

Występowanie i znaczenie zakażeń wirusem Usutu

Iwona Markowska-Daniel, Jerzy Kita

z Samodzielnej Pracowni Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Occurrence and significance of infections with Usutu virus

Markowska-Daniel I., Kita J., Laboratory of Veterinary Epidemiology and Economics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

Usutu virus (USUV) is a mosquito-borne virus belonging to the *Flaviviridae* family. It emerged in sub-Saharan Africa in 16th century. It was first introduced into Europe around 1950 and thereafter it has been introduced repeatedly into several European countries. Currently the growing spread of USUV to new areas is being noted, this might be associated with global warming, changing socio-economic conditions and global travel. This overview paper presents up-to-date knowledge about the taxonomy and structure of USUV, its genetic diversity, ecology and current epidemiological situation, diagnosis of USUV infection, prophylactic and therapeutic possibilities as well as the role of USUV as a human pathogen. Usutu virus is maintained and transmitted primarily by ornithophilic mosquitoes, especially *Culex pipiens*, among avian reservoir hosts. Migratory birds are considered responsible for both short-distance and long-distance dispersal of USUV. USUV infection has also been documented in mammalian species, in particular, bats, horses, dogs and red deer. Phylogenetic studies indicated that European isolates of USUV are distinct from those circulating in Africa. Among two main genetic groups of USUV – African and European, eight distinct genetic lineages were characterized based on their geographic location – three African and five European which suggests that the USUV genome has evolved. Infection with USUV can cause mass mortality of birds, especially among blackbirds. It should be stressed that USUV also has zoonotic potential. Human infections are common, especially in immunocompromised individuals, but disease is rarely reported. Therefore, biological samples collected from patients with febrile neuroinfection should be submitted for differential diagnosis directed at USUV infection.

Keywords: USUV, taxonomy, birds, mosquitoes, zoonosis, humans, diagnosis.

Zakażenie ptaków wirusem Usutu (Usutu virus, USUV) skutkowało w Europie w latach 90. XX w. wysoką śmiertelnością, zwłaszcza wśród kosów (*Turdus merula*; 1, 2). Na podkreślenie zasługuje fakt, że jest to patogen o znaczeniu zoonotycznym. Wprawdzie w piśmiennictwie światowym ukazało się wiele prac o USUV, w tym także jedna praca autorów polskich (3), jednak brak jest sumarycznego, a jednocześnie kompleksowego opracowania na ten temat, co skłoniło nas do zebrania i przedstawienia aktualnych danych dotyczących tego wirusa.

Pochodzenie wirusa i epidemiologia

Badania Engela i wsp. (4) wykazały, że USUV pojawił się w Afryce na początku XVI w. Został on wykryty u różnych gatunków ptaków oraz u komarów (5). Pierwsza izolacja wirusa miała miejsce dopiero w 1959 r. od komarów *Culex neavei* zebranych w pobliżu rzeki Usutu w południowej Afryce. Prawdopodobnie pomiędzy 1950 a 1960 r. wirus ten został po raz pierwszy zawleczony przez ptaki z Afryki do Europy – na terytorium Hiszpanii (6).

Pomimo że najwcześniejszy dowód na obecność USUV w Europie pochodzi dopiero z 2001 r. z Austrii, co miało

związek ze śmiertelnością kilku gatunków rodzimych ptaków w tym kraju (2), jednak na podstawie wyników analizy retrospektywnej archiwalnych próbek pochodzących od padłych ptaków w Toskanii wysunięto hipotezę, że druga transmisja USUV z Afryki do Europy miała miejsce znacznie wcześniej, w latach 1970 i 1980 na terytorium Włoch i Austrii oraz ponownie do Hiszpanii w latach 1984–2006 (1, 4).

W następnych latach wirusa USU wykryto u komarów, ptaków i nietoperzy w kilku krajach europejskich. Został on wykryty ponownie w Austrii w latach 2001–2006 i 2009–2015 (7), na Węgrzech w latach 2003–2006 (8), w Hiszpanii w latach 2006–2009 i roku 2012 (9, 10), w Czechach w 2008 r. (11), we Włoszech w latach 2009–2016 (12, 13), w Niemczech w latach 2010–2015 (14), w Szwajcarii w 2011 r. (15) oraz we Francji w 2015 r. (16). Latem 2016 r. zanotowano epizootię zakażeń USUV w Austrii (w tym samym regionie, co w latach 2001–2006), Belgii, Niemczech, we Francji i po raz pierwszy w Holandii (17, 18, 19).

Ponadto serologicznie potwierdzono zakażenie ptaków tym wirusem w Grecji (20), Polsce (21) i Wielkiej Brytanii (22). Obecność przeciwciał dla USUV wykryto także u koni w Serbii (23). Dowodzi to, że proces geograficznego szerzenia się zakażeń tym wirusem jest kontynuowany, co sugeruje trwałe zakażenie komarów w zapowietrzonym obszarze, także w okresie zimy, lub wielokrotną reintrodukcję wirusa. Dodatkowo USUV pojawia się w nowych niszach ekologicznych. Warto wspomnieć, że w wielu krajach europejskich USUV występuje często wspólnie z wirusem Zachodniego Nilu (West Nile virus, WNV). Biorąc pod uwagę krzyżową reakcję immunologiczną obydwu wirusów, należałoby określić, czy takie wspólne występowanie omawianych patogenów może mieć wpływ na krążenie USUV w Europie (24).

Taksonomia i struktura wirusa

Wirus Usutu jest arbowirusem (arthropod-borne virus) zakwalifikowanym do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Flavivirus* (25). Pod względem antygenowym jest on zbliżony do wirusa japońskiego zapalenia mózgu (Japanese encephalitis virus, JEV). Jest on spokrewniony z wieloma ludzkimi i zwierzęcymi wirusami, takimi jak: WNV, wirus zapalenia mózgu doliny Murray (Murray Valley encephalitis virus, MVEV), który wywołuje objawy nerwowe i wysoką śmiertelność u ludzi w północnej Australii, a także wirus zapalenia mózgu Saint Louis (St. Louis encephalitis virus, SLEV; 26).

Wirus USU należy do małych (40–60 nm średnicy), kulistych wirusów, o strukturze typowej dla flawiwirusów. Posiada on otoczkę lipidową pochodzącą z błony komórkowej komórki gospodarza (6). Materiałem genetycznym USUV jest jednoniciowy, pozytywnie spolaryzowany RNA wielkości ok. 11 tysięcy par zasad, bez poliadenylacji na końcu 3' (27). Posiada on unikalną ramkę

odczytu (ORF) i dwa regiony nietranslacyjne (untranslated regions, UTRs). W procesie replikacji ramka odczytu ulega translacji w unikalne białko zawierające 3434 aminokwasy, z którego powstają trzy ważne struktury: kapsyd, otoczka i premembrana oraz osiem białek niestrukturalnych (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, 2K, NS4B i NS5). Podobnie jak w przypadku innych flawiwirusów geny kodujące białka strukturalne są umiejscowione na końcu 5' genomu i formują cząstkę wirusa (28). Białko kapsydu tworzy rdzeń wirionu i jest połączone z wirusowym RNA. Najważniejszym białkiem otoczki jest glikoproteina E, która ułatwia połączenie z komórką gospodarza i wnikanie wirusa do wnętrza komórki. Białka premembranowe są ważne dla dojrzewania wirusa i tworzenia otoczki (29, 30). Białka niestrukturalne pełnią różne funkcje podczas zakażenia. Biorą one m.in. udział w dojrzewaniu wirionów i posiadają aktywność enzymatyczną. Poza tym są one istotne dla hamowania wydzielania interferonu po zakażeniu (31).

Zmienność wirusa

Aktualnie na podstawie analizy genetycznej opartej na białku niestrukturalnym NS5 wyodrębnia się dwie główne grupy genetyczne – afrykańską i europejską. Wyniki tej analizy wskazują ponadto, że można wyodrębnić 8 linii filogenetycznych USUV, 3 afrykańskie, określane jako Afryka 1–3, oraz 5 europejskich, określanych jako Europa 1–5 (32).

Linie Afryka 1 reprezentuje tylko jeden szczep – CAP-1969 wyizolowany w Republice Środkowoafrykańskiej w 1969 r. (numer akcesji w GenBanku KC7549581; 28).

Linia Afryka 2 wywodzi się ze szczepów z południowej Afryki z połowy lat 40. Obejmuje ona szczepy izolowane w Senegalu, a dodatkowo także w Hiszpanii, Niemczech i we Francji (16). Linia Afryka 3 obejmuje szczepy izolowane w Senegalu, a ponadto w Niemczech, Holandii, Belgii, we Francji i dodatkowo ludzki szczep CAR-1981, wyizolowany w Republice Środkowoafrykańskiej w 1981 r. (numer akcesji w GenBanku KC7549551).

Linia Europa 1 pochodzi od przodka, który występował pierwotnie w Senegalu. Aktualnie obejmuje ona szczepy wyizolowane w Austrii, na Węgrzech, w Szwajcarii i ostatnio wyizolowany szczep na terenie Włoch, a poza tym szczepy pochodzące z Senegalu (12). Linia Europa 2 obejmuje szczepy izolowane we Włoszech, włączając w to szczep wyizolowany w Bolonii w 2009 r. od pacjenta z zapaleniem mózgu i opon mózgowych – szczep nr HM569263 (33), a ponadto szczepy izolowane w Czechach. Linia Europa 3 obejmuje szczepy izolowane w Niemczech, Belgii i we Francji (17). Linia Europa 4 zawiera szczepy izolowane we Włoszech, łącznie ze szczepem ludzkim (18). Ostatnio wyodrębniona linia Europa 5 obejmuje różne szczepy izolowane w Niemczech (17).

Wskazuje to jednoznacznie, że populacje komarów w tym samym regionie mogą być zakażone szczepami należącymi do różnych linii filogenetycznych. Pokrewieństwo genetyczne izolatów USUV wynosi powyżej 94%, z wyjątkiem szczepu CAR-1969, którego podobieństwo nukleotydów wynosi jedynie 78,3% (28). Porównując region nietranslacyjny 5' UTR szczepów należących do różnych linii filogenetycznych, wykazano, że jest on konserwatywny i posiada podobną wielkość i strukturę drugorzędową, z wyjątkiem linii Afryka 1. Jednocześnie



FUNGITRAXX®

10 mg/ml roztwór doustny dla ptaków ozdobnych



Fungitraxx®

to pierwszy zarejestrowany w UE lek do zwalczania grzybicy u ptaków ozdobnych. Numer pozwolenia na dopuszczenie do obrotu: EU/2/13/160/001-002. Lek wydawany z przepisu lekarza – Rp.

WSKAZANIA LECZNICZE: Papugowe, sokołowe, szponiaste, sowy, blaszkodziobe: leczenie aspergilozy. (Wyłącznie) papugowe: także leczenie drożdżycy.

SUBSTANCJA CZYNNA: Itrakonazol 10 mg / ml.
Itrakonazol jest lekiem grzybobójczym, wykazującym działanie przeciwko szczepom *Aspergillus spp.* i *Candida spp.*, częstym patogenom występującym u ptaków.

DAWKOWANIE: Fungitraxx jest lekiem doustnym.

ASPERGILOZA: od 5 do 10 mg itraconazolu na kg m.c. na dobę (0,5 - 1 ml Fungitraxx / kg m.c.).

DROŻDŻYCA: 10 mg itraconazolu na kg m.c. na dobę (1 ml Fungitraxx / kg m.c.) przez 14 dni.

STOP GRZYBICY!

Pełna informacja o leku w dziale Leków weterynaryjnych



Ryc. 1. Pustułka zwyczajna (*Falco tinnunculus*). Miejski Ogród Zoologiczny w Warszawie, Ośrodek rehabilitacji ptaków chronionych „Ptasi azyl” (fot. Katarzyna Zielińska)



Ryc. 2. Sroka (*Pica pica*). Miejski Ogród Zoologiczny w Warszawie, Ośrodek rehabilitacji ptaków chronionych „Ptasi azyl” (fot. Katarzyna Zielińska)



Ryc. 3. Kos zwyczajny (*Turdus merula*). Miejski Ogród Zoologiczny w Warszawie, Ośrodek rehabilitacji ptaków chronionych „Ptasi azyl” (fot. Katarzyna Zielińska)

w regionie 5' UTR w szczepach linii afrykańskiej występują 4 specyficzne mutacje: A3T, T4C, C10T i T14C, w porównaniu ze szczepami linii europejskiej. Z kolei region 3' UTR charakteryzuje się wysoką zmiennością pomiędzy szczepami reprezentującymi różne linie genetyczne (4).

Należy także wspomnieć, że analiza porównawcza genomów USUV wykazała zależność zarówno pomiędzy sekwencją aminokwasów i geograficznym regionem izolacji wirusa, jak i rodzajem gospodarza. Wykryto przykładowo dwie specyficzne mutacje: A20V w białku kapsydu oraz M16I w NS4B, które występują we wszystkich szczepach afrykańskich (4, 28). Ponadto zidentyfikowano dwie mutacje (prM, Y120N) specyficzne dla szczepów izolowanych od ptaków, jedną (G195R) charakterystyczną dla szczepów izolowanych od komarów oraz trzy charakterystyczne mutacje: S154L w białku NS2A, Y474H w białku NS3 i H173Q w białku NS5 w szczepie CAR-1981 izolowanym od człowieka. W innym szczepie pochodzącym od pacjenta z zapaleniem mózgu i rdzenia – Bologna/09 wykryto dwie inne mutacje S302G w białku otoczki oraz D896E w białku NS5 (33). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że szczepy z wymienionymi mutacjami wykazują względny tropizm do ludzkich komórek nerwowych i zdolności do neuroinwazji (33).

W 2016 r. wykazano obecność innych mutacji – E55A, N103K, V206E w białku otoczki w szczepach izolowanych od zdrowych dawców krwi w Niemczech (34). Dowodzi to zmienności genetycznej w szczepach USUV, podobnie jak ma to miejsce w przypadku innych RNA-wirusów.

Wektory i gospodarze USUV

Głównym wektorem USUV są komary należące do 7 rodzajów: *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* (w tym kilku gatunków komarów *Culex pipiens*), *Culiseta*, *Ochlerotatus*, *Coquillettidia* i *Mansonia* (24, 27). Dotychczasowe badania nie wykazały USUV u kleszczy (35).

Ważnym gospodarzem dla USUV są ptaki. Zakażeniu mogą ulegać różne gatunki ptaków. Wirusa izolowano od 62 gatunków ptaków w Afryce i krajach europejskich (5, 24). Uważa się, że za wprowadzenie tego wirusa z Afryki do Europy odpowiadają ptaki migrujące, zwłaszcza pustułka zwyczajna (*Falco tinnunculus*; ryc. 1), trzyciniczek zwyczajny (*Acrocephalus scirpaceus*), piegża zwyczajna (*Sylvia curruca*), cierniówka (*Sylvia communis*) i muchołówka żałobna (*Ficedula hypoleuca*). Natomiast za rozprzestrzenienie USUV w Europie odpowiedzialne są takie gatunki, jak: sroka (*Pica pica*; ryc. 2), wróbel zwyczajny (*Passer domesticus*), kura domowa *Gallus gallus* i kos zwyczajny (*Turdus merula*; ryc. 3; 24).

Należy zaznaczyć, że tylko niektóre gatunki ptaków wykazują objawy chorobowe po zakażeniu. Objawy te są bardzo zróżnicowane, począwszy od łagodnych, do manifestujących się zapaleniem mózgu, zwyrodnieniem mięśnia sercowego oraz martwicą wątroby i śledziony (12, 36). Jest interesujące, że USUV powoduje wysoką śmiertelność wśród kosów w Europie, z wyjątkiem Hiszpanii, natomiast nie obserwowano dotychczas tego zjawiska w Afryce (37).

Możliwość zakażenia USUV wykazano ponadto u różnych gatunków ssaków, w szczególności nietoperzy (*Pipistrellus pipistrellus*), koni, psów i jeleni (*Cervus elaphus*; 38, 39, 40, 41).

Zakażenie ludzi USUV

Przypadki zakażeń ludzi USUV opisano zarówno w Afryce, jak i w Europie. Dotychczas zidentyfikowano 21 przypadków zakażeń ludzi tym patogenem. Warto pamiętać, że ludzie są przypadkowymi gospodarzami końcowymi – brak jest transmisji wirusa Usutu w populacji ludzi. Zwykle do zakażenia człowieka dochodzi po ukąszeniu przez komara, który wcześniej miał kontakt z zakażonym USUV ptakiem. Zakażenia u ludzi mogą być bezobjawowe lub z bardzo zróżnicowanymi objawami, począwszy od wysypki, podwyższonej temperatury ciała, bólu głowy, aż do ciężkich objawów neurologicznych, obserwowanych szczególnie u pacjentów z chorobami przewlekłymi bądź niedoborami odporności (5, 34, 42, 43, 44, 45).

Pierwszy przypadek zachorowania u ludzi opisano w Afryce na początku lat 80. (5). Drugi przypadek stwierdzono w Burkina Faso w 2004 r. U obu pacjentów występowały umiarkowane objawy, z gorączką, wysypką i żółtaczką. W Europie pierwszy przypadek zakażenia człowieka USUV zdiagnozowano w 2009 r. we Włoszech, gdzie opisano zapalenie mózgu i rdzenia u dwóch pacjentów z deficytem immunologicznym, objawiające się zaburzeniami neurologicznymi (43, 44). Pierwszy przypadek wystąpił u pacjenta z rozsianą białaczką (lymphoma large B cell), gorączką i objawami neurologicznymi, a drugi dotyczył pacjenta po transplantacji wątroby (43, 44). Ten drugi przypadek wykryto podczas badania krwi testem PCR i otrzymania wyniku dodatniego dla WNV. Wirusa Usutu wykryto także w latach 2008–2009 w płynie mózgowo-rdzeniowym trzech pacjentów z ostrym zapaleniem opon mózgowych i mózgu (45). Warto nadmienić, że w 2017 r. także odnotowano przypadki zakażeń ludzi USUV w tym kraju. W Chorwacji w 2013 r. przedstawiono pierwsze doniesienie o zakażeniu USUV trzech pacjentów z neuroinfekcjami (46). W Niemczech na podstawie wyników badań molekularnych potwierdzono ostatnio jednoczesne zakażenie dawców krwi USUV i WNV (34). Stanowi to duże zagrożenie dla pacjentów w stanie krytycznym lub z immunosupresją, szczególnie w przypadku przeprowadzania transfuzji krwi w krajach, w których nie prowadzi się monitoringu w kierunku zakażeń flawiwirusami. W latach 2015–2016 i 2018 r. zdiagnozowano zakażenia ludzi USUV we Francji (7). Również badania seroepidemiologiczne dowiodły obecności u ludzi przeciwciał dla USUV w Niemczech, we Włoszech i w Serbii. Odsetek wyników dodatnich u dawców krwi wahał się od 0,02% w Niemczech, aż do 7,5% w Serbii.

Diagnostyka zakażeń USUV

Zakażenie USUV może być rozpoznane na podstawie wykrycia obecności swoistych przeciwciał, wirusowego RNA i/lub izolacji wirusa w hodowli komórkowej (33, 46). Zwykle przeciwciała klasy IgM pojawiają się około pięciu dni po wystąpieniu gorączki (3). Najczęściej wykorzystywanym materiałem do badań jest krew lub płyn mózgowo-rdzeniowy.

Jak dotychczas brak jest uznanego komercyjnego testu serologicznego czy zestawu do PCR. Przeciwciała

wykrywa się testem ELISA opracowanym w danym laboratorium lub testem immunofluorescencji. Wynik dodatni uzyskany tymi metodami musi być potwierdzony klasyczną metodą lysinkową (plaque reduction neutralization test) lub w odmianie mikro (microneutralization assay, mNTA) w celu wykluczenia reakcji krzyżowych z WNV. Czterokrotny wzrost miana swoistych przeciwciał badanych par surowic pobranych w odstępie 10–15 dni stanowi podstawę wyniku dodatniego potwierdzającego zakażenie.

Podejrzanie wystąpienia zakażenia USUV i przeprowadzenie odpowiednich badań powinny być wdrożone w przypadku pacjentów z objawami nerwowymi i gorączką o nieustalonej etiologii, szczególnie w regionach, w których USUV krąży w środowisku.

Profilaktyka swoista i leczenie

Szczepienia mogłyby stanowić efektywne narzędzie w ochronie przed rozwojem neuroinwazji. W ostatnich latach podjęto badania nad opracowaniem szczepionki przeciwko zakażeniom USUV, jednak ograniczona liczba zachorowań nie stanowi wystarczającego bodźca do ich intensyfikacji (47, 48). U ludzi zakażonych USUV stosuje się leczenie objawowe.

Podsumowanie

Od czasu wykrycia USUV w 1959 r. przeprowadzono niewiele badań nad krążeniem tego wirusa. Zainteresowanie nim wzrosło dopiero od 2000 r. w związku z wysoką śmiertelnością ptaków w Europie. Z kolei większą uwagę na aspekt zoonotyczny zwrócił dopiero pierwszy przypadek zakażenia człowieka z obniżoną odpornością we Włoszech w 2009 r.

Zakażenia ludzi USUV są sporadyczne, a ponadto ograniczona możliwość zastosowania serologicznych testów diagnostycznych, z uwagi na krzyżowe reakcje serologiczne z innymi flawiwirusami, utrudnia diagnostykę. Jednak w ostatnich latach, szczególnie w krajach, w których prowadzony jest aktywny plan zwalczania zakażeń wirusem Zachodniego Nilu, obserwuje się wzrost liczby przypadków zakażeń ludzi omawianym patogenem.

Ostatnio zaobserwowano endemiczne wystąpienie zakażeń tym wirusem w kilku krajach europejskich, co uzasadnia celowość rozszerzenia zakresu badań zarówno medycznych, weterynaryjnych, jak i entomologicznych nad tym wirusem. Pozwoli to na lepsze poznanie geograficznego występowania USUV w krajach europejskich, ekologii, epidemiologii, patogenezy, czasu trwania wirēmii, czasu potrzebnego do uzyskania skutecznej odpowiedzi immunologicznej, zmian patologicznych i zróżnicowania genetycznego wirusa, szczególnie, że zmiany klimatu oraz globalizacja mogą istotnie wpływać na pojawianie się patogenów w nowych niszach ekologicznych.

Piśmiennictwo

1. Weissenböck H., Bakonyi T., Rossi G., Mani P., Nowotny N.: Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, 19, 274–277.
2. Weissenböck H., Kolodziejek J., Url A., Lussy H., Rebel-Bauder B., Nowotny N.: Emergence of usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, 8, 652–656.

3. Moniuszko-Malinowska A., Czupryna P., Dunaj J., Zajkowska J., Siemieniako A., Pancewicz S.: West Nile virus and Usutu – a threat to Poland. *Przegl. Epidemiol.* 2016, **70**, 7–10.
4. Engel D., Jöst H., Wink M., Börstler J., Bosch S., Garigliany M.M., Jöst A., Czajka C., Lühken R., Ziegler U., Groschup M.H., Pfeffer M., Becker N., Cadar D., Schmidt-Chanasit J.: Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *MBio* 2016, **7**, e01938–15.
5. Nikolay B., Diallo M., Boye C.S., Sall A.A.: Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011, **11**, 1417–1423.
6. Gaibani P., Rossini G.: An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection* 2017, **19**, 382–387.
7. www.promedmail.org.
8. Bakonyi T., Erdélyi K., Ursu K., Ferenczi E., Csörgo T., Lussy H., Chvala S., Bukovsky C., Meister T., Weissenböck H., Nowotny N.: Emergence of Usutu virus in Hungary. *J. Clin. Microbiol.* 2007, **45**, 3870–3874.
9. Vazquez A., Jimenez-Clavero M., Franco L., Donoso-Mantke O., Sambri V., Niedrig M., Zeller H., Tenorio A.: Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* 2011, **4**, 16 (31), pii: 19935.
10. Busquets N., Alba A., Allepuz A., Aranda C., Ignacio Nuñez J.: Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, **14**, 861–863.
11. Hubálek Z., Halouzka J., Juricová Z., Sikutová S., Rudolf I., Honza M., Janková J., Chytil J., Marec F., Sitko J.: Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in southern Moravia (Czech Republic). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008, **8**, 659–666.
12. Manarolla O., Bakonyi T., Gallazi D., Crosta L., Weissenböck H., Dorresteim G.M., Nowotny N.: Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Vet. Microbiol.* 2010, **141**, 159–63.
13. Calzolari M., Chiapponi C., Bonilauri P., Lelli D., Baioni L., Barbieri I., Lavazza A., Pongolini S., Dottori M., Moreno A.: Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infect. Genet. Evol.* 2017, **51**, 255–262.
14. Ziegler U., Jöst H., Müller K., Fischer D., Rinder M., Tietze D.T., Danner K.J., Becker N., Skuballa J., Hamann H.P., Bosch S., Fast C., Eiden M., Schmidt-Chanasit J., Groschup M.H.: Epidemic spread of usutu virus in southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2015, **15**, 481–488.
15. Steinmetz H.W., Bakonyi T., Weissenböck H., Hatt J.M., Eulenberger U., Robert N., Hoop R., Nowotny N.: Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland-genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks. *Vet. Microbiol.* 2011, **148**, 207–212.
16. Eiden M., Gil P., Ziegler U., Rakotoarivony I., Marie A., Frances B., L'Ambert G., Simonin Y., Foulongne V., Groschup M.H., Gutierrez S., Eloit M.: Emergence of 2 usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camarque, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* 2018, **61**, 151–154.
17. Cadar D., Lühken R., van der Jeugd H., Garigliany M., Ziegler U., Keller M., Lahoreau J., Lachmann L., Becker N., Kik M., Oude Munnink B.B., Bosch S., Tannich E., Linden A., Schmidt V., Koopmans M.P., Rijks J., Desmecht D., Groschup M.H., Reusken C., Schmidt-Chanasit J.: Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill.* 2017, **22**, pii: 30452.
18. Garigliany M., Linden A., Gilliau G., Levy E., Sarlet M., Franssen M., Benzarti E., Derouaux A., Francis F., Desmecht D.: Usutu virus, Belgium, 2016. *Infect. Gen. Evol.* 2017, **48**, 116–119.
19. Rijks J.M., Kik M.L., Slaterus R., Foppen R., Stroo A., IJzer J., Stahl J., Gröne A., Koopmans M., van der Jeugd H.P., Reusken C.: Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016. *Euro Surveill.* 2016, **21**(45), pii: 30391.
20. Chaintoutis S.C., Dovas C.I., Papanastassopoulou M., Gewehr S., Danis K., Beck C., Lecollinet S., Antalis V., Kalaitzopoulou S., Panagiotopoulos T., Mourelatos S., Zientara S., Papadopoulos O.: Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, **37**, 131–141.
21. Hubálek Z., Wegner E., Halouzka J., Tryjanowski P., Jerzak L., Sikutová S., Rudolf I., Kruszewicz A.G., Jaworski Z., Włodarczyk R.: Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral Immunol.* 2008, **21**, 247–253.
22. Buckley A., Dawson A., Gould E.A.: Detection of seroconversion to West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus in UK sentinel chickens. *Virology* 2006, **3**, 71.
23. Lupulovic D., Martin-Acebes M.A., Lazic S., Alonso-Padilla J., Blázquez A.B., Escibano-Romero E., Petrovic T., Saiz J.C.: First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011, **11**, 1303–1305.
24. Nikolay B.: A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2015, **109**, 609–618.
25. Poidinger M., Hall R.A., Mackenzie J.S.: Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology* 1996, **218**(2), 417–421.
26. Calisher C.H., Gould E.A.: Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv. Virus Res.* 2003, **59**, 1–19.
27. Bakonyi T., Gould E.A., Kolodziejek J., Weissenböck H., Nowotny N.: Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* 2004, **328**, 301–310.
28. Nikolay B., Dupressoir A., Firth C., Faye O., Boye C.S., Diallo M., Sall A.A.: Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa. *Virology* 2013, **10**, 217.
29. Smit J.M., Moesker B., Rodenhuis-Zybert I., Wilschut J.: Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses* 2011, **3**, 160–171.
30. Li L., Lok S.M., Yu I.M., Zhang Y., Kuhn R.J., Chen J., Rossmann M.G.: The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science* 2008, **319**(5871), 1830–1834.
31. Murray C.L., Jones C.T., Rice C.M.: Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008, **6**, 699–708.
32. Cadar D., Lühken R., van der Jeugd H., Garigliany M., Ziegler U., Keller M., Lahoreau J., Lachmann L., Becker N., Kik M., Oude Munnink B.B., Bosch S., Tannich E., Linden A., Schmidt V., Koopmans M.P., Rijks J., Desmecht D., Groschup M.H., Reusken C., Schmidt-Chanasit J.: Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill.* 2017, **22**(4), pii: 30452.
33. Gaibani P., Cavrini F., Gould E.A., Rossini G., Pierro A., Landini M.P., Sambri V.: Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms. *PLoS One* 2013, **31**, 8(5):e64761.
34. Cadar D., Maier P., Müller S., Kress J., M., A., Schlaphof A., Jansen S., Jöst H., Tannich E., Runkel S., Hitzler W.E., Hutschreuter G., Wessiepe M., Schmidt-Chanasit J.: Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Euro Surveill.* 2017, **22**(14), 30501.
35. Llopis I.V., Tomassone L., Grego E., Silvano F., Rossi L.: Investigation into Usutu and West Nile viruses in ticks from wild birds in North-western Italy, 2012–2014. *New Microbiol.* 2017, **40**, 56–57.
36. Chvala S., Kolodziejek J., Nowotny N., Weissenböck H.: Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J. Comp. Pathol.* 2004, **131**, 176–185.
37. Bakonyi T., Nória Busquets N., Nowotny N.: Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014, **14**, 324–329.
38. Cadar D., Becker N., Campos Rde M., Börstler J., Jöst H., Schmidt-Chanasit J.: Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, **20**, 1771–1773.
39. Barbic L., Vilbic-Cavlek T., Listes E., Stevanovic V., Gjenero-Margan I., Ljubin-Sternak S., Pem-Novosel I., Listes I., Mlinaric-Galinovic G., Di Gennaro A., Savini G.: Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013, **13**, 772–774.
40. Durand B., Haskouri H., Lowenski S., Vachieri N., Beck C., Lecollinet S.: Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* 2016, **144**, 1857–1864.
41. Garcia-Bocanegra I., Paniagua J., Gutiérrez-Guzmán A.V., Lecollinet S., Boadella M., Arenas-Montes A., Cano-Terriza D., Lowenski S., Gortázar C., Höfle U.: Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC Vet. Res.* 2016, **12**, 249.
42. Vazquez A., Jimenez-Clavero M., Franco L., Donoso-Mantke O., Sambri V., Niedrig M., Zeller H., Tenorio A.: Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill.* 2011, **4**, 16(31), pii: 19935.
43. Cavrini F., Gaibani P., Longo G., Pierro A.M., Rossini G., Bonilauri P., Gerunda G.E., Di Benedetto F., Pasetto A., Girardis M., Dottori M., Landini M.P., Sambri V.: Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveill.* 2009, **17**, 14(50), pii: 19448.
44. Pecorari M., Longo G., Gennari W., Grottole A., Sabbatini A., Tagliacuzzi S., Savini G., Monaco F., Simone M., Lelli R., Rumpianesi F.: First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August–September 2009. *Euro Surveill.* 2009, **17**, 14(50), pii: 19446.
45. Cavrini F., Della Pepa M.E., Gaibani P., Pierro A.M., Rossini G., Landini M.P., Sambri V.: A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* 2011, **50**, 221–223.
46. Vilbic-Cavlek T., Kaic B., Barbic L., Pem-Novosel I., Slavic-Vrzic V., Lesnikar V., Kurecic-Filipovic S., Babic-Erceg A., Listes E., Stevanovic V., Gjenero-Margan I., Savini G.: First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection* 2014, **42**, 689–695.
47. Martin-Acebes M.A., Blázquez A.B., Cañas-Arranz R., Vázquez-Calvo A., Merino-Ramos T., Escibano-Romero E., Sobrino F., Saiz J.C.: A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus. *Vaccine* 2016, **34**, 2066–2067.
48. Palanisamy N., Lennerstrand J.: Computational prediction of Usutu virus E protein B cell and T cell epitopes for potential vaccine development. *Scand. J. Immunol.* 2017, **85**, 350–364.

Prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel,
e-mail: iwona_markowska_daniel@sggw.pl