

**HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI**

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



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

---

# Virus Zapadnog Nila u ptica

Vladimir Savić\*

\* doc. dr. sc. Vladimir SAVIĆ, znanstveni savjetnik, Hrvatski veterinarski institut, Centar za peradarstvo, Zagreb

## Uvod

Ptice su u prirodnom ciklusu rezervoar virusa Zapadnog Nila (VZN) koji se prenosi komarcima na druge ptice, ali i sisavce, uključujući i čovjeka. Većina zaraženih ptica obično ne pokazuje kliničke simptome, no one mogu oboljeti, čak i sa smrtnim ishodom. To ovisi ponajprije o vrsti, katkad i dobi, te o patogenosti soja VZN-a. U Sjevernoj Americi kao najosjetljivije ptice pokazale su se vrste iz porodice vrana, a u Europi grabljivice, poglavito jastreb. Od domaće peradi posebno je osjetljiva guska, dok kokoš i puran ne pokazuju simptome. Najvažniji rezervoari VZN-a jesu određene vrste ptica iz redova vrapčarki, močvarica i sova zbog dugotrajne i izrazito visoke viremije, te ih smatramo kompetentnim rezervoarima koji služe za daljnje širenje virusa. Druge vrste ptica koje mogu biti zaražene, zbog niske i obično kratkotrajne viremije, nisu kompetentni rezervoari VZN-a, tj. kao i sisavci krajnji su domaćin za ovaj virus.

## Etiologija

Virus Zapadnog Nila (VZN) pripada porodici Flaviviridae, rodu *Flavivirus* koji

broji više od 90 virusa. Prema načinu prijenosa razvrstavamo ih u tri skupine: (1) flaviviruse koji se prenose komarcima i krpeljima, a zaražavaju brojne kralježnjake te su najvažniji flavivirusi za ljude i životinje, (2) flaviviruse za koje je nepoznat vektor, a zaražavanje je vjerojatno ograničeno samo na kralježnjake, i to vjerojatno samo glodavce i šišmiše te (3) flaviviruse koje nalazimo isključivo u kukcima, ponajprije komarcima. Ptice su prirodni rezervoar za brojne flaviviruse iz prve skupine, uključujući i virus VZN-a (Moureau i sur., 2015.), dok ljude i ostale kralježnjake smatramo slučajnim domaćinima (van der Meulen i sur., 2005., Benzarti i sur., 2019.).

Trenutačno je predloženo devet genskih loza za razvrstavanje sojeva VZN-a (Fall i sur., 2017.). Loza 1 dodatno se dijeli na skupine/kladone 1a, 1b (ili Kunjin virus) i 1c (Gray i Webb, 2014.), a najrasprostranjenija je u SAD-u, Africi, Europi i na Bliskom istoku (Fall i sur., 2017.). Virulencija među spomenutim lozama VZN-a jako varira. Naprimjer, loza 3 (virus Rabensburg) nikad nije dokazana u ljudi niti se uspjelo pokusno inficirati stanične kulture sisavaca i ptica, kućnog vrap-

ca ili kokoške embrije (Aliota i sur., 2012.). Nasuprot tomu, loze 1 i 2 odgovorne su za velike epizootije životinja i epidemije ljudi (Aliota i sur., 2012., David i Abraham, 2016.). Virusni sojevi unutar iste loze također mogu pokazati varijaciju u patogenosti. Naprimjer, unatoč visokoj genskoj povezanosti afričkog soja KN3829 i sjevernoameričkog soja NY99, potonji pokazuje nevjerojatno različit fenotip virulencije za ptice uzrokujući znatno višu viremiju i smrtnost u američkih vrana (Brault i sur., 2004.).

### **Ptice – rezervoari virusa Zapadnog Nila**

U prirodnom su ciklusu ptice rezervoari u kojima se VZN umnožava, dok komarci, poglavito iz rodova *Culex*, *Aedes* i *Ochlerotatus* imaju ulogu vektora. U takvom ciklusu ljudi, konji i drugi sisavci, ako se zaraze, predstavljaju slijepu ulicu što znači da ne mogu poslužiti kao izvor infekcije jer je u njih viremija vrlo slaba (Komar, 2000.). Zabilježen je i transovarijski prijenos virusa u komarcima, a vrste komaraca koje prezime kao adulti također mogu biti izvor zaraze u sljedećoj sezoni (Nelms i sur., 2013.). Novija istraživanja upućuju i na mogućnost prezimljivanja VZN-a u pticama i u odsutnosti komaraca (Montecino-Latorre i Barker, 2013.). Osim brojnih sisavaca virus se može prenijeti i na vodozemce i gmazove. Razina i trajanje viremije u ptica znatno variraju ovisno o vrsti. VZN se održava u enzootskim područjima u ciklusu između komaraca i ptica. Vrste komaraca koji se hrane i na pticama i na

sisavcima zaraze se obično u kasno ljeto i ranu jesen te tada mogu prenijeti virus s ptica na ljude, konje i druge slučajne domaćine (Hubalek i Halouzka, 1999., Komar, 2000., Laperriere i sur., 2011.). Ptice selice mogu prenijeti VZN u nova područja, jer u pojedinim vrsta viremija traje i dulje od tri mjeseca (Malkinson i sur., 1998., Rappole i sur., 2000.).

Razmatramo li VZN u ptica, treba imati na umu da su one biološki vrlo raznolika skupina kralježnjaka što se može usporediti s raznolikošću sisavaca. Štoviše, s 10 699 ptičjih vrsta dvostruko ih je više, a prema novijim podacima o broju ptičjih vrsta i trostruko više nego vrsta sisavaca. Samim se time nameće zaključak da među pticama postoje velike razlike u prijemljivosti za infekciju VZN-om i osjetljivosti prema ovom virusu. Iako je više od 600 ptičjih vrsta prijemljivo za infekciju VZN-om, to ne znači da su one ujedno i rezervoari virusa i da sudjeluju u njegovu širenju. Kompetentnim rezervoarima, odnosno domaćinima VZN-a koji sudjeluju u njegovu širenju, smatramo samo one vrste ptica u kojih je viremija viša od  $10^6$  PFU po mililitru krvi. Što je viremija viša te što dulje traje, to je i indeks kompetentnosti rezervoara (IKR) veći. Ptičje vrste s većim IKR-om imaju važniju ulogu u širenju VZN-a i obratno (Tolsá i sur., 2018.). Najveći je IKR utvrđen u ptica iz reda vrapčarki (Passeriformes), kojemu primjerice pripada i porodica vrana, zatim iz reda močvarica (Charadriiformes), koje su zastupljene galebovima i ćurlinima, te iz reda sovki (Stigiformes), odnosno sova. Nasuprot tomu ptice iz redova golupčarki (Co-

---

lumbiformes) i pelikanki (Pelecaniformes), kojemu pripadaju i čaplje, rode i vranici, zatim iz reda papigašica (Psittaciformes) i kokoški (Galliformes), među koje se ubrajaju i puran i gnjetao (fazan), smatramo nekompetentnim za širenje virusa jer u njih nakon infekcije viremija ostaje manja od  $10^4$  PFU po mililitru krvi (Kilpatrick i sur., 2007.). Čini se da neke vrste vrana, šojki, svraka, galebova i drugih ptica također mogu izlučivati VZN oralnim i fekalnim putem, što bi značilo da se virus može izravno prenijeti s jedne na drugu pticu. Ptice grabljivice i vrane vrlo se vjerojatno mogu zaraziti i jedenjem drugih ptica, a insektivorne ptice jedenjem komaraca (Kipp i sur., 2006.; Komar i sur., 2003.; Nemeth i sur., 2006.; McLean i sur., 2001.).

## Rasprostranjenost virusa Zapadnog Nila

VZN je u ptičjoj vrsti prvi put dokazan u Egiptu 1953. godine izdvajanjem virusa iz krvi dvaju goluba pećinara (*Columba livia*) i jedne sive vrane (*Corvus cornix*) (Work i sur., 1953.). Danas je VZN proširen gotovo u cijelom svijetu, s tim da je na zapadnoj hemisferi prvi put dokazan tek 1999. (Nash i sur., 2001.). Virus koji je te godine dokazan u New Yorku (NY99) bio je izrazito virulentan, pripadao je lozi 1 i bio je vrlo srodan virusima izdvojenim iz rode (*Ciconia ciconia*) i domaćih gusaka (*Anser domesticus*) u Izraelu od 1997. godine do 2000. godine (Malkinson i sur., 2002.), što upućuje na moguć utjecaj globalne trgovine i putovanja na globalno širenje VZN-a (Peter-

sen i Roehrig, 2001.). VZN loze 2 poslije se proširio izvan svojih povijesnih granica, koje su dugo vremena bile između južne Afrike i Madagaskara (Lanciotti i sur., 1999.; Burt i sur., 2002.). U 2004. VZN loze 2 zabilježen je najprije u Mađarskoj kod jastreba (*Accipiter gentilis*) (Bakonyi i sur., 2006.), gdje sljedećih godina poprima i enzooski karakter zaražavajući uz jastrebove i kopce (*Accipiter nisus*) (Erdelyi i sur., 2007.). Zanimljivo je da je u Mađarskoj nešto prije iz domaćih gusaka izdvojen i VZN loze 1, vrlo sličan virusima izdvojenima u Izraelu i New Yorku između 1998. i 1999. godine (Glávits i sur., 2005.; Bakonyi i sur., 2006.). Nakon dokaza VZN-a loze 2 u Mađarskoj virus te loze dokazan je i u Austriji 2008. i 2009. godine, također u jastrebova, ali i u velikog sokola (*Falco rusticolus*) (Wodak i sur., 2011.). U Italiji je 2011. virus loze 2, osim u oboljelih ljudi, dokazan i u lokalnih ptica gugutki (*Streptopelia decaocto*) i autohtonih komaraca (*Culex pipiens*) (Savini i sur., 2012.). Situacija je u Italiji tim složenija jer u toj zemlji u ptica i komaraca istodobno cirkulira i virus loze 1, a moguće je da je tako i u drugim zemljama, u kojima uglavnom nije bilo sustavnih istraživanja pa takvih podataka nema. U proteklih je nekoliko godina došlo do širenja VZN-a loze 2 u velik broj europskih zemalja, a u većini je slučajeva taj virus dokazan u grabljivica, najčešće u uginulih jastrebova, kao što je to bio slučaj 2018. i u Hrvatskoj (Vilibić-Čavlek i sur., 2018.).

Općenito u ptica su danas najrasprostranjenije loza 1 i loza 2 VZN-a (Savini i sur., 2012.), s tim da je loza 1 prisutna na

svim kontinentima osim Antarktiku, dok je loza 2 ograničena na Afriku i Europu (OIE, 2018.).

## Klinička i patoanatomska slika u ptica

Unos virulentnog VZN-a 1999. u Novi svijet za posljedicu je u SAD-u i Kanadi imao stotine umrlih ljudi, ali i iznenadna uginuća desetaka tisuća ptica. Virus je tada otkriven u najmanje 208 ptičjih vrsta, a najviše u američkih vrana (*Corvus brachyrhynchos*) (Marra i sur., 2004.). Epizootija se u SAD-u nastavila tako da je do 2018. godine infekcija ovim virusom zabilježena u 342 ptičje vrste (Benzarti i sur., 2019.). Komar i suradnici (2003.) pokušno su zarazili 25 sjevernoameričkih vrsta ptica lokalnim izolatom. Od 87 zaraženih jedinki simptomi su zapaženi u 28 ptica, osobito u vrsta iz porodice vrana (*Corvidae*) i galebova (*Laridae*). Znakovi bolesti očitovali su se kao generalizirana letargija, nakostriješeno perje, neuobičajeno držanje, nemogućnost zadržavanja glave uspravno i ataksija. U većini je slučajeva do smrti došlo u roku od 24 sata nakon pojave kliničkih znakova. Vanjska krvarenja, bilo iz usta bilo iz kloake, zabilježena su u malog broja američkih vrana. To je istraživanje, uz terenska iskustva, upućivalo na ptice iz porodice vrana kao glavne indikatore prisutnosti virusa u Americi. Istodobno u Europi su rijetko zabilježeni slučajevi prirodne infekcije, kliničkih simptoma i ugibanja divljih ptica (Hubalek i Halouzka, 1999.). Situacija se dramatično promijenila nakon prodora neuroinva-

zivnih sojeva loze 2 u Mađarsku 2004. godine, koji je uputio na veliku osjetljivost jastrebova (*Accipiter gentilis*), kobaca (*Accipiter nisus*) i drugih grabljivica prema ovom virusu. Klinički su se znakovi naglo pojavili, a očitovali su se ataksijom, podrhtavanjem glave i, u terminalnoj fazi, konvulzijama. U odraslih ptica klinički su znakovi trajali nekoliko dana, nakon čega je došlo do uginuća ili postupnog oporavka. Patoanatomske promjene bile su nespecifične, uključujući kongestiju unutarnjih organa. Sivi sokol (*Falco peregrinus*), škanjac (*Buteo buteo*) i kokoš, koji su kohabitirali sa zaraženim kopcima i jastrebovima u istom utočištu za životinje, nisu pokazali nikakve kliničke znakove (Bakonyi i sur., 2006.; Erdelyi i sur., 2007.). Slični objavljeni i neobjavljeni nalazi VZN-a loze 2 u uginulih grabljivica, i to najčešće u jastrebova, zabilježeni su i u mnogim drugim europskim zemljama proteklih nekoliko godina. Godinu prije prodora virusa loze 2 u Europu u farmskih je gusaka u Mađarskoj zabilježena infekcija virusom loze 1. Zamijećena je ataksija, povremeni tortikolis i opistotonus, nekoordiniranost, ritmično njihanje glave u obje strane, savijen vrat u obliku sinusoide i nenormalan položaj glave te gubitak tjelesne mase. Do smrti je došlo 4 do 5 dana nakon pojave kliničkih znakova. Tijekom šest tjedana ukupno je uginulo 14 % mladih gusaka (Glávits i sur., 2005.). Takvi su simptomi opisani i u pokušno zaraženih guščića virusom loze 1. Viremija u guščića nakon pokusnog zaražavanja dovoljno je visoka za daljnje širenje virusa komarcima, a moguć je i

---

horizontalni prijenos virusa među guščićima (Swayne i sur., 2001.). Spontana infekcija guščića vrlo srodnim virusom, koja je za posljedicu imala uginuće i preko 25 % uz horizontalno širenje, opisana je u Kanadi (Austin i sur., 2004.). Za razliku od guščića pokusno zaraženi pilići i purići ne pokazuju kliničke simptome, nisu kompetentni rezervoari jer je viremija niska i kratkotrajna, a nije zabilježeno ni horizontalno širenje VZN-a među njima. Unatoč niskoj viremiji i odsutnosti kliničkih znakova u pilića i purića vrlo brzo dolazi do serokonverzije (Senne i sur., 2000.; Swayne i sur., 2000.). Zbog toga su se pilići i mlade kokoši pokazali kao vrlo prikladni sentineli (pokazivači) za virusnu aktivnost u određenom području tijekom sezone tako da im se dokazuju specifična protutijela za VZN u krvnom serumu (Langevin i sur., 2001.; Chaskopoulou i sur., 2013.). Pilići i mlade kokoši su i u Hrvatskoj uspješno korišteni kao sentineli u sustavu ranog otkrivanja VZN-a i prevencije infekcije ljudi tako da su u određenim područjima pravodobno otkrivene seropozitivne jedinice, što je omogućilo ciljanu primjenu protuepidemijskih mjera (Savić i sur., 2016.).

## **Dijagnostika virusa Zapadnog Nila u ptica**

Kliničku sumnju u oboljelih ptica, uz izostanak specifičnih patoanatomskih promjena u uginulih jedinki, treba laboratorijski potvrditi dokazom VZN-a, posebno ako se radi o osjetljivim vrstama. U Europi prije svega treba obratiti pa-

žnju na grabljivice među kojima su, čini se, najosjetljiviji jastrebovi, ali i na uginuća ptica iz porodice vrana, poput vrane, svrake i šojke.

U ptica se također mogu učiniti serološki testovi koji su osobito praktični za manje osjetljive vrste ptica i one koje imaju nizak IKR, poput kokoši, purana i srodnih vrsta. Loša strana seroloških testova u dijagnostici VZN-a u ptica jest križna reakcija s ostalim virusima iz kompleksa japanskog encefalitisa, poput virusa Usutu, za koji su rezervoari upravo divlje ptice. U ptica se VZN najlakše dokazuje u srcu, mozgu ili jetri, katkad i u drugim organima, npr. slezeni, bubregu ili crijevima. Virus je moguće izdvojiti u staničnim kulturama, primjerice u verostanicama, no postupak je dugotrajan i zahtijeva laboratorij visoke razine biosigurnosti (OIE, 2018.). Virus se može uzgajati i u kokošnjim embrijima (Crespo i sur., 2009.). Razvojem molekularnih tehnika koje se temelje na lančanoj reakciji polimerazom (PCR) moguće je brzo i točno dokazati VZN u kliničkom materijalu ili potvrditi virusne izolate u staničnim kulturama (Tang i sur., 2006.; Eiden i sur., 2010.; Johnson i sur., 2010.).

## **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.

## Literatura

1. ALIOTA, M. T., S. A. JONES, A. P. DUPUIS, A. T. CIOTA, Z. HUBALEK and L. D. KRAMER (2012): Characterization of Rabensburg virus, a flavivirus closely related to West Nile virus of the Japanese encephalitis antigenic group. *PLoS One* 7:e39387.
2. AUSTIN, R. J., T. L. WHITING, R. A. ANDERSON and M. A. DREBOT (2004): An outbreak of West Nile virus-associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.* 45, 117-123.
3. Bakonyi, T., E. Ivanics, K. Erdelyi, K. Ursu, E. Ferenczi, H. Weissenböck and N. Nowotny (2006): Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 618-623.
4. BENZARTI, E., A. LINDEN, D. DESMECHT and M. GARIGLIANY (2019): Mosquito-borne epornitic flaviviruses: an update and review. *J. Gen. Virol.* 100, 119-132.
5. BRAULT, A. C., S. A. LANGEVIN, R. A. BOWEN, N. A. PANELLA, B. J. BIGGERSTAF, B. R. MILLER and N. KOMAR (2004): Differential virulence of West Nile strains for American crows. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 2161-2168.
6. Burt, F. J., A. A. Grobbelaar, P. A. Leman, F. S. Anthony, G. V. Gibson and R. Swanepoel (2002): Phylogenetic relationships of southern African West Nile virus isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 820-826.
7. CHASKOPOULOU, A., C. I. DOVAS, S. C. CHAINTOUTIS, J. KASHEFI, P. KOEHLER and M. PAPANASTASSOPOULOU (2013): Detection and early warning of West Nile Virus circulation in Central Macedonia, Greece, using sentinel chickens and mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13, 723-732.
8. Crespo, R, H. L. Shivaprasad, M. França and P. R. Woolcock (2009): Isolation and distribution of West Nile virus in embryonated chicken eggs. *Avian Dis.* 53, 608-612.
9. DAVID, S. and A. M. ABRAHAM (2016): Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen pathogen. *J. Infect. Dis.* 48, 571-586.
10. Eiden, M., A. Vina-Rodriguez, B. Hoffmann, U. Ziegler and 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.
11. Erdelyi, K., K. Ursu, E. Ferenczi, L. Szeredi, F. Ratz, J. Skare and T. Bakonyi (2007): Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 181-188.
12. Fall, G., N. Di Paola, M. Faye, M. Dia, C. C. M. Freire, C. Loucoubar, P. M. A. Zanotto, O. Faye and A. A. Sall (2017): Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11:e0006078
13. GLÁVITS, R., E. FERENCZI, E. IVANICS, T. BAKONYI, T. MATÓ, P. ZARKA and V. PALYA (2005): Co-occurrence of West Nile Fever and circovirus infection in a goose flock in Hungary. *Avian Pathol.* 34, 408-414.
14. GRAY, T. J. and C. E. WEBB (2014): A review of the epidemiological and clinical aspects of West Nile virus. *Int. J. Gen. Med.* 7, 193-203.
15. HUBALEK, Z. and J. HALOUZKA (1999): West Nile fever – a reemerging mosquito borne viral disease in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 643-650.
16. JOHNSON, N, P. R. WAKELEY, K. L. MANSFIELD, F. MCCRACKEN, B. HAXTON, L. P. PHIPPS and A. R. FOOKS (2010): Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 665-671.
17. KILPATRICK, A. M., S. L. LADEAU and P. P. MARRA (2007): Ecology of West Nile virus transmission and its impact on birds in the western hemisphere. *Auk* 124, 1121-1136.
18. Kipp, A. M., J. A. Lehman, R. A. Bowen, P. E. Fox, M. R. Stephens, K. Klenk, N. Komar and M. L. Bunning (2006): West Nile virus quantification in feces of experimentally infected American and fish crows. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 688-690.

- 
19. Komar, N. (2000): West Nile viral encephalitis. *Rev. Sci. Tech.* 19, 166-176.
  20. Komar, N., S. Langevin, S. Hinten, N. Nemeth, E. Edwards, D. Hettler, B. Davis, R. Bowen and M. Bunning (2003): Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 311-322.
  21. Lanciotti, R. S., A. J. Kerst, R. S. Nasci, M. S. Godsey, C. J. Mitchell, H. M. Savage, N. Komar, N. A. Panella, B. C. Allen, K. E. Volpe, B. S. Davis and J. T. Roehrig (2000): Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4066-4071.
  22. LANGEVIN, S. A, M. BUNNING, B. DAVIS and N. KOMAR (2001): Experimental infection of chickens as candidate sentinels for West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 726-729.
  23. Laperriere, V., K. Brugger and F. Rubel (2011): Simulation of the seasonal cycles of bird, equine and human West Nile virus cases. *Prev. Vet. Med.* 98, 99-110.
  24. Malkinson, M., C. Banet and Y. Weisman (1998): Intercontinental spread of West Nile Virus by wild birds-recent epidemiological findings in Israeli livestock and birds. *Proceedings of the 2nd International Conference on Emerging Zoonoses, (Strasbourg, November 5-9, 1998). Zbornik referata. Strasbourg.*
  25. MALKINSON, M., C. BANET, Y. WEISMAN, S. POKAMUNSKI, R. KING, M. T. DROUET and V. DEUBEL (2002): Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 392-397.
  26. Marra, P. P., S. Griffing, C. L. Cafreey, A. M. Kilpatrick, R. McLean, C. Brand, E. Saito, A. P. Dupuis, L. Kramer and R. Novak (2004): West Nile virus and wildlife. *Bioscience* 54, 393-402.
  27. McLean, R. G., S. R. Ubico, D. E. Docherty, W. R. Hansen, L. Sileo and T. S. McNamara (2001): West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 951, 54-57.
  28. MONTECINO-LATORRE, D and C. M. BARKER (2018): Overwintering of West Nile virus in a bird community with a communal crow roost. *Sci. Rep.* 8, 6088.
  29. MOUREAU, G., S., COOK, P. LEMEY, A. NOUGAIREDE, L. FORRESTER, M. KHASNATINOV, R. N. CHARREL, A. E. FIRTH, E. A. GOULD and X. DE LAMBALLERIE (2015): New insights into flavivirus evolution, taxonomy and biogeographic history, extended by analysis of canonical and alternative coding sequences. *PLoS One*; 10:e0117849.
  30. Nash, D., F. Mostashari, A. Fine, J. Miller, D. O'Leary, K. Murray, A. Huang, A. Rosenberg, A. Greenberg, M. Sherman, S. Wong and M. Layton (1999): West Nile Outbreak Response Working Group. Outbreak of West Nile virus infection, New York City area, 1999. *N. Engl. J. Med.* 344, 1807-1814.
  31. NELMS, B. M., E. FECHTER-LEGGETT, B. D. CARROLL, P. MACEDO, S. KLUH and W. K. REISEN (2013): Experimental and natural vertical transmission of West Nile virus by California Culex (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 50, 371-378.
  32. Nemeth, N., E. Edwards, D. Gould, R. Bowen and N. Komar (2006): Natural and experimental West Nile virus infection in five raptor species. *J. Wildl. Dis.* 42, 1-13.
  33. OIE (2018): West Nile fever. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Paris (697-710).*
  34. Petersen, L. R. and J. T. Roehrig (2011): West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 611-614.
  35. Rappole, J. H., S. R. Derrickson and Z. Hubalek (2000): Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western hemisphere. *Emerg. Infect. Dis.* 6, 319-328.
  36. SAVIĆ, V., L. BARBIĆ, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, M. BALENOVIĆ, V. STEVANOVIĆ, E. LISTEŠ and G. SAVINI (2016): Chickens and horses as sentinels for early warning system in prevention of human West Nile virus infections in Croatia. *Slov. Vet. Res.* 53, 292-294.
  37. Savini, G., G. Capelli, F. Monaco, A. Polci, F. Russo, A. Di Gennaro, V. Marini, L. Teodori, F. Montarsi, C. Pinoni, M. Pisciella, C. Terregino, S. Marangon, I. Capua and R. Lelli (2012): Evidence of West Nile virus lineage 2 circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* 158, 267-273.
  38. SENNE, D. A., J. C. PEDERSEN, W. D. TAYLOR, D. L. HUTTO and B. PANIGRAHY (2000): Patho-



- gencity of West Nile virus for chickens. *Avian Dis.* 44, 642–649.
39. SWAYNE, D. E., J. R. BECK, C. S. SMITH, W. J. SHIEH and S. R. ZAKI (2001): Fatal encephalitis and myocarditis in young domestic geese (*Anser anser domesticus*) caused by West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 751–753.
  40. SWAYNE, D. E., J. R. BECK and S. R. ZAKI (2000): Pathogenicity of West Nile virus for turkeys. *Avian Dis.* 44, 932–937.
  41. TANG, Y., C. ANNE HAPIP, B. LIU and C. T. FAN (2006): Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J. Clin. Virol.* 36, 177–182.
  42. TOLSÁ, M. J., G. E. GARCÍA-PEÑA, O. RICO-CHÁVEZ, B. ROCHE and G. SUZÁN (2018): Macroecology of birds potentially susceptible to West Nile virus. *Proc. Biol. Sci.* 285, 20182178.
  43. VAN DER MEULEN, K. M., M. B. PENZAERT and H. J. NAUWYNCK (2005): West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.* 150, 637–657.
  44. Vilibić-Cavlek, T., V. Savić, D. Sabadi, L. Perić, L. Barbic, A. Klobučar, B. Miklašić, I. Tabain, M. Santini, M. Vučelja, E. Dvorski, T. Butigan, G. Kolaric-Sviben, T. Potocnik-Hunjadi, M. Balenović, M. Bogdanić, Z. Andrić, V. Stevanović, K. Capak, M. Balicević, E. Listes and G. Savini (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.
  45. Wodak, E., S. Richter, Z. Bagó, S. Revilla-Fernández, H. Weissenböck, N. Nowotny and P. Winter (2011): Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.* 149, 358–366.
  46. WORK, T., H. HURLBUT and R. TAYLOR (1953): Isolation of West Nile virus from hooded crow and rock pigeon in the Nile delta. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 719–722.