

**Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Karlova v Praze  
Katedra parazitologie**

**Hostitelské preference potencionálních přenašečů West  
Nile viru v ČR a leishmanií v Turecku**

**Veronika Šeblová**

**Bakalářská práce**

**Praha, 2006**

**Školitel: Mgr. Jan Votýpka, Ph.D.**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za velkou trpělivost, ochotu, cenné odborné rady a veškerou pomoc nejen při psaní této práce. Dále patří mé poděkování celému týmu katedry parazitologie a všem mým přátelům. Ráda bych však poděkovala zejména mé rodině za jejich lásku a podporu, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

# Obsah

Úvod .....	3
Literární přehled .....	5
Patogeny a jejich kolování v přírodě .....	5
West Nile virus – přenos a rozšíření .....	7
Leishmanióza v Turecku .....	10
Identifikace nasáté krve z krevsajících členovců .....	12
Hostitelské preference potencionálních přenašečů WNV .....	18
Hostitelské preference přenašečů leishmaniózy v Turecku .....	24
Praktická část .....	27
Metodika .....	27
Výsledky a diskuze .....	27
Stanovení citlivosti .....	29
Vyhodnocení odchyť v sezóně .....	30
Identifikace krve u flebotomů .....	31
Závěr .....	32
Literatura .....	33
Příloha .....	40

# Úvod

Krevsající členovci jsou předmětem výzkumu mnoha vědeckých skupin, ale i zájmu široké veřejnosti. Jedním z hlavních důvodů je jejich schopnost přenášet nejrůznější infekční onemocnění člověka, ale i hospodářských a volně žijících zvířat.

K přenosu většiny těchto onemocnění z přenašeče na hostitele, ale i k samotné nákaze přenašeče, dochází během procesu sání krve. Většina infekčních onemocnění koluje v přírodě mezi hostiteli a přenašeči bez účasti člověka, jde o tzv. zoonózy. Až po určité době a případné změně podmínek může dojít i k přenosu na člověka. Člověk se pak stává přímým článkem cyklu a v některých případech dokonce následně vzniká zcela samostatný cyklus člověk – přenašeč – člověk.

Určení hostitelské specifity vektorů, tedy znalost okruhu hostitelů, na kterých daný druh přenašeče saje, a které hostitele při výběru preferuje, je předpokladem pro pochopení dynamiky přenosných cyklů. Tyto znalosti pak mohou napomoci odhalit pravděpodobná přírodní ohniska daného onemocnění, míru rizika přenosu z tzv. rezervoárových hostitelů na další hostitele včetně člověka a příslušnými kroky následně zabránit dalšímu šíření nemoci.

Zjištění druhového zastoupení a početnosti potencionálních přenašečů, hledání interakcí mezi přenašečem a jeho hostitelem, odhadnutí pravděpodobnosti jejich vzájemných kontaktů na základě různorodosti dostupných potravních zdrojů, experimentální zjištění vektorové kompetence, tedy schopnosti přenašeče dané infekční agens uchovávat a dále přenášet, stejně tak jako identifikace krve u nasátých odchycených jedinců pomocí nejrůznějších metod, to vše vede k lepšímu porozumění cyklům přenosu i k určení potencionálního rizika pro hostitele, zejména pak pro člověka.

Ve většině případů není úplný a detailní cyklus přenosu zcela známý, což je hlavním důvodem nekontrolovatelného postupu některých arbovirových onemocnění. Jedním z nich je např.

West Nile virus (WNV), přenášený mezi hostiteli převážně ornithofilními druhy komárů, zejména zástupci rodu *Culex*. WNV je zoonóza vyskytující především u vodních ptáků. Původně byl rozšířen pouze v Asii, Africe, Evropě a Austrálii (Hall 2001; Campbell *et al.* 2002), v současné době však způsobuje rozsáhlé epidemie v Severní Americe (Sejvar 2003). Ani jeho přesné rozšíření a přenosný cyklus – hlavně role některých druhů přenašečů na určitých územích, není zcela objasněna. Otázkou zůstává i případný výskyt WNV a zejména pak možnosti jeho přenosu jak mezi samotnými ptáky, tak i případný přenos na další hostitele na území České republiky. Právě posouzení možnosti přenosu WNV různými druhy komárů rodu *Culex* v závislosti na jejich hostitelském výběru je jednou z řešených otázek této práce.

Druhým řešeným problémem uvedeným v praktické části této bakalářské práce budou hostitelské preference přenašečů kožní leishmaniózy v Turecku v oblasti Çukurova v jihovýchodní Anatolii. Tato oblast je přírodním ohniskem kožní leishmaniózy způsobené druhem *Leishmania infantum* a přenášené flebotomem druhu *Phlebotomus tobbi*. Na základě současných znalostí nelze zatím rozhodnout, zda jde v této oblasti o antropozoonózu či zoonózu, není znám přesný způsob přenosu a ani kteří hostitelé jsou případnými rezervoáry. Právě výzkum potravních preferencí flebotomů vyskytujících se v této oblasti je vhodnou cestou k zodpovězení těchto otázek.

# Literární přehled

## Patogeny a jejich kolování v přírodě

V přírodě je řada patogenů udržována v cyklu zahrnujícím krevsajícího členovce jako přenašeče a obratlovce jako hostitele. Celý cyklus záleží na dynamice interakcí mezi patogenem, vektorem, hostitelem a prostředím, ve kterém se všechny tyto složky vyskytují (Balashov 2003).

K nákaze vektora může docházet horizontálním přenosem, a to aktivně během sání z viremického hostitele (např. WNV). Jiným způsobem je přenos vertikální, a to buď transovariálně (př. středoevropská klíštěcí encefalitida) nebo transtadiálně (př. borelióza). Ve většině případů nemá patogen na fitness přenašeče žádný výrazný vliv zatímco nákaza obratlovčího hostitele může být i fatální (Beaty a Marquardt 1996). To platí zejména pro virová onemocnění, u přenosu bakterií a prvků může být negativně ovlivněn i přenašeč. Negativně na přenašeče působí např. *Trypanosoma rangeli* na ploštice, *Yersinia pestis* na blechy, *Hepatozoon* na komáry, leishmanióza na flebotomy a mnoho dalších.

Arboviry mají přinejmenším dva hostitele. Většina arbovirů vykazuje tzv. přírodní ohniskovost, což znamená, že nemoc koluje mezi zvířaty a v cyklu nemá primárně zahrnutého člověka. Tyto cykly ve volné přírodě často unikají pozornosti až do té doby, než dovolí nějaká environmentální změna uniknout viru k sekundárním hostitelům, kde svojí roli může sehrát i člověk. Onemocnění lidí přecházející někdy až v epidemii se u člověka objeví, pokud zasáhne do přírodního ohniska a pokud se najde vhodný vektor schopný přenášet infekci z primárního hostitele na člověka (Gubler 2001).

Lidé a domácí zvířata, u nichž se vyvine klinické onemocnění, jsou většinou náhodní hostitelé, u kterých není výsledná virémie tak vysoká, aby došlo k přenosu infekce na nového přenašeče. Člověk tady tedy působí jako slepý článek cyklu. Některé arboviry jako např. horečka

Dengue nebo žlutá zimnice, ale vysoké virémie v člověku dosáhnou a člověk se pak stává přímým účastníkem cyklu. V některých zdrojích je pak takovýto typ onemocnění označován jako antropozoonóza (Gubler 2001).

K nákaze obratlovce dochází buď biologickým nebo mechanickým přenosem. U biologického přenosu se patogen v přenašeči pomnoží nebo prodělá určitou část svého vývojového cyklu – např. malárie, trypanosomiáza, Chagasova choroba, leishmanióza, lymfatická filarióza. U přenosu mechanického dochází pouze k přenosu patogena pomocí ústního ústrojí nebo regurgitací – např. virus králičí myxomatózy, tularémie (Durden a Mullen 2002).

V Mezinárodním katalogu arbovirů je současně evidováno 534 virů (Gubler 2001). Většinou jde o zoonózy, kolující jen mezi zvířaty ale 134 (25 %) z nich je schopno vyvolat onemocnění i u člověka. Většina evidovaných virů (248) patří do rodiny Bunyavirů. Tyto viry spolu s Togaviry a Flaviviry tvoří nejdůležitější patogeny přenosné na člověka: př. Togaviry – západní a východní koňská encefalomyelitida, horečka Chicungunya, Sindbis atd.; Flaviviry – klíštěcí encefalitida, žlutá zimnice, virus St.Louis encefalitidy, virus encefalitidy údolí Murray, Japonská encefalitida, West Nile virus, horečka Dengue, horečka Kyasanurského lesa atd.; Bunyaviry – Kalifornská encefalitida, Krymžsko-Konžská hemoragická horečka, virus La Cross, Ťahyňa virus, virus Čalovo, Oropouche atd. (Gubler 2001; Balashov 2003).

Arboviry jsou rozšířené celosvětově. Přesné geografické vymezení je limitováno hlavně faktory přírodními, jako jsou klimatické podmínky – teplota, srážky, druh vegetace; antropogenními faktory – např. odlesňování, zavlažování, urbanizace a celková změna krajiny; ale i faktory sociálními a demografickými, které mají vliv na distribuci a celkovou ekologii přenašečů (Gubler 2001).

Pomocí krevsajících členovců však nejsou přenášeny pouze viry, ale i řada bakterií jako rickettsiózy (*Rickettsia*, *Coxiella*, *Cowdria*, *Bartonella*, *Ehrlichia*), boreliózy (*Borrelia* spp.), mor (*Yersinia pestis*) nebo tularémie (*Francisella tularensis*). Přenášá i četná Protozoa – Haemosporidia

(*Plasmodium*), Piropasmodida (*Babesiidae* a *Theileriidae*), Trypanosomatida (*Leishmania* a *Trypanosoma*). Fungují i jako přenašeči jedné skupiny Nematod způsobující filariózy (*Filaroidea*, *Onchocercidae*) – z nichž více jak 50 druhů parazituje u člověka a domácích zvířat (Balashov 2003).

Řada arbovirů se vyskytuje i v České republice (Togaviry: Sindbis; Flaviviry: WNV, virus klíštěcí encefalitidy; Bunyaviry: virus Čalovo, Lednice) (Hubálek a Halouzka 1996).

Například v roce 1997 u nás bylo získáno po povodních na řece Moravě z komárů sedm izolátů arbovirů. Prvním byl virus Ťahyňa patřící do skupiny *Bunyaviridae* izolovaný z *Aedese vexans* (5 krát) a *Aedese cinereus* (1 krát). Druhým byl pak virus West Nile izolovaný z *Culex pipiens pipiens* (1 krát) (Hubálek *et al.* 2000) patřící do skupiny *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*, který v současnosti čítá na sedmdesát popsaných zástupců. Tento RNA virus patří do stejného komplexu jako Japonská B encefalitida, virus St. Louis encefalitidy, virus encefalitidy údolí Murray, virus Žluté zimnice, virus horečky Dengue a mnoho dalších (Bakonyi *et al.* 2005). Protilátky proti West Nile viru byly po povodních detekovány na Břeclavsku u 13 z 619 (2,1 %) hospitalizovaných pacientů. WNV se v Evropě vyskytuje pravděpodobně velmi dlouhou dobu a existuje zde řada přírodních ohnisek, která jsou stále aktivní a čas od času dochází k menším či větším epidemiím (Hubálek a Halouzka 1999; Hubálek 2000; Murque *et al.* 2001).

## **West Nile virus – přenos a rozšíření**

Virus West Nile (WNV) je u člověka původcem západonilské horečky (West Nile Fever – WNF).

U naprosté většiny pacientů se jedná o onemocnění asymptomatické, projevující se nanejvýš horečnatými stavy (15–20 %). V některých případech (5 %) však dochází k bolestem hlavy, případným zánětům mozku či mozkových obalů. K WNV jsou velmi citliví koně, u kterých dochází ke značnému poškození míchy i k edému mozkových obalů. Jde tedy o velmi závažný problém i z hlediska veterinární medicíny. U přirozených hostitelů, kterými jsou ptáci, probíhá



nákaza většinou bez příznaků a po prodělané virémii vzniká imunita (Campbell *et al.* 2002). Ze Severní Ameriky ale i jiných oblastí jsou však známa četná úmrtí ptáků hlavně z čeledi krkavcovitých (např. *Corvus branchyrhynchos*) (Komar *et al.* 2003).

WNV patří do rodiny Flaviviridae, rodu Flavivirus, který v současnosti čítá na sedmdesát popsaných zástupců. Tento RNA virus patří do stejného komplexu jako Japonská B encefalitida, virus St. Louis encefalitidy, virus encefalitidy údolí Murray, virus Žluté zimnice, virus horečky Dengue a mnoho dalších (Bakonyi *et al.* 2005).

Poprvé byl WNV izolován z pacientky s horečkou v Ugandě v roce 1937. K detailnímu prostudování epidemiologie došlo během epidemií ve Středozeří v letech 1950 a 1960, v roce 1951 u epidemie v Izraeli (Sejvar 2003) a v letech 1951–1954 v Egyptě, kde se ukázalo, že WNV je podél Nilu endemický a prevalence se blíží 60 %. V Egyptě se i potvrdila domněnka, že WNV je přenášen krevsajícími členovci. Virus zde byl izolován z komárů rodu *Culex* (Taylor *et al.* 1956; Sejvar 2003).

V současné době se WNV vyskytuje v Asii, Evropě, Africe, Austrálii. Zde všude je původní (Hall 2001; Campbell *et al.* 2002). V nedávné době byl však zavlečen do Severní Ameriky a to pravděpodobně ze Středního východu z Izraele. V Novém Světě byl poprvé zaznamenán roku 1999–2000, kde způsobil u 78 pacientů onemocnění meningoencefalitidou (Weiss *et al.* 2001). Způsob introdukce není zcela jasný, ale šlo nejspíš o náhodném zavlečení WNV s migrujícími ptáky nebo legálním a nelegálním obchodem s infikovanými ptáky (Rappole *et al.* 2000).

WNV je přenášen inokulativně slinami při sání krve převážně ornitofilními druhy komárů, zejména zástupci rodu *Culex*. Virus byl izolován také z 8 druhů klíšťat (*Ixodidae*) a klíšťáků (*Argasidae*) parazitujících na ptácích. To že WNV přenášejí i další skupiny krevsajících dvoukřídých (např. muchničky nebo tiplíci) není zatím potvrzeno (Hubálek a Halouzka 1999; Hubálek 2000; Higgs *et al.* 2004).

V Evropě se jako přenašeči uplatňují následující druhy komárů: druh *Culex pipiens* a jeho poddruh *Culex pipiens pipiens* sající zejména na ptácích a poddruh *Culex pipiens molestus* sající zároveň na ptácích i savcích, stejně jako *Culex modestus* a *Coquillettidia* (syn. *Mansonia*) *richardii*. Dalšími možnými přenašeči jsou ornito-mamaliofilní druhy jako *Aedes albopictus*, *Aedes vexans* (Appearson *et al.* 2002). V Evropě virus koluje ve dvou odlišných prostředích: v rurálním (sylvatickém) mezi převážně vodními ptáky a ornitofilními druhy komárů (především *Culex pipiens pipiens*) a v cyklu urbánním (městském) mezi synantropními či domácími ptáky a komáry sajícími jak na ptácích tak savcích (např. *Culex pipiens molestus* a *Culex modestus*) (Hubálek a Halouzka 1999).

Další možnou cestou přenosu jsou orgánové transplantace, krevní transfúze a transplacentární přenos (Granwehr 2004). Přenos z člověka na člověka, nebo z jiného savce na člověka nebyl zaznamenán (Campbell *et al.* 2002). U ptáků, kteří infekci přežijí, je virémie detekovatelná od jednoho do sedmi dní po nákaze, poté díky imunitnímu systému z krve mizí, ve vnitřních orgánech však virus přetrvává až čtyři měsíce (Komar *et al.* 2003). Virové partikule byly nalezeny i v dutině ústní a v kloace, což naznačuje možnost orofekálního přenosu (Komar *et al.* 2003).

Přírodní ohniska jsou vázána hlavně na říční delty, rybníčné a mokřadní oblasti. Hlavním rezervoárem WNV jsou volně žijící ptáci. V Severní Americe byl detekován u 208 druhů původních i introdukovaných ptáků (Marra *et al.* 2004).

Protilátky v krvi byly nalezeny v mnoha druzích migrujících ptáků v celé Eurasii (Rapolle *et al.* 2000). K infekci jsou nejvíce náchylní ptáci patřící do čeledi krkavcovitých (*Corvidae*) a vodní ptáci. Vysoké prevalence byly zjištěny např. u volavek (*Ardeola irbis*), racků chechtavých (*Larus leucapthamus*), hus domácích (*Anser anser domesticus*) a čápů bílých (*Ciconia ciconia*) (Malkinson *et al.* 2002).

WNV byl detekován také u celé řady divokých i domácích zvířat. Dle CDC (Centre for Disease Control and Prevention) to bylo u 29 druhů savců, velmi častá je epizootie u koní (Rappole a Hubálek 2003; Marra *et al.* 2004). Výjimkou nejsou ani studenokrevní živočichové, neboť WNV byl detekován i u plazů např. u aligátorů (Miller *et al.* 2003) a obojživelníků (Kostiukov *et al.* 1985).

Ačkoliv bylo prokázáno mnoho přirozených hostitelů WNV, hlavní roli přesto mají v přírodních ohniscích a v šíření na nové lokality ptáci a sylvatický cyklus pták – komár – pták. Různí hostitelé mají však různou schopnost efektivně infikovat nového přenašeče, jelikož záleží na hladině virémie. Lidé a koně jsou považováni za konečné hostitele, kteří nemohou zpětně infikovat jiné komáry, protože v jejich periferní krvi je virus v nedostatečné koncentraci (Bunning *et al.* 2002). Právě proto jsou pro infekce lidí a hospodářských zvířat důležití přenašeči, kteří jsou schopni sát jak na ptácích, kde dojde k jejich nákaze, tak i na savcích, včetně člověka.

## **Leishmanióza v Turecku**

Další část bakalářské práce se věnuje problému leishmaniózy a hostitelským preferencím přenašečů tohoto onemocnění v Turecku, přesněji v oblasti Çukurova v jihovýchodní Anatolii.

Leishmanióza je onemocnění způsobené parazitickými prvky rodu *Leishmania* (Kinetoplastida). Jako přenašeči tohoto onemocnění se uplatňují flebotomové z čeledi *Psychodidae*, rodu *Phlebotomus* a *Sergentomyia* ve Starém světě a rod *Lutzomyia* v Novém Světě. Rod *Sergentomyia* je z medicínského hlediska nezajímavý, neboť sají hlavně na plazech, pouze vzácně na lidech a nepřenáší na ně žádné onemocnění (Sádlová 1999).

Rod *Leishmania* je infekční pro celou řadu savčích hostitelů, včetně člověka. K nákaze dochází během sání krve. Flebotomus injikuje do místa sání leishmanie ve stádiu metacyklických promastigotů, ti jsou následně požití makrofágy a pomnožují se v nich. V makrofázích dochází ke změně na amastigotní stádia a ta nasaje jiný flebotomus při dalším sání, čímž se nakazí a stává se po

určité době infekčním. Ve střevě flebotoma se vyvinou nejprve procykličtí, později metacykličtí promastigoti, kteří jsou regurgitováni během sání do nového hostitele, čímž se cyklus uzavírá (Sádlová 1999).

Leishmanióza může být viscerální (orgánová), kutánní (kožní) a mukokutánní (kožněslizniční). Klinické projevy nemoci jsou různé v závislosti na typu leishmanie, druhu přenašeče a genetických predispozicích hostitele. Viscerální leishmanióza je nejvážnější a pokud není léčena, končí smrtí. Kutánní leishmanióza je nejběžnější a způsobuje kožní léze, které jsou léčitelné, ale vznikají po nich nepěkné jizvy. Mukokutánní leishmanióza začíná jednoduchými lézemi a vředy na pokožce, které se mohou rozšířit a způsobovat destrukce nosu, úst, jícnu a hltanu (Sádlová 1999).

Většinou leishmanióza koluje pouze mezi zvířaty a člověk se stane náhodným hostitelem pouze, pokud se dostane do blízkosti přírodního ohniska nemoci. Člověk slouží jako rezervoár pouze vzácně. Jako zoonózy se tedy uplatňují 13 druhů *Leishmanií* a pouze 2 druhy (*L. tropica*, *L. donovani*) jsou antroponotické (Gramiccia a Gradoni 2005).

V Turecku se vyskytují druhy *Leishmania tropica*, *L. major* a *L. infantum* (Özbel *et al.* 1995; Akman *et al.* 2000). Za antroponotickou formu se považuje *L. tropica*, zbylé dvě jsou zoonózy (Gramiccia a Gradoni 2005). Jako přenašeč *L. tropica* se uplatňuje zejména *Phlebotomus sergenti* a u *L. major* je to *Phlebotomus papatasi* (Killick-Kendrick *et al.* 1999). *L. tropica* a *L. major* způsobují kožní formu onemocnění. *L. infantum* vyvolává viscerální leishmaniózu, případně může vyvolat pouze její kožní formu (Ok *et al.* 2002).

Hlavním rezervoárem *L. major* na Blízkém východě jsou pískomilové (*Psammomys obesus* a *Meriones* sp.), informace o rezervoárech *L. tropica* a *L. major* v Turecku jsou však nedostatečné (Özbel *et al.* 1995). O možné roli hlodavců v přenosu *L. tropica* uvažuje ve své práci Svobodová *et al.* 2003.

V Turecku je leishmanióza hlášená ze šesti regionů: jihovýchodní Anatólie, centrální Anatólie, východní Anatólie, Mediteránního regionu, Egejského a Černomořského regionu (Ok *et al.* 2002).

Naše studie se zabývá Mediteránním regionem, oblastí Çukurova s největším městem Adana. Çukurova je od roku 1985 považována za nový endemický region kožní leishmaniózy. Z pacientů v této oblasti byla izolována *L. tropica* a v jednom případě *L. major* (Akman *et al.* 2000). Dále se v této oblasti vyskytuje *L. infantum* způsobující viscerální leishmaniózu, kde hlavním rezervoárem jsou psi (Özbel *et al.* 1995). Jako přenašeč *L. infantum* je v práci Gramiccia a Gradoni 2005 uváděn *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi* a *P. neglectus*. V centrální Anatólii, odkud jsou také hlášeny případy, je nejhojnějším druhem *P. perfiliewi* (Yagci *et al.* 1997 dle Özbel *et al.* 1999). Při současných odchycích v oblasti Çukurova byli nejčastěji se objevujícími druhy *P. tobbi* a *P. papatasi*.

## **Identifikace nasáté krve z krevsajících členovců**

Znalost hostitelských preferencí je důležitým předpokladem pro pochopení přirozených cyklů různých patogenů v přírodě. Přesná identifikace zdroje krve může odhadnout případný stupeň antropofilie či např. boofilie a tedy potencionální nebezpečí přenosu na člověka, nebo hospodářská zvířata. Výsledky pak umožní lépe charakterizovat přírodní ohniska nejrůznějších onemocnění (Mukabana *et al.* 2002).

Existují tři přístupy jak zjistit hostitelské preference daného přenašeče. Prvním je identifikace krve ze střeva nasátého přenašeče. Druhým je přístup experimentální, kdy se snažíme přenašeče kolonizovat a později s ním provádět experimentální sání na nejrůznějších hostitelích v laboratorních podmínkách. Problémem je však samotná kolonizace a dále možnost, že se přenašeč v laboratorních podmínkách bude chovat jinak než v podmínkách přirozených. Další možností je pak použití sentinelových hostitelů jako návnady v přirozených podmínkách.

Identifikaci krve lze provést několika způsoby. Pro prosté odlišení ptačí a savčí krve je možné použít rozlišení mikroskopické, kdy se z čerstvě vypitvané krve ze zaživacího traktu členovce připraví krevní roztěr, který se po fixaci (např. methanolem) obarví Giemsou. K odlišení dojde na základě přítomnosti jádra v ptačích erythrocytech. Erythrocyty ptáků obsahují jádro a mitochondrie, kdežto erythrocyty savců jsou bezjaderné. Nevýhodou této metody je potřeba poměrně čerstvě nasáté krve a nelze určit druh hostitele. Navíc ptačí krev je možno zaměnit za plazí či krev z obojživelníka, neboť také neobsahuje erythrocyty.

K tomu je třeba použít metody založené přímo na identifikaci krve ze střeva nasátých přenašečů. Jde o metody imunologické a molekulárně-biologické umožňující detailní zařazení hostitele až na úroveň rodů či druhů.

Imunochemické techniky se používaly velmi často v 90. letech. Jsou založeny na použití protilátek jako molekul specificky se vázajících na imunoglobuliny z krve. Mezi velmi používanou metodu patřil tzv. precipitační test využívající precipitace mezi sérem vymytým z nasáté krve a mezi specifickými antiprotilátkami, předem připravenými v laboratorních zvířatech – většinou králících. Tento test se prováděl buď v kapiláře, nebo na agarózovém gelu (tzv. Ochterlonyho mikroprecipitační test) (Boreham 1972, Tempelis a Lofy 1963). Například Boreham 1972 použil precipitační test na určení hostitelských preferencí rodu *Anopheles implexus*, kde mu v 96 % vyšel jako zdroj krve hovězí dobytek. Imunodifúzní techniky jsou spolehlivé a nenáročné na vybavení, ale pasivní difúze je velice pomalá a metoda je relativně málo citlivá. Dalším problémem je náročná příprava protilátek, které jsou omezené na námi vybrané množství potencionálních hostitelů a možnost zkřížené reakce.

Dalšími imunologickými metodami jsou např. hemaglutační test, komplement fixační test a imunofluorescenční techniky. Tyto metody byly k identifikaci hostitelské krve využívány jen výjimečně a jejich popis přesahuje rámec této práce (Murray 1969; Staak *et al.* 1986; Gouteux *et al.* 1989).

Zdaleka nejvyužívanější imunologickou metodou v současné době je ELISA. Ke stanovení komplexu antigen-protilátka používá metoda jako značkovací molekuly enzymy obvykle peroxidázu nebo fosfatázu (Novák 2002). Je to kvantitativní a velice citlivá metoda, má však řadu omezení. Používá polyklonální protilátky proti krevním komponentám z potenciálního hostitele, které se musí zdlouhavě laboratorně připravovat a jsou omezeny jen na námi vytipované potenciální hostitele (Chow *et al.* 1993 dle Oshaghi *et al.* 2006). Dalším problémem je možný vznik zkřížené reakce a proto není ELISA vhodná pro zpracování vzorků u blízce příbuzných druhů (Mukabana *et al.* 2002).

Citlivost, specifita a přesnost metody ELISA byla porovnávána s precipitačním testem na detekci krve nasáté ze psa, kočky a člověka komáry *Aedes aegypti* a *Aedes fluviatilis*. V celkové analýze ukázala ELISA nižší specifitu, ale lepší senzitivitu (Gomes *et al.* 2001).

U obou metod se celková senzitivita zvýšila, pokud byl vzorek zmražen do 48 hodin po sání, čímž se zastavil proces trávení ve střevě vektora (Bukort *et al.* 1981; Ngubi *et al.* 1992 dle Gomes *et al.* 2001).

Metodu ELISA použili pro určení hostitelské specifity ve svých pracích např. Clausen *et al.* 1998 a Späth 2000. Oba pro určení hostitelských preferencí u glosin. Dále byla ELISA aplikována např. u flebotomů (Svobodová *et al.* 2003; Bongiorno *et al.* 2003; Velo *et al.* 2005). Často zmiňovaná je hlavně u identifikace krve z komárů (Beier *et al.* 1988 dle Oshaghi *et al.* 2005 u *Anopheles gambiae*; Gomes *et al.* 2001 u *Aedes aegypti*; Zinser *et al.* 2004 u *Culex quiquefasciatus*; Appeason *et al.* 2002, 2004 u rodu *Culex*; Fyodorova *et al.* 2006 u rodu *Culex* a *Aedes* a mnoho dalších, především starších prací).

V současné době byly imunologické metody nahrazeny metodami molekulárními. Zdaleka nepoužívanější metodou je v dnešní době PCR (Polymerase Chain Reaction). PCR se používá v mnoha modifikacích k získání dostatečného množství DNA pomocí jejího

mnohonásobného pomnožení (amplifikaci). Velmi důležitá je hlavně v diagnostice, zejména pak v kombinaci s reverzní transkripcí (RT-PCR).

Molekulárně-biologické metody určené na identifikaci krve a založené na PCR lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou metody sekvenční, kdy je amplifikován a následně osekvenován určitý úsek DNA z krve hostitele. Ten je pak porovnán s dostupnými databázemi (např. pomocí BLASTu v NBI) a díky tomu je možno určit hostitele až do druhu. Sekvenované úseky mohou být různé. Nejčastěji jsou to úseky cytochromu B mitochondriální DNA, D-loop mt DNA případně dalších mitochondriálních genů. Použít se však dají geny nejen mitochondriální DNA, ale i jaderné DNA (včetně genů pro RNA) a dále intergenomické úseky. Výhodou je jednoznačné a zcela detailní určení až do druhu. Nevýhodou je neschopnost určit hostitele ze směsných vzorků, kdy je přenašeč nasát na více hostitelích najednou, dále její pracnost a finanční náročnost.

Druhou skupinu tvoří metody založené na porovnávání rozdílu v elektroforetickém patternu. U těchto metod je amplifikován určitý specifický úsek, který je u různých hostitelů odlišně dlouhý (prosté PCR). Případně je možné tuto metodu kombinovat s následným štěpením amplifikovaného produktu pomocí endonukleáz (PCR-RFLP). Pokud se jedná o amplifikaci intergenomického úseku tvořeného repetitivními sekvencemi, jde o metodu s použitím tzv. mikrosatelitů (tuto metodu nelze kombinovat s RFLP). Z předchozích metod trochu vychází metoda PCR-HDA, která je také založena na různém gelovém patternu.

Pro identifikaci krve z těla přenašeče se používá hlavně PCR založená na amplifikaci genu pro cytochrom B hostitelské mitochondriální DNA (cytB mt DNA), neboť se v každé buňce vyskytuje v mnoha kopiích na rozdíl od unikátní genomové DNA. Každý obratlovec má unikátní sekvenci cytB mt DNA. Zařazení živočicha, v našem případě hostitele, na kterém daný přenašeč sál, je po následném osekvenování možné až na úroveň druhů a to i u velmi příbuzných organismů (Ngo a Kramer 2003; Meece *et al.* 2005).



CytB PCR prokázala dobrou aplikovatelnost také při identifikaci krve z komárů nasátých na studenokrevných zvířatech (Cupp *et al.* 2004).

Tato metoda amplifikace cytB mt DNA pro určení hostitelské specifity byla použita například v práci Ngo a Kramer 2003. Autoři postupovali v několika krocích: nejprve byly použity specifické primery pro cytochrom B pro odlišení ptačí a savčí krve; poté byly u ptačí krve navrženy primery pro odlišení řádu *Passeriformes*, *Falconiformes*, *Columbiformes* a *Galliformes*. Pro odlišení krve z vran a dalších pěvců byla použita kombinace dvou restričních enzymů *Bam*HI a *Pf*MI.

Ukázala se velmi dobrá citlivost této metody – pouze jeden z testovaných druhů, káně rudoocasá, vykazoval zkříženou reakci s řády *Passeriformes* a *Falconiformes*.

Použitím této metody byli u komárů autoři schopni detekovat cytB mt DNA ještě tři dny po sání. Schopnost identifikovat krev tři dny po sání použitím PCR byla pozorována také u muchniček (Boakye *et al.* 1999). U metody ELISA a precipitačního testu zkoušeného na *Aedes aegypti* byl hostitel přesně (tedy ve 100 % případů) určen pouze dva dny po sání (Gomes *et al.* 2001). I tato skutečnost ukazuje na velkou citlivost cytB PCR metody oproti technikám imunologickým.

Další metodou je tzv. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). U této metody jsou po amplifikaci PCR produktu přidány do reakce restriční endonukleázy, které amplifikované úseky specificky naštípou. K odlišení druhu hostitele, z kterého krev pochází, pak dojde na základě počtu a velikosti vzniklých restričních fragmentů, které jsou vizualizovány na gelové elektroforéze a porovnány se známými vzorky krve.

Tato metoda byla použita např. pro určení hostitelské specifity u glosin použitím tří restričních enzymů (*Taq*I, *Alu*I, *Hind*II) pro rozlišení různých druhů dobytka. Bezproblémová identifikace byla možná ve 100 % do 1 dne po sání, v 60 – 80 % do 3 dnů po sání a některé vzorky se povedlo identifikovat i 4 dny po sání. Oproti ELISE, která identifikovala krev ve 100 % do 2 dnů

po sání a v 87,5 % do 3 dnů po sání, tedy PCR-RFLP vykazuje trochu nižší citlivost v závislosti na stupni trávení (Steuber *et al.* 2005).

Oproti přímé PCR, cytB mt DNA následně osekvenované, je PCR-RFLP schopna určit i to, že daný přenašeč sál na několika hostitelích najednou. Další výhodou je menší náročnost na samotnou práci. Je to metoda mnohem levnější než přímá sekvence, zvláště pak u studií s velkým počtem vzorků (Meece *et al.* 2005).

Jedna z metod je také založena na použití genetických markerů (např. mikrosatelitů nebo minisatelitů), které jsou uloženy v genomové DNA. K odlišení dochází na základě počtu a různé délce těchto markerů uložených v repetitivní sekvenci. Tato metoda se používá hlavně u populačních studií (Mukabana *et al.* 2002). Byla však použita i k identifikaci lidské krve u *Aedes aegypti*. Kompletní profil byl možný u vzorků zpracovaných do 2 dnů po nasátí (Benedictis *et al.* 2003).

Další v současnosti často používanou metodou je tzv. heteroduplexová analýza (HDA). Metoda je založena na reakci PCR produktu s předem navrženými sondami nesoucími signál. Heteroduplexové molekuly se od homoduplexových rozeznávají mj. i pomocí elektroforézy na částečně denaturovaném polyakrylamidovém gelu. Do reakce nemohou vstupovat sondy specifické pro několik zvířat najednou, ale k PCR produktu může být přidána sonda pouze jedna. Z toho vyplývá nevýhoda této metody, kterou je časová náročnost.

Tato metoda byla již mnohokrát aplikována na zjištění hostitelských preferencí u glosin a muchniček, u nichž byli identifikováni především savčí hostitelé (Boakye *et al.* 1999; Njiokou *et al.* 2004). Potvrzena je vysoká citlivost této metody pro vzájemné odlišení ptačích druhů a zároveň použitelnost této metody na komáry (Lee *et al.* 2002). Pomocí PCR-HDA je možno identifikovat i částečně natrávenou krev do tří dnů po sání u muchniček (Boakye *et al.* 1999) a až do sedmi dnů po sání u komárů nasátých na ptácích (Lee *et al.* 2002). Důvodem, proč u komárů sajících na ptácích byla možná doba identifikace o tolik delší je to, že ptačí erytrocyty oproti savčím obsahují jádro, ptačí krev obsahuje tedy mnohem větší množství DNA, které vydrží v těle přenašeče delší dobu.

Značnou výhodou metody PCR-HDA je její schopnost identifikovat krev i pokud se přenašeč nasál opakovaně na různých hostitelích. Záleží však na relativní koncentraci DNA z toho kterého hostitele (Lee *et al.* 2002). HDA je jednoduchá a velmi šikovná při identifikaci krve i u blízce příbuzných druhů. Mezi výhody patří dále její nízká cena. Problémem je ale někdy reprodukovatelnost a je opět omezena jen na námi vytipované spektrum hostitelů.

Dalším přístupem jakým je možné určit hostitelské preference je metoda eto-ekologická za použití sentinelových hostitelů, tedy hostitelů, kteří jsou na vytipovaných lokalitách umístěni jako „návnady“. Kolem nich jsou rozmístěny odchytné pasti a sleduje se počet a druhové složení vektorů atakujících jednotlivé hostitele. Případně existují pasti, do kterých je sentinel umístěn přímo. Nevýhodou je, že pokud je sledován exofágní druh přenašeče, tak do této pasti nevlétne, neboť v uzavřených prostorách nesaje. Metoda použitím sentinelových hostitelů byla aplikována často právě na výzkum hostitelské specifity přenašečů různých onemocnění (Jaenson 1990; Braverman *et al.* 1991) včetně West Nile viru (Darbro a Harrington 2006). Nevýhodou této metody je možnost odchytnu i jedinců, kteří kolem sentinelového hostitele jenom prolétají, aniž by měli v úmyslu na něm sát. Předpokládané množství takto náhodně odchycených jedinců je však malé a navíc tuto metodu je možno kombinovat s identifikací krve u chycených nasátých jedinců.

## **Hostitelské preference potencionálních přenašečů WNV**

Během epidemií v Evropě (v jižní Francii v roce 1962; v jižním Rusku v letech 1963 a 1999; v Bělorusku v roce 1977; na západní Ukrajině v roce 1985; v Rumunsku v roce 1996 a na jižní Moravě v roce 1997) se jako hlavní přenašeči WNV uplatňovaly zejména následující druhy komárů: *Culex pipiens* s poddruhem *Culex pipiens pipiens* a poddruhem *Culex pipiens molestus*, mediteránní druh *Culex modestus* a z dalších druhů *Coquillettidia* (syn. *Mansonia*) *richardii*

(Hubálek 2002). Jelikož se tyto zmiňované druhy, zejména pak rod *Culex*, vyskytují i na našem území, mohou tedy WNV přenášet běžně i u nás.

Druh *Culex pipiens* má dva poddruhy: *Culex pipiens molestus* a *Culex pipiens pipiens*. *Culex pipiens molestus* je městský typ druhu *Culex pipiens* (Andreadis *et al.* 2000). Je to druh primárně autogenní a stenogamní. Obývá hlavně podzemí, vlhké suterény, sklepy budov a aktivní je po celý rok, to znamená, že nediapauzuje (Medlock *et al.* 2005). Jde o antropofágní druh, který však sají i na ptácích (Kramář 1958; Fyodorova *et al.* 2006). V uvedené studii, v městské části, kde se tento poddruh vyskytuje, sálo 20,4 % na člověku, 58,1 % na ptácích a k tomu dvě třetiny ostatních komárů byly pozitivní jak na ptačí tak savčí krev. Na první pohled se tedy *C. p. molestus* jeví jako velmi zajímavý druh pro přenos různých onemocnění z ptáků na člověka v městském prostředí, kde je nabídka hostitelů oproti venkovské krajině značně omezená a člověk je tak napadán mnohem častěji.

Druhým poddruhem je *Culex pipiens pipiens*, což je druh vyskytující se spíše ve volné přírodě a na venkově. Oproti městskému poddruhu *C. p. molestus* venkovský poddruh *C. p. pipiens* ve studii Fyodorova *et al.* 2006 mnohem více preferuje ptáky a to v 87,5 %. Bude tedy nejen přenášet WNV na člověka ale hlavně jej udržovat v přírodním ohnisku v koloběhu mezi ptáky.

*C. p. pipiens* osidluje Evropu, části Asie a Afriky, střední část Severní Ameriky, jižní část jižní Ameriky a Austrálii (Vinogradova 2000). *C. p. pipiens* je druh vyskytující se na celém území České republiky (Kramář 1958). Jeho výskyt je polyzonální, tedy je to druh osidlující téměř všechny klimatické zóny, výjimkou je tundra (Dubisky 1970; Babayants 1984; Vinogradova 1997 dle Vinogradova 2000).

*C. p. pipiens* je druh anautogenní a eurygamní. Od srpna už samice sají většinou jen rostlinné šťávy, aby nabraly tuk potřebný k přezimování. *C. p. pipiens* je tedy druh diapauzující (Cranston *et al.* 1987; Snow 1990 dle Medlock *et al.* 2005). Je aktivní během teplých měsíců a početnost dospělců rapidně vzrůstá během června (Medlock *et al.* 2005).

Často řešenou otázkou v systému druhu *Culex pipiens* je možnost křížení mezi *C. p. molestus* a *C. p. pipiens*. Molekulární studie ukázaly, že hybridizace mezi těmito dvěma poddruhy je velmi častá v Severní Americe (40 %), ale v Evropě je spíše vzácná (Fonseca *et al.* 2004) a např. v Itálii je hybridní pouze 1 % jedinců (Urbanelli *et al.* 1981 dle Fyodorova *et al.* 2006).

Právě *Culex pipiens pipiens* je považován za primárního přenašeče WNV z několika důvodů: běžně se vyskytuje jak na venkově tak v urbanních oblastech; k zvýšenému výskytu onemocnění dochází v době jeho početnostního vrcholu; došlo u něj k opakovanému nálezu virových partikulí WNV; virus může být přenášen transovariálně a hlavně studie ukázaly, že je schopný sát jak na ptácích tak savcích (viz dále) a bude tedy fungovat i jako mezičlánek mezi těmito dvěma skupinami hostitelů (Fonseca *et al.* 2004). Vektorová kompetence druhu *Culex pipiens pipiens* k viru West Nile byla laboratorně demonstrována již dříve (Sardelis *et al.* 2001).

Na otázku jestli je druh *C. pipiens pipiens* druh striktně ornithofilní nebo saje i na savcích se snažilo odpovědět v minulosti několik studií. Komáři rodu *Culex* jsou všeobecně považováni za druhy silně ornithofilní (Tempelis 1975; Magnarelli 1977; Irby a Apperson 1988 dle Apperson *et al.* 2004), ale s ohledem na chování typické pro enzootického vektora se předpokládá sání také na savcích (Edman 1976; Zimmermann *et al.* 1985; Irby a Apperson 1988 dle Apperson *et al.* 2002, 2004). Existence přenašeče sajícího jak na ptácích tak savcích je hlavním předpokladem pro udržení enzootického přenosného cyklu mezi ptáky a zároveň předpoklad pro přenos na savčí hostitele včetně člověka (Savage *et al.* 1999 dle Apperson *et al.* 2004).

Ze studie Appersona *et al.* 2002 ze Severní Ameriky, vyšel *Culex pipiens pipiens* jako druh silně preferující ptáky. Autoři zjistili, že krev byla z 87 % ptačí a v pouhých 13 % šlo o krev savčí. U ptačí krve pak použili metodu PCR-HDA (viz přehled metod), pomocí které odlišili jednotlivé druhy ptáků. Komáři, *C. p. pipiens*, sáli na 11 druzích ptáků, po jednom případě se dále u *C. p. pipiens* potvrdilo sání na želvě a mývalovi. Už dřívější záznamy popisují sání také na studenokrevných, tedy žabách, ještěrkách a hadech (Apperson *et al.* 2002; Marshall 1938 dle

Medlock *et al.* 2005). Zároveň však ve své práci upozorňuje, že tak nízké procento sání na savcích může být zapříčiněno sezóně omezenou dobou odchyty, jelikož jsou popsány sezónní změny v hostitelských preferencích např. u *Culex nigripalpus* (Edman a Taylor 1968 dle Apperson *et al.* 2002) a *Culex tarsalis* (Reeves *et al.* 1963; Tempelis *et al.* 1965 dle Apperson *et al.* 2002).

Docházelo u nich k přechodu hostitelských preferencí od ptáků k savcům a naopak v závislosti na sezónních změnách podmínek. Ke změnám v preferencích může docházet také v závislosti na oblasti, kde byli komáři odchytni. To prokazuje další studie Apperson *et al.* 2004 ze Severní Ameriky, která potvrzuje vysokou ornithofilitu druhu *C. p. pipiens* v oblastech New Yorku (84,6 % ptáci, 38 % savci, 17,3 % obojživelníci a v 10 % plazi) a Tennessee (71,4 % ptáci, 24 % savci, 2,6 % obojživelníci a v 1,9 % plazi), kdežto v oblasti New Jersey už byl rozdíl skoro nulový a *C. p. pipiens* zde sál stejně ochotně na ptácích i savcích (34,7 % ptáci, 38 % savci, 17,3 % obojživelníci a 10 % plazi).

Bylo by možné předpokládat, že komáři nebudou rozlišovat jednotlivé ptačí druhy a množství vzorků získaných od určitých ptačích druhů bude odrážet jejich relativní hojnost na dané lokalitě. Ukazuje se však, že komáři mohou preferovat určité ptačí druhy před jinými. Komáři preferovali tyto druhy: drozda stěhovavého (*Turdus migratorius*), kardinála červeného (*Cardinalis cardinalis*), sýkoru rezobokou (*Baeolophus bicolor*) a drozdce mnohohlasého (*Mimus polyglottos*) přesto, že se v oblastech vyskytoval běžně např. druh racek atlantický (*Larus atricilla*), špaček obecný (*Sturnas vulgaris*), vlhovec nachový (*Quiscalus quiscula*), vlhovec červenoboký (*Agelaius phoeniceus*) nebo vrána americká (*Corvus brachyrhynchos*). Důvodem mohou být nejrůznější fyziologické, behaviorální nebo ekologické faktory, které dělají určitý druh pro přenašeče více atraktivním nebo dostupným. Tyto faktory pak hrají roli v určení, které ptačí druhy se stanou rezervoárovými hostiteli (Apperson *et al.* 2004).

Rozdíly v hostitelských preferencích v závislosti na prostředí byly patrné i u komárů *C. p. pipiens* odchytných v okolí farmy na drůbež v Severní Americe, kde sáli výhradně jenom na

kachnách a bažantech a jen minimálně na lidech, a mezi populací odchycenou v nedalekém lese, kde už byl stupeň antropofilie vysoký a lidé byli atakováni často (Andreadis *et al.* 2000).

Další kdo potvrdil svou práci ornithofilitu u druhu *C. p. pipiens* byl Ngo a Kramer 2003, jejichž výsledky ukazují, že 86 % komárů sálo na ptácích (z toho 32 % na *Passeriformes* a 5 % na *Columbiformes*).

K potvrzení ornitofilie u *C. p. pipiens* i ve Skandinávské oblasti došlo použitím sentinelových hostitelů a to žab, morčat, slepic a králíků. Z výsledků vyplývá, že hostitelské preference pro králíka a morče, se skoro vůbec neliší od počtu jedinců chycených na past se žábou nebo na past prázdnou. Savci tedy nebyli pro *C. p. pipiens* skoro vůbec atraktivní. Oproti tomu na past se slepicí se chytali 10krát častěji než na ostatní pasti. (Jaenson 1990).

Ve studii Braverman *et al.* 1991 z Izraele byli použiti jako sentinelové hostitelé telata, ovce, kuřata a krůty. Byli umístěni v klecích buď každý zvlášť, nebo dohromady v různých kombinacích a sledovala se atraktivita těchto hostitelů pro *C. p. pipiens*. Komáři preferovali zvířata v pořadí: telata, kuřata nebo krůty a na posledním místě byly ovce. Důvodem proč na ovce naletovali nejméně, je nejspíš mechanická bariéra na povrchu, kterou je vlna ovčí; jejich silné obranné chování nebo nějaká složka odpuzující komáry, jako např. tuk v ovčí vlně nebo lanolin. Další možností je snížený průnik tepla vysílaného do prostředí díky vlně, neboť teplo je jedním z faktorů důležitých při orientaci komárů (Day 2005). Když však byly vedle sebe ovce a krůty, sál převážně na ovci. Nižší atraktivita krůt byla asi zapříčiněna mnohem větším rozdílem v produkci CO<sub>2</sub>. (Braverman *et al.* 1991). Zde tedy bylo potvrzeno, že *C. p. pipiens* je druh sající často i na savcích. Vysokou hostitelskou preferenci pro savce vykazoval *C. p. pipiens* v Egyptě, kde v 85 % sál na kopytnících, ve 14 % na lidech a v pouhých 0,6 % na ptácích (zbytek pak tvořili psi, kočky, a hlodavci) (Zimmermann *et al.* 1988).

Z výše uvedeného lze tedy říci, že *Culex pipiens pipiens* není striktně ornithofilní, ale že s velkou ochotou saje i na nejrůznějších savcích. Dalo by se říci, že jižní populace *C. p. pipiens* je

spíše mamaliofilní (Izrael, Egypt), kdežto populace v zemích ležících spíše na severu prokazují vysoký stupeň ornithofilie. To jestli je *C. p. pipiens* ornithofilní či mamaliofilní záleží tedy velmi na jednotlivých populacích, lokalitě a možná i sezónních změnách. Jelikož Česká republika leží v přechodném pásmu mezi těmito oblastmi, bude velmi zajímavé zjistit, jaká populace převládá u nás, a na který typ hostitele se specializuje. Dle našich výsledků bude *C. p. pipiens* sít velmi ochotně i na savcích (viz kap. Praktická část).

To že saje jak na ptácích tak savcích je dobrým předpokladem pro přenos nejrůznějších onemocnění, mezi těmito dvěma hostiteli. Jelikož i v České republice se tento druh velmi hojně vyskytuje, je pravděpodobné, že i u nás bude zapojen do přenosu některých onemocnění z ptáků na savce, například West Nile viru (Hubálek *et al.* 2000).

Dalším z možných přenašečů je u nás druh *Culex modestus*. Vyskytuje se v oblastech maximálně do 200 m n. m. Larvy se líhnou v příkopech se stojatou vodou, v zavlažovacích kanálech, bažinách a na březích rybníků s bohatou vegetací. Jde o druh, jehož samice diapauzují. První snůška může být autogenní, před každým dalším kladením se musí samice nasát. V České republice tvoří dvě až tři generace do roka (Moussiegh 1978). Z ekologie těchto přenašečů není mnoho známo. Jedná se o druh vázaný na vlhký biotop a s výskytem na březích větších rybníků s hustým porostem rákosin.

V České republice byl dříve odchycen pouze na jižní Moravě v okolí Lednice, Mikulova, Nesytu a Hodonína (Minář 1969), v Litovelském Pomoraví, Třeboňské pánvi a v Jižních Čechách jen v pár exemplářích. Dle našich odchytů v letech 2004 – 2006 je však *Culex modestus* u nás v porovnání s předchozími lety velmi hojným, až dominantním druhem, který pravděpodobně úspěšně obsazuje nové lokality (okolí Prahy, Blatné, Řežabince, Blatce a na Mikulovsku). Dále se předpokládá, že se *Culex modestus* nevzdaluje příliš daleko od místa svého líhniště. V rákosinách byl člověk atakován během pěti minut 35 samicemi, kdežto 50 m od rákosin už na něj nenalétali vůbec (Minář 1969).



Co se týče hostitelských preferencí, je *Culex modestus* všeobecně považován za druh nalétávající ochotně jak na savce tak na ptáky. Identifikací krve z druhu *Culex modestus*, se autoři zabývají jen sporadicky. V práci Mináře 1969 je *Culex modestus* popisován jako druh spíše ornithofilní. Ten použil pro určení hostitelských preferencí sentinelových hostitelů. Pozoroval velký zájem o kachny a to spíše dospělé než mláďata a slepice, zatímco králíci byli až na několik výjimek ignorováni. Mechanicky byl *Culex modestus* nachytán v slepičárně a kachní farmě, které byly blízko místa líhnutí. Oproti tomu v chlévě u prasat, koz a v králíkárně nebyl chycen žádný, přestože tyto místa byla velmi blízko slepičárně.

Ve studii Fyodorova *et al.* (2006) je však už *Culex modestus* popsán jako druh sající i na savcích. Sál na kuřatech a jiných ptácích (v 65 %), ale i na dobytku (v 18 %), na psech, kočkách a lidech (u všech v 6 %). Zdá se tedy, že se jedná o velmi oportunní druh, který je ochoten sát jak na ptácích, tak na savcích. Jelikož se *Culex modestus* podílel na epidemiích West Nile viru např. ve Francii (Sejvar 2003), dá se jeho schopnost přenášet West Nile virus předpokládat i u nás.

## **Hostitelské preference přenašečů leishmaniózy v Turecku**

Nejvíce je známo o hostitelských preferencích *Phlebotomus papatasi* a *Phlebotomus sergenti*, neboť se hojně vyskytují ve většině sledovaných oblastí a navíc jsou to přenašeči kožní leishmaniózy Starého Světa. Oba tyto druhy jsou oportunisté, sající ochotně na širokém spektru hostitelů, především domácích zvířatech a lidech. *P. papatasi* je jedním z nejběžnějších a nejrozšířenějších druhů. Je prokázaným přenašečem *Leishmania major* (Killick-Kendrick *et al.* 1999). Jde o druh endofilní, vyskytující se hlavně v okolí lidských obydlí, zejména statků, na kterých je různorodá nabídka potravních zdrojů (Sawalha *et al.* 2003). *P. papatasi* je druh silně antropofilní. Sawaf *et al.* 1989 popisuje sání na člověku až v 99,4 %. Zbýlých 0,6 % tvořila krev z více zdrojů, člověk-pes, člověk-krysa, člověk-pták, ale člověk byl ve všech vzorcích přítomen.

Vysoký stupeň antropofilie ukazuje i studie Ershadi *et al.* 1995, v níž *P. papatasi* sál na lidech v 29,4 – 44,6 %. Zbylou část pak tvořili v 8,4 % psi, v 0,6 % krávy, v 3,8 % mix člověk-

kráva a 0,9 % tvořil mix člověk-pes. Tyto studie tedy popisují značnou ochotu tohoto flebotoma sát na lidech. Jiné práce však popisují *P. papatasi* jako druh sající ve větší míře spíše na ptácích než lidech. Javadian *et al.* 1977 určili v 57 % jako zdroj krve ptáky, a to zejména kuřata a holuby. Člověk byl napadán pouze v 12,7 %, ostatní podíl tvořila domácí zvířata (koně, kozy, ovce, krávy). Důvodem proč flebotomové v této studii sáli tak málo na lidech může být skutečnost, že lidé v této oblasti používají na noc ochranné sítě. Tato studie ukázala ještě jednu velmi zajímavou věc. *P. papatasi*, sál 4krát častěji na kuřatech než holubech, přestože je v této oblasti holubů mnohokrát více. Je tedy možné mluvit o jakési preferenci určitého ptačího druhu (Javadian *et al.* 1977). To, že *P. papatasi* saje velmi ochotně na ptácích, potvrzuje i práce Bongiorno *et al.* 2003, kde v 70 % sál právě na ptácích, následně v 26,5 % na koních a ve 3 % na psech. Žádný z testovaných vzorků nebyl však pozitivní na lidskou krev.

Druhým velmi rozšířeným a hojně studovaným druhem je *Phlebotomus sergenti*, hlavní přenašeč *Leishmania tropica* (Killick-Kendrick *et al.* 1999). Tento druh se vyskytuje hojně ve volné přírodě, v jeskyních a různých štěrbinách. Svobodová *et al.* 2003 zjistila, že *P. sergenti* v 68 % na drůbeži. Oba druhy, *P. sergenti* i *P. papatasi*, sáli také často na ostatních domácích zvířatech a dále pak hlodavcích. Zejména sání na hlodavcích může být velmi zajímavé pro epidemiologii kožní leishmaniózy. Zatímco role drůbeže při přenosu kožní leishmaniózy je nejasná, sání na drůbeži má zajisté značný vliv na početnost flebotomů, neboť slepičárny představují výborné podmínky pro flebotomy jako líhniště. Zvyšují tak nepřímo možnost přenosu. Drůbež může mít však na přenos z medicínského hlediska i pozitivní vliv. Komponenty ptačí krve, jádra erytrocytů, totiž inhibují vývoj *L. major* v *P. papatasi* (Schlein *et al.* 1983 dle Svobodová *et al.* 2003), proto nemůže být negativní efekt krve z kuřete na *L. tropica* vyloučen ani u *P. sergenti*.

Dalším důležitým přenašečem v této oblasti je *Phlebotomus perfiliewi*. I tento druh se běžně vyskytuje v blízkosti lidských obydlí, ve stájích, chlévech apod. Není to druh často sající na lidech, jeho role bude však přenos onemocnění mezi rezervoárovými zvířaty (Sawalha *et al.* 2003). Přesto je *P. perfiliewi* popsán jako osvědčený přenašečem *L. infantum* v Mediteránní oblasti (Bettini *et al.* 1986 dle Bongiorno *et al.* 2003; Maroli *et al.* 1987). Ani tento druh nevykazuje žádnou zvláštní

hostitelskou preferenci. V 80 % sál na kravách a ve 20 % na kuřatech (Velo *et al.* 2005). Ve dvou případech byla u *P. perfliewi* identifikována smíšená krev z člověka a ze psa (Bongiorno *et al.* 2003). Ani tento druh tedy není orientován jen na ptáky nebo savce a je oportunistický. Corradetti 1936 (dle Bongiorno *et al.* 2003) popsal, že *P. perfliewi* nesál na ovcích a prasatech, ale preferoval krávy a lidi. *P. perfliewi* je tedy druh sající ochotně na domácích zvířatech, v menší míře je ale schopen napadat i lidi.

Posledním pro nás velmi důležitým druhem je *Phlebotomus tobbi*, který je podezřelý z přenosu kožní leishmaniózy (Sawalha *et al.* 2003), ale i *L. infantum* způsobující viscerální leishmaniózu, právě v Mediteránní regionu (Chaniotis *et al.* 1996). Spolu s *P. papatasi* je nejhojnějším druhem během suchých měsíců (července). Velmi často se nachází ve zvířecích chlévech, přes den odpočívá v domech a stájích a je to druh endofilní (Sawalha *et al.* 2003).

O hostitelských preferencích *Phlebotomus tobbi* není mnoho známo. Podrobnou studii hostitelských preferencí založenou na identifikaci krve pomocí metody ELISA vypracoval Velo *et al.* 2005. *P. tobbi* sál v 50 % na kravách, v 25 % na kuřatech a v 25 % na psech.

Z uvedeného je vidět, že *P. tobbi* je také druh využívající široké spektrum hostitelů, savčích ale i ptačích.

Všechny výše jmenované druhy se uplatňují nebo mohou uplatnit v přenosu leishmanózy a právě studium hostitelských preferencí nám může napomoci pochopit epidemiologickou situaci, v té které konkrétní oblasti s výskytem leishmaniózy.

## Praktická část

Jak vyplývá z literárního přehledu, který je hlavní částí této bakalářské práce, je stanovení hostitelských preferencí důležitou součástí epidemiologických studií. V praktické části jsme se proto zaměřili na určení hostitelské specifity u rodu *Culex* (přenašečů WNV) v ČR a flebotomů (přenašečů leishmaniozy) v Turecku.

Po řadě předběžných pokusů a testování různých metod zaměřených na identifikaci krve z přenašečů, jsme se rozhodli pro využití sekvenace cyt B mt DNA, současně však i nadále testujeme metodu PCR-RFLP zaměřenou na amplifikaci D-loop mt DNA.

## Metodika

V sezóně 2005 a 2006 jsme prováděli odchyty komárů v jižních Čechách (Písecko, Českobudějovicko) a na jižní Moravě (Mikulovsko). Ke zjištění hostitelských preferencí potencionálních přenašečů WNV, tedy hlavně druhů *Culex modestus* a *Culex pipiens pipiens* používáme sentinelových hostitelů (pták versus savec). Odchyty jsme prováděli pomocí slepic, křepelek a králíků. Umístěny byly vždy dvě dvojice klecí a v každé z nich byly dva kusy sentinelových hostitelů. Ke každé kleci jsou umístěny dvě CDC (Center for Diseases Control) odchytové pasti. Klece a pasti jsou pověšeny na předem vytipovaných lokalitách, kde již dříve proběhl odchyt pomocí CO<sub>2</sub> pastí a kde byl potvrzen výskyt námi sledovaných přenašečů, tedy v rybníčnatých oblastech s hustým porostem rákosin. K odchytnům dochází na večer, během noci a brzy zrána, kdy je aktivita přenašečů nejvyšší. Během odchytnů je dbáno na to, aby podmínky byly pokaždé přibližně stejné, tzn. je udržována standardní vzdálenost mezi klecemi, výška zavěšení a přístup k oběma hostitelům. Odchycení komáři jsou determinováni a získaná data jsou následně statisticky zpracována.

Pro odchyt komárů včetně nasátých samic používáme CDC pastí, kde slouží jako atraktans CO<sub>2</sub> uvolňovaný z termosek naplněných suchým ledem. Nasáté samice jsou bezprostředně po

odchytu determinovány. Následně vypitvány a obsah střeva s tráveninou je nasát do filtračních papírků (Watman No 3) a uložen v -20 °C nebo -70 °C.

Z filtračních papírků s krví v různém stupni natrávení je pomocí fenol-chloroformové extrakce vyizolována DNA (od izolace DNA pomocí KITU jsme upustili z důvodu její nižší výtěžnosti a vyšší finanční náročnosti). Dalším krokem je PCR reakce, kde je pomocí vhodných primerů L 14841(reverse) + H 15149 (forward) amplifikována část cytochromu B mitochondriální DNA. Produkt PCR je vizualizován na agarózové gelové elektroforéze přidáním ethidium bromidu. Produkt je vyříznut, izolován z gelu pomocí QIA a připraven k osekvenování (3100 Avant Genetic Analyzer s 50 cm kapilárou). Porovnáním nukleotidové sekvence s databází (BLAST v knihovně NCBI) získáme druh hostitele, na kterém daný přenašeč sál.

Naší další snahou byla kolonizace rodu *Culex modestus* a zavedení jeho laboratorního chovu. Kolonizace se v sezóně 2006 pravděpodobně zdařila a bylo potvrzeno, že rod *Culex modestus* je autogenní (tzn. schopný naklást první snůšku bez předchozího sání) a stenogamní (tzn. schopný kopulace v uzavřených prostorech). V budoucnu by bylo možné tento chov využít pro sledování hostitelských preferencí v laboratorních podmínkách nebo ve virologických laboratořích pro experimentální přenos WNV a sledování chování viru v těchto přenašečích.

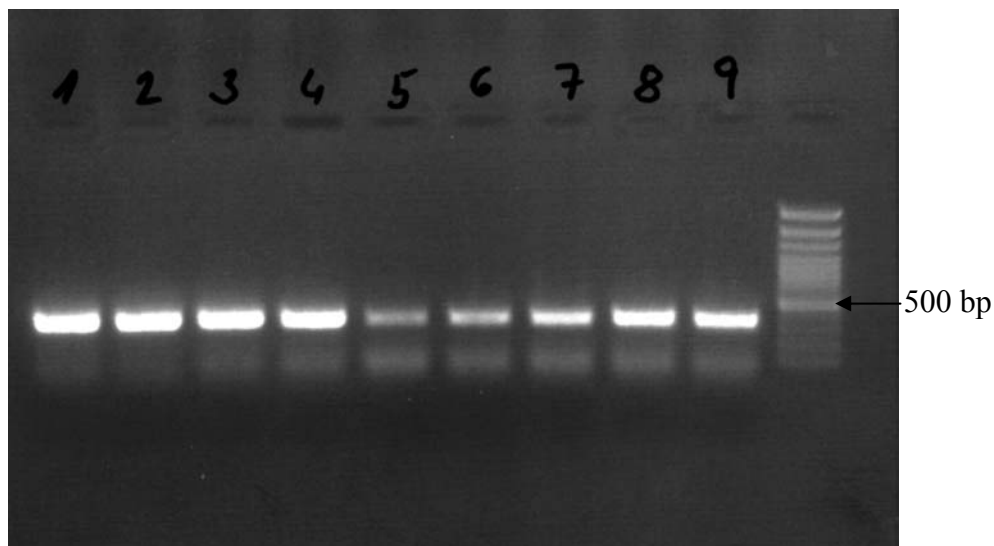
V sezóně 2006 jsme prováděli odchvy i v tzv. transektové linii. CDC pasti, kde jako atraktans slouží CO<sub>2</sub>, jsou umístěny v řadě za sebou, ale každá z nich je v trochu jiném biotopu (tj. od center rákosin přes okraje vodních porostů až po přilehlé ekosystémy – louky, pole, lesy). Důvodem tohoto uspořádání je zjistit, jak daleko od místa líhniště, jsou možní přenašeči WNV ochotni zaletovat za potravou a jaká je tedy pravděpodobnost nákazy a míra rizika přenosu infekce na člověk v závislosti na biotopu. Tyto výsledky však nejsou dosud zpracovány.

## Výsledky a diskuse

### Stanovení citlivosti

V rámci stanovení citlivosti námi vybrané metody (seq. cytB mt DNA) jsme zhotovili tzv. časovou škálu. Experimentálně nasáté samice *Culex quinquefasciatus* a *Lutzomyia longipalpis* jsme každý den od doby nasátí po dobu defekace postupně pitvali, obsah střeva nasáli do filtračního papíru a uložili do -20 °C. Chtěli jsme zjistit, jak dlouho po sání budeme schopni pomocí metody sekvence cytB mt DNA krev ze střeva přenašeče identifikovat.

Časová škála prokázala, že jsme krev identifikovat až do doby defekace, tedy u *Culex quinquefasciatus* do 3 dnů po nasátí a u *Lutzomyia longipalpis* 6 dnů po nasátí. Citlivost vybrané metody je tedy vysoká a je schopna zachytit DNA hostitele i ze značně natrávené krve. Na citlivost této metody poukazuje i to, že např. identifikace pomocí metody ELISA je možná se 100 % úspěšností pouze 2 dny po sání (Gomes *et al.* 2001). Metoda PCR-HDA je schopna určit zdroj krve u muchniček do 3 dnů po sání a u komárů do 7 dnů po sání, citlivost je tedy s naší metodou srovnatelná.



**Obrázek 1: Stanovení citlivosti metody PCR – cyt B mt DNA.**

Linie 1–7 zobrazují 0–6 den po sání *Phlebotomus dubosqi* na myši; linie 8 je *Phl. dubosqi* nasátý na člověku 2 dny po sání; linie 9 je *Phl. dubosqi* nasátý na damanovi 2 dny po sání.

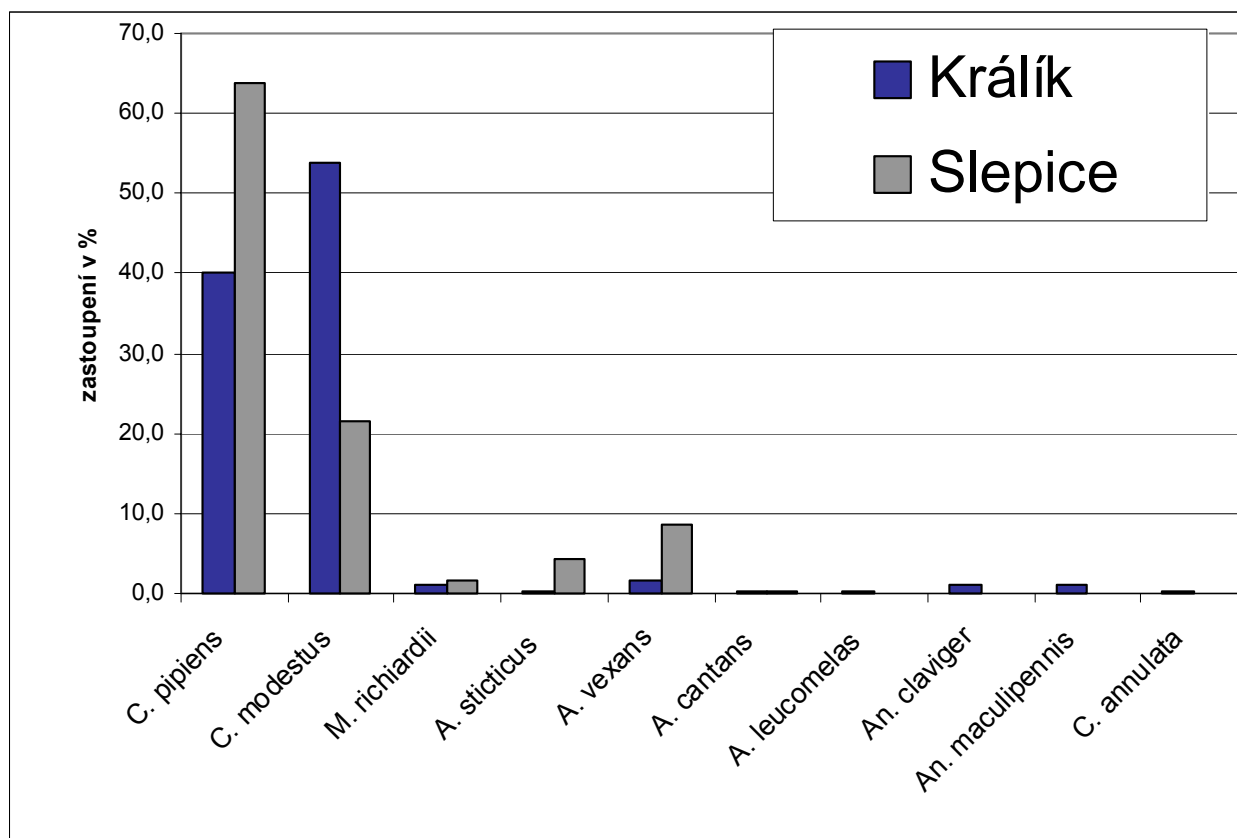
## Vyhodnocení odchyť v sezóně 2005

V sezóně 2005 jsme prováděli odchyty na 4 lokalitách na Českobudějovicku a Písecku.

Chytali jsme na sentinelové hostitele (králíka a slepici). Za 7 nocí jsme nachytali celkem 626 jedinců (viz tabulka) s průměrným počtem 48 komárů za noc na slepici a počtem 42 komárů za noc na králíka.

**Tabulka 1: Odchyť na sentinelové hostitele (2005)**

Druh komára	Králík	Slepice
<i>Culex pipiens</i>	117	213
<i>Culex modestus</i>	157	72
<i>Mansonia</i>	3	5
<i>Aedes sticticus</i>	1	14
<i>Aedes vexans</i>	5	29
<i>Aedes cantans</i>	1	1
<i>Aedes leucomelas</i>	1	
<i>Anopheles claviger</i>	3	
<i>Anopheles maculipennis</i>	3	
<i>Culicela</i> sp.	1	



**Graf 1: Odchyty na sentinelové hostitele (2005)**

Na grafu 1 a tabulce 1 je vidět opačný trend v hostitelských preferencích druhu *Culex pipiens* a druhu *Culex modestus*. *Culex pipiens* preferoval spíše slepice, oproti tomu *Culex modestus* naopak králíky. Při výsledném porovnání druhového složení u obou sentinelů (savec versus pták) jsme ověřili, že *Culex modestus* je druh sající jak na ptácích tak savcích a ochotně saje i na člověku (zjištěno pomocí odchytnů na člověka v rákosinách).

*Culex pipiens*, druhý majoritní zástupce na všech námi sledovaných lokalitách, je na rozdíl od druhu předešlého v literatuře popisován především jako druh ornithofilní (Apperson *et al.* 2002, 2004; Ngo a Kamer 2003; Jaenson 1999). Na základě našich výsledků je však patrné, že naše populace *Culex pipiens* poměrně ochotně nalétají i na savčí hostitele, což se může projevit snadnějším přenosem různých onemocnění ptáků na člověka, včetně West Nile viru.

## Identifikace krve u flebotomů

Náš další výzkum je soustředěn na určení hostitelských preferencí flebotomů z Turecka z oblasti Çukurova v jihovýchodní Anatolii. Důvodem je vysoký výskyt kožní leishmaniózy v této oblasti a neznalost rezervoárových hostitelů. I zde dochází k sezónním odchytnům pomocí CDC pastí, kde však jako atraktans slouží světlo.

V současně době probíhá identifikace krve z nasátých samic rodu *Phlebotomus* přivezených právě z této oblasti. Prozatím byla identifikována krev z 30 nasátých samic. Ve 25 případech šlo o druh *Phlebotomus tobbi*, kde byla jako zdroj krve zjištěna kráva (*Bos taurus*) a v jednom případě myš (*Mus musculus*) a člověk. Dále byla krev identifikována u jednoho *Phlebotomus papapatasi*, kde byla zdrojem krve kráva. U dvou druhů, které se nepodařilo determinovat, byla hostitelem také kráva.

S největší pravděpodobností bude tedy *P. tobbi* oportunní druh, který bude ochotný sát na všech dostupných ptácích i savcích. Pro konečné stanovení epidemiologické situace v ohnisku leishmaniózy v oblasti Çukurova je však potřeba další intenzivní výzkum.

Dosavadní výsledky tedy naznačují nejen vhodnost použitých metod, ale přinášejí i nové poznatky týkající se hostitelských preferencí a to jak komárů v Čechách, tak i flebotomů v ohnisku kutánní leishmaniózy v Turecku.



## Závěr

Určení hostitelských preferencí přenašečů je důležitou součástí každé epidemiologické studie. Zjištění hostitelské specifity, tedy určení na čem daný přenašeč saje v přirozených podmínkách, je předpokladem pro pochopení dynamiky cyklů přenosu, vytipování přírodního ohniska nemoci a veškerých interakcí mezi přenašečem a hostitelem.

Naší snahou je odpovědět na otázku, jak je to s výskytem a přenašeči West Nile viru v České republice. Z provedených odchytů na našem území je zřejmé, že hlavní přenašeč *Culex pipiens pipiens* je na našem území běžně rozšířen. Dle našich výsledků je naše populace *C. p. pipiens* nejen orthofilní, ale i vysoce mamaliofilní. Stejně tak druhý přenašeč, *Culex modestus*, se přestal na našem území vyskytovat pouze sporadicky, ale v některých oblastech je hojným až dominantním druhem (Písecko, Českobudějovicko, Mikulovsko). Jelikož se oba druhy jeví jako přenašeči schopní sát jak na ptácích tak savcích a dochází k jejich šíření na nové lokality, je výskyt West Nile viru a jeho přenos na savce, včetně člověka, v České republice velmi pravděpodobný.

Existuje mnoho způsobů, jak určit hostitelské preference přenašečů. Jako metody nejcitlivější a nejlépe použitelné se jeví metody molekulární, zejména pak metody založené na PCR. Proto i my jsme si pro náš výzkum zvolili metodu sekvenace PCR produktu cyt B mt DNA. Důvodem je její schopnost určit hostitele až do druhu a není omezená pouze na námi vytipované spektrum hostitelů jako metody imunologické. Její předností je i vysoká citlivost, neboť jsme díky ní schopni identifikovat krev ze střeva hostitele i ve značném stupni natrávení. Nevýhodou je její finanční náročnost a pracnost.

Druhým sledovaným problémem je výskyt přenašečů kožní, popřípadě viscerální leishmaniózy v Mediteránním regionu v oblasti Çukurova v Turecku. Zde se jako přenašeči různých leishmanióz uplatňují druhy *Phlebotomus papatasi*, *Phlebotomus sergenti*, *Phlebotomus perfiliewi* a *Phlebotomus tobbi*. Z uvedeného vyplývá, že všechny tyto druhy jsou oportunisté schopní sát na široké škále hostitelů od ptáků přes domácí zvířata až k člověku a jsou tedy schopni přenášet leishmaniózu na rozličné hostitele, včetně člověka.

Pro konečné stanovení epidemiologické situace, jak u West Nile viru v České republice, tak v ohnisku kutánní leishmaniózy v oblasti Çukurova je nutné intenzivně pokračovat ve výzkumu.

## Přehled použité literatury

1. Akman L, Aksu HSZ, Wang RQ, Ozensoy S, Ozbel Y, Alkan Z, Ozcel MA, Culha G, Ozcan K, Uzun S, Memisoglu HR, Chang KP (2000) Multi-site DNA polymorphism analyses of *Leishmania* isolates define their genotypes predicting clinical epidemiology of leishmaniasis in a specific region, *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47, 545-554
2. Andreadis TG, Anderson JF, Vossbrinck R (2001) Mosquito surveillance for West Nile virus in Connecticut, 2000: Isolation from *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. salinarus*, and *Culiseta melanura*, *Emerging Infectious Diseases* 7, 670-674
3. Apperson ChS, Harrison BA, Unnasch TR, Hassan HK, Irby WS, Savage HM, Aspen SE, Watson DW, Rueda LM, Engber BR, Nasci RS (2002) Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: *Culicidae*) in the borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* Mosquitoes, *Journal of Medical Entomology* 39, 777-785
4. Apperson ChS, Hassan H, Harrison BA, Savage HM, Aspen E, Farajollahi A, Crans W, Daniels TJ, Falco RC, Benedict M, Anderson M, McMillen, Unnasch TR (2004) Host feeding patterns of established and potential mosquito vectors of West Nile Virus in the Eastern United States, *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 4, 71-80
5. Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, Nowotny N (2005) Novel Flavivirus or new lineage of West Nile virus, Central Europe, *Emerging Infectious Diseases* 11, 225-231
6. Balashov YS (2003) Bloodsucking insect and ticks and mites, vectors of transmissible infections of humans and domestic animal, *Entomological Review* 85, 990-1007
7. Beaty BJ, Marquardt WC (1996) *The Biology of disease vectors*
8. Benedictis J, Chow-Shaffer E, Costero A, Clark GG, Edman JD, Scott TW (2003) Identification of the people from whom engorged *Aedes aegypti* took blood meal in Florida, Puerto Rico, using polymerase chain reaction-based DNA profiling, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 437-446
9. Boakye DA, Tang J, Truc P, Merriweather, Unnasch TR (1999) Identification of bloodmeal in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis, *Medical and Veterinary Entomology* 13, 282-287
10. Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M (2003) Host preferences of phlebotomine sand flies at hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy, *Acta Tropica* 88, 109-116

11. Boreham (1972) Serological identification of arthropod bloodmeal and its application, PANS 18, 205-209
12. Bosseno MF, Garsía LS, Baunaure F, Kasteen FL, Dumonteil E, Brenière SF, Gastelúm EM, Gutierrez MS (2006) Short report: Identification in Triatomine vectors of feeding sources and *Tryp. cruzi* variants, by heteroduplex assay and a multiplex miniexon polymerase chain reaction, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 74, 303-305
13. Braverman Z, Kitron U, Killick-Kedndrick (1991) Attractiveness of vertebrate host to *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) and other mosquitoes in Israel, Journal of Medical Entomology 28, 133-138
14. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ, Mitchell CJ (2002) Experimental infection of horses with West Nile virus, Emerging Infectious Diseases 8, 380-386
15. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ (2002) West Nile Virus, The Lancet Infectious Diseases 2, 519-529
16. Chaniotis B, Tselentis Y (1996) Water wells as a habit of sand fly (Diptera: Psychodidae) vectors of visceral leishmaniasis in Greece, Journal of Medical Entomology 32, 269-270
17. Clausen PH, Aedeiyemi I, Bauer B, Breloeer M, Salchow F, Staak C (1998) Host preferences of tsetse (Diptera: Glossinidae) based on bloodmeal identifications, Medical and Veterinary Entomology 12, 169-180
18. Cupp EW, Zhang D, Yue X, Cupp M, Guyer C, Sprenger TR, Unnasch TR (2004) Identification of reptilian and amphibian blood meals from mosquitoes in an eastern equine encephalomyelitis virus focus in central Alabama, American Journal of Medicine and Hygiene 71, 272-276
19. Darbro JM, Harrington LC (2006) Bird-baited traps for surveillance of West Nile mosquito vectors: Effect of bird species, trap height, and mosquito escape rates, Journal of Medical Entomology 43, 83-92
20. Day JF (2005) Host- seeking strategies of mosquito disease vectors, Journal of the American Mosquito Control Association 21, 17-22
21. Durden LA, Mullen GR (2002) Medical and Veterinary Entomology
22. Ershadi MRY, Javadian E, Kannani A (1995) Host preferences pattern of phlebotomine sandflies of Borkhar rural district, Isfahan province, Iran, Acta tropica 60, 155-158

23. Fonseca, Dina, Keyhobadi, Nusha, Malcom, Cilin, Mehmet, Ceylan, Schaffer, Francis, Mogi, Motoyoshi, Fleischer, Robert, Wilkerson, Richard (2004) Emerging Vectors in the *Culex pipiens* complex, *Acta Tropica*, 155-158
24. Fyodorova MV, Savage HM, Lopatina JV, Bulgakova TA, Ivanitski A, Platonova OV, Platonov AE (2006) Evaluation of potential West Nile Virus vectors in Volgograd Region, Russia, 2003 (Diptera: Culicidae): Species composition, bloodmeal host utilization, and virus infection rates of mosquitoes, *Journal of Medical Entomology* 432, 552-563
25. Gomes L, Duarte R, Lima D, Diniz BS, Serrão ML, Labarthe N ( 2001) Comparison between precipitin and ELISA tests in the bloodmeal detection of *Aedes aegypti* (Linnaeus) and *Aedes fluviatilis* (Lutz) mosquitoes experimentally fed on feline, canine and human hosts, *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 96, 693-695
26. Gouteux JP, Noireau F, Staak C (1989) The host preferences of *Chrysops silaceus* and *C. dimidiata* (Diptera: Tabanidae) in an endemic area of Loa loa in the Congo, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83, 167-172
27. Gramiccia M, Gradoni L (2005) The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control, *International Journal for Parasitology* 35, 1169-1180
28. Granwehr BP, Lillibridge KM, Higgs S, Mason PW, Aronson JF, Campbell GA, Barrett ADT (2004) West Nile virus: where are we now?, *The Lancet Infectious Diseases* 4, 547-555
29. Gubler DJ (2001) Human arbovirus infections worldwide, *Annals New York Academy of Science* 951, 13-24
30. Hall RA, Scherret JH, Mackenzie JS (2001) Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Annals of New York Academy of Sciences* 951, 153-160
31. Higgs S, Snow K, Gould EA (2004) The potential for West Nile virus to establish outside of its natural range: a consideration of potential mosquito vectors in the United Kingdom, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*
32. Hubálek Z, Halouzka J (1996) Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe, *Acta Scientiarum Naturalium academiae scientiarum bohemia Brno* 30, 95
33. Hubálek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever-a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe, *Emerging Infectious Diseases* 5, 643-650
34. Hubálek Z, 2000, European experience with the West Nile Virus ecology and epidemiology: Could it be relevant for the New World? *Viral Immunology* 13, 415-426
35. Hubálek Z, Savage HM, Halouzka J, Juřicová Z, Sanogo YO, Lusk S (2000) West Nile Virus investigations in South Moravia, Czechland, *Viral Immunology* 13, 427-433

36. Hubálek Z, Zeman P, Halouzka J, Juřicová Z, Štovičková E, Bálková H, Šikutová, Rudolf (2002) Mosquito-borne viruses, Czech Republic, Emerging Infectious Diseases 11, 116-117
37. Jaenson TGT (1990) Vector roles of Fennoscandian mosquitoes attracted to mammals, birds and frogs, medical and Veterinary Entomology 4, 221-226
38. Javadian E, Tesh R, Saidi S, Nadine A (1977) Studies o the epidemiology of sandfly fever in Iran, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 26, 294-298
39. Kent RJ, Norris DE (2005) Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 17, 336-342
40. Killick-Kendrick (1999) The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies, Clinics in Dermatology 17, 279-289
41. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hetller D, Davis B, Bowen R, Bunning M (2003) Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus, Emerging infectious Diseases 9, 311-322
42. Komar O, Robbins MB, Klenk K, Blitvich BJ, Marleene NL, Burkhalter KL, Gubler DJ, Gonzálves G, Pena CJ, Peterson AT, Komar N (2003) West Nile virus transmission in resident birds, Emerging Infectious Diseases 9, 1299-1302
43. Kostiukov MA, Gordeeva ZE, Nemova NV, Daniiarov OA (1985) The lake frog (*Rana ridibunda*) – one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzikistan-a reservoir of the West Nile fever virus, Medical Parasitology (Moskva) 3, 49-50
44. Kramář J (1958) Fauna ČSR Komáři Bodaví – Culicinae, Nakladatelství Československé Akademie věd Praha
45. Lee JH, Hassan H, Hill G, Cupp EW, Higazi TZB, Mitchell CJ, Godsey MS, Unnasch TR (2002) Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction – heteroduplex analysis, The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66, 599-604
46. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT, Deubel V (2002) Introduction of West Nile virus in the middle east by migrating white storks, Emerging Infectious Diseases 8, 392 397
47. Malmquist B, Strasevicius D, Hellgren, Adler, PH, Bensch S (2004) Vertebrate host specificity of wild-caught blackflies revealed by mitochondrial DNA in blood, Proc. R. Lond. 271, 152 –155
48. Marra PP, Griffing S, Caffrey C, Kilpatrick AM, McLean R, Brand Ch, Saito E, Dupuis AP, Kramer L, Novak R (2004) West Nile Virus and wildlife, Bioscience 54, 393-402

49. Maroli, Gramiccia M, Gradoni L (1987) Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzziregion, Italy, Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81, 596-598
50. Medlock JM, Snow KR, Leach S (2005) Potential transmission of the West Nile virus in the British Isles: an ecological review of candidate mosquito bridge vectors, Medical and Veterinary Entomology 19, 2-21
51. Meece J, Reynolds CE, Stockwell PJ, Jenson T, Christensen JE, Reed KD (2005) Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment lenght polymorphism profile analysis of the cytochrome B gene, Journal of Medical Entomology 42, 657-667
52. Miller DL, Mael MJ, Baldwin Ch., Burtle G, Ingram D, Hines M, Frazier KS (2003) West Nile virus in farmed alligators, Emerging Infectious Diseases 9, 794-799
53. Minář J (1969) A contribution to the bioomy of *Culex modestus* Fic. (Diptera, Culicidae) in southern Moravia, Folia Parasitologica 16, 93-96
54. Moussieght (1978) *Culex Barradius modestus* Bibliographie, Entente Interdepartementale pour la demoustication du litoral Mediterranéen, 34030 Montpellier cedex France
55. Mukabana WR, Takken W, Knols BGJ (2002) Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers, TRENDS in Parasitology 18, 505-509
56. Murray MD (1969) The identification of blood meals in biting midges, (Culicoides: Ceratopogonidae), Annals of Tropical Medicine and Parasitology 64, 115-122
57. Murque B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP. Zeller H (2001) West Nile outbreak in horses in Southern France 2000: the return after 35 years, Emerging Infectious Diseases 7, 692-696
58. Njiokou F, Simo G, Mbida AM, Truc P, Cuny G, Herder S (2004) A study of host preference in tsetse flies using a modified heteroduplex PCR-based method, Acta Tropica 91, 117-120
59. Ngo KA, Kramer LD (2003) Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers, Journal of Medical Entomology 40, 215-222
60. Novák F (2002) Úvod do klinické biochemie, Karolinum
61. Ok UZ, Balcioglu C, Ozkan AT, Ozensoy S, Ozbel Y (2002) Leishmaniasis in Turkey, Acta Tropica 84, 43-48
62. Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N (2006) Effects of post-ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes, Experimental Parasitology 112, 232-236

63. Oshaghi MA, Chavshin AR, Vatandoost H, Yaaghoobi F, Mohtarami F, Noorjah N, Hasthemyadeh M, Moodaresi MH (2005) Effects of post ingestion and physical conditions on PCR amplification of host blood meal DNA in mosquitoes, Iranian Journal of Public Health 34, 12-19
64. Özbel Y, Turgay N, Ozensoy S, Ozbilgin A, Alkan MZ, Ozcel MA, Jaffe CL, Schnur L, Oskam L, Abranches P (1995) Epidemiology, diagnosis and control of leishmaniasis in the Mediterranean region, Annals of Tropical Medicine and Parasitology 89, 89-93
65. Özbel MA, Ozbel Y, Ozensoy S, Turgay N, Daldal N, Alkan MZ (1999) The current status of leishmaniasis in Turkey, epidemiology and control of leishmaniasis in central Eurasia, Y.Matsumoto (Ed.), Tokyo: Int. Press Editing Centre Incorporation, p. 27-30.
66. Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z (2000) Migratory birds and spread of West Nile virus in the western hemisphere, Emerging Infectious Diseases 6, 319-328
67. Rappole JH, Hubálek Z (2003) Migratory birds and West Nile virus, Journal of Applied Microbiology 94, 47S-58
68. Sádlová J (1999) The life history of *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), Acta Societatis Zoologicae Bohemicae 63, 331-366
69. Sardelis MR, Turell MJ, Dohm DJ, O'Guinn M (2001) Vector competence of selected north American *Culex* and *Coquillettidia* Mosquitoes for West Nile Virus, Emerging Infectious Diseases 7, 1018-1022
70. Sawaf BM, Mansour NS, El Said SM, Daba S, Youssef FG, Kenawy MA, Beier JC (1989) Feeding Patterns of *Phlebotomus papatasi* and *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae) in El Agamy, Egypt, Journal of Medical Entomology 26, 497-498
71. Sawalha SS, Shtayer MS, Khanfar HM, Warburg A, Abdeen ZA (2003) Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) of palestinian West Bank: Potential vectors of leshmaniasis, Journal of Medical Entomology 40, 321-328
72. Sejvar JJ (2003) West Nile Virus: An historical overview, The Ochsner Journal 5, 6-10
73. Späth J (2000) Feeding patterns of three sympatric tsetse species (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae) in the preforest zone of Côte d'Ivoire, Acta Tropica 75, 109-118
74. Staak C, Kämpe U, Korkowski L (1986) Species identification of blood-meals from tsetse flies (Glossinidae): Results 1979-1985, Tropical Medicine and Parasitology 37, 59-60
75. Steuber S, Abdel-Rady A (2005) PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meal from tsetse flies (Diptera: Glossinidae), Parasitology Research 97, 247-254

76. Svobodová M, Sádlová J, Chang KP, Volf P (2003) Short report: Distribution and feeding preference of the sand flies *Phlebotomus sergenti* and *P. papatasi* in a cutaneous leishmaniasis focus in Sanliurfa, Turkey, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 6-9
77. Taylor RM, Work TH, Hurlburt HS, Rizk F (1956) A study of ecology of West Nile Virus in Egypt, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5, 579-620
78. Tempelis Ch, Lofy MP (1963) Modified precipitin method for identification of mosquito blood-meals, *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 12, 825-831
79. Turell MJ, Dohm J, Sardelis R, O'Guinn, Andreadis TG, Blow JA (2005) An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus, *Journal of Medical Entomology* 42, 57-62
80. Torr SJ, Wilson PJ, Schofield S, Mangwiro TNC, Akber S, White N (2001) Application of DNA markers to identify the individual-specific hosts of tsetse feeding on cattle, *Medical and Veterinary Entomology* 15, 78-86
81. Velo E, Paparisto A, Bongiorno G, Di Muccio T, Khoury C, Bino S, Gramiccia M, Gradoni L, Maroli M (2005) Entomological and parasitological study on phlebotomine sandflies in central and northern Albania, *Parasite* 12, 45-49
82. Vinogradova EB (2000) *Culex pipiens pipiens* mosquitoes: taxonomy, distribution, ecology, physiology, genetics, applied importance and control, *Pensoft Parasitologica* No 2, Sofia-Moscow
83. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan Ch, Phellips M, Bresnitz E, Layton M (2001) Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000, *Emerging Infectious Diseases* 7, 654-658
84. Zimmermann JH, Abbassy MM, Hanafi HA, Beier JC, Dees WH (1988) Host-feeding patterns of mosquitoes (Diptera: Culicidae) in a Rural Village Near Cairo, Egypt, *Journal of Medical Entomology* 25, 410-412
85. Zinser M, Ramberg F, Willott E (2004) *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) as a potential West Nile virus vector in Tucson, Arizona: Blood meal analysis indicates feeding on both humans and bird, *Journal of Insect Science* 4, 20



**Příloha:****Přehled metod použitých k identifikaci krve z krevsajících členovců**

<b>Použitá metoda</b>	<b>Přenašeč</b>	<b>Autoři</b>
<b>Precipitační test a jeho modifikace</b>	flebotomové	Javadian <i>et al.</i> 1977
	komáři	Bull a King <i>et al.</i> 1923 <sup>(1)</sup>
	komáři	Reeves a Hammon <i>et al.</i> 1944 <sup>(4)</sup>
	komáři	Tempelis a Lofy <i>et al.</i> 1963
	komáři	Zimmerman <i>et al.</i> 1988
	komáři	Braverman <i>et al.</i> 1991
	komáři	Gomes <i>et al.</i> 2001
	komáři	Fyodorova <i>et al.</i> 2006
<b>ELISA a její modifikace</b>	flebotomové	Ngumbi <i>et al.</i> 1992 <sup>(6)</sup>
	flebotomové	Bongiorno <i>et al.</i> 2003
	flebotomové	Svobodová <i>et al.</i> 2003
	flebotomové	Velo <i>et al.</i> 2005
	komáři	Burkot <i>et al.</i> 1981 <sup>(4)</sup>
	komáři	Beier <i>et al.</i> 1988 <sup>(4)</sup>
	komáři	Chow <i>et al.</i> 1993 <sup>(3)</sup>
	komáři	Gomes <i>et al.</i> 2001
	komáři	Apperson <i>et al.</i> 2002
	komáři	Apperson <i>et al.</i> 2004
	komáři	Zinser <i>et al.</i> 2004
	muchničky	Hunter a Bayly 1991 <sup>(4)</sup>
	glosiny	Clausen <i>et al.</i> 1998
<b>Hemaglutinační test</b>	glosiny	Weitz 1960 <sup>(2)</sup>
	tiplicí	Murray 1969
<b>Komplement fixační test (CFT)</b>	glosiny	Staak <i>et al.</i> 1981 <sup>(2)</sup>
	glosiny	Staak <i>et al.</i> 1986
	ovádi	Gouteux <i>et al.</i> 1989
<b>CFT kombinovaný s metodou ELISA</b>	glosiny	Pant 1987 <sup>(5)</sup>
	glosiny	Späth 1999
<b>Imunofluorescence</b>	komáři	Gentry <i>et al.</i> 1967 <sup>(7)</sup>
	komáři	McKinney <i>et al.</i> 1972 <sup>(4)</sup>
<b>PCR (cyt B mt DNA)+ sekvenace</b>	komáři	Ngo <i>et al.</i> 2003
	komáři	Cupp <i>et al.</i> 2004
	komáři	Malmqvist <i>et al.</i> 2004
	komáři	Oshaghi <i>et al.</i> 2005
	muchničky	Kent <i>et al.</i> 2005
<b>PCR-RFLP</b>	komáři	Steuber <i>et al.</i> 2005
	glosiny	Meece <i>et al.</i> 2005

<b>Použitá metoda</b>	<b>Přenašeč</b>	<b>Autoři</b>
<b>Heterodulexová analýza (PCR-HDA)</b>	vzorky krve	Boakye <i>et al.</i> 1999
	vzorky krve	Njiokou <i>et al.</i> 2004
	komáři	Lee <i>et al.</i> 2002
	glosiny a muchničky	Apperson <i>et al.</i> 2002
	ploštice	Bosseno <i>et al.</i> 2006
<b>Genetické markery</b>	komáři	Gokool <i>et al.</i> 1993 <sup>(1)</sup>
	komáři	Replogle <i>et al.</i> 1994 <sup>(1)</sup>
	komáři	Koella <i>et al.</i> 1998 <sup>(1)</sup>
	komáři	Kreike <i>et al.</i> 1999 <sup>(1)</sup>
	komáři	Ansell <i>et al.</i> 2000 <sup>(1)</sup>
	komáři	Chow-Shaffer <i>et al.</i> 2000 <sup>(1)</sup>
	komáři	Mukabana <i>et al.</i> 2002
	glosiny	Coulson <i>et al.</i> 1990 <sup>(1)</sup>
	glosiny	Michael <i>et al.</i> 2001 <sup>(5)</sup>
	klišťata	Kirstein <i>et al.</i> 1996 <sup>(5)</sup>
	veš - muňka	Lord <i>et al.</i> 1998 <sup>(5)</sup>
	veš - muňka	Torr <i>et al.</i> 2001

(1) dle Mukabana *et al.* 2002

(2) dle Steuber *et al.* 2005

(3) dle Meece *et al.* 2005

(4) dle Ngo *et al.* 2003

(5) dle Oshaghi *et al.* 2005

(6) dle Gomes *et al.* 2001

(7) dle Roy *et al.* 1987