

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

*Myxoma virus* jako původce myxomatózy  
Bakalářská práce

2022

**Martina Kuchtíčková**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Martina Kuchtíčková**  
Osobní číslo: **C19251**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Myxoma virus jako původce myxomatózy**  
Téma práce anglicky: **Myxoma Virus As A Cause Of Myxomatosis**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o poxvirech a jejich významu.
2. Zpracujte literární rešerši o myxomatóze.
3. Zaměřte se zejména na možnosti diagnostiky původce myxomatózy, možnosti preventivní vakcinace.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.** v.r.  
děkan

LS.

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

## **Prohlašuji:**

Práci s názvem *Myxoma virus* jako původce myxomatózy jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Martina Kuchtíčková

**Poděkování:**

Děkuji panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za ochotu, pomoc, a především odborné vedení při zpracování této bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za jejich trpělivost a oporu, kterou mi poskytovali.

## **ANOTACE**

Hlavním cílem bakalářské práce je představení viru *Myxoma virus*, jako původce onemocnění myxomatóza. Toto onemocnění je známé již od roku 1896 a dodnes je smrtelnou hrozbou všech jedinců z čeledi zajícovitých. Na základě vědeckých publikací je v této bakalářské práci popsán jak samotný *Myxoma virus*, tak onemocnění myxomatóza, a to včetně diagnostiky, nebo historie. Čtenář se tedy může seznámit s pojmem viry, nebo se dozvědět taxonomické zařazení původce myxomatózy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Myxomatóza; *Myxoma virus*; onemocnění; virus; králík

## **TITLE**

*Myxoma virus* as a cause of myxomatosis

## **ANNOTATION**

The main goal of this bachelor thesis is to introduce the *Myxoma virus* as a causative agent of myxomatosis. This disease has been known since 1896 and is still a deadly threat to all individuals of the hare family. Based on scientific publications, this bachelor's thesis describes both the *Myxoma virus* itself and the infection with myxomatosis, including diagnostics, or history. The reader can therefore become acquainted with the concept of viruses or learn the taxonomic classification of the cause of myxomatosis.

## **KEYWORDS**

Myxomatosis; *Myxoma virus*; disease; virus; rabbit

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....                              | 9  |
| SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK .....                                | 11 |
| TERMINOLOGIE .....   | 12 |
| Úvod.....  | 15 |
| 1 Viry .....   | 16 |
| 1.1 Morfologie virů .....                                    | 16 |
| 1.2 Replikace a šíření virů.....                             | 17 |
| 1.3 Dělení virů.....   | 19 |
| 1.3.1 Obalené viry.....                                      | 20 |
| 1.3.2 Neobalené viry .....                                   | 21 |
| 1.3.3 DNA viry .....   | 21 |
| 1.3.4 RNA viry.....  | 21 |
| 2 Virový původce myxomatózy.....                             | 22 |
| 2.1 Čeleď <i>Poxviridae</i> .....                            | 22 |
| 2.2 Podčeleď <i>Chordopoxvirinae</i> .....                   | 24 |
| 2.3 Rod <i>Leporipoxvirus</i> .....                          | 24 |
| 2.4 <i>Myxoma virus</i> .....                                | 24 |
| 2.4.1 Proteiny <i>Myxoma viru</i> .....                      | 26 |
| 2.4.2 Viroreceptory <i>Myxoma viru</i> .....                 | 28 |
| 2.4.3 Inhibitory serinových proteáz <i>Myxoma viru</i> ..... | 28 |
| 3 Myxomatóza .....   | 29 |
| 3.1 Historie myxomatózy .....                                | 29 |
| 3.2 Onemocnění a jeho průběh.....                            | 30 |
| 3.3 Příznaky onemocnění .....                                | 34 |
| 3.4 Kmeny virového původce myxomatózy .....                  | 35 |
| 4 Terapie a prevence onemocnění myxomatózy.....              | 38 |
| 4.1 Heterologní vakcíny .....                                | 39 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.2   | Homologní vakcíny .....                            | 39 |
| 4.3   | Používané vakcíny ve veterinární praxi .....       | 40 |
| 4.3.1 | Vakcína Myroxen .....                              | 41 |
| 4.3.2 | Vakcína Pestorin mormyx .....                      | 41 |
| 4.3.3 | Vakcína Nobivac Myxo-RHD Plus .....                | 41 |
| 5     | Diagnostika a laboratorní průkaz Myxoma viru ..... | 43 |
| 5.1   | Technika izolace viru .....                        | 43 |
| 5.2   | Technika elektronové mikroskopie .....             | 43 |
| 5.2.1 | Technika negativního barvení.....                  | 46 |
| 5.2.2 | Technika zalévání pryskyřicí .....                 | 48 |
| 5.2.3 | Technika imunocytochemická .....                   | 49 |
| 5.3   | Polymerázová řetězová reakce .....                 | 50 |
| 6     | Závěr .....  | 55 |
|       | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....                    | 56 |



# SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

## Seznam obrázků

|  |    |
|--|----|
| <b>Obrázek 1</b> Příklady základních virových symetrií (upraveno dle Reece et al., 2014).....  | 17 |
| <b>Obrázek 2</b> Životní cyklus obaleného viru – replikace v hostitelské buňce<br>(upraveno dle Reece et al., 2010) .....                        | 18 |
| <b>Obrázek 3</b> Možnosti exprese virionu z buňky (Khare, 2019) .....  | 18 |
| <b>Obrázek 4</b> Lytický a lyzogenní cyklus v podání bakteriofága při šíření své DNA v buňce<br>bakterie (upraveno dle Reece et al., 2010) ..... | 19 |
| <b>Obrázek 5</b> Obalený a neobalený virus (upraveno dle Matthews et al, 2017).....  | 20 |
| <b>Obrázek 6</b> Infekční cyklus poxvirů v hostitelské buňce (upraveno dle Khare, 2019) .....  | 23 |
| <b>Obrázek 7</b> Ukázka tkání a orgánů králíka zasaženého myxomatózou (Kerr et al., 2017) .....  | 26 |
| <b>Obrázek 8</b> Giuseppe Sanarelli – italský bakteriolog (www.historyofvaccines.org) .....  | 29 |
| <b>Obrázek 9</b> Králík brazilský ( <i>Sylvilagus brasiliensis</i> ) (Dantas et al., 2016) .....   | 30 |
| <b>Obrázek 10</b> Dopad použití myxomatózy pro redukci počtu zajícovitých v Austrálii (upraveno<br>dle Di Giallonardo a Holmes, 2015).....       | 31 |
| <b>Obrázek 11</b> Králík infikovaný virem <i>Myxoma virus</i> (upraveno dle Rosell, 2019).....   | 31 |
| <b>Obrázek 12</b> Šíření původce myxomatózy v těle králíka (upraveno dle Mage et al., 2016) ....   | 32 |
| <b>Obrázek 13</b> Lymfatické uzliny jako místo šíření původce myxomatózy<br>(upraveno dle Spiesschaert et al., 2011) .....                       | 33 |
| <b>Obrázek 14</b> Přehled kmenů myxomatózy vniklých mutací v Evropě a Austrálii<br>(upraveno dle Kerr et al., 2017).....                         | 36 |
| <b>Obrázek 15</b> Možnosti aplikace vakcíny králíkům (www.dyntec.cz) .....   | 40 |
| <b>Obrázek 16</b> Schéma aparatury transmisního elektronového mikroskopu<br>(upraveno dle Yao a Prud'homme, 2020) .....                          | 44 |
| <b>Obrázek 17</b> Částice původce myxomatózy v cytoplazmě buňky pozorované v TEM<br>(upraveno dle Epstein et al., 1952) .....                    | 45 |
| <b>Obrázek 18</b> Počet částic <i>Myxoma virus</i> , zachycených v tenkém řezu myxomatózního tumoru<br>(upraveno dle Epstein et al., 1952) ..... | 45 |
| <b>Obrázek 19</b> Nezralé a zralé virové částice původce myxomatózy, pozorované v TEM<br>(upraveno dle Abade dos Santos et al., 2020) .....      | 46 |
| <b>Obrázek 20</b> Pipetování dle metody s kapslí (upraveno dle Blancett et al., 2017).....   | 47 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Obrázek 21</b> Poxvirus obklopený nepravidelnými tubuly vnější membrány po negativním barvení, zobrazený metodou TEM (upraveno dle Catroxo, 2009).....                             | 48 |
| <b>Obrázek 22</b> Vyzrálé a nevyzrálé viriony Myxoma viru, zobrazené za použití TEM (upraveno dle Catroxo, 2009).....   | 49 |
| <b>Obrázek 23</b> Poxvirus značený částicemi koloidního zlata, analyzovaný v TEM (upraveno dle Catroxo, 2009).....  | 49 |
| <b>Obrázek 24</b> Sada na elektroforézu s výsledkem elektroforézy (upraveno dle <a href="http://www.yourgenome.org">www.yourgenome.org</a> ).....                                     | 51 |
| <b>Obrázek 25</b> Elektroforeticky separované produkty PCR analýzy (Kwit et al., 2019) .....  | 51 |
| <b>Obrázek 26</b> Schéma obecného průběhu PCR-ELISA metody (upraveno dle Luk et al., 1997) .....  | 52 |
| <b>Obrázek 27</b> Proces metody Real-Time PCR se vzorkem RNA viru (upraveno dle Safiabadi Tali et al., 2021) .....  | 53 |
| <b>Obrázek 28</b> Grafický záznam metody Real-Time PCR cílená na gen M053 provedena s několika mutacemi Myxoma viru na zaječích buňkách (upraveno dle Águeda-Pinto et al., 2022)..... | 54 |

## Seznam tabulek

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabulka 1</b> Příklady původu virové membrány u vybraných virových čeledí (upraveno dle Navaratnarajah et al., 2008).....   | 20 |
| <b>Tabulka 2</b> Perioda objevu příznaků onemocnění myxomatóza u infikovaných jedinců po inokulaci virem <i>Myxoma virus</i> (upraveno dle Spiesschaert et al., 2011).....             | 35 |
| <b>Tabulka 3</b> Charakteristika stupňů virulence u onemocnění myxomatóza (upraveno dle Kerr et al., 2012).....  | 36 |
| <b>Tabulka 4</b> Rozlišení virulence u vybraných mutací virových kmenů původce myxomatózy (upraveno dle Kerr et al., 2012).....  | 37 |
| <b>Tabulka 5</b> Aktuálně používané vakcíny proti myxomatóze ve světě (upraveno dle Sutherland et al., 2021).....  | 39 |
| <b>Tabulka 6</b> Obecná doporučení pro vakcinaci králíků proti Myxoma viru pro vakcíny Myroxen a Pestorin mormyx (upraveno dle <a href="http://www.uskvbl.cz">www.uskvbl.cz</a> )..... | 41 |
| <b>Tabulka 7</b> Srovnání vybraných parametrů pro PCR metody (upraveno dle Sue et al., 2014)   | 52 |

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>BCL2</b>                   | B-buněčný lymfom 2   |
| <b>DNA</b>                    | Deoxyribonukleová kyselina   |
| <b>ELISA</b>                  | Enzymová imunosorbentní analýza ( <i>z angl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)                      |
| <b>IFN<math>\gamma</math></b> | Interferony $\gamma$   |
| <b>LU</b>                     | Virový kmen původce myxomatózy ( <i>Lausanne</i> )   |
| <b>MHC</b>                    | Hlavní histokompatibilitní komplex<br>( <i>z angl.</i> Major Histocompatibility Complex)                 |
| <b>MHC-II.</b>                | Hlavní histokompatibilitní komplex druhé třídy<br>( <i>z angl.</i> Major Histocompatibility Complex II.) |
| <b>mRNA</b>                   | Mediátorová Ribonukleová kyselina  |
| <b>MYXV</b>                   | <i>Myxoma virus</i>  |
| <b>PCR</b>                    | Polymerázová řetězová reakce ( <i>z angl.</i> Polymerase Chain Reaction)                                 |
| <b>RHD</b>                    | Virové Hemoragické Onemocnění ( <i>z angl.</i> Rabbit Hemorrhagic Disease)                               |
| <b>RNA</b>                    | Ribonukleová kyselina  |
| <b>SLS</b>                    | Australský kmen MYXV ( <i>z angl.</i> Standard Laboratory Strain)  |
| <b>TEM</b>                    | Transmisní Elektronový Mikroskop   |
| <b>TNF</b>                    | Tumor Nekrotický Faktor  |

## TERMINOLOGIE

|                           |  |
|---------------------------|--|
| <i>Adsorpce:</i>          | Hromadění látky na povrchu jiné látky  |
| <i>Apoptóza:</i>          | Programovaná buněčná smrt  |
| <i>Atenuovaná vakcína</i> | Vakcína obsahující živé mikroorganismy v nepatogenní formě                               |
| <i>Autonomní:</i>         | Stav, kdy je jednotka ovládána sama sebou  |
| <i>Blefaritida:</i>       | Zánět očních víček   |
| <i>Buněčné pučení:</i>    | Jeden z procesů dělení mateřské buňky  |
| <i>Dehydratace:</i>       | Ztráta vody a iontů  |
| <i>Denaturace:</i>        | Změna prostorové struktury molekuly, většinou doprovázena ztrátou její biologické funkce |
| <i>Edém:</i>              | Otok (edematózní = oteklý)   |
| <i>Ektoparazit:</i>       | Vnější parazit   |
| <i>Elongace:</i>          | Prodloužení, které může být jak patologického, tak fyziologického charakteru             |
| <i>Endocytóza:</i>        | Proces, kdy buňky vstřebávají materiál z vnějšího prostředí                              |
| <i>Epitop:</i>            | Oblast na antigenu, na kterou se váže protilátka   |
| <i>Exocytóza:</i>         | Proces, kdy buňka vylučuje částici směrem ke své membráně až k povrchu                   |
| <i>Exogenní:</i>          | Zevní  |
| <i>Exprimovat:</i>        | Vyjadřovat, nebo také prezentovat antigen na buněčný povrch                              |
| <i>Fibrom:</i>            | Nezhoubný nádor pojivé tkáně   |
| <i>Fotolýza:</i>          | Rozklad látky způsobený světlem  |
| <i>Genom:</i>             | Je veškerá genetická informace uložená v DNA, nebo RNA (u virů)                          |
| <i>Heterologní:</i>       | Sérum, které bylo získáno od jiného živočišného druhu, než jakému je podáno              |
| <i>Homologní:</i>         | Sérum, které bylo získáno od živočišného druhu, jakému je podáno                         |
| <i>Hyperplazie:</i>       | Stav, kdy dochází ke zmnožení buněk a následně i tkáně                                   |
| <i>Hypertrofie:</i>       | Stav, kdy dochází ke zvětšení buněk a následně i tkáně                                   |
| <i>Chemotaxe:</i>         | Pohyb buněk v určitém směru  |
| <i>Imunizace:</i>         | Proces, při kterém si jedinec vytvoří imunitní protilátky proti určité látce             |
| <i>Imunodeprese:</i>      | Stav snižování imunity, v důsledku působení určitého faktoru, či látky                   |
| <i>Imunomodulátor:</i>    | Jedná se o látku, která je schopna měnit imunitní odpověď                                |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <i>Inaktivace:</i>           | Proces potlačení aktivity mikroorganismu, látky atd  |
| <i>Inhibice:</i>             | Potlačení, či zpomalení procesů v organismu  |
| <i>Inkubační doba:</i>       | Čas od proniknutí infekčního původce do organismu do prvních nástupů klinických příznaků dané nemoci |
| <i>Inokulace:</i>            | Proces vpravení látky do organismu, např. očkování   |
| <i>Interference:</i>         | Vzájemné ovlivňování a prolínání látek   |
| <i>Intradermálně:</i>        | Aplikace látky do kůže, která se používá při některých typech očkování                               |
| <i>Kapénková nákaza:</i>     | Způsob přenosu choroboplodných zárodků, díky vyloučení hlenu, či aerosolu z dýchacích cest jedince   |
| <i>Kapsida:</i>              | Bílkovinné pouzdro virové částice  |
| <i>Komplementární:</i>       | Vzájemně se doplňující vtaž dvou látek   |
| <i>Konjunktivitida:</i>      | Zánět spojivek   |
| <i>Letální:</i>              | Smrtící  |
| <i>Léze:</i>                 | Oblast v orgánu, či ve tkáni, která je poškozena v důsledku nějakého zranění nebo onemocnění         |
| <i>Lokus:</i>                | Označení pro přesné místo na chromozomu  |
| <i>Lyofilizace:</i>          | Proces, při kterém dojde k vysušení, díky působení mrazu   |
| <i>Lýza:</i>                 | Stav, kdy se rozpadne buňka, nejčastěji v důsledku narušení její vnější membrány                     |
| <i>Marker:</i>               | Slouží k označení látky, či její pozice  |
| <i>Morfologie:</i>           | Vědní obor, zabývající se vnější stavbou organismu   |
| <i>Mutace:</i>               | Stav, ke kterému dojde v důsledku změny genetické informace  |
| <i>Nekróza:</i>              | Stav odumření části tkáně v důsledku přerušování cévního zásobení                                    |
| <i>Nezhoubný nádor:</i>      | Jedná se o nádor, který neprorůstá do svého okolí  |
| <i>Patogeneze:</i>           | Neodpovídající stav oproti zdravému organismu  |
| <i>Perinukleární oblast:</i> | Jedná se o oblast v okolí buněčného jádra  |
| <i>Proliferace:</i>          | Proces, kdy dochází k rychlému zmnožení skupiny buněk  |
| <i>Pseudosubstrát:</i>       | Látka, která se chová jako substrát s inhibiční funkcí   |
| <i>Pufř:</i>                 | Zjednodušeně se jedná o směs kyseliny a zásady   |
| <i>Reagencie:</i>            | Pomocná látka, která má schopnost vyvolat danou chemickou reakci                                     |
| <i>Receptor:</i>             | Bílkovina, která má schopnost na sebe vázat specifické molekuly                                      |
| <i>Replikace:</i>            | Proces, kdy dochází k vytvoření kopie, dle předlohy  |
| <i>Revakcinace:</i>          | Proces, kdy je nutné, aby jedinec znovu podstoupil očkování  |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <i>Secernovat:</i>        | Schopnost vylučovat tkáňové, či buněčné produkty  |
| <i>Septikémie:</i>        | Stav, kdy dochází k výskytu a rozsevu bakterií v krevním řečišti                                |
| <i>Subkutánně:</i>        | Aplikace látky pod kůži, nebo do podkoží, která se používá při některých typech očkování        |
| <i>Transkripce:</i>       | Proces, kdy dojde k přepisu genetické informace z DNA do mRNA                                   |
| <i>Vektor:</i>            | Nosič části nukleové kyseliny do cílové buňky   |
| <i>Vektorová vakcína:</i> | Do laboratorně pozměněného lokusu jednoho viru je vložen protein jiného virové nákazy, či kmene |
| <i>Virémie:</i>           | Stav, kdy dochází k výskytu a rozsevu virů v krevním řečišti                                    |
| <i>Virion:</i>            | Částice viru se schopností infikovat hostitelskou buňku   |
| <i>Virový tropismus:</i>  | Schopnost virů infikovat pouze ty buňky, které obsahují pro vir kompatibilní receptory          |
| <i>Virulence:</i>         | Schopnost mikroorganismu vyvolat infekci  |
| <i>Zoonóza:</i>           | Infekce, která se přirozeně přenáší mezi zvířaty  |

## Úvod

Tato práce je zaměřená na onemocnění myxomatóza a jejího virového původce *Myxoma virus*. Popisuje obecnou stavbu a funkci virů z všeobecného hlediska s bližším zaměřením právě na *Myxoma virus*. Dále jsou zde popsány specifikace myxomatózy jako onemocnění, prevence a možnosti diagnostiky. Informace o nemoci jsou doplněny o základní historické údaje.

Myxomatóza je onemocnění způsobené virem *Myxoma virus* z čeledi *Poxviridae* rodu *Leporipoxvirus*. Název je odvozen ze dvou řeckých slov, jimiž jsou *muxa* (mokvání) a *oma* (tumor). Virus myxomatózy známý také pod zkratkou MYXV je antigenně příbuzný s virem způsobujícím králičí fibrózu. Původce myxomatózy je druhově omezený a specifický vir, jelikož infikuje pouze zvířata z čeledi zajícovitých. Kmeny viru myxomatózy se vyskytují až na výjimky po celém světě. Virus je přenášen díky krev sajícímu hmyzu a členovcům, jako jsou komáři, blechy, klíšata, vši nebo roztoči. U králíků je nejvýznamnějším přenašečem blecha králičí (*Spilopsylla cuniculi*). Nákaza může proběhnout i kapénkovou formou.

Z historického hlediska byla nemoc popsána již v roce 1896. Od té doby na ni zahynulo velké množství zvířat. Divoce žijícím jedincům se podařilo si postupným vývojem navodit imunitu, která většině kmenů myxomatózy odolává, tudíž pro ně onemocnění není takovou hrozbou, jako pro králíky z chovů.

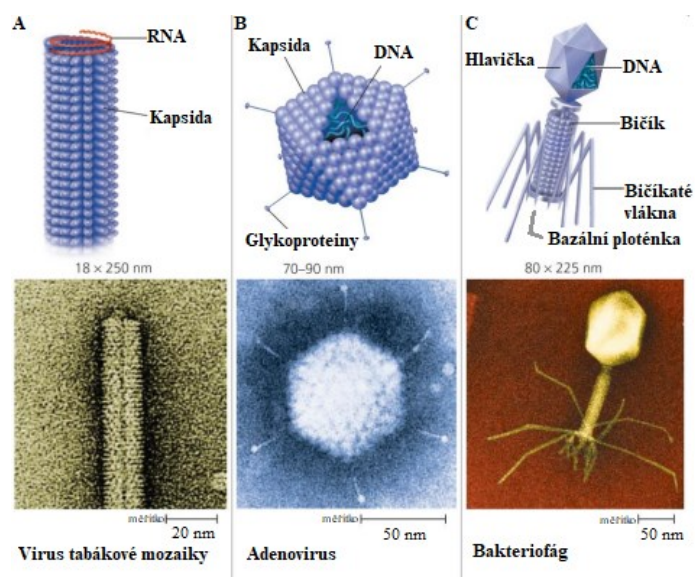
# 1 Viry

Viry jsou velice malé okem neviditelné částice. Jejich velikost se pohybuje přibližně mezi 20 až 300 nm (Khare, 2019). Viry jsou intracelulární parazité, kteří prakticky nedokáží přežít bez nějakého hostitele. Mimo hostitelskou buňku jsou tedy zpravidla neaktivní. Co se týče výběru hostitele, jsou viry velmi specifické. V praxi to například znamená, že vir, který napadá bakterie (bakteriofág) není schopen infikovat člověka (Matthews et al, 2017; McKeen, 2018). Ovšem existují i výjimky, u kterých se vědci domnívají, že díky své mutaci dokázaly tuto druhovou specifickou překonat. Jeden ze zástupců virů, u kterých se tato vlastnost předpokládá, je nám velice dobře známý. Jedná se o virus HIV (Matthews et al, 2017). „Vybíravost“ viru může fungovat kromě druhu hostitele i na samotné typy buněk v hostiteli. Tato funkce je u virů označována jako takzvaný tropismus. Tropismus u virů znamená to, že infikují pouze ty buňky, které obsahují pro vir kompatibilní receptory. Pokud narazí virus na buňku bez vhodných receptorů, nebude ji infikovat. Přímo do buňky se vir dostane například endocytózou nebo buněčnou fúzí (Khare, 2019; Roldão et al., 2011).

## 1.1 Morfologie virů

Viry jsou svou stavbou velmi jednoduché. Skládají se pouze z genomu a kapsidy (virový obal z proteinů). Některé viry navíc disponují také lipidovou vrstvou. Virový genom se skládá z jednoho nebo více fragmentů jednovláknové nebo dvouvláknové RNA nebo DNA (Roldão et al., 2011). Virový genom kóduje všechny virově specifické geny potřebné pro virovou replikaci. Proteinová kapsida sbalí virový genom během replikace a přenesení jej do dalšího kola infekce. Když se virion (virová částice) nachází u hostitelské buňky, kapsida obvykle rozpozná specifický receptor, který pomáhá při vstupu do buňky. Jakmile je kapsida uvnitř hostitelské buňky, dochází k uvolnění virového genomu, aby mohla začít replikace. Sestavení kapsidových proteinů se řídí specifickým typem symetrie, která umožňuje malé proteinové jednotky sestavit se do větší částice. Proteinová kapsida může mít několik typů symetrií (viz obrázek 1). Příkladem jsou helikální symetrie (vláknitý virus), ikosaedrická symetrie (dvanáctistěnný virus) nebo se jedná o komplexní symetrii (bakteriofág) (Khare, 2019; Luo, 2008).



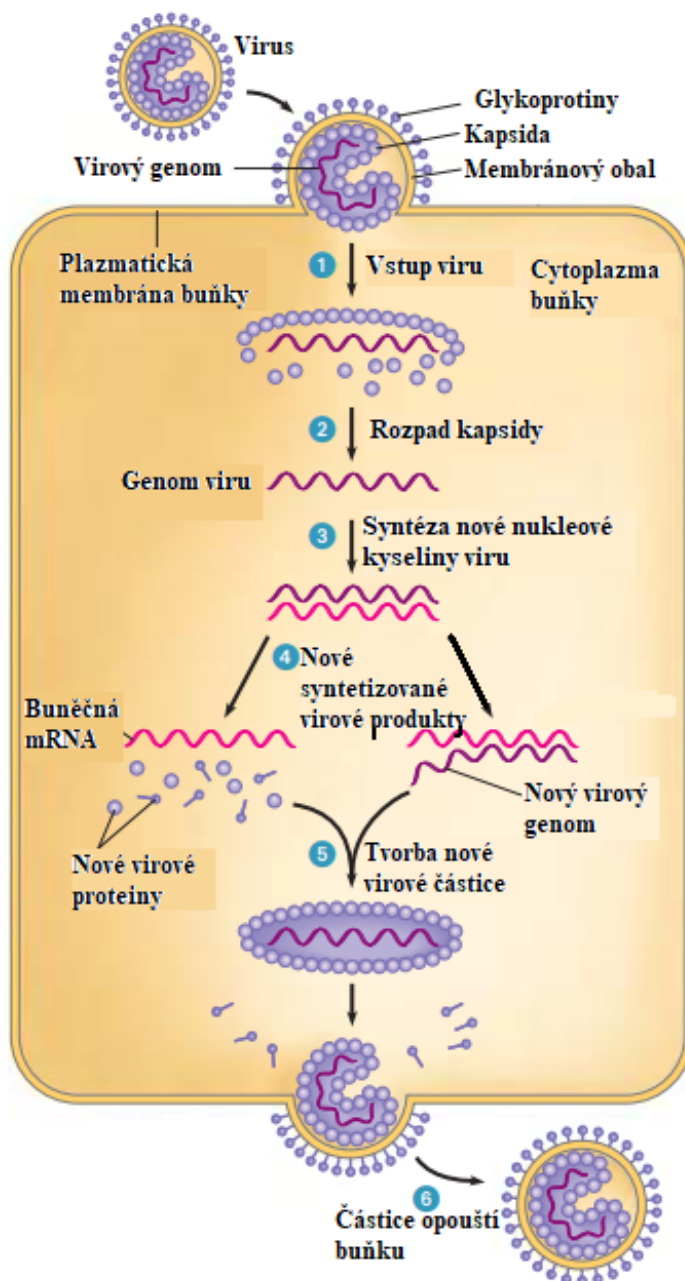


**Obrázek 1** Příklady základních virových symetrií (upraveno dle Reece et al., 2014)

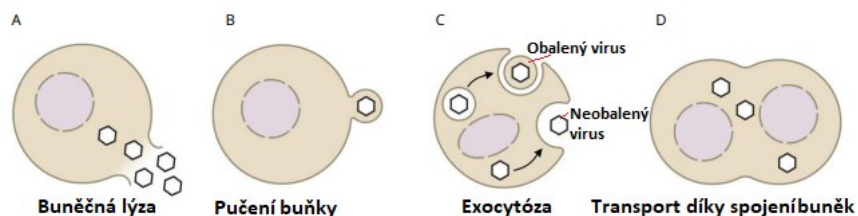
A – Helikální symetrie, B – Iksaedrická symetrie, C – Komplexní symetrie

## 1.2 Replikace a šíření virů

Virus se může replikovat pouze uvnitř živých buněk organismů. Životní cyklus viru je znázorněn na obrázku 2. Virus se přenese prostřednictvím přenašečů nebo nějakého vnějšího vlivu (vítr atd.) na hostitele. Nejprve se virus připojí k hostitelské buňce prostřednictvím interakce virového vazebného proteinu a receptoru hostitelské buňky. Následně začne virus napadat hostitelskou buňku. Vir nechá svou genetickou informaci (DNA nebo RNA) prostoupit dovnitř buňky. Proces rozmnožení viru v buňce závisí na bližším typu viru. Obecně však platí, že vir potřebuje mRNA, kterou využije k tvorbě nových virových infekčních částic (virionů). Začíná takzvaná inkubační doba, kdy hostitel slouží viru jako prostředník k pomnožení a je jen na imunitním systému hostitele, zda si zvládne s virem poradit nebo ne. Jakmile vir buňku už „nepotřebuje“ přesouvá se dál. Vypuzení virových částic z buňky nastává prostřednictvím buněčné lýzy, pučením, exocytózou, nebo specifickým transportem (viz obrázek 3). Pokud je množení viru zakončeno smrtí buňky, jedná se o lytický cyklus. U virů můžeme rozlišit ještě lyzogenní cyklus (viz obrázek 4), kdy se virus replikuje jako součást hostitelského genomu. Vir se může takto replikovat a přežívat velice dlouhou dobu a být přitom neaktivní. Po nějaké době se mohou aktivovat. Tímto způsobem fungují například viroví původci pásového oparu.

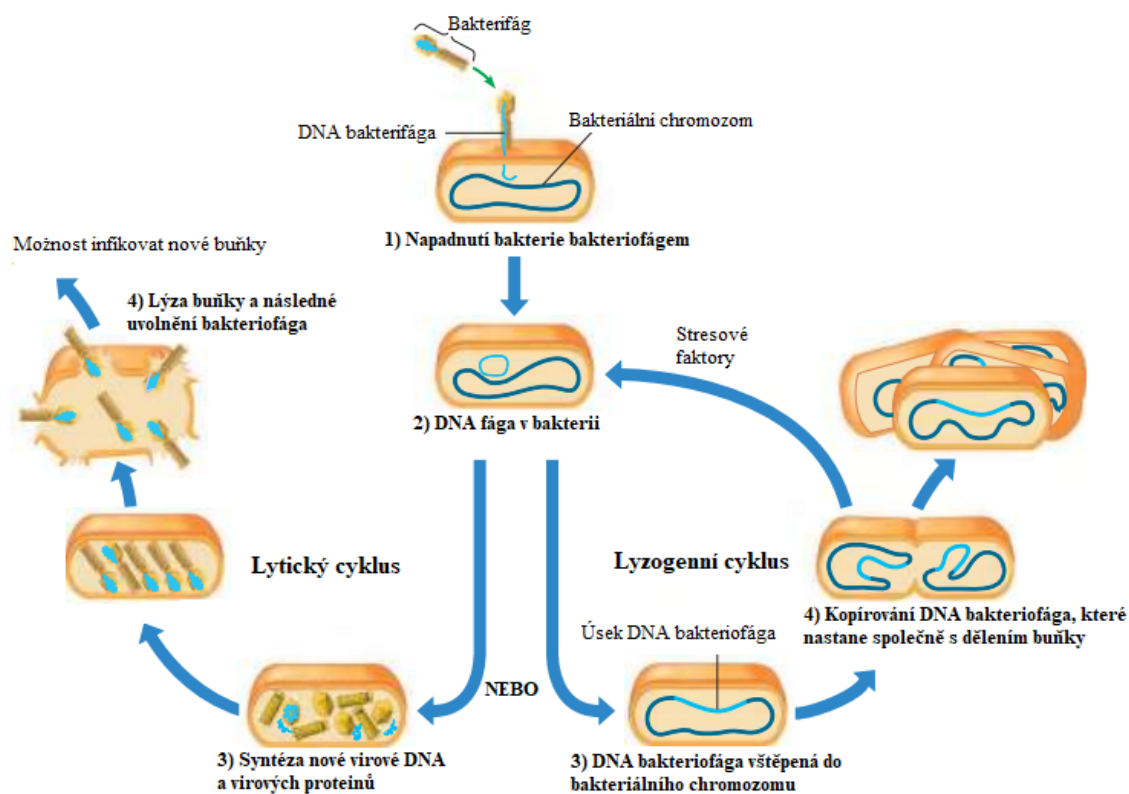


**Obrázek 2** Životní cyklus obaleného viru – replikace v hostitelské buňce  
(upraveno dle Reece et al., 2010)



**Obrázek 3** Možnosti exprese virionu z buňky (Khare, 2019)

A – Lýza buňky, B – Pučení buňky, C – Exocytóza buňky, D – Transport z buňky do buňky

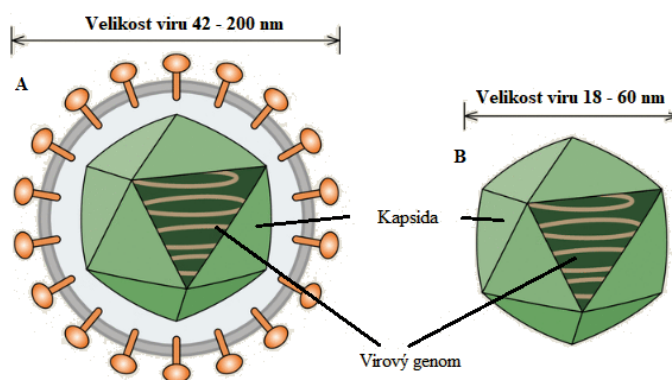


**Obrázek 4** Lytický a lyzogenní cyklus v podání bakteriofága při šíření své DNA v buňce bakterie (upraveno dle Reece et al., 2010)

Pokud vir není odhalen imunitním systémem příliš brzy, dochází k jeho zmnožení a průniku do většího množství buněk. Šíří se různými tělními tekutinami. Šíření viru pomocí krve se říká virémie. V této fázi se u infikovaného jedince mohou objevit první nespecifické příznaky, kterými jsou horečka, nevolnost atd. Různé viry vyvolávají různá onemocnění a každé onemocnění má i různou letálnost. Celý průběh a rychlost nakažení závisí na mnoha faktorech. Všeobecně však záleží na typu viru, jeho mutaci a na imunitní odolnosti hostitele (Khare, 2019).

### 1.3 Dělení virů

Viry se mohou dělit podle toho, jestli mají či nemají lipidovou vrstvu nebo na základě nukleové kyseliny v jejich genomu. Pokud rozlišujeme viry na základě přítomnosti lipidové dvojvrstvy, je řeč o obalených a neobalených virech (viz obrázek 5). Pokud se na viry díváme z pohledu jejich nukleové kyseliny, můžeme mluvit o RNA nebo DNA virech.



**Obrázek 5** Obalený a neobalený virus (upraveno dle Matthews et al, 2017)

A – Obalený virus s lipidovou membránou kolem své kapsidy, B – Neobalený virus s kapsidou

### 1.3.1 Obalené viry

Obalené viry mají vnější lipidovou dvojvrstvu (viz obrázek 5) z glykoproteinů a lipoproteinů (neobalené viry tuto vrstvu nemají). Přesné složení této vrstvy (membrány) se může lišit v závislosti na virovém druhu a buněčné části, ze které se membrána při replikaci viru odvodí (viz tabulka 1). Obalené viry infikují převážně živočišné buňky, i když je známo, že některé infikují rostliny či bakterie. Přítomnost lipidového obalu umožňuje obaleným virům opustit buňku, aniž by narušily buněčnou membránu, a proto vyžadují pro replikaci svých částic neporušenou buňku.

**Tabulka 1** Příklady původu virové membrány u vybraných virových čeledí  
(upraveno dle Navaratnarajah et al., 2008)

| Čeledi virů          | Původ virové membrány                                    |
|----------------------|--|
| <i>Poxviridae</i>    | Meziprostor endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu |
| <i>Retroviridae</i>  | Plazmatická membrána                                     |
| <i>Coronaviridae</i> | Meziprostor endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu |
| <i>Herpesviridae</i> | Jaderný obal   |
| <i>Flaviviridae</i>  | Endoplazmatické retikulum                                |

Uvnitř lipidové dvojvrstvy se pak nacházejí virové proteiny. Tyto proteiny poté zprostředkovávají interakci viru s buněčnými receptory a podpoří tak průnik viru do buňky. Kromě samotného průchodu mohou zmíněné proteiny přimět specifické hostitelské buněčné

proteiny, aby chránili virus před imunitním systémem. Tímto procesem si virus zvýší svou infekčnost (Navaratnarajah et al., 2008).

### **1.3.2 Neobalené viry**

Neobalené viry mají dvě základní složky, a to proteiny a nukleovou kyselinu. Proteiny tvoří obal zvaný kapsida, který obsahuje nukleovou kyselinu, kterou může být DNA nebo RNA. Jelikož neobalené viry druhý obal nemají, stávají se náchylnějšími k různým vlivům. Z hlediska odolnosti jsou tedy obalené viry odolnější oproti neobaleným (Navaratnarajah et al, 2008).

### **1.3.3 DNA viry**

DNA virus se replikuje pomocí DNA-dependentní DNA polymerázy. Tato skupina virů se dělí do tří kategorií. Jedná se viry s dvouvláknovou DNA, jednovláknovou DNA a pararetroviry (replikují se přes meziproducty RNA). Platí, že viry o velikosti nad 10 kilobází mají dvouvláknovou DNA. Menší viry ji mohou mít také anebo mohou mít kruhovou jednovláknovou DNA (Sanjuán et al., 2017).

### **1.3.4 RNA viry**

RNA viry replikují svůj genom pomocí virově kódované RNA-dependentní RNA polymerázy. Během replikace RNA virů se musí syntetizovat genomová mRNA. RNA viry lze rozdělit do skupin na základě typu jejich RNA, a to na pozitivní nebo negativní. RNA viry s pozitivním řetězcem zahajují svůj replikační řetězec syntézou proteinů. Jejich genom slouží zároveň jako mRNA. Pokud dojde u nově nasyntetizovaných genomů k chemické syntéze, budou po vstupu do nové vhodné buňky infekční. RNA s negativním řetězcem musí do hostitelské buňky dodat svou vlastní polymerázu pro syntézu virových proteinů nezbytných pro zahájení virové replikace (Sanjuán et al., 2017). Začínají svůj cyklus syntézou mRNA. Nově syntetizované genomy této podskupiny nemohou být po chemické syntéze infekční. Zajímavostí u RNA negativních virů je, že genom se často znázorňuje v diagramech s 3' koncem vlevo, což je v rozporu s obvyklým způsobem ilustrace řetězce nukleové kyseliny (Payne 2017).

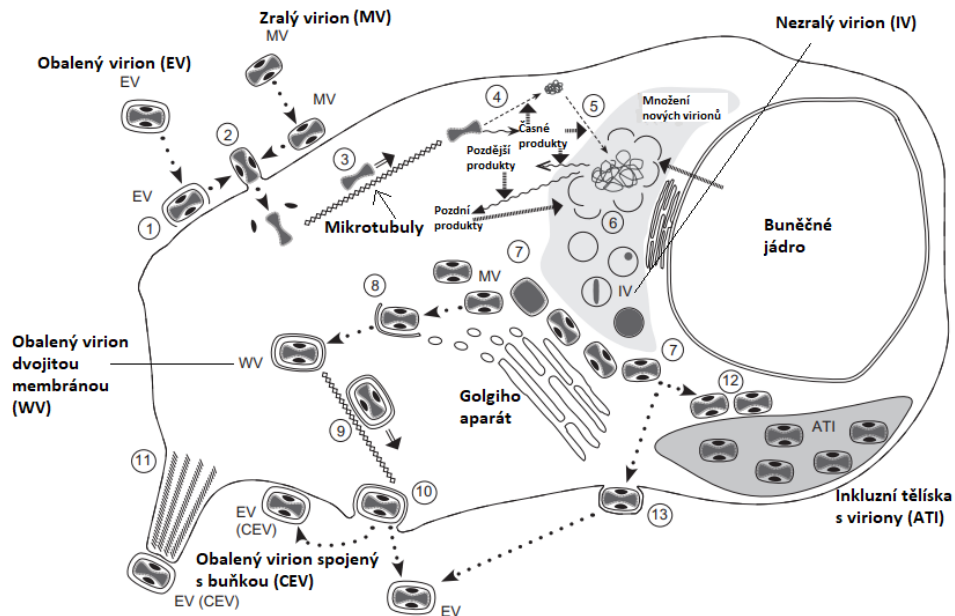
## 2 Virový původce myxomatózy

DNA *Myxoma virus*, původce onemocnění myxomatóza, patří do čeledi *Poxviridae* podčeledi *Chordopoxvirinae* a rodu *Leporipoxvirus*. Tímto virovým původcem a tím pádem i nákazou myxomatóza jsou ohroženi jedinci z čeledi zajícovitých. Myxomatóza se díky své druhové specifitě dokáže projevit pouze u těchto jedinců.

### 2.1 Čeleď *Poxviridae*

Čeleď *Poxviridae* zkráceně poxviry představuje skupinu velkých a převážně obalených dvouřetězcových DNA virů. Taxonomicky se do této čeledi řadí podčeledi *Chordopoxvirinae* a *Entomopoxvirinae* (Nencka et al., 2020; Smith et al., 2008).

Obecně jsou poxviry cihlového tvaru s rozměry 220-450 nm (délka) × 140-260 nm (šířka) × 140-260 nm (tloušťka). Dále jsou opatřeny lipoproteinovou povrchovou membránou. Podařilo se již prokázat i vejčitý tvar viru disponující povrchovou membránou s pravidelným spirálovým vláknem (King et al., 2011). Uvnitř poxvirů se nachází množství enzymů pro transkripci a replikaci DNA a řada faktorů virulence, jež umožňují vstup virovému původci do hostitele. Vstup poxvirů do buněk hostitele se dělí na dvě fáze. První fáze je připojovací a je zprostředkována prostřednictvím elektrostatických interakcí mezi virionem a částmi buněčného povrchu. V rámci první fáze následně dochází k připojení virionů k povrchu buňky hostitele. Nejvýznamnějšími částmi buněčného povrchu jsou zejména mukopolysacharidy a glykoprotein laminin. Druhou fází (fúzní/vstupní) se dodává virový genom do buněčné cytoplazmy, kde se vir replikuje. Fúze virové membrány s buněčnými membránami je zprostředkována multipodjednotkovým virovým vstupním komplexem, který obsahuje několik virových proteinů (Smith et al., 2008). Buňky infikované poxvirem produkují dva typy virionů, a to zralé a nezralé viriony. Tyto viriony mají jádro ve tvaru činky, které obklopují většinou dvě virové části s lipidovou membránou. Dále je možné rozlišit i proteinovou membránu, která se ale svým složením liší v závislosti na tom, zda se jedná o zralý nebo nezralý virion.



**Obrázek 6** Infekční cyklus poxvirů v hostitelské buňce (upraveno dle Khare, 2019)

Jednotlivá čísla v kolečku na obrázku 6 představují pořadí kroků při infekci hostitelské buňky a jsou blíže popsány v textu níže. Čísla kroků jsou uvedena v závorkách.

Při detailnějším pohledu na obrázek 6 je patrné, jak infekční cyklus probíhá. Nejprve (1) dochází k narušení virionového obalu u obalovaného virionu. Dojde k jeho navázání na buněčné povrchové receptory. Do buňky vstupuje už jako zralý virion. Pokud se již před vstupem jednalo o zralý virion, došlo ihned k fúzi dovnitř buňky s buněčnou membránou (2). Po fúzi se z virionu uvolní jeho genom s nukleonovou kyselinou. Genom je následně podél mikrotubulů (3) transportován do perinukleární oblasti infikované buňky. Začínají vznikat časné virové produkty, které jsou exprimovány (vlnité šipky) z genomu ven. Dále dochází k odkrytí nukleonové kyseliny (4) a k replikaci virové DNA (5). Následně vzniklé pozdější genové virové produkty zprostředkovávají pozdní genovou expresi. Produkty pozdních genů zahrnují strukturální proteiny, a to včetně polymerázy potřebné pro expresi časných genů. V dalším kroku se nové produkty virového genomu obklopují proteinovou membránou (6) a vznikají tak nezralé viriony. Ty dále dozrávají (7) na zralé viriony, které jsou dále transportovány (8) do Golgiho aparátu, kde dojde k obalení dvojitou membránou a tím ke vzniku obalených virionů. Obalené viriony jsou následně transportovány (9) k buněčnému povrchu, a to opět podél mikrotubulů. K opuštění buňky využijí viriony exocytózu (10). Obalený virion může zůstat na buněčném povrchu. V takovém případě se bude jednat o obalený virion spojený s buňkou. Takto spojený obalený virion může být vyvržen pryč od buňky (11), a to na špičkách buněčných výběžků řízených aktinem.

U některých poxvirů se vytvářejí v buňce inkluzivní tělíska, kde se zralé viriony uloží (12). Pokud se tato tělíska vytvoří, mohou se viriony dostat ven (13) z buňky pučením (Khare, 2019).

Mezi významnou antigenní vlastnost poxvirů se řadí zkřížená reaktivita. Zkřížená reaktivita znamená, že rozdílné antigeny sdílejí stejné epitopy (antigenní determinanty), což komplikuje následnou reakci specifických protilátek a tím i sérologickou diagnostiku (King et al., 2011). Tyto viry se již podařilo izolovat od hmyzu, plazů, ptáků, savců i vačnatců. Patří mezi ně mimo jiné i virus pravých neštovic. U celé řady poxvirů byla doložena přenosnost na člověka (Smith et al., 2008).

## **2.2 Podčeleď *Chordopoxvirinae***

Tato podčeleď zahrnuje kromě leproxvirů a také orthopoxviry, parapoxviry, avipoxviry, capripoxviry, suipoxviry, molluscipoxviry a yatapoxviry. Všechny zmíněné viry zaujmají cihlový nebo vejčitý tvar a jsou hrozbou pro obratlovce. Orthopoxviry, parapoxviry, molluscipoxviry a yatapoxviry představují hrozbu také pro lidi. Orthopoxviry jsou u lidí příčinou pravých neštovic. Parapoxviry způsobují onemocnění které se projevuje celkovou infekcí organismu. Molluscipoxviry zapříčiňují onemocnění zvané jako *molluscum contagiosum*, někdy také známé pod pojmem vodní bradavice. Posledním zde zmíněným rodem virů postihující kromě zvířecí populace i lidskou populaci, je čeleď yatapoxvirů, které způsobují nezhoubné nádory kůže (Rziha a Büttner, 2021).

## **2.3 Rod *Leporipoxvirus***

Viroví zástupci tohoto taxonomického rodu jsou omezeni hostitelem, a to pouze na druhy králíků (příkladem je právě původce myxomatózy) a veverek ze Severní a Jižní Ameriky. Myxoma virus se vyvinul společně s virem  *Shope fibroma virus*, jehož původními přenašeči byli králíci bavlíkoví (*Sylvilagus floridanus*). Bavlíkoví králík se přirozeně vyskytuje ve východní a severní části Ameriky. Leporipoxviry způsobují svému hostiteli malé fibromy (nezhoubné nádory pojivové tkáně) a léze (Barrett a McFadden, 2008).

## **2.4 *Myxoma virus***

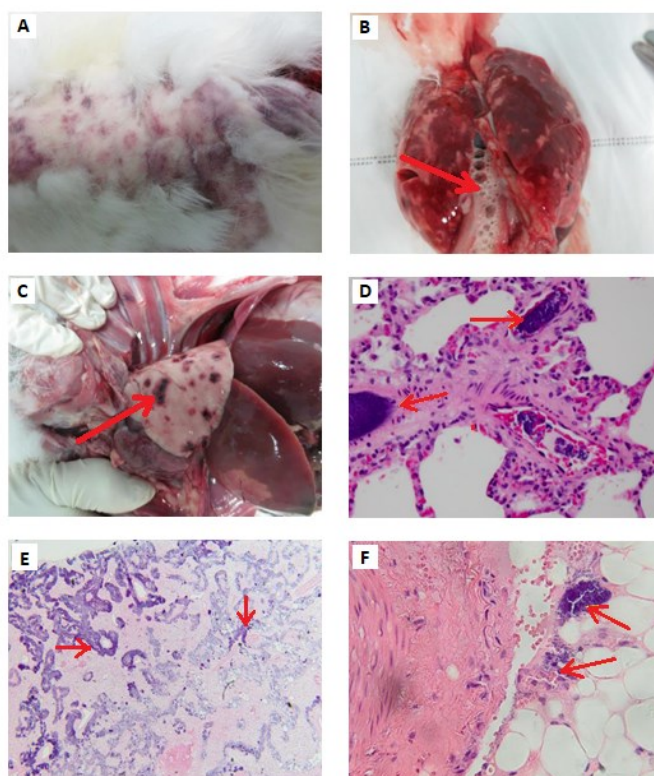
Virus myxomatózy tvoří dvouřetězcová DNA. Genomová DNA obsahuje určitý relativně stálý počet komplementárních párů bazí (bp). Dle některých publikací se hodnota těchto komplementárních párů bazí u myxoma virů uvádí jako 160 kbp. Viriony jsou cihlového



tvaru o velikosti přibližně 200-300 nm. Kapsida, sloužící jako pouzdro genomu, je složena ze 17 typově různých proteinů (King et al., 2011). Geny původce myxomatózy se vyvinuly v přirozených hostitelích *Sylvilagus* a postupně docházelo k jejich mutaci a adaptaci (Águeda-Pinto et al., 2022). Důležitou částí viru je gen M-T5, který kóduje významné proteiny účastnících se procesu replikace. Dále gen M141 R, který je nezbytný pro rozvinutí smrtelné infekce v hostiteli.

K hlavním faktorům virulence původce myxomatózy se řadí jeho schopnost kódovat proteiny a měnit tak rozsah imunitní odpovědi. Změna imunitní odpovědi probíhá prostřednictvím imunomodulátorů (MacLachlan a Dubovi, 2016). Imunomodulátory dokáží navodit apoptózu buňky, která je doprovázena chemotaxí (specifický pohyb) leukocytů. Chemotaxe podporuje samotné šíření a replikaci viru uvnitř hostitele (Nowland et al., 2015). K replikaci tohoto viru dochází v cytoplazmě buněk hostitele (Catroxo et al., 2009). Okamžitě po napadení hostitele oslabuje vir lymfocyty a narušuje jejich proliferaci (dělení). K tomuto jevu dochází již do 24 hodin od inokulace. Prokázalo se také snížení všech typů T-lymfocytů (např. CD4+, CD8+, atd.). Nejvíce byly zasaženy populace CD4+ T buněk. U B-lymfocytů rapidní pokles zaznamenán nebyl. Díky provedeným studiím a pokusům se zjistilo, že jakýkoli jiný hostitel, kromě čeledi zajícovitých si umí s virem poradit. Při těchto studiích bylo dokonce zjištěno, že některé druhy viru MYXV ztrácejí i u zajícovitých svou patogenitu. Jedná se o druhy vMyx-M135KO a vMyx-M063KO. Největší zajímavostí těchto druhů je jejich uplatnění v onkologii. Prokázaly se u nich onkolytické vlastnosti proti lidským nádorovým buňkám (Liu et al., 2010).

Myxoma virus se po inokulaci do králičí kůže začne replikovat v MHC-II. typu (glykoproteiny II. třídy). MHC-II jsou povrchové glykoproteiny, které se vyskytují na antigen prezentujících buňkách. Jedno z jejich nejvýznamnějších uplatnění je při aktivaci imunitní odpovědi, jelikož aktivují samotné T-lymfocyty, kterým produkují exogenní peptid. Právě díky tomuto peptidu T-lymfocyty po pohlcení antigenu poznají, že mají imunitní odpověď vyvolat. Jakmile se vir rozmnoží natolik, že je schopný se šířit dál, pokračuje jeho cesta přes pokožku do lymfatických uzlin. V posledním stádiu se rozšiřuje virus myxomatózy do celého těla (viz obrázek 7), a to pravděpodobně právě díky nakaženým lymfocytům (Kerr, 2021).



**Obrázek 7** Ukázka tkání a orgánů králíka zasaženého myxomatózou (Kerr et al., 2017)

A – Epidermální krvácení, které se vyvinulo v pokožce nakaženého jedince, B – Těžký plicní edém a průdušnice naplněné pěnivou tekutinou (označena šipkou), C – Plicní krvácení (označeno šipkou), D a F – Bakteriální infekce (vyznačeno šipkami), E – Lymfatická uzlina s bakteriální infekcí (šipky)

### 2.4.1 Proteiny Myxoma viru

Myxoma virus se po inokulaci do králíčí kůže začne replikovat v MHC-II. typu (glykoproteiny II. třídy). MHC-II jsou povrchové glykoproteiny, které se vyskytují na antigen prezentujících buňkách. Jedno z jejich nejvýznamnějších uplatnění je při aktivaci imunitní odpovědi, jelikož aktivují samotné T-lymfocyty, kterým produkují exogenní peptid. Právě díky tomuto peptidu T-lymfocyty po pohlcení antigenu poznají, že mají imunitní odpověď vyvolat. Jakmile se vir rozmnoží natolik, že je schopný se šířit dál, pokračuje jeho cesta přes pokožku do lymfatických uzlin. V posledním stádiu se rozšiřuje virus myxomatózy do celého těla (viz obrázek 7), a to pravděpodobně právě díky nakaženým lymfocytům (Kerr, 2021).

Příkladem proteinů s odvozenou funkcí jsou M156 a M029. U proteinu M156 se prostřednictvím studií prokázala strukturní podobnost s lidským eukaryotickým iniciačním faktorem 2a. M156 zastává funkci virového pseudosubstrátu pro proteinkinázu R, která za normálních okolností slouží k zabránění replikace virů v hostiteli. Pseudosubstrát je látka, která se chová jako substrát s inhibiční funkcí. Díky aktivitám M156 a M029 může Myxoma

virus působit proti interferonům (IFN). Díky schopnosti působení na IFN může vir ovlivňovat imunitní systém hostitele ve svůj prospěch (Liu et al., 2010; Spiesschaert et al., 2011).

Jeden z mnoha dalších proteinů viru myxomatózy je protein M11L. Tento virový protein se přichytává na vnější mitochondriální membránu infikované buňky, kde brání uvolňování mitochondriálního cytochromu c. Cytochrom c má za normálních okolností v buňce po vyplavení z mitochondrií vydat signál pro programovanou buněčnou smrt (apoptózu). Kromě toho je M11L také schopen inhibovat apoptózu vazbou na B-buněčný lymfom 2 (BCL2). BCL2 má funkci regulátoru apoptózy, který je také schopen uvolnit cytochrom c a následně tak vyvolat programovanou buněčnou smrt. Protein M127L dokáže také kódovat enzym fotolyázu. Tento enzym je spojený s funkcí DNA reparace a to mimo období DNA replikace. Virus si fotolyázu upravuje dle svých potřeb a zajišťuje si tak lepší podmínky pro přežití v těle hostitele.

Další funkcí proteinů MYXV v rámci je jejich schopnost interferovat s buněčnou chemotaxí králičích leukocytů. Chemotaxe je pohyb buněk ve směru chemického gradientu. Pojem interference zde můžeme chápat jako vzájemné prolnutí virového proteinu a již zmíněných leukocytů. Celý tento proces interference zajišťuje pro Myxoma vir lepší rozšíření v organismu hostitele. Leukocyty jsou právě jedny z prvních buněk, které v jakémkoli organismu (který leukocyty obsahuje) nastupují v první linii v boji s infektem. Ukázkou proteinů interferujících s chemotaxí jsou proteiny M – T1, M104L a M-T7. Funkce proteinu M – T1 je inhibice (útlum) chemokinů (chemotaktický cytokin) z CC skupiny, čímž dojde ke snížení až zamezení jejich funkce *in vivo*. M104L je malý protein s hydrofobními vlastnostmi. Sdílí aminokyselinovou identitu s herpesvirem Ateline 3. U herpesviru Ateline 3 se předpokládá inhibice chemokinového receptoru, tudíž se tato funkce připisuje i proteinu M104L. U M – T7 se prokázala podobná funkce jako u proteinu M-T1. Má však daleko větší rozsah, a to nejen na skupinu CC, ale i na skupinu CXC, která se vyskytuje například i u lidské populace. Z hlediska množstevního výskytu se protein M – T7 řadí na první místo, je to totiž nejhojněji secernovaný protein buněk infikovaných Myxoma virem.

Další skupinou jsou proteiny interferující s aktivací leukocytů. Zde se jedná o proteiny M121R a M122R. Oba tyto proteiny se dokážou vázat na MHC glykoproteiny první třídy. Tyto proteiny mají podobnou strukturu jako některé receptory na povrchu buněčných T-lymfocytů, které mají opět funkci vyvolat apoptózu. I přes velice vyspělou dobu, ve které se nacházíme, zde existuje i skupina proteinů, u kterých se doposud funkce nepodařila

prozkoumat vůbec, nebo nešla ani přiřadit k nějakému virovému analogu (Spiesschaert et al., 2011).

#### **2.4.2 Viroreceptory Myxoma viru**

Viroreceptory jsou virem vytvořené zakódované napodobeniny receptorů zdravé buňky hostitele a tvoří součást imunitního systému hostitele. Jejich úkolem je imunitní systém hostitele zmást ve prospěch rozšíření nákazy, jež daný virus způsobuje. Jako viroreceptory kódované virem myxomatózy lze označit i některé již zmíněné proteiny. Protein M-T7 dokáže vylučovat interferony  $\gamma$  ( $\text{IFN}\gamma$ ), které působí jako antagonisté ke králičím  $\text{IFN}\gamma$ . Pokud dojde k jejich setkání, nastane inhibice antivirových účinků králičího  $\text{IFN}\gamma$ . Za normálních okolností by králičí  $\text{IFN}\gamma$  působili proti replikaci viru. Dalším viroreceptorem Myxoma viru je M-T2. Jedná se o napodobenou verzi tumor nekrotického faktoru (TNF). TNF slouží buňce při akutní fázi zánětu a může aktivovat apoptózu. Pokud dojde k jeho dlouhodobější prezenci, může nastat až stav nekrózy tkáně (Liu et al., 2010).

#### **2.4.3 Inhibitory serinových proteáz Myxoma viru**

V genomu viru myxomatózy byly objeveny čtyři geny, které mají schopnost kódovat proteiny podobné bílkovině Serpin. Funkcí Serpinů je inhibice serinových proteáz a tím pádem regulace procesu zánětu. Serin je aminokyselinou tvořící základní složku proteinů a aktivním místem enzymů, jako jsou právě serinové proteázy (u lidí například trypsin, chymotrypsin, atd). Detailnější funkce byla zjištěna pouze u jednoho z nich, a to u SERP-1. Dalo by se předpokládat, že i tento inhibitor bude mít negativní vlastnosti. Ovšem jak některé studie prokazují je inhibitor SERP-1 (kódovaný genem MYXV M008) faktorem s protizánětlivými vlastnostmi. Tato protizánětlivá funkce byla prokázána mimo jiné i u lidských buněk, kde se osvědčil v léčbě zánětů vzniklých po chirurgickém zákroku (Liu et al., 2010).

## 3 Myxomatóza

### 3.1 Historie myxomatózy

Onemocnění myxomatóza bylo poprvé popsáno v roce 1896 ve státě Uruguay italským bakteriologem Giuseppe Sanarellim (viz obrázek 8). Sanarelli si povšiml propuknutí onemocnění u králíků evropských (*Oryctolagus cuniculus*) čeledi zajícovitých (*Leporidae*). Nemoc se u těchto savců projevila charakteristickým a četným výskytem nádorů a mucinózní kůže. Nemoc pojmenoval jako „infekční myxomatóza králíků“ (Nowland et al., 2015). V dané době ještě nebyl přesný původce tohoto onemocnění znám, avšak za původce byly tehdy považovány tzv. „filtrovatelné viry“ (z *angl.* filterable viruses). Tehdy byly také známé pod označením ultramikroskopické organismy (z *angl.* ultramicroscopic organisms). Toto označení bylo zavedeno na základě průchodnosti těchto virů přes speciální filtry o velice malém průměru pórů (Simon, 1923). Filtrovatelné viry nebylo možné z důvodu nedostatečného vybavení tehdejší doby blíže identifikovat a popsat. Již několik let od prvního průzkumu tohoto onemocnění se však vědělo, že je tento původce aktivní, jen když je hostitelem králík (Rivers, 1927). Podle tehdejších studií se onemocnění přeneslo z králíků divokých zásluhou komárů rodu *Aedes*, a to na králíky chované jako domácí (Nowland et al., 2015).



**Obrázek 8** Giuseppe Sanarelli – italský bakteriolog (www.historyofvaccines.org)

*Myxoma vir* byl také prvním virem využitým k záměrnému vyhubení přemnožených králíků. Toto zmíněné záměrné nasazení nákazy bylo provedeno např. v Austrálii v roce 1950. O dva roky později proběhlo vyhubení také v Evropě. Tato strategie záměrného snížení počtu volně žijících králíků se ale brzy prokázala jako neúspěšná. Nákaza se začala šířit i na králíky chované v domácích chovech, na které měla mnohem letálnější účinky (MacLachlan a Dubovi, 2016; Varela 2022).

### 3.2 Onemocnění a jeho průběh

Myxomatóza je velice nebezpečné onemocnění pro zvířata z čeledi zajícovitých a je povinné hlásit jeho výskyt. Myxomatózu můžeme rozdělit do kategorií dle geografického původu jejich přenašečů. Jihoamerický, známý také jako brazilský kmen virového původce myxomatózy má své označení dle svého přirozeného hostitele králíka brazilského (*Sylvilagus brasiliensis*) (obrázek 9). Pro další kmen Myxoma viru je přirozeným hostitelem králík drobný (*Sylvilagus bachmani*). Králík drobný se přirozeně vyskytuje v Kalifornii, proto se virový původce, který byl poprvé u tohoto králíka identifikován, obecně nazývá jako kalifornský kmen Myxoma viru. I přes to, že je několik virových kmenů původce myxomatózy, jsou průběhy onemocnění těmito původci způsobené takřka totožné. Dle výzkumů zapříčiňuje kalifornský kmen viru u evropských králíků vyšší a rychlejší úmrtnost.



**Obrázek 9** Králík brazilský (*Sylvilagus brasiliensis*) (Dantas et al., 2016)

Jak již bylo zmíněno, onemocnění myxomatóza je původem z amerického kontinentu, ale dnes je endemické i Evropě a v Austrálii. V Brazílii se myxomatóza šíří hojně a běžně i ve volné přírodě (MacLachlan a Dubovi, 2016). V Evropě z velké části převažuje jihoamerický kmen myxomatózy. Do Evropy byla nemoc, respektive její virový původce, donesena za účelem biologického vyhubení volně žijících přemnožených zajíců a králíků (Catroxo et al., 2009). Nyní je myxomatóza pečlivě sledována z důvodu velké úmrtnosti nakažených jedinců. Byla provedena studie (viz obrázek 10), aby se prokázalo, jak moc je toto onemocnění pro jedince z řad zajícovitých devastující. Studie se opírala o situaci v Austrálii, kde byla nemoc nasazena záměrně jako biologická zbraň. Již krátce po zavlečení nákazy klesly počty zajícovitých na území Austrálie pod 20 %, a to zde byly tyto jedinci původně přemnožení (Di Giallonardo a Holmes, 2015).

Průběh onemocnění se liší dle ohniska výskytu a dle přítomných druhů králíků. U králíků chovaných v zajetí má *Myxoma virus* mnohem letálnější účinky než u divokých králíků. Myxomatózu je také možné rozdělit dle jejího průběhu, a to na nodulární myxomatózu (mnohočetné mukoidní nádory v různých částech těla, hnisavá rýma a konjunktivitida) a

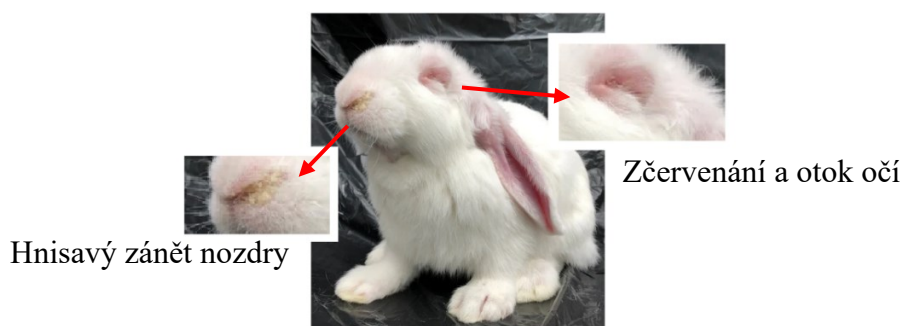


myxomatózní formu s převážně respiračními příznaky (Manev et al., 2018). Onemocnění se projeví po inokulaci viru bodavým hmyzem do těla hostitele (např. králíka). U amerických druhů králíků je projev z velké většiny pouze ve formě neškodné fibromy / fibromů, které netrvají déle než několik týdnů. Fibromy jsou benigní nádory pojivové tkáně. (Kerr et al., 2015; MacLachlan a Dubovi, 2016). Závažný průběh s téměř vždy s fatálními následky způsobuje onemocnění u evropských králíků, u kterých většinou končí smrtí nemocného jedince.



**Obrázek 10** Dopad použití myxomatózy pro redukcii počtu zajícovitých v Austrálii (upraveno dle Di Giallonardo a Holmes, 2015)

Typický vzhled nemocného králíka je charakterizován zčervenáním kolem očí, zvětšenými uzlinami a otoky na hlavě králíka. Dále nejsou výjimkou ani nádory lokalizované od hlavy k dalším částem těla nebo abscesy kůže (viz obrázek 11). To vše je doprovázeno různě lokalizovanými záněty. Při popisu vzhledu králíka trpícího myxomatózou se můžeme setkat s označením „leonský vzhled“ (MacLachlan a Dubovi, 2016).



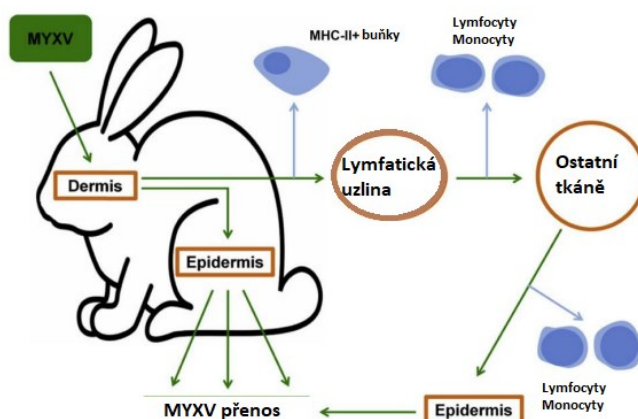
**Obrázek 11** Králík infikovaný virem *Myxoma virus* (upraveno dle Rosell, 2019)

Samotný průběh onemocnění závisí na vnímavosti nakaženého jedince a na konkrétním kmenu viru způsobující myxomatózu (Nowland et al., 2015; Rosell et al., 2019). Průběh může

být rychlý (akutní) anebo pomalejší. Při akutním průběhu onemocnění umírá infikované zvíře do 48 h od nástupu prvních klinických příznaků. Smrt nastává v důsledku septikémie, což je život ohrožující bakteriální infekce. Při pomalejším nástupu dochází k různým otokům, výskytu fibromů, plicním lézím nebo blefaritidě (zánět očních víček). Smrt následně nastává v rozmezí deseti až čtrnácti dnů po infekci. Není však výjimkou (platí hlavně pro divoké jedince), že zvíře nákazu přežije (MacLachlan a Dubovi, 2016).

Vir způsobující myxomatózu se šíří systematicky a rychle především díky kožním lézím. Naštěstí lze virus prokázat již během prvních 24 h. Primárně se původce snaží o napadení T-lymfocytů, které jsou součástí imunitního systému. V zóně, kde proběhla inokulace (nejčastěji bodnutí hmyzem) začne *Myxoma virus* infikovat epidermální část, konkrétně epidermální buňky. U těchto buněk se vyvolá buněčná hyperplazie (množení) a hypertrofie (zvětšení). Zmíněné změny mají za následek vyvýšení primární kožní léze, a to kvůli narušeným částem pokožky obalené materiálem mukózní struktury. Vznikne tedy tzv. “myxom“, od kterého je odvozen název onemocnění. Virový původce myxomatózy se dále šíří krevním řečištěm, dermálně či lymfatickými cestami do sleziny, plic, jater, očních víček a v ušním okolí hostitele. Jelikož mohou být některé povrchové léze hnisavého charakteru, dochází k vyloučení viru i mimo tělo hostitele. Hnisavé léze se vyskytují v okolí očních spojivek anebo v okolí vývodů převážně horních cest dýchacích.

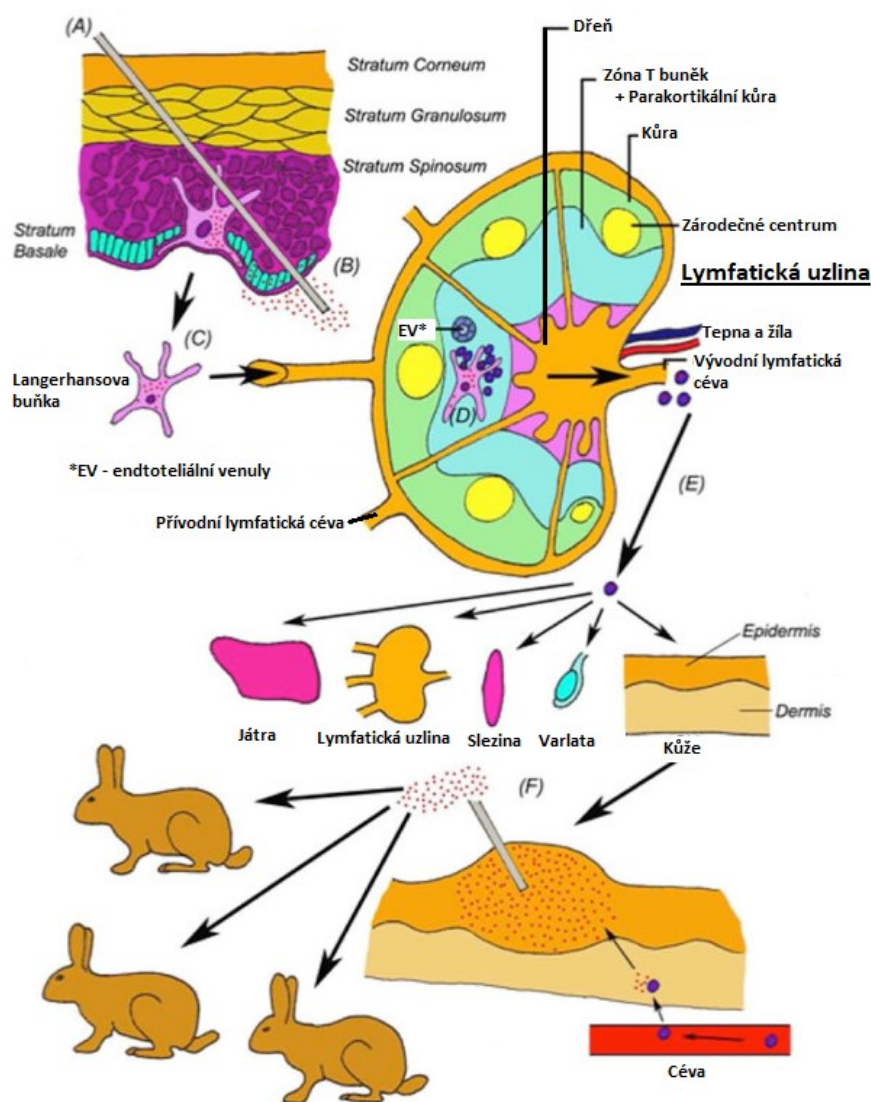
U evropských králíků, jimž byl *Myxoma virus* inokulován intradermální cestou se virus replikoval (viz obrázky 12 a 13) v buňkách MHC druhého řádu (MHC-II) a dále se šířil do uzlin lymfatického systému přes lymfocyty. Díky těmto lymfocytům došlo dále k rozšíření viru do distálních tkání. Velmi malé množství viru se šíří krevní cestou (Kerr et al., 2015).



**Obrázek 12** Šíření původce myxomatózy v těle králíka (upraveno dle Mage et al., 2016)



Obrázek 12 zobrazuje patogenezi a šíření viru MYXV. Virus byl inokulován intradermálně. V první fázi se virus replikuje díky pozitivním MHC buňkám druhého řádu. Virus postupuje velice rychle, a tak se do 24 h nalézá v lymfatických tkáních v okolí vpichu a replikuje se ve tkáních kůry a dochází k rozšíření do ostatních tkání (plíce, varlata atd.). Přenos je zprostředkováván díky lymfocytům a monocytům a postupně se dostává do celého organismu jedince (Pinheiro et al., 2016).



**Obrázek 13** Lymfatické uzliny jako místo šíření původce myxomatózy

(upraveno dle Spiesschaert et al., 2011)

A – Místo inokulace, B – Epidermální buňky, C – Langerhansovy buňky, D – T-lymfocyty, E – Rozšíření do dalších orgánů

Na obrázku 13 je zobrazena patogenese a rozšíření viru myxomatózy (MYXV). Virus se ihned po proniknutí do podkoží začíná replikovat. Replikace začíná již v epidermálních buňkách a postupně pokračuje přes buňky pokožky. Tato část průniku viru se začne v těle

králíka projevovat jako zánět, a to v těsné zóně kolem vpichu. Imunitní systém začíná reagovat a vysílat primární neutrofilů. K infekci dochází také na již zmíněných buňkách MHC-II, mezi které patří mimo jiné i Langerhansovy buňky. Tyto buňky putují do lymfatických uzlin, kde prezentují virové částice v zóně T buněk. Díky tomuto dochází k přenosu infektu i na T-lymfocyty, které díky své následné migraci v retikuloendoteliálním oběhu roznášejí virus do celého organismu králíka. MYXV se ihned po průchodu do krve (i díky lymfě) šíří do dalších orgánů, jako jsou např. játra a slezina.

### 3.3 Příznaky onemocnění

Počátečním příznakem je konjunktivitida, která se vyvíjí velmi rychle a je doprovázena mléčným výtokem z oka. Nakažený jedinec se stává apatickým a nastupuje i nechut' k jídlu, která přechází až v anorexii. Vše bývá doprovázeno horečkou, která často dosahuje teploty 42 °C. Oční víčka, nozdry, tlama a uši se stávají edematózními (otoky s vyšším množstvím tekutiny). Hlava králíků má tedy celkově nateklý vzhled. U samic dochází k edematózním zánětům vulvy. Samce postihuje otok pohlavního ústrojí, přičemž nejvíce bývá postižen šourek. Charakteristickým znakem také může být svěšení uší, a to opět v důsledku otoků. Dalším znakem je ztížené dýchání. V důsledku špatné respirace může králík upadnout do kómatu a následně zemřít. U jedinců, kteří neupadnou do kómatu a přežijí, se může postupně rozvíjet stav deprese a vytvoří se u nich drsná srst.

Na základě sledování několika vybraných laboratorních a divokých králíků, kterým byl inokulován *Myxoma vir*, byl vytvořen přehled (viz tabulka 2), kde jde jasně vidět smrtelnost myxomatózy pro laboratorní a v chovech chované králíky. Toto sledování bylo prováděno v rámci dvaceti dnů, kdy laboratorní králíci přežívali cca jednu polovinu tohoto času (Spiesschaert et al., 2011).

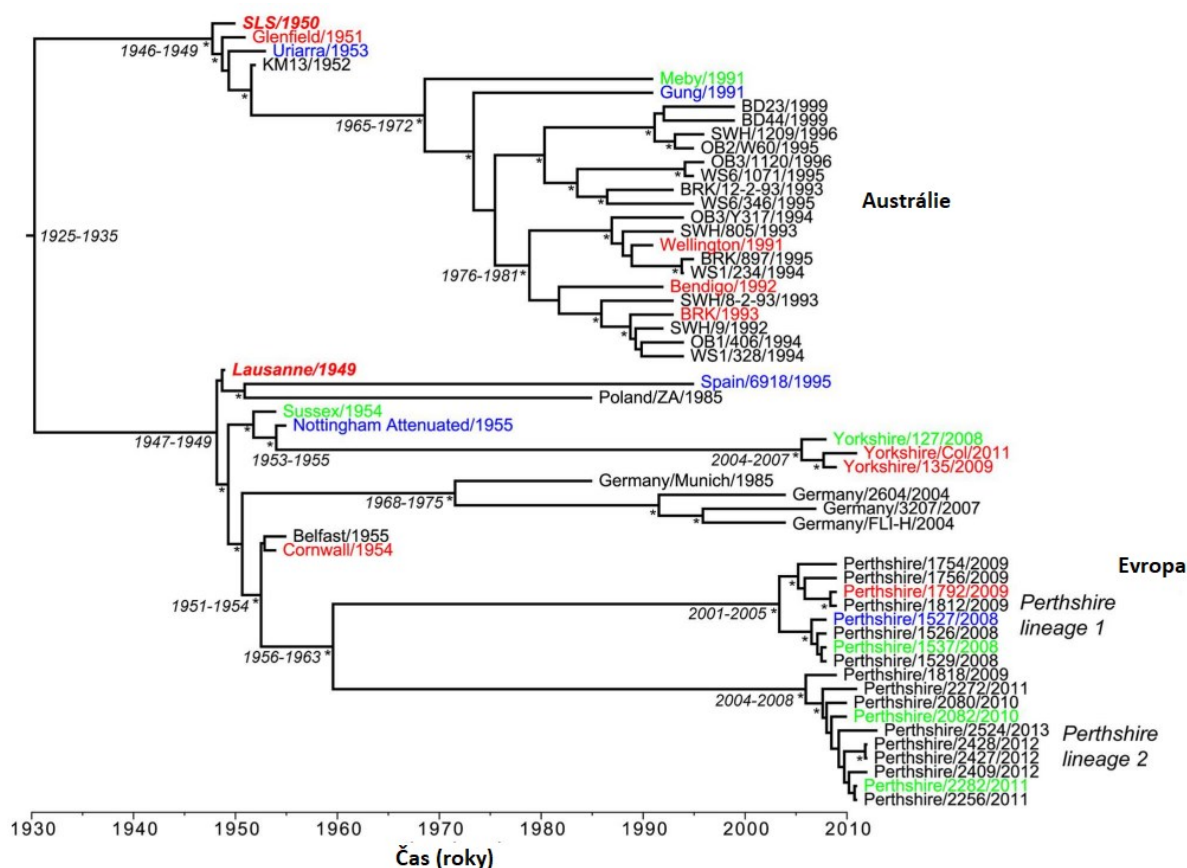
V rámci některých studií se prokázaly možné doprovodné onemocnění způsobené sekundární bakteriální nákazou, jako například infekce horních cest dýchacích, které způsobují Gramnegativní bakterie jako je *Pasteurella multocida* a *Bordetella bronchiseptica*. Tyto sekundární infekce však nejsou podmínkou, jelikož především starší studie potvrdily nepřítomnost výše zmíněných bakterií při pitvě některých uhynulých zvířat. Pokud se doprovodné nákazy potvrdily, přirovnává se jim jako příčina potlačená imunitní odpověď infikovaného jedince (Spiesschaert et al., 2011).

**Tabulka 2** Perioda objevu příznaků onemocnění myxomatóza u infikovaných jedinců po inokulaci virem *Myxoma virus* (upraveno dle Spiesschaert et al., 2011)

| Laboratorní králíci    |  | Divocí králíci         |                                   |
|------------------------|--|------------------------|-----------------------------------|
| Počet dnů od inokulace | Příznaky                                 | Počet dnů od inokulace | Příznaky                          |
| 2                      | Růžové až edematózní místo inokulace     | 2-3                    | Nic až narůžovělé místo inokulace |
| 4                      | Záněty spojivek                          | 6-9                    | Edémy a sekundární léze           |
| 5                      | Sekundární kožní léze                    | 10-11                  | Možné respirační problémy         |
| 6                      | Výtoky z očí                             | 12-15                  | Ústup kožních problémů            |
| 7                      | Zhoršení očních výtoků, dýchací problémy | 20                     | Zdravý / stále se zotavující      |
| 8                      | Nekróza místa inokulace                  |                        |                                   |
| 10-12                  | Celkové zhoršení stavu až smrt           |                        |                                   |

### 3.4 Kmeny virového původce myxomatózy

Mezi nejdiskutovanější kmeny lze zařadit kalifornský kmen a kmen *Lausanne*. V roce 2018 byl detekován nový kmen s názvem MYXV-tol původem od zajíce iberského (Águeda-Pinto et al., 2022). Virus však zmutoval na mnohem více kmenů, než jsou tyto zmíněné (viz obrázek 14). Některé kmeny však nejsou natolik klinicky významné, že se od jejich sledování upustilo (Di Giallonardo a Holmes, 2015; Kerr et al., 2017).



**Obrázek 14** Přehled kmenů myxomatózy vniklých mutací v Evropě a Austrálii  
(upraveno dle Kerr et al., 2017)

Na obrázku 14 je zachycena evoluce onemocnění. Barevné rozlišení představuje stupeň virulence, přičemž červeně jsou označeny mutace s virulencí prvního až druhého stupně. Stupeň tři je zelený a stupeň čtyři a pět jsou zaznačeny modře. Černě jsou následně zapsány kmeny, které nemají kvantifikovaný stupeň virulence. Stupně virulence (1–5) jsou blíže specifikovány níže (viz tabulka 3). Virulence byla rozřazena v závislosti na době přežití po infekci a úmrtnosti, a to dle testů, které byly provedeny na laboratorních králících.

**Tabulka 3** Charakteristika stupňů virulence u onemocnění myxomatóza  
(upraveno dle Kerr et al., 2012)

| Stupeň virulence                  | 1            | 2       | 3       | 4      | 5            |
|-----------------------------------|--------------|---------|---------|--------|--------------|
| <b>Charakteristika virulence</b>  | Velmi vysoká | Vysoká  | Střední | Nízká  | Velmi nízká  |
| <b>Procento smrtnosti</b>         | 99,50 %      | 95-99 % | 70-95 % | 5-70 % | <50 %        |
| <b>Doba přežití jedince (dny)</b> | ≤13          | 14-16   | 17-28   | 29-50  | Nedefinováno |

Na základě výzkumu laboratorních králíků se zjistilo, že virové mutace se střední až nižší hodnotou virulence mají vyšší šanci na přenos onemocnění. Nakažený jedinec kmenem s vysokým číslem virulence s velkou pravděpodobností brzy uhynie a nákaza se tak nestačí přenést na dalšího hostitele. V důsledku rozsáhlé virové evoluci a nových vzniklých mutací došlo k rozsáhlým výzkumům ve snaze mít nákazu pod kontrolou. Během těchto studií bylo identifikováno poměrně velké množství mutací a následně k nim byl přidělen i stupeň virulence (viz tabulka 3). Bohužel u některých z nich se nepodařilo objasnit a odhalit funkce příslušných genů, takže jejich role při kontrole virulence zůstává nejasná (Kerr et al., 2012).

**Tabulka 4** Rozlišení virulence u vybraných mutací virových kmenů původce myxomatózy  
(upraveno dle Kerr et al., 2012)

| Virový kmen Myxoma viru | Zdroj                | Stupeň virulence |
|-------------------------|----------------------|------------------|
| SLS                     | Králičí tkáň         | 1                |
| Glenfield               | Specifický typ buněk | 1                |
| KM113                   | Králičí tkáň         | 3                |
| Urriarra                | Specifický typ buněk | 5                |
| SWH                     | Divoký králík        | 4                |
| BRK                     | Divoký králík        | 1                |
| Bendigo                 | Divoký králík        | 1                |
| Meby                    | Divoký králík        | 5                |
| Lausanne                | Laboratorní sérum    | 1                |
| Cornwall                | Králičí tkáň         | 1                |
| Nottingham attenuated   | Králičí tkáň         | 5                |
| Gung                    | Divoký králík        | 4                |
| Wellington              | Divoký králík        | 1                |

## 4 Terapie a prevence onemocnění myxomatózy

Specifická terapie při onemocnění myxomatózou neexistuje. Pro překonání nákazy je třeba, aby měl infikovaný jedinec velice silnou imunitu. Nemocným jedincům se sice mohou podávat antibiotika, avšak jejich účinek cílí na předcházení vzniku doprovodných bakteriálních infekcí nikoli na původce myxomatózy. Pokud se králik myxomatózou nakazí, je ve většině případů doporučeno utracení nakaženého kusu, následná karanténa a sledování ostatních králíků v chovu.

Prevence proti onemocnění myxomatóza má velký význam zejména pro chovy králíků. Doporučuje se karanténa pro nové kusy králíků, a to alespoň dva týdny. K obecným zásadám prevence se dále řadí použití hustého pletiva a ochranných sítí do výpletu otvorů králíkárn. Těmito opatřeními je možné docílit maximální možné eliminaci přístupu bodavého hmyzu. Chovatel by dále měl provádět občasnou kontrolu přítomnosti ektoparazitů a případně králíkárn dezinfikovat. Úplnou samozřejmostí je řádné poskytnutí optimální výživy pro všechna chovaná zvířata.

Účinnou prevencí a obranou je včasná a pravidelná vakcinace. Ideální je plošná vakcinace celého chovu a současně zavedení zoohygienických opatření. První vakcinace proti tomuto onemocnění byla zavedena již v roce 1955 subkutánně (do podkoží) anebo intradermálně (MacLachlan a Dubovi, 2016). Od objevu myxomatózy již bylo vyvinuto několik typů vakcín. V Evropě je jejich dostupnost legislativně schvalována a jsou tedy dostupnou prevencí. Není tomu tak ale např. v Austrálii, Asii nebo Severní Americe kvůli vládní legislativě bránící dovoz a použití těchto vakcín. Neznamená to však, že by k vakcinaci v těchto zemích nedocházelo. Vakcinuje se tam jinými vakcínami, které nejsou pro Evropu běžné. Obsahem vakcín, které se používají mimo Evropu jsou, pouze různé kmeny viru RHD (viz tabulka 4). RHD neboli Rabbit hemorrhagic disease je v českém překladu známé jako virové hemoragické onemocnění. Rozdíl oproti evropským vakcínám je ten, že evropské vakcíny jsou obohaceny i o oslabený vir myxomatózy. Ochranný účinek vakcinace proti myxomatóze mimo Evropu je tedy sporný. Dokonce australská vláda nepovoluje komerční použití vakcín proti myxomatóze u domácích králíků (Sutherland et al., 2021).

Mezi vakcíny představené v Evropě patří například inaktivované vakcíny, u kterých se bohužel nedostavil žádoucí účinek v podobě dostatečné imunitní ochrany králíka. Další v pořadí byly podjednotkové vakcíny na bázi plazmidu, které taky nebyly v ochraně jedince dostatečně úspěšné. Díky tomu jsou dnes dostupné pouze živé vakcíny. Živé vakcíny

mohou být dvojího typu, homologní a heterologní (Manev et al., 2018; Spiesschaert et al., 2011). Očkování u divokých králíků je problematické. Vakcinace se tedy u divokých zvířat provádí díky speciálním návnadám, které zvíře pozře (Bárcena et al., 2000).

**Tabulka 5** Aktuálně používané vakcíny proti myxomatóze ve světě (upraveno dle Sutherland et al., 2021)

| Lokalita vakcinace | Název vakcíny         | Specifická účinnost |
|--------------------|-----------------------|---------------------|
| Evropa             | Nobivac Myxo-RHD Plus | MYXV + RHD          |
| Australie          | Cylap RCD             | RHDVa               |
| Nový Zéland        | Cylap RCD             | RHDVa               |
| Nový Zéland        | Filavac               | RHDV1 a RHDV2       |

MYXV – Virový původce myxomatózy, RHD – Virový původce hemoragického onemocnění, RHDVa – Jiný kmen původce virového hemoragického onemocnění, RHDV1 a RHDV2 – Další kmeny původce virového hemoragického onemocnění

#### 4.1 Heterologní vakcíny

Heterologní typ vakcíny má složení založené na obsahu nepatogenního, avšak blízce příbuzného leporipoxviru. Konkrétně je využíván *Shope fibroma virus*, a to kvůli své úzké antigenní podobnosti s původcem myxomatózy a pochází z králíka východního (*Sylvilagus floridanus*). Heterologní očkování poskytuje značnou zkříženou ochranu proti MYXV. Toto očkování je určeno především pro králíky v chovech a poskytuje vysokou ale krátkodobou ochranu (Manev et al., 2018; Spiesschaert et al., 2011). Ochrana trvá okolo 3 měsíců, což je hlavní slabá stránka tohoto očkování. Vakcinace je vhodná od 28. dne života králíka (Bárcena et al., 2000; Spiesschaert et al., 2011).

#### 4.2 Homologní vakcíny

Homologní vakcína může být monovalentní (pouze proti Myxoma viru) nebo bivalentní (proti Myxoma viru a viru hemoragického onemocnění králíků – RHDV). Bivalentní vakcínu lze získat spojením dvou samostatných přípravků, jednoho atenuovaného pro myxomatózu a jednoho inaktivovaného pro RHD, nebo rekombinantního viru, ve kterém je Myxoma virus geneticky modifikován tak, aby exprimoval hlavní strukturální protein RHDV. Jedním z původních oslabených kmenů původce myxomatózy je SG33 odvozený od kmene *Lausanne*. Dále se také používá vakcinační homologní kmen Borghi, který je odvozen od kmene MSD,

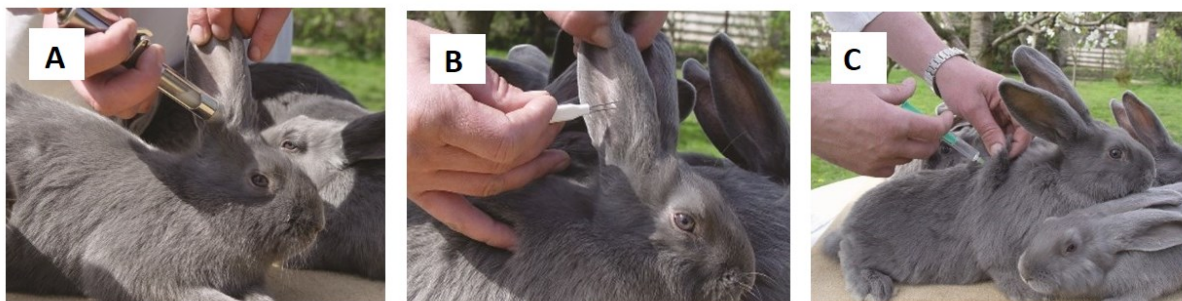


původem z Kalifornie. Tyto homologní vakcíny navozují silnější imunitní ochranu než kterákoli ze současných heterologních vakcín. Ochranná lhůta trvá alespoň čtyři měsíce po aplikaci očkovací látky (Spiesschaert et al., 2011).

Nevýhodou však u homologních vakcín je, že nejsou zcela vhodné pro mladé králíčí jedince a také je vakcinace účinná pouze pro domácí králíky (Bárcena et al., 2000). U mladých jedinců byla totiž po vakcinaci hlášena imunodeprese (snížení imunity). Výjimku tvoří mladí angorští králíci, u kterých bylo prokázáno, že po vakcinaci SG33 nedošlo k žádným velkým vedlejším účinkům. Angorští králíci jsou plemeno v chovech hojně chované, o kterém je známo, že je v polních podmínkách na virus myxomatózy zvláště citlivé (Spiesschaert et al., 2011). V rámci vylepšení vakcinačních přípravků byl kmen SG33 spojen s kapsidovou složkou od RHD. Tímto spojením vznikl vakcinační kmen chránící králíky jak před MYXV, tak před onemocněním RHD (Spiesschaert et al., 2011).

### 4.3 Používané vakcíny ve veterinární praxi

V České republice se provádí očkování např. vakcínami Myroxen, Pestorin mormyx (starší typy vakcín) a Nobivac Myxo-RHD Plus (aktuálně nejnovější). U všech 3 zmíněných vakcín se jedná o očkování účinnou látkou v podobě oslabeného živého kmene původce myxomatózy. Očkovaný kus by měl být ve věku 3–4 týdnů a je nutné jej během života přeočkovat (viz tabulka 5). Pokud zvěrolékař vakcinaci schválí, aplikuje ji (viz obrázek 15) průnikem injekční jehly do ušního boltce, dvojvpichem do ucha králíka nebo subkutánně (do podkoží). Po aplikaci a vpravení antigenu do těla zvířete dojde k reakci imunitního systému (imunizaci). Imunizace je proces, kdy si začne tělo jedince vytvářet specifické protilátky. Trvání navozené imunity je časově omezené například mateřskými protilátkami, což je také jeden z hlavních důvodů, proč se doporučuje očkování až od 1. měsíce věku.



**Obrázek 15** Možnosti aplikace vakcíny králíkům ([www.dyntec.cz](http://www.dyntec.cz))

A – Očkování metodou vpichu do ušního boltce, B – Očkování metodou dvojvpichu, C – Očkování subkutánně (do podkoží)



### 4.3.1 Vakcína Myroxen

Vakcínou Myroxen je možné očkovat i gravidní samice před druhou polovinou březosti a mladé jedince od 1. měsíce života. Pokud se očkuje králík jednou dávkou vakcíny již při takto nízkém věku, je nutné jej revakcinovat po uplynutí 6 týdnů a poté bude jeho imunita trvat stejně dlouho, jako kdyby došlo k vakcinaci již staršího jedince po 10. týdnu života. Imunita starších očkovaných králíků trvá 6 měsíců bez nutnosti druhé dávky vakcíny. Vakcínu myroxen je dobré dávkovat dvakrát ročně, obzvláště pak v oblastech s prokázaným výskytem myxomatózy.

### 4.3.2 Vakcína Pestorin mormyx

Tato vakcína kombinuje několik účinných složek, které mají za úkol králíka ochránit nejenom před myxomatózou, ale i před hemoragickým onemocněním. Vakcinace tímto typem je doporučena od desátého týdne života králíka. Existují i výjimky, kdy je možné králíka nejdříve očkovat vakcínou Myroxen (od čtvrtého týdne) a poté přeočkovat kombinovanou vakcínou Pestorin mormyx. Pokud se chovatel shodne se zvěrolékařem, je možné hranici deseti týdnů posunout na šest, ale je nutné takto očkovaného jedince revakcinovat po uplynutí čtyř týdnů. Tuto vakcínu není doporučeno aplikovat gravidní samici, kvůli následnému prokázanému riziku potratu. Stejně jako u předešlé vakcíny je i u této vakcíny doporučena revakcinace po 6 měsících, a to obzvláště v nepříznivých oblastech výskytu ([www.uskvbl.cz](http://www.uskvbl.cz)).

**Tabulka 6** Obecná doporučení pro vakcinaci králíků proti Myxoma viru pro vakcíny Myroxen a Pestorin mormyx (upraveno dle [www.uskvbl.cz](http://www.uskvbl.cz))

| Stáří králíka | Primovakcinace            | Revakcinace | Typ vakcíny pro revakcinaci |
|---------------|---------------------------|-------------|-----------------------------|
| Od 4. týdne   | Myroxen                   | Za 6 týdnů  | Pestorin mormyx             |
| Od 6. týdne   | Pestorin mormyx           | Za 4 týdny  | Pestorin mormyx             |
| Od 10. týdne  | Myroxen / Pestorin mormyx | Za 6 měsíců | Myroxen / Pestorin mormyx   |

### 4.3.3 Vakcína Nobivac Myxo-RHD Plus

Tato vakcína je stejně jako Pestorin mormyx určena k ochraně proti myxomatóze a zároveň proti hemoragickému onemocnění. Vakcína je licencovaná pro celou EU od roku

2019, jedná se tedy o zatím nejaktuálnější využívanou vakcínu. Díky svému inovativnímu složení poskytuje však ochranu i proti novým kmenům. Tato vakcína je vytvořena kombinací dvou živých rekombinantních RHD virů vektorovaných myxomem. Stručně řečeno kapsidový protein od kmene RHDV1 (německý izolát klasického RHDV) nebo RHDV2 (španělský izolát RHDV2) byl vložen do lokusu MGF/M11L laboratorně oslabeného kmene viru *Myxoma virus*. Tímto způsobem došlo k vytvoření dvou živých rekombinantních myxovektorovaných virů RHDV, které mají stejný vektor *Myxoma virus*, ale obsahují gen VP60 pro RHDV1 nebo RHDV2.

Před začátkem vakcinace je nutné původně lyofilizovanou vakcínu aktivovat rozpouštědlem. Očkování se provádí u králíků starších pěti týdnů, a to do oblasti podkoží. Imunita se u očkovaného zvířete navodí do tří týdnů. Ochrana by dále měla poskytnout až na jeden rok a následně se doporučuje přeočkování (Aida et al., 2021; Reemers et al., 2020)

## 5 Diagnostika a laboratorní průkaz Myxoma viru

Diagnostika myxomatózy může být prokázána klinickým výskytem, vyizolováním viru na membráně embryí slepičích vajec, nebo kultivaci v králičích buňkách. Průkazy nákazy se také mohou provádět pomocí elektronové mikroskopie, metody polymerázové řetězové reakce (PCR), či imunochemickou metodou ELISA (MacLachlan a Dubovi, 2016; Nowland et al., 2015). ELISA metodu je vhodné použít k průkazu přirozeně vytvořených protilátek u jedince, který nákazu přežil. Použití této metody k ověření přítomnosti protilátek se osvědčilo a metoda se ukázala být citlivější a specifitější oproti obdobným metodám. K přiblížení a zjištění struktury viru se využívá elektronové mikroskopie, která nabízí dostatečné zvětšení, čímž může laboratorní pracovník spatřit částice běžným mikroskopem nezachytitelné. Elektronovou mikroskopií doprovázenou předcházejícími úpravami vzorku se dá virus zachytit již v rané fázi onemocnění (Catroxo et al., 2009).

### 5.1 Technika izolace viru

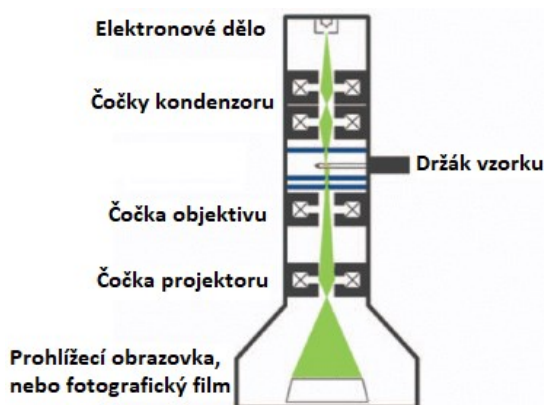
Před samotným mikroskopováním, či jinou technikou je nutné, aby byl virus vyizolován. Provádí se inokulace viru na membránu embrya od 11. do 13. denních kuřecích vajec. Následuje inkubace při 35 °C po dobu 4 až 6 dnů. Pokud je virus přítomen, začnou se rozvíjet zřetelné trhliny na membráně embrya. Trhliny se mohou lišit v závislosti na původu onemocnění. Jihoamerické typy viru myxomatózy způsobují velké trhliny, kdežto kalifornské typy jen středně velké trhliny. Takto izolovaný virus může být dále identifikován přímým i nepřímým imunofluorescenčním testem, testem neutralizace plaku, nebo mikroprecipitačním testem na agarózovém gelu. U přímého imunofluorescenčního testu se prokazuje přítomnost viru, kdežto u nepřímého se prokazuje přítomnost protilátek.

### 5.2 Technika elektronové mikroskopie

Technika se provádí všeobecně k odhalení a označení částic viru, a to pomocí mikroskopování v elektronovém mikroskopu. Preparáty je nutné před mikroskopováním umístit a fixovat na měděnou destičku. Pokud se jedná o řez připravený technikou zalévání pryskyřicí, musí být co nejtenčí. Vzorky je také dobré obarvit metodou negativního barvení, či označit imunochemickými metodami. Elektronový mikroskop dokáže pozorovaný objekt přiblížit zhruba tisíckrát více, než to dokáží klasické optické mikroskopy. Výsledkem pozorování v elektronovém mikroskopu jsou dva typy obrázků, které se následně spojí v jeden

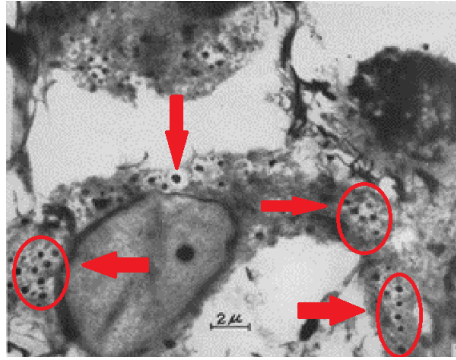
výsledný. Jedná se o světelně mikroskopický obrázek, který se následně porovnává s elektronmikroskopickým snímkem části pozorovaného pole. Sledovaná struktura je tedy viditelná natolik, že je u ní možné provést mnohem detailnější popis, a to i z hlediska jejího uspořádání a struktury oproti pozorování klasickým světelným mikroskopem.

U elektronové mikroskopie můžeme rozlišit typy režimů mikroskopování. Jedná se o transmisní elektronový mikroskop (TEM) a rastrovací elektronový mikroskop. Transmisní elektronový mikroskop (viz obrázek 16) se používá k mikroskopování tenkých vzorků (např. tkáňové řezy, molekuly atd.). Těmito vzorky prochází elektrony a tím vytvoří projekční snímek. Transmisní elektronový mikroskop je také využíván k zobrazení vnitřní struktury buněk a molekul proteinů a v neposlední řadě také k mikroskopii molekul ve virech a cytoskeletálních filamentech (upraveny technikou negativního barvení). TEM je nejčastěji využívaným typem elektronového mikroskopu pro zkoumání virů (Yao a Prud'homme, 2020)



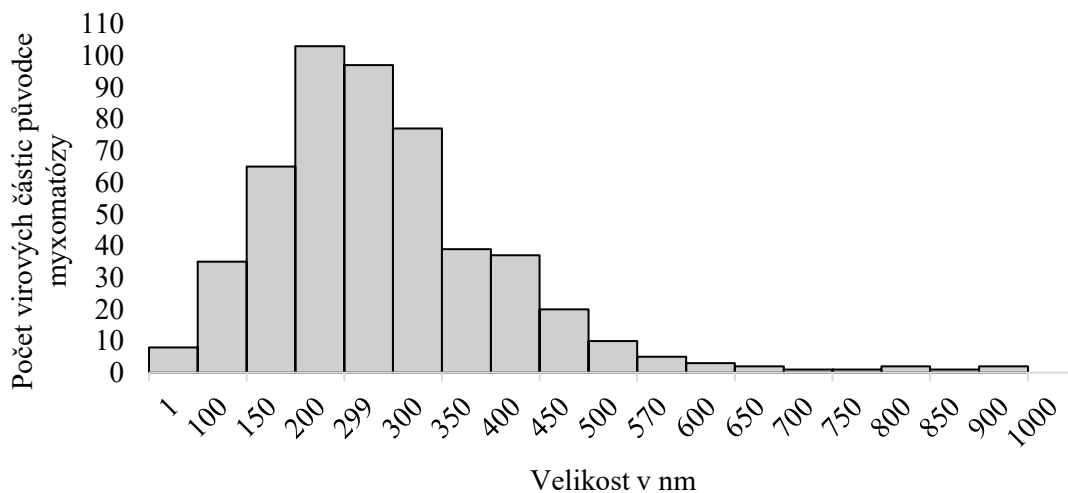
**Obrázek 16** Schéma aparatury transmisního elektronového mikroskopu (upraveno dle Yao a Prud'homme, 2020)

Díky TEM se podařilo zjistit velikost virových částic viru myxomatózy. Jejich průměrná velikost byla stanovena na základě změření 488 virových částic (viz obrázek 17). Velikost částic byla následně vynesena i do grafu (viz obrázek 18). Z grafu vyplývá, že nejčastěji se jednalo o částice o velikosti 150–350 nm. Největší nalezené částice dosahovaly velikosti až okolo 900 nm (Epstein et al., 1952).



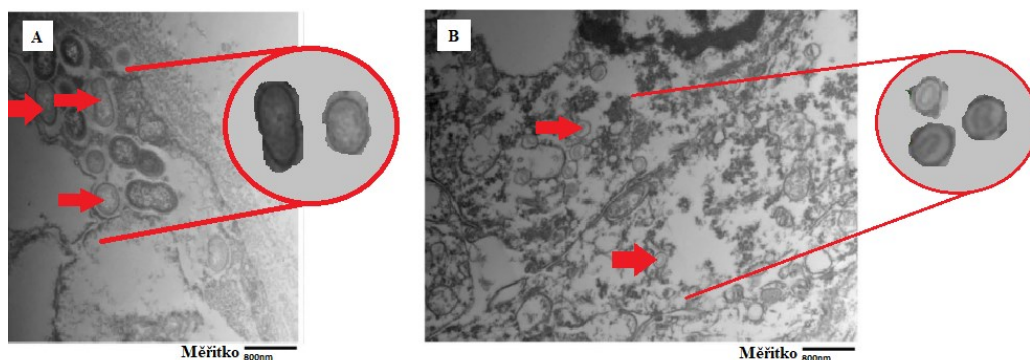
**Obrázek 17** Částice původce myxomatózy v cytoplasmě buňky pozorované v TEM  
(upraveno dle Epstein et al., 1952)

Na obrázku 17 je vyobrazen ultratenký řez myxomatózního nádoru. V cytoplasmě buňky jsou vidět částice různé velikosti i hustoty a jsou zvýrazněny červenými šipkami a kroužky.



**Obrázek 18** Počet částic *Myxoma virus*, zachycených v tenkém řezu myxomatózního tumoru  
(upraveno dle Epstein et al., 1952)

Díky další studii se podařilo zachytit zralé a nezralé virové částice. Jednalo se o analýzu poxvirových částic v očním víčku a plicích nakažené samice králíka. U obou preparátů již započala autolýza buněk, což mikroskopování neusnadňuje, avšak i přes to byly virové částice *Myxoma viru* zpozorovány a zdokumentovány (Abade dos Santos et al., 2020). Na obrázku 19 je možné vidět dva preparáty z plíce a epitelu očního víčka. Oba preparáty byly zdokumentovány metodou transmisní elektronové mikroskopie.



**Obrázek 19** Nezralé a zralé virové částice původce myxomatózy, pozorované v TEM  
(upraveno dle Abade dos Santos et al., 2020)

A – Nezralé virové částice (šipky) v preparátu plicní tkáně samice králíka, pozorované v TEM, B – Zralé virové částice (šipky) v preparátu z epitelu očního víčka, pozorované v TEM

### 5.2.1 Technika negativního barvení

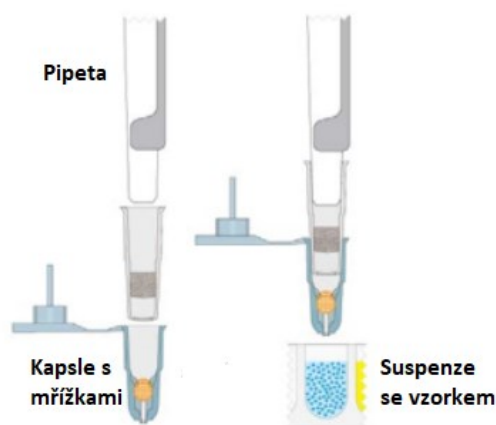
Vzorok je potřeba před provedením transmisní elektronové mikroskopie vhodně upravit. Díky své struktuře jsou viry pod TEM jen obtížně viditelné. K ulehčení mikroskopie se tedy jako jedna z přípravných metod používá negativní barvení. Jedná se o nejběžnější metodu používanou k vytvoření kontrastu a zobrazení virů při mikroskopování pomocí TEM (Blancett et al., 2017). Tato metoda je rychlá, jako nejvhodnější materiál se zde jeví kousky kožních lézí, či různé strupy a jiné fragmenty postižené kůže infikovaného jedince (Catroxo et al., 2009).

Proces negativního barvení pro elektronovou mikroskopii zahrnuje aplikaci roztoku virové suspenze na měděnou mřížku. V některých případech jsou mřížky již se vzorkem dodány. Mřížka je speciálně vyrobená a tvarovaná tak, aby se vešla do transmisního elektronového mikroskopu. Před obarvením musí být mřížka s virovou suspenzí vysušená a dojde k aplikaci barviva. V TEM poté uvidíme tmavý okraj kolem pozorované virové částice a můžeme tak spatřit její tvar (Blancett et al., 2017).

Konkrétní postup negativního barvení dle jedné z provedených studií může vypadat následovně. Biologický materiál je zpracován v 0,1M fosfátovém pufru o pH 7,0. Vzorek se po umístění nachází v okolí měděné mřížky, která je potažená uhlíkovým filmem. Před samotným elektronovým mikroskopováním se mřížky musí vysušit, a to pomocí filtračního papíru a následně se obarví. Barvení probíhá v závislosti na laboratoři, například ve 2% roztoku molybdenanu amonného o pH 5,0 (Catroxo et al., 2009).

Starší studie a výzkumy využívaly metodu ručního barvení (předchozí popis metody), kde bylo nutné pro každý vzorek pracovat zvlášť pouze s jednou mřížkou. Dle novějších studií

je však možné postupovat metodou, která obarví rovnou dvě mřížky najednou. Metoda je využitelná v biokontejnmentové laboratoři, která využívá pro manipulaci s mřížkou zařízení na bázi kapslí. Takováto kapsle pojme dvě mřížky, zároveň minimalizuje přímou manipulaci, a dokonce snižuje možnost poškození mřížky. Pipetování se provádí přímo s kapslí (viz obrázek 20), která se připojuje rovnou k pipetě. Připojení se provádí stejným způsobem jako při využívání klasické pipetovací špičky. To umožňuje současnou přípravu více vzorků s duplicitními mřížkami. U metody negativního barvení s kapslemi je vzorek viru nasán do kapsle. V kapsli je materiál ponechán 10 minut. Během časového úseku dojde k adsorpci viru na povrch mřížky. Dále je důležité mřížku, či mřížky promýt deionizovanou vodou. Následně dojde k barvení vybranými činidly. Rozdíl od předchozího postupu je v tom, že veškerá práce probíhá uvnitř kapsle, takže nedochází k fyzické manipulaci s mřížkami (Blancett et al., 2017).

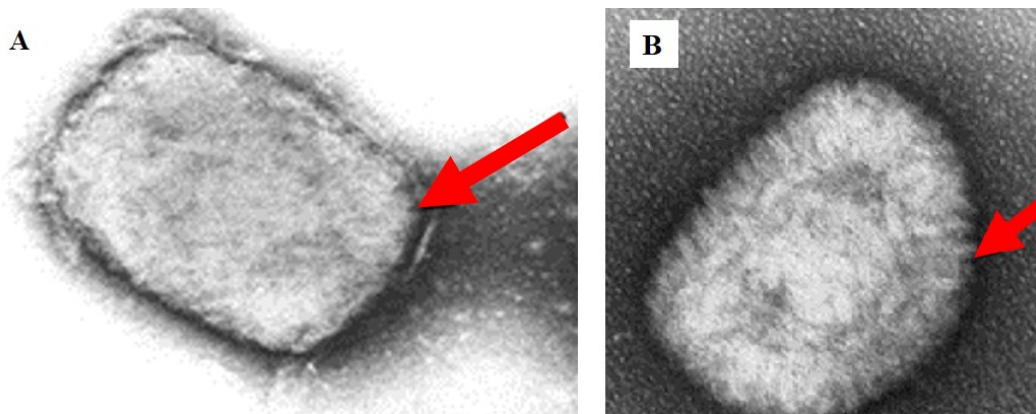


**Obrázek 20** Pipetování dle metody s kapslí (upraveno dle Blancett et al., 2017)

Vlevo je kapsle před nasazením na pipetu a vpravo je kapsle po nasazení, již připravena k pipetování vzorku virové suspenze.

### Vyhodnocení metody a výsledek:

Po provedení transmisní elektronové mikroskopie (TEM) můžeme pozorovat negativně obarvený poxvirus obalen nepravidelnými tubuly (viz obrázek 21), které připomínající tvar cihly. Tyto tubuly jsou lokalizované na vnější membráně viru. Průměrná velikost poxviru činí okolo 280×230nm.



**Obrázek 21** Poxvirus obklopený nepravidelnými tubuly vnější membrány po negativním barvení, zobrazený metodou TEM (upraveno dle Catroxo, 2009)

A – Poxvirus obklopený nepravidelnými tubuly vnější membrány po negativním barvení, zobrazený díky TEM,  
 B – Poxvirus po negativním barvení, s bližším pohledem na stavbu tubulů nepravidelného cihlovitého tvaru (červené šipky vyznačují nepravidelné tubuly)

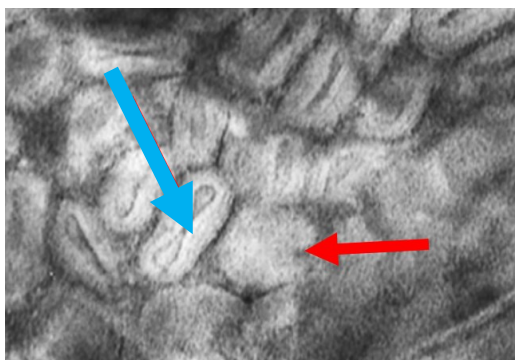
### 5.2.2 Technika zalévání pryskyřicí

Tato metoda se neobejde bez použití vhodných vzorků (např. částí kožních lézí), stejně jako tomu bylo u metody předchozí. Tyto vzorky se musí při jejich zpracování zafixovat, a to pomocí pufru složeného z 0,1 M 2,5 % glutaraldehydu o pH 7,0. Následně je nutno provést dehydrataci, po které se vzorek zalívá tekutou pryskyřicí. Takto zalitý vzorkový materiál je připravený na nařezání na velice tenké plátky, které se dále umístí a upevní na měděné mřížky. Posledním krokem je jejich zvýraznění kontrastní látkou.

#### Vyhodnocení výsledku:

Po provedení elektronové mikroskopie můžeme pozorovat obarvený preparát vykazující přítomnost inkluzních (odpadních) tělísek, které jsou obklopeny membránou obsahující virové částice (viriony) oválného tvaru (viz obrázek 22) s průměrnou velikostí 270×130 nm s viditelným genomem. Genom je možné pozorovat i ve tvaru připomínající tyčinku (vyznačeno modrou šipkou). Výjimkou také není přítomnost prázdných nevyzrálých virionů (vyznačeno červenou šipkou).





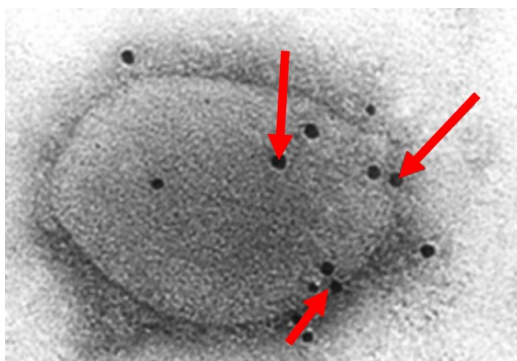
**Obrázek 22** Vyvrálé a nevyvrálé viriony Myxoma viru, zobrazené za použití TEM  
(upraveno dle Catroxo, 2009)

### 5.2.3 Technika imunocytochemická

Při této metodě se využívá pro negativní obarvení částic koloidního zlata. I u této metody je zapotřebí měděné mřížky s virovou suspenzí. Navíc je nanesena vrstva suspenze s primárními protilátkami. Následuje proplachování mřížek roztokem PBS a deionizovanou vodou. Po důkladném propláchnutí se mřížky inkubují v přítomnosti sekundární protilátky, kterou tvoří protein v kombinaci s částicemi zlata o velikosti 10 nm. V posledním kroku se mřížky obarví za pomoci kontrastní látky (Catroxo et al., 2009).

#### Vyhodnocení výsledku:

Díky použití koloidního zlata, které zde posloužilo jako marker, byla reakce antigenu s protilátkou zviditelněna. Respektive byl těmito částicemi zlata (červené šipky, viz obrázek 23) označena a zviditelněna virová částice.



**Obrázek 23** Poxvirus značený částicemi koloidního zlata, analyzovaný v TEM  
(upraveno dle Catroxo, 2009)

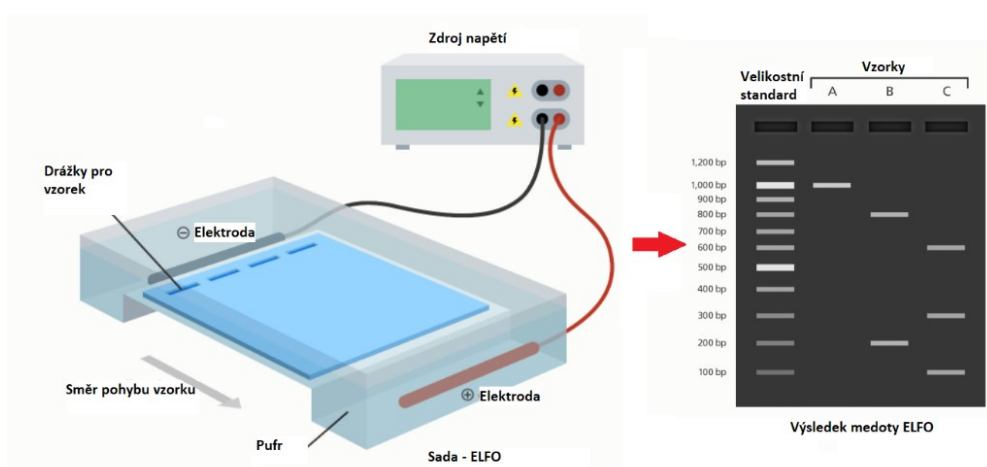
### 5.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založená na „kopírování“ částí, či segmentů DNA nebo RNA. Existuje již široká škála metod PCR a každá má své výhody a omezení. Tyto metody umožňují sledovat například přítomnost viru s použitím minimálního množství vzorku. Pomocí PCR lze detekovat přítomnost virového původce na základě průkazu jeho nukleové kyseliny. Klasická PCR metoda je relativně finančně dostupná a dokáže vyrobit miliony kopií úseku DNA za několik málo hodin (Duarte et al., 2014). Díky tomu se zajistí dostatečné množství DNA pro následnou analýzu a vizualizaci DNA (Walker-Daniels 2012).

Začátkem každé PCR metody je vyizolování DNA ze vzorku. Vyizolovaná DNA se *in vitro* smíchá s reagensy, mezi které patří například DNA polymeráza, nukleotidy, primery (uměle vytvořené startovací sekvence DNA), popř. fluorescenční látka. Metoda je prakticky založena na přirozeném procesu replikace DNA. Celý postup se tedy skládá z několika kroků, během kterých se množství stanovovaného úseku DNA až zdvojnásobí. Prvními kroky jsou separace cílové DNA neboli úvodní denaturace a následná denaturace. Během těchto kroků dojde k zahřátí vzorku na teplotu okolo 90 °C. Při takovéto teplotě se DNA dvoušroubovice začíná narušovat a vznikají dvě samostatná vlákna. Dalším krokem je navázání primerů DNA (annealing), při teplotě od 50 do 75 °C. PCR metoda dokáže zdvojnásobit množství pouze takových DNA úseků, které jsou označeny PCR primery. Primerem se rozumí uměle vyrobené oligonukleotidy (krátké kousky syntetické DNA), které se navážou na dané sekvence po obou stranách cílové oblasti v DNA. Například pro virového původce myxomatózy je takovýmto specifickým úsekem gen M000.5L/R, který je duplikován na koncích genomu a je jedinečný mezi leporipoxviry (Duarte et al., 2014). Dále tedy dochází k navázání primerů na začátek sekvence, která má zkopírovat a označit tuto sekvenci pro třetí PCR krok. Následný krok se nazývá elongace. Dochází při něm k připojení nukleotidů k primerům pomocí DNA polymerázy za teploty okolo 75 °C. Dojde k vytvoření nového vlákna DNA ze vzorku. Výsledkem této fáze jsou dvě stejné kopie originálního úseku DNA. Všechny tyto tři kroky se opakují s duplikovanými DNA v cyklu tolikrát, než dojde k vytvoření dostatečného množství kopií DNA. Obecný počet tepelně regulovaných cyklů se pohybuje okolo 30–40 (Cooper, 2011; Mackay et al., 2002).

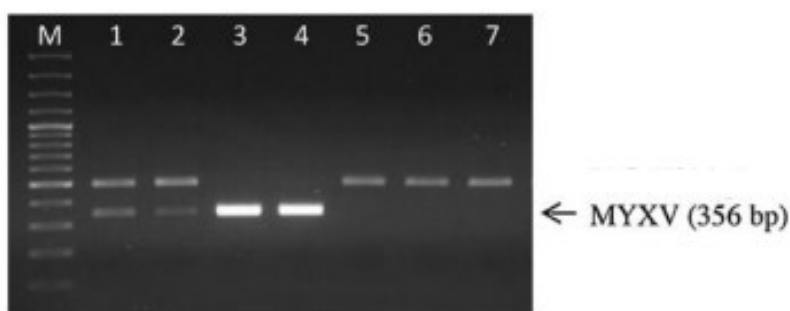
Standardní PCR metoda je po namnožení DNA dále vyhodnocována pomocí gelové elektroforézy, speciálních barviv a UV světla (Walker-Daniels 2012). Během elektroforetické separace při stejnosměrném elektrickém napětí se kladně nabitá částice ve vzorku pohybují ke katodě a záporně nabitá k anodě (viz obrázek 24), neutrální částice se nepohybují. Při gelové

elektroforéze závisí pohyb analyzovaného vzorku na tvaru a velikosti molekul, pH prostředí a na struktuře gelové matrice. Tyto aspekty mohou ovlivnit i celou účinnost metody (Cooper, 2011; Mackay et al., 2002).



**Obrázek 24** Sada na elektroforézu s výsledkem elektroforézy (upraveno dle [www.yourgenome.org](http://www.yourgenome.org))

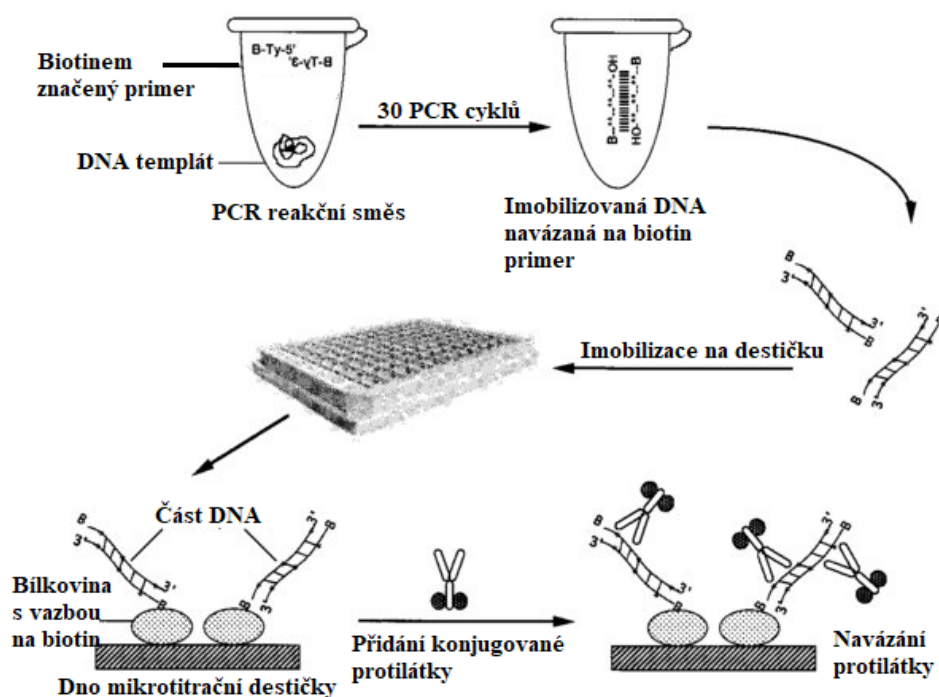
PCR produkty se elektroforeticky separují za přítomnosti ethidium bromidu, nebo jiných netoxických barviv (SYBR Green nebo Eva Green). Barviva se využívají především pro zviditelnění výsledku, jelikož zvyšují schopnost DNA fluoreskovat pod UV světlem. Některé barviva, jako SYBR Green se používají již ve fázi množení DNA. Elektroforeticky separované produkty se následně porovnávají pod UV světlem a vyhodnocují dle standardu, kterým je směs fragmentů DNA o známé velikosti. Intenzita proužku značí přítomné množství analyzované látky ve vzorku. Pokud je přítomných proužků více, znamená to, že vzorek obsahoval sekundární produkty (Dudová a Hájek, 2008; Walker-Daniels 2012).



**Obrázek 25** Elektroforeticky separované produkty PCR analýzy (Kwit et al., 2019)

Na obrázku 25 jsou vyznačeny vzorky 1-7. Vzorky č. 1 a č. 2 jsou pozitivní na výskyt Myxoma viru. Vzorek č.3 se vzorkem č. 4 jsou silně pozitivní a čísla 5,6 a 7 jsou negativní kontroly. Vzorky 1-4 jsou rozdílného charakteru, jedná se o 4 odlišné divoké kmeny Myxoma viru. Všechny vzorky pocházely z tkání králíků původem z Polska.

Standardní detekce DNA na agarózovém gelu (southern blot) je však časově náročná a vyžaduje několik kroků manipulace s produktem PCR, což dále riskuje kontaminaci laboratoře (Mackay et al., 2002). Alternativně lze k zachycení DNA použít PCR-ELISA. Proces této metody je v prvních krocích shodný s předchozí standardní PCR metodou, změna nastává po namnožení úseků DNA (viz obrázek 26). K vyhodnocení se využívá navazovacích primerů značených biotinem nebo oligonukleotidovou sondou (oligosonda) a detekčních protilátek. Tato metoda je mnohem citlivější metodou ve srovnání se standardní PCR a vyznačuje se kratším analytickým časem. Další výhodou (viz tabulka 7) PCR-ELISA je to, že test umožňuje provádět screening ve velkém měřítku pouze za použití standardního laboratorního vybavení, takže je vhodný pro použití v klinických laboratořích. (Sue et al., 2014).



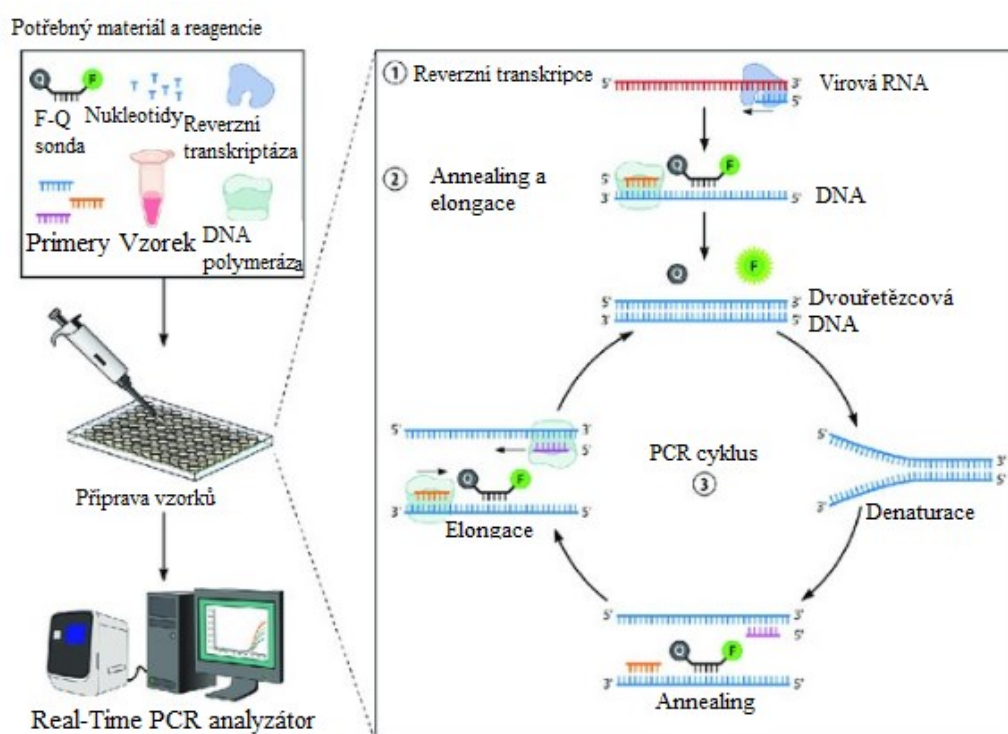
**Obrázek 26** Schéma obecného průběhu PCR-ELISA metody (upraveno dle Luk et al., 1997)

**Tabulka 7** Srovnání vybraných parametrů pro PCR metody (upraveno dle Sue et al., 2014)

|                            | PCR                             | PCR-ELISA                       | Real-Time PCR                    |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <b>Potřebné vybavení</b>   | Standardní laboratorní vybavení | Standardní laboratorní vybavení | Přístroj na detekci fluorescence |
| <b>Náklady na reagenty</b> | Nízké                           | Středně vysoké                  | Vysoké                           |
| <b>Detekční limit</b>      | 1-10 ng/μl                      | 0,01 ng/μl                      | 0,25 pg/μl                       |

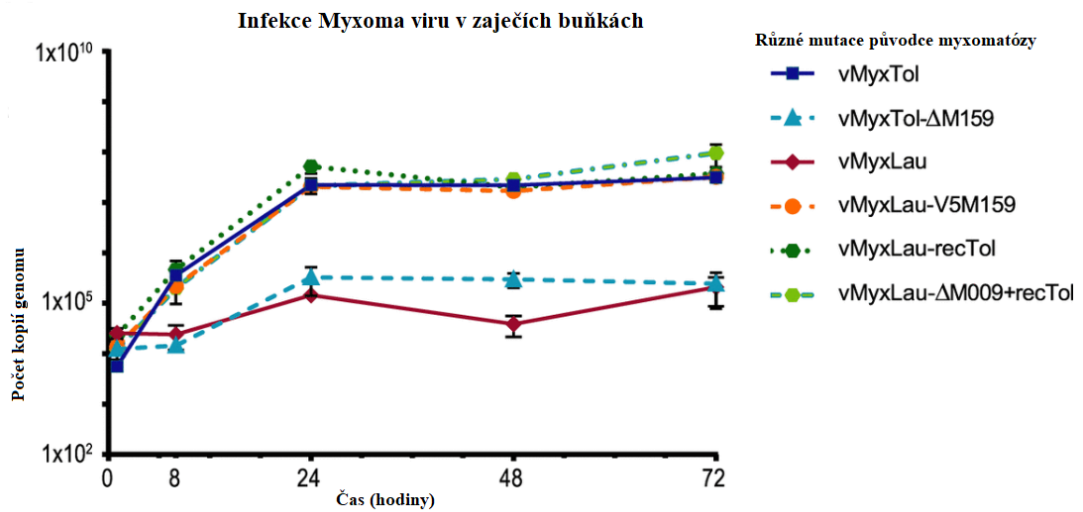
PCR metody se však od tohoto způsobu vizualizace výsledku posunuly během let ještě o něco dále. Další a hojně využívanou metodou je PCR, která se hojně využívá, díky její

možnosti sledování výsledků v aktuálním časovém rozmezí. Metoda se nazývá Real-Time PCR, v překladu známá jako PCR v reálném čase. PCR v reálném čase jak kvantitativní, tak specifická. Monitorování akumulujících se částí DNA vzorku v reálném čase (viz obrázek 27) je umožněno prostřednictvím značených primerů, sond nebo fluorogenními molekulami. Tato chemie má jasné výhody oproti radiogenním oligosondám, které zahrnují zamezení radioaktivních emisí, snadnou likvidaci a prodlouženou skladovatelnost. Počáteční množství sledované sekvence lze určit porovnáním vzorků se standardní křivkou známých množství DNA.



**Obrázek 27** Proces metody Real-Time PCR se vzorkem RNA viru  
(upraveno dle Safiabadi Tali et al., 2021)

Mezi nevýhody použití Real-Time PCR ve srovnání s běžnou PCR patří nekompatibilita některých softwarových platforem s určitými fluorogenními chemiemi. Také počáteční náklady na PCR v reálném čase mohou být velice vysoké. Výsledkem této metody je grafický záznam a data (viz obrázek 28). I když je Real-Time PCR metoda k detekci virů již hojně využívána, dá se stále využít i jiných zde zmíněných metod. Záleží na možnostech a vybavení laboratoře (Walker-Daniels 2012).



**Obrázek 28** Grafický záznam metody Real-Time PCR cílená na gen M053 provedena s několika mutacemi Myxoma viru na zaječích buňkách (upraveno dle Águeda-Pinto et al., 2022)

## 6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo popsat *Myxoma virus* jako původce onemocnění. První část práce je věnována představení pojmu „viry“. Je zde stručně popsána jejich morfologie, funkce, replikace a jsou zde vyjmenovány základní druhy virů. Následně se práce věnuje původci myxomatózy a představuje jeho taxonomické zařazení. Dle tohoto taxonomického členění spadá *Myxoma virus* do čeledi *Poxviridae*, podčeledi *Chordopoxvirinae* rodu *Leporipoxvirus*. Po seznámení s *Myxoma* virem se práce ubírá k představení myxomatózy jako onemocnění a k její historii. V této části je popsán průběh nemoci, včetně názorných obrázků a tabulek. Nechybí zde ani obecné nastínění nejběžnějších kmenů *Myxoma viru*, které se za dobu existence této nákazy vyvinuly (respektive zmutovaly) a nemoc se tak mohla lépe šířit a bohužel stále i šíří. V posledních kapitolách této bakalářské práce jsou sepsány informace ohledně problematiky terapie a prevence, pro předejití nákazy způsobované virem *Myxoma virus*. Nechybí ani nejběžnější metody, které se využívají při diagnostice myxomatózy. Jedná se převážně o elektronovou mikroskopii a PCR metody. Opět jsou zde popsány obecné principy, postupy a u některých metod i ukázky v podobě obrázků.

I navzdory tomu, že myxomatózu jako onemocnění známe již několik desítek let, je stále hrozbou zejména pro chovy králíků a volně žijící zajíce. Není se tedy proč divit, že myxomatóza, a to včetně jejího původce stále tématem různých výzkumů. Také vzhledem ke stále větší odolnosti mikroorganismů obecně, se dá předpokládat, že se výzkum nejen myxomatózy bude posouvat stále dopředu. I když je onemocnění rozšířeno takřka po celém světě, je mu největší pozornost věnována právě v Evropě.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **ABADE DOS SANTOS, F. A., C. L. CARVALHO, A. PINTO, R. RAI. M. MONTEIRO, P. CARVALHO, P. MENDONÇA, M. C. PELETEIRO, F. PARRA. M. D. DUARTE, 2020.** Detection of Recombinant Hare Myxoma Virus in Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*). *Viruses*. 12(10), s. 9-10. DOI: 10.3390/v12101127
2. **ÁGUEDA-PINTO, A., S. KRABERGER, A. EVERTS, A. GUTIERREZ-JENSEN, H. L. GLENN, K. P. DALTON, A. PODARERA, F. PARRA, M. MARTINAZ-HARO, J. A. VIÑUELAS, A. VARSANI, G. MCFADDEN, M. M. RAHMAN, P. J. ESTEVES, N. C. ELDE, C. B. COYNE, 2022.** Identification of a Novel Myxoma Virus C7-Like Host Range Factor That Enabled a Species Leap from Rabbits to Hares. *MBio*. 13(2). ID článku: e03461-21. DOI: 10.1128/mbio.03461-21
3. **AIDA, V., V. C. PLIASAS, P. J. NEASHAM, J. F. NORTH, K. L. MCWHORTER, S. R. GLOVER a C. S. KYRIAKIS, 2021.** Novel Vaccine Technologies in Veterinary Medicine: A Herald to Human Medicine Vaccines. *Frontiers in Veterinary Science*. 8, ID článku: 654289. DOI:10.3389/fvets.2021.654289
4. **BARRETT, J. W. a G. MCFADDEN, 2008.** Origin and Evolution of Poxviruses. *Origin and Evolution of Viruses*. Elsevier, 2008, s. 438. DOI: 10.1016/B978-0-12-374153-0.00019-9
5. **BLANCETT, C. D., M. K. MONNINGER, C. A. NGUESSAN, K. A. KUEHL, C. A. ROSSI, S. P. OLSCHNER, P. L. WILLIAMS, S. L. GOODMAN, M. G. SUN, 2017.** Utilization of Capsules for Negative Staining of Viral Samples within Biocontainment. *Journal of Visualized Experiments*. (125), s. 1-6. DOI: 10.3791/56122
6. **BRABB, T. a R. F. DI GIACOMO, ed., 2012.** Viral Diseases. SUCKOW, M. A., K. A. STEVENS a R. P. WILSON. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*. 1. Elsevier, 2012, s. 365-373. DOI: 10.1016/B978-0-12-380920-9.00014-6



7. **CATROXO, M. H. B., J. G. BERSANO, A. M. C. P. F. MARTINS, S. PETRELLA, M. A. S. C. PORTUGAL a O. S. SOUZA, 2009.** Ultrastructural Study of Poxvirus Causing Myxomatosis in Rabbits, in São Paulo and Santa Catarina, Brazil. *International Journal of Morphology*. 27 (2), s. 543–552. DOI: 10.4067/S0717-95022009000200039
8. **COOPER, A. 2011.** *Biophysical chemistry*. 2. Cambridge, UK: RSC Publishing. Tutorial chemistry texts (RSC Publishing). ISBN 978-184-9730-815.
9. **DANTAS, A. R. C., F. H. MENEZES, K. S. SERRA, E. D. O. BARBOSA a H. FERNANDES-FERREIRA, 2016.** First record of *Sylvilagus brasiliensis* (Linnaeus, 1758) (Lagomorpha Leporidae) in Rio Grande do Norte state, Northeast Brazil. *Check List*. 12 (2), s. 2. DOI: 10.15560/12.2.1856
10. **DI GIALLONARDO, F. a E. C. HOLMES, 2015.** Viral biocontrol: grand experiments in disease emergence and evolution. *Trends in Microbiology*. 23 (2), s. 84. DOI: 10.1016/j.tim.2014.10.004
11. **DUARTE, M. D., S. C. BARROS, A. M. HENRIQUES, M. T. FAGULHA, F. RAMOS, T. LUÍS a M. FEVEREIRO, 2014.** Development and validation of a real time PCR for the detection of myxoma virus based on the diploid gene M000.5L/R. *Journal of Virological Methods*. 196, s. 219-221. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.11.014
12. **DUDOVÁ, S. a R. HÁJEK, 2008.** Využití metody REAL-TIME PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klinická Onkologie*. 21(1), s. 1-3. ISSN 0862-495X.
13. **EPSTEIN, B., M. REISSIG a E. DE ROBERTIS, 1952.** Studies by electron microscopy of thin sections of infectious myxomatosis in rabbits. *Journal of Experimental Medicine*. 96(4), s. 349-350. DOI: 10.1084/jem.96.4.347
14. **KERR, P. J., 2021.** Rabbit Myxoma Virus and the Fibroma Viruses (Poxviridae). *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, 2021, s. 2-5. DOI: 10.1016/B978-0-12-809633-8.20935-7

15. **KERR, P. J., I. M. CATTADORI, M. B. ROGERS, et al., 2017.** Genomic and phenotypic characterization of myxoma virus from Great Britain reveals multiple evolutionary pathways distinct from those in Australia. *PLOS Pathogens*. 13(3), s. 2-4. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006252
16. **KERR, P., J. LIU, I. CATTADORI, E. GHEDIN, A. READ a E. HOLMES, 2015.** Myxoma Virus and the Leporipoxviruses: An Evolutionary Paradigm. *Viruses*. 7(3), s. 1020-1061. DOI: 10.3390/v7031020
17. **KHARE, R., 2019.** Foundations of clinical virology section I. *GUIDE TO Clinical and Diagnostic Virology*. 1. ASM Books. ISBN 9781555819910.
18. **KING, A. M. Q., M. J. ADAMS, E. B. CARSTENS a E. J. LEFKOWITZ, ed., 2011.** *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. 9. Elsevier. ISBN 978-0-12-384684-6.
19. **KWIT, E., Z. OSIŃSKI a A. RZEŻUTKA, 2019.** Detection of viral DNA of myxoma virus using a validated PCR method with an internal amplification control. *Journal of Virological Methods*. 272, s. 6. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113709
20. **LIU, J., S. WENNIER a G. MCFADDEN, 2010.** The immunoregulatory properties of oncolytic myxoma virus and their implications in therapeutics. *Microbes and Infection*. 12(14-15), s. 1145-1150. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.08.012
21. **LUK, J. M., U. KONGMUANG, R. S. TSANG a A. A. LINDBERG, 1997.** An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the rfbS gene from serogroup D salmonellae: a rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(3), s. 715. DOI: doi:10.1128/jcm.35.3.714-718.1997
22. **LUO, M. 2008.** Assembly of Viruses: Nonenveloped Particles. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, 2008, s. 200-201. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00666-X
23. **MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. 2002.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 30(6), s. 1292-1293. DOI: 10.1093/nar/30.6.1292
24. **MACLACHLAN, N. J. a E. J. DUBOVI, ed., 2016.** *Fenner's Veterinary Virology*. Fifth Edition. Academic Press. ISBN 9780128009468.

- 25. MANEV, I., K. GENOVA, A. LAVAZZA a L. CAPUCCI, 2018.** Humoral immune response to different routes of myxomatosis vaccine application. *World Rabbit Science*. 26(2), s. 149-150. DOI: 10.4995/wrs.2018.7021
- 26. MCKEEN, L. 2018.** Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization.: *The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers*. 4. Elsevier, 2018, s. 2-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-814511-1.00001-9
- 27. NAVARATNARAJAH, C. K.; WARRIER, R.; KUHN, R. J. 2008.** Assembly of Viruses: Enveloped Particles. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, 2008, s. 194-195. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00667-1
- 28. NENCKA, R., D. RŮŽEK, K. HERCÍK, M. KLÍMA a J. WEBER, 2020.** AVex – Viry a boj s nimi. *AVex* [online]. 2020, 2020 (SPECIÁL), s. 1-12 [cit. 2022-02-27]. Dostupné z: <https://www.avcr.cz/export/sites/avcr.cz/cs/veda-a-vyzkum/avex/files/2020-06-Viry-a-boj-s-nimi.pdf>
- 29. NOWLAND, M. H., D. W. BRAMMER, A. GARCIA, H. G. RUSH a K. R. PRITCHETT-CORNING, FOX, J. G., G. M. OTTO, M. T. WHARY a L. C. ANDERSON, ed., 2015.** Biology and Diseases of Rabbits. *Laboratory Animal Medicine*. 3. Elsevier, 2015, s. 430-431. DOI: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00010-9
- 30. PAYNE, Susan, 2017.** Introduction to RNA Viruses. *Viruses*. Elsevier, 2017, s. 97–100. DOI: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00010-6
- 31. PINHEIRO, A., A. LEMOS DE MATOS a P. J. ESTEVES, MAGE, R. G., ed., 2016.** The Immune System of Lagomorphs. RATCLIFFE, M. J. H. *Encyclopedia of Immunobiology*. 1. 1. Elsevier, 2016, s. 518-519. DOI: 10.1016/B978-0-12-374279-7.12016-8
- 32. REECE, J. B., L. A. URRY, M. L. CAIN, S. A. WASSERMAN a P. V. MINORSKY, 2014.** *Campbell Biology*: 10. Pearson. ISBN 978-0321775658.
- 33. REECE, J. B., L. A. URRY, M. L. CAIN, S. A. WASSERMAN, P. V. MINORSKY a R. B. JACKSON, 2010.** *Campbell Biology*. 9. Benjamin Cummings. ISBN 13: 978-0321558237.

- 34. REEMERS, S., L. PEETERS, J. VAN SCHIJNDEL, B. BRUTON, D. SUTTON, L. VAN DER WAART a S. VAN DE ZANDE, 2020.** Novel Trivalent Vectored Vaccine for Control of Myxomatosis and Disease Caused by Classical and a New Genotype of Rabbit Haemorrhagic Disease Virus. *Vaccines*. 8 (3), s. 3. DOI: 10.3390/vaccines8030441
- 35. RIVERS, T. M., 1927.** Filterable viruses a critical review. *Journal of Bacteriology*. 14 (4), s. 220-226. DOI: 10.1128/jb.14.4.217-258.1927
- 36. ROLDÃO, A., A. C. SILVA, M. C. M. MELLADO, P. M. ALVES a M. J. T. CARRONDO, 2011.** Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier, 2011, s. 626-627. DOI: 10.1016/B978 - 0- 08-088504-9.00072-6
- 37. ROSELL, J. M., L. F. DE LA FUENTE, F. PARRA, et al., 2019.** Myxomatosis and Rabbit Haemorrhagic Disease: A 30 – Year Study of the Occurrence on Commercial Farms in Spain. *Animals*. 9 (10), s. 1-12. DOI: 10.3390/ani9100780
- 38. RZIHA, H. J. a M. BÜTTNER, 2021.** Parapoxviruses (Poxviridae). *Encyclopedia of Virology*. 4. Elsevier, 2021, s. 666-667. DOI: 10.1016/B978-0-12-814515-9.00058-8
- 39. SAFIABADI TALI, S. H., J. J. LEBLANC, Z. SADIQ, O. D. OYEWUNMI, C. CAMARGO, B. NIKPOUR, N. ARMANFARD, S. M. SAGAN, S. JAHANSHAHI-ANBUHI, 2021.** Tools and Techniques for Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 Detection. *Clinical Microbiology Reviews*. 34(3). ID článku: e00228-20. DOI: 10.1128/CMR.00228-20
- 40. SANJUÁN, R., M. PEREIRA-GÓMEZ a J. RISSO, 2016.** Genome Instability in DNA Viruses. *Genome Stability*. Elsevier, s. 37. DOI: 10.1016/B978 - 0- 12 - 803309- 8.00003- 3
- 41. SIMON, Ch. E., 1923.** The filterable viruses. *Physiological Reviews*. 1923, 3(4), s. 483. DOI: 10.1152/physrev.1923.3.4.483
- 42. SMITH, G. L., P. BEARD a M. A. SKINNER, 2008.** Poxviruses. *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, s. 2008, 329. DOI: 10.1016/B978-012374410-4.00691-9

- 43. SPIESSCHAERT, B., G. MCFADDEN, K. HERMANS, H. NAUWYNCK a G. R. VAN DE WALLE, 2011.** The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Veterinary Research* [online]. 42(1), s. 2-12. DOI: 10.1186/1297-9716-42-76
- 44. SUE, M. J., S. K. YEAP, A. R. OMAR a S. W. TAN, 2014.** Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *BioMed Research International*. 2014, ID článku: 653014. DOI: 10.1155/2014/653014
- 45. SUTHERLAND, M., H. BARON a J. LLINAS, 2021.** Recommended Health Care and Disease-Prevention Programs for Herds/Flocks of Exotic Animals. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 24(3), s. 708-716. DOI: 10.1016/j.cvex.2021.05.003
- 46. VARELA, F., 2022.** Myxomatosis and Radioactivity in Carlos Saura's La caza. *Environmental Humanities*. 14(1), s. 129. DOI: 10.1215/22011919-9481473
- 47. WALKER-DANIELS, J., 2012.** Current PCR Methods. *Materials and Methods*. 2, s. 1-5. DOI: 10.13070/mm.en.2.119
- 48. www.dyntec.cz:** [online] Copyright © 2022 Dyntec s. r. o. [cit. 2022-02-26]. Dostupné z: <https://www.dyntec.cz/product-catalogue/veterinary-medicaments/products-rabbits?language=en>
- 49. www.historyofvaccines.org** [online]. © 2022 College of Physicians of Philadelphia. [cit. 2021-12-20]. Dostupné z: <https://www.historyofvaccines.org/content/bacterium-mistakenly-blamed-yellow-fever>
- 50. www.uskvbl.cz:** Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv [online]. [cit. 2022-05-12]. Dostupné z: <https://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>
- 51. YAO, N., PRUD'HOMME, R. K., ed., 2020.** The Advanced Microscopy of Colloids. PRIESTLEY, R. D. a R. K. PRUD'HOMME, ed. *Polymer colloids: Formation, characterization and applications*. 9. USA: Royal Society of Chemistry, s. 220-223. DOI: 10.1039/9781788016476-FP001