

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

USUTU VIRUS, DALŠÍ EMERGENTNÍ PATOGEN PŘENÁŠENÝ KOMÁRY VE STŘEDNÍ EVROPĚ

USUTU VIRUS, ANOTHER EMERGING MOSQUITO-BORNE PATHOGEN IN CENTRAL EUROPE

Jakub Vojtíšek ^{1,2}, Radek Pečta ¹, Romana Kejíková ¹, Zdeněk Hubálek ¹, Silvie Šikutová ¹, Ivo Rudolf ^{1,2} ✉

¹ Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., Brno

² Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Přijato 4. září 2021.

Akceptováno 1. října 2021.

Zveřejněno 4. března 2022.

Souhrn

Usutu virus (USUV) je emergentní patogen přenášený komáry, taxonomicky náleží do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae*. Tento původně africký arbovirus v roce 2001 způsobil hromadné hynutí ptactva v okolí Vídně a poté se rozšířil prakticky po celé střední, jižní a západní Evropě. USUV je primárně patogenní pro některé druhy ptevců, především kosy černé (*Turdus merula*), avšak patogenita byla prokázána i u řady jiných druhů, zejména z řádů dravců a sov. V posledních letech přibývá případů infekce u člověka. Cílem práce je podat ucelené informace o taxonomii viru, jeho genomu, životním cyklu včetně komářích vektorů a obratlovčích rezervoárů, endemickém výskytu v Africe i následném expanzivním šíření v Evropě, surveillanci v jednotlivých evropských státech, patogenitě viru pro obratlovce včetně popisu onemocnění, jež způsobuje, laboratorní diagnostice a dostupné léčbě.

Klíčová slova: *Usutu virus; USUV; flaviviry; ptáci; emergentní arboviry*

Summary

Usutu virus (USUV) is an emerging mosquito-borne pathogen belonging to the genus *Flavivirus* and family *Flaviviridae*. This African arbovirus caused a large bird die-off near Vienna in 2001. Since then the virus spread in Central, Southern and Western Europe. USUV is a primarily pathogen of birds, highly pathogenic especially for blackbirds (*Turdus merula*), but with proven pathogenicity for other bird species, mainly from orders *Accipitriformes* and *Strigiformes*. However, the number of human cases of USUV infection has increased recently. In this review, we summarize the current knowledge on USUV taxonomy, its genome, transmission cycle involving mosquitoes as vectors and vertebrate hosts, endemic occurrence in Africa and expansive spread in Europe, surveillance in individual European countries, pathology and clinical manifestations in vertebrates, laboratory diagnosis of infection and available treatment.

Key words: *Usutu virus; USUV; flaviviruses; birds; emerging arboviruses*

Úvod

Usutu virus (USUV) náleží do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae* a poprvé byl izolován v roce 1959 z komára *Culex neavei* na území dnešního Svazijska (jižní Afrika) poblíž řeky Usutu (1). Zájem o něj vzrostl v návaznosti na jeho velmi rychlou expanzi v Evropě, patogenitu pro ptáky a také první popsání případy lidské infekce. K jeho introdukci z Afriky do Evropy pravděpodobně došlo migrujícími ptáky, a to ve více vlnách. K prvnímu průkazu USUV v podobě úhynu kosů černých (*Turdus merula*) došlo v roce 1996 v Itálii (retrospektivní nález), avšak na základě fylogenetických analýz lze předpokládat, že samotný virus se do Evropy dostal již dříve (2, 3).

Genom USUV a jeho replikační strategie

USUV je sférický flavivirus, jehož obal vzniká pučením virové částice do lumen endoplazmatického retikula hostitelské buňky. Viriony mají průměr 40–60 nm a obsahují jednořetězcový RNA genom s kladnou polaritou o velikosti 11 kb, který obsahuje na svém 5' konci čepičku, avšak postrádá poly(A) ukončení na 3' konci genomu (2, 4). Celý otevřený čtecí rámec kódující 3434 aminokyselin se nachází mezi nukleotidy 97 a 10401 a je překládán do polyproteinu, který je kotranslačně a posttranslačně štěpen buněčnými a virovými proteázami. Těmito úpravami pak vznikají strukturní proteiny tvořící virovou částici (kapsidový – C, prekursor pro membránový – prM a obalový – E) a proteiny nestrukturní (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b a NS5 – s různými funkcemi jako např. RNA dependentní RNA polymerázy, serinové proteázy nebo napomáhající komplementaci virionu) (4, 5). Virion vstupuje do hostitelské buňky pomocí receptory asociované endocytózy a zevnitř fúzuje s kyselým endozomem (6). Mimo translatovanou oblast obsahuje genom ještě dvě netranslatovaná místa nezbytná pro replikaci a translaci virového genomu. Kapsidový protein tvoří jádro virionu a je asociován s virovou RNA. Obalový glykoprotein E zprostředkovává navázání virionu na receptor na povrchu hostitelské buňky a podporuje vstup viru do buňky. Membránový prM protein pak hraje důležitou funkci při maturaci viru, ke které dochází těsně před opuštěním hostitelské buňky (4, 7).

Taxonomie USUV

V čeledi *Flaviviridae* je USUV řazen společně s virem západonilské horečky (WNV), virem encefalitidy Murray Valley (MVEV), virem Japonské encefalitidy (JEV) nebo virem encefalitidy St. Louis (SLEV) do komáry přenášeného sérokomplexu Japonské encefalitidy. Celkem tato skupina zahrnuje 10 virů, z nichž jen některé způsobují infekce i u lidí (8, 9). Porovnání genomů USUV s dalšími viry ze sérokomplexu Japonské encefalitidy prokázalo nejvyšší příbuznost USUV s MVEV (73 % shoda v nukleotidové sekvenci a 82 % shoda v sekvenci aminokyselin) (4).

Fylogenetické postavení USUV podle sekvence genu pro NS5

Na základě sekvenace genu kódující protein NS5 i celogenomového sekvenování byla u evropských zástupců USUV stanovena fylogenetická příbuznost, podle níž rozlišujeme pět základních genomických linií (2): Linie „**Europe 1**“ obsahuje virové kmeny z Rakouska a Maďarska, linie „**Europe 2**“ z Itálie a Česka, linie „**Europe 3**“ především z Německa, Belgie a Francie a linie „**Europe 4**“ z Itálie. Nejnověji objevená linie „**Europe 5**“ obsahuje kmeny izolované z ptáků v Německu v roce 2016 (10). V Africe byly stanoveny 3 genomické linie, fylogeneticky nejvzdálenější linie „**Africa 1**“ obsahuje kmen izolovaný v roce 1969 ve Středoafrické republice (11). Linie „**Africa 2**“ a „**Africa 3**“ obsahují kmeny především ze subsaharské Afriky a Španělska (2).

Cirkulace USUV v přírodě

V přírodě USUV cirkuluje mezi ptáky a ornitofilními komáry, nicméně neutralizační protilátky lze detekovat i u lidí, koní a jiných savců. Ptáky využívá virus jako hostitele amplifikátory (tzv. „amplifying hosts“), kteří významně přispívají k jeho následnému geografickému šíření. Je vhodné rozlišovat infekce migrujících ptáků, kteří mohou zavléci novou genomickou linii viru do vzdálených oblastí, a ptáků rezidentních, kteří udržují ohnisko nákazy na relativně malém prostoru. S nálezem RNA USUV v uhynulých netopýrech hvízdavých (*Pipistrellus pipistrellus*) v Německu a Belgii si klademe otázku, zda netopýři nemohou v Africe figurovat jako primární hostitelé viru vedle ptáků (12, 13). Komáry lze označit za vektory podílející se na cirkulaci agens mezi jednotlivými ptáky v dané

oblasti a také za pravděpodobné vektory nákazy mezi ostatními obratlovci, kteří figurují jako nahodilí, tzv. koneční hostitelé viru („dead-end hosts“). Se záchyty USUV se tak setkáváme především v nívních oblastech a v blízkosti mokřadů, kde se vyskytují jak ptáci, tak komáři v hojném počtu. Pro přečkání meziepidemických období mohou sloužit jak přezimující komáři (14) tak ptáci s dlouhotrvající virémií, podobně jako u WNV (15). Nálezy USUV u ptáků v jarních měsících svědčí pro úspěšné přezimování viru po období, kdy komáři nejsou aktivní (16). Alternativní cestou přenosu přímo mezi ptáky může být požírání uhynulých jedinců oportunními mrchožrouty podobně jako u WNV (17).

Komáři jako přenašeči USUV

Mimo *Culex neavei* (1) byl USUV v různých Afrických státech zachycen u komárů *Aedes minutus*, *Cx. perfuscus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. univittatus* (skupina), *Coquilleltidia aurites* nebo také *Mansonia africana* (1, 18). USUV však pravděpodobně bude rozšířen i v dalších afrických státech, jak naznačují např. pozdější záchyty USUV v druhu *Cx. quinquefasciatus* v Keni (19).

Tab. 1. Záchyt USUV v komárech na území Evropy.

Druh	Potenciál vektora	Stát (region)	Rok záchytu	Reference
<i>Aedes albopictus</i>	M	Itálie (Emilia-Romagna)	2009-12	(16, 22)
<i>Aedes caspius</i> *	M	Itálie (Emilia-Romagna)	2011, 2012	(16, 22)
		Itálie (Veneto)	2010	(22)
<i>Aedes detritus</i> *	P	Itálie (Molise)	2011	(22)
<i>Aedes japonicus</i>	M	Rakousko (Graz)	2018	(23)
<i>Anopheles maculipennis</i> s.l.	M	Itálie (Emilia-Romagna)	2010, 2011	(16, 22)
<i>Culex modestus</i>	P	Česká republika (Jižní Morava)	2013, 2016	(24, 25)
<i>Culex perexiguus</i>	M	Španělsko (Delta Guadalquivir)	2009	(26)
		Česká republika (Jižní Čechy)	2018	(25)
		Francie (Delta Camargue)	2015	27
		Chorvatsko (Zagreb)	2018	(28)
		Itálie (Emilia-Romagna)	2009-16	(16, 22, 29)
		Itálie (Friuli-Venezia-Giulia)	2012	(22)
		Itálie (Lazio)	2018	(30)
		Itálie (Liguria)	2014	(22)
		Itálie (Lombardie)	2009, 2011, 2013, 2014	(22)
		Itálie (Marche)	2011	(22)
		Itálie (Molise)	2011	(22)
		Itálie (Piedmont)	2009–11, 2014	(22, 31, 32)
		Itálie (Sardinia)	2011, 2013	(22)
		Itálie (Tuscany)	2010	(22)
		Itálie (Umbria)	2011	(22)
		Itálie (Veneto)	2009-13	(22)
		Německo (Emsdetten)	2016	(33)
		Německo (Freiburg)	2014	(33)
		Německo (Weinheim)	2010	(34)
		Rakousko (Linz, Graz)	2018	(23)
		Slovenská republika (Nitra)	2018	(35)
		Srbsko (Titel, Zrejanin)	2014	(36)
		Španělsko (Delta del Llobregat)	2006	(20)
		Švýcarsko (Ticino, Geneva)	2011, 2012	(37)
<i>Culiseta annulata</i>	P	Itálie (Molise)	2011	(22)

* někdy označovaný jako rod *Ochlerotatus*; V = ověřený vektor; P = pravděpodobný vektor; M = malá pravděpodobnost přenosu infekce

V Evropě byl USUV poprvé zachycen v komárech *Cx. pipiens* v roce 2006 ve Španělsku (20). Poté byl detekován také v dalších evropských zemích v druzích *Cx. modestus*, *Cx. perexiguus*, *Culiseta annulata*, *Anopheles maculipennis* sensu lato, *Aedes caspius*, *Ae. detritus* (někdy označováni jako *Ochlerotatus caspius* a *Oc. detritus*) a také v invazivních druzích komárů *Ae. albopictus* a *Ae. japonicus*. Záchyty USUV v evropských druzích komárů shrnuje tabulka „Tab. 1“. Nejvýznamnějším vektorem v Evropě je ornitofilní komár *Cx. pipiens*, v němž byla mezi jinými komáry RNA USUV zachycena nejčastěji a také se jedná o komára sajícího jak na ptácích, přirozených hostitelích viru, tak na lidech (21).

Přestože bylo zaznamenáno 17 druhů infikovaných komárů z celkem 7 rodů, neznamená toto zjištění vektorovou kompetenci zmiňovaných druhů pro USUV. Vektorová kompetence byla laboratorně ověřena pouze u *Cx. pipiens*, *Cx. torrentium* (38–40) a *Cx. neavei* (41). Avšak experimentálně bylo zjištěno, že severoamerické kmeny komárů *Cx. pipiens* pravděpodobně nejsou schopny USUV přenášet (42).

Ptáci jako rezervoároví hostitelé USUV

Mezi ptáky bývají fatální infekce USUV popisovány především u jedinců z řádu pěvců (*Passeriformes*) a sov (*Strigiformes*). Nejvíce známým druhem je kos černý (*Turdus merula*), což dokládají hromadné úhyny v Rakousku z roku 2001 (9, 43), v Itálii v roce 2009 (44), a v Německu v letech 2011–12 (45, 46). Retrospektivní analýzou bylo první vzplanutí USUV infekce mezi kosa v Evropě zachyceno v Itálii v roce 1996 (3). Mnoho úhynů kvůli infekci USUV bylo také prokázáno u sov držených v zajetí, především u puštíka vousatého (*Strix nebulosa*) (43, 45, 47–49). Domácí drůbež jako slepice či husy se zdají být vůči infekci USUV rezistentní (50, 51), i když i u nich byla zaznamenána sérokonverze specifických protilátek naznačující průběh infekce, avšak bez vážných následků (44).

V Africe byl USUV izolován ze zoborožce (*Bycanistes sharpii*), drozda rudozobého (*Turdus libonyanus*) a bulbula malého (*Andropadus virens*) (18). Současné záznamy infekcí USUV u ptáků v Evropě prokázaných detekcí virové RNA shrnuje tabulka „Tab. 2“.

Tab. 2. Záchyt RNA USUV v séru z aktivního odchytu nebo orgánů uhynulých ptáků na území Evropy. (3 stránky)

Druh	Stát	Rok záchytu	Počet pozitivních jedinců	Reference
Kos černý <i>Turdus merula</i>	Rakousko	2001–05, 2016	134 (o)	(43, 52, 53)
	Maďarsko	2005, 2006, 2010–16	20 (o)	(53, 54)
	Švýcarsko	2006, 2007	20 (o)	(47)
	Itálie	2007–11	20 (o)	(16, 44, 55–57)
	Česká republika	2011, 2012	3 (o)	(58)
	Německo	2011–18	342 (o), 44 (s)	(45, 46, 49, 59)
	Francie	2015	3 (o)	(60)
	Nizozemí	2016	27 (o)	(48)
	Belgie	2017, 2018	37 (o)	(12)
	Velká Británie	2020	5 (o)	(61)
Vrabec domácí <i>Passer domesticus</i>	Rakousko	2001, 2002	1 (o)	(43)
	Švýcarsko	2006, 2007	30 (o)	(47)
	Itálie	2011	1 (o)	(16)
	Německo	2011, 2018	1 (o), 1 (s)	(45, 46, 59)
	Belgie	2017, 2018	2 (o)	(12)
	Velká Británie	2020	1 (o)	(61)
Vlaštovka obecná <i>Hirundo rustica</i>	Rakousko	2001	1 (o)	(9)
	Rakousko	2003	1 (o)	(52)
Drozd zpěvný <i>Turdus philomelos</i>	Španělsko	2012	2 (o)	(62)
	Německo	2012, 2016–18	3 (o), 2 (s)	(46, 49, 59)
	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)

Druh	Stát	Rok záchytu	Počet pozitivních jedinců	Reference
Červenka obecná	Rakousko	2003	1 (o)	(52)
	Švýcarsko	2006, 2007	2 (o)	(47)
Brhlík lesní	Rakousko	2003	1 (o)	(52)
Sýkora koňadra	Rakousko	2003	2 (o)	(52)
Sýkora modřinka	Švýcarsko	2006, 2007	1 (o)	(47)
Zvonek zelený	Švýcarsko	2006	1 (o)	(47)
Straka obecná	Itálie	2008–11	21 (o)	(16, 44, 56, 57)
	Belgie	2017, 2018	2 (o)	(12)
Špaček obecný	Itálie	2009, 2011	3 (o)	(16,56)
	Německo	2011, 2016–18	4 (o), 2 (s)	(45, 46, 49, 59)
	Maďarsko	2016	1 (o)	(53)
Špaček zlatoprsý	Německo	2017	1 (o)	(59)
Sojka obecná	Itálie	2009–11	4 (o)	(16, 56, 57)
	Maďarsko	2016	1 (o)	(53)
	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Kanár domácí	Německo	2011	2 (o)	(45, 46)
	Německo	2018	1 (s)	(59)
Hýl obecný	Belgie	2012	1 (o)	(63)
	Německo	2018	2 (s)	(59)
Drozd kvičala	Maďarsko	2015	1 (o)	(53)
Vrána černá	Německo	2017	1 (s)	(59)
Kavka obecná	Německo	2017	1 (s)	(59)
Střízlík obecný	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Pěnkava obecná	Belgie	2017, 2018	2 (o)	(12)
Konipas bílý	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Hýl škraboškový	Německo	2018	1 (s)	(59)
Puštík vousatý	Rakousko	2001, 2002	1 (o)	(43)
	Itálie	2006	1 (o)	(55)
	Švýcarsko	2006–09	5 (o)	(47)
	Německo	2011, 2013, 2016–18	17 (o), 2 (s)	(45, 46, 49, 59)
	Nizozemí	2016	6 (o)	(48)
Puštík obecný	Belgie	2017, 2018	2 (o)	(12)
Sýc rousný	Švýcarsko	2006, 2007	4 (o)	(47)
	Itálie	2007	2 (o)	(55)
Kulíšek nejmenší	Švýcarsko	2006	1 (o)	(47)
Sovice krahujová	Švýcarsko	2006–09	2 (o)	(47)
	Německo	2013, 2017	3 (o)	(46, 59)
Kalous ušatý	Itálie	2010	2 (o)	(57)
	Německo	2012	1 (o)	(46)
Sovice sněžní	Německo	2016	1 (o)	(49)
Sýček obecný	Německo	2018	1 (s)	(59)
Racek středomořský	Itálie	2009	1 (o)	(56)
	Itálie	2011	1 (o)	(16)
Rybák inka	Německo	2012	2 (o)	(46)
Lelek lesní	Itálie	2010	1 (o)	(57)
Orebice rudá	Itálie	2010	1 (o)	(57)
Hrdlička zahradní	Itálie	2010, 2011	2 (o)	(16, 57)

Druh	Stát	Rok záchytu	Počet pozitivních jedinců	Reference
Holub domácí <i>Columba livia domestica</i>	Německo	2015	1 (s)	(49)
	Belgie	2017, 2018	12 (o)	(12)
Orel volavý <i>Aquila clanga</i>	Itálie	2011	1 (o)	(16)
Ledňáček říční <i>Alcedo atthis</i>	Německo	2011	2 (o)	(45, 46)
Vlha pestrá <i>Merops apiaster</i>	Itálie	2011	1 (o)	(16)
Volavka popelavá <i>Ardea cinerea</i>	Itálie	2011	1 (o)	(16)
Žluna zelená <i>Picus viridis</i>	Itálie	2011	1 (o)	(16)
	Německo	2012	1 (o)	(46)
	Belgie	2012	1 (o)	(63)
Strakapoud velký <i>Dendrocopos major</i>	Německo	2017	1 (s)	(59)
	Belgie	2017, 2018	2 (o)	(12)
Husice nilská <i>Alopochen aegyptiaca</i>	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Kachna divoká <i>Anas platyrhynchos</i>	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Berneška velká <i>Branta canadensis</i>	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Labuť velká <i>Cygnus olor</i>	Belgie	2017, 2018	1 (o)	(12)
Rorýs obecný <i>Apus apus</i>	Belgie	2017, 2018	3 (o)	(12)
Poštolka obecná <i>Falco tinnunculus</i>	Německo	2018	1 (s)	(59)

(o) = RNA izolována z orgánů, (s) = RNA izolována z krevního séra

V evropských zoologických zahradách byly prokázány protilátky specifické pro USUV u cizokrajních ptáků jako zoborožec havraní (*Bucorvus abyssinicus*), nandu pampový (*Rhea americana*), emu hnědý (*Dromaius novaehollandiae*), ibis rudý (*Eudocimus ruber*), plameňák karibský (*Phoenicopterus ruber*), marabu africký (*Leptoptilos crumeniferus*), tučňák Humboldtův (*Spheniscus humboldti*), ledňák obrovský (*Dacelo novaeguineae*), páv korunkatý (*Pavo cristatus*), ale i u zástupců kachnovitých (*Branta ruficollis*, *Tadorna ferruginea*, *Tachyeres pteneres*) nebo čápa bílého (*Ciconia ciconia*) a také sov (*Bubo bubo*, *Bubo scandiacus*, *Strix uralensis*) (64, 65).

USUV specifické protilátky byly nalezeny u mnoha dalších druhů ptáků. Např. v roce 2005 byla v Rakousku provedena rozsáhlá sérologická studie, jež prokázala protilátky proti USUV u řady migrujících ptáků jako jsou poštolka obecná (*Falco tinnunculus*), rákosník obecný (*Acrocephalus scirpaceus*), vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), jiříčka obecná (*Delichon urbicum*) nebo pěnice hnědokřídla (*Sylvia communis*) (66). V roce 2006 byly zjištěny specifické protilátky k USUV u racka chechtavého (*Chroicocephalus ridibundus*) v Polsku (67), a v letech 2006 a 2011 u několika lysek obecných (*Fulica atra*) na Moravě (68, 69). Je pravděpodobné, že USUV dokáže infikovat široké spektrum ptactva a utvrzuje teorii o geografickém šíření tažnými ptáky. Rakouská studie zaznamenala výraznou změnu u sérologicky pozitivních jedinců, kdy v letech 2003 a 2004 byly specifické protilátky detekovány pouze u méně než 10 % jedinců, v letech 2005 a 2006 tomu tak bylo u více než 50 % jedinců (66). Ve spojitosti s poklesem úhynů ptactva mezi roky 2003, 2004 a 2005 (záchyt USUV RNA), data poukazují na možný rozvoj kolektivní imunity (52).

Výskyt USUV u dalších druhů obratlovců

Specifické protilátky proti USUV byly detekovány i u savců, a to především u koní a psovitých šelem. U koní byl USUV sérologicky prokázán v Itálii (44), Srbsku (70), Chorvatsku (71), Španělsku (72), Polsku (73), Maroku (74) a Tunisku (75). U psů byly protilátky nalezeny v Itálii (76) a Maroku (74), ale v rámci WNV monitoringu byly detekovány také u čtyř psů hyenovitých (*Lycaon pictus*), psa hřivnatého (*Chrysocyon brachyurus*), vlka iberského (*Canis lupus signatus*) a lva perského (*Panthera leo persica*), chovaných ve francouzských zoo (65). Ve volné přírodě i oborách byl výskyt USUV sérologicky potvrzen u jelena evropského (*Cervus elaphus*) na území Španělska (77), prasete divokého (*Sus scrofa*) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*) v Srbsku a ve Francii (78, 79). RNA USUV se podařilo prokázat v uhynulých netopýrech hvízdavých (*Pipistrellus pipistrellus*) v Německu a Belgii (12, 13). V Senegalu byl USUV izolován z hlodavců; krysy mnohobradavkové (*Mastomys natalensis*), krysy obecné (*Rattus rattus*) a jednoho zástupce rejskovitých (*Crocidura* sp.) (80), sérologicky byl USUV zachycen u pěti veverek (*Sciurus carolinensis*) v Itálii (81).

Geografické rozšíření USUV

Do roku 2003 docházelo velmi pravděpodobně k omezenému šíření USUV v Africe. V roce 2003 byl však zaznamenán obrovský nárůst pozitivních vzorků, kdy bylo zachyceno 141 pozitivních jedinců komára *Cx. neavei* v Senegalské oblasti Barkenji (18). V Africe byl USUV izolován také z hlodavců a rejska (linie „Africa 2“) (80) a sérologicky byl výskyt USUV potvrzen v Tunisku a Maroku (74, 75). Mimo Evropu a Afriku byl USUV prokázán také v severním Izraeli v letech 2014 až 2015 u komárů *Cx. pipiens*, *Cx. perexigus* a *Ae. albopictus*. Při porovnání sekvencí NS5 genu byla stanovena shoda s kmeny z Německa z roku 2016 náležícími do linie „Europe 5“ (82).

Na základě statistického porovnání genomických linií USUV a hlavních tras tažných ptáků mezi Afrikou a Evropou lze usuzovat, že se poprvé USUV dostal z Afriky do Evropy, konkrétně Španělska v padesátých či šedesátých letech 20. století, trasou „East Atlantic“. Podruhé byl zavlečen mezi roky 1970 a 1990 z Afriky do střední Evropy trasou „Black Sea/Mediterranean“. Třetí zavlečení USUV opět do Španělska se odhaduje na období okolo roku 1996 (2). Další možnost introdukce USUV může představovat transport infikovaných komárů lodní, leteckou či nákladní dopravou. USUV byl detekován v Rakousku v přezimujících komárech *Cx. pipiens* (14), tudíž lze usuzovat, že představuje ukázkou úspěšné introdukce a usídlení „tropického“ arboviru v podmínkách mírného pásma. Stálou cirkulaci viru ve střední Evropě prokazuje i velmi blízká genetická podobnost jednotlivých kmenů USUV z Německa, Rakouska, Švýcarska, Maďarska a Česka (45, 83). USUV je nyní rozšířen po celé Evropě a v roce 2020 byla poprvé zachycena jeho RNA také na území Velké Británie (61), kde od roku 2002 byly detekovány pouze specifické protilátky u ptáků (84).

Výskyt USUV v České republice

První nepřímé průkazy USUV v České republice byly zaznamenány při výzkumu WNV, kdy byla pozorována zkřížená reaktivita mezi těmito dvěma příbuznými flaviviry. V květnu roku 2006 byl na jižní Moravě analyzován jedinec lysky černé (*Fulica atra*), jež vykazoval vyšší titr protilátek proti USUV než WNV. U dalšího jedince byl stanoven stejný titr protilátek pro oba viry (68). K první izolaci USUV v České republice došlo v roce 2011, kdy byl v Brně objeven mrtvý jedinec kosa černého (*Turdus merula*). Specifická PCR ze srdce a mozku potvrdila USUV infekci a současně byla negativní na WNV (58). Tento vzorek se proti původnímu vzorku „Vienna-2001“ (9) při porovnání sekvencí pro proteiny E (částečná sekvence) a NS1 lišil v 5 z 1 839 nukleotidů (99,7 % shoda). Při porovnání částečné sekvence pro NS5 a 3'UTR se vzorkem „Budapest-2005“ (54) byl český vzorek dokonce identický v celé své délce (58). Další dva USUV pozitivní vzorky původem z kosa černého byly v Brně objeveny v roce 2012 (58). Podobně jako v roce 2006 byly protilátky proti USUV prokázány v lyskách černých (*Fulica atra*) na Moravě i v roce 2015, kdy bylo shledáno pomocí neutralizačního testu 9 pozitivních vzorků z celkového počtu 146 jedinců (69). Lysky patří mezi stěhovavé ptáky, jež mimo oblast Moravy hnízdí například i v Polsku a Pobaltí, což může vést k dalšímu šíření USUV v Evropě.

Rozsáhlý monitoring komárů *Cx. modestus*, čítající 61 770 samic rozdělených do 1 243 směsí, odchycených mezi lety 2010–2014 na jihomoravských rybnících měl za cíl zdokumentovat výskyt WNV a USUV v rákosinném ekosystému. RNA USUV byla detekována ve směsi ze srpna 2013. Virus byl izolován a sekvenován (bylo analyzováno 38 % genomu na pěti místech o celkové délce 4 218 nukleotidů). Oproti genomu „Vienna-2001“ (9) bylo objeveno 12 substitucí a shoda v 99,7 % sekvence. Bylo provedeno i porovnání s linií izolovanou v roce 2011 z kosa černého v Brně (58), shodující se při porovnání v 99,78 % sekvence. Jde o první detekci USUV v komárech *Cx. modestus* (24). K dalšímu potvrzení detekce RNA USUV na našem území došlo v letech 2016 až 2019, kdy byly zkoumány uhynulí jedinci kosa černého z Prahy (z roku 2018), Brna (2017–2019) a Českých Budějovic (2017). Z celkového počtu 55 kosů černých bylo 20 (36 %) pozitivních na USUV pomocí molekulárních metod a z 10 vzorků byl virus izolován na savčích PS buňkách. Součástí byla i pozitivní detekce USUV ve dvou směsích komárů, jedné směsi *Cx. modestus* z jižní Moravy, jedné směsi *Cx. pipiens* z jižních Čech a jednom vzorku kosa černého z Břeclavi (25). Spojitá nukleotidová sekvence byla získána z 18 pozitivních kosů černých a obou pozitivních směsí komárů. Ty byly podrobeny fylogenetické analýze, kdy byly vzorky z Prahy z roku 2018 přiřazeny do linie „Europe 3“, zatímco většina vzorků z Brna (2017, 2018) byla přiřazena do linie „Europe 1“. Jeden vzorek USUV z Brna a sekvence získané z obou komářích směsí byly přiřazeny do linie „Europe 2“. Samostatný pozitivní vzorek kosa černého z Břeclavi byl podle sekvencí pro NS4B/NS5 zařazen do linie „Africa 3“ s původem v západní Evropě (25).

Onemocnění ptáků a patologie USUV

USUV je primárně patogenní pro ptáky s nejvyšší prokázanou virulencí pro kosy černé (*Turdus merula*), puštíky vousaté (*Strix nebulosa*) nebo vrabce domácí (*Passer domesticus*). Virová nálož způsobuje patologické změny v řadě orgánů a detekce viru je možná v mozku, játrech, slezině nebo srdci (45). Hlavním makroskopickým nálezem u ptáků bývá hepatosplenomegalie. Histologický nález zahrnuje nekrózu CNS, léze v myokardu a koagulační nekrózy jater a sleziny. U nakažených ptáků lze často pozorovat fyzickou slabost, vyhubnutí až kachexii. Mrtví ptáci mají často prázdné žaludky a enteritidu. Méně častá je patologie na plicích, plicní edém či hemoragie. Současně byla prokázána i spojitost mezi nákazou USUV a zvýšeným počtem intestinálních parazitů, jakými jsou tasemnice, hlístice a vrtejši (43). U týden starých sajících myší po intraperitoneální inokulaci USUV byly prokázány deprese, dezorientace, paraplegie a po 6–11 dnech pak paralýza a kóma. Při histologickém vyšetření byla nalezena apoptóza neuronů, především v mozковém kmeni, dále pak v bílé hmotě mozečku, v prodloužené míše a míše, doprovázená primární demyelinizací. Stejně jako ostatní flaviviry se tedy USUV prokázal jako neurotropní, nicméně lze mezi jednotlivými liniemi rozeznávat odlišné virulentní profily a např. linie „Europe 2“ vykazuje atypický cytopatický efekt, nejvyšší mortalitu *in vivo* a mnohem lépe perzistuje v mikroglii a endoteliích mozku (9, 85).

Při *in vitro* kultivaci USUV je cytopatický efekt na VERO buňkách pozorován po 24–48 hodinách, ale také na dalších buněčných kulturách, jakými jsou prasečí embryonální buňky PK-15 nebo husí embryonální fibroblasty. Virová replikace byla v řadě dalších savčích buněk (například lidské HeLa nebo psí MDCK) prokázána pomocí imunohistochemie. Naopak kuřecí embryonální fibroblasty a kuřecí embrya se ukázala k infekci USUV rezistentní (86).

Infekce USUV u lidí

Poprvé byl případ USUV infekce u člověka popsán ve Středoafrické republice v roce 1981 a poté v Burkině Faso v roce 2004 (18). V obou případech šlo však o lehký průběh nákazy provázený horečkou a vyrážkou. Od roku 2009 byla nákaza lidí USUV prokázána v řadě evropských států: Itálie (30, 87–93), Chorvatsko (28, 94), Německo (95), Francie (96), Rakousko (97, 98), Nizozemí (99) a Maďarsko (100). Jde však především o záchyty u zdravých dárců krve nebo vzácně u imunokompromitovaných pacientů s vážnějším průběhem infekce. Dosavadní zjištěné infekce u lidí s prokázanou RNA USUV či přímo izolací agens shrnuje tabulka „Tab. 3“. V České republice byla lidská nákaza tímto virem dokumentována pouze sérologicky v roce 2018 u jednoho pacienta s podezřením na meningoencefalitidu (101).

Získaná data indikují, že USUV mezi lidmi cirkuluje především v oblastech s vyšším výskytem vektorů. I když infekce virem neurologické komplikace způsobuje velice vzácně, a to převážně u imunokompromitovaných pacientů, zůstává důležitým patogenním arbovirem, který je nutno vyšetřovat u dárců krve, a to zejména v oblastech s potvrzenou cirkulací viru nebo u jedinců s cestovatelskou anamnézou.

Diagnostika USUV infekce

Diagnostický průkaz USUV infekce se provádí u pacientů s infekcí CNS s podezřením na arbovirózy nebo při diferenciální diagnostice nejasných horečnatých stavů (zejména u jedinců v endemických oblastech exponovaných komáry) a také formou skrínungu dárců krve. USUV infekci lze diagnostikovat pomocí detekce specifických protilátek, virové RNA nebo izolací viru na buněčné kultuře či sající myši, dále potvrzené molekulárními metodami. Většina záchytů RNA USUV probíhá skrínungem krevních vzorků zdravých dárců krve automatizovaným testem nukleových kyselin na WNV, tzv. cobas WNV metodou (30). Často se po přezkoumání positivity vzorku na RNA WNV specifickou RT-PCR ukázalo, že jde o vzorky pozitivní na USUV či případně na oba flaviviry (92, 98). Průběh infekce může být zaznamenán testem krevního séra na protilátky proti USUV metodou ELISA, nepřímou imunofluorescenční metodou (IFA), mikroneutralizační metodou (mNTA) nebo plak redukčním neutralizačním testem (PRNT). Využití sérologie však naráží na problém zkřížené reaktivity protilátek vůči geneticky podobným flavivirům cirkulujícím v dané oblasti (USUV, WNV nebo i TBEV), proto je v případě pozitivního nálezu nutné potvrdit přítomnost USUV pomocí specifického PRNT. Sérokonverze či čtyřnásobný a vyšší nárůst titru USUV-specifických protilátek v párových vzorcích (v intervalu odběru 10–15 dní) potom indikuje probíhající infekci (92).

Tab. 3. Přehled detekce RNA/izolace USUV u lidí.

Stát	Rok záchytu	Počet pozitivních / testovaných	Vzorek	Diagnóza	Reference
Středoafriická rep.	1981	1	Krev	Eruptivní horečka	(18)
Burkina Faso	2004	1	Krev	Horečka a žloutenka	(18)
Itálie	2009	1	CSF	Meningoencefalitida	(87)
	2009	1	Krev	Encefalitida	(88)
	2008–09	3/44	CSF	Meningoencefalitida	(89)
	2008–09	8/306	CSF	Meningoencefalitida	(90)
	2008–11	2/609	Krev	Zdraví	(90)
	2018	1/44	Krev	Zdraví	(91)
	2016–18	25/73964	Krev	Zdraví	(92)
	2017–18	9	Krev	Zdraví	(30)
	2018	8/1967	Krev + moč	Podezření na arbovirózu	(93)
	2013	3/95	Krev	Meningoencefalitida	(94)
Chorvatsko	2018	3/178	Krev + moč	Neuroin vazivní infekce	(28)
Německo	2016	1/13023	Krev	Zdraví	(95)
Nizozemí	2018	7/12040	Krev	Zdraví	(99)
Francie	2016	1/666	CSF	Idiopatická paralýza obličeje	(96)
Rakousko	2016	1/70864	Krev	Zdraví	(97)
	2017	6/12047	Krev	Zdraví	(97)
	2018	18/31598	Krev	Zdraví	(98)
Maďarsko	2018	1	Krev	Aseptická meningitida	(100)

CSF = cerebrospinální tekutina

Léčba a prevence USUV infekce

V současnosti neexistuje žádná dostupná specifická antivirová léčba USUV infekce. Podobně jako u WNV ani u USUV není komerčně dostupná humánní vakcína.

Závěr

Od objevu USUV v Africe v polovině minulého století se tento patogen rozšířil na Blízký východ i velkou část Evropy. I když nejsou záznamy o úhynech ptactva v Africe, v Evropě je situace vnímána zcela opačně. Jde primárně o veterinárně významný arbovirus způsobující hromadné úhyny pěvců a sov. V Evropě nyní cirkuluje 6 genomických linií, prokazatelně neurotropních, přičemž linie „Europe 2“ je nejvíce patogenní. Nelze opomenout ani riziko USUV infekce pro lidi a jiné savce. Do roku 2021 bylo celosvětově zaznamenáno celkem 101 potvrzených nálezů USUV u lidí.

Vzhledem k tomu, že je potvrzena cirkulace viru v oblastech střední Evropy a současně představuje zdravotní riziko pro člověka, měly by být z pohledu surveillance prověřovány hromadné úhyny ptáků a také testována krev dárců na případný výskyt tohoto agens. Významnou vlastností USUV je genetická podobnost s WNV, která je reflektována zkříženou reaktivitou protilátek a nelze tudíž potvrdit sérologický nález USUV protilátek bez potvrzení virus neutralizačním testem či detekcí virové RNA pomocí specifické RT-PCR. USUV navíc sdílí s WNV vektory, hostitele a šíří se ve stejných či podobných typech ekosystémů.

Bohužel malé množství lidských případů není dostatečně silným argumentem pro další vývoj specifických antivirálních léčiv či dokonce vakcinaci. Vakcinace ptactva, a to především sov či dravců v chovatelských stanicích a zoo by jistě napomohla prevenci masivních úhynů i šíření viru. Vzhledem k trendu šíření USUV je nutné podpořit a zefektivnit programy propojující systémy lidské i veterinární medicíny s detekcí patogenů a monitoringem jejich vektorů i hostitelů, např. začleněním přístupu „One Health“.

Funding

The study was financially supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (Reg. No. NV19-09-00036). All rights reserved.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Adherence to Ethical Standards

This article does not contain any studies involving animals performed by any of the authors. This article does not contain any studies involving human participants performed by any of the authors.

References

1. Williams MC, Simpson DIH, Haddow AJ, et al. The Isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 1964;58(3):367–374.
2. Engel D, Jöst H, Wink M, et al. Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *mBio*. 2016;7(1):e01938-15.
3. Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, et al. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(2):274–277.
4. Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, et al. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001. *Virology*. 2004;328(2):301–310.
5. Nikolay B, Fall G, Boye CSB, et al. Validation of a structural comparison of the antigenic characteristics of Usutu virus and West Nile virus envelope proteins. *Virus Research*. 2014;189:87–91.
6. Smit JM, Moesker B, Rodenhuis-Zybert I, et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. *Viruses*. 2011;3(2):160–171.
7. Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection*. 2017;19(7–8):382–387.
8. Poidinger M, Hall RA, Mackenzie JS. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the *Flavivirus* genus. *Virology*. 1996;218(2):417–421.
9. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, et al. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2002;8(7):652–656.
10. Cadar D, Lühken R, van der Jeugd H, et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2017;22(4):pii=30452.
11. Nikolay B, Dupressoir A, Firth C, et al. Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa. *Virology Journal*. 2013;10:217.
12. Benzarti E, Sarlet M, Franssen M, et al. Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of virus endemization and ongoing introduction events. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2020;20(1):43–50.
13. Cadar D, Becker N, Campos R de M, et al. Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(10):1771–1773.
14. Pfeffer M, Dobler G. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*. 2010;3(1):35.
15. Nemeth N, Young G, Ndaluka C, et al. Persistent West Nile virus infection in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Archives of Virology*. 2009;154(5):783–789.
16. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, et al. Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PloS One*. 2013;8(5):e63978.
17. Komar N, Langevin S, Hinten S, et al. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9(3):311–322.
18. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, et al. Usutu virus in Africa. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2011;11(11):1417–1423.

19. Ochieng C, Lutomiah J, Makio A, et al. Mosquito-borne arbovirus surveillance at selected sites in diverse ecological zones of Kenya; 2007 - 2012. *Virology Journal*. 2013;10:140.
20. Busquets N, Alba A, Allepuz A, et al. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2008;14(5):861–863.
21. Rizzoli A, Bolzoni L, Chadwick EA, et al. Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasites & Vectors*. 2015;8:213.
22. Mancini G, Montarsi F, Calzolari M, et al. Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy. *Veterinaria Italiana*. 2017;53(2):97–110.
23. Camp JV, Kolodziejek J, Nowotny N. Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus. *Parasites & Vectors*. 2019;12(1):46.
24. Rudolf I, Bakonyi T, Šebesta O, et al. Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. *Parasites & Vectors*. 2015;8(1):520.
25. Hönig V, Palus M, Kaspar T, et al. Multiple Lineages of Usutu Virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019). *Microorganisms*. 2019;7(11):568.
26. Vázquez A, Ruiz S, Herrero L, et al. West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008-2009. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;85(1):178–181.
27. Eiden M, Gil P, Ziegler U, et al. Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018;61:151–154.
28. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Sabadi D, et al. Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the “One health” context, 2018. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2019;66(5):1946–1957.
29. Puggioli A, Bonilauri P, Calzolari M, et al. Does *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) play any role in Usutu virus transmission in Northern Italy? Experimental oral infection and field evidences. *Acta Tropica*. 2017;172:192–196.
30. Carletti F, Colavita F, Rovida F, et al. Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2019;24(3):pii=1800649.
31. Cerutti F, Giacobini M, Mosca A, et al. Evidence of mosquito-transmitted flavivirus circulation in Piedmont, north-western Italy. *Parasites & Vectors*. 2012;5:99.
32. Rizzo F, Cerutti F, Ballardini M, et al. Molecular characterization of flaviviruses from field-collected mosquitoes in northwestern Italy, 2011-2012. *Parasites & Vectors*. 2014;7:395.
33. Scheuch D, Schäfer M, Eiden M, et al. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected in Germany, 2011–2016. *Viruses*. 2018;10(7):389.
34. Jöst H, Bialonski A, Maus D, et al. Isolation of Usutu virus in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;85(3):551–553.
35. Čabanová V, Šikutová S, Straková P, et al. Co-circulation of West Nile and Usutu flaviviruses in mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses*. 2019;11(7):639.
36. Kemenesi G, Buzás D, Zana B, et al. First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014. *Infection, Genetics and Evolution*. 2018;63:58–61.
37. Engler O, Savini G, Papa A, et al. European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013;10(10):4869–4895.
38. Fros JJ, Miesen P, Vogels CB, et al. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health (Amsterdam, Netherlands)*. 2015;1:31–36.
39. Holicki CM, Scheuch DE, Ziegler U, et al. German *Culex pipiens* biotype *molestus* and *Culex torrentium* are vector-competent for Usutu virus. *Parasites & Vectors*. 2020;13(1):625.
40. Wang H, Abbo SR, Visser TM, et al. Competition between Usutu virus and West Nile virus during simultaneous and sequential infection of *Culex pipiens* mosquitoes. *Emerging Microbes & Infections*. 2020;9(1):2642–2652.
41. Nikolay B, Diallo M, Faye O, et al. Vector competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;86(6):993–996.
42. Bates TA, Chuong C, Rai P, et al. American *Aedes japonicus japonicus*, *Culex pipiens pipiens*, and *Culex restuans* mosquitoes have limited transmission capacity for a recent isolate of Usutu virus. *Virology*. 2021;555:64–70.

43. Chvala S, Kolodziejek J, Nowotny N, et al. Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *Journal of Comparative Pathology*. 2004;131(2–3):176–185.
44. Savini G, Monaco F, Terregino C, et al. Usutu virus in Italy: an emergence or a silent infection? *Veterinary Microbiology*. 2011;151(3–4):264–274.
45. Becker N, Jöst H, Ziegler U, et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PloS One*. 2012;7(2):e32604.
46. Ziegler U, Jöst H, Müller K, et al. 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 and Zoonotic Diseases*. 2015;15(8):481–488.
47. Steinmetz HW, Bakonyi T, Weissenböck H, et al. 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. *Veterinary Microbiology*. 2011;148(2–4):207–212.
48. Rijks J, Kik M, Slaterus R, et al. Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(45):pii=30391.
49. Michel F, Fischer D, Eiden M, et al. West Nile virus and Usutu virus monitoring of wild birds in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018;15(1):171.
50. Chvala S, Bakonyi T, Hackl R, et al. Limited pathogenicity of Usutu virus for the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* 2005;34(5):392–395.
51. Chvala S, Bakonyi T, Hackl R, et al. Limited pathogenicity of usutu virus for the domestic goose (*Anser anser f. domestica*) following experimental inoculation. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 2006;53(4):171–175.
52. Chvala S, Bakonyi T, Bukovsky C, et al. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Veterinary Microbiology*. 2007;122(3–4):237–245.
53. Bakonyi T, Erdélyi K, Brunthaler R, et al. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016. *Emerging Microbes & Infections*. 2017;6(1):1–7.
54. Bakonyi T, Erdélyi K, Ursu K, et al. Emergence of Usutu virus in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007;45(12):3870–3874.
55. Manarolla G, Bakonyi T, Gallazzi D, et al. Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Veterinary Microbiology*. 2010;141(1–2):159–163.
56. Tamba M, Bonilauri P, Bellini R, et al. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2011;11(5):551–557.
57. Calzolari M, Gaibani P, Bellini R, et al. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna Region (Italy) in 2010. *PloS One*. 2012;7(5):e38058.
58. Hubálek Z, Rudolf I, Čapek M, et al. Usutu virus in blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011–2012. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2014;61(3):273–276.
59. Michel F, Sieg M, Fischer D, et al. Evidence for West Nile virus and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses*. 2019;11(7):674.
60. Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, et al. Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(12):2225.
61. Folly AJ, Lawson B, Lean FZ, et al. Detection of Usutu virus infection in wild birds in the United Kingdom, 2020. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2020;25(41):pii=2001732.
62. Höfle U, Gamino V, de Mera IGF, et al. Usutu virus in migratory song thrushes, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(7):1173–1175.
63. Garigliany M-M, Marlier D, Tenner-Racz K, et al. Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*. 2014;199(1):191–193.
64. Buchebner N, Zenker W, Wenker C, et al. Low Usutu virus seroprevalence in four zoological gardens in central Europe. *BMC veterinary research*. 2013;9:153.
65. Constant O, Bollore K, Clé M, et al. Evidence of exposure to USUV and WNV in zoo animals in France. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2020;9(12):1005.
66. Meister T, Lussy H, Bakonyi T, et al. Serological evidence of continuing high Usutu virus (*Flaviviridae*) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Veterinary Microbiology*. 2008;127(3–4):237–248.

67. Hubálek Z, Wegner E, Halouzka J, et al. Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral Immunology*. 2008;21(2):247–254.
68. Hubálek Z, Halouzka J, Juřicová Z, et al. Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in Southern Moravia (Czech Republic). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2008;8(5):659–666.
69. Straková P, Šikutová S, Jedličková P, et al. The common coot as sentinel species for the presence of West Nile and Usutu flaviviruses in Central Europe. *Research in Veterinary Science*. 2015;102:159–161.
70. Lupulovic D, Martín-Acebes MA, Lazic S, et al. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011;11(9):1303–1305.
71. Barbic L, Vilibic-Cavlek T, Listes E, et al. Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2013;13(10):772–774.
72. Vanhomwegen J, Beck C, Desprès P, et al. Circulation of zoonotic arboviruses in equine populations of Mallorca Island (Spain). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2017;17(5):340–346.
73. Bażanów B, Jansen van Vuren P, Szymański P, et al. A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses*. 2018;10(2):87.
74. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, et al. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection*. 2016;144(9):1857–1864.
75. Ben Hassine T, De Massis F, Calistri P, et al. First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2014;61(5):385–389.
76. Montagnaro S, Piantedosi D, Ciarcia R, et al. Serological evidence of mosquito-borne flaviviruses circulation in hunting dogs in Campania region, Italy. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2019;19(2):142–147.
77. García-Bocanegra I, Paniagua J, Gutiérrez-Guzmán AV, et al. Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. *BMC veterinary research*. 2016;12(1):249.
78. Escribano-Romero E, Lupulović D, Merino-Ramos T, et al. West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary Microbiology*. 2015;176(3–4):365–369.
79. Bournez L, Umhang G, Faure E, et al. Exposure of wild ungulates to the Usutu and tick-borne encephalitis viruses in France in 2009–2014: Evidence of undetected flavivirus circulation a decade ago. *Viruses*. 2019;12(1):10.
80. Diagne MM, Ndione MHD, Di Paola N, et al. Usutu virus isolated from rodents in Senegal. *Viruses*. 2019;11(2):181.
81. Romeo C, Lecollinet S, Caballero J, et al. Are tree squirrels involved in the circulation of flaviviruses in Italy? *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(5):1372–1376.
82. Mannasse B, Mendelson E, Orshan L, et al. Usutu virus RNA in mosquitoes, Israel, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2017;23(10):1699–1702.
83. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, et al. Epidemiology of Usutu virus: The European scenario. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2020;9(9):699.
84. Buckley A, Dawson A, Moss SR, et al. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *The Journal of General Virology*. 2003;84(Pt 10):2807–2817.
85. Clé M, Constant O, Barthelemy J, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. *Journal of Neuroinflammation*. 2021;18(1):11.
86. Bakonyi T, Lussy H, Weissenböck H, et al. *In vitro* host-cell susceptibility to Usutu virus. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(2):298–301.
87. Pecorari M, Longo G, Gennari W, et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August–September 2009. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2009;14(50):15–16.
88. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2009;14(50):17–18.
89. Cavrini F, Della Pepa ME, Gaibani P, et al. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;50(3):221–223.
90. Grottola A, Marcacci M, Tagliazucchi S, et al. Usutu virus infections in humans: A retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2017;23(1):33–37.

91. Caracciolo I, Mora-Cardenas E, Aloise C, et al. Comprehensive response to Usutu virus following first isolation in blood donors in the Friuli Venezia Giulia region of Italy: Development of recombinant NS1-based serology and sensitivity to antiviral drugs. Bowen RA, ed. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2020;14(3):e0008156.
92. Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, et al. West Nile or Usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. Viruses. 2020;12(2):157.
93. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, et al. Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2019;24(47):pii=1900180.
94. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, et al. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August–September 2013: clinical and laboratory features. Journal of NeuroVirology. 2015;21(1):92–97.
95. Cadar D, Maier P, Müller S, et al. Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2017;22(14):pii=30501.
96. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, et al. Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. Emerging Infectious Diseases. 2018;24(5):875–878.
97. Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, et al. Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 - Raising awareness for diagnostic challenges. Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2017;22(41):pii=17-00644.
98. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, et al. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2018;23(43):7–12.
99. Zaaijer HL, Slot E, Molier M, et al. Usutu virus infection in Dutch blood donors. Transfusion. 2019;59(9):2931–2937.
100. Nagy A, Mezei E, Nagy O, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin. 2019;24(28):pii=1900038.
101. Zelená H, Kleinerová J, Šikutová S, et al. First Autochthonous West Nile Lineage 2 and Usutu Virus Infections in Humans, July to October 2018, Czech Republic. Pathogens. 2021; 10(6):651.