

Surveillance západonilské horečky u koní v České republice v letech 2011–2013

Sedlák K.¹, Zelená H.^{2,3}, Křivda V.¹, Šatrán P.⁴

¹Oddělení sérologie a virologie, Národní referenční laboratoř pro infekční nemoci koní, Státní veterinární ústav Praha

²Oddělení virologie, Národní referenční laboratoř pro arboviry, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

³Katedra epidemiologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové

⁴Oddělení ochrany zdraví zvířat, Ústřední veterinární správa, Státní veterinární správa České republiky

SOUHRN

Cíl práce: Virus západonilské horečky (WNV) je významný celosvětově rozšířený flavivirus přenášený komáry. Ve střední Evropě se virus dlouhodobě sporadicky vyskytuje, ale v letech 2008 a 2009 se masivně rozšířil po celém Maďarsku. Cílem práce bylo zjistit aktuální výskyt infekce WNV u koní v České republice (ČR).

Materiál a metody: Celkem bylo v letech 2011–2013 vyšetřeno 2 349 sér dospělých zdravých nevakcinovaných koní z území celé ČR. K vyšetření byl použit komerčně vyráběný kompetitivní imunoenzymatický test (cELISA), pozitivně reagující vzorky byly potvrzovány virus-neutralizačním testem (VNT) s WNV a virem klíšťové encefalitidy (TBEV).

Výsledek: Imunoenzymatický test byl pozitivní u 11,5 % vzorků (271 pozitivních/2349 vyšetřených). Konfirmačním vyšetřením VNT byly prokázány protilátky proti WNV u 16 vzorků. Jedenáct z nich reagovalo pozitivně pouze s WNV v titrech 8 až 1024, ve VNT s virem TBEV byly negativní. Souběžná WNV a TBEV séropozitivita byla zjištěna u třech vzorků. Titry protilátek proti WNV byly ale vždy nižší nebo shodné s titry proti TBEV. Pravděpodobně se uplatnila křížo-

vá reaktivita flavivirů, ale u vzorků s obdobným titrem WNV a TBEV nelze vyloučit ani souběžnou infekci oběma patogeny. Dva koně reagovali ve VNT s WNV v hraničním titru 4. U séropozitivních koní byl ověřován jejich původ a přesuny. Pět sérologicky WNV pozitivních/TBEV negativních koní (0,2 %) pocházelo z pěti krajů ČR (Jihočeský, Karlovarský, Středočeský, Jihomoravský, Moravskoslezský), přičemž do zahraničí nebyla tato zvířata nikdy přemístována. Čtyři z nich nebyli přemístováni ani po ČR a hospodářství majitele nepustili. Další šest WNV pozitivních/TBEV negativních koní bylo do ČR dovezeno ze severní Ameriky nebo střední a západní Evropy, nelze jednoznačně určit, zda se v těchto případech jedná o importovanou nebo autochtonní infekci. **Závěr:** Výsledky studie potvrzují, že výskyt protilátek proti WNV u koní v ČR je sporadický. Bylo prokázáno, že virus cirkuluje v různých částech České republiky, nejen na jižní Moravě.

KLÍČOVÁ SLOVA:

západonilská horečka – WNV – flaviviry – sérosurveillance – koně

ABSTRACT

Sedlák K., Zelená H., Křivda V., Šatrán P.: Surveillance of West Nile fever in horses in the Czech Republic from 2011 to 2013

Study aim: The West Nile virus (WNV) is an important mosquito-borne flavivirus occurring around the world. Occasionally found in Central Europe, the virus spread massively through whole Hungary between 2008 and 2009. The aim of our study was to determine the recent prevalence of the WNV infection in horses in the Czech Republic.

Material and methods: Overall, 2349 serum samples, collected from healthy unvaccinated adult horses in the Czech Republic between 2011 and 2013, were tested. A commercially available competitive ELISA kit (cELISA) was used for this purpose and positive samples were confirmed by virus neutralisation tests using WNV and tick-borne encephalitis virus (TBEV).

Results: Altogether 271 of 2348 samples (11.5%) were positive by cELISA. Confirmatory VNT revealed 16 WNV positive samples, 11 of which had titres from 8 to 1024; VNTs with TBEV were negative. Three samples had antibodies against both viruses and the WNV antibody titres were less than or equal to the TBEV antibody titres. A cross reactivity of flaviviruses might have had an impact on the results, but in

samples with similar WNV and TBEV titres, co-infection with both pathogens cannot be ruled out either. VNT antibody titres in two horses were inconclusive (cut-off titre 4). The place of birth and transfers (if any) were checked for each WNV seropositive horse. Five WNV positive/TBEV negative samples (0.2 %) came from five administrative regions (South Bohemian, Karlovy Vary, Central Bohemian, South Moravian, and Moravian-Silesian) and the respective animals were never moved to a foreign country. Four of these horses never left the farm. Other six WNV positive/TBEV negative horses were imported to the Czech Republic from North America or Central and West Europe and therefore, it is not possible to tell unambiguously whether their infection is autochthonous or imported.

Conclusion: The results of the present study confirm that WNV antibodies occur sporadically in horses in the Czech Republic. WNV was found to circulate in different parts of the Czech Republic and not only in the South of Moravia.

KEYWORDS:

West Nile fever – WNV – flaviviruses – serosurveillance – horses

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol., 63, 2014, č. 4, s. 307–311

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

ÚVOD

Virus západonilské horečky (WNV) je v současnosti nejrozšířenějším flavivirem způsobujícím zánět mozku. V roce 1937 byl virus objeven v Africe, později byl prokázán v Evropě, Asii, Austrálii a Oceánii. V roce 1999 byl virus zjištěn v Severní Americe, během několika dalších let se rozšířil do Karibiku, Střední a Jižní Ameriky. Původcem onemocnění je RNA virus z rodu *Flavivirus*, čeledi *Flaviviridae*. Hlavním přenašečem viru jsou komáři rodu *Culex*. Rezervoárem viru jsou ptáci, zejména drobní pěvci, v jejichž těle se virus pomnožuje a dlouhodobě přežívá. Silná a dlouhodobá virémie u ptáků usnadňuje přenos viru na vektora a umožňuje další cirkulaci. U ptáků probíhá infekce WNV velmi často asymptomaticky, což usnadňuje šíření viru při migraci. Nervové příznaky a úhyny v důsledku encefalitidy byly popsány zejména u dravců nebo u infekcí neuropatogenními kmeny WNV. Savci jsou většinou jen náhodným hostitelem viru a přenosový cyklus viru neovlivňují. U lidí probíhá onemocnění většinou asymptomaticky, v některých případech je provázeno horečkou a chřipkovými příznaky. Sporadicky se onemocnění projevuje nervovými příznaky, aseptická meningitida a encefalitida může mít v těchto případech fatální následky. U koní probíhá infekce WNV většinou asymptomaticky nebo jako horečnaté onemocnění. Sporadické případy encefalomyelitid u koní jsou často fatální [1, 2, 3, 4, 5, 6].

Virus se vyskytuje v několika liniích, celosvětově nejvýznamnější jsou linie 1 a 2. V Evropě byl virus zjištěn zejména u koní v jižní Francii, Španělsku, Itálii a Rumunsku [7, 8, 9, 10]. Ve střední Evropě cirkuluje virus tří linií: Linie 1 je celosvětově rozšířená (Severní, Střední a Jižní Amerika, Evropa, Afrika, Asie, Austrálie) [5], linie 2 zahrnuje původně subsaharské kmény, nově rozšířené zejména v Maďarsku, Rakousku, Řecku a Rusku [2, 3, 4, 11], linie 3 obsahuje málo patogenní izoláty z *Culex pipiens* ze střední Evropy [12]. V České republice virus dlouhodobě cirkuluje, ale ohniska vykazují malou aktivitu. Hubálek [13] poprvé izoloval virus západonilské horečky v České republice po povodních v roce 1997 z komára *Culex pipiens pipiens*. Ve stejné době bylo zjištěno pět případů klinického onemocnění a sérokonverze u lidí z jižní Moravy [14, 15]. Protilátky proti WNV byly sporadicky v nízkých titrech prokázány u několika druhů volně žijících ptáků [16]. U koní v České republice dosud nebyly prokázány protilátky proti WNV, ale infekce WNV již byla zjištěna u koní v sousedním Slovensku [17].

S ohledem na nálezovou situaci ve střední a východní Evropě byla v roce 2011 zahájena surveillance západonilské horečky u koní a ptáků v České republice. Cílem práce bylo zjistit aktuální výskyt protilátek proti WNV u koní v České republice.

MATERIÁL A METODY

Aktivní sérosurveillance

Sérologická surveillance WNV byla prováděna se vzorky sér koní zaslaných k vyšetření na jiná sérologická testování v letech 2011, 2012 a 2013. Vzorky byly každoročně odebírány v měsících leden až březen. Krve koní odebírané privátními veterinárními lékaři z *vena jugularis*, byly v laboratořích centrifugovány, separovaná krevní séra byla až do vyšetření uchována při -20 °C. Vzorky pocházely od dospělých koní (starších než 2 roky) z území celé České republiky, kolekce sér byly uchovávány v laboratořích pěti státních veterinárních ústavů (SVÚ Praha, SVÚ Jihlava, SVÚ Olomouc, SVÚ České Budějovice a SVÚ Hradec Králové). Vyšetření bylo prováděno v SVÚ Praha, kde je umístěna Národní referenční laboratoř pro infekční nemoci koní. V letech 2011, 2012 a 2013 bylo v oficiální evidenci koní v ČR, vedené podle plemenářského

zákona evidováno celkem 84 350, 80 574 a 87 439 koní. Počet odebraných vzorků byl stanoven podle vzorce tak, aby zajistil 99% pravděpodobnost detekce onemocnění při předpokládané 1% prevalenci a 80% senzitivitě testu [18]. Dále pak byly vzorky vybírány tak, aby byla zajištěna distribuce na celé území ČR. Z každé plochy území o velikosti 100 km² byl testován minimálně jeden náhodně vybraný kuň. Ze všech archivovaných sér koní bylo každoročně vybráno 783 vzorků. Celkem bylo v období 3 let 2011, 2012 a 2013 vyšetřeno 2349 sér koní.

Krevní séra koní byla na přítomnost protilátek proti WNV vyšetřena komerčním imunoenzymatickým testem (cELISA, ID Screen WNV Competition, ID Vet, Francie) podle návodu výrobce. Konfirmační vyšetření bylo provedeno v národní referenční laboratoři pro arboviry ve Zdravotním ústavu v Ostravě. Vzorky vykazující pozitivní výsledky v testu cELISA byly konfirmovány virusneutralizačním testem (VNT) v mikromodifikaci s vitálním barvením v 96jamkových mikrotitračních destičkách postupem dříve publikovaným [19, 20]. VNT byl proveden s virem západonilské horečky linie 2 a souběžně s virem klíšťové encefalitidy kmene Hypr. Viry byly pěstovány na mozcích sajících laboratorních myší ve stáří 1–3 dnů. Jako buněčný substrát pro virus západonilské horečky byla použita suspenze buněk CV-1 (linie opičích ledvinných buněk), pro virus klíšťové encefalitidy suspenze buněk PS (linie prasečích ledvinných buněk). Použité pracovní ředění u obou buněčných linií je 600 000 buněk/ml. Výsledky VNT jsou vyjádřeny tzv. virusneutralizačním (VN) titrem, který je převrácenou hodnotou nejvyššího ředění vzorku, které je ještě schopno neutralizovat cytopatický efekt z více než 50 % (TCID₅₀). Za pozitivní výsledek je považován VN titer > 4. Titr 4 je hraniční hodnota.

U všech WNV pozitivních reagentů byl ověřován jejich původ, věk, pohlaví, vakcinační a zdravotní záznamy.

Pasivní surveillance

Pasivní surveillance západonilské horečky u koní v ČR byla započata v lednu 2011. Vztahuje se na koně vykazující změny chování nebo příznaky postižení nervového systému. Vyšetření provádí Národní referenční laboratoř pro infekční nemoci koní ve Státním veterinárním ústavu Praha. V uvedených případech se podle metodiky kontroly zdraví provádí průkaz WNV metodou RT-PCR a detekce protilátek proti WNV (IgM a IgG ELISA). V tříletém období (2011–2013) bylo vyšetřeno 5 koní s nervovými příznaky (tři případy v roce 2012, po jednom případě v roce 2011 a 2013). Průkaz viru byl prováděn ze vzorků krve metodou real-time RT-PCR [21]. Pro průkaz protilátek byla použita ELISA IgM WNV (Institut Pourquier, Francie) a cELISA (ID Screen WNV Competition).

VÝSLEDKY

Aktivní sérosurveillance

V roce 2011 reagovalo pozitivně v cELISA celkem 12,5 % sér (98 pozitivních/783 vyšetřených). Konfirmační vyšetření bylo provedeno u 85 vzorků, 13 vzorků nebylo možno z důvodu silné hemolýzy vyšetřit VNT. Z 85 vzorků sér vyšetřených VNT na přítomnost protilátek proti viru WNV reagovalo pozitivně 5 vzorků (v titru 32, 128, 256 a 512 – 2krát). Všechna séra pozitivně reagující s WNV byla v neutralizačním testu s virem TBEV negativní. Autochtonní infekce WNV byla potvrzena u tří séropozitivních koní (s titry 512, 256, 128), kteří se narodili v ČR a nikdy nebyli přemístováni mimo ČR (dva z nich zcela bez přesunů z chovu). Další dva koně s titry protilátek 512 a 32 byly importováni z USA a Slovenska – tabulka 1. V roce 2012 bylo v cELISA testu pozitivních 10,2% (80/783) sér. Konfirmace VNT byla provedena u 77 vzorků, 3 vzorky nebyly

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

Tabulka 1. Přehled koní s nálezem neutralizačních protilátek proti WNV

Table 1. List of horses with antibodies neutralizing WNV

Číslo vzorku	Rok	Titr WNV	Titr TBEV	Lokalita, okres	Původ koně a historie přesunů
1	2011	512	< 4	Krumvíř, okr. Břeclav	narozen v ČR, bez přesunů
2	2011	512	< 4	Česká Ves, okr. Jeseník	narozen v Kanadě (Alberta), později USA (Oklahoma), od 2008 ČR, v roce 2009 Německo
3	2011	256	< 4	Baška, okr. Frýdek-Místek	narozen v ČR, přesuny po ČR
4	2011	128	< 4	Mnichovo Hradiště, okr. Mladá Boleslav	narozen v ČR, bez přesunů
5	2011	32	< 4	Most	narozen na Slovensku, v roce 2011 přesun do ČR a Německa
6	2012	1024	< 4	Kaplice, okr. Český Krumlov	narozen v ČR, bez přesunů
7	2012	16	16	Krhovice, okr. Znojmo	narozen v Německu, v roce 2012 přesuny po ČR
8	2012	8	< 4	Napajedla, okr. Zlín	narozen v Kanadě, v roce 2005 přesun do Rakouska, od 2008 v ČR, účast na závodech v ČR a Slovensku
9	2012	8	16	Vlachovo Březí, okr. Prachatice	narozen v ČR, bez přesunů
10	2012	4	256	Velká Turná, okr. Strakonice	narozen v ČR, bez přesunů
11	2013	1024	< 4	Turnov, okr. Semily	narozen v Německu, do ČR přesunut v roce 2012, přesuny po ČR, účast na závodech v Rakousku a Německu
12	2013	1024	< 4	Tvrzice, okr. Prachatice	narozen v USA (Texas), v letech 2006–2011 v Rakousku, od 2012 přesun do ČR
13	2013	128	< 4	Chomutov	narozen v Nizozemí, od roku 2011 v ČR, přesuny po závodech v ČR
14	2013	64	< 4	Rudolec, okr. Sokolov	narozen v ČR, bez přesunů
15	2013	16	64	Rovná, okr. Strakonice	narozen v ČR, přesuny po ČR
16	2013	4	< 4	České Budějovice	narozen v Německu, v roce 2013 dovoz do ČR

možno vyšetřit VNT z důvodu hemolýzy. Z celkového počtu 77 vzorků sér vyšetřených VNT na přítomnost protilátek proti viru WNV reagovaly pozitivně 4 vzorky (v titru 8, 8, 16, 1024). Z toho dva vzorky, s titrem WNV protilátek 8 a 1024, reagovaly negativně v neutralizačním testu s TBEV. Další dva vzorky (titr 8 a 16) byly v neutralizačním testu s TBEV pozitivní v titru 16. Jeden vzorek byl hodnocen jako hraniční, v nejnižším ředění séra (1 : 4) vykazoval částečnou neutralizaci v neutralizačním testu s WNV, zároveň byl ale pozitivní v neutralizačním testu s TBEV v titru 256. Dva koně s titrem WNV/TBEV 16/16 a 8/< 4 byli dovezeni z Rakouska a Německa, ostatní pochází z ČR. Za jedinou autochtonní infekci WNV můžeme považovat koně s WNV titrem 1024 (TBEV negativní), u něhož bylo ověřeno, že nebyl přemístován. V roce 2013 reagovalo pozitivně v eELISA testu 11,8 % (93/783) vyšetřených vzorků sér. Z celkem 93 vzorků sér vyšetřených VNT na přítomnost protilátek proti viru WNV reagovalo pozitivně 5 vzorků (v titru 16, 64, 128 a 1024 (2x)), jeden vzorek reagoval v hraničním titru 4. Autochtonní infekce WNV proběhla u jediného koně, který nebyl přemístován ani v rámci ČR (WNV titr 64, TBEV negativní). Tři koně s nejvyššími titry protilátek proti WNV (1024 a 128) byli TBEV sérologicky negativní, pocházeli z USA, Německa a Nizozemí. Kůň reagující s WNV v titru 4 byl do ČR dovezen z Německa. Jeden kůň s WNV titrem 16 reagoval souběžně s TBEV v titru 64.

Pasivní sérosurveillance

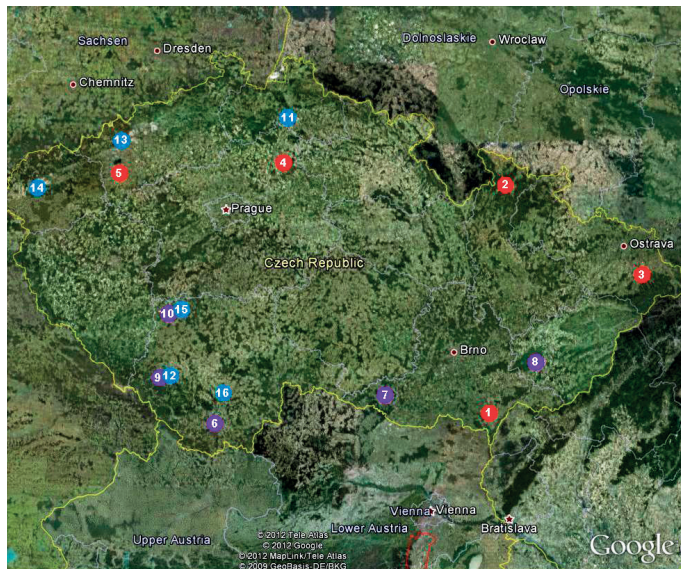
V žádném vzorku krve nebyl metodou RT-PCR prokázán virus západonilské horečky, a ani protilátky proti tomuto viru nebyly v žádném vzorku zjištěny.

DISKUSE

V období tří let bylo kompetitivní ELISA metodou vyšetřeno celkem 2349 sér koní, pozitivně reagovalo 271 vzorků (11,5 %). Konfirmačním vyšetřením virus neutralizačním testem byly prokázány protilátky proti WNV u 16 vzorků. Jedenáct z nich reagovalo pozitivně pouze s WNV v titrech 8 až 1024, ve virus neutralizačním testu s virem TBEV reagovaly negativně. Pět koní z nich pocházelo z ČR a republiku nikdy neopustilo, v těchto případech byl potvrzen autochtonní výskyt WNV. Šest koní bylo do ČR dovezeno ze Severní Ameriky nebo střední a západní Evropy, a proto u nich nelze vyloučit importovanou infekci. Další čtyři vzorky reagovaly pozitivně v obou testech, což bylo pravděpodobně způsobeno křížovou reaktivitou flavivirů, s velkou pravděpodobností se jedná o infekci TBEV. U vzorků s obdobným titrem WNV a TBEV nelze vyloučit ani souběžnou infekci oběma patogeny. Dva vzorky reagovaly v hraničním titru 4, jeden byl TBEV negativní, druhý silně pozitivní. Žádný kůň nevykazoval změny chování ani nervové příznaky, žádný z koní nebyl vakcinován proti WNV.

Během tří let byli prokázáni WNV séropozitivní koně v sedmi krajích ČR (Jihočeský, Jihomoravský, Moravskoslezský, Ústecký, Středočeský, Liberecký a Karlovarský) – viz tabulka 1, mapa. V pěti případech se jednalo o autochtonní infekci WNV. Čtyři koně z lokalit v okrese Břeclav, Český Krumlov, Mnichovo Hradiště a Sokolov nebyli vůbec přesouváni. Námí zjištěné výsledky jsou v souladu s výsledky studií ze sousedních států. V sousedním Německu byla v letech 2010–2012 prováděna sérosurveillance, ale specifické protilátky nebyly u koní prokázány [22]. Hubálek vyšetřil v letech 2008–2011 celkem 163 sér koní z ČR, protilátky proti WNV u žádného

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY



Mapa 1. Výskyt WNV séropozitivních koní v České republice (2011–2013)
Červené body, č. 1–5 (2011), fialové body, č. 6–10 (2012), modré body, č. 11–16 (2013)

Map 1. Distribution of WNV seropositive horses in the Czech Republic (2011–2013)
Red dots, no. 1–5 (2011), purple dots, no. 6–10 (2012), blue dots, no. 11–16 (2013)

neprokázal [17]. V sousedním Slovensku zjistil protilátky proti WNV u 19 nevakcinovaných koní z 232 vyšetřených [17]. V Rakousku byly protilátky u koní zjištěny již v roce 2002 [23]. V Chorvatsku byly u koní prokázány protilátky v prevalenci 3,4% [24], na Ukrajině v prevalenci 13,5% [25].

Aktivní surveillance umožňuje vyšetření požadovaného souboru vzorků s ohledem na statistickou hodnotu. Pro screeningové vyšetření byla vybrána citlivá, ale méně specifická kompetitivní ELISA v kombinaci s konfirmací pozitivních vzorků virus neutralizačním testem. Kompetitivní ELISA je určena pro detekci protilátek proti viru WNV u koní a ptáků, ale interpretaci výsledků komplikuje křížová reaktivita, která je u flavivirů často popisována [26, 27]. Komerčně vyráběné ELISA soupravy používají jako antigen obalový protein viru (pr-E), který obsahuje společný epitop pro většinu flavivirů [28]. Proto je vhodné námi zjištěné výsledky vyšetření metodou cELISA interpretovat jako prevalenci protilátek proti flavivirům. V České republice je nejrozšířenějším zástupcem z čeledi *Flaviviridae* virus klíšťové encefalitidy. Z výsledků lze předpokládat, že více než 10 % koní se setkala s virem klíšťové encefalitidy. Skutečnou prevalenci protilátek proti WNV u koní ukazují výsledky virus-neutralizačního testu s virem WNV.

V ČR je v současnosti chováno přes 80 tisíc koní. V rámci pasivní surveillance bylo ve tříletém sledovaném období zasláno k vyšetření pouhých 5 koní vykazujících nervové příznaky. Přestože byly výsledky vyšetření (RT-PCR, IgM a IgG ELISA) jednoznačně negativní, nelze z tak nízkého počtu vzorků ve vztahu k rozšíření WNV vyvozovat žádné závěry. Je zcela zřejmé, že riziko WNV u koní v ČR je ze strany praktických veterinárních lékařů, chovatelů a majitelů koní podceňováno, a proto není průběh pasivní surveillance zcela optimální.

Přestože byl jednoznačně prokázán sporadický výskyt autochtonních infekcí u koní, zůstává nezodpovězeno, jakým kmenem viru byli koně infikováni, protože sérologické vyšetření rozlišení linií viru neumožňuje. Není zřejmé, zda se jedná o ojedinělý výskyt linie 1 z minulých let nebo o zavlečení linie 2 původem z Maďarska. V budoucnu bude nutné lépe odhalovat klinické případy u koní, detekovat virus a provést jeho molekulární analýzu. Zároveň považujeme za vhodné sledovat další vývoj nálezové situace u koní formou sérologické surveillance.

Literatura

- Hubálek Z, Halouzka J. West Nile fever-reemerging mosquito borne viral diseases in Europe. *Emerg Infect Dis*, 1999;5:643–650.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, Central Europe. *Emerging Infect Dis*, 2006;12:618–623.
- Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, et al. Equine encephalomyelitis outbreak caused by a genetic lineage 2 West Nile virus in Hungary. *J Vet Intern Med*, 2011;25:586–591.
- Wodak E, Richter S, Bagó Z, et al. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet Microbiol*, 2011;149:358–366.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, et al. Phylogeography of West Nile Virus: from the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol*, 2011;85(6):2964–2974.
- Chevalier V, Lecollinet S, Durand B. West Nile virus in Europe: A comparison of surveillance system designs in a changing epidemiological context. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2011;11:1085–1091.
- Durand B, Chevallier V, Pouillot R, et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: Results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis*, 2002;8:777–782.
- Jimenez-Clavero MA, Tejedor CG, Rojo G, et al. Serosurvey of West Nile Virus in equids and bovinds in Spain. *Vet Rec*, 2007;161:212.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, et al. West Nile Virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis*, 2002;8:1372–1378.
- Savuta G, Ionescu A, Dragomir G, et al. Serological investigations of WNV infection in horses from the south-east of Romania. *Bull Univ Agricult Sci Vet Med (Cluj Napoca)*, 2007;64:527–530.
- Bakonyi T, Ferenzi E, Erdélyi K, et al. Explosive spread of a neuro-invasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet Microbiol*, 2013;165:61–70.
- Bakonyi T, Hubálek Z, Rudolf I, et al. Novel Flavivirus or New Lineage of West Nile Virus, Central Europe. *Emerg Infect Dis*, 2005;11:225–231.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z, et al. First isolation of mosquito-borne West-Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virol*, 1998;42:119–20.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z. West Nile fever in Czechland. *Emerg Infect Dis*, 1999;5:594–595.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z, et al. Surveillance virů přenosných komáry na Břeclavsku v povodňovém roce 1997. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*, 1999;3:91–96.
- Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z, et al. Serologic survey of birds for West Nile *Flavivirus* in Southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008;8:659–666.
- Hubálek Z, Ludvíková E, Jahn P, et al. West Nile virus Equine serosurvey in the Czech and Slovak Republics. *Vector borne and Zoonotic Dis*, 2013;13:733–738.
- Cannon RM. Sense and sensitivity – design survey based on a imperfect test. *Prev Vet Med*, 2001;49:141–163.
- Januška J, Daneš L, Heinz F. Laboratorní vyšetřovací metody arbovirových nálezů a virových nálezů šířených hlodavci. Praha: Avicenum; 1990.
- Zelená H, Januška J, Raszka J. Micromodification of Virus-neutralisation Assay with Vital Staining in 96-well Plate and its Use in diagnostics of Ťahyňa Virus Infections. *Epidemiol Mikrobiol Immunol*, 2008;57:106–110.

SOUHRNNÁ SDĚLENÍ • PŮVODNÍ PRÁCE • KAZUISTIKY

20. Eiden M, Vina-Rodriguez A, Hoffmann B, et al. Two new real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assays with unique target sites for the specific and sensitive detection of lineages 1 and 2 West Nile virus strains. *J Vet Diagn Invest*, 2010;22:748–53.
21. Ziegler U, Angenwoort J, Klaus Ch, et al. Use of Competition ELISA for monitoring of West Nile virus infections in horses in Germany. *Int J Environ Res Public Health*, 2013;10:3112–3120.
22. Weissenböck H, Hubálek Z, Halouzka J, et al. Screening for West Nile virus infections in susceptible animal species in Austria. *Epidem Infect*, 2003;131:1023–1027.
23. Barbic L, Listes E, Katic S, et al. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet Microbiol*, 2012;159:504–508.
24. Ziegler U, Skrypnyk A, Keller M, Staubach Ch, et al. West Nile virus antibody prevalence in horses of Ukraine. *Viruses*, 2013;5:2469–2482.
25. Madrid AT, Porterfield JS. The flaviviruses (group B arboviruses): A cross-neutralization study. *J Gen Virol*, 1974;23:91–96.
26. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*, 1989;70:37–43.
27. Blitwich BJ, Bowen RA, Marlenee NL, et al. Epitope-blocking enzy-

me-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus antibodies in domestic mammals. *J Clin Microbiol*, 2003;41:2676–2679.

Poděkování

Autoři děkují všem kolegům z laboratoří státních veterinárních ústavů v Jihlavě, Olomouci, Českých Budějovicích a Hradci Králové za sběr, evidenci a pomoc při vyšetření vzorků krevních sér koní. Poděkování patří i všem inspektorům krajských veterinárních správ za poskytnutí detailních informací k séropozitivním koním.

Do redakce došlo dne 11. 5. 2014.

Adresa pro korespondenci:

MVDr. Kamil Sedlák, Ph.D.

Státní veterinární ústav Praha

Sídlištění 136/24,

165 03 Praha 6-Lysolaje

e-mail: kamil.sedlak@svupraha.cz