

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI

**ZAVOD ZA ZNANSTVENOISTRAŽIVAČKI I UMJETNIČKI RAD,
HAZU VELIKA GORICA**



**MRACLINSKA BOLEST KONJA – ŠTO JE
STVARAN UZROK BOLESTI?**

Pojavnost i širenje virusa Zapadnog Nila u konja i ljudi na području Hrvatske

Ljubo Barbić¹, Tatjana Vilibić Čavlek², Josip Madić^{1,3}

¹ prof. dr. sc. Ljubo BARBIĆ, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

² prof. dr. sc. Tatjana VILIBIĆ ČAVLEK, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

³ akademik Josip MADIĆ, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti

Uvod

Virus Zapadnog Nila (VZN) u svom prirodnom ciklusu kruži između ptica koje su primarni domaćin, dok su glavni prijenosnici komarci roda *Culex*. Inficirani komarci mogu virus sporadično prenijeti na slučajne domaćine (različite druge vrste životinja sisavaca, ali i ljude). Od slučajnih domaćina bolest se klinički očituje, s mogućim letalnim ishodom, u konja i ljudi.

Bolest je desetljećima poznata i pojavljivala se na području Afrike s povremenim izbijanjima ograničenih epizootija/epidemija u Europi. No u posljednja se dva desetljeća virus znatno proširio te danas cirkulira u većem dijelu svijeta. Ovaj je trend uočen i u Hrvatskoj, gdje su infekcije sporadično opisivane u ljudi i životinja do 2010. godine. Otada se, provedbom sustavnog nadzora infekcije VZN-om, virusna aktivnost kontinuirano bilježi u konja. Početni rezultati nadzora ove bolesti u konja, kojima je dokazana virusna aktivnost na području

Republike Hrvatske, bili su najava javnozdravstvenog rizika. To se, nažalost, i potvrdilo prvim slučajevima bolesti ljudi zabilježenima 2012. godine. Otada se infekcije životinja i bolesti ljudi dokazuju svake godine s različitim intenzitetom. Od prve pojave obolijevanja ljudi veći je broj oboljelih zabilježen 2013. godine te najveći tijekom sezone prijenosa 2018. godine, kad je zabilježen 61 slučaj neuroinvazivne infekcije VZN-om i VZN groznice. Veterinarska je struka i na primjeru ove bolesti dokazala da nije samo odgovorna za zaštitu zdravlja životinja nego istodobno obavlja i neprocjenjivu ulogu u očuvanju zdravlja ljudi. Sustavnim nadzorom i bliskom suradnjom s liječnicima veterinari su pridonijeli da posljedice ove bolesti ne budu i znatno veće. Stoga su nam iskustva s bolešću Zapadnog Nila potvrda važnosti bliske suradnje, ali i obveza njezina intenziviranja u skladu s inicijativom *Jedno zdravlje*. Ovakva suradnja mora

biti smjernica za rad u budućnosti jer je to jedini mogući odgovor na širenje ove, ali i nekih drugih emergentnih vektorskih zoonoza koje nam prijete.

Proširenost infekcije virusom Zapadnog Nila

Nakon izolacije VZN-a iz krvi febrilne žene u Ugandi 1937. godine (Smithburn i sur., 1940.), prva opsežnija epidemija bolesti opisuje se u Izraelu (kada su opisani i neuroin vazivni oblici bolesti) te Egiptu početkom 50-ih godina prošlog stoljeća (Bernkopf i sur., 1953.; Taylor i sur., 1956.). Upravo su u Egiptu provedena opsežna istraživanja koja su obuhvatila određivanje seroprevalencije u ljudi, sisavaca i ptica, izdvajanje virusa iz prirodno inficiranih domaćina i vektora te pokusne infekcije ljudi, konja, ptica i artropoda. Ona su rezultirala spoznajom da su konji osjetljivi na infekciju VZN-om i da razvijaju klinički oblik bolesti. Nakon tih početnih spoznaja bolesti konja s kliničkim znakovima meningoencefalitisa prvi su put opisana u Europi 60-ih godina prošlog stoljeća, kad se bolest pojavila u Francuskoj (Joubert i sur., 1970.). Otada se ona sporadično opisuje u konja, a veći broj obolijevanja bilježi se 1998. godine u Italiji, gdje je na malom prostoru oboljelo 14 životinja od kojih je šest uginulo (Cantile i sur., 2000.).

VZN se, obolijevanjem ljudi i životinja, nedvojbeno znatno proširio krajem prošlog stoljeća u veći broj europskih država uzrokujući i opsežnije epizootije u konja, primjerice 2000. godine u Fran-

cuskoj (Murgue i sur., 2001.). Globalnu važnost ova infekcija poprima širenjem virusa u Sjevernu Ameriku 1999. godine, kad dolazi do velike epidemije u ljudi, ali i većeg broja infekcija i kliničkih bolesti konja (Trock i sur., 2001.). U 21. stoljeću VZN se proširio gotovo po cijelom svijetu, tako da je u ovom trenutku to globalni problem za zdravlje konja, ali prije svega za zdravlje ljudi.

Prvi dokaz infekcije VZN-om u životinja u RH opisan je 1993. godine nalazom protutijela u smeđeg medvjeda (Madić i sur., 1993.), a infekcije u konja opisane su prvi put na području Đakova 2001. godine (Madić i sur., 2007.). Opsežnim istraživanjem provedenim 2010. i 2011. godine dokazana je proširenost infekcije VZN-om u konja u cijeloj kontinentalnoj Hrvatskoj te u Istri, uz najvišu seroprevalenciju u istočnoj Hrvatskoj (Barbić i sur., 2012.a). Dokazana visoka proširenost, uz prva obolijevanja ljudi 2012. godine, bila su polazište za uvođenje sustava nadzora VZN-a u RH. Taj se sustav nadzora, uz modifikacije, provodi i danas te je pretraživanjem konja dokazana kontinuirana cirkulacija ovoga zoonotskog uzročnika na području RH kao i akutne infekcije konja u svakoj sezoni prijenosa. Proširenost virusa iz godine u godinu raste te je u 2018. godini seroprevalencija u konja iznosila približno 10 % uz 20 akutno inficiranih životinja iz šest kontinentalnih županija (neobjavljeni podaci projekta CRONEUROARBO).

U ljudi, serološki dokazi prisutnosti VZN-a opisani su 1970-ih i 1980-ih godina, kad su protutijela za VZN dokazana u 0,28 –

4,9 % stanovnika otoka Brača, Hvara i Mljeta (Vesenjak-Hirjan i sur., 1980.). Nadalje, seropozitivnost od 0,3 % dokazana je u dva istraživanja provedena 2007. godine u sjeverozapadnoj Hrvatskoj (Golubić, 2012.) te 2011. godine u istočnoj Hrvatskoj (podaci Nacionalnog referentnog laboratorija za arboviruse, HZJZ). Nakon prvih slučajeva neuroinvazivne bolesti u ljudi 2012. godine na području istočne Hrvatske infekcije se kontinuirano pojavljuju epidemijski (2013., 2017. godine) ili sporadično (2014. – 2016. godine) u kontinentalnim županijama (Pem-Novosel i sur., 2014.; Vilibić-Čavlek i sur., 2014.). Tijekom 2018. godine na području RH zabilježeno je više od 60 slučajeva neuroinvazivne infekcije VZN-om i VZN groznice te pet smrtnih ishoda u deset kontinentalnih županija. Molekularnom tipizacijom i filogenetskom analizom potvrđena



SLIKA 1. Akutne infekcije uzrokovane virusom Zapadnog Nila u konja i ljudi na području kontinentalne Hrvatske (2012. – 2018. godine)

je cirkulacija VZN-a linije 2 (Vilibić-Čavlek i sur., 2019.).

U skladu s tim danas se bolest Zapadnog Nila može smatrati udomaćenom i visoko proširenom bolešću u Republici Hrvatskoj te trajnom opasnošću za zdravlje ljudi i konja.

Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila

VZN, kao i ostali virusi serogrupe virusa japanskog encefalitisa, pokazuju tkivni tropizam prema živčanom tkivu. Nakon inokulacije virusa ubodom komarca virus inficira keratinocite i Langerhansove stanice kojima uzročnik dolazi u regionalne limfne čvorove, gdje se zbiva primarno umnožavanje. Nakon što dospije u sekundarno limfno tkivo, dolazi do nove faze infekcije tijekom koje virus putem limfnoga sustava dopire u sistemsku cirkulaciju. Razvija se viremija, postupna infekcija visceralnih organa te dolazi do prodora kroz hematoencefalnu barijeru i ulaska u središnji živčani sustav (SŽS). Mehanizam prodora kroz hematoencefalnu barijeru nije u potpunosti razjašnjen, a VZN se može dokazati u SŽS-u tri do četiri dana nakon infekcije. Infekcija neurona povezana je s degeneracijom i gubitkom stanične strukture. Velike Purkinjijeve stanice maloga mozga i motorički neuroni kralježnične moždine osobito su zahvaćeni, a eksperimentalna istraživanja upućuju na to da je virusno inducirana apoptotska smrt stanice mehanizam koji je odgovoran za oštećenje neurona (Samuel i Diamond, 2006.; Lim i sur., 2011.).

Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila

Inkubacija bolesti Zapadnog Nila u konja iznosi 3 – 15 dana. Infekcije u najvećem broju prolaze asimptomatski, a u nekih se životinja pojavljuju samo blagi febrilni oblici koji često prođu nezapaženo. U do 8 % zaraženih konja bolest Zapadnog Nila klinički se očituje znakovima poremećaja SŽS-a različita intenziteta (Gardner i sur., 2007.). U slučaju pojave kliničkih znakova razvija se encefalomijelitis s ataksijom kao dominantnim kliničkim znakom. Učestalo se pojavljuju i slabost ekstremiteta, lijevanje i fascikulacija mišićja. Nešto su manje izraženi klinički znakovi deficita kranijalnih živaca poput opuštene usne, igre nosnica te fascikulacije mišićja lica. Važno je istaknuti da u oboljelih konja često izostaje porast tjelesne temperature, a ako se pojavi, ona prethodi kliničkim znakovima poremećaja SŽS-a. Uz povišenu tjelesnu temperaturu prvi uočeni klinički znakovi mogu biti i depresija, anoreksija, količni napadi ili hromost (Delcambre i Long, 2013.). U manjem broju slučajeva uočavaju se hiperestezija, škrgutanje zubima, fotofobija i gubitak vida (Murgue i sur., 2001.; Ostlund i sur., 2001.; Garcia-Bocanegra i sur., 2011.). Ostali poremećaji u ponašanju, poput somnolencije, preosjetljivosti, pa čak i agresivnosti, također se mogu pojaviti pri infekciji konja VZN-om (Ostlund i sur., 2001.; Abutarbush i sur., 2004.; Garcia-Bocanegra i sur., 2011.; Delcambre i Long, 2013.). U nekih se konja razvijaju simptomi slični narkolepsiji i poremećajima spavanja. Klinički slika izrazito varira s

obzirom na kliničke simptome, intenzitet i trajanje, međutim u većine oboljelih konja do kliničkog poboljšanja dolazi tri do sedam dana nakon pojave prvih znakova bolesti. Ako konji pokazuju znatno kliničko poboljšanje u tom razdoblju, za jedan do šest mjeseci može se u više od 90 % slučajeva očekivati potpun oporavak. U manjem broju slučajeva moguće su trajne posljedice poput slabosti, povremenih ataksija te gubitka funkcije jednoga ili više ekstremiteta (Delcambre i Long, 2013.). Ipak, potrebno je naglasiti da u slučaju očitovanja poremećaja središnjega živčanog sustava letalitet može biti vrlo visok te varirati od 22 do 44 % (Murgue i sur., 2001.; Ostlund i sur., 2001.; Garcia-Bocanegra i sur., 2011.).

U ljudi inkubacija iznosi 2 – 6 (14) dana. Većina infekcija (oko 80 %) prolazi asimptomatski, 20 % oboljelih razvija blagu febrilnu bolest (VZN groznica), a manje od 1 % razvija infekciju SŽS-a koja se očituje meningitisom, encefalitisom ili sindromom poliomijelitisa (akutna mlohava kljenut), iako se pojedini sindromi često preklapaju (Hart i sur., 2014.). Smrtnost kod neuroinvazivnih oblika bolesti iznosi oko 10 %. Starija životna dob i imunosupresija glavni su rizični faktori za nastanak težih oblika bolesti. VZN groznica jest samoizlječiva bolest, blagog tijeka i povoljnog ishoda. VZN meningitis pojavljuje se u oko 40 % slučajeva svih neuroinvazivnih oblika infekcije VZN-om. VZN encefalitis povezan je s visokim mortalitetom (oko 20 %), a u petine osoba koje prebole akutnu bolest ostaju trajne neurološke posljedice (Vilibić-Čavlek i sur., 2013.).

Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila

Klinički znakovi infekcije VZN-om u konja nisu patognomonični te se pri pojavi nespecifičnih kliničkih znakova poremećaja SŽS-a u njih mora diferencijalnodijagnostički isključiti bjesnoća i rinopneumonitis uzrokovan neuropatogenim tipom konjskog herpesvirusa 1 koji je također proširen u Republici Hrvatskoj (Barbić i sur., 2012.b). Iznimno je važno u slučaju pojave neuroloških znakova u konja objektivno dijagnosticirati o kojoj se od navedenih bolesti radi, jer su postupci s oboljelim životinjama i mjere u uzgojima potpuno različite, dok je rizik za ljude (bjesnoća) i infekciju drugih životinja (bjesnoća, rinopneumonitis konja) znatan.

Infekcija VZN-om u konja dijagnosticira se dokazom uzročnika ili serološkim pretragama. Ograničenje u dokazu uzročnika izdvajanjem, pa čak i molekularnim metodama, jest kratkotrajna viremija, koja traje 4 – 6 dana i prestaje s pojavom kliničkih znakova (Bunning i sur., 2002.; Siger i sur., 2004.). Nadalje, odabir početnica za molekularnu dijagnostiku mora biti prilagođen linijama virusa koje cirkuliraju na nekom području zbog mogućnosti dobivanja lažno negativnih rezultata (Eiden i sur., 2010.). Zbog toga je samo pozitivan nalaz uzročnika potvrda bolesti, dok negativan nalaz molekularnih i viroloških pretraga ne može biti siguran dokaz izostanka infekcije VZN-om. Dokaz uzročnika važniji je za dijagnostiku *post mortem*, kad je virus znatno lakše dokazati u tkivu mozga uginule životinje.

Ljudi, kao i konji, jesu slučajni krajnji domaćini za infekciju VZN-om s kratkotrajnom i niskom viremijom zbog čega je izravna dijagnostika često neuspješna. Virus se rijetko izolira iz krvi bolesnika s neuroinvazivnim oblicima bolesti jer više nije prisutan u krvi u vrijeme pojave neuroloških simptoma. Metodama molekularne dijagnostike RNA VZN moguće je dokazati i u likvoru te nešto dulje u urinu oboljelih osoba, no osjetljivost je tih metoda do 50 % (Vilibić-Čavlek i sur., 2013.).

Zbog toga se dijagnostika infekcije VZN-om najčešće provodi serološkim metodama, tj. detekcijom specifičnih protutijela IgM i IgG. Dokaz protutijela IgM jest potvrda akutne infekcije u konja jer ta klasa protutijela nastaje nekoliko dana nakon infekcije, a nestaje za dva do najdulje tri mjeseca (Castillo-Olivares i Wood, 2004.). Za razliku od konja u ljudi protutijela IgM mogu biti prisutna u mjerljivoj titru znatno dulje pa ne moraju biti potvrda nedavne infekcije (Papa i sur., 2011.). U tim se slučajevima za dokaz akutne/nedavne infekcije radi određivanje avidnosti protutijela IgG (Vilibić-Čavlek i sur., 2018.). Potvrda protutijela IgG dijagnostički je manje važna jer se ona mogu detektirati dugo vremena nakon infekcije te mogu biti rezultat infekcije iz prethodne sezone. Uz to u državama u kojima se provodi cijepljenje konja, protutijela IgG mogu biti i posljedica cijepljenja. Važno je istaknuti da su u serologiji poteškoća i križne reakcije s protutijelima za druge viruse iz roda *Flavivirus*, od kojih su na području RH prošireni virus krpeljnog encefalitisa, a odnedavno je

dokazana i proširenost virusa Usutu (Barbić i sur., 2013.; Vilibić Čavlek i sur., 2014.; Vilibić-Čavlek i sur., 2019.). Stoga serološka dijagnostika katkad zahtijeva i dodatne potvrdne neutralizacijske testove (Di Gennaro i sur., 2014.).

Liječenje i profilaksa

Specifičnog lijeka nema, odnosno terapija je simptomatska. Teži, posebno neurološki slučajevi bolesti zahtijevaju hospitalizaciju kako bi se moglo pružiti adekvatno potporno liječenje (Vilibić-Čavlek i sur., 2013.). Za razliku od ljudi imunoprofilaksa u konja provodi se već dulje vrijeme, s opisanim dobrim rezultatima. Cijepljenje je najproširenije u SAD-u, ali i sve prisutnije u europskim državama. Od početnih inaktiviranih cjepiva imunoprofilaksa se u konja razvijala te su danas na tržištu dostupna i rekombinantna cjepiva. S obzirom na različite linije VZN-a pitanje je jesu li sva cjepiva prilagođena za uporabu u svim područjima, iako je u pojedinim istraživanjima dokazana učinkovita križna zaštita cjepiva koje je proizvedeno korištenjem soja VZN-a linije 1 u pokusnoj infekciji sojem VZN-a linije 2 (Minke i sur., 2011.). Upitna je i isplativost cijepljenja, poglavito u velikim skupinama ekstenzivno držanih konja s obzirom na to da se bolest očituje u najviše 8 % inficiranih životinja. U prilog tomu ide i izostanak obolijevanja konja na području RH tijekom gotovo deset godina sustavnog praćenja bolesti, iako je dokazana virusna aktivnost, kao i bolesti u ljudi. Iako je izostanak kliničke bolesti konja vjero-

jatnije posljedica neprijavlivanja slučajeva nego nepojavlivanja bolesti, očito broj obolijevanja nije alarmantan te cijepljenje cjelokupne populacije konja za sigurno gospodarski nije opravdano. Stoga se u RH trenutačno ne provodi cijepljenje konja protiv VZN-a, ali u slučaju da se započne imunoprofilaksa, potrebno je striktno evidentirati svaku cijepljenu životinju kako bi se serološkim pretraživanjem kopitara i dalje mogao provoditi program kontrole proširenosti VZN-a u svrhu usmjerivanja i provođenja mjera javnoga zdravstva za zaštitu ljudi. S obzirom na to da ne postoji mogućnost zaštite cjepivom kod ljudi, iznimno su važne nespecifične mjere prevencije bolesti koje se odnose na kontrolu populacije komaraca adulticidnim i larvicidnim dezinfekcijskim mjerama. Isto tako, poseban naglasak treba staviti na mjere osobne zaštite (nošenje adekvatne odjeće, upotrebu repelenata i izbjegavanje boravka na otvorenom u vrijeme najveće aktivnosti komaraca) (Vilibić-Čavlek i sur., 2013.).

Zahvala

Ovaj rad sufinanciran je iz projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ IP 2016-06-7456 *Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske*, CRONEUROARBO i međunarodnog hrvatsko-srpskog znanstvenoistraživačkog projekta *Optimizacija dijagnostike i sustava nadzora emergentnih i re-emergentnih virusnih zoonoza prenosivih vektorima*.

Literatura

1. ABUTABUSH, S. M., B. P. O'CONNOR, C. CLARK, F. SAMPIERI, J. M. NAYLOR (2004): Clinical West Nile virus infection in 2 horses in western Canada. *Can. Vet. J.* 45, 315-317.
2. BARBIĆ, LJ. E. LISTEŠ, S. KATIĆ i sur. (2012a): Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet. Microbiol.* 159, 504-508.
3. BARBIĆ, LJ., I. LOJKIĆ, V. STEVANOVIĆ i sur. (2012b): Two outbreaks of neuropathogenic equine herpesvirus type 1 with breed-dependent clinical signs. *Vet. Rec.* 170, 227.
4. BARBIĆ, LJ., T. VILIBIĆ-ČAVLEK, E. LISTEŠ i sur. (2013): Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne Zoon. Dis.* 13, 772-774.
5. BERNKOPF, H., S. LEVINE, R. NERSON (1953): Isolation of West Nile virus in Israel. *J. Infect. Dis.* 93, 207-218.
6. BUNNING, M. L., R. A. BOWEN, C. B. CROPP i sur. (2002): Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 380-386.
7. CANTILE, C., G. DI GUARDO, C. ELENI, M. ARISPICI (2000): Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.* 32, 31-35.
8. CASTILLO-OLIVARES, J., J. WOOD (2004): West Nile virus infection of horses. *Vet. Res.* 35, 467-483.
9. DELCAMBRE, G. H., M. T. LONG (2013): *Flavivirus Encephalitides. U: Equine infection diseases (ur. Sellon i Long), 2. izd., Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, SAD, 2013, str. 217-226.*
10. DI GENNARO, A., A. LORUSSO, C. CASACCIA, A. CONTE, F. MONACO, G. SAVINI (2014): Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of West Nile virus antibodies in human and animal serum samples. *Clin. Vaccine Immunol.* 21, 1460-1462.
11. EIDEN, M., A. VINA-RODRIGUEZ, B. HOFFMAN, U. ZIEGLER, M. H. GROSCHUP (2010): 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.* 22, 748-753.
12. GARCIA-BOCANEGRA, I., J. A. JEAN-TELLEZ, S. NAPP i sur. (2011): West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2397-2399.
13. GARDNER, I. A., S. J. WONG, G. L. FERRARO i sur. (2007): Incidence and effects of West Nile virus infection in vaccinated and unvaccinated horses in California. *Vet. Res.* 38, 109-116.
14. GOLUBIĆ, D., G. DOBLER (2012): Flavivirusi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. *Infektol. Glasn.* 32, 153-157.
15. HART, J., G. TILLMAN, M. A. KRAUT i sur. (2014): NIAID Collaborative Antiviral Study Group West Nile Virus 210 Protocol Team. West Nile virus neuroinvasive disease: neurological manifestations and prospective longitudinal outcomes. *BMC Infect. Dis.* 14, 248.
16. JOUBERT, L., J. OUDAR, C. HANNOUN i sur. (1970): Epidemiologie du virus West Nile: etude d'un foyer en Camargue. IV. La meningo-encephalomyelite du cheval. *Ann. Inst. Pasteur; IIR*, 239-247.
17. LIM, S. M., P. KORAKA, A. D. OSTERHAUS, B. E. MARTINA (2011): West Nile virus: Immunity and pathogenesis. *Viruses* 3, 811-828.
18. MADIĆ, J., Đ. Huber, B. LUGOVIĆ (1993): Serological survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *J. Wildl. Dis.* 29, 572-576.
19. MADIĆ, J., G. SAVINI, A. DI GENNARO i sur. (2007): Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Vet. Rec.* 160, 772-773.
20. MINKE, J. M., L. SIGER, L. CUPILLARD i sur. (2011): Protection provided by a recombinant ALVAC(®)-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain. *Vaccine* 29, 4608-4612.
21. MURGUE, B., S. MURRI, S. ZIENTARA, B. DURAND, J. P. DURAND, H. ZELLER (2001): West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 692-696.

22. OSTLUND, E. N., R. L. CROM, D. D. PEDERSEN, D. J. JOHNSON, W. O. WILLIAMS, B. J. SCHMITT (2001): *Equine West Nile encephalitis, United States. Emerg. Infect. Dis.* 7, 665-669.
23. PAPA, A., K. DANIS, A. ATHANASIADOU, M. DELIANIDOU, T. PANAGIOTOPOULUS (2011): *Persistence of West Nile virus immunoglobulin M antibodies, Greece. J. Med. Virol.* 83, 1857-1860.
24. PEM-NOVOSEL, I., T. VILIBIC-CAVLEK, I. GJENERO-MARGAN i sur. (2012): *First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012. Vector Borne Zoonot. Dis.* 14, 82-84.
25. SAMUEL, M. A., M. S. DIAMOND (2006): *Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. J. Virol.* 80, 9349-9360.
26. SIGER, L., R. A. BOWEN, K. KARAC i sur. (2004): *Assessment of the efficacy of a single dose of a recombinant vaccine against West Nile virus in response to natural challenge with West Nile virus-infected mosquitoes in horses. Am. J. Vet. Res.* 65, 1459-1462.
27. SMITHBURN, K. C., T. P. HUGHES, A. W. BURKE, J. H. PAUL (1940): *A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. Am. J. Trop. Med.* 20, 471-492.
28. TAYLOR, R. M., T. H. WORK, H. S. HURLBUT, F. RIZK (1965): *A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. Am. J. Trop. Med.* 5, 579-620.
29. TROCK, S. C., B. J. MEADE, A. L. GLASER i sur. (2001): *West Nile virus outbreak among horses in New York State, 1999 and 2000. Emerg. Infect. Dis.* 7, 745-747.
30. VESENJAK-HIRJAN, J., M. GALINOVIĆ-WEISSGLASS, Z. BRUDNJAK, C. H. CALISHER, D. TOVORNIK, J. S. LAZUICK i sur. (1980): *Island of Brač – Focus of Arbovirus Infections. U: Vesenjak-Hirjan J, ur. Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl. Bakt. Suppl* 9, Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag; str. 311-317.
31. VILIBIĆ-ČAVLEK, T., LJ. BARBIĆ, S. LJUBINSTERNAK i sur. (2013): *Infekcija uzrokovana virusom Zapadnog Nila: re-emergentna bolest u Hrvatskoj. Liječ. Vjesn.* 135, 156-161.
31. VILIBIĆ-ČAVLEK, T., B. KAIĆ, LJ. BARBIĆ i sur. (2014): *First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. Infection* 42, 689-695.
32. VILIBIĆ-ČAVLEK, T., B. KRISTOFIĆ, V. SAVIĆ i sur. (2018): *Diagnostic significance of immunoglobulin G avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 51, 591-595.
33. VILIBIĆ-ČAVLEK, T., V. SAVIĆ, D. SABADI i sur. (2019): *Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the 'One health' context, 2018. Transbound. Emerg. Dis. doi:10.1111/tbed.13225.*