

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

Viry a plísně jako nástroje bioterorismu
Lucie Jankovičová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Jankovičová**
Osobní číslo: **C16242**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Viry a plísně jako nástroje bioterorismu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte literární rešerši pojednávající o virech a plísních, které jsou potenciálně zneužitelné jako nástroje bioterorismu.
2. V hlavní části bakalářské práce charakterizujte stavbu a vlastnosti virů a plísní. Dále uveďte konkrétní příklady mikroorganismů, které jsou zneužitelné jako bioteroristické nástroje. Tyto mikroorganismy následně zevrubně charakterizujte.
3. Ke studiu tématiky použijte především zahraniční odbornou literaturu a informace přehledně zpracujte podle pokynů a doporučení školitele. K vyhledávání odborných publikací používejte elektronické vědecké databáze, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, *apod.*

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

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Jiří Handl**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Majtnerová**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**
Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 30. června 2019

Lucie Jankovičová

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala především skvělé Mgr. Pavlíně Majtnerové za její ochotnou spolupráci, vstřícnost, trpělivost a také za odborné rady a konzultace, které mi poskytovala v celém průběhu psaní mé práce. Dále bych ráda poděkovala rodině a všem přátelům, kteří pro mě byli po celou dobu mého studia obrovskou oporou.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na viry a plísně resp. mykotoxiny, které by z hlediska jejich mikrobiologických znaků bylo možné zneužít při výrobě biologických zbraní. V úvodní části jsou všechny patogeny rozděleny do kategorií tak, jak je hodnotí NATO a CDC. Dále jsou popsány obecné vlastnosti a charakteristika virů a plísní. Hlavní část práce se pak zabývá podrobnějším zhodnocením konkrétních virových onemocnění a mykotoxikóz, jako potenciálních bioteroristických hrozeb.

KLÍČOVÁ SLOVA

Viry, plísně, mykotoxiny, biologické zbraně, bioterorismus

TITLE

Use of viruses and fungi in bioterrorism

ANNOTATION

This bachelor thesis is focused on viruses and fungi, mycotoxins respectively, which can be used as a biological weapon due to their microbiological characteristics. In the introduction, all pathogens are classified according to NATO and CDC. The general characteristics of viruses and fungi are also described in this work. The main part of the thesis deals with more detailed evaluation of specific viral diseases and mycotoxicoses as potential bioterrorist threats.

KEYWORDS

Viruses, fungi, mycotoxins, biological weapons, bioterorrism

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	9
SEZNAM TABULEK.....	10
ÚVOD	12
1 BIOTERORISMUS.....	13
1.1 Patogeny využívané pro bioterorismus	13
1.1.1 Kategorie A	13
1.1.2 Kategorie B.....	14
1.1.3 Kategorie C.....	15
2 VIRY	16
2.1 Stavba virionu.....	16
2.2 Genom	17
2.3 Reprodukční cyklus	18
2.4 Patogenita, formy a vstupní brány infekce	18
2.5 Léčba	19
3 VIRY A VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÁ PRO BIOTERORISMUS.....	20
3.1 Pravé neštovice.....	20
3.2 Virové hemoragické horečky	21
3.2.1 Horečka Lassa	21
3.2.2 Horečka Marburg	23
3.2.3 Ebola.....	24
3.2.4 Bolivijská hemoragická horečka	26
3.3 Komplex virů klíšťové encefalidity.....	27
3.3.1 <i>Virus evropské klíšťové encefalidity</i>	27
3.4 Komplex virů japonské encefalidity.....	29
3.5 Žlutá zimnice.....	30
3.6 Horečka dengue.....	30
3.7 Virus Nipah	31
3.8 Hantavirus	32
3.9 Chřipková onemocnění.....	34
3.9.1 Rod <i>Influenzavirus A</i>	35
4 PLÍSNĚ	37

4.1	Stavba	37
4.2	Rozmnožování	37
4.3	Negativní vlivy plísní	37
4.3.1	Toxigenní mikromycety	38
5	PLÍSNĚ A MYKOTOXINY POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÉ PRO BIOTERRORISMUS	39
5.1	Fusariové mykotoxiny	39
5.1.1	Trichotheceny	39
5.1.2	Fumonisinyl	41
5.2	Aflatoxiny	42
5.3	Ochratoxiny	43
5.4	Námelové alkaloidy	43
6	ZÁVĚR	45
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	46

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1</i> Obecné schéma viru.....	16
<i>Obrázek 2</i> Typy symetrie	17
<i>Obrázek 3</i> Orthopoxvirus v elektronovém mikroskopu	20
<i>Obrázek 4</i> Mladá žena trpící pravými neštovicemi	20
<i>Obrázek 5</i> Struktura viru Lassa.....	22
<i>Obrázek 6</i> Marburgvirus v elektronovém mikroskopu	23
<i>Obrázek 7</i> Ebolavirus pod mikroskopem.....	25
<i>Obrázek 8</i> Stádia vývoje klíšťat z rodu <i>Ixodes Ricinus</i>	28
<i>Obrázek 9</i> Flavivirus	28
<i>Obrázek 10</i> Charakteristické struktury viru Nipah	32
<i>Obrázek 11</i> Schéma morfologie hantavirů.....	33
<i>Obrázek 12</i> Puchýřky na těle, které způsobil "yellow rain"	40
<i>Obrázek 13</i> Aflatoxin B1,B2,G1 a G2	42
<i>Obrázek 14</i> Ochratoxin A.....	43

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 Přehled mikroorganismů spadajících do kategorie A.....</i>	<i>14</i>
<i>Tabulka 2 Přehled organismů virů a toxinů spadajících do kategorie B.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabulka 3 Přehled systémových antivirotik.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabulka 4 Přehled výskytu viru Marburg.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabulka 5 Přehled některých onemocnění způsobených mykotoxiny.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabulka 6 Rozdělení trichothecenů</i>	<i>40</i>

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFB1	Aflatoxin B1
BHF	Bolivijská hemoragická horečka („Bolivian hemorrhagic fever“)
BSF	Úroveň biologické bezpečnosti („Biosafety level“)
BTWC	Úmluva o biologických a toxických zbraních („The Biological and Toxin Weapons Convention“)
CDC	Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí („Centers for Disease Control and Prevention“)
CNS	Centrální nervový systém
CWC	Úmluva o chemických zbraních („The Chemical Weapons Convention“)
dsDNA	Dvouřetěcová DNA („double-stranded DNA“)
dsRNA	Dvouřetězcová RNA („double-stranded RNA“)
HFRS	Hemoragická horečka s ledvinovým syndromem („Hemorrhagic fever with renal syndrome“)
HPS	Lidský plicní syndrom („Human pulmonary syndrome“)
mRNA	Mediátorová RNA („messenger RNA“)
NATO	Severoatlantická aliance („North Atlantic Treaty Organization“)
NE	Nephropathia epidemica
OTA	Ochratoxin A
PCR	Polymerázová řetězová reakce („Polymerase Chain Reaction“)
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy
ssDNA	Jednořetěcová DNA („single-stranded DNA“)
ssRNA	Jednořetězcová RNA („single-stranded RNA“)
TBE	Klíšťová encefalitida („Tick-Borne encephalitis“)
TBEV	Virus klíšťové encefalitidy („Tick-Borne encephalitis virus“)
WHO	Světová zdravotnická organizace („World Health Organization“)
WNV	Západonilský virus („West Nile virus“)

ÚVOD

Hrozba teroristickými útoky je především v poslední době velmi obávaná a diskutované téma. Předpokládá se, že výroba a především použití biologických zbraní by představovalo pro lidstvo mnohem větší nebezpečí než jaderné bomby. Příprava biologických zbraní je totiž poměrně lehká a levná. Proto bývají biologické zbraně často nazývány jako atomové zbraně chudých. Pokud bychom si připomněli nějaké případy z historie, dá se s jistotou prohlásit, že pokusů o výhru války nebo o vyvolání paniky pomocí zasažení nepřítele smrtící nemocí, nebylo málo. Většinou se ale jednalo o onemocnění bakteriální. V této práci se zaměřuji na použití virů a plísni, resp. mykotoxinů, které sice v minulosti nebylo tak časté, ale rozhodně neméně účinné.

Na úvod by bylo dobré připomenout, že vývoj, produkce a použití biologických a chemických zbraní jsou zakázány mezinárodními smlouvami. Většina států podepsala v roce 1925 Ženevský protokol, v roce 1972 Konvenci o biologických a toxinových zbraních („The Biological and Toxin Weapons Convention“, BTWC) a v roce 1993 Konvenci o chemických zbraních („The Chemical Weapons Convention“, CWC). Ne všechny státy však ke konvencím přistoupily. V současné době nepodepsalo úmluvu o chemických zbraních 5 států – Angola, Egypt, KLLDR, Somálsko a Sýrie (1; 2).

1 BIOTERRORISMUS

O bioterorismu jako takovém se začalo nejvíce mluvit po události v roce 2001 ve Washingtonu, D.C., kdy 5 lidí zemřelo na vdechnutí aerosolu se spory antraxu (3). Jako biologické zbraně mohou být použity bakterie, viry, mikroskopické houby nebo i toxiny. Cílem jsou převážně lidé, ale hrozba se může týkat i hospodářsky významných zvířat, či rostlin. Dle způsobu použití zbraně můžeme útoky rozdělit do různých skupin především podle způsobu šíření proti napadenému cíli (4).

Bioterorismus je tedy pouze jedna z forem užití biologických zbraní, kdy důvodem pro takovýto útok může být např. odlišná víra. Cílem teroristů je způsobit co největší paniku a zájem. Stát by totiž nepoužil prostředek, proti němuž není jeho armáda vybavena a který by mohl vyvolat epidemie ve vlastních řadách (2).

Ne vždy se však jedná o bioterorismus. Například útoky, při kterých jeden stát použije biologickou zbraň proti jinému státu nebo skupině, se označují jako biologická válka. Při biokriminalitě se zase jedná o útok mnohem menšího rozsahu. Osoba, která by chtěla takovýto útok provést, musí mít značné znalosti v oboru a většinou i přístup do vybavené laboratoře, protože pokud by se biologický materiál dostal do rukou nezkušené osoby, mohlo by to způsobit velké škody, které by mohly vyústit v epidemie (2).

Rozhodujícím pro kvalifikaci útoků je, kdo útok organizuje a provádí a jaký je jeho rozsah. Následuje už jen volba vhodného mikroorganismu (2).

1.1 Patogeny využívané pro bioterorismus

Podle amerického centra pro kontrolu a prevenci nemocí („Center for Disease Control and Prevention“, CDC) jsou bioteroristické útoky definovány jako úmyslné šíření mikroorganismů a nebuněčných organismů, které jsou schopny u člověka, zvířat nebo rostlin vyvolat onemocnění nebo způsobit smrt (5). Mohou být v laboratoři upraveny tak, aby se zvýšila schopnost vyvolat infekci a zároveň je učinit odolnější vůči současné farmakoterapii. Biologické látky se mohou šířit vzduchem, vodou nebo potravinami a často je bývá těžké rychle identifikovat. Stanovená klasifikační kritéria vedla k zařazení mikroorganismů do tří kategorií – A, B a C (podle NATO a CDC) (5).

1.1.1 Kategorie A

Do kategorie A se řadí bakterie, toxiny nebo viry, které se snadno šíří a hrozí u nich vysoké riziko primárního přenosu mezi lidmi (5). Léčba bývá velmi náročná a často tyto infekce končí smrtí. Práce s těmito látkami vyžaduje laboratoř s bezpečnostním opatřením

4 (Biosafety Level, BSF). V takové laboratoři jsou nutné sprchy, vzduchotěsné komory s dezinfekčními chemikáliemi, speciální skafandry a především uzavřený okruh vzduchotechniky (6). Na území ČR splňuje podmínky BSF-4 pouze jedna laboratoř a ta se nachází v Těchoníně (7). Přehled organismů, které NATO a CDC zařadilo do této kategorie je v následující tabulce 1.

Tabulka 1 Přehled mikroorganismů spadajících do kategorie A (převzato a upraveno).

Mikroorganismus	Onemocnění
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismus
<i>Yersinia pestis</i>	Mor
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie
<i>Variola major</i>	Pravé neštovice
<i>Ebola virus</i>	Krvácivá horečka Ebola
<i>Marburg virus</i>	Margburská krvácivá horečka
<i>Lassa virus</i>	horečka Lassa
<i>Machupo virus</i>	Bolivijská hemoragická horečka

1.1.2 Kategorie B

Do kategorie B jsou řazeny mikroorganismy se středním rizikem přenosu a mírnějším průběhem onemocnění. Pokud se zachytí včas, dají se poměrně úspěšně léčit. Tato kategorie zahrnuje například některé toxiny a bakterie vyskytující se v potravinách a ve vodě (8). Při manipulaci s těmito patogeny je kladen větší důraz na osobní ochranu a je nutné použití ochranných pomůcek - zejména rukavic, a dezinfekce pracovních ploch. Pokud je patogen schopen šíření aerosolem, pak je nutná laboratoř BSL-3. Ta je udržována v permanentním podtlaku a vystupující vzduch prochází HEPA filtry (9). Přehled mikroorganismů spadajících do kategorie B je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2 Přehled organismů virů a toxinů spadajících do kategorie B (převzato a upraveno).

Mikroorganismus/toxin	Onemocnění
<i>Brucella sp.</i>	Brucelóza- primárně u zvířat. U lidí způsobuje hnisavé záněty.
<i>Salmonella sp.</i>	Břišní tyfus, paratyfus a salmonelóza z potravin
<i>Escherichia coli</i>	Průjmová onemocnění
<i>Shigella dysenteriae</i>	Bacilární úplavice
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Melioidóza – horečka, abscesy, encefalitida
<i>Chlamydia psittaci</i>	Psitakóza
<i>Coxiella burnetii</i>	Horečka Q
<i>Rickettsia prowazekii</i>	Skvrnitý tyfus
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Kryptosporidióza
Virus	Onemocnění
Viry encefalitických horeček	Encefalitida
Toxiny	Onemocnění
Epsilon toxin	Toxin produkováný bakterií <i>Clostridium perfringens</i> a způsobující enterotoxémii (10)
Ricin	Toxin, semen skočce obecného (<i>Ricinus communis</i>) (11).
Stafylokokový enterotoxin B	Otravy z potravin, horečky, zimnice, kašel

1.1.3 Kategorie C

Mezi látky s třetí nejvyšší prioritou patří patogeny, které by v budoucnu mohly být využívány jako biologické zbraně především kvůli jejich dopadu na zdraví, dostupnosti, snadné výrobě a potenciálně vysoké míře úmrtnosti. Patří sem virus Nipah a *Hantavirus* (8).

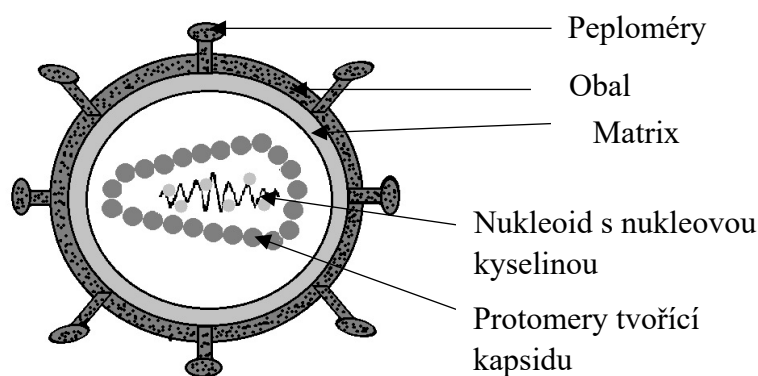
2 VIRY

Viry obecně jsou nebuněčné organismy, které jsou neaktivní do té doby, než si najdou hostitelskou buňku vhodnou k rozmnožování. Takto napadená hostitelská buňka většinou umírá a uvolňuje tak jednotlivé virové částice – viriony - do okolního prostředí. Viry se proto dají považovat za vnitrobuněčné parazity rostlin i živočichů, včetně člověka. Jejich součástí je jeden typ nukleové kyseliny, která je chráněna bílkovinným obalem – kapsidou. Některé viry mohou mít jeden či více bičíků a složitější viry ještě další obaly, které bývají tvořeny bílkovinami a fosfolipidy (12).

2.1 Stavba virionu

Jako virion se označuje jedna virová částice. Velikost jedné částice se pohybuje od 20 nm do 300 nm. Struktura virionu je znázorněna na obr.1. Virionové částice jsou obklopeny vnějším obalem, který se skládá z M-proteinu a z vnějšího lipoproteinového komplexu. Komplex je tvořen lipidovou dvojvrstvou z buněčných membrán a virovými glykoproteiny. Glykoproteiny bývají shlukovány v pravidelně uspořádané peploméry, které můžeme vidět jako drobné výběžky (Obr. 2) (13).

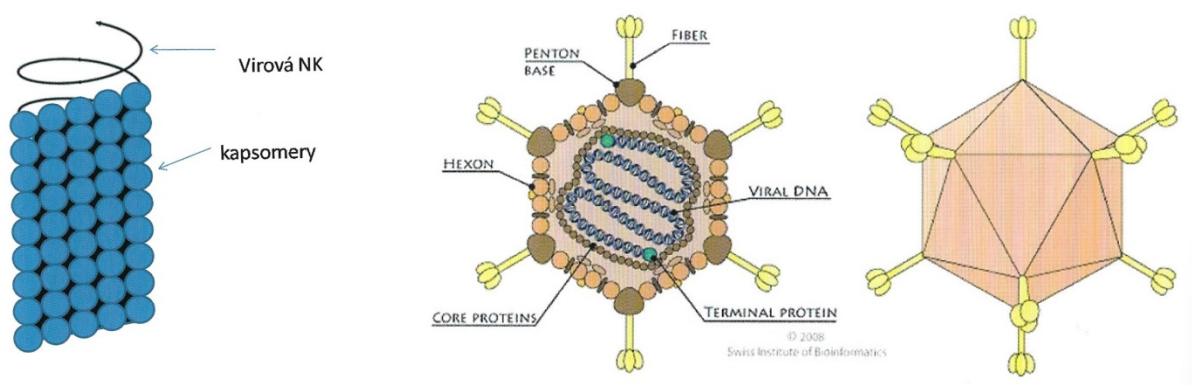
Vnitřní část virionu - nukleoid, obsahuje nukleovou kyselinu, která tvoří genom viru. Nukleoid je obklopen bílkovinným obalem – kapsidou, jejíž hlavní funkcí je chránit nukleovou kyselinu. Celý komplex se nazývá nukleokapsida. Virová kapsida se skládá ze stejných opakujících se bílkovinných podjednotek – protomer (14)



Obrázek 1 Obecné schéma viru

Protomery se pravidelným přikládáním symetricky shlukují ve vyšší útvary. Podle typu symetrie se u živočišných virů rozlišují kapsidy se spirální (helikální), kubickou (ikozahedrální) a komplexní symetrií (13; 14).

Kapsidy se spirální symetrií jsou tvořeny jednotlivými protomery, které jsou řazeny za sebou do tvaru šroubovice (obr.2). Takový typ kapsidy se vyskytuje převážně u řady RNA virů (např. u virů čeledí *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* apod.) Velká většina DNA virů obsahuje kapsidu s kubickou symetrií, kterou tvoří pravidelný dvacetistěn. V jeho vrcholu bývá pět protomer a na jeho hranách a stěnách jsou obvykle jednotky šestičlenné (obr.2). Viry s kubickou symetrií se k sobě v místě svého vzniku často řadí a vytvářejí tzv. pseudokrystaly (15).



Obrázek 2 Typy symetrie. Vlevo je schéma helikální symetrie a vpravo kubická nukleokapsida tvořena kapsomery z hexonových a pentonových bází. Virový protein je zakončen terminálními proteiny. Na povrchu virionu jsou patrné vláknité struktury (14).

Komplexní symetrie se nachází u bičíkatých fágů, jejichž hlavička je stavěna podle kubické symetrie a bičík podle binální. Takovou komplexní stavbu mají například poxviry-největší živočišné viry (13).

2.2 Genom

Podle nukleové kyseliny se rozlišují DNA a RNA viry. U DNA virů je genom tvořen molekulou DNA s dvěma komplementárními vlákny (double-stranded DNA, dsDNA). Genom RNA virů je tvořen pouze jednou RNA molekulou (single-stranded RNA, ssRNA). Je však známo pár virů jejichž genom je tvořen jednovláknovou molekulou DNA (ssDNA), například *Circovirus* a *Gyrovirus*, a nebo dvouvláknovou dsRNA (*Orthoreovirus*, *Orbivirus*, *Rotavirus* a jiné) (14).

U RNA a ssDNA je potřeba také rozlišit polaritu genomu. RNA s pozitivní polaritou (+)ssRNA má povahu jako mRNA a může být na ribozomech přímo překládána do příslušných polypeptidů. Zatímco (–)ssRNA má opačnou polaritu než mRNA a tak musí být nejprve přepsána virovou RNA transkriptázou do podoby mRNA (14; 16).

2.3 Reprodukční cyklus

Viry zahájí reprodukční cyklus přilnutím na povrch buňky pomocí specifických receptorů – fáze **adsorpce**. Virovými receptory mohou být např. povrchové buněčné glykoproteiny nebo sacharidové zbytky. Po průniku viru do buňky (fáze **penetrace**) se do buňky uvolní NK, která se začne replikovat a tvořit virové proteiny. Některé obalené viry (Retroviry, Herpesviry) pronikají do buňky splynutím obalu viru s buněčnou plazmatickou membránou a virová nukleokapsida se tak ocitne v cytoplazmě. Všechny neobalené viry pak do buňky pronikají nejčastěji pasivně pomocí endocytózy. Jamka kolem receptoru má na sobě navázaný virion, ta se vychlípí, odškrtí a splývá s nejbližším endozómem. Poté nastává fáze **eklipse**, kdy dochází k obnažení a replikaci NK a k syntéze virových proteinů.

Ve fázi **maturace** dochází k dozrávání virionů. Poslední fází reprodukce virů je fáze **eluce**, při které se viriony uvolňují do buňky (17; 13). Uvolněné viry buď infikují další citlivé buňky nebo mohou nějakou dobu přežívat v mezipříteli a ve vnějším prostředí. Některé viry mohou také přetrvávat ve formě latentní infekce, při které se replikační mechanismy spustí až po určité stimulaci (18).

2.4 Patogenita, formy a vstupní brány infekce

Patogenita vyjadřuje schopnost mikroorganismu vyvolat určité onemocnění. Mikroorganismy mohou být nepatogenní, podmíněně patogenní a obligátně patogenní. Nepatogenní mikroorganismy nejsou schopny vyvolat onemocnění. Podmíněně patogenní pouze za určitých podmínek, například pokud zmutují. Obligátně patogenní vyvolají onemocnění vždy, když se dostanou do hostitele v dostatečném počtu (14).

Virové infekce probíhají většinou bezpříznakově a projeví se pouze u oslabených jedinců. Pokud bývá postižen větší počet buněk, projeví se infekční nemoc, která má tři různé formy – klinickou, abortivní a subklinickou. Klinická forma infekce má všechny typické příznaky, forma abortivní má pouze některé charakteristické příznaky a forma subklinická nemá specifické příznaky (13).

Podle rozsahu můžeme infekce také dělit na lokální, systémové a generalizované (13). Infekce může být chronická, perzistentní a nebo latentní, Při perzistentní infekci nejsou přítomny žádné klinické příznaky ale virus je v organismu stále přítomen. Jako chronické infekce se většinou projevují infekce získané již před narozením (17).

Nejčastější vstupní branou pro infekci jsou sliznice. Ve vnímavých buňkách slizničního epitelu dojde k primárnímu pomnožení viru a inkubační doba u nemocí lokalizovaných na sliznicích trvá zhruba 2-5 dní. Pokud je v těle více vnímavých buněk, pronikají viry hlouběji

do submukozy a lymfatických uzlin, případně se mohou šířit i krví. Infekce se do těla může dostat také skrz kůži – bodnutím hmyzem, kousnutím, škrábnutím či vpichem injekční jehly. Dalším způsobem proniknutí viru může být transplacentární přenos infekce z matky na plod (15).

2.5 Léčba

Proti virovým infekcím se uplatňuje především zvyšování specifické imunity vakcínami a antiséry, zvyšování nespecifické odolnosti interferonem nebo jeho induktory a antivirová terapie. Vakcinace se provádí buď pomocí živých oslabených virových vakcín nebo inaktivovaných (usmrcené nebo neinfekční viriony) vakcín. Účinek pasivní imunizace je okamžitý, avšak krátkodobý. V dnešní době se nejčastěji používají lidské imunoglobuliny (13). Existuje však celá řada systémově použitelných antivirotik (tabulka 3), které se nedoporučuje užívat k léčbě obyčejných viróz. V tomto případě se spíše vyplatí léčit příznaky.

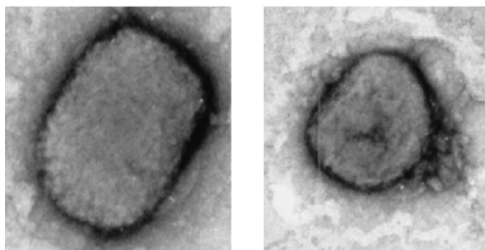
Tabulka 3 Přehled systémových antivirotik (13)

Antiherpetika	Aciklovir, valaciklovir, famciklovir		
Proticytomegalovirová antivirotika	Ganciklovir, cidofovir, foscarnet		
Protichřipková chemoterapeutika	Amantadin, zanamivir, oseltamivir		
Antiretrovirotika	Inhibitory reverzní transkriptázy	nukleosidové	Zidovudin, didanosin, stavudin, adefovir a další.
		nenukleosidové	Nevirapin, indinavir, nelfinavir, amprenavir
	Inhibitory virové proteázy	Saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir, amprenavir	
	Inhibitory vstupu viru do buňky	Enfuvirtir	
Interferony	Interferon α , interferon β		
Ostatní	Ribavirin, viradabin		

3 VIRY A VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÁ PRO BIOTERRORISMUS

3.1 Pravé neštovice

Původcem onemocnění pravých neštovic je virus *Variola vera* - obalený dsDNA virus s komplexní symetrií. Patří do rodu *Orthopoxvirus* (obr.3) a řadí se spolu s dalšími viry neštovic do čeledi *Poxviridae*, pro které jsou charakteristické velké a složité viriony (19).



Obrázek 3 *Orthopoxvirus* v elektronovém mikroskopu (20).

Onemocnění se rozlišuje na dvě formy – *Variola major* s velkou mortalitou a *Variola minor* s mírnějším průběhem. Mortalita u *Variola major* dosahuje až 42 %. Virus neštovic lze chytit poměrně snadno. Do lidského hostitele vstupuje ústy nebo respiračními cestami. Doba a stupeň infekčnosti pacienta je dána množstvím viru, který se vylučuje v puchýřcích a strupech. Inkubační doba trvá 10 – 14 dní a během této doby se virus replikuje v dýchacích cestách a dále se šíří po celém těle. S nástupem vyrážky (Obr. 4) začíná doba nejvyšší infekčnosti, která postupně ubývá až dokud se oddělí všechny strupy. Do té doby zůstává pacient v izolaci (19).



Obrázek 4 Mladá žena trpící pravými neštovicemi. Fotografie byla pořízena čtvrtý den od propuknutí vyrážky (21).

Předtím, než začala eradikace neštovic, nebyl dostupný žádný lék. Léčily se tedy pouze symptomy neštovic – snížení horečky, léky proti bolesti a masti na puchýřky. Kvůli

precitlivosti na světlo bylo důležité, aby byl pacient v tmavé místnosti (19). V roce 1796 britský lékař Edward Jenner použil materiál od lidí, kteří byli nakaženi kravskými neštovicemi (*Vaccinia virus*) a naočkoval jím člověka, který trpěl pravými neštovicemi. Očkování bylo velmi efektivní a rychle se rozšířilo v Evropě i Americe (22). Po vymýcení neštovic se vakcína přestala vyrábět a v současné době je dostupných pouze 77 miliónů dávek této vakcíny (19).

Laboratorní diagnostika varioly se nejčastěji provádí pomocí negativního barvení v elektronového mikroskopu. Další možností jsou antigenní detekce a sérologické testy. V tomto případě bývá nejčastější metoda detekce antigenu pomocí precipitace v gelu, která detekuje přítomnosti virového antigenu ve vezikulární nebo pustulární tekutině. Vzorky by měly být zpracovávány pouze v laboratoři na bezpečnostní úrovni 4 (19).

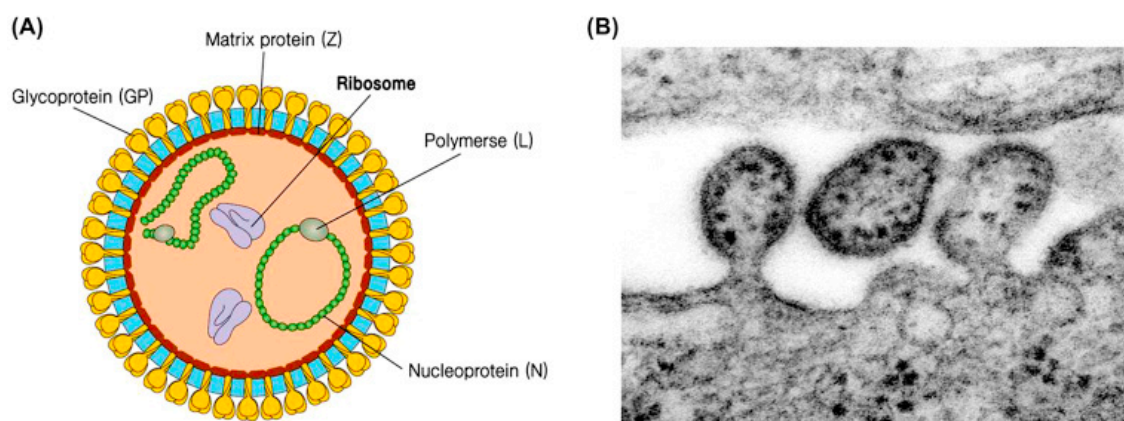
Z infekčních onemocnění, které jsou potenciální bioteroristickou hrozbou, jsou právě neštovice ty nejobávanější. Virus totiž dokáže v podobě aerosolu přežít mimo hostitele až 48 hodin a rychle se šíří mezi vnímavými jedinci. Pravděpodobně poprvé byly neštovice jako biologická zbraň použity britským vojskem v Jižní Americe (1754-1767). Podle dostupných informací byli indiánům distribuovány deky kontaminované virem neštovic. V roce 1970 a 1972 propukly v Evropě další dvě epidemie, které jsou také považovány za úmyslné šíření infekce (23).

V roce 1967 byla zahájena kampaň pro eradikaci neštovic, které se v té době vyskytovaly ve více než 42 státech po celém světě. Počet případů se uvádí na 10-15 milionů a 2 miliony úmrtí ročně (24). V roce 1980 byly právě neštovice prohlášeny Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organization, WHO) za vymýcené. Vzorky původce neštovic bylo nařízeno zničit ve všech laboratořích kromě laboratoře v CDC v Atlantě a v Sovětském svazu. Po vyhlášení eradikace bylo zrušeno povinné očkování a přeočkování. Většina populace není v téhle době tedy proti pravým neštovicím imunní (24).

3.2 Virové hemoragické horečky

3.2.1 Horečka Lassa

Onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1969 v Nigérii, Libérii a Sierra Leone. Pojmenované je podle místa v Nigérii, kde byl identifikován první případ. O tři roky později probíhal ve Sierra Leone výzkum, při kterém se zjistilo, že přirozeným rezervoárem viru je krysa *Mastomys natalensis* (25).



Obrázek 5 Struktura viru Lassa. A: Obecná stavba virionu, B: Virus Lassa v elektronovém mikroskopu (29).

Virus horečky Lassa (Obr. 5) patří do čeledi *Arenaviridae*. Sem patří mnoho dalších virů, které infikují především hlodavce a vyvolávají u nich perzistentní infekci. Arenaviry měří asi 100 nm, jsou obalené a pokryté výběžky. Dřeň virionu obsahuje drobná zrníčka, která odpovídají ribozomům hostitelské buňky. Genom je tvořen jedním vláknem RNA rozděleným do dvou segmentů. Má negativní polaritu a symetrie je helikální (13).

Mezi typické projevy onemocnění patří vysoká horečka, bolest hlavy, zvracení, průjem, těžká faryngitida s bílými skvrnami na hltanu, měkkém patře a na mandlích, kašel a především zvýšená krvácivost. Po čtrnácti dnech nastává kóma a smrt (26). Inkubační doba je 6-21 dní.

V Africe se Lassa vyskytuje endemicky a přenos na člověka bývá především z potravin kontaminovaných močí hlodavců, nebo z člověka na člověka. Ročně se infikuje odhadem 100 000-300 000 lidí a z toho jich přibližně 5 000 zemře (27).

Nejdůležitější prevencí je vyvarovat se kontaktu s hlodavci a nekonzumovat nic, co by mohlo být potenciálně kontaminované. Při léčbě se nejvíce uplatňuje antivirotikum Ribavirin. Ten se doporučuje podávat nitrožilně a aby byla léčba účinná, je nutné ji zahájit do šesti dnů od nakažení (28).

Dále byla navržena jednorázová vakcína proti žluté zimnici a horečce Lassa, ovšem náklady spojené s distribucí byly obrovské a navíc velmi málo zasažených zemí podporuje očkování dětí (28). Z pohledu teroristů je Lassa zneužitelná právě kvůli zhoršenému přístupu léků. V prvních dnech se dá onemocnění jen těžko diagnostikovat, protože projevy nejsou pro virus specifické a pokud se nenasadí včas vhodná léčba, bývá onemocnění často smrtelné (29).

Jako většina virů, i virus Lassa se dá izolovat z krve na tkáňových kulturách buněk Vero. Od ostatních arenavirů se dá Lassa odlišit pomocí imunofluorescence, ta prokáže virus ale pouze u 52 % případů. Virový antigen můžeme detekovat pomocí metody ELISA. U přeživších se prokazují protilátky IgG a IgM. Lassa lze diagnostikovat po třech dnech od nakažení (28).

3.2.2 Horečka Marburg

Marburgvirus byl poprvé objeven v roce 1967, když se v laboratoři v Marburgu, Frankfurtu a v Bělehradu nakazili zaměstnanci neznámou nemocí. Onemocnělo 31 lidí a z toho 7 jich na následky onemocnění zemřelo. Zpětně bylo zjištěno, že zdrojem infekce jsou nakažení Kočkodani zelení importovaní z Ugandy (30). Později bylo prokázáno, že opice nejsou přirozeným hostitelem – virus je pro ně až příliš patogenní (13). Virus byl pojmenován po městě s nejvíce potvrzenými případy, tedy Marburg. V dalších letech byl virus diagnostikován pouze u pár případů. První velká epidemie vypukla až v roce 1998 u dělníků v dolech na zlato ve městě Durba v Kongu (30).

Původcem onemocnění je *Marburgvirus* (Obr. 6), který se řadí spolu s *Ebolavirus* do čeledi *Filoviridae*. Je to obalený ssRNA – virus s negativní polaritou a helikální symetrií. Filovirus vytváří vláknité útvary různých délek a tvarů. Manipulovat s virem je dovoleno pouze v laboratoři s nejvyšším stupněm bezpečnosti (13).



Obrázek 6 *Marburgvirus* v elektronovém mikroskopu (31).

Inkubace je individuální, ale nejčastěji se pohybuje od 4 do 7 dní. Typickými příznaky jsou bolesti hlavy, vysoké horečky, charakteristické vyrážky, zvýšená krvácivost z tělních otvorů, zvracení krve a v neposlední řadě i postižení centrálního nervového systému. Virus se šíří tělními tekutinami téměř do všech tkání a buňky v nich nekrotizují (32). Mortalita dosahuje téměř 90 % (tabulka 4).

Tabulka 4 Přehled výskytu viru Marburg (převzato a upraveno) (30).

Rok	Země	Počet mrtvých/nakažených	Mortalita
1967	Německo, Srbsko	7/31	23%
1975	Jižní Afrika	1/3	33%
1980	Keňa	1/2	50%
1987	Keňa	1/1	100%
1988	Rusko	1/1	100%
1990	Rusko	0/1	0%
1998-2000	Demokratická republika Kongo	128/154	83%
2004-2005	Angola	227/252	90%
2007	Uganda	¼	25%
2008	USA	0/1	0%
2008	Nizozemsko	1/1	100%

Na toto onemocnění neexistuje žádné očkování a ani účinný lék. Léčí se tedy pouze symptomy. Kvůli akutnímu selhání ledvin, které často onemocnění provází, je u většiny pacientů potřebná dialýza. Největším problémem však bývá krvácení. Musí se tedy podávat léky na podporu srážlivosti krve (32). Právě vysoká mortalita, žádný účinný lék a neznámý přirozený hostitel viru vedou k obavám z jeho zneužití.

Pro diagnostiku viru *Marburg* se nejčastěji využívají molekulárně biologické metody a detekce antigenu metodou ELISA. V pozdějším stádiu onemocnění se využívá sérologický průkaz virus-specifických protilátek. Dále se k diagnostice může využít nepřímá imunofluorescence, Western-blot, případně elektronová mikroskopie a izolace viru na tkáňových kulturách nebo na laboratorních zvířatech (33).

3.2.3 Ebola

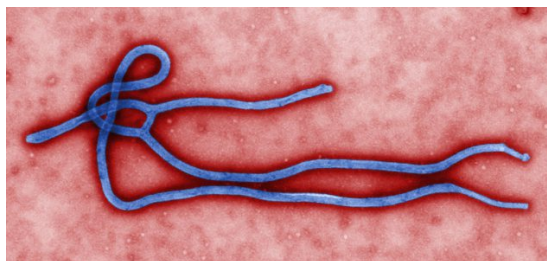
První případ krvácivého onemocnění byl nahlášen v roce 1976 na severu Zaire (nyní Demokratická republika Kongo) v nemocnici, která se specializovala na léčbu malárie. Mortalita při této epidemii dosáhla 88 % (318 případů a z toho 280 úmrtí). Podruhé propukla epidemie ve stejném roce v Jižním Súdánu. Nakazil se pracovník továrny, kde se zpracovávala bavlna. Později onemocněli další zaměstnanci a během pěti měsíců počet nemocných vzrostl na 284 případů. Při této epidemii zemřelo 151 lidí. Až do roku 1976 se

v Africe nikdo s takovým virem nesetkal. Virus byl tedy pojmenován podle řeky na severozápadu Konga – Ebola (34; 35).

Největší epidemie proběhla v letech 2014-2016, kdy podle WHO bylo nakaženo 28 652 lidí a 11 325 jich zemřelo. Nejvíce případů bylo evidováno v Guinei, Libérii s Sierra Leone (35).

Aktuálně k roku 2019 probíhá epidemie eboly v Demokratické republice Kongo. Během května 2019 bylo nahlášeno 1510 případů. Situace v Kongu je velmi vážná a to především ze dvou důvodů. Zhruba třetina pacientů umírá mimo nemocnice a často až do jejich smrti není jasné, že pacienti trpěli ebolou. Takto se od nich pak nakazí další lidé. Druhým problémem jsou v Kongu útoky místní milice a také to, že ve většině zasažených regionech panuje prakticky bezvládnost, což komplikuje očkování a hlavně osvětu.

Původce eboly (Obr. 7) je stejný jako u viru Marburg, tedy *Filovirus*. Identifikován byl ale až o několik let později. Podle výskytu viru se rozlišují na Sudan, Zaire, Reston, Pobřeží slonoviny a Bundibugyoa (oblast v Ugandě). V každém státě bylo onemocnění jinak závažné (35).



Obrázek 7 Ebolavirus pod mikroskopem (35)

Ebola je smrtelné onemocnění, které postihuje jak lidi, tak i opice. Přírodním hostitelem však nejsou opice, ale s největší pravděpodobností netopýři. Mezilidský přenos je oproti viru Marburg velmi snadný a průběh nemoci závažnější. Úmrtnost dosahuje až 88 %, ale výrazně se liší podle druhu. Ne všechny kmeny jsou pro člověka patogenní. Ebola Reston postihuje pouze opice a prasata a na Pobřeží slonoviny byl popsán pouze jeden případ, kdy se vědkyně nakazila při pitvě nemocného šimpanze. Onemocnění mělo pouze mírný průběh a pracovnice se po pár dnech zcela zotavila (34; 13).

Šíří se přímým kontaktem s tělními tekutinami infikované osoby. Virus se do těla může dostat skrz popraskanou kůži, sliznici očí, nosu nebo úst a kontaktem s krví a tkání infikovaných zvířat. Nejčastějšími symptomy bývají: horečka, bolesti hlavy a svalů, slabost, únava, průjem, zvracení, bolesti břicha, vyrážka, selhání ledvin a jater nebo krvácení

a podlitiny z nejasných příčin. Symptomy se mohou objevit 2 až 21 dnů od kontaktu s virem. Průměrně však doba nepřesahuje 10 dní (35).

Proti ebrole nebyla dosud vynalezena žádná léčba ani očkování. Nejdůležitější je včasná diagnostika a rychlé zahájení podpůrné léčby symptomů – rehydratace pacienta, udržování krevního tlaků, prokysličení a tlumení bolesti. Při podezření na ebolu musí být pacient ihned izolován a zdravotnický personál by měl užívat ochranné oděvy. Oficiálně se epidemie eboly považuje za ukončenou po 42 dnech od posledního potvrzeného případu (36).

Sovětská armáda se několikrát snažila kultivovat ebolu a vyrobit z ní biologickou zbraň. U samotného viru však není jeho zneužití až tak pravděpodobné. Aby byl jako biologická zbraň účinný, musel by se přenášet vzduchem nebo by musel být modifikován tak, aby se mohl snadněji šířit a ovlivňoval i dýchací systém. Sovětský svaz nakonec ukončil program na výrobu biologických zbraní (37). Dále se o kultivaci eboly snažil japonský kult Aum Shinrikyo, který je znám pro bioteroristický útok sarinovým plynem v tokijském metru. Aum Shinrikyo poslal v roce 1992 skupinu 40 lidí do Demokratické republiky Kongo kvůli údajné pomoci při epidemii. Skutečným účelem ale bylo shromáždit virus, což se nepodařilo (38).

Laboratorní diagnostika je možná až po propuknutí prvních příznaků onemocnění. Vyšetření se provádí ze vzorku krve pomocí PCR na průkaz virové RNA. Ta bývá pozitivní už po pár dnech od prvních projevů. V pozdějším stádiu nemoci je možné stanovení specifických IgG a IgM protilátek metodou ELISA. Osoby, které onemocnění přežijí, by měli mít v krvi protilátky, které by je měly chránit minimálně dalších 10 let. Diagnostika by měla probíhat v podmínkách s maximální biologickou ochranou (39).

3.2.4 Bolivijská hemoragická horečka

Poprvé byla Bolivijská hemoragická horečka (Bolivian hemorrhagic fever, BHF) popsána v roce 1959 ve východní Bolívii. Nicméně samotný virus Machupo, který onemocnění způsobuje, byl izolován z pacienta, až v roce 1963. Mezi lety 1976 a 1993 nebyly hlášeny žádné další případy. Rok poté se virus zase objevil a od té doby je sledován. Nejméně 20 případů (z toho 3 smrtelné) bylo zaznamenáno v roce 2007 a více než 200 případů BHF (12 smrtelných) o rok později (40).

Virus Machupo se řadí, stejně jako virus horečky Lassa, do čeledi Arenaviridae. Je to tedy ssRNA obalený virus s negativní polaritou (13).

Pacienti, kteří se přišli s BHF léčit do nemocnice si stěžovali na vysokou horečku, krvácení dásní, petechie, modřiny, pocit nevolnosti a třes. Klinická laboratorní vyšetření dále

ukázala trombocytopenii, leukopenii a také hematurii. Dále se u pacientů rozvinula respirační alkalóza a metabolická acidóza. V tomto stádiu většinou onemocnění končilo smrtí. Mortalita se u tohoto viru pohybuje kolem 30 % (40).

Při propuknutí onemocnění se pacientovi dostává podpůrné léčby. Ta zahrnuje intravenózní hydrataci, kortikoidy, antipyretika, antimikrobiální léčiva a především krevní transfúze od dárců, kteří přežili infekci virem Machupo (40). Bylo zjištěno, že rezervoárem viru jsou hlodavci *Calomys callosus*. Jako prevence se tedy doporučuje se vyhýbat kontaktu s těmito hlodavci a nekonzumovat potenciálně kontaminované potraviny (40). Bioterroristická hrozba je u tohoto viru stejná jako u ostatních hemoragických horeček - příznaky nejsou ze začátku specifické a léčba pouze podpůrná. To je pro teroristy značná výhoda, protože aby byla léčba účinná, musí se zahájit včas.

Diagnostika se provádí izolací na tkáňových kulturách buněk Vero. Po několika dnech se buňky testují na arenaviry nepřímým imunofluorescenčním testem a PCR (40).

3.3 Komplex virů klíšťové encefalidity

Klíšťová encefalitida (Tick-borne encephalitis, TBE) patří mezi nejnebezpečnější neuroinfekce v Evropě a Asii. Onemocnění způsobuje *virus klíšťové encefalidity* (TBEV), který byl poprvé objeven v roce 1937 během expedice ve východním Rusku vedené Levem Zilberem. Ten hledal původce akutní encefalidity ve spojitosti s kousanci od klíšťe (41). Podle nejaktuálnějšího taxonomického schématu se do tohoto komplexu řadí antigenně příbuzné viry přenášené klíšťaty. Nejdůležitější z této skupiny je virus klíšťové encefalidity se dvěma podtypy – evropský a dále východní (virus ruské jaro-letní encefalidity). Dále sem patří například virus Louping ill, virus Langat, virus Powasan, virus nemoci kyanurského hvozdu a virus omské hemoragické horečky (13).

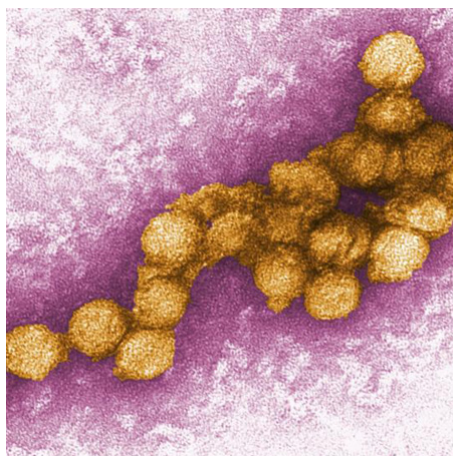
3.3.1 Virus evropské klíšťové encefalidity

Virus byl poprvé izolován v roce 1949 (kmeny Hanzalová a Hypr). V přírodním ohnisku nákazy koluje virus mezi hlodavci a hmyzožravci a přenášejí ho různá vývojová stádia klíšťat rodu *Ixodes ricinus* (Obr. 8). V ohnisku bývá většinou infikováno 1 % klíšťat a to převážně dospělců. Od klíšťat se mohou nakazit i hospodářská zvířata, nejčastěji kozy, které pak virus vylučují mlékem (13).



Obrázek 8 Stádia vývoje klíšťat z rodu *Ixodes Ricinus* – Dospělá samička, dvě larvy a nymfa. Virus přenáší všechna stádia (42).

Původcem onemocnění je virus klíšťové encefalitidy, který se řadí do rodu *Flavivirus* (Obr. 9) a do čeledi *Flaviviridae*. Ta dostala svůj název podle původce žluté zimnice, *febris flava* (*Flava* – žlutý) (13). Zralé viriony mají průměr asi 50 nm a jsou tvořeny hustým jádrem obklopeným lipidovou dvojvrstvou obsahující dva obalové glykoproteiny, E a M (41). Glykoprotein E se váže na buněčné receptory jako hemaglutinin a je hlavním cílem neutralizačních protilátek. Membránový protein se vyskytuje pouze na zralých extracelulárních virionech (13). Nezralé intracelulární viriony obsahují prekurzorový prM protein. Ke štěpení prM na M dochází během výstupu virionů z buněk. Jádro se skládá z jednovláknového RNA genomu s pozitivní polaritou a z kapsidového proteinu C (41).



Obrázek 9 *Flavivirus* (43)

Flaviviry jsou citlivé na nízké pH, žluč a proteolytické a lipolytické enzymy, které znemožňují perorální infekci. Přesto, že má virus ochranný bílkovinný obal, je zcela inaktivován již během 30 minut při teplotě 56°C. Ve formě aerosolu zůstává virus infekční velmi dlouhou dobu, proto je považován za bioteroristickou hrozbu a je řazen do kategorie B (13). Kvůli nízké úmrtnosti je jeho zneužití velmi nepravděpodobné.

Inkubační doba TBE je 7-14 dní a bývá obvykle asymptomatická. Na rozdíl od encefalitidy dálného východu je evropská TBE závažnější u dospělých než u dětí. Přibližně u dvou třetin pacientů se projevila pouze časná viremická fáze. Symptomy pro tuto fázi

nejsou specifické a zahrnují horečku, malátnost, anorexii, bolest hlavy, nevolnost a zvracení. Po 8 dnech nastává druhá fáze onemocnění. Ta se vyskytuje u 20 - 30 % pacientů. Tato fáze zasahuje centrální nervový systém a objevuje se meningitida (horečka, bolesti hlavy a ztuhlý krk) a encefalitida (ospalost, zmatenost, smyslové poruchy a paralýza). Doba rekonvalescence bývá velmi dlouhá a až u 60 % nakažených zůstávají trvalé následky. Úmrtnost tohoto onemocnění je velmi vzácná, přibližně 1-2%, přičemž úmrtí nastává 5 až 7 dní po nástupu neurologických příznaků (43).

Na TBE neexistuje žádná specifická léčba. Meningitida, encefalitida a meningoencefalitida vyžadují hospitalizaci a podpůrnou léčbu. Pro léčbu některých symptomů se používají kortikosteroidy (43).

Infekci lze nejlépe předejít použitím repelentu proti hmyzu a ochranných oděvů, které zabrání kousnutí klíštěte. V některých oblastech se zvýšeným výskytem onemocnění je dostupná vakcína. Ve viremické fázi lze virus prokázat přímo izolací na mladých myších. Častěji se používá nepřímý průkaz, při kterém se sleduje dynamika tvorby protilátek (43).

3.4 Komplex virů japonské encefalitidy

Viry japonské encefalitidy patří stejně jako klíšťové encefalitidy do rodu *Flavivirus*. Tato skupina onemocnění zahrnuje viry japonské encefalitidy, encefalitidy Údolí Murray, saintlouiské encefalitidy a západonilské horečky (West Nile virus, WNV) (13).

Virus japonské encefalitidy se vyskytuje především v jihovýchodní Asii a je přenášen komáry rodu *Culex*. Onemocnění mívá těžký průběh u dětí a u starších osob. (13).

Virus encefalitidy Údolí Murray se objevuje na území Austrálie. Na zvířata ho přenáší také komáři rodu *Culex*. Infekce virem často zanechává trvalé následky (13).

Nejdůležitějším flavivirem v USA je virus saintlouiské encefalitidy, který přenáší komáři *Culex pipiens*. Většinou postihuje starší osoby a smrtnost může dosahovat až 20 % (13).

Virus západonilské horečky je patogenem pro člověka, koně a ptáky. Ptáci jsou přirozeným rezervoárem WNV a z nich se poté přenáší přes komáry na lidi. Takto byl virus zavlečen do Severní Ameriky a v letech 1999-2002 se rozšířil do většiny států ve východní části USA. Během těchto tří let bylo v USA hlášeno 142 případů neuroinvazivního onemocnění západonilskou horečkou. 18 lidí na následky zemřelo. Na onemocnění není dostupná žádná léčba nebo vakcína (45).

3.5 Žlutá zimnice

Viriony viru žluté zimnice odpovídají vlastnostem ostatních flavivirů. Antigenní rozdíly mezi jednotlivými kmeny jsou velmi nepatrné a proto se nerozlišují. Onemocnění se vyskytuje pouze v Africe a ve Střední a Jižní Americe. V Evropě a Severní Americe došlo také k větším epidemiím, ale nevyskytuje se zde pravidelně. Ačkoliv komáři z rodu *Aedes*, kteří onemocnění přenášejí, žijí i v Asii, nikdy tam Žlutá zimnice nepropukla (46).

Inkubační doba od kousnutí infikovaným komárem je 3-6 dnů. Nástup onemocnění je typicky náhlý, nastává horečka, zimnice, malátnost, bolest hlavy, bolest zad, generalizovaná myalgie, nevolnost a závratě. Horečka bývá velmi vysoká (průměrně 39°C) a trvá kolem 3 dnů. Laboratorní abnormality zahrnují leukopenii, neutropenii a cca po 48 hodinách od nástupu a před vznikem žloutenky se mohou také zvýšit hladiny transamináz v séru. Toto období se nazývá „období infekce“ a může trvat až několik dní. Po něm následuje „období remise“, při kterém většina symptomů vymizí. Během období remise je virus odstraněn protilátkami a buněčnou imunitní odpovědí. Krev může obsahovat neinfekční imunitní komplexy, které jsou detekovatelné imunoanalýzou nebo PCR. Někteří pacienti se mohou v této fázi zotavit bez dalších příznaků, ale u zhruba 15-25 % postižených osob se onemocnění znovu objeví v závažnější formě („období intoxikace“). Mezi typické projevy patří horečka, zvracení, žloutenka, selhání ledvin a hemoragická diatéza. Hladina transamináz v séru vzrůstá a žloutenka se prohlubuje. Koncentrace přímého bilirubinu dosahuje 171-257 mol/l (47).

Dříve se jako prevence šíření prováděla hlavně strategická kontrola vektorů, to ale nemělo dlouhé trvání a teď je nejdůležitější metodou prevence imunizace a použití prostředků, které zabrání kousnutí komára. Účinné vakcíny jsou dostupné téměř 70 let a jsou zodpovědné za významné snížení výskytu onemocnění po celém světě. Současně dostupné vakcíny chrání proti všem kmenům viru žluté zimnice a jsou to oslabené živé virové vakcíny, které jsou odvozené od viru izolovaného v roce 1927. Nedávno však byly popsány závažně, avšak vzácné nežádoucí účinky, které vedly k novým výzkumům vakcíny (46). Právě kvůli dostupné vakcíně není zneužití tohoto onemocnění příliš pravděpodobné. Pozornosti však tento virus neuniká a to především kvůli jeho nespecifickým a náhlým příznakům.

3.6 Horečka dengue

Infekce jedním nebo více viry dengue ohrožuje zhruba 2,5 miliardy lidí žijících v tropech a subtropích. Každoročně je infikováno 50-100 milionů jedinců. Virus patří do rodu *Flavivirus* a v současné době se virus vyskytuje ve 4 částečně příbuzné antigenních typech. Stejně jako žlutá zimnice, je virus dengue přenášen komáry rodu *Aedes*. Infekce jakýmkoliv

virem dengue může mít za následek dva syndromy – horečka dengue a hemoragická horečka dengue. Hemoragická horečka dengue postihne ročně až 300 tisíc lidí, především dětí (48).

Typickým příznakem onemocnění bývá makulopapulózní vyrážka a v těžších případech teplota nad 39°C doprovázena intenzivními bolestmi hlavy. Díky tomu získala dengue přezdívku „Horečka lámajících kostí“. Příznaky trvají 3-7 dní a zůstávají benigní. U dětí se většinou projevuje jako hemoragická horečka a ta se vyznačuje petechiemi, krvácením z injekčních vpichů, snížením počtu krevních destiček a zvýšením hematokritu. V některých případech mohou nastat příznaky hemoragického šoku, které mají často špatnou prognózu (13; 49).

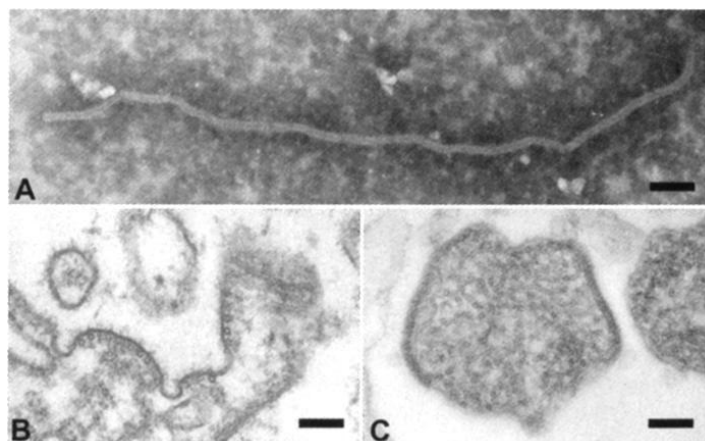
Největším problémem u dengue je, že osoba, která je infikována jedním ze 4 sérotypů už nemůže být nikdy infikována stejným sérotypem. Během 12 týdnů ale ztrácí imunitu vůči třem dalším sérotypům a stává se tak náchylnější k infekci. Obecně se při horečce dengue léčí hlavně příznaky. Žádná účinná vakcína totiž neexistuje a nejsou ani známa konkrétní antivirotika, která by byla účinná. U lehčích případů stačí pouze dostatečný příjem tekutin, aby se virus z těla rychleji vyloučil. V těžších případech je potřeba dohled lékaře a podávání nitrožilních roztoků a krevních transfúzí (50).

Pokud je léčba zahájena včas a správně, umírá na dengue méně než 1 % nakažených. Vzhledem k nízké mortalitě není pravděpodobné využití viru jako biologické zbraně. Největší riziko u dengue představuje to, že není plně rozluštěna struktura proteinů viru a tím pádem není znám žádný lék. Pokud se dengue neléčí, tak u hemoragické formy onemocnění může dojít k hemoragickému šoku a mortalita pak dosahuje i 25 % (48).

3.7 Virus Nipah

Virus byl poprvé izolován v březnu 1999 a následně identifikován jako etiologický činitel zodpovědný za vypuknutí smrtelné encefalitidy v Malajsii a Singapuru. Celkově bylo ohlášeno 265 případů a 105 úmrtí. Většina případů onemocnění propukla u lidí, kteří byli v kontaktu s nakaženými prasaty. Tato epidemie měla devastující následky nejen kvůli ztrátách na lidských životech, ale také zasáhla do ekonomiky. Kvůli onemocnění muselo být v Malajsii poraženo více než 1 milión prasat (51). Přírodním zdrojem infekce jsou infikovaní netopýři, od kterých se kontaminovaným ovocem nakazí prasata (13).

Pomocí elektronové mikroskopie byl virus zařazen do čeledi *Paramyxoviridae*. Ta se rozděluje na dvě podčeledi – *Paramyxovirinae* a *Pneumovirinae*. Do podčeledi *Paramyxovirinae* se řadí 4 rody – *Resovirus*, *Rubulavirus*, *Morbillivirus* a nově vytvořený rod *Megamyxovirus*, do kterého se zařazuje právě virus Nipah (Obr. 10) (13).



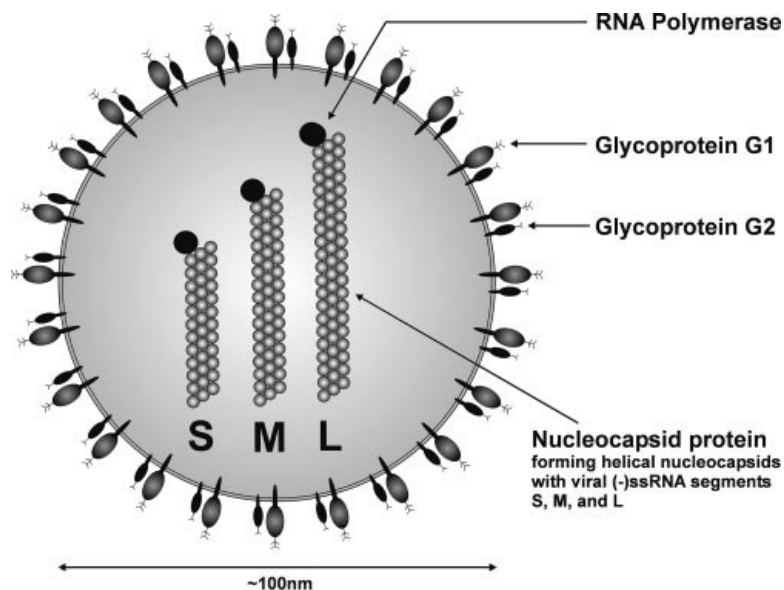
Obrázek 10 Charakteristické struktury viru Nipah izolovaného z buněčné kultury při zobrazení v elektronovém mikroskopu (A). Virus Nipah obsahuje jednoduchou nukleokapsidu s patrným prstencem (B) typickým pro čeleď *Paramyxoviridae*. Virové nukleokapsidy zarovnané podél plazmatické membrány buněk Vero E6 infikovaných virem Nipah (C) (51).

Pro čeleď *Paramyxoviridae* je typický obalený ssRNA-virus negativní polarity, nesegmentovaný s helikální symetrií. Velikost virionu se pohybuje od 120 do 500 nm (51).

Virus způsobuje těžkou akutní encefalitidu a infiltruje většinu hlavních orgánů a endotelových buněk. Mezi symptomy převládaly většinou horečka, bolest hlavy, zvracení a ztráta vědomí. Příznaky, které indikovaly dysfunkci mozkového kmene a postižení centrálního nervového systému (CNS), byly převážně myoklonus, areflexie a tachykardie. Na onemocnění neexistuje žádný lék. Při epidemii v Malajsii byl nemocným podáván ribavirin, který dokázal úmrtnost snížit o 36%. Přesto se celková mortalita pohybovala kolem 40-50 % (52).

3.8 Hantavirus

Hantaviry (Obr. 11) jsou obalené RNA viry z čeledi *Bunyaviridae*, které jsou přenášeny různými druhy hlodavců. Zatím není známo, zda jsou hlodavci náhodně infikováni nebo se jedná o přirozený rezervoár viru. Člověk není přirozený hostitel a k nákaze většinou dochází po požití kontaminovaných potravin, či po vdechnutí prachových částic obsahujících stopy myších výkalů (53).



Obrázek 11 Schéma morfologie hantavirů. Genom viru je členěn do tří segmentů označovaných dle velikosti - S (malé), M (střední), L (velké). S-segment kóduje nukleokapsidový protein, M-segment povrchové glykoproteiny G1 a G2 a L-segment kóduje transkriptázu. (53)

Dosud bylo popsáno 21 druhů hantavirů a charakterizováno více než 30 genotypů, které lze nalézt po celém světě. Virus způsobuje dvě odlišná lidská onemocnění – lidský plicní syndrom (Human pulmonary syndrome, HPS) a hemoragickou horečku s ledvinovým syndromem (Hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS). O Hantavirech se začalo nejvíce mluvit během korejské války (1950-1953), když více než 3000 zástupců OSN a americké armády prodělalo akutní febrilní onemocnění s akutním selháním ledvin a šokem. Úmrtnost byla v tomto případě 7%. Díky tomu byl objeven jeden ze zástupců hantavirů, virus *Hantaan*, pojmenovaný podle malé říčky, kde byl poprvé identifikován (53).

Rod Hantavirus se skládá ze dvou hlavních skupin – Hantaviry nového a starého světa. HFRS je způsobena patogenními hantaviry starého světa mezi které patří například Amur virus, Seoul virus, epidemiologicky nejvýznamnější virus s mírou letality až 15 % HTNV, dále virus Dobrava, virus Tula a Puumala virus. Puumala patří mezi nejčastější hantaviry v Evropě a u lidí vyvolává onemocnění nazvané Nephropathia epidemica (NE), což je onemocnění postihující ledviny a doprovází ho bolesti břicha, hlavy, beder a vysoká horečka. Typickým nálezem v rané fázi onemocnění je přechodná trombocytopenie. Možný bývá také výskyt hemoragie spojivek, vyrážky a paralýzy močového měchýře. Hemoragie bývá doprovázena oligurií, azotemií, proteinurií a hematurií. Vyrážka vymizí během 3 dnů a celková rekonvalescence trvá několik týdnů. Jedná se o mírnější formu HFRS s úmrtností 0,1 % a pacienti, kteří se zotaví nemívají trvalé následky (53).

Nástup HFRS bývá velmi podobný příznakům NE. Inkubační doba je 7 až 36 dní a míra letality se pohybuje od 6 do 15%. Klinický průběh HFRS je rozdělen do pěti fází: Febrilní, hypotenzní, oligurická, diuretická a rekonvalescenční. Trvalé následky bývají vzácně a zahrnují většinou chronické selhání ledvin (53).

První patogenní hantavirus nového světa, virus Sin Nombre, byl objeven na počátku 90. let ve spojených státech a od té doby bylo identifikováno mnoho dalších patogenních hantavirů Nového světa. Ty bývají původcem přibližně 300 případů HPS ročně. Toto onemocnění se ze začátku projevuje jako chřipka (vysoké horečky, myalgie a bolest hlavy). U pacientů se v rozmezí 2 až 15 dnů vyvine plicní edém a hypotenze. Míra úmrtnosti bývá v tomto případě až 50 % (53).

Laboratorně lze virus prokázat pouze ve specializovaných laboratořích. U lidí se prokazuje přítomnost IgM a vzestup protilátek proti viru Puumala nebo Hantaan pomocí imunofluorescence nebo metodou ELISA (13).

Znalosti lékařů o hantavirech se v posledních letech výrazně zvýšily. Stále však neexistuje 100% účinná léčba ani na jedno z onemocnění. Největší obavy mají lékaři z Andského hantavirového kmenu *Sout*, který byl objeven v Argentině a bylo zjištěno, že se zatím jedná o jediný kmen, u kterého jsou hlášeny sporadické přenosy mezi lidmi. To dělá z viru potencionální biologickou hrozbu budoucnosti a CDC ho tak oprávněně řadí do kategorie C (53; 54).

3.9 Chřipková onemocnění

Viry chřipky A,B a C představují tři z pěti rodů čeledi Orthomyxoviridae (Existuje ještě typ D, který ale primárně postihuje dobytek a není známo, že by způsoboval onemocnění u lidí). Jsou charakterizovány segmentovaným genomem RNA s negativním vláknem. Sekvenováním bylo potvrzeno, že všechny tři viry mají společný genetický původ, nicméně se geneticky divergoval tak, že výměna virových RNA segmentů mezi viry nastává pouze uvnitř rodu nebo typu, ale nikdy ne napříč. Viry chřipky A jsou dále charakterizovány podtypem jejich povrchových glykoproteinů, hemaglutininu a neuraminidázy (55).

Viry chřipky mají standardní nomenklaturu, která vždy zahrnuje typ viru, druh, ze kterého byl izolován (pokud nebyl izolován z člověka), místo, kde byl izolován, číslo izolátu, rok izolace a pro virus chřipky A se ještě rozlišuje podtyp HA a NA (Viry chřipky mají aktuálně 18 H podtypů a 11 N podtypů) (56).

Příklad: A/Panama/2007/1999 (H3N2) – Bylo izolováno číslo 2007 viru chřipky A. Virus byl izolován v Panamě v roce 1999 a má podtyp HA 3 a NA 2 (55).

Elektronovou mikroskopií nejdou viry chřipky A a B téměř vůbec rozeznat. Jsou sférické nebo vláknité a mají kulovitý tvar o průměru 100 nm. Virion chřipky A je opatřen glykoproteinovými hroty HA a NA většinou v poměru 4:1, vyčnívající z lipidové membrány, která je odvozená od hostitelské buňky. Virus chřipky B má podobnou organizaci jako typ A. Viriony chřipky C jsou strukturně odlišné a na infikovaných buňkách mohou tvořit dlouhé kordovité struktury velké až 500 μm (55).

3.9.1 Rod *Influenzavirus A*

Virus chřipky A je ze všech nejvýznamnější. Ročně způsobuje epidemie chřipky a někdy se podílí na celosvětových pandemiích. Největší katastrofu způsobil v letech 1918-1919, kdy způsobil tzv. španělskou chřipku, při které zemřelo odhadem 20-40 miliónů lidí. Virus je totiž velmi antigenně proměnlivý. Podtyp HA i NA podléhají dvojímu typu změn. Při jednom typu změn vznikají lehce odlišné antigenní varianty a nazývá se **antigenní posun** neboli **drift**. Antigenní drift vzniká hromaděním bodových mutací, které mají za následek náhradu původních aminokyselin jinými. Kvůli těmto posunům se při očkování každý rok obměňují i kmeny použité pro výrobu vakcíny. Druhým typem změn je **antigenní zlom – shift**. Ten nastává vždy s objevem nového podtypu, který má buď jiný hemaglutinin nebo neuraminidázu. Tyto nově vzniklé podtypy způsobují právě ty velké pandemie, protože populace nemá proti nim vyvinuté protilátky (13).

Inkubační doba trvá obvykle dva dny a onemocnění začíná velmi náhle. Typickými příznaky jsou bolesti hlavy, suchý kašel a vysoká horečka a na rozdíl od běžného nachlazení jsou u chřipky časté celkové slabosti a bolesti svalů. Největším problémem bývají záněty plic, které jsou buď vyvolány přímo virem chřipky nebo při sekundární bakteriální bronchopneumonii (původcem bývá nejčastěji *Staphylococcus aureus*). Chřipka se šíří jako kapénková infekce, tedy při kašli a kýčání. Je možný i přenos kontaminovanými rukama (13).

Virus lze prokázat přímo izolací viru, průkazem virových antigenů nebo průkazem virové RNA. Nepřímo se dá virus prokázat stanovením titru protilátek. Mezi rychlými diagnostickými postupy se nejvíce uplatňují molekulárně biologické metody a to především průkaz sekvence virové nukleové kyseliny metodou RT-PCR (polymerázová řetězová reakce s využitím reverzní transkriptázy) (13).

Na rozdíl od jiných onemocnění je použití chřipkového viru jako biologické zbraně více reálné. Chřipka vydrží i v podobě aerosolu, inkubační doba je velmi krátká a očkování není vždy 100% účinné. Navíc epidemie chřipky by ze začátku nebyla s největší pravděpodobností vůbec podezřívána za teroristický útok. Ovšem vytvořit chřipkový kmen, který by byl dostatečně virulentní tak, aby představoval reálnou hrozbu, není zas tak snadné (57).

4 PLÍSNĚ

Vláknité mikroskopické houby (mikromycety, plísně) jsou mnohobuněčně mikroorganismy, které se řadí do samostatné říše hub. Mikroskopické houby v současné době čítají asi 6000 rodů a 64 000 druhů a z toho jich je 150 druhů zoopatogenních (resp. antropopatogenních). Morfologická rozmanitost a schopnost přizpůsobit se ekologickým podmínkám jim umožňuje výskyt prakticky všude. Mikroskopické houby osidlují rozdílné biotopy (58).

4.1 Stavba

Základem těla je vegetativní vláknitý útvar – **stélka (thallus)**. Dále houbové vlákno, které se nazývá **hyfa**. Hyfy mohou být **coenocytické**, kdy mnohjaderný protoplast není rozlišen v jednotlivé buňky, a nebo mohou být rozděleny **septy** (příčné přehrádky). Soubor hyf tvoří **mycelium**. Pokud jsou hyfy rozvětvené, tvoří se dále **kolonie**. Barvy kolonií bývají rozdílné, často bílé, krémové, hnědé, černé, zelené, modré atd.. To je způsobeno pigmenty, které zabarvují povrchovou membránu a spory (58).

U mikroskopických hub se vyskytuje dimorfismus a polymorfismus. Při dimorfismu se houba za přístupu vzduchu vyskytuje ve vláknité formě a při zaplynování CO₂ na Petriho misce v kvasinkové formě. Polymorfismus rozlišuje mikroskopické houby podle způsobu rozmnožování na dvě různé formy: Forma pohlavní (teleomorfa) a forma nepohlavní (anamorfa) (58).

4.2 Rozmnožování

Rozmnožování mikromycetů je tedy pohlavní (sexuální) a nepohlavní (asexuální) a je umožněno specializovanými orgány. Při sexuálním rozmnožování dochází ke splývání vláken pohlavního ladění za vzniku zygoty a zygospory nebo dikaryonu. Ten vzniká tak, že dvě spory rozdílného pohlaví vytvoří pohlavní vlákna, která poté splynou. Takto se vytvoří například askus a až 8 askosporami nebo basidium se 4 basidiosporami (58).

Při nepohlavním rozmnožování dochází k růstu fragmentů stélky a spor různých tvarů a velikostí. Nepohlavní spory se dále dělí na **exospory** a **endospory** (58).

4.3 Negativní vlivy plísní

Mikromycety kontaminují potraviny, které jsou pro ně vhodným substrátem, a způsobují tak rozkladné procesy a kažení. Některé plísně mohou využívat jen určité složky potravy a snižovat tak jejich biologickou hodnotu. Potraviny, které jsou plesnivé jsou hodnoceny jako zdravotně závadné (58).

Dalšími vhodnými substráty mohou být pro mikromycety například nábytek, podlahové krytiny, omítky, zdivo, dlaždice atd.. Díky vhodnému enzymatickému vybavení, mohou tyto povrchy využívat k výživě a růstu a u lidí při dlouhodobé expozici způsobovat i otravy (58).

4.3.1 Toxigenní mikromycety

Jsou to mikroorganismy, které jsou schopny produkovat mykotoxiny. Toxigenní mikromycety mohou v potravinách a krmivech produkovat mykotoxiny (sekundární metabolity), které mohou vyvolávat mykotoxikózy (tabulka 5) (aflatoxikózu, ochratoxikózu, fuzáriové mykotoxikózy atd.) poškozující zdraví člověka a hospodářských zvířat. Toxigenní mikromycety jsou díky enzymatickému vybavení velmi adaptabilní a mohou tak kontaminovat téměř jakýkoliv substrát (58).

Riziko akutního toxického účinku mykotoxinů je u nás minimální. Za významné se ale považují jejich imunosupresivní účinky (snižují obranyschopnost organismu) a riziko pozdních toxických účinků, kdy se zvyšuje riziko vzniku karcinomu po příjmu nízkých jednorázových nebo opakovaných mykotoxinů v potravinách. Podle mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC/WHO) jsou mykotoxiny rozděleny do kategorií z hlediska jejich karcinogenních účinků. Karcinogen 1 zahrnuje všechny mykotoxiny, které jsou prokázány jako karcinogeny pro člověka. 2B je možný karcinogen pro člověka a 3 zatím není klasifikován jako karcinogen pro člověka (58).

Tabulka 5 Přehled některých onemocnění způsobených mykotoxiny (58)

ONEMOCNĚNÍ	MYKOTOXIN
Akutní DON toxikóza	Fusariový mykotoxin - deoxynivalenon
Aflatoxikóza	aflatoxiny
Alimentární toxická aleukie	Fusariové mykotoxiny - trichotheceny
Balkánská endemická nefropatie	Ochratoxin A a další mykotoxiny
Kwashiork	aflatoxiny
Rakovina jícnu	Fusariové mykotoxiny - fumonisiny
Primární jaterní karcinom	aflatoxinyn
Nádory ledvin	Ochratoxin A
Reyův syndrom	aflatoxiny

5 PLÍSNĚ A MYKOTOXINY POTENCIÁLNĚ VYUŽITELNÉ PRO BIOTERRORISMUS

5.1 Fusariové mykotoxiny

V současné době je známo více než 50 druhů této plísně. Druhy plísně *Fusarium* jsou důležité patogeny rostlin, které způsobují různá onemocnění, hniloby a plísně. Příležitostně mohou způsobovat infekce u zvířat. U lidí způsobují druhy *Fusarium* široké spektrum infekcí, alergických onemocnění a mykotoxikózu po požití potravy kontaminované mykotoxinem. Druhy *Fusarium* jsou rozšířeny v půdních, podzemních a vzdušných částech rostlin, v rostlinných zbytcích a dalších organických substrátech. Jsou také přítomny ve vodách po celém světě (59).

5.1.1 Trichotheceny

Ze všech dosud objevených mykotoxinů *Fusarium* jsou trichotheceny (tabulka 6) nejvíce spojovány s chronickými a fatálními toxikózami lidí a zvířat. Hlavním mechanismem trichothecenové toxicity je inhibice syntézy ribozomálních proteinů. Trichotheceny jsou estery seskviterpenických alkoholů, které obsahují trichothecenový tricyklický systém. Z historie je známo spoustu intoxikací tímto mykotoxinem. Ve východní Sibiři onemocněli lidé, kteří konzumovali proso a ječmen kontaminovaný houbami rodů *Fusarium* a *Gibberella* (anamorfa a teleomorfa) Onemocnění mělo projevy jako bolesti hlavy, závratě, třesavku, nauzeu, zvracení a poruchy zraku. Během 2. světové války se zase vyskytla v Orenburgu rozsáhlá epidemie alimentární toxické aleukie (ATA), když lidé konzumovali kontaminované rostliny. Úmrtnost byla při této epidemii 60 %. Symptomy ATA jsou záněty ústní dutiny a bolesti břicha. Po několika dnech se pacient cítí lépe a dále se rozvíjí progresivní leukopenie, agranulocytóza a případně rozsáhlá hemoragie, nekrotická angína, sepse a poškození kostní dřeně (60).

Ve válkách v jihovýchodní Asii a Afghánistánu použila armáda SSSR tzv. yellow rain (Obr.12), což byl pravděpodobně hrubý extrakt z kultur fusarií. Tato látka způsobovala na těle puchýře, podobné jako při použití yperitu. Navíc vyvolávala těžké postižení imunity a krvetvorby (60).

Tabulka 6 Rozdělení trichothecenů

Trichotheceny A	Trichotheceny B
Verrucarol	Nivalenol
Neosolaniol	4-Deoxynivalenol
Deacetoxysciperol	Fusarenon -X
HT-2 toxin	3-Acetyldeoxyvalenol
T-2 toxin	15-Acetyldeoxyvalenol

Mykotoxiny trichothecene mohou být dodány v podobě prachu, kapek, aerosolu, kouře z letadel, raket, dělostřelectva, nebo pomocí přenosných postřikovačů. Vzhledem k jejich vlastnostem a snadné výrobě mají trichothecenové mykotoxiny (zejména toxin T-2) velký potenciál jako biologické zbraně. Aerosolizované trichotheceny mohou způsobit smrt do několika minut (61).



Obrázek 12 Puchýřky na těle, které způsobil "yellow rain" (62)

Trichotheceny nejsou pouze produkty plísní *Fusarium*. Je prokázané, že trichotheceny produkují i plísně jako *Dendrochium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Stachybotris*, *Cephalosporium* a *Uerticimonosporium* (63).

5.1.1.1 *Stachybotryotoxikóza*

Tato toxikóza postihuje především domácí zvířata, která konzumují kontaminované seno a slámu. Onemocnění je způsobeno satratoxiny a stachybotryotoxiny. Projevuje se primárně podrážděním v oblasti kontaktu s kontaminovanou látkou. Dále se rozvíjí leukopenie a trombocytopenie, snižuje se srážlivost krve a dochází k septikémii. Postižený pak trpí trávicími potížemi, ztrátou chuti, ztíženým polykáním a ztrátou hmotnosti. Pokud jsou projevy takto vážné, nastává většinou smrt zvířete. U lidí se stachybotryotoxikóza projevila například dermatitidou, katarální angínou a faryngitidou (60). Spíše se nepředpokládá, že by byly tyto mykotoxiny použity jako biologické zbraně. V tomto by byly cílem pravděpodobně hospodářská zvířata.

5.1.1.2 *Dendrochiotoxikóza*

Jedná se o těžkou toxikózu trichothecenového typu, která se vyskytuje především u koní a projevuje se jako kožní léze kolem tlamy a nozder. Způsobuje také cyanózu, hemoragii, zrychlený puls, leukopenii a v neposlední řadě může dojít až k uhynutí zvířete. Dendrochiotoxikózu způsobuje plíseň *Dendrochium toxicum* (60). Bioteroristické hrozba je u této mykotoxikózy minimální. Více ohrožena jsou opět zvířata.

5.1.2 Fumonisin

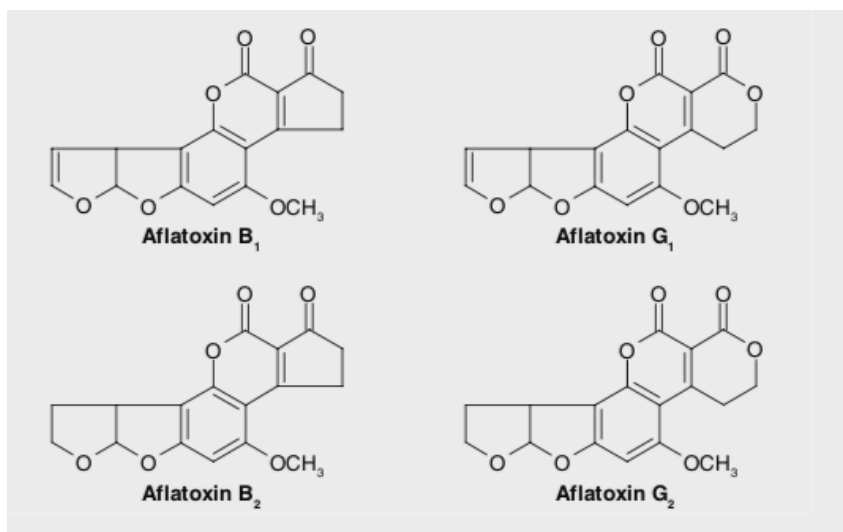
Fumonisin byly poprvé izolovány v roce 1988 z kultur plísně *Fusarium verticillioides* Nirenberg. Během toho roku byly objasněny struktury fumonisinů a bylo zjištěno, že fumonisin B1 způsobuje leukoencefalomalacii koní. Fumonisin se také velmi často vyskytují v kukuřici, což je základní potravinový doplněk v mnoha zemích. V roce 1993 bylo Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny hodnoceno karcinogenní riziko fumonisinů a toxiny produkované plísní *Fusarium moniliforme* byly hodnoceny jako „karcinogeny skupiny 2B“, tedy pravděpodobně karcinogenní pro člověka a jsou charakterizovány jako promotory karcinogenního procesu (64). Můžou být tedy považovány za případnou bioteroristickou hrozbu. Pravděpodobnost zneužití je však velmi malá.

Fumonisin jsou podobné sfinganinu a sfingosinu a zapříčiňují tak zástavu syntézy sfingolipidů. Ty se vyskytují ve větším množství v mozku a nervové tkáni a jsou potřeba především pro stavbu a fyziologickou činnost buněčné stěny. Fumonisin tedy inhibují jejich biosyntézu (64; 63).

V současné době je známo 28 různých fumonisinů (pouze 15 druhů je ale produkováno plísní *Fusarium*), které se rozdělují do čtyř hlavních skupin: Fumonisinů A, B, C a P. Skupina B obsahuje toxicky významné fumonisiny. Dle mnoha studií bylo poskytnuto spousta údajů o toxikologii fumonisinů ze série FB, nicméně výzkum pokračuje dál u jiných skupin, které mohou také představovat zdravotní riziko pro lidi a zvířata. Další nové druhy rodu *Fusarium* produkující fumonisiny byly popsány u jiných zemědělských plodin, jako je čirok a proso. Je tedy nezbytné určit, zda se u těchto plodin tyto mykotoxiny vyskytují (64).

5.2 Aflatoxiny

Aflatoxiny patří mezi nejrozšířenější mykotoxiny v přírodě a vykazují výrazné toxické vlastnosti, které postihují převážně plodiny, jako jsou kukuřice a arašídů. Jsou produkovány toxigenními kmeny *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. argeniticus* a *A. nomius*. Chronická expozice aflatoxinům je považována za velké zdravotní riziko (působí jako hepatotoxiny a hepatokarcinogeny) a ve většině zemí je tak zavedeno monitorování tohoto mykotoxinu a také různá regulační opatření a stanovení limitů. Za vhodných podmínek jsou *A. flavus* a *A. parasiticus* schopny růstu a tvoření aflatoxinů téměř na jakémkoliv dostupném organickém substrátu. Postupně byly identifikovány 4 typy aflatoxinů (obr.13): AFB₁, AFB₂, AFG₁ a AFG₂, které mohou být akutně toxické, kancerogenní, mutagenní a teratogenní (AFB₁> AFG₁ >AFB₂>AFG₂). Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny ale hodnotí jako prokázaný karcinogen pro člověka zatím pouze aflatoxin B₁ (67; 68).



Obrázek 13 Aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂ (67)

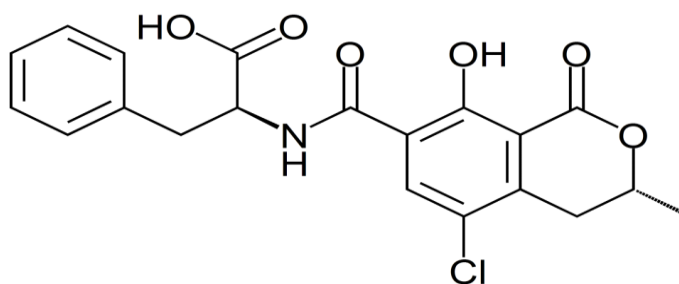
Aflatoxin B₁(AFB₁) je hlavní toxická sloučenina produkována plísní rodu *Aspergillus*. Své účinky projevuje po biotransformaci enzymy závislými na cytochromu P450 na elektrofilní sloučeninu AFB₁-epoxid. Tento epoxid bývá vázán na buněčné makromolekuly,

včetně proteinů, DNA a RNA (67). Při vysokých hladinách AFB1 se toxicita projeví za 3-6 hodin jako nekróza hepatocytů, porucha srážlivosti a kapilární fragilita. To může vést až k smrti. První epidemie aflatoxikózy u lidí byla zaznamenána v roce 1974, kdy v Indii zemřelo více než 100 lidí. Na našem území zemřelo v 70. letech 27 dětí u kterých se rozvinul Reyův syndrom – encefalopatie a tuková degenerace vnitřních orgánů. Dají se tedy také považovat za potenciální biologickou zbraň. Nejlepším způsobem, jak zabránit kontaminaci aflatoxiny, je zlepšení zemědělských postupů, podmínek skladování a vyhýbat se zvýšené konzumaci potravin s výskytem aflatoxinů (68).

5.3 Ochratoxiny

Ochratoxiny patří do skupiny mykotoxinů, které jsou sekundárními metabolity plísní *Aspergillus sp.* a *Penicillium sp.* Několik typů ochratoxinů se vyskytuje přirozeně a to především ochratoxin A (OTA, obr.14), ochratoxin B a C a často jsou produkovány společně. Obvykle je jejich zvýšený výskyt zaznamenán v obilovinách a výrobcích z nich, v rozinkách a v kávě. Ochratoxin A je nejrozšířenějším toxinem a je klasifikován jako potenciální karcinogen skupiny 2B. Cílovým orgánem OTA bývá nejčastěji vyvíjející se CNS (69).

U lidí mohou ochratoxiny způsobovat například endemickou nefropatii, nebo akutní selhání ledvin. Chronická nefrotoxicita způsobena Ochratoxinem A je nejčastější a diagnostika není vůbec snadná. Poločas rozpadu v krvi po perorálním podání trvá zhruba 35 dní .



Obrázek 14 Ochratoxin A (69)

5.4 Námelové alkaloidy

První mykotoxikózou popsanou u člověka byla právě intoxikace po požití mouky infikované paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*). Paličkovice nachová parazituje na travinách včetně obilovin. Její přezimující stádium se nazývá sklerocium, neboli námel. Právě námel obsahuje toxické látky. Konzumace námelu může způsobit onemocnění zvané ergotismus. Onemocnění se může projevit v několika klinických formách – konvulzivní, gangrenózní a psychotropní forma. Konvulzivní ergotizmus se projevuje mírnými závratěmi, pocitem tlaku v čelní oblasti hlavy, únavou, depresemi, nauzeou , zvracením a bolestí

končetin. Při váženějším průběhu může docházet je svalovým záškubům a křečím končetin, jazyka a mimických svalů. Smrt může nastat po 3 dnech od prvních projevů onemocnění (70).

Gangrenózní ergotismus bývá provázen stažením cév, svalovými bolestmi a střídavými pocity chladu a tepla. Může dojít i k nekróze, gangréně a ztrátě končetin. V dnešní době je riziko onemocnění v našich podmínkách minimální, protože je kladen velký důraz na dodržování zásad správné zemědělské a technologické praxe. U psychotropní formy dochází většinou k tělovým a sluchovým halucinacím (70).

6 ZÁVĚR

V této práci jsem hned v úvodní části vytvořila přehled všech patogenních agens, které jsou hodnoceny jako potenciálně zneužitelné biologické zbraně. Tyto patogeny jsou přehledně rozděleny do tří kategorií tak, jak je podle různých klasifikačních kritérií hodnotí NATO a CDC. Následně, v hlavní části práce, jsou podrobně popsána konkrétní onemocnění způsobená viry a mykotoxiny. U onemocnění je zmíněn původce, způsob přenosu, léčba, diagnostika a také především proč je zrovna toto onemocnění spojováno s bioterorismem. Aby byla tato problematika více srozumitelná, tak jsou v práci popsány také obecné charakteristiky a vlastnosti virů a plísní. Pokusila jsem se také uvést vždy nejaktuálnější informace a postřehy o vývoji léčiv a moderní diagnostice.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. GUILLEMIN, J.H. The New New Terrorism Biological Weapons: Avoiding The Next, Worst Threat. Boston, Mass.: , Sep 23, 2001 ProQuest Central. ISBN 07431791.
2. DANEŠ, Luděk. Bioterorismus. Praha: Karolinum, 2003. ISBN 80-246-0693-3.
3. BAGGETT, H. C., J. C. RHODES, S. K. FRIDKIN, et al. No Evidence of a Mild Form of Inhalational Bacillus anthracis Infection During a Bioterrorism-Related Inhalational Anthrax Outbreak in Washington, D.C., in 2001. Clinical Infectious Diseases. 2005, no. 41(7), s. 991-997.
4. PRYMULA, Roman. Biologický a chemický terorismus: informace pro každého. Praha: Grada, 2002. ISBN 8024702886.
5. IONESCU, Lucia Elena a Nicoleta Simona BICHERU. The 21st century challenges and counteraction ways: biological weapons and molecular biology research. Strategic Impact. 2013, no. 46, s. 103-110. ISSN 18415784.
6. CDC LC Quick Learn: Recognize the four Biosafety Levels. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/training/QuickLearns/biosafety/>. [Online]
7. Odbor biologické ochrany - Těchonín | Armáda ČR. Armáda ČR [online]. Copyright © 2019 [cit. 23.04.2019]. Dostupné z: <http://www.acr.army.cz/struktur/generalni/podpora/avz/odbor-biologicke-ochrany---techonin-86980/>.
8. CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response. Emergency Preparedness and Response | CDC. Dostupné z: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>.
9. CDC LC Quick Learn: Recognize the four Biosafety Levels. Centers for Disease Control and Prevention. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/training/QuickLearns/biosafety/>. [Online]
10. ALVES, Guilherme Guerra, Ricardo Andrez MACHADO DE ÁVILA, Carlos Delfin CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, et al. Clostridium perfringens epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. Anaerobe. 2014, no. 30, s. 102-107 .
11. AUDI, Jennifer, Martin BELSON, Manish PATEL, et al. Ricin Poisoning. JAMA.2005, no. 294(18).

12. KONVALINKA, Jan a Ladislav MACHALA. *Viry pro 21. století*. 2. vyd. Praha: Academia, 2011. Průhledy. ISBN 978-80-200-2271-4.
13. VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.
14. CELER, Vladimír a Vladimír CELER. *Obecná virologie*. Hradec Králové: Nucleus HK, 2010. ISBN 978-80-87009-70-3.
15. BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, et al. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1, Dotisk. Ilustroval Libuše KOLÁŘOVÁ, ilustroval Jiří NIEDERLE, ilustroval Eva NOHÝNKOVÁ. Praha: Marvil, 1999.
16. PHAKARATSAKUL, Supinya, Thanyaporn SIRIHONGTHONG, Chompunuch BOONARKART, et al. Genome polarity of RNA viruses reflects the different evolutionary pressures shaping codon usage. *Archives of Virology*. 2018, no. 163(1.).
17. The Viral Life Cycle | Microbiology. Lumen Learning – Simple Book Production [online]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/the-viral-life-cycle/>. [Online]
18. BENDA, Vladimír, Ivan BABŮREK a Pavel KOTRBA. *Základy biologie*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-587-0.
19. DARLING, Robert G., Timothy H. BURGESS, James V. LAWLER, et al. *Virologic and Pathogenic Aspects of the Variola Virus (Smallpox) as a Bioweapon*. LINDLER, Luther E., Frank J. LEBEDA a George W. KORCH, ed. *Biological Weapons Defense* .
20. TRINDADE, G.S., J.M.C. VILELA, J.M.S. FERREIRA, et al. Use of atomic force microscopy as a diagnostic tool to identify orthopoxvirus. *Journal of Virological Methods*. 2007, no. 141(2), s. 198-204 .
21. MACK, Thomas. A Different View of Smallpox and Vaccination. *New England Journal of Medicine*. 2003, no. 348(5), s. 460-463.
22. Klíšťová encefalitida - Úvodní stránka [online]. Copyright © [cit. 18.03.2019]. Dostupné z: <https://www.klistova-encefalitida.cz/img/kniha/pdf/13.pdf>.
23. WHITLEY, Richard J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral Research* 2003, no. 57(1-2), s. 7-12.
24. Několik komentářů k očkování, SZÚ. SZÚ [online]. Copyright © 2007 [cit. 15.03.2019]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/vakciny/nekolik-komentaru-k-ockovani>.

25. MCCORMICK, Joseph B., Isabel J. KING, Patricia A. WEBB, et al. Lassa Fever. *New England Journal of Medicine*. 1986, no. 314(1), s. 20-26.
26. EDINGTON, G.M. a H.A. WHITE. The pathology of lassa fever. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1972, no. 66(3), s. 381-389.
27. Horečka Lassa, SZÚ. SZÚ [online]. Copyright © 2007 [cit. 28.03.2019]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/horecka-lassa-obecne-informace>.
28. RICHMOND, J K. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ*. 2003, no. 327(7426), s. 1271-1275.
29. FISHER-HOCH, Susan P a Joseph B MCCORMICK. Lassa fever vaccine. *Expert Review of Vaccines*. 2014, no. 3(2), s. 189-197.
30. BRAUBURGER, Kristina, Adam J. HUME, Elke MÜHLBERGER, et al. Forty-Five Years of Marburg Virus Research. *Viruses*. 2012, no. 4(10), s. 1878-1927.
31. SMITH, D.H., M. ISAACSON, K.M. JOHNSON, et al. MARBURG-VIRUS DISEASE IN KENYA. *The Lancet* 1982, no. 319(8276), s. 816-820.
32. MARTINI, G. A. Marburg virus disease. *Postgraduate Medical Journal* 1973, no. 49(574), s. 542-546.
33. TROJÁNEK, Milan, Hana ROHÁČOVÁ, Vilma MAREŠOVÁ, et al. Virové hemoragické horečky. *Praktický lékař*. 2015, no. 95(1), s. 4-11.
34. FELDMANN, Heinz, Steven JONES, Hans-Dieter KLENK, et al. Ebola virus: from discovery to vaccine. *Nature Reviews Immunology* 2003, no. 3(8), s. 677-685.
35. Ebola (Ebola Virus Disease) | CDC. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/index.html>. [Online]
36. Ebola | Lékaři bez hranic. Lékaři bez hranic | Nestranně, nezávisle, neutrálně [online]. Dostupné z: <https://www.lekari-bez-hranic.cz/ebola>.
37. FRANZ, David R. a Russ ZAJTCHUK. Biological terrorism: Understanding the threat, preparation, and medical response. *Disease-a-Month* 2002, no. 48(8), s. 493-564.
38. MARON, Dina Fine. Weaponized Ebola: Is It Really a Bioterror Threat?: What would it take to hijack the virus in west Africa and turn it into a bioterror agent elsewhere?. *SCIENTIFIC AMERICAN* 2014, 25.9.2014 .
39. Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě [online]. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Novinka?id=87>, Ebola 2014.

40. AGUILAR, Patricia V., Wilfredo CAMARGO, Jorge VARGAS, et al. Reemergence of Bolivian Hemorrhagic Fever, 2007–2008. *Emerging Infectious Diseases* 2009, no. 15(9), s. 1526-1528.
41. GRITSUN, T.S, V.A LASHKEVICH a E.A GOULD. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research* 2003, no. 57(1-2), s. 129-146.
42. LINDQUIST, Lars a Olli VAPALAHTI. Tick-borne encephalitis. *The Lancet* 2008, no. 371(9627), s. 1861-1871.
43. Flaviviridae | Viral Hemorrhagic Fevers (VHFs) | CDC. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/vhf/virus-families/flaviviridae.html>. [Online]
44. KIM, Su-Yeon, Seok-Min YUN, Myung Guk HAN, et al. Isolation of Tick-Borne Encephalitis Viruses from Wild Rodents, South Korea. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2008, no. 8(1), s. 7.
45. CAMPBELL, Grant L, Anthony A MARFIN, Robert S LANCIOTTI a Duane J GUBLER. West Nile virus. *The Lancet Infectious Diseases* 2002, no. 2(9), s. 519-529.
46. BARNETT, E. D. Yellow Fever: Epidemiology and Prevention. *Clinical Infectious Diseases* 2007, no. 44(6), s. 850-856.
47. MONATH, Thomas P. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2001, no. 1(1), s. 11-20.
48. HALSTEAD, Scott B. Dengue. *The Lancet* 2007, no. 370(9599), s. 1644-1652.
49. DEROUICH, M, A BOUTAYEB a EH TWIZELL. A model of dengue fever. *BioMedical Engineering OnLine* 2003, no. 2(1).
50. WIWANITKIT, Viroj. Dengue fever: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2014, no. 8(7), s. 841-845.
51. CHUA, K. B. Nipah Virus: A Recently Emergent Deadly Paramyxovirus. *Science*, no. 288(5470), s. 1432-1435.
52. EPSTEIN, Jonathan H., Hume E. FIELD, Stephen LUBY, et al. Nipah virus: Impact, origins, and causes of emergence. *Current Infectious Disease Reports* 2006, no. 8(1), s. 59-65.
53. MURANYI, Walter, Udo BAHR, Martin ZEIER, et al. Hantavirus Infection. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005, no. 16(12), s. 3669-3679.

54. CDC - Hantavirus. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/hantavirus/index.html> . [Online]
55. BOUVIER, Nicole M. a Peter PALESE. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008, no. 26, s. 49-53.
56. Types of Influenza Viruses | CDC. Centers for Disease Control and Prevention [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>. [Online]
57. LARKIN, Marilyn. Will influenza be the next bioweapon?. *The Lancet Infectious Diseases* 2003, no. 3(9).
58. MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. Vlákňité mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
59. NUCCI, M. a E. ANAÏSSIE. *Fusarium Infections in Immunocompromised Patients. Clinical Microbiology Reviews* 2007, no. 20(4), s. 695-704.
60. Toxikon - Trichotheceny. Biotox [online]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/trichotheceny.php>,. [Online]
61. UENO, Yoshio. Trichothecene Mycotoxins Mycology, Chemistry, and Toxicology. DRAPER, Harold H., ed. *Advances in Nutritional Research* Boston, MA: Springer US, 1980, 1980, s. 301-353.
62. WATSON, S. Analysis for trichothecenes in samples from Southeast Asia associated with ?Yellow Rain?. *Fundamental and Applied Toxicology* 1984, no. 4(5), s. 700-717.
63. Toxikon - Fumonisin. Biotox [online]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/fumonisin.php> . [Online]
64. RHEEDER, J. P., W. F. O. MARASAS a H. F. VISMER. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 2002, no. 68(5), s. 2101-2105.
65. DESJARDINS, A.E. a R.H. PROCTOR. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology* 2007, no. 119(1-2), s. 47-57.
67. DUARTE, Sofia Cancela, Celeste DE MATOS LINO a Angelina Lopes Simões PENA. *Mycotoxins and their Implications in Food Safety* Unitec House, 2 Albert Place, London N3 1QB, UK: Future Science, 2014. ISBN. 978-1-909453-22-7.

68. Toxikon - Aflatoxiny. Biotox [online]. Dostupné z: <http://www.biotox.cz/toxikon/mikromycety/aflatox.php> . [Online]
69. REDDY, Lalini a Kanti BHOOLA. Ochratoxins—Food Contaminants: Impact on Human Health. *Toxins* 2010, no. 2(4), s. 771-779.
70. PATOČKA, Jiří. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada Publishing, 2004. ISBN 80-247-0608-3.