

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce virových zoonóz v biologických vzorcích z polárních oblastí

Diplomová práce

Bc. Tereza Liduchová

**Vedoucí práce: prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc., Hon. D.Sc., dr. h. c.
Konzultant: RNDr. Jana Elsterová**

České Budějovice 2020

Liduchová T., 2020 Detekce virových zoonóz v biologických vzorcích z polárních oblastí.
[Detection of viral zoonoses in biological samples from polar regions. Mgr. Thesis, in Czech.]
– **90 p.**, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This work is focus on detection of zoonotic viruses from Greenland and Svalbard and it is divided into two parts. In the first part, the detection of the Sindbis virus genomic RNA was conducted in mosquitoes samples of *Ochlerotatus nigripes* collected in Svalbard and Greenland by using molecular biology methods. There was no repeatedly confirmed positive result of viral RNA in the mosquitoes samples. The presence of arboviruses in polar areas can not be completely excluded. However, the prevalence is very low so other researches are needed. In the second part, the screening of samples of cloacal swabs and samples of oropharyngeal swabs from seabird *Rissa tridactyla* collected in Svalbard was conducted to detect Avian Influenza A virus by using RT-qPCR. The positive result was not repeatedly confirmed as well as in case of Sindbis virus.

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 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, 21.5.2020

.....

Bc. Tereza Liduchová

Poděkování

Touto cestou bych nejdříve ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., Hon. D.Sc., dr. h. c. za umožnění podílet se na tomto projektu, za ochotu a také poskytnuté zázemí. Děkuji také RNDr. Jiřímu Černému, Ph.D. za odbornou pomoc a cenné připomínky. Největší dík patří mé školitelce – specialistce RNDr. Janě Elsterové za trpělivost, ochotu, cenné rady, přátelský přístup a zaučení veškeré metodiky. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře arbovirologie vedené doc. RNDr. Danielem Růžkem, Ph.D. nejen za poskytnutí zázemí a přátelského kolektivu, ale také za ochotu a cenné rady. Zejména bych ráda poděkovala Mgr. Václavu Hönigovi, Ph.D. za jeho ochotu, čas, veškeré odborné rady a konzultace během této práce.

Poděkování patří také všem, kteří se podíleli na sběru vzorků pro tuto práci. Jmenovitě RNDr. Janě Müllerové, doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc.; RNDr. Janě Elsterové; RNDr. Jiřímu Černému, Ph.D.; Mgr. Jakobovi Žárskému, Ph.D., RNDr. Václavu Pavlovi, Ph.D., a Lauren E. Culler (Norway Dartmouth College, Hanover, USA).

Závěrem bych velice ráda poděkovala svému příteli, rodině a přátelům za jejich obrovskou trpělivost a především podporu během celého mého studia.

Obsah

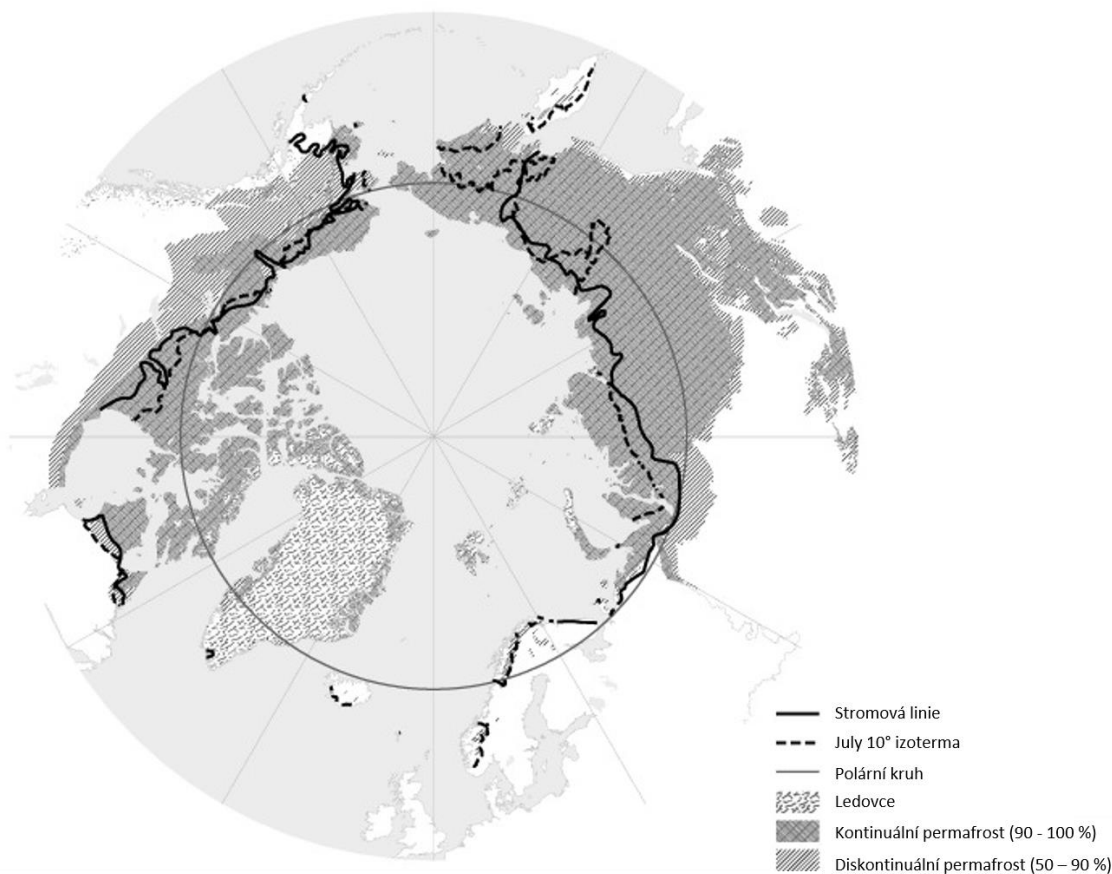
1. ÚVOD	1
1.1. Vymezení a specifikace oblasti Arktidy	1
1.2. Zoonózy	2
1.3. Arboviry	3
1.3.1. Charakteristika arbovirů	4
1.3.2. Přenos arbovirů	4
1.3.2.1. Přenašeči	5
1.3.2.1.1. Přenašeči vybraných polárních oblastí Grónska a Svalbardu	5
1.3.2.1.2. Životní cyklus arboviru ve vektoru	6
1.3.2.2. Přenos arbovirů z vektora na hostitele	8
1.3.2.3. Přenos mezi hostiteli	8
1.3.3. Komáry přenášené arboviry v polárních oblastech	9
1.3.4. Vybrané arboviry	12
1.3.4.1. Čeleď <i>Togaviridae</i>	12
1.3.4.1.1. Virus Sindbis	13
1.4. Virus chřipky	15
1.4.1. LPAI subtypy	17
1.4.2. Molekulární charakteristika	18
1.4.2.1. Antigenní shift a drift	20
1.4.3. Přírozený cyklus AIV	20
1.4.4. Způsoby nákazy	21
1.4.5. Výskyt a šíření AIV	21
1.4.5.1. Chřipka v oblastech Arktidy a Antarktidy	23
2. CÍLE PRÁCE	25
3. MATERIÁL A METODY	26
3.1. Materiál	26
3.1.1. Vzorky	26
3.1.2. Buněčná linie	30
3.1.3. Bakterie <i>Escherichia coli</i>	30
3.1.4. Víry	31
3.1.4.1. Virus Sindbis	31
3.1.4.2. Virus Inkoo	31
3.1.4.3. Virus ptačí chřipky	31
3.1.5. Primery a sondy	31
3.2. Metody	33
3.2.1. Pozitivní kontrola viru Sindbis	33
3.2.1.1. Pomnožení viru pro pozitivní kontrolu	33
3.2.1.2. Jednokroková reverzní transkripce (RT-PCR)	34
3.2.1.3. Separace na agarózovém gelu	35
3.2.1.4. Purifikace produktu a příprava sekvenační reakce	35
3.2.1.5. Plaková titrace	35

3.2.2.	Zpracování komářích a ptačích vzorků.....	36
3.2.2.1.	Homogenizace vzorků komárů.....	37
3.2.2.2.	Izolace RNA.....	37
3.2.2.3.	Kontrola kvality RNA.....	38
3.2.2.4.	Příprava směsných vzorků RNA získaných ze vzorků komárů.....	38
3.2.2.5.	Kvantitativní jednokroková reverzní transkriptázová PCR (RT-qPCR).....	38
3.2.2.6.	Klonování.....	40
4.	VÝSLEDKY.....	43
4.1.	Arboviry.....	43
4.1.1.	Sběr vzorků komárů.....	43
4.1.2.	SINV.....	44
4.1.2.1.	Pozitivní kontrola SINV.....	44
4.1.2.2.	Detekce SINV ve vzorcích komárů.....	47
4.2.	Virus chřipky.....	49
4.2.1.	Pozitivní kontrola AIV.....	49
4.2.2.	Detekce AIV ve stěrech z kloaky a oropharyngu.....	49
5.	DISKUZE.....	52
5.1.	Arboviry.....	52
5.1.1.	Virus Sindbis a další výzkum.....	53
5.1.2.	Sběr a testování vzorků komárů.....	54
5.2.	Virus chřipky.....	56
5.2.1.	Odběr a testování vzorků stěrů z kloaky a oropharyngu.....	58
5.2.2.	Testování protilátek a další výzkum.....	59
6.	ZÁVĚR.....	60
7.	SEZNAM ZKRATEK.....	61
8.	POUŽITÁ LITERATURA.....	65
9.	PŘÍLOHA.....	82

1. Úvod

1.1. Vymezení a specifikace oblasti Arktidy

Vymezení oblasti Arktidy se dá pojmout několika způsoby. Jedním z nich je definice Arktidy jako oblasti planety na sever od polárního kruhu (zeměpisná šířka 66 ° 33 '39 "). Dalším způsobem je specifikace podle severní stromové linie. Nejvíce užívaným vymezením této oblasti je podle izotermy, tak zvané „10°C July“ izotermy. Název se odvíjí od skutečnosti, že teplota v jí vymezené oblasti ani v nejteplejším měsíci v roce (červenec) nepřesahuje 10°C. Arktida se rozkládá na území Severního ledového oceánu, severní části Tichého oceánu a Atlantského oceánu s velkými pobřežními oblastmi části severního pobřeží Evropy, Asie a Severní Ameriky. Celková rozloha této oblasti činí kolem 26,5 mil km² (Obr. 1) (Hueffer a spol., 2011).



Obr. 1: Vymezení oblasti Arktidy (D'Odorico a spol., 2013).

Vegetace arktické oblasti je charakterizována boreálním lesem v jižní Arktidě a tundrou v severní a pobřežní oblasti. Části mořské plochy jsou pokryty ledem buď celoročně nebo jen v období zimy. Podnebí se vyznačuje nízkými průměrnými ročními teplotami

vzduchu, které se v Arktidě značně liší, přičemž zimní teploty v pobřežních oblastech jsou obecně vyšší než v oblastech s kontinentálním (vnitřním) podnebím. Během léta je tomu naopak. Extrémní sezónní kolísání teploty je způsobeno výraznou změnou fotoperiody během ročních období, 24 hodin denního světla nebo naopak 24 hodin tmy (Hueffer a spol., 2011).

1.2. Zoonózy

Zoonotické infekce jsou definovány jako nemoci přirozeně přenosné ze zvířat na člověka (Acha a Szyfres, 2003). Původci těchto onemocnění se řadí do pěti velkých skupin - bakterie, viry, parazité, prvoci a houby. Počet známých zoonóz neustále roste, v současné době se jich odhaduje na 250 s tím, že zhruba 80 z nich se považuje za běžně se vyskytující (například vzteklna, malárie, lymská nemoc, klíšťová encefalitida atd.) (Hubálek a Rudolf, 2011). Mezi způsoby přenosu patří přímý kontakt s infikovaným jedincem, pozření infikované potravy, prostřednictvím přenašečů jako jsou komáři a klíšťata nebo přenos kapénkami aerogenní cestou (Hubálek, 2003; Christou, 2011).

Jedním ze způsobů jak lze zoonózy dělit je podle lokality nebo ekosystému, kde jejich původci cirkulují. Jedná se o synantropický ekosystém, s městským (antroponotickým) cyklem, kde zdrojem lidské infekce jsou nejčastěji domácí zvířata nebo synantropní obratlovci vázaní na lidské obydlí (např. městská vzteklna či brucelóza). Druhý typ je exoantropický, se sylvatickým cyklem, jehož rezervoár bývá na venkově mimo lidská obydlí a je označován jako tzv. přírodní ohnisko nákazy (např. klíšťová encefalitida nebo tuláremie). Nicméně toto dělení není jasně vymezené a řada zoonóz vykazuje oba vzorce oběhu (např. žlutá zimnice či mor) (Hubálek a Rudolf, 2011).

Obecně lze říci, že se zoonózy vyskytují v oblastech s vysokou živočišnou rozmanitostí a velkou hustotou zalidnění, kde se objevuje také vysoký počet možných zoonotických vektorů a hostitelů. Mezi tyto oblasti řadíme Střední a Jižní Ameriku (jihovýchodně od And), Střední a subsaharskou Afriku, Evropu (východní Evropu, část západní Evropy) a jihovýchodní Asii (Han a spol., 2016). Nicméně zoonózy se nachází i v méně osídlených lokalitách s nižší variabilitou fauny jako je například Arktida či Antarktida. V Arktidě ale i jiných polárních oblastech existuje velice úzká vazba mezi domorodými komunitami a volně žijícími zvířaty, zejména soby, karibu a mořskými savci. Jako hlavní zdroj potravy, ale i součást tamních kultur představují tato zvířata významný zdroj nákazy (Arneberg, 2009).

Hlavním problémem polárních oblastí je neustále se zvyšující teplota. Do roku 2040 se předpokládá zvýšení o 2°C a do roku 2100 až o 4-7°C. Tyto teplotní změny poté vedou k změně sněhové pokrývky, mořského ledu, permafrostu či oteplování oceánu. Bezprecedentní rychlost oteplování má vliv na infekční choroby v těchto oblastech, zejména na ty zoonotické. Vyšší teploty mohou přímo urychlit tempo růstu patogenů, včetně hmyzích vektorů, což spolu s rostoucí migrací člověka může vést k zavedení infekčních chorob do dříve izolovaných oblastí a vystavení citlivé populace novým patogenům (Waits a spol., 2018). Mezi viry se zoonotickým potenciálem řadíme například Salmonid virus (SAV), který ovlivňuje chov lososa atlantického (*Salmo salar*). Tento virus byl detekován v severním Atlantiku od Skotska a Irska až po Norsko a dál za polární kruh (Jansen a spol., 2017). Dalším zoonotickým virem endemickým ve většině částí Arktidy je virus vztekliny. Hlavním zdrojem tohoto viru jsou polární lišky, nicméně byly hlášeny také infekce ledních medvědů, tuleňů, sobů nebo psích spřežení (Černý at al., in prep.). Zoonotická infekce bakteriálního původu je například tularémie způsobená *Francisellou tularensis*, která byla nalezena u více než 20 savců žijících v ruské Arktidě. Primárně se tato bakterie drží u hryzce vodního (*Arvicola terrestris*) (Revich a spol., 2012).

1.3. Arboviry

Arboviry jsou definovány jako skupina evolučně nepříbuzných virů sdílejících společnou ekologickou niku (Weaver a Reisen, 2010). Název této skupiny je odvozen z anglického spojení „*arthropod-borne viruses*“. Významným společným znakem této skupiny virů je, že jsou přenášeny z krev sajících (hematofágních) členovců na obratlovce. Jsou rozšířeny téměř po celém světě s největším výskytem v tropickém podnebném pásu (Artsob a spol., 2017).

Existuje přibližně 500 známých arbovirů, z nichž asi 100 je schopno vyvolat onemocnění u lidí a 40 u domácích zvířat (Artsob a spol., 2017). Mezi nejznámější lidské patogeny přenášené komáry patří virus Zika (ZIKV), virus dengue (DENV), virus žluté zimnice (YFV) či virus chikungunya (CHIKV). Nejznámějším arbovirem přenášeným klíšťaty je virus klíšťové encefalitidy (VKE). Arboviry způsobená onemocnění nejčastěji zahrnují encefalitidy, horečnatá onemocnění a hemoragické horečky. Protilátky proti těmto virům byly prokázány také u řady živočichů (savci - přežvýkavci, hlodavci, masožravci, zajícovití nebo ptáci) (Descamps, 2013; Hubálek a spol., 2014).

Výzkum arbovirů je důležitý zejména pro jejich potenciál se neustále vyvíjet a rozšiřovat tak svůj rozsah působení. Děje se tak hlavně v důsledku změn klimatu (teplota a

vlhkost) a okolní krajiny, demografických a sociálních změn nebo také kvůli růstu migrace, což zvyšuje počet možných vektorů i hostitelů. V neposlední řadě se jedná o důležité zvířecí, ale především lidské patogeny (Ciota a Kramer, 2010; Tingström a spol., 2016).

1.3.1. Charakteristika arbovirů

Molekulární struktura většiny arbovirů je charakterizována genomem tvořeným jednou nebo více molekulami RNA. Jedinou známou výjimkou je virus afrického moru prasat (ASFV) patřícího do čeledi *Asfviridae*, jehož genom je tvořený dvouvláknovou molekulou DNA (Hernandez a spol., 2014; Vasilakis a spol., 2016). Skutečnost, že se jedná téměř výhradně o RNA viry se dá vysvětlit jako požadavek na výraznou plasticitu v rámci potřeby arbovirů uspět v dynamickém hostitelském prostředí (Ciota a Kramer, 2010).

Morfologicky jsou arboviry velice různorodou skupinou. Najdeme u nich téměř všechny typy tvarů – tyčinkovité, sférické nebo oválné. Z pohledu symetrie je většina z nich ikosaedrální, ale například rabdoviry vykazují strukturu helikální (Hernandez a spol., 2014). Virová částice (virion) se skládá z nukleové kyseliny (většinou RNA viz výše), která je obalená kapsidou. Některé viry navíc obsahují také obal (= obalené viry), který získaly během pučení přes membránu hostitelské buňky. Složení tohoto obalu odráží složení lipidové dvojvrstvy hostitelské membrány. Na povrchu této lipidové dvojvrstvy se nachází glykosylované povrchové proteiny zajišťující jejich interakci s hostitelskou buňkou určující antigenní složení virionu (Gelderblom, 1996).

1.3.2. Přenos arbovirů

Arboviry, stejně jako ostatní viry, potřebují pro svůj životní cyklus replikační aparát buněk svého hostitele, případně přenašeče, ve kterém se také množí. Proto, aby byl virus úspěšně přenesen a amplifikován jsou nutné tři základní předpoklady. Jako první je důležitá přítomnost vnímavého obratlovčího hostitele (savec, pták, plaz či obojživelník). Následně, během infekce hostitele, musí nastat viremická fáze, což je doba, kdy je virus přítomen v krevním řečišti v dostatečném titru (množství) a po dostatečně dlouhou dobu, aby mohlo dojít k infekci krev sajícího vektora. Nakonec je nutné, aby byl určitý virus schopný se replikovat v daném členovci sajícím krev (Artsob a spol., 2017).

1.3.2.1. Přenašeči

Mezi nejdůležitější hematofágní vektory arbovirů patří komáři (*Insecta; Diptera; Culicidae*) přenášející asi 50% známých arbovirů a klíšata (*Acari; Ixodida; Ixodidea*), u kterých je tento počet přibližně poloviční (Nuttall a spol., 1994). Nicméně jako přenašeči mohou fungovat také některé druhy vší řádu *Phthiraptera*, koutule (*Phlebotomus*) a pakomárcovití (*Ceratopogonidae*) (Vasilakis a spol., 2016). U čeledi klíšat jsou významnými vektory především rody *Hyalomma* a *Ixodes* (Nuttall a spol., 1994). Klinicky nejvýznamnější rody komářích vektorů jsou rody *Culex* a *Aedes*. Některé arboviry jsou přenášeny také komáry rodu *Anopheles*, avšak ve srovnání s rody *Culex* a *Aedes* jich je podstatně méně. Komáři rodu *Culex* jsou převážně ornitofilní, ale při absenci ptáků sají také na koních nebo i jiných savcích včetně člověka. (Conway a spol., 2014). Druhý rod *Aedes* se živí hlavně sáním na savcích. Důležité druhy tohoto rodu jsou *Aedes (Ae.) aegypti*, jehož hlavním hostitelem je člověk a *Ae. albopictus*, který je spíše exofagický a na lidech či zvířatech saje jen výjimečně. Oba tyto druhy komárů přenáší například DENV či CHIKV (Marchi a spol., 2018).

1.3.2.1.1. Přenašeči vybraných polárních oblastí Grónska a Svalbardu

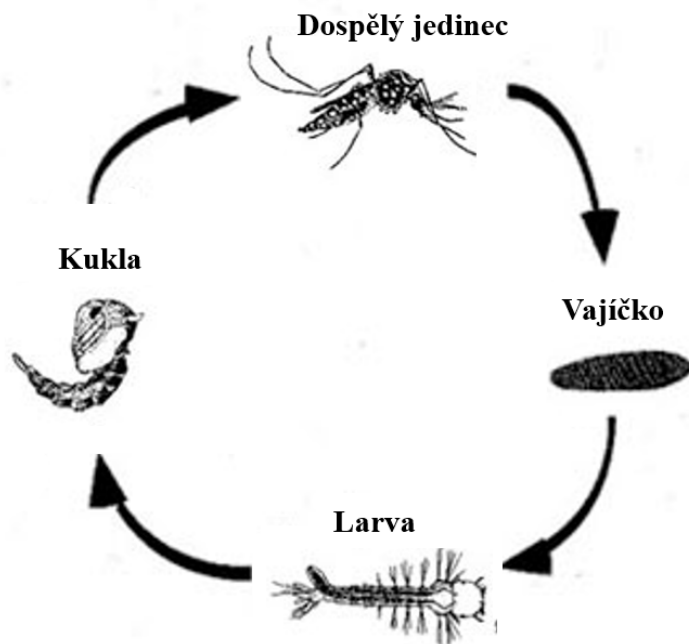
Také v polárních oblastech, konkrétně v Grónsku, Svalbardu a přilehlých ostrovech, se vyskytuje několik druhů krev sajících členovců. Jedná se zejména o komáry a klíšata, kteří sají na zdejších obratlovcích (Hubálek a spol., 2014). Jediným druhem klíšete žijícím na těchto ostrovech je *Ixodes (I.) uriae*, jehož hostiteli jsou moštní ptáci (Coulson a spol., 2014). U komárů se jedná o rod *Aedes*, s dominancí podrodu *Ochlerotatus* (Lynch-Arribalzaga, 1891). (Lundström a spol., 2013). Bylo ovšem nutné, aby se přenašeči i jejich hostitelé přizpůsobili zdejším extrémním podmínkám – zimní teploty -50°C i méně, dominance sněhové pokrývky, výrazná změna fotoperiody v zimních a letních měsících, povětrnostní podmínky a další (Hueffer a spol., 2011). Ačkoli samotná druhová diverzita arktických komárů je malá, z kvantitativního hlediska hrají nezanedbatelnou roli škůdců a významných vektorů patogenů a zároveň působí jako důležitá součást potravního řetězce (Culler a spol., 2018). Dominantními druhy komárů v oblasti za polárním kruhem jsou *Oc. nigripes* (Zetterstedt, 1838) a *Oc. impiger* (Walker, 1848). Tyto dva druhy představují holoarktické přenašeče jejichž oblast výskytu se v důsledku klimatických změn neustále rozšiřuje. Jako hostitelé jim slouží různé druhy trvale žijících menších savců (Robert a spol., 2011). V Grónsku najdeme oba tyto druhy, s vyšší prevalencí *Oc. nigripes*, zatímco na souostroví Svalbard a Jan Mayen se nachází pouze *Oc. nigripes* (Becker a spol., 2010; Prestrud, 2004).

Mimo výše zmíněné ostrovní lokality se vyskytují i další, již subpolární druhy komárů, jako jsou například *Oc. pionips*, *Oc. hexodontus*, *Oc. communis* či *Oc. punctor* (Böcher a spol., 2015).

Oc. nigripes, jakožto jediný druh komára vyskytující se na Svalbardu, je také druh s cirkumpolárním rozložením a nejsevernějším výskytem ze všech druhů komárů (až do 80° severní šířky) (Becker a spol., 2010). Vzhledem k extrémním klimatickým podmínkám, ve kterých tento druh komára žije, je odlišný i jeho vývoj. Z vajíčka v dospělého jedince se vyvine za pouhé 3 až 4 týdny. Také teplotní snášenlivost tohoto druhu má mnohem širší rozsah, avšak nejvyšší sledovaná zeměpisná šířka pro vývoj byla 59°, kde byl teplotní práh změřen na 1°C (Corbet a Danks, 1973). Vektorová kompetence *Oc. nigripes* pro arboviry je zatím do značné míry neznámá. Existují ale důkazy o přirozené infekci viry Anadyr (ANADV) a Chatanga (CHATV) z čeledi Bunyviridae (Müllerová a spol., 2018). Samotný přenos arbovirů těmito komáry může být horizontální a pravděpodobně i vertikální (popsáno v kapitole 1.3.2.2. Přenos arbovirů z vektora na hostitele). I když mechanismus ani jednoho z typů přenosu nebyl konkrétně u *Oc. nigripes* studován, byl popsán u dalších druhově příbuzných jedinců. Na základě toho lze předpokládat stejný nebo velice podobný proces interakce mezi přenašečem a arbovirem (Müllerová, 2014).

1.3.2.1.2. Životní cyklus arboviru ve vektoru

Životní cyklus přenašeče (Obr. 2) (v našem případě komára *Oc. nigripes*) je nezbytnou součástí pro tak zvaný biologický přenos arbovirové infekce. Samičky *Oc. nigripes* kladou vajíčka pouze za přímého slunečního světla v nejteplejší část dne (Becker a spol., 2010). Vajíčka jsou většinou kladena 5-10 cm nad vodní hladinu, na mech, do bahna nebo vlhké půdy nebo na stonky rostlin poblíž vodní plochy, vždy tak, aby byla chráněna před větrem (Corbet a Danks, 1975). Díky tomu, že vajíčka jsou vystavena slunci, jejich vývoj v nepohyblivé larvy je velice rychlý, v ideálních podmínkách trvá 2-7 dní. Z larvy se dále vyvíjí již pohyblivá kukla, přičemž obě tato stádia žijí ve vodě (Becker a spol., 2010; Corbet a Danks, 1973). Následně dojde k porušení kukly, ze které vylézá nový dospělý jedinec. Dospělý sameček se živí pouze nektarem z květů, zatímco samička saje převážně krev. Pokud je ovšem nedostatek hostitelů nebo je hematofagie z nějakého jiného důvodu nemožná, přechází také na nektar. Typ její potravy pak ovlivňuje především kladení a dozrávání vajíček. Při tak zvané autogenii (potravou je nektar) klade vajíček méně (Corbet, 1967; Müllerová, 2018).



Obr. 2: Jednotlivá stádia vývoje komářího jedince (převzato a upraveno z *Mosquito Control—Kentucky Pesticide Safety Education*, b.r.).

Pro samotný přenos arboviru je nutné jeho pomnožení v těle vektora. Přenašeč se nakazí při sání krve na infikovaném obratlovčím hostiteli. Virus pak putuje spolu s krví do lumen střeva, kde musí překonat různé fyziologické a imunologické bariéry (Conway a spol., 2014; Artsob a spol., 2017). Hladina viru ve střevě kulminuje v důsledku destrukce či vyloučení části virových částic. Po fázi snížení dochází k replikaci viru, zvýšení titru a dosažení fáze plató, která přetrvává v těle vektora po zbytek jeho života. Nárůst počtu virových částic je umožněn jejich fúzí a průnikem přes membránu do buněk střevní stěny, kde dochází k jejich amplifikaci. Po uvolnění z těchto buněk následuje rozsev virionů do hemocoelu. Dalším krokem může být, ale také nemusí, sekundární amplifikace viru v orgánech obklopených hemolymfou. Důležitým krokem ovšem je, aby se virové částice dostaly do slinných žláz, kde dojde k jejich dalšímu pomnožení. Při dalším sání vektora na hostiteli pak takto namnožený virus může infikovat dalšího jedince (Mellor, 2000).

Obratlovčí hostitelé významně přispívající k úspěšnému cyklu arbovirů se nazývají amplifikující hostitelé. Ti, u nichž se infekce nevyvinula se označují jako rezervoár. Naopak ti, u nichž titr viru nedosahuje dostatečné hladiny pro infekci dalších členovců, se nazývají náhodnými hostiteli. Člověk funguje jako náhodný hostitel u většiny arbovirů, ale například pro CHIKV nebo DENV představuje naopak hlavního amplifikujícího hostitele (Artsob a spol., 2017).

1.3.2.2. Přenos arbovirů z vektora na hostitele

V zásadě existují dva způsoby přenosu – horizontální a vertikální. Tyto dva typy se vzájemně nevylučují a u řady virů, ale i jiných patogenů, dochází ke kombinaci obou způsobů. Tím se zefektivňuje přenos, například za nepříznivých podmínek (Lequime a spol., 2016).

Horizontální nebo také mechanický typ přenosu je běžně se vyskytujícím transferem definovaným, jako přenos viru mezi krev sajícím členovcem (v našem případě komárem) a (obratlovčím) hostitelem, tedy jiným živočišným druhem (DeFoliart a spol., 1987). Obecně se jedná o jakýkoliv „ne-rodíčovský“ přenos. Klasickým příkladem je sání infikovaného komára na hostiteli, který se tak nakazí (Lequime a spol., 2016). Tímto způsobem jsou přenášeny arboviry jako WNV nebo YFV (Huang a spol., 2019). Může také nastat situace, kdy během sání na neinfikovaném hostiteli dojde k nakažení neinfikovaného přenašeče, pokud saje v blízkosti jiného již infikovaného komára, aniž by muselo dojít k nakažení hostitele. Jedná se o tak zvané sousání, které bylo dobře prostudováno u klíšťat rodů *Hyalomma* a *Ixodes* (Kuno a Chang, 2005; Randolph a spol., 1996). Dalším způsobem horizontálního přenosu je nákaza komářích larev během jejich krmení v kontaminované vodě. Příkladem takto přeneseného viru je virus horečky Rift Valley (RVFV) nebo virus bovinní leukémie (BVL) (Kuno a Chang, 2005; Lequime a spol., 2016).

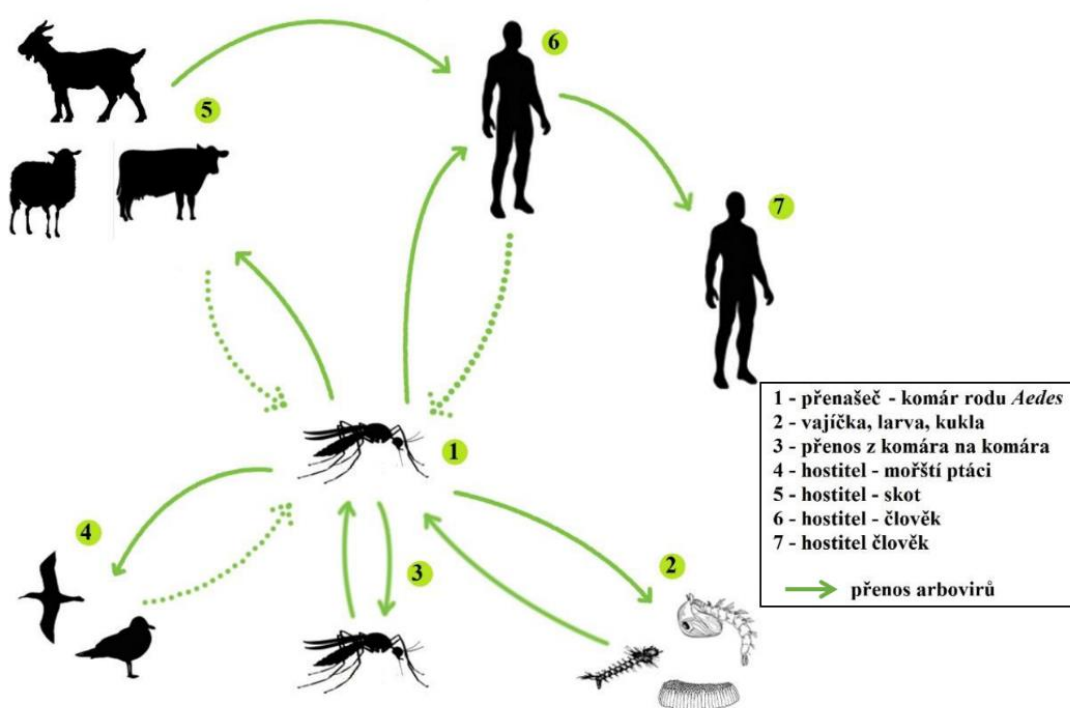
Vertikální neboli dědičný přenos, je přenos viru (patogena) z matky (samice) na potomky v rámci vektora. Tento přenos se považuje za možný mechanismus perzistence virů za nepříznivých podmínek pro horizontální přenos. Vertikální přenos může nastat prostřednictvím dvou hlavních mechanismů. První je transovariální přenos, kdy virus infikuje zárodečné tkáně komára (Lequime a spol., 2016). Takto se přenáší například LACV nebo DENV (Artsob a spol., 2017; da Costa a spol., 2017). Druhým mechanismem je „*trans-egg*“, který probíhá během ovipozice v plně vyvinutém vajíčku, nicméně je méně efektivní než přenos transovariální (Lequime a Lambrechts, 2014). Byla také prokázána nákaza komárů během kopulace, kdy byla vertikálně infikovaným samečkem nakažená neinfikovaná samička (Marchi a spol., 2018).

1.3.2.3. Přenos mezi hostiteli

Jedná se o přenos, který nezahrnuje členovce jako vektora arboviru. K těmto přenosům dochází spíše zřídka a náhodně. Jedním z příkladů je kanibalismus nebo pozření nakaženého

jedinice, který fungoval jako reservoár viru. Takto byl přenesen například WNV (Smith, 2008). Infekce může být přenesena i přes tělní tekutiny, jako jsou moč, výkaly a krev. U viru DENV, YFV a WNV byl potvrzen přenos krví z člověka na člověka (Chen a Wilson, 2004; Chen a Wilson, 2005; Kuno a Chang, 2005). V nedávné době byl u lidí zjištěn také přenos pomocí spermatu a transplacentární přenos z matky na dítě u ZIKV (Mansuy a spol., 2016; Quicke a spol., 2016). Dalším dokumentovaným případem je přenos nákazy přes mléko z matky na potomky. Děje se tak u ovcí, koz či skotu. Přes mléčné výrobky se potom může nakazit i člověk (Arragain a spol., 2016).

Jednotlivé cesty přenosu jsou znázorněny níže (Obr. 3).



Obr. 3: Možné způsoby přenosu arbovirů (převzato a upraveno z Müllerová, 2018).

1.3.3. Komáry přenášené arboviru v polárních oblastech

Běžný výskyt arbovirů se uvádí především v tropickém až mírném pásu. Toto tvrzení je však postupně vyvracováno. Vlivem klimatických změn (teplota a vlhkost), zavlečením invazivních hostitelských druhů či nárůstem cestovního ruchu se významně mění výskyt a rozsah arbovirových přenašečů, což má za následek vliv na celý ekosystém (Waits a spol., 2018). Dnes jsou arboviru hlášeny z oblastí téměř celého světa s výjimkou Antarktidy, do 70° severní šířky a do 54° jižní šířky. Téma výskytu a potenciální cirkulace arbovirů v polárních

oblastech je ale stále poměrně zanedbané a nevěnuje se mu dostatek pozornosti, ačkoli i v této oblasti se nachází řada klinicky významných zvířecích i lidských patogenů (Kurstak, 2012).

Existuje několik biologických faktorů umožňujících introdukci a perzistenci arbovirů v těchto extrémních podmínkách. První je přítomnost vhodných permissivních hostitelů. Zejména v období arktické zimy, kdy plno živočichů migruje do nižších zeměpisných šířek či hibernuje, jsou patogenní přenašeči odkázáni na omezené množství suchozemských organismů, jako jsou savci a ptáci a mořští živočichové, kteří zůstávají aktivní, a proto je i v zimním období možná cirkulace virů infikujících tato zvířata. Za druhé, virus musí být schopný přenosu z jednoho hostitele na druhého. To je dáno několika faktory. Hostitelská populace musí být dostatečně hustá a virus musí být dostatečně stabilní, aby přežil ve vnějším prostředí během přenosu z jednoho hostitele na druhého. Třetí podmínkou pro přežití virů v polárních oblastech je jejich závislost na vektorech během přenosu, u arbovirů se jedná o členovce a roztoče (Černý a spol., in prep.).

Jak je již zmíněno výše, v polárních oblastech jsou hlavními přenašeči klíšťata (*Ixodes uriae*) a komáři rodu *Culex* a *Aedes*. Nejvíce komáry přenášených arbovirů bylo detekováno na území Aljašky, Kanady, Skandinávie a Arktické části Ruska. Doposud žádný nález nebyl zaznamenán v Grónsku, Svalbardu, Islandu a Antarktidě. U lokalit Islandu a Antarktidy je hlavním problémem absence komářích přenašečů, avšak byly zde nalezeny arboviry přenášené například klíšťaty nebo islandskými muchničkami (*Simulium vittatum*) (Müllerová a spol., 2018; Černý a spol., in prep.).

V polárních oblastech byly arboviry či protilátky proti komáry přenášeným arbovirům detekovány v mnoha hostitelích, přičemž infekce proběhla asymptomaticky nebo s příznaky o široké škále závažnosti a klinicky odlišnými symptomy (Descamps, 2013; Zarnke a spol., 1983). Mezi viry, proti kterým byly detekovány protilátky u lidí patří například virus kalifornské encefalitidy (CEV), který byl detekován u indiánské populace na východě centrální Aljašky (Ritter a Feltz, 1974). Jako další lze jmenovat viry Sindbis (SINV) či Inkoo (INKV), zjištěné kromě Skandinávie také u lidí na Aljašce (Tirrell a spol., 1999). WNV je jedním z nejvíce rozšířených arbovirů vůbec. Kromě tropických a subtropických oblastí byl detekován také v několika oblastech Aljašky a Kanady (Kurstak, 2012; Marchi a spol., 2018). Arboviry detekované v oblasti Arktického Ruska a Aljašky jsou například Snowshoe hare virus (SSHV) a Jamestown Canyon virus (JCV), oba patřící do sérokomplexu kalifornské encefalitidy, rodu *Orthobunyavirus*, řádu *Bunyaviridae* (McLean, 1983; McLean a spol.,

1977). Souhrn všech detekovaných arbovirů polárních oblastí přenášných komáry je uveden v tabulce níže (Tab. I).

Tab. I: Přehled komáry přenášných arbovirů v polárních oblastech.

Řád/čeleď	Rod	Název viru	Oblast výskytu	Přenašeč	Hostitel	Citace
<i>Bunyavirales</i>	<i>Orthobunyvirales</i>	Virus kalifornské encefalitidy	Severní Amerika, Norsko, Arktická Kanada	<i>Oc. canadensis</i> , <i>Oc. communis</i>	Hlodavci (<i>Lepus Americanus</i>)	(Kurstak, 2012)
		Virus Inkoo	Skandinávie a Aljaška	<i>Oc. communis</i>	Hlodavci (<i>Apodemus sp.</i> , <i>Microtus sp.</i> , <i>Sorex sp.</i>)	(Brummer - Korvenkio a spol., 1973)
		Virus Chatanga	Finsko, Švédsko, Rusko	Komáři	Lidé	(Putkuri a spol., 2016)
		Virus Snowshoe hare	Kanada a Aljaška	<i>Oc. canadensis</i> , <i>Oc. communis</i> , <i>Culex inornata</i>	Hlodavci (<i>Lepus Americanus</i>)	(McLean, 1975; McLean a spol., 1977)
		Virus Northway	Aljaška	Komáři rodu <i>Aedes</i>	Králíci, hraboši	(Ritter a Feltz, 1974)
		Virus Jamestown Canyon	Kanada, Aljaška, Arktické Rusko	<i>Oc. canadensis</i> , <i>Oc. communis</i> , <i>Oc. excrucians</i> , <i>Oc. punctor</i>	Jeleni, bizoni, losi	(Goff a spol., 2012; Vosoughi a spol., 2018)
		Virus Tahyna	Kolský poloostrov	<i>Oc. communis</i>	Hlodavci, králíci, ježci	(Bennett a spol., 2011)
		Virus Batai	Bajkal	Komáři rodu <i>Aedes</i>	Neznámý	(Francy a spol., 1989)
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Virus Getah	Bajkal	Komáři rodu <i>Culex</i>	Neznámý	(L'vov a spol., 2015)
		Virus Sindbis	Skandinávie	Komáři rodu <i>Culex</i>	Ptáci (<i>Passeriformes</i>), lidé	(Kurkela a spol., 2008)

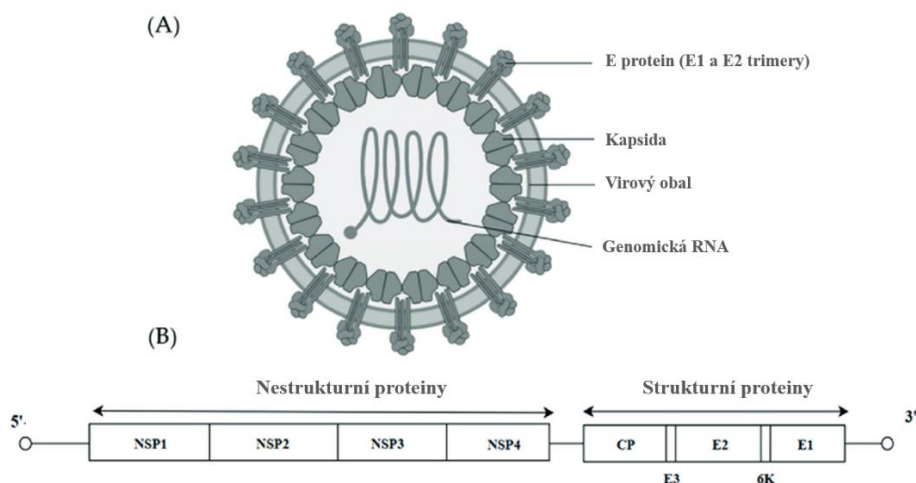
1.3.4. Vybrané arboviry

Část této práce je zaměřena na detekci SINV (*Togaviridae*). SINV, společně s INKV, se vyskytují v oblastech Skandinávie a Ruska do 70° zeměpisné šířky a tudíž je pravděpodobný přenos do dalších lokalit skrze migrující hostitele. V roce 2013 byl zaznamenán náhlý „*outbreak*“ nemoci způsobený SINV a INKV v původně neendemické oblasti Švédska (Tingström a spol., 2016).

1.3.4.1. Čeleď *Togaviridae*

Čeleď *Togaviridae* jsou obalené jednovláknové RNA viry s genomem pozitivní polarity o velikosti 70 nm. Zahrnuje celkem dva rody – *Alphavirus* (Obr. 4), spadající do arbovirů a dále rod *Rubivirus*, kam patří virus zarděnek (Wachtman a Mansfield, 2012).

Arboviry rodu *Alphavirus* jsou přenášeny komáry a jsou schopné replikace jak ve svém přenašeči, tak v obratlovčím hostiteli. Jedinou výjimku na požadavek přenosu komárem tvoří SAV a Southern elephant seal virus (SESV), které byly izolovány ze dvou druhů vší, *Lepidophthirus macrorhini* (SESV) a *Lepeophtheirus salmonnus* (SAV) (MacLachlan a Dubovi, 2017). Migrace ptáků hraje důležitou roli při šíření alphavirů do různých oblastí, hlavně po severní polokouli (Artsob a spol., 2017). Na základě geografické distribuce se arboviry tohoto rodu dělí na viry Starého a Nového světa. Alphaviry Starého světa (např. SINV, CHIKV, virus O'nyong-nyong (ONNV), virus Mayaro (MAYV), virus Ross River (RRV), virus Barmah Forest (BFV) a virus Semliki Forest (SFV)) se vyskytují především v Evropě, Asii, Austrálii a částech Afriky a u lidí způsobují horečku, vyrážku a artritidu. CHIKV, SINV a RRV také způsobují lidskou encefalitidu. Mezi alphaviry Nového světa patří virus koňské encefalomyelitidy východního typu (EEEV), virus koňské encefalomyelitidy západního typu (WEEV) a virus venezuelské koňské encefalomyelitidy (VEEV), které jsou rozšířeny po celém americkém kontinentu a způsobují encefalitidy u koní a lidí (MacLachlan a Dubovi, 2017).



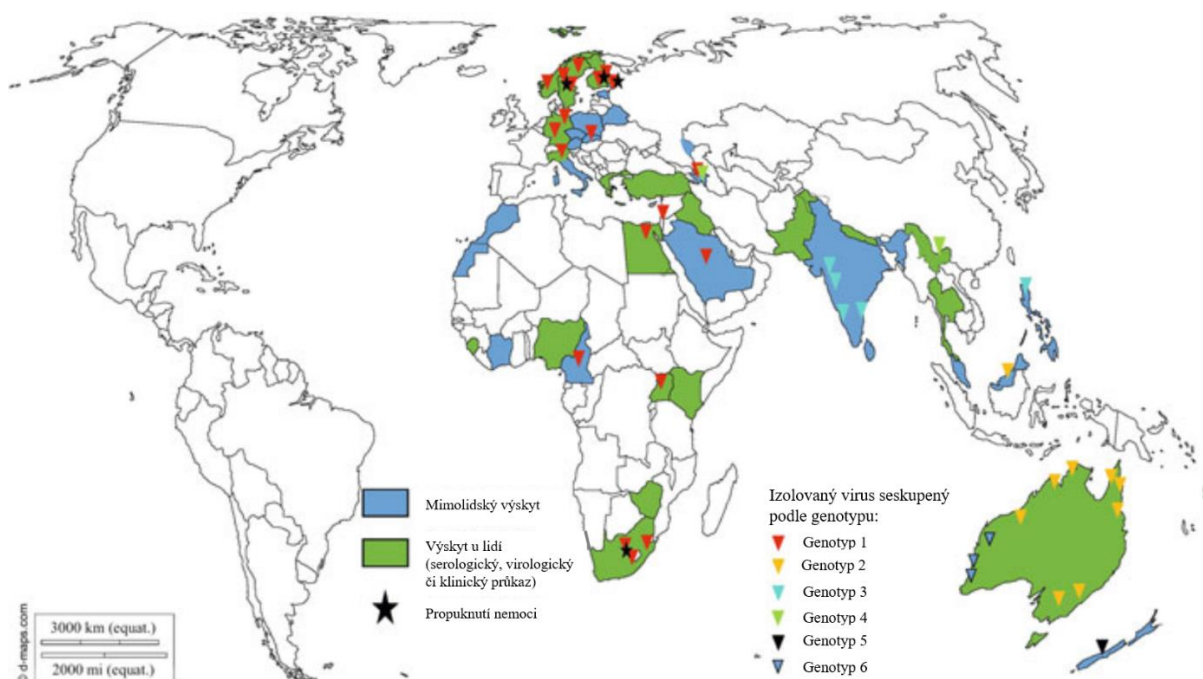
Obr. 4: (A): Ilustrační obrázek molekulární struktury virové částice rodu *Alphavirus*; (B): Genom virové částice rodu *Alphavirus*. NSP1-4 = nestrukturní proteiny 1-4; CP = kapsidový protein; E1-3 = obalové („enveloped“) proteiny (převzato a upraveno z Mandary a spol., 2019).

1.3.4.1.1. Virus Sindbis

SINV, člen komplexu WEEV, je převážně ornitofilní alphavirus přenášený komáry rodu *Culex*. Poprvé byl izolován v roce 1952 v deltě řeky Nilu v Egyptě ze smíšeného vzorku komárů *Culex (Cx.) pipiens* a *Cx. univittatus* (Lundström a Pfeffer, 2010). Kromě komárů a ptáků pochází izoláty některých kmenů SINV také ze vzorků klíšťat, netopýrů, skokana skřehotavého (*Pelophylax ridibundus*) a křečka polního (*Cricetus cricetus*) (Adouchief a spol., 2016; Kurkela a spol., 2008). Protilátky proti SINV byly prokázány jak u několika druhů ptáků, tak u králíků, koní nebo divokých koček v Austrálii (Hesson a spol., 2016; Johansen a spol., 2005). Genomová RNA SINV se skládá ze dvou subgenomových podjednotek velkých 49 S (= Svedberg) a 26 S. Transkripce větší podjednotky (49 S) produkuje čtyři nestrukturální proteiny NSP1-4. Tato část také slouží jako mRNA v infikované buňce. Přepisem a následným překladem menší podjednotky (26 S) vzniká polypeptid, ze kterého jsou vytvořeny strukturní proteiny E1, E2 a C (viz Obr. 5) (Kurkela a spol., 2004).

Výskyt SINV je vyhrazen v podstatě jen na Starý svět (Eurasie, Afrika) spolu s Austrálií a Oceánií, v Americe nikdy zaznamenán nebyl. Dle fylogenetických analýz jsou kmeny SINV rozděleny do 6 genotypů ležících v osách sever – jih. Evropské a africké kmeny tvoří genotyp 1. Australské, východo- a středoasijské kmeny se označují jako genotypy 2-4 a kmeny blízké příbuzné viru Whataroa jako genotyp 5. Kmeny z jihozápadní Austrálie pak tvoří šestý genotyp (Obr. 3). I přes jeho širokou distribuci byly klinické příznaky u lidí

zaznamenány jen v určitých oblastech, zejména v severní Evropě a jižní Africe (Adouchief a spol., 2016; Kurkela a spol., 2008). V severní Evropě je výskyt SINV označen za kauzativní agens u „*Pogosta disease*“ ve Finsku, „*Ockelbo disease*“ ve Švédsku a „*Karelian fever*“ v Rusku (Nielsen a spol., 2001). Lidské infekce tímto virem se projevují polyartritidou, horečkou a vyrážkou, případně myalgií (Adouchief a spol., 2016). Ve Švédsku i Finsku se podle několika studií nemoci způsobené SINV objevují v přibližně sedmiletých intervalech. Ve Finsku je SINV nejčastěji diagnostikovaný arbovirus se seroprevalencí 5,2 %. Švédsko má nejvyšší výskyt SINV v centrální části s klesající seroprevalencí směrem na jih a sever země (Ahlm a spol., 2014; Gylfe a spol., 2018).

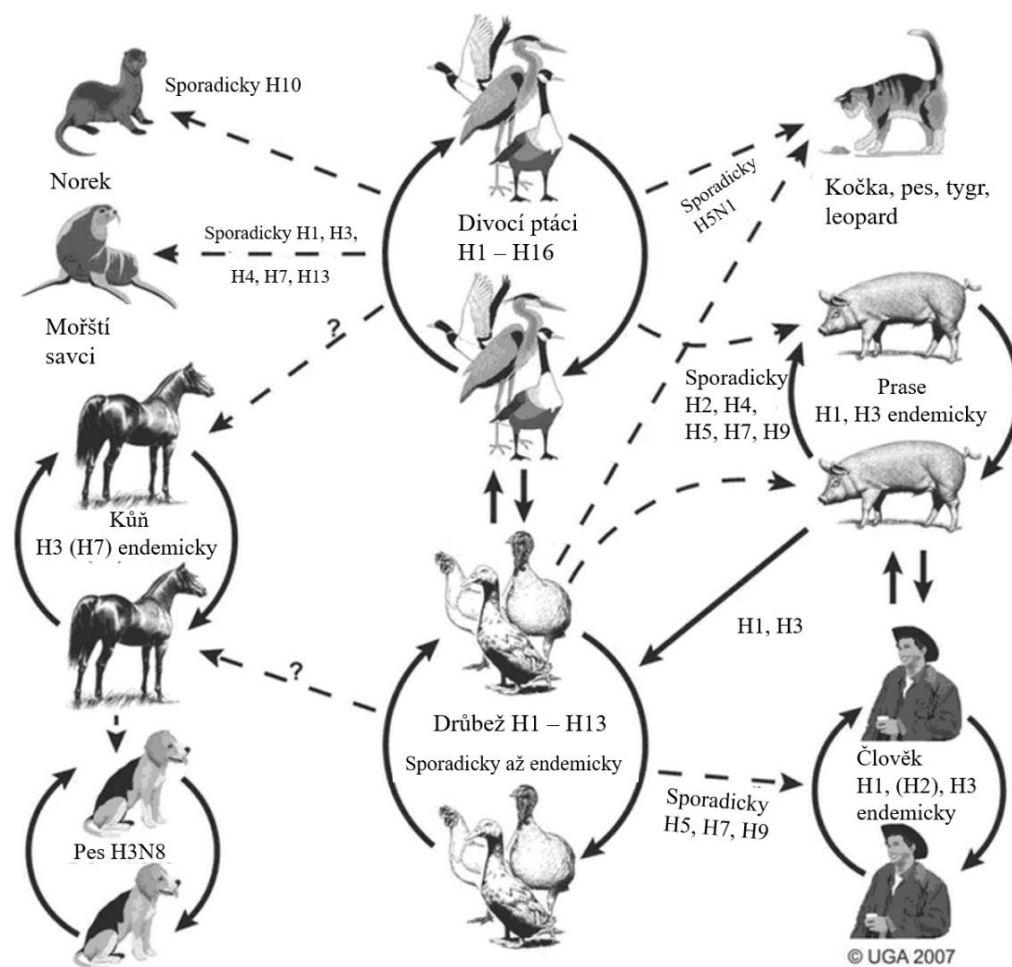


Obr. 5: Mapa znázorňující výskyt SINV (převzato a upraveno z (Adouchief a spol., 2016).

Jak je již zmíněno výše, komáři rodu *Culex* představují hlavní přenašeče SINV. Podle několika studií však některé druhy rodu *Ochlerotatus* a *Aedes* představují důležité můstkové vektory s největším potenciálem pro přenos SINV na člověka (Adouchief a spol., 2016). Vertikální přenos (transovariální) SINV byl popsán v severní části Švédska, kde byl tento virus detekován z larev komára *Oc. communis*, *Oc. punctor* a *Oc. diantaeus* (Tingström a spol., 2016). Hlavními hostiteli SINV jsou ptáci, zejména pěvci (*Passeriformes*). Ve Skandinávii byla vysoká virémie zaznamenána také u tetřevovitých (*Tetraonidae*), hrabavých (*Galliformes*) a kachnovitých (*Anatidae*). Velice důležitým rezervoárem jsou stěhovaví ptáci, kteří mohou šířit SINV do neendemických oblastí (Adouchief a spol., 2016; Kurkela a spol., 2004). Přenos z člověka na člověka nebyl dosud popsán (Tingström a spol., 2016).

1.4. Virus chřipky

Chřipka je poměrně běžné nicméně také vysoce infekční onemocnění zapříčiněné virem chřipky. Virus chřipky patří do čeledě *Orthomyxoviridae* a rozlišujeme u něho 4 typy, A, B, C a D. U lidí byly doposud popsány jen 3 typy, chřipka A, B a C, zatímco pouze virus chřipky A (IAV, z anglického spojení „*Influenza A virus*“) je přenášen ze zvířat na člověka a naopak (Obr. 6) (Meseko a spol., 2018).



Obr. 6: Mezihostitelský přenos IAV (převzato a upraveno z Swayne, 2009).

IAV se dále dělí na subtypy podle povrchových glykoproteinů hemagglutininu (HA) a neuraminidázy (NA) (Saxena, 2018). Celkem rozeznáváme 18 typů HA a 11 typů NA (Obr. 7). U volně žijících ptáků bylo detekováno 16 HA a 9 NA antigenních subtypů tvořících množství kombinací, zatímco u člověka byly zjištěny pouze tři HA (H1, H2 a H3) a dva NA (N1 a N2) subtypy (Bouvier a Palese, 2008; Olsen a spol., 2006).

Hemaglutinin		Neuraminidáza	
H1		N1	
H2		N2	
H3		N3	
H4		N4	
H5		N5	
H6		N6	
H7		N7	
H8		N8	
H9		N9	
H10		N10	
H11		N11	
H12			
H13			
H14			
H15			
H16			
H17			
H18			

- člověk	- velryby	- tygři, leopardi
- divocí ptáci	- koně	- netopýři
- prasata	- mořští savci	- drůbež
- fretky	- psi	

Obr. 7: Souhrn HA a NA subtypů (převzato a upraveno z Müllerová, 2018).

Podle svého hostitele může být virus chřipky kategorizován. Rozlišujeme tak ptačí, prasečí a koňský kmen. Jako další hostitele lze uvést tuleně, velryby, norky, kočkovité šelmy, psy nebo netopýry (viz Obr. 7) (Ito a spol., 1995). Virus ptačí chřipky (AIV, z anglického spojení „*Avian influenza virus*“) je souhrnné označení pro všechny chřipkové viry jejichž prvním hostitelem byl pták. Ptačí chřipka, způsobená AIV, je infekční onemocnění postihující zejména ptáky, ale i prasata či mořské savce (Rappole a Hubalek, 2006). AIV infikuje více než 90 druhů ptáků z 13 řádů, nejvíce však vodní ptáky z řádů dlouhokřídlých (*Charadriiformes*) a vrubozobých (*Anseriformes*) (Breban a spol., 2009). První zaznamenaná izolace viru od volně žijících ptáků byla z rybáka obecného (*Sterna hirundo*) v roce 1961 (Fouchier a Munster, 2009). Časté infekce se objevují i u domácích chovů drůbeže, ale může infikovat také řadu savců včetně člověka (Rappole a Hubalek, 2006). Jak je již zmíněno výše, primárním biotickým rezervoárem AIV v přírodě jsou vodní ptáci. Za potencionální abiotický rezervoár lze kromě vody v tekutém skupenství krátkodobě i dlouhodobě považovat také led. Je tomu tak zejména v sibiřských oblastech, které jsou součástí několika migračních cest různých vodních ptáků (Zhang a spol., 2006).

Na základě virulence způsobené u kuřat je AIV rozdělen na nízcí a vysoce patogenní formu chřipky. Hojně diskutovanou a v posledních letech nejvíce zkoumanou je vysoce patogenní ptačí chřipka (HPAI, z anglického spojení „*Highly Pathogenic Avian Influenza*“). Dříve byla tato forma označována jako drůbeží mor v důsledku 100% úmrtnosti v rámci

několika málo hodin až týdne po zahájení infekce. Tento typ je také omezen pouze na dva subtypy, H5 a H7, i když ne všechny viry s tímto subtypem hemaglutininu způsobují HPAI (Alexander, 2000). Druhou formou je nízcce patogenní ptačí chřipka (LPAI, z anglického spojení „*Low Patogenic Avian Influenza*“). Viry této formy obvykle nezpůsobují vysokou úmrtnost v zasažených hejnech drůbeže. LPAI u nich mohou být asymptomatické, ale mnohem častěji způsobují mírné až těžší respirační a/nebo enterální onemocnění. Naproti tomu HPAI se u drůbeže projevují těžkými systémovými infekcemi. V případě člověka způsobují HPAI i LPAI vážná onemocnění (Swayne, 2009). Tyto dvě formy se liší také ve virovém přenosu a replikaci. HPAI viry se množí v celém hostiteli a horní cesty dýchací pro ně představují nejjednodušší cestu transferu. LPAI viry, kterých je většina, se naopak amplifikují v respiračních orgánech, popřípadě ve střevě. AIV se šíří trusem nakažených ptáků, přenos je tedy označován jako fekálně-orální (Webster a spol., 1992).

K prvnímu přenosu ptačí chřipky na člověka došlo v roce 1997 v Hongkongu. Jednalo se o subtyp H5N1 (Webster, 1998). Infekce H5N1 se u pacientů projevuje horečkou, kašlem, dušností a známkami pneumonie (Saxena, 2018). Dalšími subtypy ptačí chřipky, kterými byl infikován člověk jsou H9N2, H7N7 nebo H7N9 (Matrosovich a spol., 2004; Saxena, 2018). V České republice se ptačí chřipka poprvé objevila v roce 2006, kdy bylo v populaci labutí (*Cygnus olor*) zaznamenáno 12 jedinců nakažených kmenem H5N1 (Nagy a spol., 2007).

1.4.1. LPAI subtypy

LPAI viry se vyskytují po celém světě a jejich hlavním rezervoárem jsou volně žijící ptáci, především z řádu *Anseriformes* a *Charadriiformes*. Ptáci z těchto dvou řádů se nachází po celém světě s výjimkou nejsušších regionů. Mnoho jedinců migruje na velké vzdálenosti a má tak vysoký potenciál distribuovat LPAI viry mezi zeměmi nebo kontinenty. LPAI viry mohou být přenášeny buď přímo nebo nepřímo na další hostitele, jako je drůbež, prasata, koně, norci, mořští savci a lidé (viz výše) (Fouchier a Munster, 2009). Byly izolovány z nejméně 105 druhů volně žijících ptáků z 26 různých čeledí. U ptáků viry infikují přednostně buňky sliznice střevního traktu a jsou vylučovány ve vysokých koncentracích do stolice. Ukázalo se, že chřipkové viry zůstávají infekční v jezerní vodě až 4 dny při 22°C a více než 30 dní při 0°C (Olsen a spol., 2006).

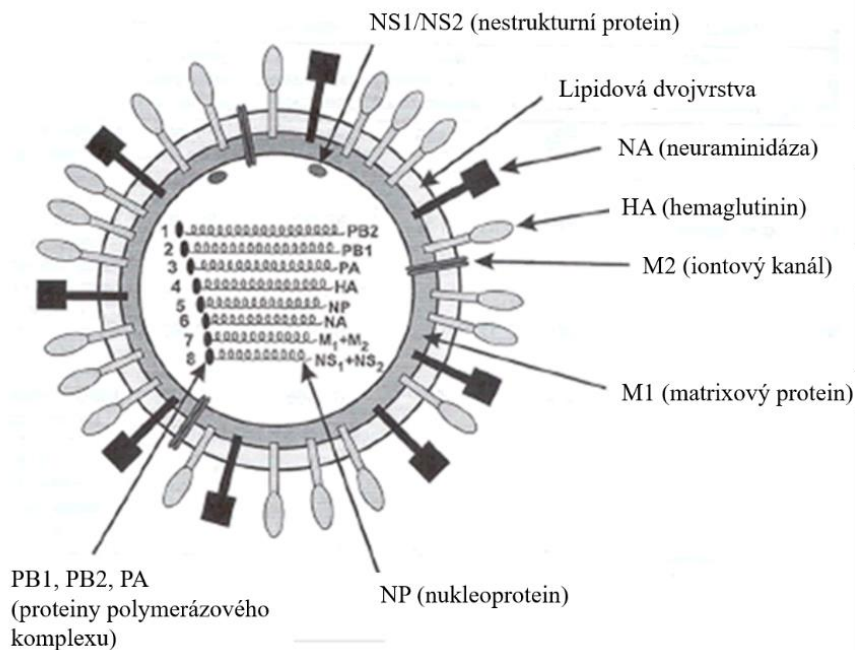
Zdá se, že většina ptáků je více nebo méně citlivá na více než 1 kmen AIV, avšak míra infekce a úroveň citlivosti na různé virové subtypy se mezi taxony liší. Například subtypy H3 a H6 jsou běžné u kachen, hus a labutí (*Anseriformes*), zatímco kmeny H4, H9, H11 a H13

jsou více rozšířeny u slukovitých (*Scolopacidae*), rybáků a racků (*Charadriiformes*) (Rappole a Hubalek, 2006). Všechny subtypy HA a NA, s výjimkou H13 až H16, cirkulují v populaci divokých kachen (*Anas platyrhynchos*) v Severní Americe a severní Evropě. Na základě několikaleté studie z Kanady byly u těchto ptáků nejčastěji izolovány subtypy H3, H4 a H6, méně často pak subtypy H1, H2, H7, H10 a H11 a pouze sporadicky subtypy H5, H8, H9 a H12 (Olsen a spol., 2006).

Nejčastěji detekované subtypy LPAI u řádu dlouhokřídlých (*Charadriiformes*) jsou H13 a H16, které jsou jen velmi zřídka nalezeny u jiných druhů (Fouchier a Munster, 2009). Proto jsou tyto kmeny označovány jako „gull-associated“, nebo-li s racky spojené kmeny. Kromě výjimky AIV kmene H13N9 izolovaného z racka jižního (*Larus dominicanus*) v Jižní Americe, byly všechny H13 a H16 detekovány pouze na severní polokouli, s vyšší prevalencí H13. Poprvé byl kmen H13 detekován v roce 1982 v USA z racka delawarského (*Larus delawarensis*), racka vnitrozemského (*Leucophaeus pipixcan*), racka mořského (*Larus marinus*) a racka stříbřitého (*Larus argentatus*) (Toennessen a spol., 2011). O něco později byl detekován kmen H16, a to z racka chechtavého (*Larus ridibundus*) v roce 2015 ve Švédsku (Olsen a spol., 2006). Kromě subtypů H13 a H16 byly u rackovitých (*Laridae*) zjištěny i další u ptáků se vyskytující kmeny HA a NA s výjimkou H15. Nejčastěji se však jednalo o H4, H5, H6, H9 a N1, N2, N3, N9. U racka tříprstého (*Rissa tridactyla*) se na přítomnost AIV doposud podařilo detekovat subtypy H4, H13, H16 a N2, N3, N6 (Arnal a spol., 2015; Hall a spol., 2013; Toennessen a spol., 2011).

1.4.2. Molekulární charakteristika

Genom chřipkového viru se skládá z osmi segmentů jednořetězcové RNA negativní polarity, který kóduje 11 proteinů (Olsen a spol., 2006). Přítomnost všech osmi segmentů je nutná pro infekčnost virové částice. Viriony mají sférický tvar o velikosti 80 – 120 nm. Sestávají se z nukleokapsidy obalující genom a lipidového obalu odvozeného z hostitelské buňky, ve kterém jsou zanořeny povrchové glykoproteiny HA, NA a malé množství transmembránových iontových kanálů M2 (Bouvier a Palese, 2008; Webster a spol., 1992). Kromě těchto tří proteinů je součástí virionu také 8 interních proteinů. Patří mezi ně proteiny polymerázového komplexu PB2, PB1, PB1-F2 a PA, nukleoprotein NP, matrixový protein M1, a nestrukturní proteiny NS1, a NS2 (Obr. 8). Protein PB1-F2 je kódován pouze u některých kmenů chřipky typu A a vyznačuje se proapoptickou aktivitou. (Chen a spol., 2006; Swayne, 2009).



Obr. 8: Virová částice IAV (převzato a upraveno z *Medical Ecology >> Infectious Diseases >> Influenza, b.r.*).

HA je hlavní povrchový antigen virové částice chřipky. Je zodpovědný za vazbu virionů na receptory hostitelských buněk a za fúzi mezi obalem virionu a hostitelskou buňkou. HA je nejprve syntetizován jako polypeptidový prekurzor HA0, který je štěpen hostitelskými proteázami na HA1 a HA2 podjednotky. Tento krok je nutný zejména pro fúzi virionového obalu s hostitelskou buňkou právě pomocí volného aminového konce HA podjednotky. Přejít z LPAI, běžného u volně žijících ptáků a drůbeže, na fenotyp viru HPAI je dosažen zavedením základních aminokyselinových zbytků do místa štěpení HA0, což usnadňuje systémovou replikaci viru. (Olsen a spol., 2006; Webster a spol., 1992). Druhým významným povrchovým antigenem virionu je NA. Její důležitou funkcí je terminální štěpení kyseliny sialové, čímž umožní uvolnění virových částic z receptorů hostitelských buněk. Díky tomu se nově vzniklé viriony dostanou z buňky ven a usnadňuje se tak šíření viru v organismu (Webster a spol., 1992).

Virus chřipky zahajuje infekci navázáním na „sialylovaný“ receptor hostitelské buňky pomocí HA molekuly na svém povrchu. Konkrétně jde o vazbu receptoru s HA vazebným místem s virovými povrchovými glykokonjugáty obsahujícími terminální zbytky kyseliny sialové. Samotná identita hostitelského receptoru je zatím neznámá, ale obecně se předpokládá, že HA z AIV má vyšší specifitu pro receptory s α -2,3 kyselinou sialovou, zatímco HA z lidského IAV preferuje α -2,6 vazbu (Dou a spol., 2018).

1.4.2.1. Antigenní shift a drift

Vlivem virové RNA polymerázové aktivity náchylné k chybám je chřipkový virus vystaven velmi vysoké míře mutace. Ta je odhadována na přibližně 2×10^{-3} substitucí bází na pozici na generaci viru nebo na přibližně jednu substituci báze v genu HA na virovou generaci. Volba substitucí aminokyselin je částečně řízena imunitním tlakem, protože HA je hlavním cílem imunitní odpovědi hostitele (Webster a spol., 1992). Charakteristickým rysem chřipkového viru je tedy jeho vysoká variabilita. Jde o schopnost viru změnit svou antigenní identitu tak výrazně, že specifická imunita stanovená v reakci na infekci konkrétním kmenem může poskytnout malou nebo i žádnou ochranu před viry (subtypy), které se následně objeví. Tyto antigenní variace jsou výsledkem molekulárních změn v povrchových proteinech chřipkových virů, HA a NA. Existují dva typy změn, které mohou u HA a NA nastat – antigenní shift (zlom) a antigenní drift (posun). Antigenní drift se vyskytuje v rámci subtypu a zahrnuje řadu drobných změn na úrovni genu, obvykle bodové mutace, takže se vytvářejí varianty, z nichž se každá mírně liší od té předchozí. Antigenní drift je zodpovědný za roční chřipkové epidemie (Webster a spol., 1983). Naproti tomu antigenní shift je způsoben radikálnější změnou v HA a/nebo NA. Tento typ procesu vede k změně virových antigenních vlastností, přičemž dochází k přeskupení celých segmentů. Přeskupení nastane, pokud je jedna hostitelská buňka infikována dvěma virovými subtypy. Následně se tak vytvoří nový subtyp chřipkového viru s novým typem HA, NA nebo novou kombinací obou těchto povrchových proteinů. Vzhledem k tomuto faktu je antigenní shift zodpovědný za vznik světových pandemií (Reed a spol., 2003).

1.4.3. Přírozený cyklus AIV

V současné době není způsob udržování AIV v přírodě zcela znám. Existují ovšem záznamy z populací kachen (*Anatinae*), které podporují tvrzení, že se jedná o cyklus založený na kombinovaném účinku neustálého přenosu z jednoho ptáka na druhého spolu s environmentální persistencí (například ve vodě). Tento předpokládaný cyklus je založen na přenosu AIV jak v rámci hnízdišť, tak zimovišť. Virus je udržován a amplifikován v rámci různých ptačích druhů a populací v místech jejich hnízdění. Následuje „přesun“ AIV migrujícími ptáky na místo jejich zimoviště. V zimovištích jsou virem infikováni ptáci, kteří migrují časně nebo nemigrují vůbec. Během jara se potom stěhovaví ptáci vrací zpět na svá hnízdiště, kam přenesou i AIV a cyklus se opakuje. Toto migrační chování tak poskytuje náchylnou populaci pro nákazu a udržení cyklu v oblasti zimovišť (Swayne, 2009).

K vylučování viru dochází během jarních a podzimních měsíců, což je období korespondující s migrační aktivitou ptáků do zimovišť. Naopak v polárních oblastech Kanady a Aljašky je virus nejvíce vylučován během letních měsíců, tedy v době, kdy ptáci v těchto regionech hnízdí (Ito a spol., 1995; Tůmová, 2008). Málo pochopenou oblastí je také příspěvek jednotlivých druhů ptáků v udržení tohoto AIV cyklu, což může souviset právě s migračním chováním ptáků. Kromě kachen se na tomto udržovacím mechanismu podílí i racci (*Lari*) či bahňáci (*Charadrii*). Persistence viru v životním prostředí (ve vodě) hraje roli především ve zvýšení jeho sezónního přenosu poskytnutím zbytkového zdroje viru po odletu infikovaných ptáků z místa hnízdišť (do zimovišť). Tato potenciální role životního prostředí v údržbě AIV cyklu však vyžaduje ještě další studie (Swayne, 2009; Webster a spol., 1992).

1.4.4. Způsoby nákazy

Vstupní portál pro infekci člověka může být prostřednictvím spojivky (např. tření očí), nosních či slizničních membrán, kdy dojde k inhalaci prachu nebo kapének. Člověk se vodou nebo kontaminovaným prostředím nakazí jen zřídka. Hlavním způsobem infekce u lidí je přímý kontakt s postiženým nebo uhynulým zvířetem. Děje se tak především na trzích nebo farmách, kde se drůbež také zpracovává, přičemž při kontaktu člověka s krví, vnitřnostmi, peřím či výkaly může také dojít k nákaze. Pozření infikovaného masa nebo i vajíčka (hlavně skořápka, ale i žloutek či bílek), je dalším způsobem onemocnění zejména zvířat, u člověka tento způsob přenosu nebyl dokumentován díky dostatečné tepelné úpravě (Mostafa a spol., 2018; Tůmová, 2008). Velice ojedinělým případem je nákaza AIV z člověka na člověka, ke kterému může dojít po těsném kontaktu osob (Yang a spol., 2007). U volně žijících, zejména vodních ptáků se AIV šíří fekálně-orálním způsobem prostřednictvím vody. Fekální kontaminace vody poté může vést k přenosu chřipky na prasata, koně, drůbež nebo člověka. Například trus volně žijících kachen může zavést LPAI virus do domácích chovů drůbeže chovaných poblíž vody nebo v otevřených ohradách (Webster, 1998). Také plavání v kontaminované vodě může vést k nákaze dalších ptáků nebo savců (Yang a spol., 2007).

1.4.5. Výskyt a šíření AIV

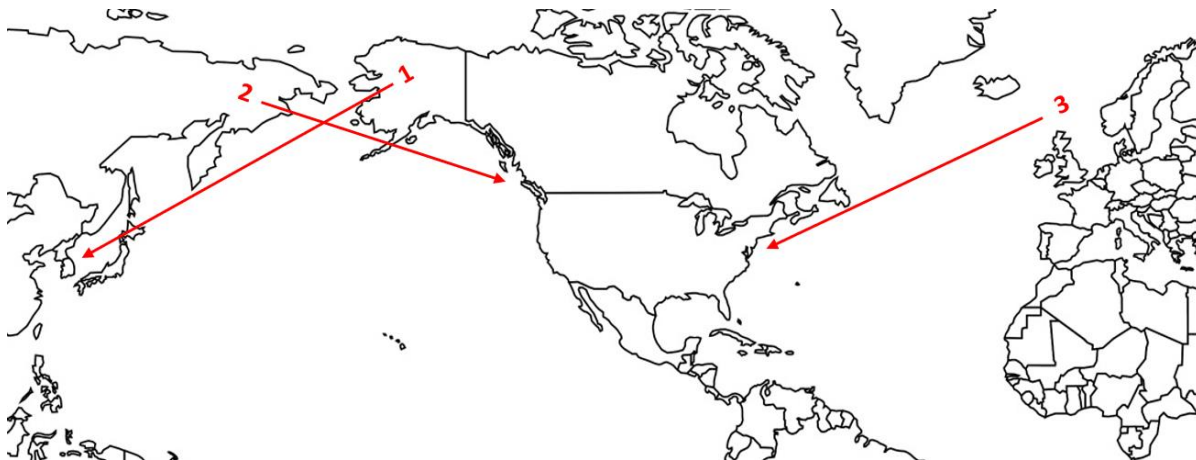
Kromě vodních ptáků řadících se do řádů *Anseriformes* (stěhovavé kachny, husy a labutě), *Charadriiformes* (bahňáci) patří mezi časté rezervoáry také ptáci z řádů *Lariformes* (racci, rybáči, buňňáci), *Ciconiiformes* (volavky, čápi) a *Pelecaniformes* (kormoráni) (Tůmová, 2008). Dalším důležitým rezervoárem je drůbež (kuřata, krocani, perličky) (Webster a spol., 1992). Infekce u těchto hostitelských druhů ptáků nejsou jen nízko patogenní

projevující se respiračním onemocněním, ale mohou být také asymptomatické. Bylo prokázáno, že HPAI i LPAI mohou být přenášeny na velké vzdálenosti, aniž by došlo ke klinickým projevům hostitele. Fylogeografické analýzy pomohly odhalit například roli stěhovavých volně žijících ptáků v rámci interkontinentální cirkulace LPAI v Severní Americe. U šíření LPAI kmene H9N2 v Asii bylo naopak zjištěno, že na jeho distribuci se významně podílela drůbež a domácí obchod s ptáky (Lycett a spol., 2019).

Je zřejmé, že migrační cesty volně žijících ptáků mají významný vliv na šíření a globální oběh AIV. Jednotlivé dráhy se různě prolínají a překrývají, proto je jejich dokumentace velmi obtížná. Lze ale pozorovat dvě velmi odlišné hlavní ptačí linie odpovídající buď Americe nebo Asii spolu s Evropou, Afrikou a Australázií (Lycett a spol., 2019). Existují ale i důkazy přenosu z amerického kontinentu do Eurasie (Cheon a spol., 2018). Přeskupením genů mezi těmito dvěma liniemi může dojít k vzniku kmene s novými vlastnostmi nebo k vytvoření zcela nové sublinie. Izolace mnoha subtypů byla provedena z odchycených ale i uhynulých ptáků (drůbež i volně žijící) na západě USA, kanadských jezerech, přes střední a západní Evropu, Skandinávii, Kaspické oblasti, Kamčatku, Indii, Čínu a Japonsko až po Velký Bradlový útes u Austrálie. Výskyt AIV se tak dá z hlediska druhové a geografické distribuce označit za ubikvitní (Kerlinger, 2008; Tůmová, 2008).

Šíření AIV se děje dvěma způsoby. K primárnímu (vertikálnímu) přenosu dochází z volně žijících migrujících vodních ptáků na hejna suchozemských ale i vodních ptáků. Přenos infekce mezi chovy drůbeže se označuje jako sekundární (horizontální). U primárního přenosu se za zdroj infekce pokládají vodní migrující ptáci. Problémem je ovšem nedostatečná znalost jejich druhů a obtížnost izolace přenášených kmenů. Hlavní migrační trasy doplněné řadou vedlejších linií tvoří komplikovanou síť, díky které se AIV šíří do dalších oblastí. Severní Amerika má 4 základní linie pokrývající celé území. Publikace popisující způsob a přesnější migraci v rámci Evropy stále chybí. Z dostupných dat vedou evropské linie ze severu a severovýchodu Evropy a severního Ruska směrem k Pyrenejím a Africe nebo na Balkán a k malé Asii nebo pak k Sicílii a Itálii. Asijská linie se větví z arktických oblastí na řadu linií vedoucích do centrální Asie a dál na jih (Austrálie, Nový Zéland) a na západ (Rusko, Evropa, Arabský poloostrov, Afrika) (Tůmová, 2008). V rámci migrace mezi západní a východní hemisférou jsou známé tři linie. První trasa vede z Aljašky do Východní Asie, ve které ptáci hnízdící na Aljašce přezimují. Druhá migrační linie směřuje z Východní Asie do Pacifiku v Severní Americe. Ptáci hnízdící na severovýchodě Asie létají přezimovat podél pacifického pobřeží Severní Ameriky. Poslední je trasa mezi Evropou a pobřežím Atlantického oceánu

v Severní Americe, kam migrují ptáci z Islandu a severozápadu Evropy (Obr. 9) (Rappole a Hubalek, 2006).



Obr. 9: Mapa známých tras pohybu ptáků v rámci hemisféry.

Tyto migrační cykly se u odlišných ptačích druhů různě překrývají, což má významný dopad na ekologii AIV a udržení perzistujícího genofondu viru. Také křížení jednotlivých migračních linií v místech s vysokou hustotou různých ptačích druhů z odlišných oblastí má značný vliv na rozšíření AIV. Tyto faktory spolu s vysokou promořeností volně žijících vodních migrantů, převládající bezpříznakovou formou nákazy, amplifikací viru ve střevních buňkách a následným vyloučením kloakou vedou k vysoké kontaminaci vody a prostředí. V něm se poté mohou nakazit ostatní ptáci velice často i více subtypy současně. Například z infikovaných kachen byly v rámci jednoho kloakálního stěru izolovány dva až tři virové subtypy (Tůmová, 2008).

1.4.5.1. Chřipka v oblastech Arktidy a Antarktidy

Výše uvedený celosvětový výskyt chřipkového viru zahrnuje také oblasti Arktidy a Antarktidy. Pro polární oblasti obecně jsou typické LPAI viry, jejichž hlavními rezervoáry jsou na severní polokouli kachny, husy, racci, rybáči a bahňáci. V Antarktidě AIV cirkuluje v rámci populace tučňáků, do které byl pravděpodobně zanesen štitonosí světlezobými (*Chionis albus*). Tito ptáci úzce interagují s koloniemi tučňáků a jejich přirozený výskyt v oblasti Antarktidy a přilehlých ostrovech usnadňuje pohyb AIV mezi tímto regionem a pevninskou částí Jižní Ameriky (Hurt a spol., 2016; Černý a spol., in prep.).

Virus chřipky byl nalezen také u mořských savců, jako jsou tuleni a velryby. U tuleně obecného (*Phoca vitulina*) virus způsobuje těžkou pneumonii. V arktické Kanadě byly detekovány protilátky proti chřipce u tuleně kroužkovaného (*Pusa hispida*) nebo u běluhy

severní (*Delphinapterus leucas*). IAV u mořských savců obvykle úzce souvisí s chřipkovým virem, který v současné době cirkuluje u mořských ptáků ve stejné oblasti. Proto jsou mořští savci považováni za slepého hostitele, který je jen příležitostně infikován mořskými ptáky. Zoonotický potenciál AIV cirkulujících v Arktidě je nízký a zdá se, že tyto kmeny nezpůsobují lidské infekce (Nielsen a spol., 2001; Černý a spol., in prep.).

2. Cíle práce

- 1) Charakterizovat pozitivní kontrolu viru Sindbis.
- 2) Pomocí zavedené metodiky otestovat vzorky komárů *Ochlerotatus nigripes* na přítomnost tohoto arboviru.
- 3) Charakterizovat pozitivní výsledky pomocí sekvenace a fylogenetické analýzy.
- 4) Otestovat pomocí molekulárních metod vzorky exkretů a stěrů z oropharyngu a kloaky na přítomnost viru ptačí chřipky.
- 5) Pomocí serologických a molekulárně biologických metod charakterizovat subtyp viru u pozitivních nálezů a následně je porovnat pomocí fylogenetické analýzy.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1. Vzorky

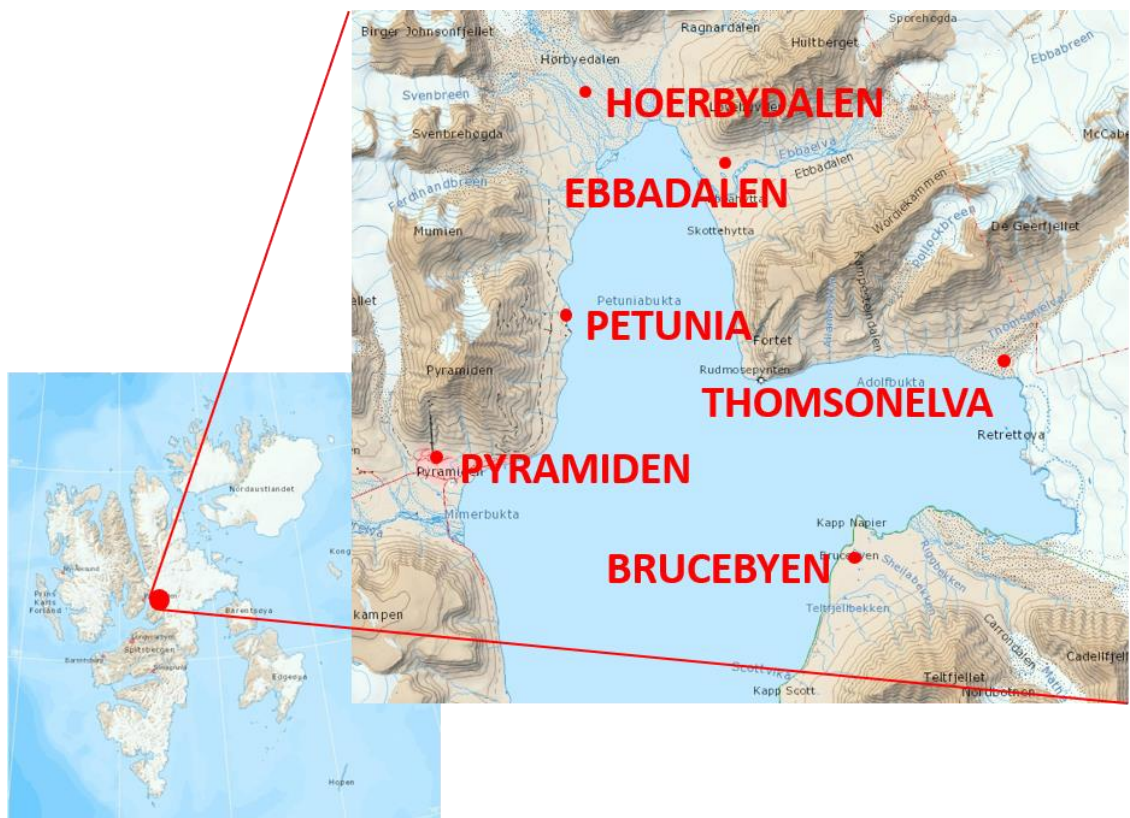
Sběr komárů

Veškeré vzorky byly sesbírány a laskavě poskytnuty členy centra polární ekologie, jmenovitě RNDr. Janou Müllerovou, doc. RNDr. Olegem Ditrichem, CSc.; RNDr. Janou Elsterovou; RNDr. Jiřím Černým, PhD.; Mgr. Jakubem Žárským, PhD., a Lauren E. Culler (Norway Dartmouth College, Hanover, USA)

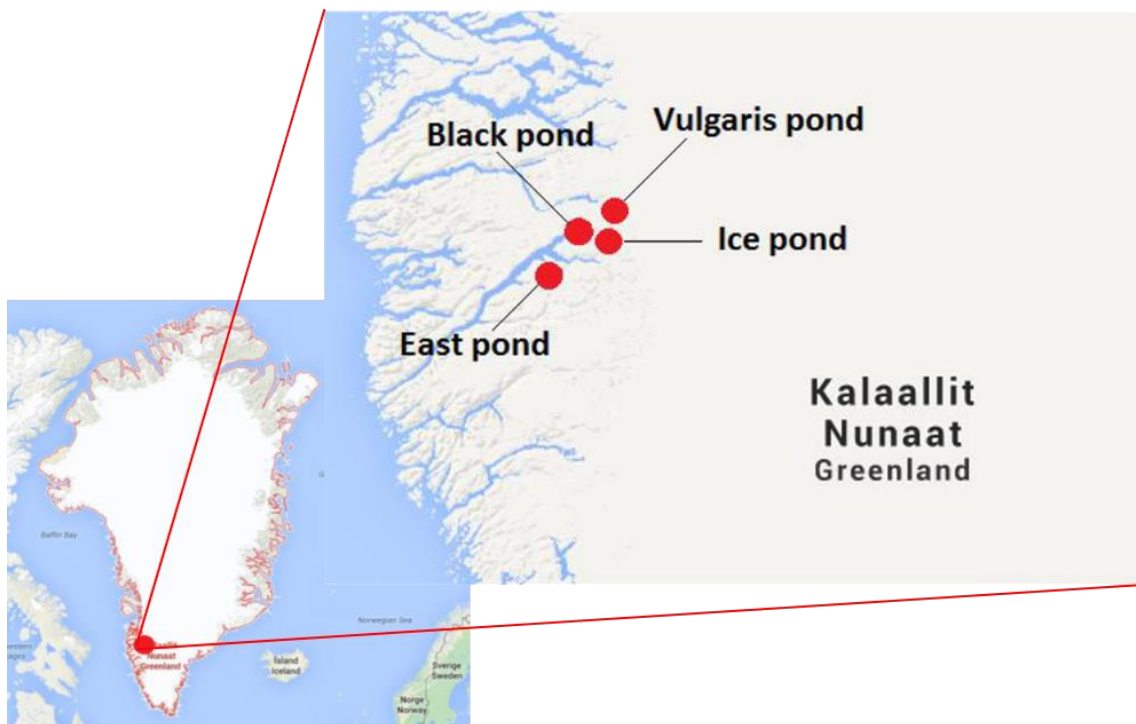
Celkem bylo sesbíráno téměř 8 000 komářích jedinců rodu *Ochlerotatus nigripes* v průběhu letní sezóny mezi lety 2013 až 2018 (Tab. II). Lokality sběru byly celkem dvě – souostroví Svalbard, přesněji okolí místa Petuniabukta (78°41'N 16°32'E) (Obr. 10) a dále ostrov Grónsko, kde sběr probíhal v okolí místa Kangerlussuaq (67°01'N 50°41'W) v lokalitách East Pond, Black Pond, Vulgaris Pond a Ice Pond (Obr. 11).

Tab. II: Přehled testovaných komářích vzorků ze Svalbardu a Grónska.

Lokalita	Rok sběru	Počet jedinců - kukly	Počet jedinců - dospělci
Grónsko	2013	0	213
	2015	0	632
Svalbard	2013	0	522
	2014	0	2313
	2015	390	1710
	2016	0	1871
	2017	0	67
	2018	0	51
Celkem		390	7379
Celkem		7769	



Obr. 10: Lokality sběru komárů na Svalbardu (převzato a upraveno z Jana Müllerová, bakalářská práce, 2014).



Obr. 11: Lokality sběru komárů v Grónsku (převzato a upraveno z Jana Müllerová, bakalářská práce, 2014).

Sesbírání komáří byli umístěni do zkumavek obsahujících 400 μ l roztoku RNAlater (*Ambion*) a uloženi v 4°C. Rozřazeni byli vždy po maximálně 30ti kusech na základě místa a data sběru. Po transportu do České republiky byly po celou dobu uchovávány v -80°C.

Odběr ptačích vzorků

Na základě analýzy z publikací na téma AIV v polárních oblastech zpracované v diplomové práci RNDr. Jany Müllerové, byla jako vhodná kandidátní populace ptáků pro studium prevalence tohoto viru na Svalbardu zvolena kolonie mořských ptáků - racků tříprstých (*Rissa tridactyla*).

Díky udělenému povolení č. 2013/00722-5 (viz Příloha 1) bylo v roce 2014 ve městě Pyramiden na Svalbardu (GPS 78°40'59.99" N 16°23'59.99" E) (Obr. 12) odebráno 100 vzorků krve a 100 stěrů z kloaky a oropharyngu. Veškeré odběry a stěry byly provedeny RNDr. Janou Elsterovou pod vedením ornitologa RNDr. Václava Pavla, Ph.D z Centra polární ekologie, České Budějovice. Dále na sběru vzorků spolupracovaly studentky kurzu Centra polární ekologie, Mgr. Zuzana Literáková a RNDr. Anna Mynářová.



Obr. 12: Vyznačení lokality odběru vzorků v kolonii racka tříprstého města Pyramiden (převzato a upraveno z Jana Müllerové, diplomová práce, 2018).

Vzorky krve byly odebírány sterilní jehlou promytou heparinem do zkumavky přímo z křídelní žíly (Obr. 13). Místo vpichu bylo vždy před i po odběru dezinfikováno roztokem ethanolu. Zpracování těchto vzorků následovalo bezprostředně po odběru. Krev byla nejprve centrifugována (2000 g/6min.), dále došlo k separaci séra, jenž bylo odebráno do sterilních zkumavek. Následně byly vzorky uloženy do 4°C. Po převozu do České republiky se již skladovaly v -80°C.

Vzorky stěrů z kloaky a oropharyngu (Obr. 13) byly odebírány pomocí sterilního tamponu na plastové tyčince a ihned po odběru přesunuty do sterilních zkumavek s 500 µl roztoku RNAlater. Odebrané vzorky byly nejprve opět uloženy do 4°C a po transportu do České republiky dále uchovávány v -80°C.

Jednotliví jedinci byli označeni, aby nedošlo k opakovanému odběru. Před opětovným vypuštěním a následně po něm byli sledováni, zda nejeví známky zranění či nějaké další fyziologické změny.



Obr. 13: Fotografie zobrazující odběry vzorků racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) (převzato a upraveno z Jana Müllerová, diplomová práce, 2018).

3.1.2. Buněčná linie

Pro pomnožení SINV byly zvoleny dvě buněčné linie, savčí BHK-21 a komáří C6/36.

Buněčná linie BHK-21 (z angl. „*Baby Hamster Kidney*“) byla připravena v roce 1961 z ledvin pěti jednodenních mláďat křečků *Mesocricetus auratus* (Creative Biolabs, 2019). Tato linie vykazuje při infekci SINV cytopatický efekt během 12-16 hodin (Frolov a Schlesinger, 1994). Buňky byly po rozmrazení kultivovány v médiu D-MEM (*Biosera*) s přídatkem 10 % fetálního bovinního séra (BOFES) (*Biosera*), 1 % antibiotiky a antimykotiky (*Biosera*; penicilin, streptomycin a amphotericin B), 1 % L-glutaminem (*Biosera*) při 37°C, v atmosféře 5 % CO₂ a relativní vlhkosti 95 %. Pravidelné pasážování probíhalo pomocí metody suché trypsinizace. V tomto případě byly buňky pasážovány v poměru 1:5.

Buněčná linie C6/36 byla původně získána z larev komára *Aedes albopictus* v polovině 60. let. Vzhledem k vysoké citlivosti této linie vůči široké škále arbovirů dané absencí RNA interference, je hojně využívána k jejich izolaci (Walker a spol. 2014; Brackney a spol. 2010). Buňky byly kultivovány v médiu Leibovitz L15 (*Biosera*) v kombinaci s 20 % BOFES, 10 % tryptozofosfátovým bujónem (*Sigma-Aldrich*), 1 % antibiotiky a antimykotiky (*Biosera*; penicilin, streptomycin a amphotericin B) a 1 % L-glutaminem. Pasáže byly provedeny metodou suché trypsinizace za stejného poměru jako u buněčné linie BHK-21. Inkubace probíhala při 28°C, atmosféře 0,5 % a vlhkosti 95 %.

Pro metodu plakové titrace byla použita savčí buněčná linie PS, která byla původně získána z buněk prasečích ledvin. Kultivace probíhala v médiu Leibovitz L15 (*Biosera*) s přídatkem 3 % PTS (*Biosera*), 1 % antibiotik a antimykotik (*Biosera*; penicilin, streptomycin a amphotericin B) a 1 % L-glutaminu. Buňky byly inkubovány při teplotě 37°C, atmosféře 0,5 % a vlhkosti 95 %. Pasážování bylo provedeno opět metodou suché trypsinizace v poměru 1:10.

3.1.3. Bakterie *Escherichia coli*

E. coli je gramnegativní anaerobní bakterie tyčinkovitého tvaru pohybující se pomocí bičků. Nachází se u většiny teplotokrevných živočichů jako součást fyziologické mikroflóry tlustého střeva a distální části kyčelníku (Lee, 2009). Roste jak na tekutých, tak na pevných médiích s přídatkem agaru. V našem případě byly použity NEB5alpha kompetentní *E. coli*

kultivované v médiu LB (1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 1% NaCl (chlorid sodný), deionizovaná H₂O) (Elbing a Brent, 2019).

3.1.4. Viry

3.1.4.1. Virus Sindbis

Pro izolování pozitivní kontroly pro SINV byla použita zásobní suspenze získaná z mozkové tkáně v roce 1986. Tato virová suspenze byla skladována v lyofilizovaném stavu. Suspenze byla resuspendována ve 200 µl sterilního fosfátem pufovaného fyziologického roztoku (PBS).

3.1.4.2. Virus Inkoo

Pozitivní kontrola pro virus Inkoo ve formě cDNA byla laskavě poskytnuta profesorem Magnusem Evanderem (*Departments of Virology, University of Umeå, Sweden*).

3.1.4.3. Virus ptačí chřipky

Jako pozitivní kontrola pro virus ptačí chřipky byl použit patientský izolát sezónní chřipky kmene H3N2, který byl laskavě poskytnut MUDr. Martinou Havlíčkovou, CSc. a RNDr. Helenou Jiřincovou ze Státního zdravotního ústavu.

3.1.5. Primery a sondy

Všechny primery a sondy použité v rámci této diplomové práce jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. III).

Tab. III: Použité sady primerů a sondy.

Cílený rod/virus	Primer /sonda	Sekvence	Teplota nasedání [°C]	Zdroj
<i>Alphavirus</i>	α +	5'- GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIG G - 3'	59,5	Sanchez – Seco a spol., 2001
	α -	5' - KYTCYTCIGTRTTIGTICCIGG - 3'	61	Sanchez – Seco a spol., 2001
SINV	SINV- nsPIF	5'- GGTCCTACCACAGCGACGAT - 3'	60	Tingström a spol., 2016
	SINV- nsPIR	5' - TGATACTGGTGCTCGGAAAACA - 3'	60	Tingström a spol., 2016
AIV	F25	5'- AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTC G - 3'	60	Spackman, 2014
	R124	5' - TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG - 3'	60	Spackman, 2014
Plasmidové primery	M13F	5' - GTAAAACGACGGCCAG - 3'	51	TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)
	M13R	5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3'	51	TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)
AIV	F64 sonda	5' - [FAM]- TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA- [BHQ-1] - 3'		Spackman, 2014
SINV	SINV- nsP1 sonda	5' - [FAM]- TTGGACATAGGCAGCGCA-[BHQ- 1] - 3'		Tingström a spol., 2016

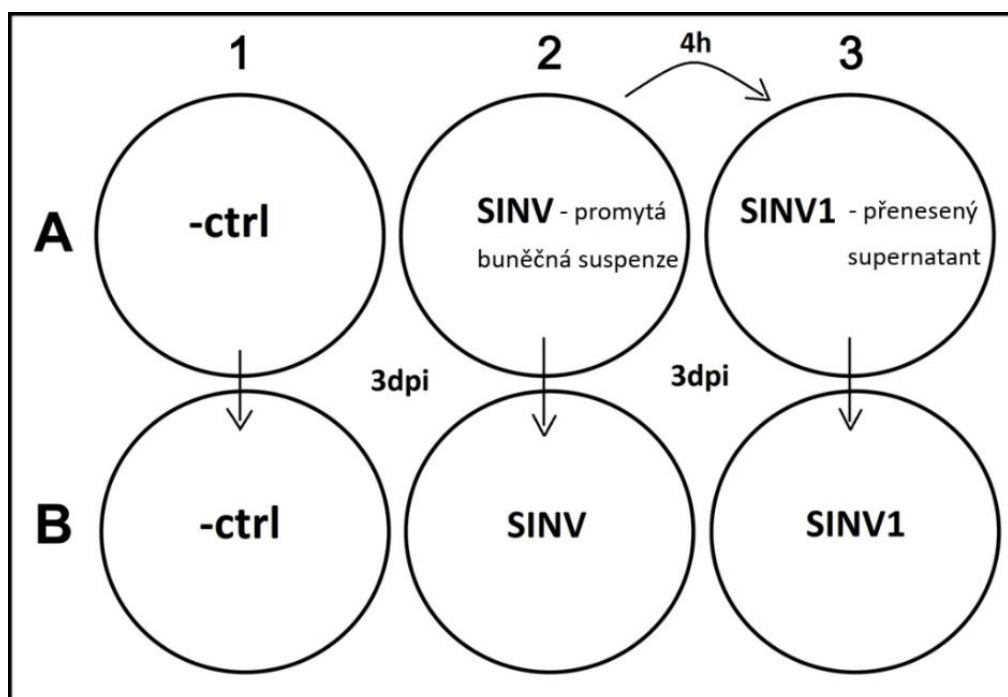
3.2. Metody

Práce s infekčním a potenciálně infekčním materiálem byla prováděna za dodržení specifických bezpečnostních podmínek.

3.2.1. Pozitivní kontrola viru Sindbis

3.2.1.1. Pomnožení viru pro pozitivní kontrolu

Vzhledem k celkovému malému množství suspenze byl jako další postup zvolen namnožení viru na buněčné linii. Byla vybrána savčí (BHK-21) a komáří (C6/36) buněčná linie. Pro naše účely byly použity 6-jamkové panely, pro každou linii jeden. Nejprve byly do jamek nasety buňky v množství $1,5 \times 10^6$ buněk na jamku. 24 hodin po nasetí byly buňky infikovány a následovala 4-hodinová inkubace. Poté byly buňky celkem dvakrát pasážovány v intervalu tří dnů vždy v poměru 1:2. Po každé pasáži byly buňky promyty roztokem PBS (*Biosera*). U buněk byl pod světelným mikroskopem sledován cytopatický efekt. Odebraná buněčná suspenze byla uchovávána v -80°C . Následná kontrola přítomnosti virové nukleové kyseliny byla provedena molekulárně biologickými metodami popsány níže v kapitole 3.2. Metody. Schéma pomnožení viru je na obrázku níže (Obr. 14).



Obr. 14: Schéma pomnožení viru Sindbis pro pozitivní kontrolu. -ctrl = negativní kontrola; 3dpi = 3 dny po infekci (z angl. „day per infection“).

3.2.1.2. Jednokroková reverzní transkripce (RT-PCR)

Metoda jednokrokové RT-PCR byla prováděna pomocí soupravy One-Step RT-PCR (Qiagen). Postupováno bylo dle pokynů výrobce. Metoda byla optimalizována na poloviční objem, tedy 25 μ l Master mixu na reakci. Objemové zastoupení jednotlivých reagensů je uvedeno v tabulce (Tab. IV). Tato metoda byla použita pro detekci virů rodu Alphavirus a specificky viru Sindbis (primery viz Tab III). Samotná amplifikace vzorku probíhala v přístroji Biometra Uno II za níže uvedených podmínek (Tab. V). Vzniklá cDNA byla dále uchovávána v -20°C .

Tab. IV: Reagencie pro přípravu 1 reakce Master Mixu metody jednokrokové RT-PCR.

Master Mix	Objem/reakce [μ l]	Finální koncentrace
H ₂ O prostá RNáz	11,6	-
Pufr 5x	5	2,5 mM Mg ²⁺
dNTP	1	400 μ M
Primer forward	1,2	0,6 μ M
Primer reverse	1,2	0,6 μ M
Směs enzymů	1	-
Templát (RNA)	4	-

Tab. V: Podmínky jednokrokové RT-PCR.

Počet cyklů	Reakce	Čas [min]	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]
	Reverzní transkripce	30	50
	Počáteční aktivace polymerázy a deaktivace reverzní transkriptázy	15	95
40x	Denaturace	00:45	94
	Nasedání primerů	00:45	Viz Tab. III
	Syntéza nového řetězce	1	72
	Finální syntéza	10	72

3.2.1.3. Separace na agarózovém gelu

Pro separaci PCR produktu byl zvolen 2 % agarózový gel v 1x TAE pufru. Do každé jamky bylo přidáno 10 µl směsi vzniklé ze 7 µl PCR produktu a 3 µl nanášecího pufru Orange DNA Loading Dye (*Thermo Fisher Scientific*) s 5x koncentrovaným barvivem SYBR GREEN I (*Sigma Aldrich*). K odhadu velikosti separovaných fragmentů byl použit velikostní standard GENERULER 1 kb (*Thermo Fisher Scientific*). Elektroforéza probíhala při 110 V po dobu 30 až 40 minut.

3.2.1.4. Purifikace produktu a příprava sekvenační reakce

Pro enzymatickou purifikaci byly vybrány PCR produkty, které podle výsledků elektroforézy odpovídaly očekávané velikosti. K tomuto produktu byly přidány 0,2 µl alkalické fosfatázy (*Thermo Fisher Scientific*) a 0,2 µl exonukleázy I (*Thermo Fisher Scientific*). Purifikační reakce probíhala v přístroji Biometra Uno II ve dvou krocích (Tab. VI). Následně byla připravena sekvenační reakce o celkovém objemu 10 µl (Tab. VII), pro každý primer zvlášť. Sekvence byla provedena firmou SEQme s.r.o., Dobříš, Česká republika.

Tab. VI: Podmínky pro purifikační reakci.

Reagencie	Čas [min]	Teplota [°C]
Inkubace	15	37
Deaktivace	15	80

Tab. VII: Reagencie pro přípravu sekvenační reakce.

Reagencie	Objem/reakce [µl]
H ₂ O prostá RNáz	8,5
Primer forward/reverse	0,5
Templát	1

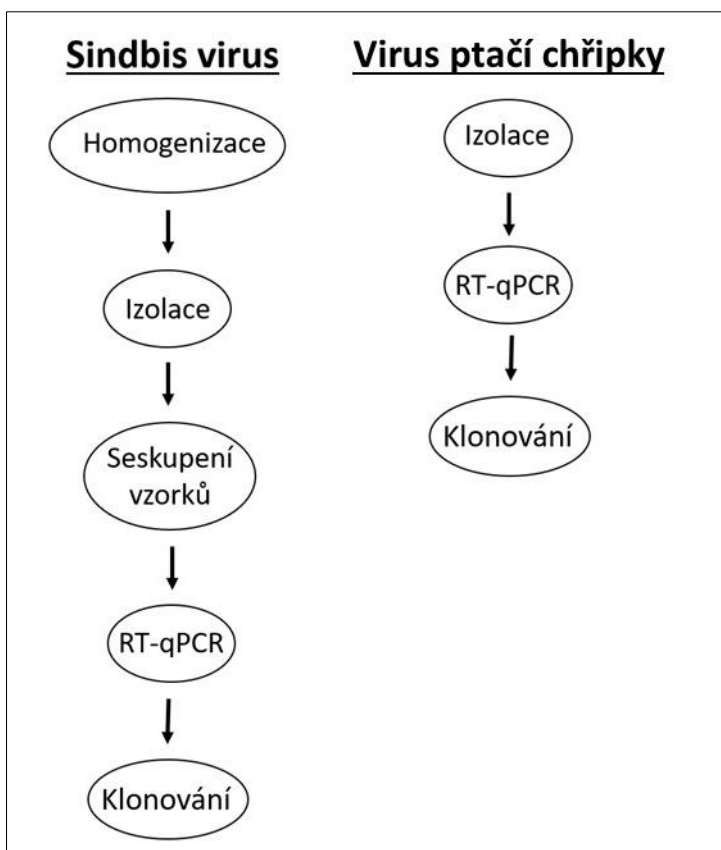
3.2.1.5. Plaková titrace

Ke zjištění titru SINV pomnoženého na buněčných liniích (BHK-21, C6/36) byla zvolena metoda plakové titrace (De Madrid a Porterfield, 1969). Pro tuto metodu byly použity 96-jamkové panely. Nejprve byly testované vzorky (20 µl) v panelu rozředěny desítkovou

ředící řadou ($10^{-1} - 10^{-8}$) ve 180 μ l kultivačního média Leibovitz L15 (+ 3 % PTS, 1 % ATB a 1 % GL). Poté bylo do jamek přidáno 130 μ l buněčné suspenze (buněčná linie PS), která byla připravena tak, aby v každé jamce bylo 5×10^4 buněk. Po jejich následné 4 hodinové inkubaci při 37°C v atmosféře 0,5 % CO₂ byly buňky překryty 100 μ l „pokrývky“ (roztok 3% karboxymethylcelulózy a 2x koncentrovaného kultivačního média v poměru 1:1) a opět uloženy k inkubaci v 37°C a 0,5 % atmosféře CO₂ na 5 dní. Panel byl následně promyt fyziologickým roztokem (9 g NaCl v 1 l destilované vody) a fixován a obarven roztokem naftalenové černi (1 g naftalenové černi, 60 ml ledové kyseliny octové a 13,6 g octanu sodného doplněné do 1 l destilovanou vodou). Nakonec byly panely opláchnuty pod tekoucí vodou a usušeny. Následně byly v jamkách odečteny plaky a po přepočtu podle ředění byl výsledek vyjádřen v plakotvorných jednotkách (PFU, z angl. „*plaque-forming units*“; počet virových částic) na ml původní suspenze. Jednotlivé vzorky byly testovány ve formě technických triplikátů.

3.2.2. Zpracování komářích a ptačích vzorků

Vzhledem k tomu, že některé z níže uvedených metod jsou společné pro oba detekované viry, zatímco jiné byly použity jen u jednoho z nich, bylo pro větší přehlednost vypracováno schéma (Obr. 15) znázorňující obecný postup pro jednotlivé viry.



Obr. 15: Schéma zobrazující jednotlivé kroky při detekci konkrétních virů.

3.2.2.1. Homogenizace vzorků komárů

Jednotlivé vzorky komárů byly nejprve rozděleny podle roku a místa nálezu. Poté byly připraveny homogenizační zkumavky (*Eppendorf*) s 1000 μ l sterilního PBS a sterilní ocelovou kuličkou o průměru 5 mm (*Qiagen*). Následně byli do zkumavek přidáni komáři o maximálním počtu 30 ks z jedné lokality. Celkově se tak jednalo o 312 směsných vzorků komárů. Homogenizace probíhala v předchlazených adaptérech po dobu 3 minut při rychlosti 30 kmitů/s v automatickém homogenizačním přístroji Tissue Lyser II (*Qiagen*). Takto zpracované vzorky byly uchovávány v -80°C .

3.2.2.2. Izolace RNA

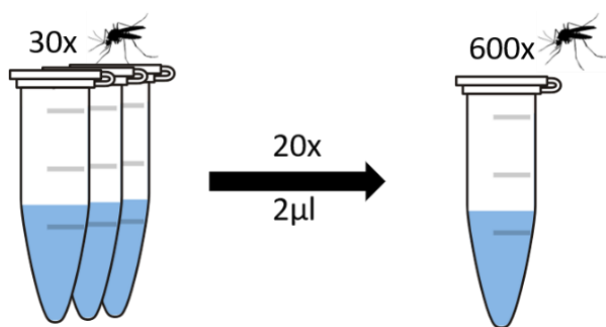
Pro extrakci RNA z homogenizovaných komářích vzorků, stěrů z oropharyngu a kloaky racků tříprstých byla použita souprava QIAamp® Viral RNA Mini kit (*Qiagen*). Postup probíhal dle pokynů výrobce až na jedinou výjimku, kdy eluce komářích vzorků byla provedena 40 μ l deionizované H_2O místo uvedeného pufru AVE. Pro zajištění vyššího výtěžku RNA byla zopakována eluce již vzniklým eluátem. RNA byla opět uskladněna v -80°C .

3.2.2.3. Kontrola kvality RNA

Ke kontrole kvality izolované RNA byla zvolena metoda elektroforetické separace na agarózovém gelu. Pro tyto účely byl použit 1 % agarózový gel v 1x TAE pufru, jehož příprava vyžadovala RNáz prostou deionizovanou H₂O. Směs 10 µl v jamkách byla tvořena 5 µl RNA a 5 µl nanášecího pufru Orange DNA Loading Dye (*Thermo Fisher Scientific*) s 5x koncentrovaným barvivem SYBER GREEN (*Sigma Aldrich*). Elektroforéza probíhala při 80 V po dobu 15 minut, přičemž během procesu separace byla elektroforetická nádoba chlazená ledem. Následná vizualizace gelů byla prováděna na UV transiluminátoru Biometra TI 3.

3.2.2.4. Příprava směsných vzorků RNA získaných ze vzorků komárů

Tento postup byl zvolen na základě publikace Tingström a spol. 2016, ve které připravovali směsné vzorky, tedy „*pooly*“ (z angl. *pooling* = smíchat) z homogenátů komářích vzorků. V každé zkumavce se po úvodní homogenizaci a následné izolaci RNA nacházelo RNA z maximálně 30 jedinců komárů. Z každé této zkumavky bylo odebráno po 2 µl a napipetováno do nové 0,5 ml zkumavky, vždy maximálně z 20ti zkumavek s izolovanou RNA. Výsledné pooly tak byly tvořeny RNA z maximálně 600 jedinců komára (Obr. 16). Tímto způsobem vzniklo 27 poolů, ze kterých byly vytvořeny alikvóty pro omezení degradace RNA opakovaným rozmrazováním. Vzorky byly dále uchovávány v -80°C a připraveny k analýze. Těchto 27 vzorků sloužilo pro detekci SINV.



Obr. 16: Schéma postupu seskupování RNA vzorků.

3.2.2.5. Kvantitativní jednokroková reverzní transkriptázová PCR (RT-qPCR)

Tato metoda sloužila pro testování jak komářích vzorků (detekce SINV), tak výtěrů z oropharyngu a kloaky racků tříprstých (detekce AIV). RT-qPCR byla provedena pomocí soupravy Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (*Thermo Fisher Scientific*).

Postupováno bylo přesně dle pokynů výrobce. Jednotlivé reagentie a jejich množství pro přípravu Master Mixu jsou uvedeny v tabulce (Tab. VIII). Použité primery spolu se sondami jsou již zmíněny v tabulce výše (Tab. III). Jednalo se o specifické primery a sondu pro SINV a primery a sondu pro AIV. Negativní kontroly (bez templátu a bez enzymu) byly stejně jako pozitivní kontrola vždy testovány v triplikátu, jednotlivé vzorky pak už jen v uniplikátu. Amplifikace byla provedena v přístroji QuantStudio 6 Fix (*Thermo Fisher Scientific*) podle podmínek uvedených v tabulce (Tab. IX). Celkový objem na jednu reakci činil 25 μ l.

Tab. VIII: Reagentie pro přípravu 1 reakce Master Mixu.

Master Mix	Objem/reakce [μ l] <u>SINV</u>	Objem/reakce [μ l] <u>AIV</u>	Finální koncentrace
2X RT-PCR Buffer	12,5	12,5	1x
Primer forward	2,5	0,5	400 nM
Primer reverse	2,5	0,5	400 nM
TaqMan® sonda	0,6	1	120 nM
H ₂ O prostá RNáz	0,9	4,5	-
25X RT-PCR Enzyme Mix	1	1	-
Templát (RNA)	5	5	-

Tab. IX: Čas a teplota pro RT-qPCR.

Počet cyklů	Reakce	Čas [min]	Teplota [°C]
	Reverzní transkripce	10	45
	Deaktivace reverzní transkriptázy a počáteční aktivace polymerázy	10	95
40x	Amplifikace	00:15	95
		00:45	60
Teplotní přechod mezi jednotlivými kroky			1,6°C/s

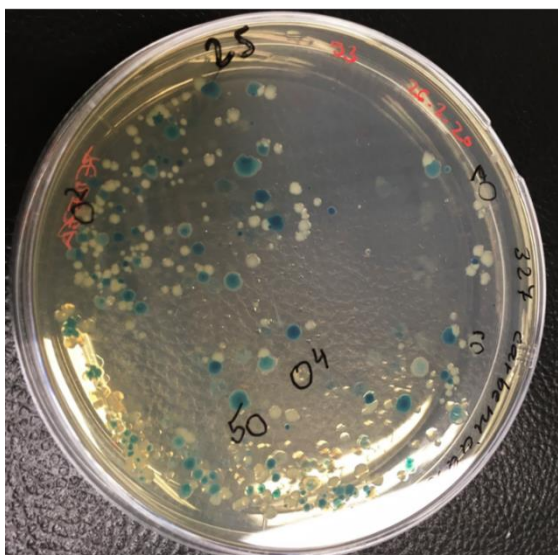
3.2.2.6. Klonování

Purifikační metoda

Suspektní PCR vzorky SINV a AIV byly nejprve přečištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*). Postupováno bylo dle návodu výrobce. Vzorky byly eluovány 30 μ l pufru EB („*Elution Buffer*“). Purifikovaná DNA byla dále elektroforeticky rozdělena a vizualizována na UV transiluminátoru (postup separace uveden výše).

Klonování a kultivace *E. coli*

Purifikovaná DNA suspektních vzorků byla následně vložena do pCR4 plazmidu. Metoda klonování byla provedena pomocí TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (*Thermo Fisher Scientific*). Opět bylo postupováno dle pokynů výrobce. Naklonovaný vektor byl poté vložen do buněk NEB5alpha kompetentních *E. coli* pomocí tepelného šoku (buňky byly po celou dobu drženy na ledu, následně zahřáty na 42°C po dobu 30 s a poté opět uloženy na led na 2 min). Po ochlazení bylo k buňkám přidáno 180 μ l SOC média (*Thermo Fisher Scientific*) (2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl (chlorid draselný), 10 mM MgCl₂ (chlorid hořečnatý), 10 mM MgSO₄ (síran hořečnatý), a 20 mM glukóza) temperovaného na 37°C. Takto ošetřené buňky s vloženým insertem byly následně inkubovány 1 h při 37°C. V dalším kroku byly buňky vysety na agarové plotny s carbenicilinem. Před samotným výsevem buněk bylo na každou plotnu přidáno 40 μ l X-Gal pro rozlišení prázdných plazmidů (modré kolonie) od těch s inzertem (bílé kolonie) (Obr. 17). Po 24 h inkubaci byly náhodně vybrané kolonie rozočkovány na nové plotny a přeneseny do LB média. Zkumavky se vzorky v LB médiu byly uloženy do třepačky GallenKamp, ve které se „třepaly“ do druhého dne na 200 rpm při 37°C.



Obr. 17: Fotografie agarové plotny s bakteriálními klony rozlišenými pomocí „blue/white“ selekce za použití X-Gal. 1-5 = náhodně vybrané klony pro izolaci plasmidu.

Izolace plasmidové DNA

Následně byla z vybraných klonů vyzolována plasmidová DNA. Nejprve byly vzorky z třepačky centrifugovány na maximální otáčky (9000 x g) 5 min při pokojové teplotě. Supernatant byl slit do odpadu a vzniklý pelet byl pomocí vortexu resuspendován v 1 ml ledově vychlazeného Roztoku I (složení Roztoků I-III viz níže Tab. X). K suspenzi byly dále přidány 2 ml Roztoku II a opatrným otáčením zkumavek došlo k promíchání. Ke vzniklému lyzátu se poté přidalo 1,5 ml ledově vychlazeného Roztoku III a zkumavky byly opět opatrně promíchány. Následovala centrifugace při maximálních otáčkách (9000 x g) 30 minut při 4°C. Supernatant byl ponechán a doplněn 1,5 objemem isopropanolu, aby došlo k precipitaci plasmidové DNA. Poté byly vzorky opatrně promíchány a opět centrifugovány za stejných podmínek. Vzniklý supernatant byl slit do odpadu a pelet byl promyt 2 ml ledově vychlazeného 70% roztoku ethanolu. Po evaporaci ethanolu byla plasmidová DNA resuspendována v 100 µl H₂O a uložena v -20°C. Během celé izolace byly zkumavky se vzorky uchovávány na ledu.

Tab. X: Složení Roztoků I-III použitých pro izolaci plasmidové DNA.

Roztok I (pH 8,0)	10 ml 500 mM glukózy, 2 ml 500 mM EDTA (pH 8,0), 2,5 ml 1 M Tris (pH 8,0), 85,5 ml H ₂ O
Roztok II	Čerstvě připravený 0,2 N NaOH, 1 % SDS
Roztok III (pH 6,0)	60 ml 5 M octanu draselného, 11,5 ml ledového acetátu, 28,5 ml H ₂ O

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vyizolovaná plasmidová DNA byla amplifikována metodou PCR za použití plasmidových primerů M13 (viz Tab. III). Jednotlivé reagensie (Tab. XI) a podmínky metody (Tab. XII) jsou uvedeny níže. Poté byly DNA produkty elektroforeticky separovány, vizualizovány, purifikovány a zaslány na sekvenaci (tyto metody jsou již popsány výše).

Tab. XI: Reagensie Mastermixu.

Master Mix	Objem/reakce [μ l]	Finální koncentrace
H ₂ O prostá RNáz	9,5	-
PPP Mastermix	12,5	-
Primer forward	1	400 nM
Primer reverse	1	400 nM
Templát	1	-

Tab. XII: Podmínky PCR reakce.

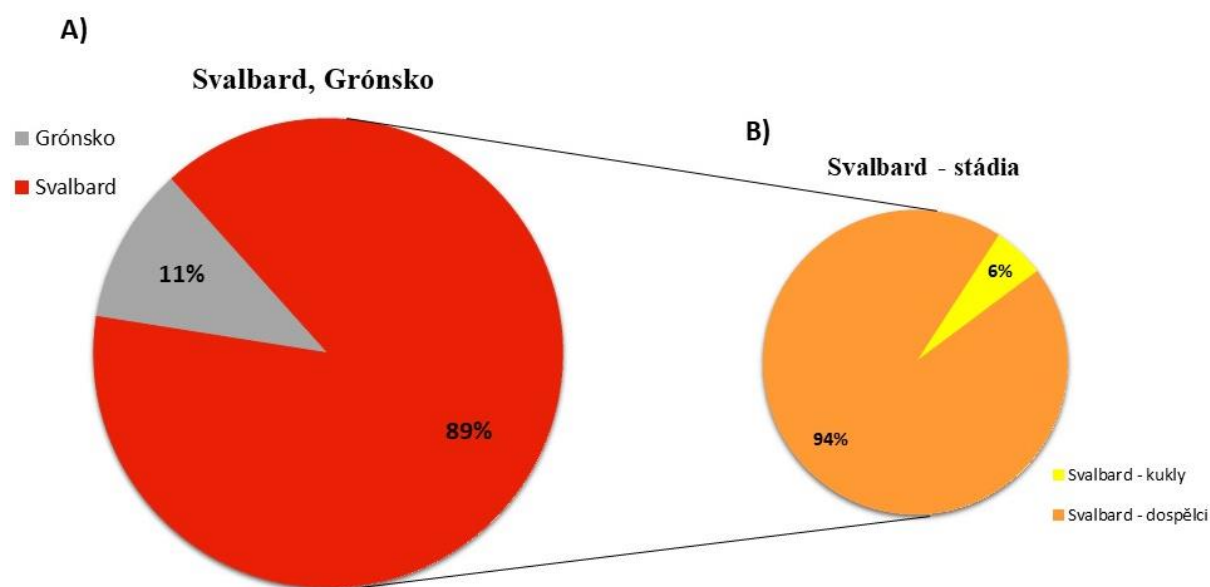
Počet cyklů	Reakce	Čas [min]	Teplota [°C]
	Úvodní denaturace	10	94
40x	Denaturace	00:15	94
	Nasedání primerů	00:30	Viz Tab. III
	Syntéza nového řetězce	1	72
	Finální syntéza	10	72

4. Výsledky

4.1. Arboviry

4.1.1. Sběr vzorků komárů

Z celkového počtu 7769 odchycených komárů *Ochlerotatus nigripes* mezi lety 2013-2018 jich bylo 6924 sesbíráno v okolí místa Petuniabukta na Svalbardu a 845 v oblasti Kangerslussuaq v Grónsku (Obr. 18A). Celkový počet 6924 jedinců odchycených na Svalbardu tvořilo 390 kulek a 6534 dospělých jedinců (Obr. 18B). V Grónsku byly sesbírány pouze dospělí jedinci.



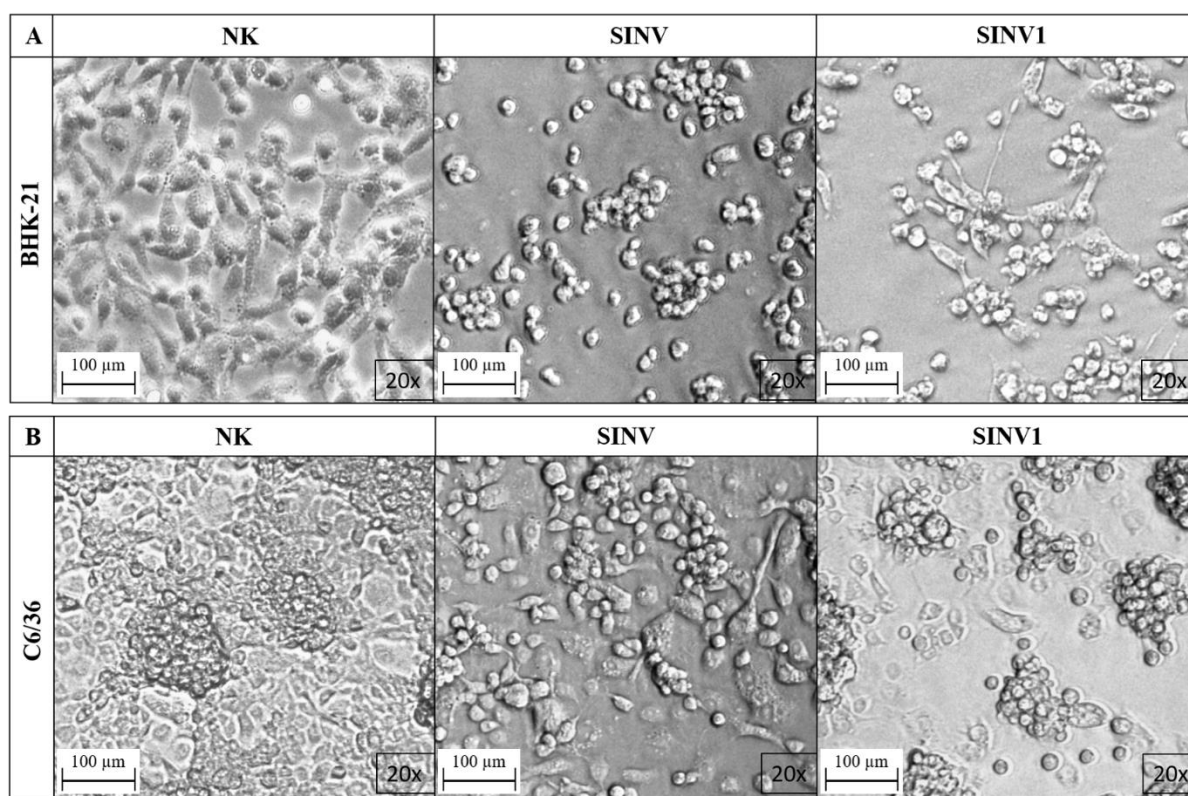
Obr. 18: (A): Zastoupení testovaných vzorků komára *Ochlerotatus nigripes* podle místa sběru (Svalbard a Grónsko); (B): Podíl kulek a dospělců komára *Ochlerotatus nigripes* sesbíraných na Svalbardu.

4.1.2. SINV

4.1.2.1. Pozitivní kontrola SINV

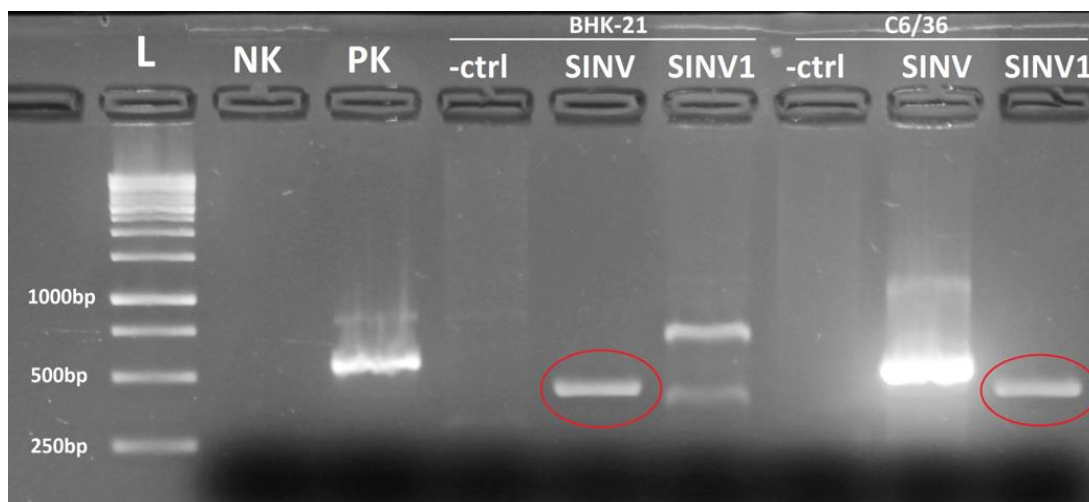
Jako pozitivní kontrola pro testování vzorků na přítomnost SINV byla použita virová suspenze ze sbírky arbovirů Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR (<https://www.arboviruscollection.cz/>), konkrétně se jednalo o izolát BCCO 50_0149 z roku 1986. Virus byl pomnožen na dvou buněčných liniích – savčí (BHK-21) a komáří (C6/36).

Z obrázku Obr.19A je u savčí buněčné linie BHK-21 zřetelný cytopatický efekt v infikovaných jamkách (SINV, SINV1) ve srovnání s kontrolní jamkou (NK), ve které docházelo pouze k výměně čerstvého média. Naproti tomu u komáří buněčné linie C6/36 (Obr. 19B) cytopatický efekt pozorován nebyl. Nicméně lze pozorovat sníženou vitalitu a rychlost množení buněk ve srovnání s kontrolní jamkou (NK).



Obr. 19: Pomnožení viru na buněčných liniích BHK-21 a C6/36 3.den po infekci. (A): savčí buněčná linie BHK-21; **(B):** komáří buněčná linie C6/36. Celkové zvětšení 20x, měřítko odpovídá 100 µm. (NK = negativní kontrola; SINV = promytá buněčná suspenze; SINV1 = přenesený supernatant).

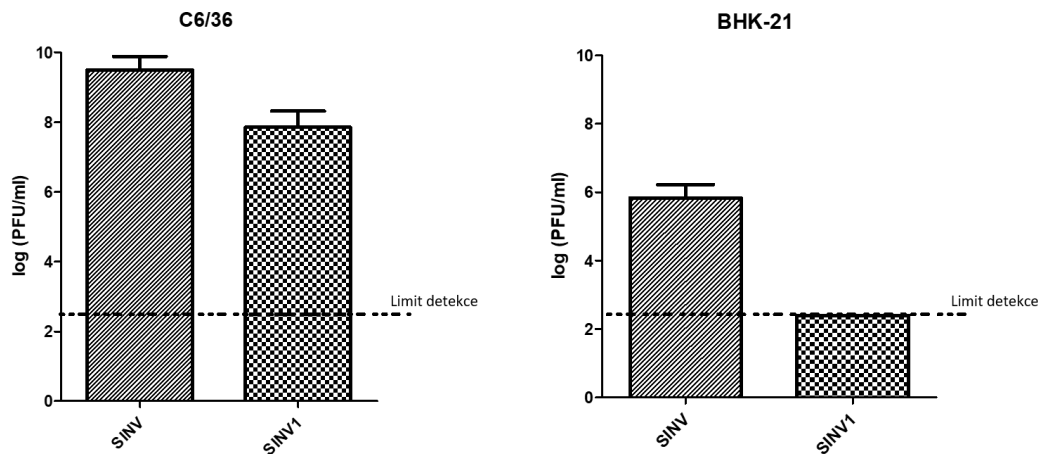
Virová RNA byla následně izolována pomocí kolonkového kitu (QIAamp® Viral RNA Mini kit (*Qiagen*)) a amplifikována metodou jednokrokové RT-PCR za použití primerů pro rod *Alphavirus*. Dále byly PCR produkty elektroforeticky rozděleny a vizualizovány pomocí UV transiluminátoru s očekávanou velikostí ampliconu 490 bází (bp) (postup popsán v kapitole 3.2. Metody) (Obr. 20).



Obr. 20: Fotografie gelu s vizualizovanou DNA v očekávané velikosti 490 bp. L = velikostní standard; NK = negativní kontrola bez templátu; PK = pozitivní kontrola (zásobní suspenze SINV); -ctrl = negativní kontrola pomnožené RNA (neinfikované buňky).

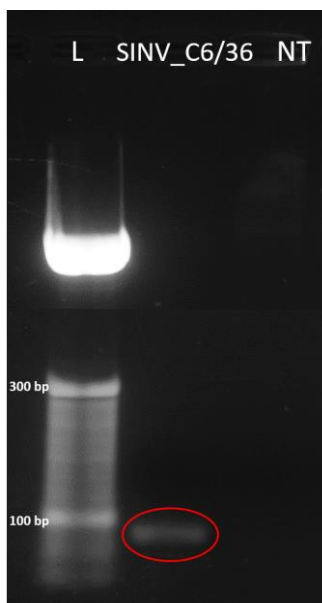
Červeně značené vzorky (SINV_BHK-21 a SINV1_C6/36) byly zaslány na sekvenaci. Pomocí BLAST analýzy (z angl. „*Basic Local Alignment Search Tool*“) výsledků sekvenace bylo potvrzeno, že se jedná o SINV, 99,33 % identického s kmenem LEIV-Ast03-1-844 (GenBank: MG679378.1).

Množství replikujících se virových částic v suspenzi z BHK-21 i C6/36 buněčných linií bylo stanoveno metodou plakové titrace. Z grafů (Obr. 21) vyplývá, že virus se rychleji a do vyšších titrů pomnožil na komáří buněčné linii (C6/36) v porovnání se savčí linií (BHK-21). 3 dny po infekci dosahoval titr viru u C6/36 hodnoty 10^9 PFU/ml, zatímco u BHK-21 se jednalo o 10^6 PFU/ml. Vzhledem k limitu detekce je také vidět, že u linie BHK-21 došlo k adherenci téměř všech virových částic a přenesený supernatant (SINV1) vykazoval žádný nebo jen velmi nízký počet replikace schopných virových částic. U linie C6/36 naopak přenesený supernatant (SINV1) obsahoval dostatek virových částic, které nenaadherovaly k buňkám během inkubace (SINV) a byly tak schopné další replikace po přenosu supernatantu. Ze sloupců grafu vyplývá, že rozdíl mezi SINV a SINV1 je přibližně 2 logaritmy.



Obr. 21: Grafy zobrazující a porovnávající množství viru pomnoženého na savčí (BHK-21) a komáří (C6/36) buněčné linii. SINV = promytá buněčná suspenze; SINV1 = přenesený supernatant.

Izolovaná RNA vzorku SINV_C6/36 byla dále amplifikována jedнокrokovou RT-PCR se specifickými primery pro SINV, pro něž byla optimalizována počáteční koncentrace na 1 μ M na reakci. DNA produkt byl opět elektroforeticky rozdělen a vizualizován v očekávané velikosti ampliconu 75 bp (Obr. 22). Vzorek SINV_C6/36 potom nadále sloužil jako pozitivní kontrola pro detekci SINV ve vzorcích komárů *Oc. nigripes*.



Obr. 22: Fotografie gelu s vizualizovanou pozitivní kontrolou v očekávané velikosti 75 bp. L = velikostní standard; SINV_C6/36 = vzorek pozitivní kontroly; NT = negativní kontrola bez templátu.

Na základě určení množství titru viru pomocí metody plakové titrace byl vzorek pozitivní kontroly naředěn desítkovou ředící řadou $1:10^0 - 1:10^{12}$. Tato řada byla použita jako kalibrační křivka pro RT-qPCR (Obr. 23) využívanou k detekci viru ve vzorcích komárů.

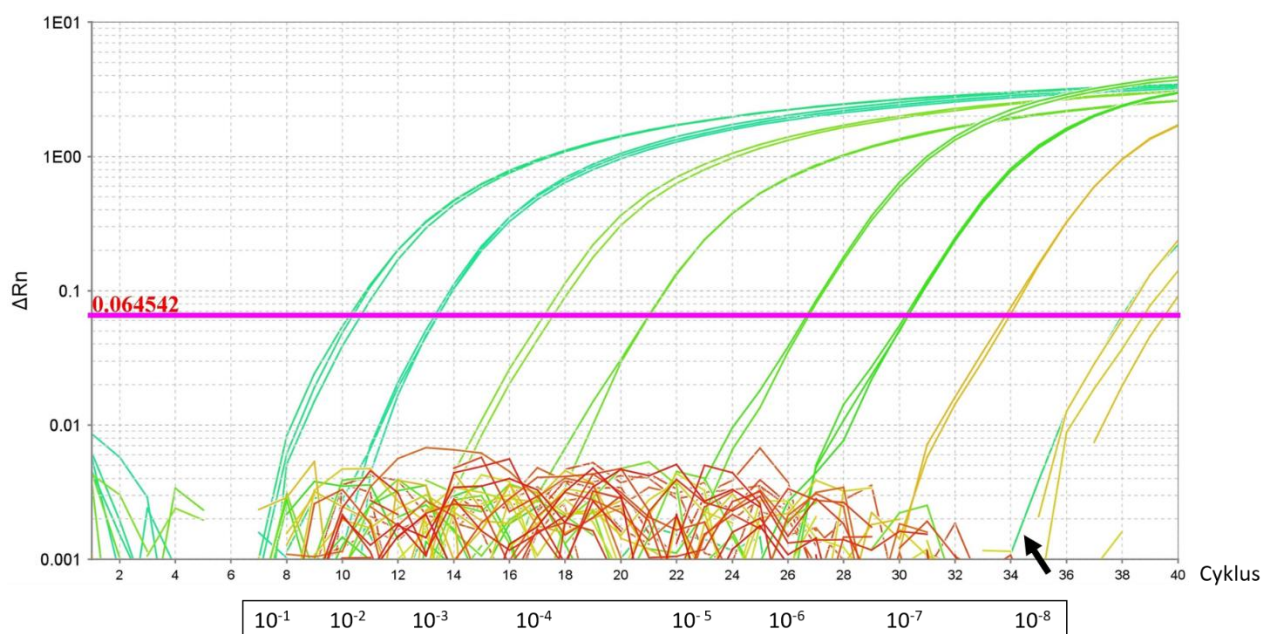
4.1.2.2. Detekce SINV ve vzorcích komárů

Vyizolovaná RNA z komářích homogenátů byla poolována tak, že každý výsledný směsný vzorek obsahoval RNA maximálně 600 jedinců. Celkem tak vzniklo 27 vzorků (Tab. XIII). Tyto vzorky byly testovány na přítomnost SINV.

Tab. XIII: Počty směsných vzorků RNA z komárů *Oc. nigripes*.

	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Svalbard	1	8	5	3	1	1
Grónsko	5	0	3	0	0	0

Takto poolované vzorky byly amplifikovány metodou RT-qPCR za použití specifických primerů pro SINV a specifické FAM (Fluorescein) sondy (Obr. 23).

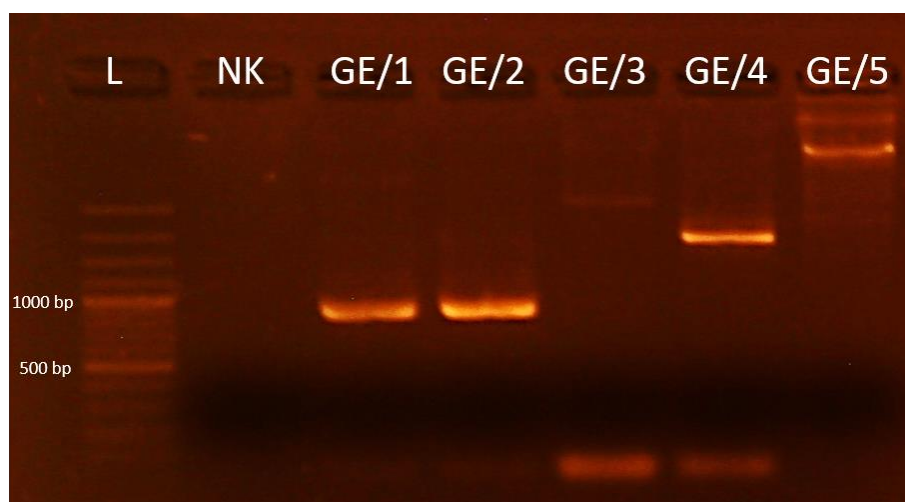


Obr. 23: Amplifikační graf ředící řady pozitivní kontroly SINV spolu s 27 směsnými vzorky. 10^{-x} = ředění; \blackleftarrow = pozitivní vzorek; --- = prahová úroveň; osa x = cyklus; osa y = změna fluorescence.

Z obrázku (Obr. 23) vyplývá, že limitní ředění pozitivní kontroly pro SINV je přibližně 10^{-8} , což odpovídá $1,75 \cdot 10^8$ počtu virových částic. Z celkem 27 testovaných vzorků vyšel jediný vzorek, vzorek číslo 3, pozitivně, přibližně v hodnotě limitního ředění 10^{-8} kalibrační křivky pozitivní kontroly. Jednalo se o vzorek z Grónska odebraný v lokalitě East Pond. Nicméně při opakovaném pokusu totožnou metodou se již pozitivní nález nepotvrdil. Následovalo testování RNA původních směsných vzorků, které byly poté zpoolovány v daný suspektně pozitivní vzorek 3. Nejprve byly směsné vzorky testovány opět metodou RT-qPCR a dále pak konvenční PCR za použití specifických primerů pro SINV. V obou případech nedošlo k potvrzení pozitivního vzorku.

Suspektně pozitivní vzorek jsme se následně pokusili osekvenovat pomocí primerů specifických pro rod *Alfavirus*, použitých dříve pro sekvenování pozitivní kontroly. Výsledky sekvenace opět nepotvrdily pozitivní nález.

Abychom mohli s jistotou označit vzorek za pozitivní na genomickou RNA SINV a kvůli malé velikosti PCR produktu amplifikovaného metodou RT-qPCR bylo nutné tento produkt zaklonovat, aby mohl být osekvenován. PCR produkt byl vložen do plazmidu pCR4. Amplifikace vyizolovaného plazmidu z 5 náhodně vybraných klonů proběhla za použití primerů specifických pro M13 sekvenační místo v plazmidu pCR4 *E. coli*, ovšem pomnožený produkt vizualizovaný na gelu neodpovídal ani v jednom případě očekávané velikosti cca 300 bp (Obr. 24).



Obr. 24: Fotografie gelu PCR produktu z plazmidu. L = velikostní standard; NK = negativní kontrola; GE/X = klony vzorku 3.

4.2. Virus chřipky

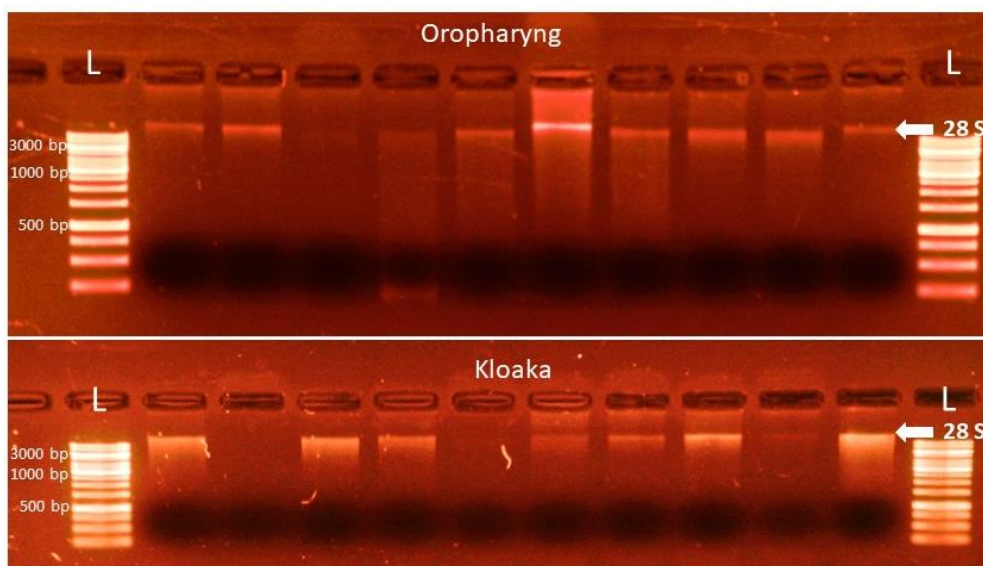
V roce 2014 bylo odebráno celkem 100 stěrů z kloaky a 100 stěrů z oropharyngu jedincům z kolonie racka tříprstého (*Rissa tridactyla*) čítající celkem 700 hnízdících párů v osadě Pyramiden na Svalbardu. Všechny odebrané vzorky byly testovány metodou RT-qPCR na přítomnost RNA AIV.

4.2.1. Pozitivní kontrola AIV

Zásobní suspenze pozitivní kontroly kmene H3N2 byla naředěna desítkovou ředící řadou 1:10⁰ – 1:10¹¹. Následně proběhla amplifikace pomocí RT-qPCR za použití primerů a sondy specifických pro AIV. Detekční limit metody odpovídal ředění pozitivní kontroly AIV 10⁻⁵ (Obr. 26).

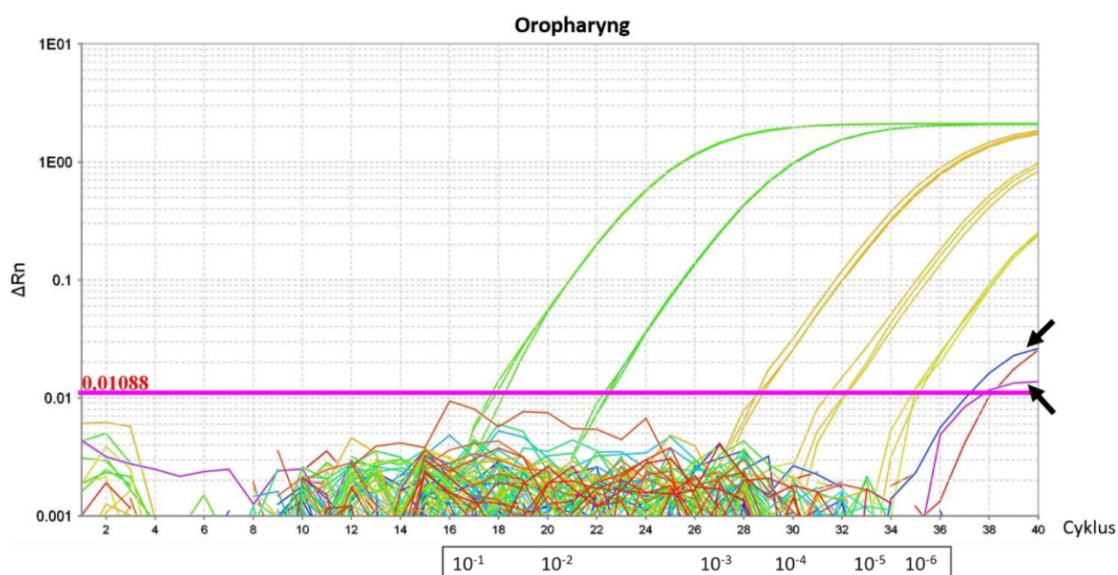
4.2.2. Detekce AIV ve stěrech z kloaky a oropharyngu

Po izolaci RNA byly pro jednotlivé vzorky vytvořeny alikvóty, aby nedocházelo k opakovanému rozmrazování a tím snižování kvality testované RNA. Poté byla u 10 náhodně vybraných vzorků z kloaky a oropharyngu testována kvalita vyizolované RNA, která byla poměrně variabilní (Obr. 25). Velikost vizualizovaného produktu odpovídala velikosti velké ribosomální podjednotky molekuly RNA (28 S) o přibližné velikosti 3800 bp.

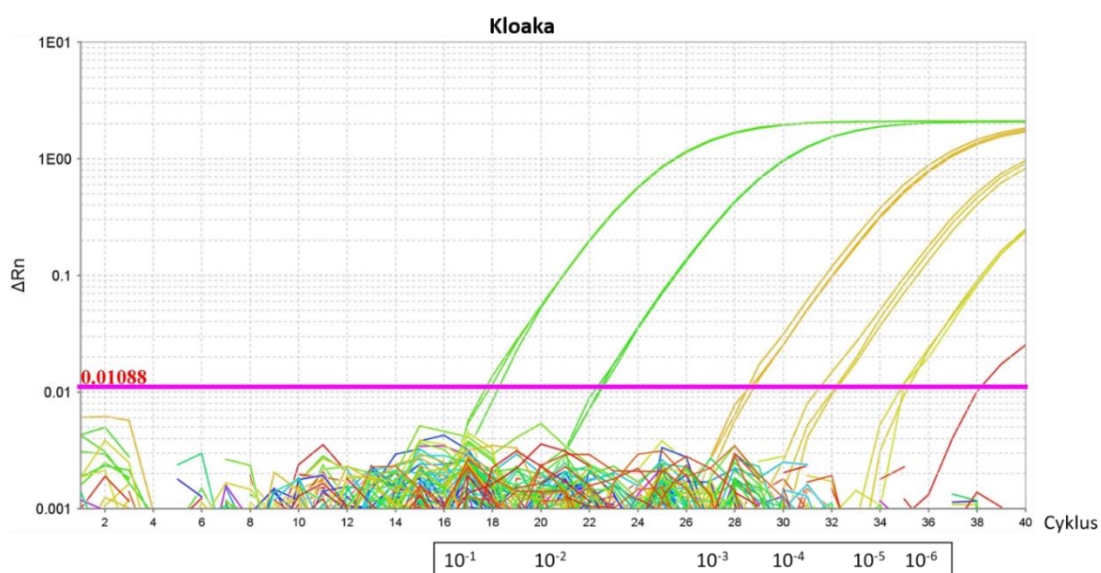


Obr. 25: Kontrola kvality izolované RNA ze stěrů z oropharyngu a kloaky. L = velikostní standard; 28 S = velká ribosomální podjednotka ~ 3800 bp.

Následně proběhla amplifikace RNA pomocí metody RT-qPCR za použití specifických AIV primerů a FAM sondy (Obr. 26, 27). V prvním grafu (Obr. 26) jsou patrné 2 pozitivní vzorky (číslo 85, 93). Nicméně při jejich reamplifikaci totožnou metodou se ani jeden z nich nepodařilo znovu potvrdit. Výsledky ze stěrů z kloaky pro detekci virové RNA byly u všech vzorků negativní (Obr. 27).

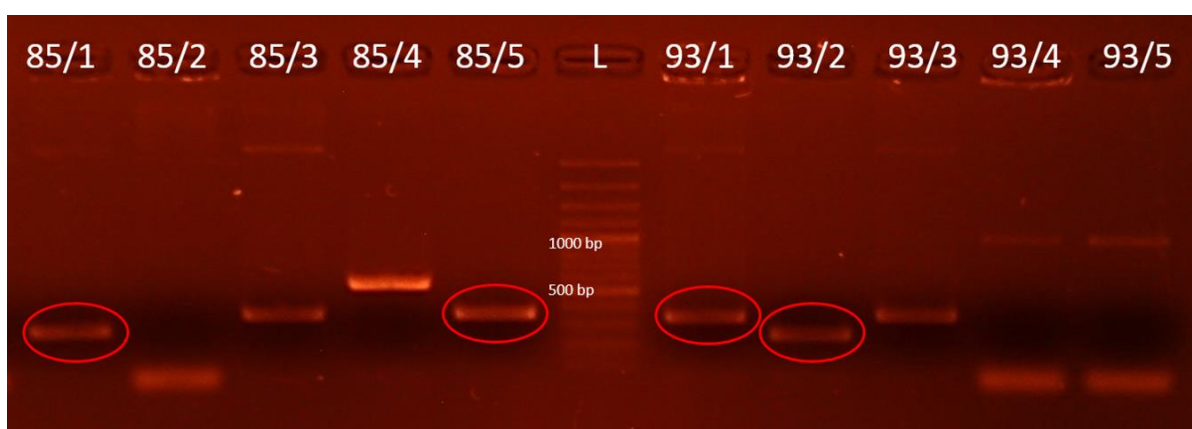


Obr. 26: Amplifikační graf ředící řady pozitivní kontroly AIV a RNA vzorků z oropharyngu. 10^{-x} = ředění; ← = pozitivní vzorek; — = prahová úroveň; osa x = cyklus; osa y = změna fluorescence.



Obr. 27: Amplifikační graf ředící řady pozitivní kontroly AIV a RNA vzorků z kloaky. 10^{-x} = pozitivní kontrola; — = prahová úroveň; osa x = cyklus; osa y = změna fluorescence.

PCR produkt 2 suspektně pozitivních vzorků (85, 93) byl stejně jako u SINV (viz kapitola výše 4.1.2.2. Detekce SINV ve vzorcích komárů) zaklonován do pCR4 plazmidu, aby mohl být s určitostí potvrzen pozitivní nález RNA AIV. Po izolaci plazmidu z 5 náhodně vybraných klonů a následné PCR amplifikaci pomocí M13 primerů byly amplikony elektroforeticky rozděleny a vizualizovány. PCR produktu v očekávané velikosti cca 300 bp odpovídaly u vzorku 85 celkem tři klony (85/1, 3, 5) a u vzorku 93 byly taktéž tři (93/1, 2, 3). Amplikony, které byly přečištěny a zaslány na sekvenaci jsou na obrázku (Obr. 28) vyznačeny červeně. Pomocí BLAST analýzy byla porovnána homologie výsledné sekvence, která však ani v jednom případě neodpovídala žádné sekvenci AIV.



Obr. 28: Fotografie gelu s vizualizovanou DNA v očekávané velikosti 300 bp. L = velikostní standard (marker).

5. Diskuze

5.1. Arboviry

Arboviry jsou velice různorodou skupinou virů, která je převážně tvořena RNA viry. Tento fakt umožňuje arbovirům výraznou plasticitu. Odhaduje se, že míra chybovosti RNA-dependentní RNA-polymerázy (RdRp) se pohybuje od 10^{-3} do 10^{-5} chyb na nukleotid v rámci jednoho replikačního cyklu. Tato míra chybovosti spolu s rychlou a velmi vyvinutou virovou replikací umožňuje rychlou adaptaci a produkci variant, které mohou arboviry zvýhodňovat v různých hostitelských prostředích (Ciota a Kramer, 2010). Nedávné epidemie způsobené arboviry i v původně neendemických oblastech jejich výskytu prokazují potenciál těchto virů adaptovat se a rozšířit jejich rozsah. Nejvíce je distribuce arbovirů ovlivněna změnami klimatu a krajiny (Ciota a Kramer, 2010; Tingström a spol., 2016). Především teplota a vlhkost významně ovlivňují postupné rozšiřování arbovirů do stále vyšších zeměpisných šířek. Změny klimatu se odráží také na rázu okolní krajiny a její fauny a flóry. Potencionální přenašeči i hostitelé se tak objevují i v polárních oblastech, kde je většina tamních populací potenciálních hostitelů imunitně naivní. Spolu s klimatem a krajinou k dalšímu rozšiřování přispívá migrace lidí, rozvoj cestovního ruchu a socioekonomické poměry či zavlékání invazních hostitelských druhů (Ciota a Kramer, 2010; Müllerová a spol., 2018; Waits a spol., 2018).

Ačkoli studie zabývající se výskytem arbovirů v námi sledovaných oblastech Grónska a Svalbardu zatím nepotvrdily žádný pozitivní nález komáry či klíšťaty přenášených arbovirů, vzhledem k výše uvedeným změnám v těchto oblastech je nutné je stále sledovat (Elsterová a spol., 2015; Müllerová, 2018; Müllerová a spol., 2018). Doposud nejvyšší zeměpisná šířka, ve které byly arboviry detekovány je 70° severní šířky (Kurstak, 2012). Důvodů dosud negativních nálezů může být hned několik. V porovnání s ostatními lokalitami výskytu arbovirů je na Svalbardu a v Grónsku nízká druhová diverzita i abundance potenciálních hostitelů, čímž se snižuje možnost šíření viru (Arneberg, 2009; Bennike a spol., 1989). Další příčinou může být kompetence tamních vektorů pro přenos arbovirů. Obecně jsou arboviry v polárních oblastech přenášeny především klíšťaty rodu *Ixodes* a komáry rodu *Culex* a *Aedes*. V námi sledovaných oblastech se vyskytuje pouze klíště *I. uriae* a z komárů žije na Svalbardu jako jediný druh *Oc. nigripes* a v Grónsku navíc i *Oc. impiger*. Zejména u *Oc. nigripes* není kompetence k přenosu arbovirů dostatečně prostudována (Becker a spol., 2010; Corbet a Danks, 1973). I u virů, které byly v polárních oblastech nalezeny je obecně velice nízká prevalence, což může představovat další důvod, proč doposud nebyl zaznamenán pozitivní

záchyt v námi sledovaných oblastech. Například u komářích jedinců rodu *Aedes* nachytaných v oblasti Severozápadních teritorií v Kanadě byly detekovány viry CE a Northway (NORV) s prevalencí 1:3 662 (McLean a spol., 1977). V oblasti Bajkalu v Rusku byla zjištěna prevalence virů Batai (BATV) a Getah (GETV) 1:24 000 (L'vov a spol., 1995). V neposlední řadě je třeba zmínit extrémní klimatické podmínky, se kterými se musí vypořádat jak hostitel, tak vektor, ale i samotný patogen. Nepříznivé klima tak může představovat další z důvodů negativních výsledků. Teplotní citlivost při pomnožení viru v komářím přenašeči je poměrně vysoká, avšak byla prokázána replikace NORV při 4°C u arktického komára rodu *Aedes* (Hueffer a spol., 2011; McLean a spol., 1979; Ring a Tesar, 1981).

5.1.1. Virus Sindbis a další výzkum

Konkrétním arbovirem, jehož přítomnost byla v této práci testována, je SINV. Jedná se o virus rozšířený téměř po celém světě vyjma amerického kontinentu (Adouchief a spol., 2016). Jeho nedávný záchyt v larvách komárů *Oc. communis*, *Oc. punctor* a *Oc. diantaeus* v původně neendemické oblasti Švédska okolo 64° severní šířky tak naznačuje jeho šíření do stále vyšších zeměpisných šířek (Tingström a spol., 2016). Studie Tingström a spol., 2016 dále indikuje vertikální přenos tohoto arboviru. V naší práci se nám však nepodařilo potvrdit přítomnost tohoto viru v polárních oblastech Svalbardu a Grónska. Jedním z problémů může být nedostatek informací o druhu komára *Oc. nigripes* a především o kompetenci tohoto komára virus přenášet. Jak je již zmíněno výše, překážkou pro přenos viru může být i nepříznivé okolní klima. Jestli je možný přenos SINV pomocí vektora *Oc. nigripes* v extrémních teplotách by se mohlo do budoucna otestovat v laboratorních podmínkách. Bylo by nutné přivést kukly, případně larvy tohoto druhu komára a nechat je vyvinout do stádia dospělého jedince. Poté infikovat dospělé SINV a vytvořit okolní podmínky s postupně se snižující teplotou simulující okolní klima námi vybraných oblastí. Výsledky by mohly objasnit, zda je *Oc. nigripes* vůbec kompetentním vektorem SINV, či zda je limitujícím faktorem pro přenos a přežití viru v těchto lokalitách teplota. Zároveň by se mohl potvrdit transovariální přenos indikovaný ve studii Tingström a spol., 2016. Studie McLean a spol., 1977 popisuje obdobný způsob infikování komárů rodu *Aedes*, nachytaných v oblasti arktické Kanady, virem kalifornské encefalitidy.

Zejména ve Skandinávii a Karelské oblasti Ruska je SINV původcem řady onemocnění a lidé v těchto státech vykazují poměrně vysokou seroprevalenci (Nielsen a spol., 2001). Ve Finsku je nejčastěji diagnostikovanou arbovirovou infekcí a to s prevalencí

protilátek 5,2 %. Oblasti s nejvyšší seroprevalencí leží na východě země (Severní Karélie a Kainuu), ale také na západě Finska v oblasti centrální Ostrobothnii (Kurkela a spol., 2008). Dle seroepidemiologické studie získané v 80. letech 20. století byla v centrální části Švédska seroprevalence 3,6 % s klesajícím trendem směrem na jih a sever země. Ve dvou nejsevernějších krajích Švédska (Norrbotten a Väster-botten) byla zjištěna prevalence protilátek proti SINV pouze 0,1 – 1,0 %. Nicméně klinická studie z roku 2009 zabývající se prevalencí protilátek proti SINV v těchto dvou švédských oblastech došla k výsledné seroprevalenci 2,9 %. To naznačuje neustále se zvyšující seroprevalenci v těchto polárních oblastech (Norrbotten leží již v oblasti za polárním kruhem). Do severní Evropy byl tento arbovirus ve větší míře zavlečen pravděpodobně migrujícím ptactvem na přelomu 60. a 70. let 20. století. Stejně jako ve Švédsku je rostoucí trend seroprevalence zaznamenán i ve Finsku (Ahlm a spol., 2014; Gylfe a spol., 2018).

Kromě SINV cirkuluje v oblastech Skandinávie a Ruska další komáry přenášený arbovirus, a to INKV (*Peribunyaviridae*). Zvláště ve Finsku je prevalence protilátek proti tomuto viru až 51% a ve Švédsku 41% (Lwande a spol., 2017; Putkuri a spol., 2007). Jeho pozitivní záchyt v cca 64°C severní šířky v původně neendemické oblasti Švédska popsany v práci Tingström a spol., 2016 tak naznačuje možnost jeho zavlečení i do vyšších zeměpisných šířek. Proto by v budoucnu bylo dobré provést testování komárů *Oc. nigripes* také na přítomnost tohoto viru.

5.1.2. Sběr a testování vzorků komárů

Cílem první části práce bylo otestovat cca 8000 komářích vzorků ze Svalbardu a Grónska nasbíraných v rozmezí let 2013 až 2018 na přítomnost SINV pomocí metody RT-qPCR. Odchyt komárů smýkáací metodou probíhal vždy během letních měsíců. V těchto polárních oblastech je efektivita odchytů silně závislá na aktuálních klimatických podmínkách. Především se jedná o povětrnostní podmínky a okolní teplotu. Proto se počty komárů pro jednotlivé roky liší.

Po sběru byli jednotliví komáři uloženi do roztoku RNAlater, který zabraňuje degradaci RNA a dle dostupných možností uchovávání v chladu. Až po jejich transportu do České republiky byli uloženi do -80°C. Na základě předchozího výzkumu (Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy, Müllerová Jana, 2018) byly všechny komářích vzorky určeny jako druh *Oc. nigripes*. Ve vyšetřovaných vzorcích se nám ale ani v jednom případě nepodařilo opakovaně detekovat přítomnost SINV. Příčinou může být

uchovávání vzorků v nedokonalých podmínkách a dále také transport na dlouhou vzdálenost a časová prodleva mezi sběrem a testováním daných vzorků. Kvalita vyizolované RNA byla kontrolována pomocí její elektroforetické separace na agarózovém gelu v rámci předchozí analýzy vzorků (Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy; podkapitola Kontrola kvality RNA (4.1.3.), Müllerová Jana, 2018). Ačkoli byly ze vzorků utvořeny alikvóty, vícečetné rozmrazení RNA následně ubírá na její kvalitě, což může být také jedna z příčin nepotvrzeného pozitivního nálezu.

Zásobní suspenze SINV sloužící jako pozitivní kontrola byla skladována v lyofilizovaném stavu. Proto bylo nutné ji resuspendovat v pufru PBS a dále kvůli malému množství pomnožit na savčí (BHK-21) a komáří (C6/36) buněčné linii. Na savčí buněčné linii byl při porovnání s kontrolní jamkou jasně zřetelný cytopatický efekt, a to jak v promyté buněčné suspenzi, tak v přeneseném supernatantu (viz Obr. 19A). Naproti tomu u buněčné linie C6/36 tento efekt pozorován nebyl, buňky jevíly pouze sníženou vitalitu (viz Obr. 19B). Ovšem při porovnání titru viru u obou linií se rychleji i do vyšších titrů virus pomnožil na komáří buněčné linii, což je pravděpodobně dáno absencí obranných mechanismů (RNAi) proti virům u C6/36 (Brackney a spol., 2010).

Z RNA vyizolované z komářích jedinců byly vytvořeny pooly za vzniku celkem 27 směsných vzorků. Tento postup byl zvolen na základě práce Tingström a spol., 2016., ve které na rozdíl od nás byly poolované homogenáty komářích larev. U pozitivních nálezů bylo možné na základě zpětné RT-PCR analýzy původních směsných vzorků dohledat jednotlivé larvální vzorky (Tingström a spol., 2016). Metoda poolování RNA by tedy na limit detekce neměl mít vliv.

Jeden z testovaných směsných vzorků metodou RT-qPCR vyšel hraničně pozitivní v hodnotách Ct blízkých limitu detekce metody (ředění 10^{-8} kalibrační křivky pozitivní kontroly). Během dalšího opakování totožnou metodou se již pozitivní nález nepodařilo potvrdit. Další analýza původních směsných vzorků jak pomocí RT-qPCR tak pomocí konvenční PCR také nepotvrdila pozitivní výsledek. Při porovnání detekčního limitu u těchto metod byla křivka konvenční PCR o 2 řády vyšší než v případě metody RT-qPCR. PCR produkty získané konvenční PCR byly na základě sekvenování a porovnání s dalšími sekvencemi z databáze GenBank vyhodnoceny jako nespecifická amplifikace. Příčinou neúspěchu s potvrzením pozitivního záchytu byla pravděpodobně postupná degradace materiálu. RT-qPCR produkt ze suspektně pozitivního vzorku byl dále vložen do plazmidu

pCR4 a z 5 náhodně vybraných klonů vyizolovaný plazmid amplifikován pomocí specifických M13 primerů. Tím došlo ke zvětšení produktu umožňujícího sekvenování, nicméně ani u jednoho z klonů výsledný produkt neodpovídal očekávané velikosti 300 bp. Následné sekvenování potvrdilo, že i pozitivně sekvenované plazmidy nenesly vložený úsek či nesly jiný než cílový úsek. Příčinou byla nejpravděpodobněji nízká koncentrace PCR produktu v ligační směsi. Dle pokynů výrobce, je u klonování fragmentů menších než 100 bp vyšší riziko falešně pozitivních výsledků (TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (*Thermo Fisher Scientific*)).

V této práci se nám tedy nepodařilo potvrdit detekci SINV v testovaných komárech *Oc. nigripes* nasbíraných na Svalbardu a v Grónsku. Vzhledem k velice nízké prevalenci virů v polárních oblastech je zapotřebí, aby bylo v dalších sezónách odchyceno co nejvíce komárů, čímž by se zvýšila i pravděpodobnost pozitivního záchytu. Je také nutné dále rozšiřovat informace a znalosti z polárních oblastí, kterých je stále nedostatek. Zejména co se týče kompetence potencionálního vektora *Oc. nigripes* a zjištění hostitele, na kterém tento komár saje.

5.2. Virus chřipky

Jako obalený virus je virus chřipky relativně citlivý na škodlivé dopady na životní prostředí. V závislosti na okolních podmínkách (např. vlhkost a teplota) však může přežít až několik hodin a ve vodě při nízkých teplotách (např. $< 20^{\circ}\text{C}$) i podstatně déle (až několik měsíců (Zhang a spol., 2006)). Chřipkové viry jsou citlivé na teplo a nízké pH v závislosti na typu viru. Viry chřipky A s nerozštěpeným HA jsou stabilnější (ztráta infekčnosti při $\text{pH} < 4,5$) než viry s rozštěpeným HA (ztráta infekčnosti při $\text{pH} < 5$) (Scholtissek, 1985).

Nejvýraznější vlastností chřipkových virů je jejich rychlý vývoj, který vede k jeho velké variabilitě. To je případ zejména virů chřipky typu A („Influenza Virus“, 2009). Chřipkové viry vykazují vysokou míru chybovosti během transkripce svých genomů, což je dáno nízkou přesností RNA polymerázy. Tato vysoká míra chyb způsobuje tak zvaný „quasispecies“ jev, kdy v hostiteli ko-cirkuluje mnoho různých virových genotypů, přičemž každý virus má potenciálně různé úrovně způsobivosti pro hostitelské prostředí (Domingo a spol., 1985). Výhodou vysoké míry chybovosti je schopnost virů rychle se přizpůsobit novému prostředí. K tomu může dojít například během infekce nového hostitelského druhu, který vyžaduje adaptivní genetické změny pro optimální replikaci a přenos. Primární nevýhodou je

produkce mnoha virových genotypů, které jsou defektní nebo mají sníženou způsobilost pro současného hostitele (Suarez, 2000).

Výskyt a šíření AIV je úzce spjato jak s migračními trasami volně žijících ptáků, tak s postupně se měnícím klimatem. Spleť sítí migračních tras komplikuje dokumentaci trasování jednotlivých druhů ptáků. Často dochází ke křížení různých migračních linií, a to v místech s vysokou hustotou i druhovou diverzitou, kde se AIV může snadno přenést mezi jedinci, kteří ji tak zavlečou do svých hnízdišť (Lycett a spol., 2019; Tůmová, 2008). Migrace ptáků je především v posledních letech značně ovlivněna změnou klimatických podmínek. Tání ledu v Arktickém oceánu znamená narušení migračních drah řady ptačích druhů při cestě do jejich hnízdišť v polárních oblastech. Led slouží jako plocha pro mezipřistání. Je tak možné, že některé druhy budou zůstávat v arktických oblastech po celý rok (Clairboux a spol., 2019). Tím by se zvýšila hustota i kvantita perzistujících jedinců, mezi kterými by mohl AIV cirkulovat. Roste také pravděpodobnost toho, že se stanou potravou jiného zvířete, které se pak může při pozření nakaženého jedince nakazit. Globální oteplování by mohlo mít ale i opačný vliv na migraci. S rostoucí teplotou se už druhům, které žijí v severních oblastech, nevyplatí z energetického hlediska migrovat, což bude mít za následek zvýšenou druhovou variabilitu v těchto lokalitách. Dalším následkem oteplování je dle studie Both a spol., 2005 ovlivnění jarní migrace, ke které dochází dříve. Do arktických oblastí by mohli začít migrovat nové druhy ptáků, čímž by se opět zvýšila pravděpodobnost přenosu AIV (Both a spol., 2005; Lemoine a Bohning-Gaese, 2003).

Rostoucí výskyt infekcí, včetně ptačí chřipky, v důsledku oteplování a dalších klimatických změn ovlivňuje negativním způsobem fitness nakažených jedinců. Doposud byly infekce LPAI viry považovány za benigní, nicméně například studie van Gils et al., 2007 uvádí, že u labutě malé (*Cygnus columbianus bewickii*) došlo ke zhoršení účinnosti hledání potravy a migrace. V důsledku tohoto chování by mohlo dojít k opožděné migraci do jejich arktických hnízdišť, čímž by se snížila šance na úspěšné rozmnožování těchto ptáků v daném roce infekce (Lebarbenchon et al., 2010). Další studie poukazuje na snížení tělesné hmoty infikovaných jedinců kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) v porovnání se zdravými jedinci (Latorre-Margalef et al., 2009). Tyto zdánlivě mírné projevy LPAI virů u volně žijících ptáků by tak v konečném důsledku mohli mít vliv na druhové složení ptáků v daném území. Proto je nutné sledovat tyto dopady na celkovou kondici nakažených ptáků a určit jejich možný rozsah (Lebarbenchon et al., 2010).

5.2.1. Odběr a testování vzorků stěrů z kloaky a oropharyngu

Cílem druhé části naší práce bylo otestovat 100 vzorků stěrů z kloaky a 100 vzorků stěrů z oropharyngu na přítomnost AIV pomocí metody RT-qPCR. Vzorky stěrů byly získány z jedinců kolonie racka tříprstého (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu v roce 2014. Kolonie těchto mořských ptáků byla zvolena jednak na základě předchozí analýzy publikací zabývajících se tématem AIV v polárních oblastech vypracované v diplomové práci RNDr. Jany Müllerové, a dále pak na základě skutečnosti, že kolonie racků tříprstých hnízdí na poměrně dostupných místech (okenní římsy starých budov) na rozdíl od ostatních druhů ptáků, kteří mají svá hnízda na skalních útvarech či volných prostranstvích.

Po odběru stěrů byly jednotlivé vzorky uloženy do pufru RNAlater a uchovávány v dostupném chladicím zařízení (cca 4°C). Po transportu do České republiky byly uloženy do -80°C. Stejně jako u vzorků komárů se nedokonalé uchování po odběru a transport na dlouhou vzdálenost mohlo negativně odrazit na kvalitě RNA. Také v případě testování těchto vzorků stěrů se nám ani v jednom případě nepodařilo opakovaně potvrdit pozitivní nález RNA AIV. Kontrola kvality izolované RNA v tomto případě byla poměrně variabilní (viz Obr. 25), což může být jedna z příčin nepotvrzení positivity vzorků. Ribosomální RNA (rRNA) eukaryotických buněk obsahuje tři ribosomální RNA molekuly, 5,8 S, 18 S a 28 S rRNA (Noller, 1984). V případě separace RNA, která je jiná než hmyzí, v našem případě ptačí, jsou na gelu vidět 2 produkty o velikostech 28 S (velká ribozomální podjednotka velká přibližně 3800 bp) a 18 S (malá ribozomální podjednotka o velikosti přibližně 1900 bp) (Gillespie a spol., 2006; Scheele a Hanafusa, 1972). V našem případě je po vizualizaci gelu jasně zřetelná velká ribozomální podjednotka odpovídající velikosti okolo 3800 bp. Na základě proměnlivé kvality RNA byly z jednotlivých vzorků vytvořeny alikvóty, aby již nedocházelo k opětovnému rozmrazování celého objemu ribonukleové kyseliny a její další degradaci.

Celkem dva vzorky ze stěrů z oropharyngu vykazovaly přítomnost virové RNA. V obou případech se jednalo o hodnoty za již limitní hodnotou 10^{-5} kalibrační křivky pozitivní kontroly. Limitní ředění 10^{-6} se již nepodařilo amplifikovat v triplicátu. Vzhledem k negativnímu výsledku při opakování dvou suspektně pozitivních vzorků z oropharyngu byly oba vzorky zaklonovány do plazmidu pCR4. Po následné vizualizaci elektroforeticky separovaných DNA produktů jich celkem šest odpovídalo očekávané velikosti 300 bp. Čtyři klony byly zaslány na sekvenaci a výsledné sekvence byly porovnány pomocí BLAST

analýzy. Ani v jednom případě nebyla potvrzena homologie produktu s žádnou sekvencí genomu AIV a jednalo se pouze o nespecifické směsi molekul. K chybě mohlo dojít již během přípravy reakční směsi pro metodu RT-qPCR při amplifikaci vzorků stěrů. Dále mohlo dojít k zaklonování a následné izolaci jiného než požadovaného produktu. Také mohla nastat chyba při přípravě reakční směsi pro PCR reakci vyizolovaného plazmidu. Nebo byly vzorky negativní, ale v hodnotách detekčního limitu došlo k nespecifickému nasednutí primerů. Z časových důvodů byl zvolen nižší počet vybraných klonů, pouze 5 místo plánovaných 10, čímž se snížila pravděpodobnost pozitivního záchytu.

5.2.2. Testování protilátek a další výzkum

Spolu s odběry stěrů z kloaky a oropharyngu bylo jedincům z kolonie racka tříprstého (*Rissa tridactyla*) odebráno také 100 vzorků krve. Z nich bylo separováno sérum, které bylo následně testováno na přítomnost specifických protilátek proti AIV pomocí metody kompetitivní ELISY. Z celkového počtu vyšlo 13 vzorků pozitivních, 5 vzorků hraničních a 82 vzorků negativních. Pro subtypizaci AIV bylo 18 vzorků (13 pozitivních, 4 hraniční a 1 negativní jako negativní kontrola) odesláno do Státního veterinárního ústavu v Praze, kde pomocí hemaglutinačně inhibičního testu (HIT) proběhla testování těchto vzorků na výskyt protilátek proti AIV subtypu H16. Výsledná seroprevalence činila 100% (negativní vzorek jako kontrola vyšel negativně) (Müllerová, 2018). Dále se budou tyto vzorky sér testovat pomocí HIT také na výskyt protilátek proti AIV subtypu H13. Subtypy H13 a H16 jsou nejčastěji detekované subtypy LPAI u ptáků z řádů dlouhokřídlých (*Charadriiformes*), tedy u racků a jejich detekce je až na jednu výjimku (H13N9) omezena je na severní polokouli (Toennessen a spol., 2011).

V naší práci nebyla opakovaně potvrzena cirkulace viru ptačí chřipky v námi sledované oblasti (Svalbard) a oba vzorky lze považovat za negativní. Avšak ptáci, kteří zde hnízdí vykazují protilátky proti AIV (Müllerová, 2018). Vzhledem k faktu, že převážná většina ptáků v Arktidě jsou migrující druhy, může u nich dojít k nakažení na většinou dalekých zimovištích a cirkulace viru v arktických hnízdištích je tak redukována (Altizer a spol., 2011; Clairbaux a spol., 2019). Každý rok se tu však líhne nová, naivní populace, která se může snadno nakazit. Zejména s predikovanou zvyšující se hustotou i diverzitou ptačích druhů migrujících do arktických oblastí lze očekávat rostoucí promořenost ptačích kolonií AIV také na Svalbardu.

6. Závěr

V první části této práce se nám podařilo charakterizovat pozitivní kontrolu pro virus Sindbis a následně ji namnožit na buněčných kulturách (BHK-21, C6/36).

Dále pak bylo provedeno testování téměř 8000 vzorků komárů *Oc. nigripes* nachytaných v Grónsku a na Svalbardu na přítomnost viru Sindbis. K detekci byla použita metoda jednokrokové RT-qPCR. V žádném z testovaných vzorků se nám nepodařilo opakovaně prokázat pozitivní záchyt virové RNA.

V druhé části práce byla provedena detekce viru ptačí chřipky ze 100 vzorků stěrů z kloaky a 100 vzorků stěrů z oropharyngu odebraných jedincům z kolonie racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu. Ke zjištění přítomnosti virové RNA byla použita metoda jednokrokové RT-qPCR, na základě které se nám nepodařilo ani v jednom případě potvrdit pozitivní výsledek.

7. Seznam zkratek

Ae. - *Aedes*

AIV - Virus ptačí chřipky (z angl. „*Avian influenza virus*“)

ANADV - Virus Anadyr

ASFV - Virus afrického moru prasat

ATB - Antibiotika

BATV - Virus Batai

BFV - Virus Barmah Forest

BHK-21 - z angl. „*Baby Hamster Kidney*“

BLAST - z angl. „*Basic Local Aligment Search Tool*“

BOFES - Fetální bovinní sérum

Bp - Báze

BVL - Virus bovinní leukémie

cDNA - Komplementární deoxyribonukleová kyselina

CEV - Virus kalifornské encefalidity

CP - Kapsidový protein

Cx. - *Culex*

DENV - Virus dengue

D-MEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA - Deoxyribonukleová kyselina

dNTP - Deoxynukleotid trifosfát

Dpi - Den po infekci (z angl. „*day per infection*“)

E (P) - Obalový protein

EB - Eluční pufr (z angl. „*elution buffer*“)

EEEV - Virus koňské encefalomyelitidy východního typu

ELISA - z angl. „*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*“

FAM - Flourescein

GETV - Virus Getah

GL - L-glutamin

HA - Hemaglutinin

HIT - Hemaglutinačně inhibiční test

HPAI - Vysoce patogenní ptačí chřipka (z angl. „*High Pathogenic Avian Influenza*“)

CHATV - Virus Chatanga

CHIKV - Virus chikungunya

I. - Ixodes

IAV - Virus chřipky typu A (z angl. „*Influenza A virus*“)

INKV - Virus Inkoo

JCV - Jamestown Canyon virus

Kb- Kilobáze

L15 - Leibowitz's L15 médium

LB - Luria-Bertani médium

LPAI - Nízce patogenní ptačí chřipka (z angl. „*Low Pathogenic Avian Influenza*“)

M1/2 - Matrixový protein

MAYV - Virus Mayaro

mRNA - Mediátorová ribonukleová kyselina

NA - Neuraminidáza

NORV - Virus Northway

NSP - Nestrukturní protein

Oc. - *Ochlerotatus*

ONNV - Virus O'nyong-nyong

PB1 - Protein PB1

PB1-F2 - Protein PB1-F2

PB2 - Protein PB2

PBS - Fosfátový pufovaný fyziologický roztok

PCR - Polymerázová řetězová reakce

PFU - Počet plakotvorných jednotek (z angl. „*plaque-forming units*“)

PS - Buňky prasečích ledvin (z angl. „*porcine kidney stable*“)

PTS - Prekolostrální telecí sérum

RdRp - RNA-dependentní RNA-polymeráza

Rn (hodnota) - z angl. „*Normalized reporter(value)*“

RNA - Ribonukleová kyselina

RNAi - z angl. „*RNA interference*“

rRNA - Ribosomální ribonukleová kyselina

RRV - Virus Ross River

RT-PCR - Reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce

RT-qPCR - Kvantitativní jednokroková reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce

RVFV - Virus horečky Rift Valley

S - Svedberg

SAV - Virus Salmonid

SDS - Dodecylsírán sodný

SESV - Southern elephant seal virus

SFV - Virus Semliki Forest

SOC - z angl. „*Super Optimal broth with Catabolite repression*“

SSHV - Snowshoe hare virus

TAE - Tris – acetate – ethylendiamintetraoctová

UV - Ultrafialové záření

VEEV - Virus venezuelské koňské encefalomyelitidy

VKE - Virus klíšťové encefalitidy

WEEV - Virus koňské encefalomyelitidy západního typu

YFV - Virus žluté zimnice

ZIKV - Virus Zika

8. Použitá literatura

Adouchief, S., Smura, T., Sane, J., Vapalahti, O., a Kurkela, S. (2016). Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis: Sindbis virus as a human pathogen. *Reviews in Medical Virology*, 26(4), 221–241. <https://doi.org/10.1002/rmv.1876>

Ahlm, C., Eliasson, M., Vapalahti, O., a Evander, M. (2014). Seroprevalence of Sindbis virus and associated risk factors in northern Sweden. *Epidemiology and Infection*, 142(7), 1559–1565. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002239>

Acha, P. N., a Szyfres, B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*. Pan American Health Org.

Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00160-7)

Altizer, S., Bartel, R., a Han, B. A. (2011). Animal Migration and Infectious Disease Risk. *Science*, 331(6015), 296–302. <https://doi.org/10.1126/science.1194694>

Arnal, A., Vittecoq, M., Pearce-Duvet, J., Gauthier-Clerc, M., Boulinier, T., a 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), 508–519. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.870967>

Arneberg, P. (2009). Impact of climate change on infectious diseases of animals [Review of *Impact of climate change on infectious diseases of animals*, recenzoval M. Tryland a J. Godfroid]. Kortrapport/Brief Report Series, 10, 28.

Arragain, L., Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Sigur, N., Grangeon, J.-P., Huguon, E., Dechanet, C., Cazorla, C., Gourinat, A.-C., a Descloux, E. (2016). Vertical Transmission of Dengue Virus in the Peripartum Period and Viral Kinetics in Newborns and

Breast Milk: New Data. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, piw058. <https://doi.org/10.1093/jpids/piw058>

Artsob, H., Lindsay, R., a Drebot, M. (2017). Arboviruses. In *International Encyclopedia of Public Health* (s. 154–160). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00023-0>

Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., a Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control*. Springer Science a Business Media.

Bennett, R. S., Gresko, A. K., Murphy, B. R., a Whitehead, S. S. (2011). Tahyna virus genetics, infectivity, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virology Journal*, 8, 135. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-135>

Bennike, O., Higgins, A. K., a Kelly, M. (1989). Mammals of central North Greenland. *Polar Record*, 25(152), 43–49. <https://doi.org/10.1017/S0032247400009979>

Böcher, J., Kristensen (†), N. P., Pape, T., a Vilhelmsen, L. (2015). *The Greenland Entomofauna: An Identification Manual of Insects, Spiders and their Allies*. BRILL.

Both, C., G. Bijlsma, R., a E. Visser, M. (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), 368–373. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03484.x>

Bouvier, N. M., a Palese, P. (2008). The biology of Influenza viruses. *Vaccine*, 26 (Suppl 4), D49–D53.

Brackney, D. E., Scott, J. C., Sagawa, F., Woodward, J. E., Miller, N. A., Schilkey, F. D., Mudge, J., Wilusz, J., Olson, K. E., Blair, C. D., a Ebel, G. D. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(10), e856. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000856>

Breban, R., Drake, J. M., Stallknecht, D. E., a Rohani, P. (2009). The Role of Environmental Transmission in Recurrent Avian Influenza Epidemics. *PLoS Computational Biology*, 5(4), e1000346. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000346>

Brummer-Korvenkontio, M., Saikku, P., Korhonen, P., Ulmanen, I., Reunala, T., a Karvonen, J. (1973). Arboviruses in Finland. IV. Isolation and characterization of Inkoo virus, a Finnish representative of the California group. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22(3), 404–413.

Ciota, A. T., a Kramer, L. D. (2010). Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. *Viruses*, 2(12), 2594–2617. <https://doi.org/10.3390/v2122594>

Clairbaux, M., Fort, J., Mathewson, P., Porter, W., Strøm, H., a Grémillet, D. (2019). Climate change could overturn bird migration: Transarctic flights and high-latitude residency in a sea ice free Arctic. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54228-5>

Conway, M. J., Colpitts, T. M., a Fikrig, E. (2014). Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual Review of Virology*, 1(1), 71–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085513>

Corbet, P. S. (1967). Facultative Autogeny in Arctic Mosquitoes. *Nature*, 215(5101), 662–663. <https://doi.org/10.1038/215662a0>

Corbet, P. S., a Danks, H. V. (1973). Seasonal emergence and activity of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in High-Arctic locality. *The Canadian Entomologist*, 105(6), 837–872. <https://doi.org/10.4039/Ent105837-6>

Corbet, P. S., a Danks, H. V. (1975). Egg-laying habits of mosquitoes in the high arctic. *Mosquito News*, 35(1), 8–14.

Coulson, S., Convey, P., Aakra, K., Aarvik, L., Avila-Jiménez, M., Babenko, A., Biersma, E., Boström, S., Brittain, J., Carlsson, A., Christoffersen, K., De Smet, W., Ekrem, T., Fjellberg, A., Füreder, L., Gustafsson, D., Gwiazdowicz, D., Hansen, L., Hullé, M., a Zmudczyńska-Skarbek, K. (2014). The terrestrial and freshwater invertebrate biodiversity of the archipelagoes of the Barents Sea, Svalbard, Franz Josef Land and Novaya Zemlya. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 440–470. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.10.006>

Culler, L. E., Ayres, M. P., a Virginia, R. A. (2018). Spatial heterogeneity in the abundance and fecundity of Arctic mosquitoes. *Ecosphere*, 9(8), e02345. <https://doi.org/10.1002/ecs2.2345>

Černý J., Elsterová J., Růžek D., a Grubhoffer L. Vertebrate viruses in polar ecosystems. (in preparation).

da Costa, C. F., dos Passos, R. A., Lima, J. B. P., Roque, R. A., de Souza Sampaio, V., Campolina, T. B., Secundino, N. F. C., a Pimenta, P. F. P. (2017). Transovarial transmission of DENV in *Aedes aegypti* in the Amazon basin: A local model of xenomonitoring. *Parasites a Vectors*, 10(1), 249. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2194-5>

DeFoliart, G. R., Grimstad, P. R., a Watts, D. M. (1987). Advances in Mosquito-Borne Arbovirus/Vector Research. *Annual Review of Entomology*, 32(1), 479–505. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.002403>

Descamps, S. (2013). Winter Temperature Affects the Prevalence of Ticks in an Arctic Seabird. *PLoS ONE*, 8(6), e65374. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065374>

D’Odorico, P., He, Y., Collins, S., De Wekker, S., Engel, V., a Fuentes, J. (2013). Vegetation–microclimate feedbacks in woodland–grassland ecotones. *Global Ecology a Biogeography*, 22. <https://doi.org/10.1111/geb.12000>

Domingo, E., Martínez-Salas, E., Sobrino, F., de la Torre, J. C., Portela, A., Ortín, J., López-Galindez, C., Pérez-Breña, P., Villanueva, N., Nájera, R., VandePol, S., Steinhauer, D., DePolo, N., a Holland, J. (1985). The quasispecies (extremely

heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: Biological relevance - a review. *Gene*, 40(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90017-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90017-4)

Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H., a Daniels, R. (2018). Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01581>

Elbing, K., a Brent, R. (2019). Recipes and tools for culture of Escherichia coli. *Current protocols in molecular biology*, 125(1), e83. <https://doi.org/10.1002/cpmb.83>

Elsterová, J., Černý, J., Müllerová, J., Šíma, R., Coulson, S. J., Lorentzen, E., Strøm, H., a Grubhoffer, L. (2015). Search for tick-borne pathogens in the Svalbard Archipelago and Jan Mayen. *Polar Research*, 34(1), 27466. <https://doi.org/10.3402/polar.v34.27466>

Fouchier, R., a Munster, V. (2009). Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds: -EN- Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds - FR- Epidemiologie des virus de l'influenza aviaire faiblement pathogène dans l'avifaune -ES- Epidemiología de la influenza aviar de baja patogenicidad en aves silvestres. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 28(1), 49–58. <https://doi.org/10.20506/rst.28.1.1863>

Francy, D. B., Jaenson, T. G. T., Lundström, J. O., Schildt, E.-B., Espmark, Å., Henriksson, B., a Niklasson, B. (1989). Ecologic Studies of Mosquitoes and Birds as Hosts of Ockelbo Virus in Sweden and Isolation of Inkoo and Batai Viruses from Mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41(3), 355–363. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.355>

Gelderblom, H. R. (1996). Structure and Classification of Viruses. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th vyd.). University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8174/>

Gillespie, J. J., Johnston, J. S., Cannone, J. J., a 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), 657–686. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00689.x>

Goff, G., Whitney, H., a Drebot, M. A. (2012). Roles of Host Species, Geographic Separation, and Isolation in the Seroprevalence of Jamestown Canyon and Snowshoe Hare Viruses in Newfoundland. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6734–6740. <https://doi.org/10.1128/AEM.01351-12>

Gylfe, Å., Ribers, Å., Forsman, O., Bucht, G., Alenius, G.-M., Wållberg-Jonsson, S., Ahlm, C., a Evander, M. (2018). Mosquitoborne Sindbis Virus Infection and Long-Term Illness—Volume 24, Number 6—June 2018—Emerging Infectious Diseases journal—CDC. <https://doi.org/10.3201/eid2406.170892>

Hall, J. S., TeSlaa, J. L., Nashold, S. W., Halpin, R. A., Stockwell, T., Wentworth, D. E., Dugan, V., a Ip, H. S. (2013). Evolution of a reassortant North American gull influenza virus lineage: Drift, shift and stability. *Virology Journal*, 10(1), 179. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-179>

Han, B. A., Kramer, A. M., a Drake, J. M. (2016). Global Patterns of Zoonotic Disease in Mammals. *Trends in Parasitology*, 32(7), 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.007>

Hernandez, R., Brown, D. T., a Paredes, A. (2014). Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. *Advances in Virology*, 2014, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/259382>

Hesson, J. C., Lundström, J. O., Tok, A., Östman, Ö., a Lundkvist, Å. (2016). Temporal Variation in Sindbis Virus Antibody Prevalence in Bird Hosts in an Endemic Area in Sweden. *PLOS ONE*, 11(8), e0162005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162005>

Huang, Y.-J. S., Higgs, S., a Vanlandingham, D. L. (2019). Arbovirus-Mosquito Vector-Host Interactions and the Impact on Transmission and Disease Pathogenesis of Arboviruses. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00022>

Hubálek, Z. (2003). Emerging Human Infectious Diseases: Anthroponoses, Zoonoses, and Sapronoses. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 403–404. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020208>

Hubálek, Z., a Rudolf, I. (2011). *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-9657-9>

Hubálek, Z., Rudolf, I., a Nowotny, N. (2014). Arboviruses Pathogenic for Domestic and Wild Animals. In *Advances in Virus Research* (Roč. 89, s. 201–275). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7>

Hueffer, K., O’Hara, T. M., a Follmann, E. H. (2011). Adaptation of mammalian host-pathogen interactions in a changing arctic environment. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-17>

Hurt, A. C., Su, Y. C. F., Aban, M., Peck, H., Lau, H., Baas, C., Deng, Y.-M., Spirason, N., Ellström, P., Hernandez, J., Olsen, B., Barr, I. G., Vijaykrishna, D., a Gonzalez-Acuna, D. (2016). Evidence for the Introduction, Reassortment, and Persistence of Diverse Influenza A Viruses in Antarctica. *Journal of Virology*, 90(21), 9674–9682. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-16>

Chen, G.-W., Chang, S.-C., Mok, C.-K., Lo, Y.-L., Kung, Y.-N., Huang, J.-H., Shih, Y.-H., Wang, J.-Y., Chiang, C., Chen, C.-J., a Shih, S.-R. (2006). Genomic Signatures of Human versus Avian Influenza A Viruses. *Emerging Infectious Diseases*, 12(7), 1353–1360. <https://doi.org/10.3201/eid1209.060276>

Chen, L. H., a Wilson, M. E. (2004). Transmission of Dengue Virus without a Mosquito Vector: Nosocomial Mucocutaneous Transmission and Other Routes of Transmission. *Clinical Infectious Diseases*, 39(6), e56–e60. <https://doi.org/10.1086/423807>

Chen, Lin H, a Wilson, M. E. (2005). *Non-Vector Transmission of Dengue and Other Mosquito-Borne Flaviviruses*. 29, 14.

Cheon, S.-H., Lee, Y.-N., Kang, S.-I., Kye, S.-J., Lee, E.-K., Heo, G.-B., Lee, M.-H., Kim, J.-W., Lee, K.-N., Son, H.-M., a Lee, Y.-J. (2018). Genetic evidence for the intercontinental movement of avian influenza viruses possessing North American-origin nonstructural gene allele B into South Korea. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.09.001>

Christou, L. (2011). The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), 326–330. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03441.x>

Influenza Virus. (2009). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 36(1), 32–39. <https://doi.org/10.1159/000197314>

Ito, T., Okazaki, K., Kawaoka, Y., Takada, A., Webster, R. G., a Kida, H. (1995). Perpetuation of influenza A viruses in Alaskan waterfowl reservoirs. *Archives of Virology*, 140(7), 1163–1172. <https://doi.org/10.1007/BF01322743>

Jansen, M. D., Bang Jensen, B., McLoughlin, M. F., Rodger, H. D., Taksdal, T., Sindre, H., Graham, D. A., a Lillehaug, A. (2017). The epidemiology of pancreas disease in salmonid aquaculture: A summary of the current state of knowledge. *Journal of Fish Diseases*, 40(1), 141–155. <https://doi.org/10.1111/jfd.12478>

Johansen, C. A., Mackenzie, J. S., Smith, D. W., a Lindsay, M. D. A. (2005). Prevalence of neutralising antibodies to Barmah Forest, Sindbis and Trubanaman viruses in animals and humans in the south-west of Western Australia. *Australian Journal of Zoology*, 53(1), 51. <https://doi.org/10.1071/ZO03042>

Kerlinger, P. (2008). *How Birds Migrate*. Stackpole Books.

Kuno, G., a 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), 608–637.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005>

Kurkela, S., Manni, T., Vaheri, A., a Vapalahti, O. (2004). Causative Agent of Pogosta Disease Isolated from Blood and Skin Lesions. *Emerging Infectious Diseases*, 10(5), 889–894. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030689>

Kurkela, S., Rätti, O., Huhtamo, E., Uzcátegui, N. Y., Nuorti, J. P., Laakkonen, J., Manni, T., Helle, P., Vaheri, A., a Vapalahti, O. (2008). Sindbis Virus Infection in Resident Birds, Migratory Birds, and Humans, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 14(1), 41–47. <https://doi.org/10.3201/eid1401.070510>

Kurstak, E. (2012). *Arctic and Tropical Arboviruses*. Elsevier.

Latorre-Margalef, N., Gunnarsson, G., Munster, V. J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., Elmberg, J., Olsen, B., Wallensten, A., Haemig, P. D., Fransson, T., Brudin, L., & Waldenström, J. (2009). Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1659), 1029–1036. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1501>

Lebarbenchon, C., Feare, C. J., Renaud, F., Thomas, F., & Gauthier-Clerc, M. (2010). Persistence of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Natural Ecosystems. *Emerging Infectious Diseases*, 16(7), 1057–1062. <https://doi.org/10.3201/eid1607.090389>

Lee, S. Y. (2009). *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer Science a Business Media.

Lemoine, N., a Bohning-Gaese, K. (2003). Potential Impact of Global Climate Change on Species Richness of Long-Distance Migrants. *Conservation Biology*, 17(2), 577–586. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01389.x>

Lequime, S., a Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.07.025>

Lequime, S., Paul, R. E., a Lambrechts, L. (2016). Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, 12(5), e1005548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005548>

Lundström, J. O., a Pfeffer, M. (2010). Phylogeographic Structure and Evolutionary History of Sindbis Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(9), 889–907. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0069>

Lundström, J. O., Schäfer, M. L., Hesson, J. C., Blomgren, E., Lindström, A., Wahlqvist, P., Halling, A., Hagelin, A., Ahlm, C., Evander, M., Broman, T., Forsman, M., a Vinnersten, T. Z. P. (2013). *The geographic distribution of mosquito species in Sweden*. 31, 15.

L'vov, D. K., Shchelkanov, M. Y., Alkhovsky, S. V., a Deryabin, P. G. (2015). *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology*. Academic Press.

L'vov, S. D., Gromashevsky, V. L., Chaporgina, Y. A., Miloserdov, V. Y., Schipanova, M. V., Agapov, V. A., Dmitriyev, G. D., Guschina, Y. A., Galkina, I. V., Zlobin, V. I., Solovyov, A. S., Biti, W. J., Skvortsova, T. M., L'vov, D. K., Aristova, V. A., Golubinsky, Y. L., Gorin, O. Z., Kolobukhina, L. V., Bolshakov, A. B., ... Feoktistov, A. Z. (1995). *Mosquito-borne arboviruses in the Baikal region*. 4(40), 170–172.

Lwande, O. W., Bucht, G., Ahlm, C., Ahlm, K., Näslund, J., a Evander, M. (2017). Mosquito-borne Inkoo virus in northern Sweden—Isolation and whole genome sequencing. *Virology Journal*, 14(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0725-5>

Lycett, S. J., Duchatel, F., a Digard, P. (2019). A brief history of bird flu. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1775). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>

MacLachlan, J., a Dubovi, E. (Ed.). (2017). Togaviridae. In *Fenner's Veterinary Virology* (s. 511–524). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800946-8.00028-3>

Mandary, Masomian, a Poh. (2019). Impact of RNA Virus Evolution on Quasispecies Formation and Virulence. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4657. <https://doi.org/10.3390/ijms20184657>

Mansuy, J. M., Suberbielle, E., Chapuy-Regaud, S., Mengelle, C., Bujan, L., Marchou, B., Delobel, P., Gonzalez-Dunia, D., Malnou, C. E., Izopet, J., a Martin-Blondel, G. (2016). Zika virus in semen and spermatozoa. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(10), 1106–1107. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30336-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30336-X)

Marchi, S., Trombetta, C. M., a Montomoli, E. (2018). Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases as a Global Health Problem. *Public Health - Emerging and Re-Emerging Issues*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77382>

Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A., a Klenk, H.-D. (2004). Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(13), 4620–4624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308001101>

McLean, D. M. (1975). Mosquito-borne arboviruses in arctic america. *Medical Biology*, 53(5), 264–270.

McLean, D. M. (1983). Yukon isolates of snowshoe hare virus, 1972-1982. *Progress in Clinical and Biological Research*, 123, 247–256.

McLean, D. M., Grass, P. N., Judd, B. D., Ligate, L. V., a 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., a Stolz, K. J. (1979). Bunyavirus development in arctic and *Aedes aegypti* mosquitoes as revealed by glucose oxidase staining and immunofluorescence. *Archives of Virology*, 62(4), 313–322. <https://doi.org/10.1007/BF01318105>

Medical Ecology >> Infectious Diseases >> Influenza. (b.r.). Získáno 1. března 2020, z http://www.medicalecology.org/diseases/influenza/print_influenza.htm

Mellor, P. S. (2000). Replication of Arboviruses in Insect Vectors. *Journal of Comparative Pathology*, 123(4), 231–247. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0434>

Meseko, C., Kumar, B., a Sanicas, M. (2018). Preventing Zoonotic Influenza. *Influenza - Therapeutics and Challenges*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76966>

Mosquito Control—Kentucky Pesticide Safety Education. (b.r.). Získáno 14. února 2020, z <http://www.uky.edu/Ag/Entomology/PSEP/cat8mosquito.html>

Mostafa, A., Abdelwhab, E. M., Mettenleiter, T. C., a Pleschka, S. (2018). Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. *Viruses*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/v10090497>

Müllerová, J. (2014). *Výskyt arbovirů v Grónsku a na Svalbardu* [Bakalářská práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Müllerová, J. (2018). *Detekce zoonotických virů v biologických vzorcích z Arktidy* [Diplomová práce]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Müllerová, J., Elsterová, J., Černý, J., Ditrich, O., Žárský, J., Culler, L. E., Kampen, H., Walther, D., Coulson, S. J., Růžek, D., a Grubhoffer, L. (2018). No indication of arthropod-vectored viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected on Greenland and Svalbard. *Polar Biology*, 41(8), 1581–1586. <https://doi.org/10.1007/s00300-017-2242-9>

Nagy, A., Machova, J., Hornickova, J., Tomci, M., Nagl, I., Horyna, B., a Holko, I. (2007). Highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in Mute swans in the Czech Republic. *Veterinary Microbiology*, 120(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.10.004>

Nielsen, O., Clavijo, A., a Boughen, J. A. (2001). Serologic Evidence of Influenza A Infection in Marine Mammals of Arctic Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(4), 820–825. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.4.820>

Noller, H. F. (1984). Structure of Ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 119–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.001003>

Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., a Kaufman, W. R. (1994). Adaptations of Arboviruses to Ticks. *Journal of Medical Entomology*, 31(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.1.1>

Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A. D. M. E., a Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>

Prestrud, P. (Ed.). (2004). *A catalogue of the terrestrial and marine animals of Svalbard*. Norsk Polarinst.

Putkuri, N., Kantele, A., Levanov, L., Kivistö, I., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., a Vapalahti, O. (2016). Acute Human Inkoo and Chatanga Virus Infections, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 22(5), 810–817. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151015>

Putkuri, N., Vaheri, A., a Vapalahti, O. (2007). Prevalence and Protein Specificity of Human Antibodies to Inkoo Virus Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(12), 1555–1562. <https://doi.org/10.1128/CVI.00288-07>

Quicke, K. M., Bowen, J. R., Johnson, E. L., McDonald, C. E., Ma, H., O’Neal, J. T., Rajakumar, A., Wrammert, J., Rimawi, B. H., Pulendran, B., Schinazi, R. F.,

Chakraborty, R., a Suthar, M. S. (2016). Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host a Microbe*, 20(1), 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>

Randolph, S. E., Gern, L., a Nuttall, P. A. (1996). Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, 12(12), 472–479. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(96\)10072-7](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(96)10072-7)

Rappole, J., a Hubalek, Z. (2006). Birds and Influenza H5N1 Virus Movement to and within North America. *Emerging Infectious Diseases*, 12(10), 1486–1492. <https://doi.org/10.3201/eid1210.051577>

Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., a Shukla, S. K. (2003). Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine a Research*, 1(1), 5–12. <https://doi.org/10.3121/cmr.1.1.5>

Revich, B., Tokarevich, N., a Parkinson, A. (2012). Climate change and Zoonotic infections in the Russian Arctic. *International journal of circumpolar health*, 71, 18792. <https://doi.org/10.3402/ijch.v71i0.18792>

Ring, R. A., a Tesar, D. (1981). Adaptations to cold in Canadian arctic insects. *Cryobiology*, 18(2), 199–211. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(81\)90090-0](https://doi.org/10.1016/0011-2240(81)90090-0)

Ritter, D. G., a Feltz, E. T. (1974). On the natural occurrence of California encephalitis virus and other arboviruses in Alaska. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(10), 1359–1366. <https://doi.org/10.1139/m74-210>

Robert, V., Rocamora, G., Julienne, S., a Goodman, S. M. (2011). Why are anopheline mosquitoes not present in the Seychelles? *Malaria Journal*, 10(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-31>

Saxena, S. (2018). *Influenza: Therapeutics and Challenges*. BoD – Books on Demand.

Scheele, C. M., a Hanafusa, H. (1972). Electrophoretic analysis of the RNA of avian tumor viruses. *Virology*, 50(3), 753–764. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(72\)90429-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(72)90429-1)

Scholtissek, C. (1985). Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. *Vaccine*, 3(3), 215–218. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(85\)90109-4](https://doi.org/10.1016/0264-410X(85)90109-4)

Smith, A. (2008). Infection prevalence and vector-borne transmission: Are vectors always to blame? *Trends in Parasitology*, 24(11), 492–496. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.07.008>

Suarez, D. L. (2000). Evolution of avian influenza viruses. *Veterinary Microbiology*, 74(1–2), 15–27. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00161-9)

Swayne, D. E. (2009). *Avian Influenza*. John Wiley a Sons.

Tingström, O., Wesula Lwande, O., Näslund, J., Spyckerelle, I., Engdahl, C., Von Schoenberg, P., Ahlm, C., Evander, M., a 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), 461–467. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1940>

Tirrell, S. J., Walters, L. L., a 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), 806–821. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.806>

Toennesen, R., Germundsson, A., Jonassen, C. M., Haugen, I., Berg, K., Barrett, R. T., a Rimstad, E. (2011). Virological and serological surveillance for type A influenza in the black-legged kittiwake (*Rissa tridactyla*). *Virology Journal*, 8(1), 21. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-21>

Tůmová, B. (2008). *Ptačí chřipka*. Grada Publishing a.s.

van Gils, J. A., Munster, V. J., Radersma, R., Liefhebber, D., Fouchier, R. A. M., & Klaassen, M. (2007). Hampered Foraging and Migratory Performance in Swans Infected

with Low-Pathogenic Avian Influenza A Virus. *PLoS ONE*, 2(1), e184.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000184>

Vasilakis, N., Lambert, A., Maclachlan, N., a Brault, A. (2016). *Genome organization of Arboviruses* (s. 31–44).

Vosoughi, R., Walkty, A., Drebot, M. A., a Kadkhoda, K. (2018). Jamestown Canyon virus meningoencephalitis mimicking migraine with aura in a resident of Manitoba. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal*, 190(9), E262–E264.
<https://doi.org/10.1503/cmaj.170940>

Wachtman, L., a Mansfield, K. (2012). Viral Diseases of Nonhuman Primates. In *Nonhuman Primates in Biomedical Research* (s. 1–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00001-8>

Waits, A., Emelyanova, A., Oksanen, A., Abass, K., a Rautio, A. (2018). Human infectious diseases and the changing climate in the Arctic. *Environment International*, 121, 703–713.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.09.042>

Weaver, S. C., a Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>

Webster, R. (1998). Influenza: An Emerging Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4(3), 436–441. <https://doi.org/10.3201/eid0403.980325>

Webster, R. G., Laver, W. G., a Air, G. M. (1983). Antigenic Variation Among Type A Influenza Viruses. In P. Palese a D. W. Kingsbury (Ed.), *Genetics of Influenza Viruses* (s. 127–168). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8706-7_5

Webster, Robert G., Bean, J. W., Gorman, T. O., Chambers, M. T., a Kawaoka, Y. (1992). Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological Reviews*, 56(1), 152–179.

Yang, Y., Halloran, M. E., Sugimoto, J. D., a Longini, I. M. (2007). Detecting Human-to-Human Transmission of Avian Influenza A (H5N1). *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1348–1353. <https://doi.org/10.3201/eid1309.07-0111>

Zarnke, R. L., Calisher, C. H., a Kerschner, J. (1983). Serologic evidence of arbovirus infection in humans and wild animals in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*, 19(3), 175–179. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-19.3.175>

Zhang, G., Shoham, D., Gilichinsky, D., Davydov, S., Castello, J. D., a Rogers, S. O. (2006). Evidence of Influenza A Virus RNA in Siberian Lake Ice. *Journal of Virology*, 80(24), 12229–12235. <https://doi.org/10.1128/JVI.00986-06>

9. Příloha

Příloha 1: Povolení pro odběr vzorků z jedinců kolonie racků tříprstých (*Rissa tridactyla*) na Svalbardu v letní sezóně 2014.

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



**SYSSELMANNEN
PÅ SVALBARD**

**GOVERNOR OF SVALBARD
ГУБЕРНАТОР СВАЛЪБАРДА**

<i>Executive officer:</i>	<i>Our date:</i>	<i>Our ref: (to be quoted in further correspondence)</i>
Henrik Rotneberg	24.6.2014	2013/00722-5
	<i>Your date:</i>	a.512
	3.6.2014	<i>Your ref:</i>

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:
firmapost@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 herby 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 Tysl 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