a sondou. Tato metoda na našich vzorcích bude provedena v následujících měsících.

Virus lze také izolovat z čerstvých exkrementů (Brown a spol., 2012) a proto jsme pro rozšíření studie u racků tříprstých v roce 2016 nasbírali okolo 100 vzorků exkrementů ze stejné oblasti. V letních sezónách 2015 a 2016 jsme se při pobytu na Svalbardu zaměřili na sběr exkrementů od husy krátkozobé (*Anser brachyrhynchus*) a bernešky bělolící (*Branta leucopsis*). V roce 2015 jsme nasbírali 26 vzorků exkrementů a v roce 2016 139 vzorků exkrementů. Tyto vzorky budou v následujících letech otestovány na přítomnost viru. Naším dalším cílem je odebrat vzorky z vodních ploch v této oblasti a pokusit se izolovat virus z těchto vzorků.

6 ZÁVĚR

Byla provedena detekce arbovirů z 5 různých čeledí ve více než 10 000 vzorcích komárů získaných ze Svalbardu a Grónska. Tím byla rozšířena předešlá studie na výskyt arbovirů v polárních oblastech. Pomocí metod molekulární biologie (RT-PCR) nebyl prokázán žádný výskyt arbovirů ve vzorcích. Pro úplné vyloučení arbovirů v námi studovaných oblastech je nutné otestovat větší počet komárů z nadcházejících sezón.

Dále byla vytvořena metaanalýza na výskyt ptačí chřipky v polárních oblastech ve spolupráci s RNDr. Jiřím Černým, Ph.D., Bc. Janou Müllerovou, RNDr. Janou Elsterovou, Mgr. Václavem Hönigem, Ph.D., RNDr. Václavem Pavlem, Ph.D. Výsledky této metaanalýzy poukázaly na fakt, že Arktida nehraje tak důležitou roli pro ekologii ptačí chřipky, protože u arktických ptáků se větší množství infekcí objevuje na zimovištích.

Bylo provedeno první testování přítomnosti protilátek proti viru ptačí chřipky z krevních sér získaných v kolonii racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu. Pomocí imunologické metody ELISA byla zjištěna přítomnost protilátek proti AIV u ptáků z této kolonie. Byla provedena základní subtypizace viru, pomocí HI testů. Celkem jsme prokázali přítomnost AIV subtypu H16 u 17 z testovaných jedinců.

Všechny výsledky z této práce rozšiřují znalosti o celkovém výskytu virů v polárních oblastech.

7 SEZNAM ZKRATEK

Ae. – *Aedes*

AHSV – African Horse Sickness Virus - virus afrického moru koní

AIV – Avian influenza virus - virus ptačí chřipky

ASFV – African swine fever virus - virus afrického moru prasat

ATB – antibiotika

BTV – Bluetongue virus - virus katarální horečky ovcí

CMCV – Catch me cave virus

DENV – Dengue virus

DNA – deoxyribonucleic acid – deoxyribonukleová kyselina

EEEV – Eastern equine encephalitis virus - virus koňské encefalomyelitidy východního typu

GL – glutamin

HA – hemaglutinin

HPAIV – Highly Pathogenic Avian Influenza Virus – vysoce patogenní forma ptačí chřipky

CHIKV – Chikungunya virus

I. – *Ixodes*

kb – kilobase - kilobáze

KEMV – Kemerovo virus

L15 – Leibowitz's L15 medium

LPAIV – Low Pathogenic Avian Influenza Virus – nízko patogenní forma ptačí chřipky

M1/2 – matrix protein 1/2 – matrixový protein 1/2

mRNA – messenger RNA - mediatorová ribonukleová kyselina

NA – neuraminidase - neuroamidáza

NP – nucleoprotein - nukleoprotein

NS1/2- nonstructural protein 1/2 – nestrukturní protein 1/2

NWV - Northway virus

One-step qRT-PCR - One-step Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction – jednokroková kvantitativní polymerázová řetězcová reakce spojená s reverzní transkripcí

PA – Polymerase acidic protein

PB1- Protein PB1

PB1-F2 – Protein PB1-F2

PB2 - Protein PB2

PCR – polymerase chain reaction – polymerázová řetězcová reakce

PTS – prekolostrální telecí sérum

RNA – ribonucleic acid - ribonukleová kyselina

RT-PCR – Reverse Transcription polymerase chain reaction – polymerázová řetězcová reakce spojená s reverzní transkripcí

RVFV Rift Valley Fever virus – virus horečky údolí Rift

SAKV – Sakhalin virus

SESV – Southern elephant seal virus

SINV – Sindbis virus

SLEV – St. Louis encephalitis virus

SSHV – Snowshoe hare virus

ssRNA – single strand RNA – jednovláknová RNA

TAE – Tris – acetate – ethylendiamintetraoctovou

TBEV – Tick-borne encephalitis virus - virus klíšťové encefalidity

TRBV – Tribec virus - Tribeč virus

VEEV – Venezuelan equine encephalitis virus - virus venezuelské koňské encefalomyelitidy

WEEV – Western equine encephalitis virus virus koňské encefalomyelitidy západního typu

WNV – West Nile virus - virus západonilské horečky

YFV – Yellow fever virus - virus žluté zimnice

ZIKV – Zika virus

ZTV - Zaliv Terpenia virus

8 CITACE

Andayi F., Charrel R.N., Kieffer A., Richet H., Pastorino B., Leparc-Goffart L., Abdo Ahmed A., Carrat F., Flahaut A., Lamballerie X. (2014). A Sero-epidemiological Study of Arboviral Fevers in Djibouti, Horn of Africa. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8(12):3299.

Anisimov O.A., Vaughan D.G., Callaghan T.V., Furgal C., Marchant H., Prowse T.D., Vilhjálmsson H., Wals J.E. (2007). Polar regions (Arctic and Antarctic). *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. 653-685.

Arnal A., Vittecoq M., Pearce-Duvel J., Gauthier-Clerc M., Boulinier T., Jourdain E. (2015). Laridae: A neglected reservoir that could play a major role in avian influenza virus epidemiological dynamics. *Critical Reviews in Microbiology*. 41(4):508-19.

Altizer S., Bartel R., Han B.A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. *Science*. 331(6015):296-302.

Becker W.B. (1966). Isolation and Classification of Tern Virus – Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *Journal of Hydrology*. 64:309-20.

Bennike O., Higgins A., Kelly M. (1989). Mammals of central North Greenland. *The Polar Record*. 25:43–9.

Both Ch., Biljsma R.G., Visser M.E. (2005). Climatic effects on timing of spring migration and breeding in a long-distance migrant, the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology*. 36(5):368-73.

Brown J.D., Berghaus R.D., Costa T.P., Poulson R., Carter D.L., Lebarbenchon C., Stallknecht D.E. (2012). Intestinal excretion of a wild bird-origin H3N8 Low Pathogenic Avian Influenza virus in mallards (*Anas Platyrhynchos*). *Journal of Wildlife Diseases*. 48(4):991-8.

Brown J.D., Goekjian G., Poulson R., Valeika S., Stallknecht D.E. (2009). Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*. 136(1-2):20-6.

Brugh M., Johnson D.C. (1986). Epidemiology of Avian Influenza in Domestic Poultry. *Avian Diseases*. 47:177-86.

- Brummer-Korvenkontio M., Saikku P., Korhonen P., Ulmanen I., Reunala T., Karvonen J. (1973).** Arboviruses in Finland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 22(3):404-13.
- Capua A., Alexander D.J. (2002).** Avian influenza and human health. *Acta Tropica*. 83(1):1-6.
- Capua I., Mutineli F., Marangon S., Alexander D.J. (2010).** H7N1 avian influenza in Italy (1999 to 2000) in intensively reared chickens and turkeys. *Avian Pathology*. 29(6):537-43.
- Carrat F., Flahault A. (2007).** Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 25(39-40):6852-62.
- Carson P.K., Holloway K., Dimitrova K., Rogers L., Chaulk A.C., Lang A.S., Whitney H.G., Drebot M.A., Chapman T.W. (2017).** The seasonal timing of snowshoe hare virus transmission on the island of Newfoundland, Canada. *Journal of Medical Entomology* 54:712–18.
- Corbet P.S., Downe A.E.R. (1966).** Natural hosts of mosquitoes in northern Ellesmere Island. *ARCTIC Journal*. 19:153–61.
- Costa C.F., Passos R.A., Lima J.B.P., Roque R.A., Sampaio V.S., Campolina T.B., Secundido N.F.C., Pimenta P.F.P. (2017).** Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: a local model of xenomoting. *Parasites and Vectors*. 10:249.
- Coulson S.J. (2007).** Terrestrial and freshwater invertebrate fauna of the high Arctic archipelago of Svalbard. *Zootaxa*. 1448:41-58.
- Coulson S.J., Refseth D. (2007).** The terrestrial and freshwater invertebrate fauna of Svalbard (and Jan Mayen). *Zootaxa*. 1448:41-58.
- Culler L.E., Ayres M.P., Virginia R.A. (2015).** In a warmer Arctic, mosquitoes avoid increased mortality from predators by growing faster. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 282:e20151549.
- Curran J.M., Robertson I.D., Ellis T.M., Selleck P.W. (2014).** Evaluation of avian influenza serologic and virologic diagnostic methods in wild Anseriformes and Charadriiformes. *Avian Diseases*. 58(1):53-9.

Dedkov V.G., Markelov M.L., Gridneva K.A., Bekova M.V., Gmyl A.P., Kozlovskaya L.I., Karganova G.G., Romanova L.I., Pogodina V.V., Yakimenko V.V., Shipulin G.A. (2014). Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. *Ticks Tick-Borne Dis.* 5(6):651–5.

Descamps S. (2013). Winter temperature affects the prevalence of ticks in an Arctic seabird. *PLoS ONE.* 8:e65374.

Doherty R.L., Carley J.G., Murray M.D., Main A.J., Kay B.H., Domrow R. (1975). Isolation of arboviruses (Kemerovo group, Sakhalin group) from *Ixodes uriae* collected at Macquarie Island, Southern Ocean. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 24(3):521–6.

Dusek R.J., Hallgrimsson G.T., Ip H.S., Jonsson J.E., Sreevatsan S., Nashold S.W., TeSlaa J.T., Enomoto S., Halpin R.A., Lin X., Fedorova N., Stockwell T.B., Dugan V.G., Wentworth D.E., Hall J.S. (2014.) North Atlantic migratory bird flyways provide routes for Intercontinental movement of Avian Influenza Viruses. *PLoS ONE.* 9(3):e92075.

Eldridge B.F. (1990). Evolutionary Relationships Among California Serogroup Viruses (*Bunyaviridae*) and *Aedes Mosquitoes (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Medical Entomology.* 27(5):738-49.

Elsterová J., Černý J., Müllerová J., Šíma R., Coulson S.J., Lorentzen E., Strom H., Grubhoffer L. (2015). Search for tick-borne pathogens in the Svalbard Archipelago and Jan Mayen. *Polar Research.* 34(1).

Endres M.J., Jacoby D.R., Janssen R.S., Gonzalez-Scarano F., Nathanson N. (1989). The large viral RNA segment of California serogroup bunyaviruses encodes the large viral protein *Journal of General Virology.* 70(1):223-28.

Fazakerley J.K., Gonzalez-Scarano F., Strickler J., Dietzschold B., Karush F., Nathanson N. (1988). Organization of the middle RNA segment of snowshoe hare bunyavirus. *Virology.* 167:422-32.

Forrester N.L., Palacios G., Tesh R.B., Savji N., Guzman H., Sherman M., Weaver S.C., Lipkin W.I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the Alphaviruses Genus Suggests a Marine Origin. *Journal of Virology.* 86(5):2729-38.

Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herfst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. (2005). Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *Journal of Virology*. 79:2814-22.

Fuller F., Bhowan A.S., Bishop D.H. (1983). Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NSS, are coded by overlapping reading frames in the S RNA. *Journal of General Virology*. 64(8):1705-14.

Garmashova N., Gorchakov R., Volkova E., Paessler S., Frolova E., Frolov I. (2007). The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of Virology*. 81(5):2472-84.

Gilbert M., Xiao X., Pfeiffer D.U., Epprecht M., Boles S., Czarnecki C., Chaitaweesub P., Kalpravidh W., Minh P.Q., Otte M.J., Martin V., Slingenbergh J. (2008). Mapping H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(12):4769-74.

Gillespie J.J., Cannone J.J., Gutell R.R. (2006). Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): Structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Molecular Biology*. 15(5):657–86.

Gíslason G. M. (2005). „Why are there no mosquitoes in Iceland, when they live on both sides of Greenland?“. *The Icelandic Web of Science*.16(4):405.

Gould E., Pettersson J., Higgs S., Charrel R., Xavier L. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*. 4:1-13.

Gresikova M., Nosek J., Kozuch O., Ernek E., Lichard M. (1965). Study on ecology of Tribec virus. *Acta Virologica*. 9(1):83-8.

Grunt J.B., Brinton M.A. (1986). Characterization of West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase and cellular terminal adenylyl and uridylyl transferases in cell-free extracts. *Journal Of Virology*. 60(3):1113-24.

- Gubler D.J. (1998).** The Global Pandemic of dengue/dengue haemorrhagic fever: current status and prospects for the future. *ANNALS Academy of Medicine Singapore*. 27(2):227-34.
- Gubler D.J. (2002).** The Global emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Official Journal of the Instituto Mexicano del Seguro Social*. 33(4):330-42.
- Hall J.S., TeSlaa J.L., Nashold S.W., Halpin R.A., Stockwell T., Wentworth D.E., Dugan V., Ip H.S. (2013).** Evolution of a reassortant North American gull influenza virus lineage: drift, shift and stability. *Virology Journal*. 10:179.
- Han B.A., Kramer A.M., Drake J.M. (2016).** Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. *Trends in Parasitology*. 32(7):565-77.
- 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.
- Hayden F., Croisier A. (2005).** Transmission of Avian Influenza Viruses to and between Humans. *The Journal of Infectious Diseases*. 192(8):1311-4.
- Heymann D.L., Rodier G. (2004).** Global Surveillance, National Surveillance, and SARS. *Emerging Infectious Diseases*. 10(2):173-5.
- Hinshaw V.S., Air G.M., Gibbs A.J., Graves L., Prescott B., Karunakaran D. (1982).** Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *Journal of Virology*. 42:865-72.
- Hinshaw V.S., Bean W.J., Geraci J., Fiorelli P., Early G., Webster R.G. (1986).** Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *Journal of Virology*. 58:655-6.
- Horimoto T., Kawaoka Y. (2005).** Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nature Reviews Microbiology*. 3(8):591-600.
- Hubálek Z. (2003).** Emerging Human Infectious Diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Saprozooses. *Emerging Infectious Diseases*. 9(3):403-4.

Hubálek Z. Microbial Zoonoses and Saprinoses. Rudolf I. Dordrecht: Springer. (2011). pp 457. ISBN:978-90-481-9656-2.

Hueffer K., O'Hara T.M., Follmann E.H. (2011). Adaptation of mammalian host-pathogen interactions in a changing arctic environment. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 53(1):17

Hughes H.R., Lanciotti R.S., Blair C.D., Lambert A.J. (2017). Full genomic characterization of California serogroup viruses, genus *Orthobunyavirus*, family *Peribunyaviridae* including phylogenetic relationships. *Virology*. 512:201-10.

Charrel R. N., Izri A., Temmam S., Lamballerie X. Parola P. (2006). Toscana Virus RNA in *Sergentomyia minuta* Flies. *Emerging Infectious Diseases*. 12:8:1299-1300.

Chumakov M.P. (1963). Report on isolation from *Ixodes persulcatus* ticks and from patients in Western Siberia of a virus differing from agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virologica*. 7(1):82-3.

Ito T., Okazaki K., Kawaoka Y., Takada A., Webster R.G., Kida H. (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaska waterfowl reservoirs. *Archives of Virology*. 140:1163-72.

James H.G. (1966). Location of univoltine *Aedes* eggs in woodland pool areas and experimental exposure to predators. *Mosquito News*. 26(1).

Jenkins DW. Ecology of Arctic and Subarctic mosquitoes. (1956). International Congress of Entomology. Montreal. 627-634i.

Johannessen O.M., Bengtsson L., Miles M.W., Kuzmina S.I., Semenov V.A., Alekseev G.V., Nagurnyi A.P., Zakharov V.F., Bobylev L.P., Pettersson L.H., Hasselmann K., Cattle H.P. (2004). Arctic climate change: observed and modelled temperature and sea-ice variability. *Tellus A*. 56(4):328-41.

Jose J., Snyder J.E., Kuhn R.J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*. 4(7):837-56.

Keawcharoen J., Oraveerakul K., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Amonis A., Payungporn S., Noppornpath S., Wattanodorn S., Theamboonlers A., Tantilertcharoen R., Pattanarangsarn R., Arya N., Ratanakorn P., Osterhaus A.D.M.E., Poovorawan Y. (2004). Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards. *Emerging Infectious Diseases*. 10(12):2189-91.

Kilbourne E.D. (2006). Influenza Pandemic of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases*. 12(1):9-14.

Kleiboeker S.B., Scoles G.A. (2001). Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks. *Animal Health Research Reviews*. 2(2):121-8.

Kuno G, Mitchell C.J., Chang G-J.J., Smith G. C. (1996). Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California Serogroups by a PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:5:1184-1188.

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. *Clinical Microbiology Reviews*. 18(4):608-37.

Kurkela S., Ratti O., Huhtamo E., Uzcategui N.Y., Nuorti P., Laakkonen J., Manni T., Helle P., Vaheri A., Vapalahti O. (2008). Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, Finland. *Emerging Infectious Diseases*. 14(1):41-7.

Kurstak E. Arctic and Tropical Arboviruses. Cambridge: Academic Press. (1979). pp 342. ISBN: 9780323155120.

L'vov D.K., Timofeeva A.A., Gromashevski V.L., Chervonsky V.I., Gromov A.I., Tsyarkin Y.M., Pogrebenko A.G., Kostyrko I.N. (1972). "Sakhalin" virus — a new arbovirus isolated from Ixodes (Ceratiixodes) putus Pick.-Camb. 1878 collected on Tuleniy Island, Sea of Okhotsk. *Archiv für die gesamte Virusforschung*. 38:133.

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.

L'vov S.D., Pogorelyi A., Skvortsova T.M., Kiseleva L.V., Berezina L.K. (1985). Isolation of the Tahyna bunyavirus in the Arctic. *Voprosy Virusologii*. 30(6):736-40.

L'vov S.D., Gromashevskii V.L., Skvortsova T.M., Aristova V.A., Golobinskiĭ E.P., Gorin O.Z., Kolobukhina L.V., Bol'shakov E.P., Morozova T.N., Feoktistov A.Z. (1995). Mosquito-borne arboviruses in the Baikal region. *Voprosy Virusologii*. 40:170–2.

La Linn M., Gardner J., Warrilow D., Darnell G.A., McMahon C.R., Field I., Hyatt A.D., Slade R.W., Suhrbier A. (2001). Arboviruses of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *Journal of Virology*. 75(9):4103-9.

LeDuc J.W., Barry M.A. (2004). SARS, the First Pandemic of the 21st Century. *Emerging Infectious Diseases*. 10(11):26.

Lemoine N., Böhning-Gaese K. (2003). Potential Impact of Global Climate Change on Species Richness of Long-Distance Migrants. *Conservation Biology*. 17(2):577-86.

Lequime S., Lambrechts L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*. 28:681-90.

Li K.S., Guan Y., Wang J., Smith G.J.D., Xu K.M., Duan L., Rahardjo A.P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T.G., Estoepangestie A.T.S., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H.T., Hanh N.T.H., Webby R.J., Poon L.L.M., Chen H., Shortridge K., Yuen K.Y., Webster R.G., Peiris J.S.M. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 430:209-13.

Main A.J., Shope R.E., Wallis R.C. (1976). Cape Wrath: a New Kemerovo Group Orbivirus from *Ixodes Uriae* (Agari: Ixodidae) in Scotland. *Journal of Medical Entomology*. 13(3):304-8.

Main A.J., Downs W.G., Shope R.E., Wallis R.C. (1973). Great Island and Bauline: Two New Kemerovo Group Orbiviruses from *Ixodes Uriae* In Eastern Canada. *Journal of Medicine Entomology*. 10(3):229-35.

Major L., Linn M.L, Slade R.W, Schroder W.A., Hyatt A.D., Gardner J., Cowley J., Suhrbier A. (2009). Ticks associated with Macquarie Island Penguins carry arboviruses from four Genera. *PLoS ONE* 4(2).

Major L., Linn M.L., Slade R.W., Schroder W.A., Hyatt A.D., Gardner J., Cowley J., Suhrbier A. (2009). Ticks associated with Macquarie Island penguins carry arboviruses from four genera. *PLoS ONE*. 4:e4375.

- Mansuy J.M., Dutertre M., Mengelle C., Fourcade C., Marchou B., Delobel P., Izopet J., Martin-Blondel G. (2016).** Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases*.
- Masic A., Pyo H.M., Babiuk S., Zhou Y. (2013).** An Eight-Segment Swine Influenza Virus Harboring H1 and H3 Hemagglutinins Is Attenuated and Protective against H1N1 and H3N2 Subtypes in Pigs. *Journal of Virology*. 87(18):10114-25.
- Mavale M., Parashar D., Sudeep A., Gokhale M., Ghodke Y., Geevarghese G., Arankalle V., Mishra A.C. (2010).** Venereal Transmission of Chikungunya Virus by *Aedes aegypti* Mosquitoes (Diptera: Culicidae). 83(6):1242-44.
- Mavroidi N. (2008).** Transmission of zoonoses through immigration and tourism. *Veterinaria Italiana*. 44(4):651-6.
- McLean D.M. (1975).** Mosquito-borne arboviruses in Arctic America. *Med Biol* 53:264–70.
- McLean D.M. (1983).** Yukon isolates of Snowshoe Hare virus, 1972 – 1982. *Progress in clinical and biological research*. 123:247–56.
- 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. *The Journal of Hygiene*. 79(1):61–71.
- McLean D.M., Grass P.N., Judd B.D., Stolz K.J. (1979).** Bunyavirus development in arctic and *Aedes aegypti* mosquitoes as revealed by glucose oxidase staining and immunofluorescence. *Archives of Virology*. 62:313–22.
- Mellor P.S. (2000).** Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *Journal of Comparative Pathology*. 123:231-47.
- Mellor P.S., Boorman J. (2016).** The transmission and geographical spread of African horse sickness and bluetongue viruses. *Annals of Tropical Medicine Parasitology*. 89(1):1-15.
- Mitchell C.J., L'vov S.D., Savage H.M., Calisher C.H., Smith G.C., L'vov D.K., Gubler D.J. (1993).** Vector and host relationships of California serogroup viruses in western Siberia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49(1):53–62.

Müllerová J., Elsterová J., Černý J., Ditrich O., Žárský J., Culler L.E., Kampen H., Walther D., Coulson S.J., Růžek D., Grubhoffer L. (2018). No indication of arthropod – vectored viruses in mosquitoes (Diptera:Culicidae) collected on Greenland and Svalbard. *Polar Biology*.

Mutebi J.P., Gianella A., Rosa A.T., Tesh R.B., Barrett A.D.T., Higgs S. (2004). Yellow Fever Virus Infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Emerging Infectious Diseases*. 10(9):1657-60.

Obenauer J.C., Denson J., Mehta P.K., Su X., Mukatira S., Finkelstein D.B., Xu X., Wang J., Ma J., Fan Y., Rakestraw K.M., Webster R.G., Hoffmann E., Krauss S., Zheng J., Zhang Z., Naeve C.W. (2006). Large-scale sequence analysis of avian influenza isolates. *Science*. 311:1576-80.

Palacios G., Cowled Ch., Bussetti A. V., Savji N., Weir R., Wick I., Travassos da Rosa A., Calisher CH. H., Tesh R. B., Boyle D., Lipkin W. (2011). Rapid Molecular Strategy for Orbivirus Detection and Characterization. *Journal of Clinical Microbiology*. 49:6:2314-2317.

Pavio N., Meng X.J., Renou C. (2010). Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Veterinary Research*. 41:46-66.

Pedersen K., Marks D.R., Wang E., Eastwood G., Weaver S.C., Goldstein S.M., Sinnott D.R., DeLiberto T.J. (2016). Widespread detection of antibodies to eastern equine encephalitis, West Nile, St. Louis encephalitis, and Turlock viruses in various species of wild birds from across the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 95(4):206–11.

Peiris M., Yuen K.Y., Leung C.W., Chan K.H., Ip P.L.S., Lai R.W.M., Orr W.K., Shortridge K.F. (1999). Human infection with influenza H9N2. *The Lancet*. 354(9182):916-7.

Pereda A.J., Uhart M., Perez A.A., Zaccagnini M.E., La S.L., Decarre J., Gojiman A., Solari L., Suarez R., Craig M.I., Vagnozzi A., Rimodi A., Konig G., Terrera M.V., Kaoghlian A., Song H., Sorrel E.M., Perez D.R. (2008). Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology*. 378:363-70.

- Perreira R., Cook S., Lopes A., Pedro de Matos A., Gouveia de Almeida A.P., Piedade J., Esteves A. (2012).** Genetic characterization of an insect-specific flavivirus isolated from *Culex theileri* mosquitoes collected in southern Portugal. *Virus Research*. 167(2):152-61.
- Pfeffer M., Dobler G. (2010).** Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*. 3(1):35.
- Pierson T.C., Graham B.S. (2016).** Zika Virus: Immunity and Vaccine Development. *Cell*. 167(3):625-31.
- Pushpa V., Venkatesikalum M., Mohan S., Cherian T., John J., Ponnuraj E.M. (1998).** An Epidemic of dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome in tropical India. *Annals of Tropical Paediatrics*. 18(4):289-93.
- Putkuri N., Kantele A., Levanov L., Kivistö I., Brummer-Korvenkontio M., Vaheeri A., Vapalahti O. (2016).** Acute Human Inkoo and Chatanga Virus Infections, Finland. *Emerging Infectious Diseases*. 22(5):810-7.
- Ramey A.M., Pearce J.M., Ely C.R., Sheffield Guy L.M., Irons D.B., Derksen D.V., Ip H.S. (2010).** Transmission and reassortment of avian influenza viruses at the Asian-North America interface. *Virology*. 406:352-9.
- Rappole J.H., Hubálek Z. (2006).** Birds and Influenza H5N1 Virus Movement to and within North America. *Emerging Infectious Diseases*. 12:10.
- Reed K.D., Meece J.K., Henkel J.S., Shukla S.K. (2003).** Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*. 1(1):5-12.
- Reed K.D., Meece J.K., Shukla S.K. (2003).** Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*. 1(1):5-12.
- Revich B., Tokarevich N., Parkinson A.J. (2012).** Climate change and zoonotic infection in the Russian Arctic. *International Journal of Circumpolar Health*. 71(1):18792.
- Riel D., Munster V.J., Wit E., Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E., Kuiken T. (2007).** Human and Avian Influenza Viruses target different cells in

the lower respiratory tract of humans and other mammals. *The American Journal of Pathology*. 171(4):1215-23.

Ritter D.G., Feltz E.T. (1974). On the natural occurrence of California encephalitis virus and other arboviruses in Alaska. *Canadian Journal of Microbiology*. 20(10):1359-66.

Russier M., Yang G., Marinova-Petkova A., Vogel P., Kaplan B.S., Webby R.J., Russell C.J. (2017). H1N1 influenza viruses varying widely in hemagglutinin stability transmit efficiently from swine to swine and to ferrets. *PLoS Pathogens*. 13(3):e1006276.

Sahu S.P., Pedersen D.D., Ridpath H.D., Ostlund E.N., Schmitt B.J., Alstad D.A. (2002). Serologic survey of cattle in the northeastern and north central United States, Virginia, Alaska, and Hawaii for antibodies to Cache Valley and antigenically related viruses (Bunyamwera serogroup virus). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 67(1):119-22.

Saikku P., Main A.J., Ulmanen I., Brummer-Korvenkontio M. (1980). Viruses in Ixodes uriae (Acari: Ixodidae) from seabirds colonies at Rost Island, Lofoten, Norway. *Journal of Medical Entomology*. 17:360-66.

Sánchez-Seco M.P., Echevarría J.M., Hernandez L, Estevez D, Navarro-Marí J.M., Tenorio A. (2003). Detection and Identification of Toscana and Other Phleboviruses by RT-Nested-PCR Assays With Degenerated Primers. *Journal of Medical Virology*. 71: 140 -149.

Schäfer M., Lundström J.O. (2001). Comparison of mosquito (Diptera: Culicidae) fauna characteristics of forested wetlands in Sweden. *Annals of the Entomological Society of America*. 94(5):576-82.

Schwaiger M., Cassionotti P. (2003). Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *Journal of Clinical Virology*. 27(2):136-45.

Somme L. *Invertebrates in Hot and Cold Arid Environments*. Berlin: Springer. (1995). pp 121. ISBN: 978-3-642-79583-1.

Spickler A.R., Trampel D.W., Roth J.A. (2008). The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. 37(6):555-77.

- Stallknecht D.E. (2003).** Ecology and epidemiology of Avian Influenza Viruses in wild birds population: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc. *Avian Diseases*. 47:61-9.
- Suarez D.L. (2000).** Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology*. 74(1-2):15-27.
- Sun X., Li Q., Wu Y., Wang M., Liu Y., Qi J., Vavricka C.J., Gao G.F. (2014).** Structural of Influenza Virus N7: the Last Piece of the Neuraminidase "Jigsaw" Puzzle. *Journal of Virology*. 88(16):9197-9207.
- Šebesta O.** Komáři - fenomén lužního lesa. In: Hrib M, Kordiovský E, eds. *Lužní les v Dyjsko-moravské nivě*. Hubálek Z. 2004. Břeclav: Moraviapress; 2004. pp 335-43. ISBN:80-86181-68-5.
- Taubenberger J.K., Morens D.M. (2006).** 1918 Influenza. The Mother of All Pandemic. *Emerging Infectious Diseases*. 12(1):15-22.
- Teixeria M.G., Conceicao N., Costa M., Oliveira W.K., Lavocat Nunes M., Rodrigues L.C. (2016).** The Epidemic of Zika Virus – Related Microcephaly in Brazil: Detection, Control, Etiology, and Future Scenarios. *Ameriacan Journal of Public Health*. 106(4):601-5.
- Thomas L.A, Clifford C.M., Yunker C.E., Keirans J.E., Patzer E.R., Monk G.E., Easton E.R. (1973).** Tick-borne viruses in western North America. Viruses isolated from *Ixodes uriae* in coastal Oregon in 1970. *Journal of Medical Entomology*.10:165–8.
- Tingström O., Lwande O.W., Näslund J., Spyckerelle I., Engdahl C., Schoenberg P.V., Ahlm C., Evander M., Bucht G. (2016).** Detection of Sindbis and Inkoo Virus RNA in Genetically Typed Mosquito Larvae Sampled in Northern Sweden. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. 16(7):461-7.
- Toennessen R., Germundsson A., Jonassen CH.M., Haugen I., Berg K., Barret R.T., Rimstad E. (2011).** Virological and serological surveillance for type A influenza in the black-legged kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Virology Journal*. 8:21.
- Traavik T., Mehl R., Wiger R. (1978).** California encephalitis group viruses isolated from mosquitoes collected in Southern and Arctic Norway. *Acta Pathol Microbiol Scand, Section B*. 86B:335–41.

Tůmová B. Ptačí chřipka – trvalá hrozba pandemie. Praha: Grada Publishing a.s. (2008). pp 136. ISBN 802471986X, 9788024719863.

Turell M.J., Linthicum K.J., Beaman J.R. (1990). Transmission of Rift Valley fever virus by adult mosquitoes after ingestion of virus as larvae. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 43:677-90.

Vandegrift K.J., Sokolow S.H., Daszak P., Klipatrick A.M. (2010). Ecology of avian influenza in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1195:113-28.

Verhagen J.H., Hofle U., Amerongen G., Bildt M., Majoor F., Fouchler R.A.M., Kuiken T. (2015). Long-Term effect of serial infections with H13 and H16 Low-pathogenic Avian Influenza Viruses in Black-Headed Gulls. *Journal of Virology.* 89:22.

Verhagen J.H., Majoor F., Lexmond P., Vuong O., Kasemir G., Lutterop D., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Kuiken T. (2014). Epidemiology of Influenza A Virus among Black-headed Gulls, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases.* 20(1):138-41.

Vora N. (2008). Impact of Anthropogenic Environmental Alterations on Vector-Borne Diseases. *The Medscape Journal of Medicine.* 10(10):238.

Walters L.L., Tirrell S.J., Shope R.E. (1999). Seroepidemiology of California and Bunyamwera serogroup (*Bunyaviridae*) virus infections in native populations of Alaska. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 60(5):806-21.

Webster R.G., Ben W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews.* 56:152-79.

Webster R.G., Govorkova E.A. (2014). Continuing challenges in influenza. *Annals of the New York Academy of Science.* 1323(1):115-39.

Winnebeck E.C., Millar C.D., Warman G.R. (2010). Why Does Insect RNA Look Degraded?. *Journal of Insect Science.* 10:159.

Winton J.R., Lannan C.N., Yoshimizu M., Kimura T. (1989). Response of Salmonid Fish to Artificial Infection with Chum Salmon Virus. *Viruses of Lower Vertebrates.* pp 270-8.

Zhang G., Shoham D., Gilichinsky D., Davydov S., Castello J.D., Rogers S.O. (2006).
Evidence of Influenza A virus RNA in Siberian Lake Ice. *Journal of Virology*. 80(24):12229-35.

<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

<http://www.arboviruscollection.cz>

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/glycomicrobiology/GM10/GM10E.html>

http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_avian_influenza_update20140317

<https://viralzone.expasy.org/6>

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Získané povolení na odběr krevních sér z Racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu v letní sezóně 2014.



Centre for Polar Ecology, University of South
Bohemia
tomastym1@gmail.com
tomas.hajek@prf.jcu.cz

**SYSSERMANNEN
PÅ SVALBARD**

GOVERNOR OF SVALBARD
ГУБЕРНАТОР СВАЛЪБАРДА

Executive officer:
Henrik Rotneberg

Our date:
24.6.2014

Your date:
3.6.2014

Our ref. (to be quoted in further correspondence)
2013/00722-5
a.512
Your ref.:

Reply – fieldwork in Billefjorden – RIS ID 5069 CzechPolar and 6024 Polar Ecology - 2014

Reference is made to your letter dated 1st of June 2014 and to subsequent correspondence.

Application background:

In the letter you ask for permission to do various sampling from: saltwater fish marine invertebrates and microscopic soil and freshwater animals to parasitological examination. You also ask for permission to take blood samples from birds and observation of nesting behavior.

Further two small pollen traps (20 cm high and 20 cm in diameter) will be placed in Petuniabukta.

Finally you ask for a prolongation of the permission to have semi-permanent meteorological stations in Petuniabukta. These stations have been working in Petuniabukta during the last seasons.

The Governors considerations:

According to the Svalbard Environmental Protection Act of 15 June 2001 § 30, no person may hunt, capture, injure or kill fauna or damage eggs, nests or lairs unless so authorized by the provisions of chapter IV of the law. In § 37, the Governor is given authority to grant exemptions for scientific purposes or when other special reasons so indicate.

Capturing animals to instrument them and/or take other samples is regarded as a disturbance for the birds etc. Performed in a correct way, with short handling time, it is assumed that this will not have a significant negative effect on the animals or the populations. All activities concerning handling, measurements and experimentation is approved by the Norwegian Animal Research Authority. The Governor considers that the disturbance can be accepted since the information from the data collection may be useful for nature management and relevant for other involved scientists. The Governor has placed emphasis on the fact that the purpose of the field work is strictly scientific and that the applicant has experience in such field work from several previous studies in the same area.

Postal address:
Postboks 633
N-9171 LONGYEARBYEN
NORWAY

Phone:
+47 79 02 43 00

Fax:
+47 79 02 11 66

E-mail and Internet:
firmaspost@sysselmannen.no
www.sysselmannen.no



The pollen traps (size: 20 cm X 20 cm) is consider not to require a special permission from the Governor, but please be aware of your responsibility to obtain these installations and clean the area when the project/the permission period have expired.

Regarding the semi-permanent meteorological stations in Petuniabukta the governor hereby prolong the actual permission on the same conditions as our decision with reference 2013/00722-2.

The Governor has considered your application and made the following decision:

The Governor grants Faculty of Science, Czech Republic att. Tomas Tymi and Tomas Hajek as described in the application, the permission to:

- *Conduct sampling from saltwater fish, marine invertebrates and microscopic soil and freshwater animals to parasitological examination and to take blood samples from birds and observation of nesting behavior*
- *Hold semi-permanent meteorological stations in Petuniabukta for one more year, cf. previous permission with reference 2013/00722-2.*

The permission regarding the sampling from birds and other animals are given for the period 4.07.2014 until 31.08.2014 under the provisions of the Svalbard Environmental Protection Act of 15 June 2001, § 37.

The permission to hold semi-permanent meteorological stations for one more year in Petuniabukta are given for the period 15.08.2014 until 15.08.2015 under the provisions of the Svalbard Environmental Protection Act § 57.

The decision does not interfere with possible permissions needed from property owners in the area.

The Governor's permission is granted on the following conditions.

- All activities shall be of sort that the birds etc. are not inflicted unnecessary stress and strain.
- Procedures for preventing transmission of any disease shall be followed.
- The semi-permanent meteorological stations shall be marked with the owner's name, date of deployment and retrieval. They shall be removed and sufficient clearing shall be made by the end of the permit, at the latest **15. August 2015**.
- The project leader shall provide for the immediate reporting of possible accidents/irregularities to the Governor.
- The project shall submit a report from the field work by **1 November 2015**. The template for this report can be found on the Governors web pages.
- All equipment you bring with you during the field trip, and all waste items are to be removed and brought back with you when the field expedition is finished.
- When carrying out the projects, the researchers shall show consideration towards other users of the areas in such a way that the research does not seem provoking or destroy people's wilderness experience.
- These exemptions are only valid for the people included in the projects.
- This permission must be brought along during the fieldwork.



According to Norwegian law you are entitled to complain about the present decision. Complaints must be submitted within three weeks of receiving this letter. Complaints are to be sent to the Governor who will forward the complaint to the Norwegian Environment Agency or the Ministry of the Environment (depending on the contents of the appeal).

Best regards

Guri Tveito
Head of Department for Environment
Protection

Henrik Rotneberg
Juridical Adviser

Approved and expedited electronically without signature

Copy: Norwegian Environment Agency

Příloha 2: Protokol o vyšetření vzorků pomocí HI testu.



STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV PRAHA

Sídlištní 136/24, 165 03 Praha 6, tel. 251 031 111
e-mail: sekretariat@svupraha.cz, www.svupraha.cz
Oddělení sérologie a virologie
tel. 251 031 704, email: virologie@svupraha.cz



Zkušební laboratoř č. 1176 akreditovaná ČIA, podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005

Protokol o zkoušce č. SVP 31509 / 17

Počet stran : 1

Číslo vzorku :	31509/17	Datum doručení:	16.11.2017
Odesílatel :	Mgr. Jana Elsterová	Datum vyřízení :	22.11.2017
Zakázka :	Fakturace	Důvod : neuveden	
Majitel :	Biologické centrum AV ČR v.v.i. České Budějovice	Farma :	
		Okres : České Budějovice	
		Vyřizuje: MVDr. Jitka Homíčková	

Identifikace vzorku : racek tříprstý vzorky č. 4, 11, 12, 20, 28, 30, 47, 48, 57, 59, 63, 66, 4, 83, 92, 94, 95, 101; vzorek č. 26 chybí

V ý s l e d e k v y š e t ř e n í

Vyšetření	počet vyšetření	pozit.	dubio.	negat.	závěr	vyřizuje
Aviární influenza - protilátky	18	17	0	1		Homíčková

Použité metody

Aviární influenza - protilátky HIT aviární influenza SOP 30.305

Interpretace

V krevních sérech racků tříprstých byly zjištěny hemaglutinačně inhibičním testem (HIT) protilátky proti viru aviární infekce - subtypu H16 v titrech:

vzorek č. 4 - titr 128	vzorek č. 59 - titr 64
vzorek č. 11 - titr 64	vzorek č. 63 - titr 32
vzorek č. 12 - titr 32	vzorek č. 66 - titr 256
vzorek č. 20 - titr 32	vzorek č. 74 - titr 32
vzorek č. 28 - titr 32	vzorek č. 83 - titr 16
vzorek č. 30 - titr 128	vzorek č. 92 - titr 256
vzorek č. 47 - titr 128	vzorek č. 94 - titr 64
vzorek č. 48 - titr 32	vzorek č. 95 - titr 32
vzorek č. 57 - titr 64	vzorek č. 101 - negativní

Poznámka: Hodnota nejnižšího pozitivního titru je 16

MVDr. Kamil Sedlák, Ph.D.
ředitel SVÚ Praha a vedoucí ZL

MVDr. Jitka Homíčková
vedoucí oddělení sérologie a virologie

MVDr. Jitka Homíčková
vedoucí oddělení sérologie a virologie

Obdrží:

1x Biologické centrum AV ČR v.v.i., Branišovská 1160/31, 370 05 České Budějovice

2x archiv

Prohlášení :

Výsledky zkoušek se týkají pouze zkoušených předmětů. Bez písemného souhlasu laboratoře se nesmí protokol reprodukovat jinak než celý. Změny a doplňky mohou být provedeny pouze laboratoři, která dokument vystavila.