

Marta Popiel^{1,3*}, Grażyna Sygitowicz², Tomasz Laskus¹

¹Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa

²Zakład Laboratoryjnej Diagnostyki Medycznej Katedry Biochemii i Chemii Klinicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

³Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Żwirki i Wigury 61, 02-091 Warszawa

Wpłynęło w marcu 2013 r.

1. Wstęp. 1.1. Klasyfikacja i filogenetyka. 1.2. Budowa. 2. Transmisja. 3. Zakażenie WNV. 4. Epidemiologia zakażeń wśród ludzi. 4.1. Afryka. 4.2. Ameryka Północna i Południowa. 4.3. Australia. 4.4. Azja i Europa. 5. Epidemiologia zakażeń w Polsce. 6. Objawy zakażenia. 7. Diagnostyka. 8. Leczenie i profilaktyka zakażeń. 9. Podsumowanie

West Nile virus

Abstract: West Nile virus (WNV), an arthropod-borne virus which belongs to the *Flaviviridae* family is maintained in an enzootic cycle between mosquitoes and birds, but it can also infect and cause disease in horses and humans. The WNV was originally isolated in 1937 from blood of a febrile woman in the West Nile province of Uganda. Since its introduction into North America in the New York area in 1999, it has spread throughout the western hemisphere. Since 1994, an increasing number of severe outbreaks affecting the central nervous system have occurred among humans. Clinical presentation ranges from asymptomatic (approximately 80% of cases) to symptomatic neurologic disease (meningitis, encephalitis and poliomyelitis-like syndrome) and death (less than 1% of cases).

1. Introduction. 1.1. Classification and phylogenetics. 1.2. Structure. 2. Transmission. 3. WNV infection. 4. The epidemiology of infections in humans. 4.1. Africa. 4.2. North and South America. 4.3. Australia. 4.4. Asia and Europe. 5. The epidemiology of infections in Poland. 6. Symptoms of infections. 7. Diagnostics. 8. Treatment and prevention of infections. 9. Summary

Słowa kluczowe: Wirus zachodniego Nilu, wirusowe zapalenie mózgu, WNV

Key words: viral encephalitis, West Nile Virus, WNV

1. Wstęp

1.1. Klasyfikacja i filogenetyka

Wirus gorączki zachodniego Nilu (WNV) jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych wirusów należącym do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Flavivirus* [4]. Zaliczany jest do kompleksu wirusa japońskiego zapalenia mózgu (JEV) obejmującego kilka arbowirusów odpowiedzialnych za zapalenie mózgu tj. JEV, wirus zapalenia mózgu Saint-Louis (SLEV), wirus zapalenia mózgu Murray Valley (MVEV), WNV i Kunjin wirus (WNV_{KUN} – Australijski wariant WNV) [63].

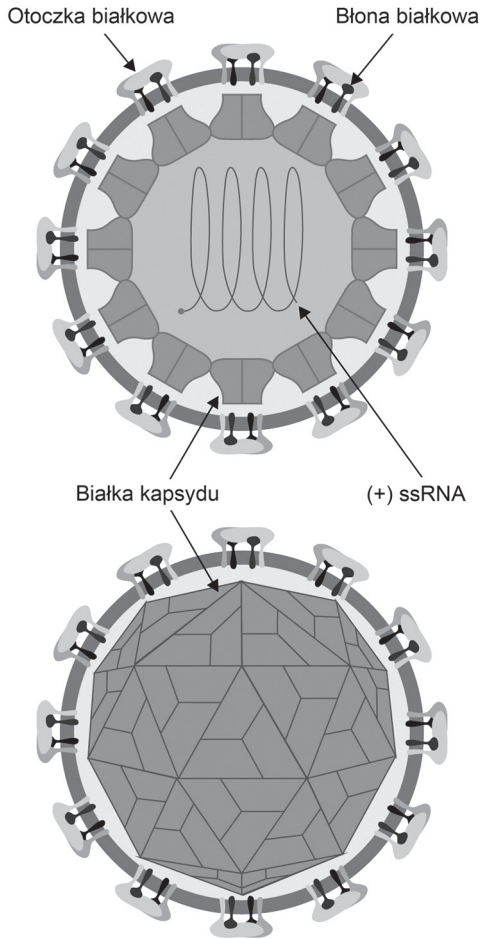
WNV wykazuje wysoki poziom zmienności sekwencji nukleotydowych. Badania nad pokrewieństwem filogenetycznym szczepów pokazują, że występują co najmniej dwa główne genotypy [11, 38] różniące się od siebie o 5–25% nukleotydów [60]: rodowód I i II. Rodowód I jest bardziej rozpowszechniony na świecie i można podzielić go na dwie gałęzie. Gałąź Ia zawiera szczepy z Europy, Afryki, Bliskiego Wschodu i Ameryki. Gałąź Ib to australijskie szczepy wirusa (WNV_{KUN}) [4]. Rodowód II obejmuje jedynie szczepy wirusa z Afryki Subsaharyjskiej i Madagaskaru. Jednak od 2004 r., wiąże się go również z ogniskami epidemiologicznymi w niektórych częściach Europy np. w Hiszpanii i Grecji. Jak

do tej pory rodowód I został najdokładniej przebadany. Rozpowszechniony jest na całym świecie i reprezentowany jest przez genotyp, który w 1999 r. spowodował epidemię w USA (NY99). Niektóre genotypy wydają się bardziej chorobotwórcze aniżeli inne, na przykład NY99 [60]. Rodowód II uważany jest za mniej chorobotwórczy dla ludzi w porównaniu z rodowodem I, który powoduje poważne choroby neurologiczne w tym zapalenie mózgu [13, 38, 60]. Najnowsze badania filogenetyczne wskazują na istnienie jeszcze innych rodowodów [70]. Dwie nowo odkryte linie rozwojowe WNV wykazują znaczne różnice genetyczne w porównaniu do tych dobrze już poznanych i jest to rodowód III i IV. Rodowód III obejmuje szczepy wirusa wyizolowane od komarów *Culex pipiens* na obszarze Republiki Czeskiej i Austrii, natomiast rodowód IV został wyizolowany na terenach Kaukazu [3, 4] i obejmuje on liczne izolaty, po raz pierwszy wykryte w 1988 r. w Rosji [48]. Niektóre dane wskazują na występowanie jeszcze rodowodu V obejmującego szczepy wirusa z Indii [7].

1.2. Budowa

WNV jest niewielkim otoczkowym, jednoniciowym wirusem RNA o dodatniej polarności (średnica 40–60 nm). Zbudowany jest z otoczki białkowej i białek

* Autor korespondencyjny: Zakład Immunopatologii Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Pawińskiego 3c, 02-106 Warszawa; tel. 0 602-757-148; e-mail: mszabl@wp.pl



Rys. 1. Schemat cząsteczki WNV

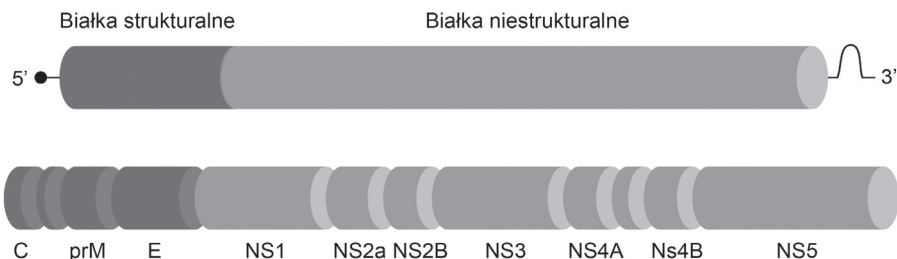
osadzonych w podwójnej warstwie lipidowej. Wewnątrz znajduje się iksaedralny kapsyd, a w nim genom wirusa, zawierający ok. 11 000 par zasad (Rys. 1) [37]. Genom składa się z obszaru nieulegającego translacji 5' (5'UTR), jednej długiej otwartej ramki odczytu i obszaru nieulegającego translacji 3' (3'UTR). Genom koduje trzy białka strukturalne tj. glikoproteinę otoczkową (E), białko kapsydu (C) oraz białko błony (prM) oraz siedem białek niestukturalnych tj. NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5 (Rys. 2). Białka strukturalne są głównie zaangażowane w tworzenie cząstek wirusa, natomiast białka niestukturalne biorą udział m.in. w jego replikacji oraz w unikaniu odporności immunologicznej gospodarza [16, 37, 70]. Najlepiej scharakteryzowane są największe białka niestukturalne

tj. NS3 i NS5. Białko NS3 zawiera helikazę i domeny proteazy, natomiast białko NS5 białka polimerazy RNA i metylotransferazy niezbędne do replikacji wirusa. Pozostałe białka nie są już tak dokładnie opisane; są małe, na ogół hydrofobowe i pełnią różnorodne funkcje. Wykazano, że glikozylowane białko NS1 nie bierze udziału w replikacji wirusa [7]. Jest ono wydzielane przez zainfekowane komórki, a jego funkcja nie jest do końca poznana. Ostatnie badania ujawniły zaangażowanie białka NS1 w modulację szlaków sygnałowych wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [83]. Ponadto zaobserwowano, że białko to może być również powiązane z neuroinfekcyjnymi właściwościami WNV [79].

Cykl życiowy flawowirusów składa się z 4 podstawowych etapów: adsorpcja/wnikanie, translacja, replikacja i składanie wirionów/uwalnianie. WNV wnika do komórek poprzez endocytozę za pośrednictwem receptorów (DC-SIGN, $\alpha\beta 3$ integryny oraz białka wiążącego lamininę) i jest transportowany do endosomów [15, 70]. Zmiany konformacyjne w białku E doprowadzają do połączenia wirusowej i endosomalnej membrany. Dzięki temu nukleokapsyd wirusa uwalniany jest do cytoplazmy. Replikacja genomu wirusa, jak również składanie wirionów następuje w retikulum endoplazmatycznym, po czym wirusy potomne są uwalniane przez egzocytozę [70].

2. Transmisja

WNV przenoszony jest głównie przez ukąszenia zakażonych komarów [15, 84]. Transmisja wirusa możliwa jest dzięki obecności receptorów na komórkach śródbrzońka jelita środkowego komara oraz zdolności wirusa do przedostawania się z jelita środkowego do gruczołów ślinowych, gdzie ulega on replikacji [64]. Chociaż WNV można zarazić się od różnych gatunków komarów (wykryto go u 60 gatunków komarów), to wydaje się, że mniej niż 10 z nich odgrywa znaczącą rolę w jego transmisji [14, 25, 60]. Większość z nich jest z rodziny *Culex*. WNV stwierdzono również u komarów gatunku *Culex pipiens*, które żywią się krwią ludzką, dlatego to właśnie one mogą być głównym wektorem infekowania ludzi [23]. W północnych regionach Stanów Zjednoczonych gatunek



Rys. 2. Schemat genomu WNV

Culex pipiens jest głównym wektorem wirusa i wydaje się być odpowiedzialny za większość jego transmisji [6]. W centralnych i zachodnich częściach USA transmisja wirusa jest najczęściej spowodowana przez gatunek *Culex tarsalis*, a w południowych regionach kraju przez gatunek *Culex p. quinquefasciatus* [5, 20]. W Europie w roku 2008, z pośród ponad 10.000 zakażonych komarów z obszarów delty Dunaju, 82% stanowiły trzy główne gatunki: *Culex pipiens* (44%), *Culex torrentium* (27%) i *Culex modestus* (11%). Gatunkami najczęściej powodującymi zakażenia u ludzi były: *Culex modestus* (35%) i *Culex richardii* (34%), natomiast *Culex pipiens* stanowił mniej niż 2% [68].

Na obszarach gdzie występują zainfekowane komary, 1 na 100–1000 owadów faktycznie jest zakażony WNV [24]. Transmisja wirusa z człowieka na komara jest niemożliwa, ponieważ ilość wirusa w ludzkiej surowicy krwi jest zbyt niska [70]. Natomiast u jednej osoby na 100 ukąszonych przez zakażonego wirusem komara może rozwinąć się ciężkie zakażenie [24].

WNV został wyizolowany z krwi co najmniej 30 różnych gatunków kręgowców, w tym zwierząt hodowlanych, domowych oraz dzikich. Może powodować zakażenia np. u koni, wiewiórek, psów, kotów [64, 78], ale również niedźwiedzi brunatnych, aligatorów, węży czy też wilków [80]. Głównym jego gospodarzem są natomiast ptaki. Wirus jest chorobotwórczy dla wielu gatunków dzikich ptaków wędrownych, drapieżnych oraz drobiu. Odnotowano go u ponad 300 gatunków ptaków [15, 60]. Rezerwuarem wirusa w środowisku jest dzikie ptactwo w tym ptaki krukowate np. wrony, kruki oraz ptaki drapieżne np. jastrzębie, sokoły, sowy. Za rozprzestrzenianie się wirusa na całym świecie odpowiedzialne są głównie ptaki drapieżne, dlatego WNV jest obecny w Ameryce Północnej, Południowej i Centralnej, Afryce, Australii, Azji i Europie [46]. Wykazano, że niektóre ptaki charakteryzują się opornością na wirusa (np. indyki), natomiast inne tj. wrony są na niego bardzo wrażliwe. Intensywność wirerii, czas jej trwania oraz sam przebieg zakażenia może być różny u różnych gatunków [13]. Wrony, sroki, wróble oraz zięby wydają się posiadać najwyższe stężenia wirusa we krwi oraz najdłuższy czas trwania wirerii [64]. W 3–7 dni po zakażeniu WNV, miano wirusa u ptaków jest na tyle wysokie, aby zakazić krwiopijne komary [79]. Większość przypadków zakażenia wirusem wśród ptaków jest bezobjawowa, jednak epidemia, która miała miejsca w 1999 r. w USA spowodowała bardzo dużą śmiertelność [40].

3. Zakażenie WNV

Wirus najczęściej przenoszony jest na człowieka za pośrednictwem ugryzienia zakażonego komara. Występują również udokumentowane przypadki rozprze-

strzenia się wirusa wśród ludzi poprzez transfuzję krwi, przeszczepy narządów [10], wewnątrzmaciczne zakażenia płodu [2] oraz karmienie piersią. W 2000 r. zidentyfikowano 23 przypadki zakażenia WNV po transfuzji preparatów krwiopochodnych [59]. Konsekwencją tego było opracowanie testów amplifikacji kwasów nukleinowych wykorzystywanych do badania produktów krwiopochodnych [34, 61, 75]. W 2007 r. FDA zatwierdziła test przesiewowy do wykrywania zakażeń WNV dla dawców organów [41].

Wirus początkowo rozmnaża się w gruczołach ślinowych komara, skąd po ukąszenia przenika do keranocytów człowieka. Powoduje to zainfekowanie komórek dendrytycznych takich jak komórki Langerhansa, które migrują do węzłów chłonnych, gdzie następuje replikacja wirusa [15, 70]. Wkrótce potem wirus rozprzestrzenia się w tkankach prowadząc do przejściowej wirerii, która zazwyczaj kończy się wraz z produkcją przeciwciał IgM anty-WNV [8]. Wirus może infekować organy wewnętrznych tj. nerki i śledzionę, w których replikuje się odpowiednio w komórkach nabłonka oraz makrofagach [43]. Zaobserwowano, że wirus wykrywany jest w moczu już po 8 dniach po pojawieniu się pierwszych objawów u pacjentów z zapaleniem mózgu [76]. W zależności od poziomu wirerii WNV może przekroczyć barierę krew-mózg i zainfekować ośrodkowy układ nerwowy (OUN) powodując poważne choroby neurologiczne [15, 43, 70]. Wykazano, że transmisja wirusa do OUN może następować już po upływie 1 tygodnia [79]. Istnieje kilka przypuszczalnych mechanizmów wnikania WNV do OUN. Mechanizm, dzięki któremu flawowirusy przekraczają barierę krew-mózg i powodują zakażenie OUN nie został jeszcze w pełni poznany. Uważa się, że jednym z nich może być bierny transport przez śródbłonek lub komórki spłotu naczyniowego. Kolejne to możliwość bezpośredniego infekowania neuronów węchowych, transport wirusa przez zakażone komórki przede wszystkim do OUN, bądź bezpośredni wsteczny transport z zainfekowanych neuronów obwodowych. U ludzi WNV najczęściej wykrywano w neuronach kory mózgowej, wzgórza, mózgowia, zwojach podstawy mózgu, mózdzku i rdzenia kręgowego [43]. Niektóre badania wykazują, że współistnienie nadciśnienia tętniczego i choroby naczyń może predysponować do zakażenia WNV przebiegającego z neuroinfekcją [47, 53, 54].

Leukocyty aby dostać się do miąższu mózgu muszą przejść dwie bariery: ścianę śródbłonek naczyniowego i warstwę komórek glejowych, pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń okołonaczyniowa, zbiorczo określana jako bariera krew-mózg (BBB). Większość naciekających leukocytów jest zatrzymywana w przestrzeni okołonaczyniowej, ale czynniki regulujące ten proces nie zostały jeszcze wyjaśnione [43]. Natomiast zostało dowiedzione, że cząsteczki adhezji międzykomórkowej

(ICAM-1), czynnik hamujący migrację makrofagów (MIP) i metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9 (MMP-9) są zaangażowane w zmiany przepuszczalności BBB podczas zakażenia WNV [70]. Rozpoznanie WNV przez receptor TLR3 znajdujący się na monocytach / makrofagach prowadzi do produkcji MMP-9 i czynnika martwicy nowotworu alfa (TNF- α), co powoduje wzrost przepuszczalności śródbłonna naczyń i umożliwia wnikanie WNV oraz komórek układu odpornościowego do mózgu. Zakażone komórki glejowe i neurony uwalniają mediatory neurotoksyczne, co prowadzi do śmierci neuronów, w których pośredniczą kaspaza-3 i kaspaza-9 [43]. Wysokie miano wirusa ułatwia jego wnikanie i rozprzestrzenianie się w obrębi mózgu [43].

4. Epidemiologia zakażeń wśród ludzi

4.1. Afryka

W 1937 r. w prowincji Zachodniego Nilu w Ugandzie potwierdzono pierwsze zakażenie człowieka WNV, kiedy to z surowicy krwi kobiety z nierozpoznaną chorobę przebiegającą z wysoką gorączkową wyizolowano szczep B 956 [74]. Udokumentowano występowanie epidemii również w kilku afrykańskich krajach. Największa wystąpiła w 1974 r. w Republice Południowej Afryki; gdzie zachorowało 18 tysięcy ludzi. Chorobie towarzyszyła gorączka, ból głowy, mięśni, brak łaknienia, bóle brzucha i wymioty. Nie obserwowano żadnych przypadków zająęcia OUN ani zgonów. Pierwsze zakażenia WNV, któremu towarzyszyły zaburzenia neurologiczne zaobserwowano w 1957 r. [52, 64]. Do połowy lat 90 WNV wiązany był z niewielkim ryzykiem ciężkich zachorowań u ludzi, jednak od tego czasu patogenność wirusa uległa zmianie. Zaczęto obserwować coraz częstsze przypadki zakażeń manifestujących się ciężkimi zaburzeniami neurologicznymi. Pierwsze śmiertelne przypadki zapalenia mózgu w przebiegu zakażenia WNV odnotowano w 1994 r. w Algierii [15, 64].

4.2. Ameryka Północna i Południowa

W 1999 r. zaobserwowano pierwszą epidemię WNV w Ameryce Północnej, miała ona miejsce w Nowym Jorku. Odnotowano wtedy wiele zakażeń wśród ptaków, koni, jak również ludzi [40]. Ilość bezobjawowych zakażeń oszacowano na 8200 przypadków, a ilość objawowych zakażeń na 1700. Zająęcie OUN zaobserwowano u 62 pacjentów z czego 7 zmarło [51]. W latach 2000 i 2001 ilość neuroinfekcji i zgonów z powodu zakażenia WNV była porównywalna do roku 1999, ale uległa zwiększeniu od 2002 r., kiedy to odnotowano ponad 4 150 przypadków zakażenia OUN w tym 284 zgony

[55]. Następnie wirus objął całą Amerykę Północną, a pierwsze przypadki zakażenia WNV wśród mieszkańców Kanady zostało udokumentowane w 2002 r. W ciągu 10 lat wirus rozprzestrzenił się we wszystkich 48 stanach USA oraz w Meksyku, na Karaibach i w Ameryce Południowej. Ze względu na coraz większy zakres terytorialny zakażeń spowodowanych przez WNV ilość zgonów w USA stale wzrasta [16]. W latach 1999–2010 w Stanach Zjednoczonych odnotowano ponad 30 000 potwierdzonych przypadków zakażenia WNV, z czego ponad 1000 zakończyło się śmiercią [15]. Większość (ok 85%) zakażeń WNV u ludzi w USA występuje późnym latem ze szczytem w sierpniu i wrześniu, co jest odzwierciedleniem sezonowej aktywności komarów oraz wiremii u ptasich gospodarzy, która następuje wiosną i wczesnym latem. W cieplejszych rejonach USA transmisja wirusa występuje praktycznie przez cały rok [16].

4.3. Australia

W Australii występuje głównie jeden szczep wirusa – WNV_{KUN}. Powoduje on łagodne infekcje u koni, natomiast u ludzi odnotowano jedynie sporadyczne infekcje, głównie w północnej części kontynentu [22]. W latach 2004–2005 odnotowano cztery przypadki WNV_{KUN} wśród ludzi [67]. W latach 2007–2008 opisano tylko jeden przypadek u turysty z Izraela, który prawdopodobnie został zainfekowany na Bliskim Wschodzie [69]. W kolejnych latach (2009–2010) zakażenie WNV_{KUN} spowodowało śmierć dwóch pacjentów, z czego jeden miał objawy neuroinfekcji [21]. Na początku 2011 r. w południowo-wschodniej Australii odnotowano epidemię zakażeń WNV_{KUN}, która spowodowała ponad 1000 przypadków końskiego zapalenia mózgu. Choć epidemia ta była krótkotrwała to doprowadziła do śmiertelności 10–15% zainfekowanych koni. W tym czasie zaobserwowano tylko jeden przypadek łagodnej infekcji wirusa wśród ludzi, natomiast ciężkich przypadków w ogóle nie odnotowano [19].

4.4. Azja i Europa

Pierwsze epidemie WNV na kontynencie azjatyckim odnotowano w Izraelu w 1951 r. i 1952 r., a następne w 1957, 1962 i 1980 [52, 64]. W kolejnych latach WNV rozprzestrzenił się w Pakistanie i Indonezji. W Europie po raz pierwszy wirusa wyizolowano od chorych pacjentów w deltach Rodanu i Wołgi w 1963 r. [66]. W latach 1963–1993, kilka szczepów WNV zostało wyizolowanych z kleszczy, ptaków i komarów w południowej części Rosji i zachodniej Syberii. W tych samych regionach stwierdzono obecność przeciwciał anti-IgG u 0,4–4% populacji. Przypadki kliniczne infekcji WNV notowano w obwodzie astrachańskim, gdzie aż u do 8%

zdrowej populacji wykazywało obecność przeciwciał anti-WNV [44]. Do 1990 r. WNV pojawiał się w wielu krajach zachodniej Europy (Włochy, Francja, Portugalia i Hiszpania), jak również centralnej i wschodniej (Rosja, Rumunia, Ukraina, Słowacja).

Jedną z największych epidemii miała miejsce latem w 1996 r. w Rumunii w regionie Bukaresztu i 14 okolicznych powiatach w dolnym rejonie doliny Dunaju [13]. Szczyt epidemii przypadł na okresie od lipca do października. Zaobserwowano 835 klinicznych przypadków zakażeń układu nerwowego wymagających hospitalizacji. W 77% przypadków stwierdzono obecność przeciwciał anti-WNV; z czego 40% chorych miało zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, 44% zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych a 16% zapalenie mózgu. Zarejestrowano 17 zgonów pacjentów powyżej 50 r.ż., co stanowiło 4,3% śmiertelności [13, 77].

Kolejna epidemia miała miejsce w Rosji w aglomeracjach miejskich: Wołgograd i Wolczki usytuowanych na przeciwległych brzegach Wołgi w 1999 r. i podobnie jak w Rumunii wystąpiła w sezonie letnim. Większa część przypadków zachorowań (65%) występowała na terenie Wołgogradu. Szczyt epidemii przypadł w okresie od sierpnia do września. Z 826 hospitalizowanych pacjentów u 480 zaobserwowano neurologiczne objawy, u 394 chorych retrospektywnie potwierdzono obecność przeciwciał IgM dla WNV. 40 osób zmarło z powodu ostrego aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. Większość zgonów nastąpiła w ciągu 10 dni lub więcej od momentu wystąpienia klinicznych objawów zapalenia mózgu u pacjentów powyżej 60 r.ż. [65].

W kolejnych latach w Europie zaobserwowano sporadyczne przypadki zakażenia WNV u mieszkańców Portugalii, Hiszpanii, Francji, Czech, Węgier, Włoch oraz Rosji [45]. W 2010 r. zaobserwowano epidemię zakażeń WNV w Grecji gdzie potwierdzono ponad 250 przypadków choroby ze współtowarzyszącymi zaburzeniami neurologicznymi, z czego ponad 30 zakończyło się śmiercią [58]. W tym samym roku odnotowano prawie 500 przypadków zakażeń WNV w Rosji i ponad 50 przypadków w Rumunii [15]. W tym samym roku infekcje WNV miały miejsce w Izraelu i Turcji. Odnotowano 417 przypadków gorączki zachodniego Nilu (WNF) w Izraelu, z czego większość występowała w centralnej i zachodniej części kraju. Zakażenie centralnego układu nerwowego zaobserwowano u 170 z 233 pacjentów hospitalizowanych [82]. W Turcji odnotowano 47 przypadków zakażeń WNV, w tym 12 laboratoryjnie potwierdzonych i 35 niepotwierdzonych. U 40 pacjentów wykryto neuroinfekcje, a 10 pacjentów zmarło. Pacjenci pochodzili głównie z zachodniej części kraju [33].

Od lipca do listopada 2011 roku odnotowano 96 przypadków infekcji WNV w Europie, z czego 69 przypadków występowało w Grecji, 14 we Włoszech i 10

w Rumunii. W sąsiednich krajach odnotowano 189 przypadków zakażeń WNV (2 w Albanii, 4 w Bułgarii, 33 w Izraelu, 136 w Rosji, 3 w Tunezji, 3 Turcji i 8 na Ukrainie [33]).

5. Epidemiologia zakażeń w Polsce

W wielu krajach europejskich (Włochy, Francja), a także u sąsiadów Polski (Czechy, Słowacja, Ukraina i Białoruś) obserwowano pojedyncze przypadki zakażeń WNV nie tylko u komarów czy zwierząt, ale również u ludzi [36]. Dlatego też jest prawdopodobne, że WNV dotarł również do Polski, gdzie transmisja wirusa jest możliwa latem w czasie upałów, zwłaszcza na terenach południowo-wschodnich [27, 35]. Pierwsze badania oceniające występowanie WNV w Polsce były przeprowadzone w latach 1995–1996. Oceniano w nich występowanie przeciwciał anti-WNV wśród wróbli domowych i mazurków na obrzeżach Puszczy Kampinoskiej w Łomiankach. Wykazano, że 2,8% wróbli domowych i 12,1% mazurków posiadało przeciwciała [32], co potwierdza transmisję wirusa u miejscowych ptaków na tym terenie. W 2006 r. wykonano badania przeciwciał anti-WNV u prawie 100 dzikich ptaków należących do 10 gatunków i wykazano, że 5,2% było seropozytywnych (3 bociany, 1 wrona i 1 łabędź) [29]. W przeciwieństwie do tych danych, badania przeprowadzone w Zakładzie Chorób Wirusowych Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach obejmujących ponad 1600 dzikich ptaków na obszarze całego kraju nie potwierdziły obecności materiału genetycznego WNV [71]. Badania te kontynuowano w następnych latach z podobnym rezultatem – nie wykryto materiału genetycznego WNV u żadnego spośród 2140 ptaków [57].

Brak doniesień wskazujących na zakażenia WNV u ludzi w Polsce do 2003 r. był związany z faktem braku rutynowej diagnostyki w tym kierunku. Obraz kliniczny zakażenia WNV jest dość niecharakterystyczny i może być mylony z zakażeniem wywołanym przez wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV) [27, 36]. Dlatego w 2003 r. zespół ekspertów powołanych przez Głównego Inspektora Sanitarnego wskazał na możliwe ryzyko występowania WNV na terenie Polski i w efekcie powstanie trwałego ogniska endemicznego. Spowodowało to wydanie zaleceń dotyczących zakupu testów diagnostycznych i włączenia ich do rutynowej diagnostyki w przypadku wystąpienia zapalenia mózgu i rdzenia oraz innych zachorowań o nieznanym etiologii u ludzi. Zalecono również regularne badania i monitorowanie występowania arbowirusów w populacji komarów w Polsce [35, 36].

Pierwszy przypadek zakażenia WNV u ludzi w Polsce potwierdzono w 2005 r. w Klinice Chorób Zakaźnych

i Neuroinfekcji Akademii Medycznej w Białymstoku u 55-letniej kobiety, która była hospitalizowana z powodu objawów gorączki utrzymującej się od 2 tygodni. Etiologię zakażenia potwierdzono przez wykrycie przeciwciał anti-WNV klasy IgM w surowicy krwi. Przypadek ten potwierdza występowanie WNV wśród ludzi na terenie Polski [27]. W tym samym roku przeprowadzono badania na grupie 75 chorych ze stanami gorączkowymi jak również 93 pracowników leśnych z terenu województwa podlaskiego (41 osoby) i świętokrzyskiego (52 osoby). Badania wykonano za pomocą testów ELISA oraz immunofluorescencji (IFA). W testach ELISA stwierdzono obecność przeciwciał anti-WNV klasy IgM u jednej osoby. Obecność przeciwciał anti-WNV klasy IgG zaobserwowano u 28,85% z województwa świętokrzyskiego i 34,14% z województwa podlaskiego. Po wykonaniu IFA pozytywne wyniki zaobserwowano natomiast u 5 pracowników leśnych z pośród 29, którzy byli dodatni w testach ELISA. Uzyskane wyniki dowodzą, że pomimo stosunkowo chłodnego klimatu komary mogą powodować rozprzestrzenianie się WNV z migrującego ptactwa na populację ludzką [36].

6. Objawy zakażenia

Okres inkubacji zakażeń WNV u ludzi trwa od 2 do 14 dni od ukąszenia komara. W większości przypadków (75–80%) zakażenie WNV jest bezobjawowe. W pozostałych przypadkach może manifestować się gorączką, złym samopoczuciem, zmęczeniem, bólem oczu, głowy, mięśni, dolegliwościami żołądkowo-jelitowymi oraz niekiedy wysypką [9, 28]. Klinicznie zakażenie WNV najczęściej powoduje WNF charakteryzującą się łagodnymi objawami podobnymi do grypy [51, 62, 81]. W niewielkiej ilości przypadków zakażenia WNV (ok. 1–5%) mogą rozwinąć się choroby neurologiczne tj. zapalenie mózgu, zapalenie opon mózgowych lub ostre porażenie wiotkie (AFP) [43, 49]. Zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych spowodowane przez WNV charakteryzuje się szybko pojawiającym się bólem głowy, bólem pleców, światłowstrętem, dezorientacją i gorączką [70]. Pacjenci ze stwierdzonym zapaleniem mózgu mogą mieć dodatkowe objawy kliniczne: zmieniony poziom świadomości, dezorientację oraz ogniskowe objawy neurologiczne np. dyzartria, drgawki, drżenia, ataksja, ruchy mimowolne czy też parkinsonizm (np. niestabilność postawy i spowolnienie ruchowe), co wskazuje na zakażenie populacji komórek układu nerwowego znajdujących się np. w istocie czarnej pnia mózgu, jądrze podstawnym i mózdzku. Wszystkie te cechy kliniczne zaobserwowano również u pacjentów z innymi zakażeniami spowodowanymi przez wirusy z rodzaju *Flavivirus*, co może rodzić problemy w odróżnieniu czynnika sprawczego

powodującego zakażenie. Większość pacjentów z WNF całkowicie powraca do zdrowia w czasie od kilku dni do kilku miesięcy, jednakże pacjenci z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych i/lub zapaleniem mózgu mają zdecydowanie gorsze rokowanie [37].

AFP u pacjentów zakażonych WNV manifestuje się nagłym, szybko postępującym, zwykle osiągając *plateau* w ciągu godziny porażeniem. Zazwyczaj jest asymetryczny i może obejmować jedną lub więcej kończyn. Zespołowi mogą towarzyszyć bóle mięśni w okolicy krzyżowej i / lub nieprawidłowości związane z funkcjonowaniem jelit. Niektórzy pacjenci z AFP mają wczesne objawy WNF, niekiedy z objawami zapalenia opon mózgowych lub zapalenia mózgu, jednak u większości pacjentów porażenie nie jest poprzedzone żadnymi objawami [1, 37, 49].

Objawy ze strony nerwów czaszkowych są częste u pacjentów z chorobą obejmującą zakażenie układu nerwowego. Choroba może spowodować m.in. zawroty głowy, oczopląs jak również rhabdomyolizę czy zapalenie mięśni. Wielu pacjentów skarży się na niewyraźne lub zaburzone widzenie i światłowstręt. W niektórych przypadkach obserwuje się również zapalenie mięśnia sercowego, trzustki, wątroby i jąder. W kilku przypadkach zakażenia WNV w Afryce i w USA zaobserwowano zagrażający życiu zespół krwotoczny [1, 37].

Długotrwałe następstwa (trwające rok bądź dłużej) występują u ponad 50% pacjentów z zajęciem OUN [28]. Najczęściej należą do nich: zmęczenie i osłabienie, bóle mięśniowe, stawowe, bóle głowy, a także powikłania neurologiczne tj. zaburzenia psychiczne, depresja, drgawki, zaburzenia pamięci i koncentracji [70]. 1 na 150 zakażonych rozwija ciężkie i potencjalnie śmiertelne postaci choroby. Badania epidemiologiczne wskazują, że częstość występowania zakażeń WNV, jak i nasilenie objawów klinicznych choroby wzrasta wraz z wiekiem, kiedy to spada naturalna odporność organizmu [51, 56, 77]. Śmiertelność podczas epidemii WNV wynosi od 4% do 15% [1], natomiast całkowita liczba przypadków śmiertelnych wśród hospitalizowanych pacjentów z powodu zapalenia mózgu wynosi ok. 10%. Zakażenia WNV związane z chorobami układu nerwowego występują rzadko u zdrowych pacjentów poniżej 30 r.ż. [1]. W dwóch niezależnych badaniach oszacowano 20-krotny wzrost ryzyka neuroinwazyjnej choroby i śmiertelności u pacjentów powyżej 50 r.ż. [30, 56]. Śmiertelność wzrasta wraz z wiekiem i wynosi ona 15–29% u pacjentów powyżej 70 r.ż. Pacjenci z zapaleniem mózgu są często starsi od tych, którzy rozwijają zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub AFP [1]. Zaobserwowano że, większe ryzyko zachorowania mają również pacjenci po przeszczepach narządów, z cukrzycą oraz chorobami autoimmunologicznymi [72]. Dane te sugerują, że prawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy ma zasadnicze znaczenie dla

kontroli zakażenia WNV [53]. Zakłada się, że przebycie zakażenia WNV prowadzi do trwałej odporności na zakażenie. Dotychczas nie ma dowodów na nawracające lub przewlekłe zakażenie wirusem [85].

7. Diagnostyka

W grupie pacjentów z objawami klinicznymi zapalenia mózgu, zwłaszcza współistniejącymi z gorączką i bólami głowy, należy wziąć pod uwagę rozpowszechnienie występowania komarów, zakażeń WNV oraz porę roku. Podejrzenie zakażenia WNV należy rozważyć zwłaszcza u osób starszych w sezonie zwiększonej aktywności komarów, jednak trzeba mieć na uwadze, że zakażenie może występować w każdym wieku i o każdej porze roku [62].

Najczęściej stosowanymi metodami diagnostycznymi są badania serologiczne oraz te oparte na wykrywaniu kwasu nukleinowego wirusa zarówno w surowicy krwi jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) [16]. Po zakażeniu WNV produkowane są przeciwciała zarówno IgM jak i IgG. Wykrywanie przeciwciał IgM w surowicy krwi i PMR jest najczęściej stosowaną metodą diagnostyczną. W większości przypadków przeciwciała IgM wykrywane są w ciągu 4 do 7 dni od zakażenia aż do roku. Wykonanie testów w pierwszych 8 dniach choroby wykazuje dużą czułość (ok. 90%). Fałszywie ujemne wyniki mogą być spowodowane zbyt wczesnym lub zbyt późnym pobraniem materiału. Badania wykonane w pierwszych 72 godzinach jak również po 21 dniach mogą dawać fałszywie ujemne wyniki [26, 37]. Najlepsze rezultaty oznaczenia uzyskuje się podczas pobrania materiału między 8, a 21 dniem od pojawienia się pierwszych objawów zakażenia [26]. Obecność przeciwciał IgM w PMR (przeciwciała IgM nie przenikają bariery krew-mózg, więc ich obecność w PMR wyraźnie sugeruje infekcję OUN), jak również czterokrotny wzrost ich miana w surowicy krwi może być podstawą do potwierdzenia zakażenia WNV [37]. Przeciwciała IgG są wykrywane od ok. 8 dnia od wystąpienia objawów i mają ograniczone zastosowanie w diagnostyce zakażeń WNV. Do wykrywania przeciwciał anty-WNV często stosowane są testy immunoenzymatyczne (ELISA), które są szybkie [16]. Najczęściej wykorzystywanymi testami ELISA są te wykrywające przeciwciała IgM tzw. MAC-ELISA i pośrednie testy wykrywające przeciwciała IgG. MAC-ELISA umożliwia diagnozowanie ostrych infekcji dzięki wykrywaniu wczesnych przeciwciał w surowicy krwi oraz PMR. Szacunkowa czułość tych testów wynosi 91,7%, a swoistość 99,2% [14].

Testem opartym na wykrywaniu wirusowego RNA jest reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkryptazą (RT-PCR – *Reverse Transcriptase-Polymerase*

Chain Reaction). Mimo swojej wysokiej specyficzności testy te posiadają niską czułość. Związane jest to z tym, że wirus szybko przemija i często poprzedza wystąpienie objawów klinicznych. Ze względu na to testy te są zdecydowanie rzadziej stosowane w diagnostyce WNV [16]. Najczęściej stosowaną metodą wykrywania WNV jest kombinacja reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą i analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym (Real-time RT-PCR). Real-time RT-PCR jest stosowany od 2003 r. jako szybka i niezawodna metoda przesiewowa wykrywania WNV u ludzi [39]. Metoda ta posiada wiele zalet: jest bardziej czuła i swoista w porównaniu do zwykłego RT-PCR. Najczęściej wykorzystuje detektory niespecyficzne – SYBR Green ze względu na prostotę i niski koszt. Jednak ze względu na to, że wiąże każde dwuniciowe DNA, może doprowadzić do odczytu nieswoistych produktów PCR i „primer-dimers”. Alternatywą jest zastosowanie detektorów specyficznych tj. sonda Taq Man [15]. Zastosowanie Nested RT-PCR powoduje 10-krotny wzrost czułości w porównaniu do zwykłego RT-PCR, ale technika ta jest obciążona większym ryzykiem zanieczyszczenia, a więc uzyskaniem fałszywie dodatnich wyników [73].

Wiele chorób neurologicznych ma bardzo podobne objawy do zakażenia WNV, w tym zapalenie mózgu powodowane przez np. JEV, MVEV czy też TBEV. Uzyskanie pojedynczego dodatniego wyniku testu nie zawsze jest jednoznaczne z potwierdzeniem zakażenia WNV gdyż mogą wystąpić reakcje krzyżowe z innymi flawowirusami. Dlatego powtórzenie oznaczenia po 2 tygodniach jest kluczowe do potwierdzenia zakażenia WNV. Takie postępowanie jest wymagane zwłaszcza u pacjentów z niewyjaśnioną gorączką lub ekstremalnych bólach głowy. W celu odróżnienia diagnostyki etiologii zapalenia mózgu/opon mózgowo-rdzeniowych stosuje się serologiczne testy laboratoryjne (np. ELISA) [37, 70].

U pacjentów z zapaleniem mózgu spowodowanym przez WNV obserwuje się zwiększoną ilość limfocytów i podwyższony poziom białka w PMR. W wczesnej fazie choroby obserwuje się również zwiększoną ilość neutrofilów we krwi ($\geq 50\%$), podobnie jak w PMR [37, 85]. U pacjentów z neuroinwazyjnym zakażeniem WNV ponad 40% komórek w PMR stanowią neutrofile [70]. Pacjenci zarówno z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, jak i z zapaleniem mózgu mają podobną plejocytozę w PMR, choć zazwyczaj w zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych obserwuje się wyższe stężenia białka całkowitego [37, 85].

Tomografia komputerowa (CT) w większości przypadków zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych jest prawidłowa. Natomiast obraz widoczny w badaniu rezonansem magnetycznym (MRI) w ponad jednej trzeciej przypadków jest nieprawidłowy. Obraz może naśladować procesy demielinizacyjne obserwowane

m.in. w stwardnieniu rozsianym, ostrym rozsianym zapaleniu mózgu i rdzenia oraz wirusowych zapaleniach mózgu o innej etiologii [85].

8. Leczenie i profilaktyka zakażeń

Możliwości leczenia chorych z zakażeniem WNV są ograniczone. Powszechnie stosowane jest jedynie leczenie objawowe. Obecnie nie ma skutecznych leków przeciwwirusowych przeciwko WNV, mimo prowadzonych wielu badań klinicznych [70]. W badaniach *in vitro* stwierdzono efektywność stosowania interferonu typu I (IFN- α i IFN- β) i wysokich dawek rybowiryryny (od 50–60 do 100 μ M) [16, 31]. Skuteczność IFN została potwierdzona w leczeniu zakażeń spowodowanych przez różne flawowirusy, w tym również WNV [16, 17]. Dane wskazują, że leczenie IFN może zmniejszyć powikłania towarzyszące zapaleniu mózgu u ludzi spowodowanym przez wirus St Louis. IFN został również wykorzystany do leczenia małej liczby przypadków zapalenia mózgu spowodowanego przez WNV [16, 42]. Niektóre badania kliniczne potwierdzają skuteczność zastosowania rybowiryryny w leczeniu zakażeń WNV, jednak część z nich sugeruje, że jej stosowanie może tylko powodować wzrost śmiertelności, co obserwowano na modelu zwierzęcym [50]. Ponadto, w okresie epidemii WNV w Izraelu w 2000 r., 37 pacjentów otrzymywało rybowiryrynę i w grupie tej odnotowano wysoką śmiertelność – 41% [12]. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem swoistych przeciwciał przeciw WNV. Jednak ich zastosowanie wydaje się być mało przydatne w terapii gdyż zazwyczaj nieznanym jest dokładny moment zakażenia, a większość pacjentów zgłasza się do lekarza dopiero po wystąpieniu objawów zakażenia. Swoiste przeciwciała mogą być przydatne u osób po wyraźnej ekspozycji na zakażenie np. zakłucie igłą [18].

Prewencja zakażeń WNV opiera się przede wszystkim na unikaniu kontaktu z komarami podczas ich największej aktywności. Jeśli nie jest to możliwe, to należy przynajmniej ograniczyć możliwość ukąszeń przez zastosowanie środków odstraszających komary oraz właściwej odzieży wierzchniej. Na obszarach, gdzie istnieje duże prawdopodobieństwo występowania zakażeń WNV, powinien być prowadzony monitoring zakażeń ptaków. WNV jest wrażliwy na typowe środki dezynfekcyjne [57]. Ulega neutralizacji poprzez działanie np. podchlorynu sodu (500–5000 ppm chloru), 2–3% nadtlenu wodoru, 2% aldehydu glutarowego, 3–8% formaldehydu, etanolu oraz 1% jodu. Inaktywowany jest również przez UV i promieniowanie gamma, jak również ciepło (30 min. w temperaturze 56°C) [1, 57].

Szczepionki przeciw wirusom z rodziny *Flaviviridae* dostępne są tylko przeciw wirusowi żółtej febry, JEV

oraz TBEV [37]. Jak do tej pory FDA nie wydała licencji do stosowania szczepionki przeciw WNV u ludzi [70]. W USA od 2002 r. powszechnie stosuje się natomiast szczepienia przeciw WNV u koni [13].

9. Podsumowanie

WNV przez długi okres (aż do roku 1990) uważany był za jeden z mniej patogennych flawowirusów. Epidemie były nieliczne i towarzyszyła im niska śmiertelność, a przebieg kliniczny choroby był zazwyczaj łagodny. Jednak, na przestrzeni ostatnich lat wirus dynamicznie dostosował się do różnych gospodarzy i środowisk powodując zakażenia nie tylko u zwierząt, ale również u ludzi. Większość zakażeń przebiega bezobjawowo lub powoduje grypo-podobne objawy, jednak coraz częściej WNV doprowadza do rozwoju epidemii w Europie. Wielokrotnie zakażenie przebiega z zajęciem OUN, które może prowadzić do rozwoju zapalenia mózgu, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych oraz ostrego porażenia wiotkiego, a w niektórych przypadkach nawet do śmierci. Pojedyncze doniesienia sugerują, że WNV dotarł również do Polski. Przeciwciała anti-WNV wykryto u niektórych ptaków jak również u pojedynczej pacjentki, co sugeruje, że WNV mógłby być czynnikiem sprawczym zakażeń w tym również zapalenia mózgu, zwłaszcza w miesiącach letnich. Należy jednak zwrócić uwagę, że badania przeciwciał anti-WNV jest mniej specyficzne niż wykrywanie materiału genetycznego wirusa ze względu na możliwe fałszywie dodatnie wyniki na terenach gdzie zakażenia innymi flawowirusami są częste jak w Polsce. Największe badania epidemiologiczne w Polsce wykonane na dużej populacji ptaków nie potwierdzają obecności materiału genetycznego WNV co pozostawia pod znakiem zapytania obecność zakażeń WNV w Polsce. Dlatego niezbędne jest wprowadzenie metod diagnostycznych wykrywających WNV u pacjentów z neuroinfekcjami, nie tylko w oparciu o badania serologiczne ale również metody wykrywania wirusowego RNA. Unikanie komarów będących nosicielami wirusa jest na dzień dzisiejszy podstawową metodą profilaktyczną unikania zakażeń WNV.

Piśmiennictwo

1. The Center for Food Security and Public Health website http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/west_nile_fever.pdf. 4 luty 2013 rok.
2. Alpert S.G., Ferguson J., Noel L.P.: Intrauterine West Nile virus: ocular and systemic findings. *Am. J. Ophthalmol.* **136**, 733–735 (2003)
3. Bakonyi T., Hubalek Z., Rudolf I., Nowotny N.: Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 225–231 (2005)

4. Bakonyi T., Ivanics E., Erdelyi K., Ursu K., Ferenczi E., Weissenböck H., Nowotny N.: Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 618–623 (2006)
5. Bell J.A., Brewer C.M., Mickelson N.J., Garman G.W., Vaughan J.A.: West Nile virus epizootiology, central Red River Valley, North Dakota and Minnesota, 2002–2005. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1245–1247 (2006)
6. Bernard K.A., Maffei J.G., Jones S.A. i wsp.: West Nile virus infection in birds and mosquitoes, New York State, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 679–685 (2001) (praca stanowi dzieło 15 autorów)
7. Brault A.C.: Changing patterns of West Nile virus transmission: altered vector competence and host susceptibility. *Vet. Res.* **40**, 43 (2009)
8. Busch M.P., Kleinman S.H., Tobler L.H. i wsp.: Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J. Infect. Dis.* **198**, 984–993 (2008) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
9. Campbell G.L., Marfin A.A., Lanciotti R.S., Gubler D.J.: West Nile virus. *Lancet. Infect. Dis.* **2**, 519–529 (2002)
10. Charatan F.: Organ transplants and blood transfusions may transmit West Nile virus. *BMJ*, **325**, 566 (2002)
11. Charrel R.N., Brault A.C., Gallian P. i wsp.: Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains. Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology*, **315**, 381–388 (2003) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
12. Chowers M.Y., Lang R., Nassar F. i wsp.: Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 675–678 (2001) (praca stanowi dzieło 17 autorów)
13. Couissinier-Paris P.: West Nile virus in Europe and Africa: still minor pathogen, or potential threat to public health? *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **99**, 348–354 (2006)
14. Dauphin G., Zientara S.: West Nile virus: recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine*, **25**, 5563–5576 (2007)
15. De Filette M., Ulbert S., Diamond M., Sanders N.N.: Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* **43**, 16 (2012)
16. Diamond M.S.: Progress on the development of therapeutics against West Nile virus. *Antiviral. Res.* **83**, 214–227 (2009)
17. Diamond M.S., Roberts T.G., Edgil D., Lu B., Ernst J., Harris E.: Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. *J. Virol.* **74**, 4957–4966 (2000)
18. Drobot M.A., Artsob H.: West Nile virus. Update for family physicians. *Can. Fam. Physician.* **51**, 1094–1099 (2005)
19. Frost M.J., Zhang J., Edmonds J.H. i wsp.: Characterization of virulent West Nile virus Kunjin strain, Australia, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 792–800 (2012) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
20. Goldberg T.L., Anderson T.K., Hamer G.L.: West Nile virus may have hitched a ride across the Western United States on *Culex tarsalis* mosquitoes. *Mol. Ecol.* **19**, 1518–1519 (2010)
21. Gray T.J., Burrow J.N., Markey P.G. i wsp.: West nile virus (Kunjin subtype) disease in the northern territory of Australia – a case of encephalitis and review of all reported cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**, 952–956 (2011) (praca stanowi dzieło 7 autorów)
22. Hall R.A., Scherret J.H., Mackenzie J.S.: Kunjin virus: an Australian variant of West Nile? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **951**, 153–160 (2001)
23. Hamer G.L., Kitron U.D., Brawn J.D. i wsp.: *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. *J. Med. Entomol.* **45**, 125–128 (2008) (praca stanowi dzieło 7 autorów)
24. Harrison T.W. West Nile encephalitis. *J. Pediatr. Health. Care.* **16**, 278–281 (2002)
25. Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S., Montgomery S.P., O’Leary D.R., Campbell G.L.: Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1167–1173 (2005)
26. Hayes E.B., Sejvar J.J., Zaki S.R., Lanciotti R.S., Bode A.V., Campbell G.L.: Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1174–1179 (2005)
27. Hermanowska-Szpakowicz T., Grygorczuk S., Kondrusik M., Zajkowska J., Pancewicz S.: Zakażenie wirusem zachodniego Nilu. *Przegl. Epidemiol.* **60**, 93–98 (2006)
28. Hubalek Z.: Comparative symptomatology of West Nile fever. *Lancet*, **358**, 254–255 (2001)
29. Hubalek Z., Wegner E., Halouzka J. i wsp.: Serologic survey of potential vertebrate hosts for West Nile virus in Poland. *Viral. Immunol.* **21**, 247–253 (2008) (praca stanowi dzieło 10 autorów)
30. Huhn G.D., Austin C., Langkop C. i wsp.: The emergence of west nile virus during a large outbreak in Illinois in 2002. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**, 768–776 (2005) (praca stanowi dzieło 14 autorów)
31. Jordan I., Briese T., Fischer N., Lau J.Y., Lipkin W.I.: Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J. Infect. Dis.* **182**, 1214–1217 (2000)
32. Juricova Z., Pinowski J., Literak I., Hahn K.H., Romanowski J.: Antibodies to alphavirus, flavivirus, and bunyavirus arboviruses in house sparrows (*Passer domesticus*) and tree sparrows (*P. montanus*) in Poland. *Avian. Dis.* **42**, 182–185 (1998)
33. Kalaycioglu H., Korukluoglu G., Ozkul A. i wsp.: Emergence of West Nile virus infections in humans in Turkey, 2010 to 2011. *Euro. Surveill.* **17** (2012) (praca stanowi dzieło 19 autorów)
34. Kleinman S.H., Williams J.D., Robertson G. i wsp.: West Nile virus testing experience in 2007: evaluation of different criteria for triggering individual-donation nucleic acid testing. *Transfusion*, **49**, 1160–1170 (2009) (praca stanowi dzieło 9 autorów)
35. Knap J.P., Kubica-Biernat B.: Czy gorączka zachodniego Nilu (WNV) dotarła do Polski? Stanowisko zespołu ekspertów powołanych przez Głównego Inspektora Sanitarnego. *Przegl. Epidemiol.* **57**, 399–404 (2003)
36. Kondrusik M., Ferenczi E., Zajkowska J., Pancewicz S., Grygorczuk S., Swierzbinska R., Hermanowska-Szpakowicz T.: Obecność przeciwciał reagujących z antygenem wirusa zachodniego Nilu (WNV) wśród mieszkańców województw podlaskiego i świętokrzyskiego. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 409–416 (2007)
37. Kramer L.D., Li J., Shi P.Y.: West Nile virus. *Lancet. Neurol.* **6**, 171–181 (2007)
38. Lanciotti R.S., Ebel G.D., Deubel V. i wsp.: Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*, **298**, 96–105 (2002) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
39. Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci R.S. i wsp.: 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 (2000) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
40. Lanciotti R.S., Roehrig J.T., Deubel V. i wsp.: Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science*, **286**, 2333–2337 (1999) (praca stanowi dzieło 11 autorów)
41. Lang L.: The Food and Drug Administration approves second West Nile virus screening test for donated blood and organs. *Gastroenterology*, **133**, 1402 (2007)
42. Lewis M., Amsden J.R.: Successful treatment of West Nile virus infection after approximately 3 weeks into the disease course. *Pharmacotherapy*, **27**, 455–458 (2007)
43. Lim S.M., Koraka P., Osterhaus A.D., Martina B.E.: West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses*, **3**, 811–828 (2011)
44. Lovo D.: West Nile fever. *Vopr. Virusol.* **45**, 4–9 (2000)
45. Lundstrom J.O.: Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J. Vector. Ecol.* **24**, 1–39 (1999)

46. Mackenzie J.S., Gubler D.J., Petersen L.R.: Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat. Med.* **10**, S98–S109 (2004)
47. Marfin A.A., Bleed D.M., Lofgren J.P. i wsp.: Epidemiologic aspects of a St. Louis encephalitis epidemic in Jefferson County Arkansas, 1991. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**, 30–37 (1993) (praca stanowi dzieło 9 autorów)
48. May E.J., Davis C.T., Tesh R.B., Barrett A.D.: Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **85**, 2964–2974 (2011)
49. Morgan D.: Control of arbovirus infections by a coordinated response: West Nile Virus in England and Wales. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 305–312 (2006)
50. Morrey J.D., Day C.W., Julander J.G., Blatt L.M., Smee D.F., Sidwell R.W.: Effect of interferon-alpha and interferon-inducers on West Nile virus in mouse and hamster animal models. *Antivir. Chem. Chemother.* **15**, 101–109 (2004)
51. Mostashari F., Bunning M.L., Kitsutani P.T. i wsp.: Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*, **358**, 261–264 (2001) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
52. Murgue B., Zeller H., Deubel V.: The ecology and epidemiology of West Nile virus in Africa, Europe, and Asia. *Curr. Topics. Microbiol. Immun.* **267**, 196 (2001)
53. Murray K., Baraniuk S., Resnick M. i wsp.: Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection. *Epidemiol. Infect.* **134**, 1325–1332 (2006) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
54. Murray K.O., Koers E., Baraniuk S., Herrington E., Carter H., Sierra M., Kilborn C., Arafat R.: Risk factors for encephalitis from West Nile Virus: a matched case-control study using hospitalized controls. *Zoonoses Public Health*, **56**, 370–375 (2009)
55. Murray K.O., Mertens E., Despres P.: West Nile virus and its emergence in the United States of America. *Vet. Res.* **41**, 67 (2010)
56. Nash D., Mostashari F., Fine A. i wsp.: The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1807–1814 (2001) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
57. Niczyporuk J.S., Samorek-Salamonowicz E., Mizak W.K.: The survey of wild birds for West Nile virus in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* **14**, 573–577 (2011)
58. Papa A., Danis K., Baka A. i wsp.: Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro. Surveill.* **15**, 1–5 (2010) (praca stanowi dzieło 14 autorów)
59. Pealer L.N., Marfin A.A., Petersen L.R. i wsp.: Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1236–1245 (2003) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
60. Pesko K.N., Ebel G.D.: West Nile virus population genetics and evolution. *Infect. Genet. Evol.* **12**, 181–190 (2012)
61. Petersen L.R., Epstein J.S.: Problem solved? West Nile virus and transfusion safety. *N. Engl. J. Med.* **353**, 516–517 (2005)
62. Petersen L.R., Marfin A.A.: West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann. Intern. Med.* **137**, 173–179 (2002)
63. Petersen L.R., Roehrig J.T.: West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 611–614 (2001)
64. Phalen D., Dahlhausen B.: West Nile Virus. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, **13**, 67–78 (2004)
65. Platonov A.E.: West Nile encephalitis in Russia 1999–2001: were we ready? Are we ready? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **951**, 102–116 (2001)
66. Platonov A.E., Shipulin G.A., Shipulina O.Y. i wsp.: Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 128–132 (2001) (praca stanowi dzieło 12 autorów)
67. Prow N.A.: The changing epidemiology of kunjin virus in Australia. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **10**, 6255–6272 (2013)
68. Reiter P.: West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro. Surveill.* **15**, 19508 (2010)
69. Rogers B.A., Hueston L., Ratnam I.: Imported West Nile virus encephalitis in an Israeli tourist. *Med. J. Aust.* **191**, 232–234 (2009)
70. Rossi S.L., Ross T.M., Evans J.D.: West Nile virus. *Clin. Lab. Med.* **30**, 47–65 (2010)
71. Samorek-Salamonowicz E., Niczyporuk J., Wijaszka T.: Wirus Zachodniego Nilu – zagrożenie dla zdrowia publicznego. *Medycyna Wet.* **68**, 1368–1370 (2008)
72. Sejvar J.J.: The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1617–1624 (2007)
73. Shi P.Y., Kauffman E.B., Ren P. i wsp.: High-throughput detection of West Nile virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 1264–1271 (2001) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
74. Smithburn K., Burke A., Paul J.: A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **20**, 471–492 (1940)
75. Tobler L.H., Bianco C., Glynn S.A. i wsp.: Detection of West Nile virus RNA and antibody in frozen plasma components from a voluntary market withdrawal during the 2002 peak epidemic. *Transfusion*, **45**, 480–486 (2005) (praca stanowi dzieło 13 autorów)
76. Tonry J.H., Xiao S.Y., Siirin M., Chen H., da Rosa A.P., Tesh R.B.: Persistent shedding of West Nile virus in urine of experimentally infected hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **72**, 320–324 (2005)
77. Tsai T.F., Popovici F., Cernescu C., Campbell G.L., Nedelcu N.I.: West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet*, **352**, 767–771 (1998).
78. Tyler K.L.: West Nile virus encephalitis in America. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1858–1859 (2001)
79. Ulbert S.: West Nile virus: the complex biology of an emerging pathogen. *Intervirology*, **54**, 171–184 (2011)
80. van der Meulen K.M., Pensaert M.B., Nauwynck H.J.: West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.* **150**, 637–657 (2005)
81. Watson J.T., Pertel P.E., Jones R.C., Siston A.M., Paul W.S., Austin C.C., Gerber S.I.: Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever. *Ann. Intern. Med.* **141**, 360–365 (2004)
82. Weinberger M., Pitlik S.D., Gandacu D. i wsp.: West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 686–691 (2001) (praca stanowi dzieło 16 autorów)
83. Wilson J.R., de Sessions P.F., Leon M.A., Scholle F.: West Nile virus nonstructural protein 1 inhibits TLR3 signal transduction. *J. Virol.* **82**, 8262–8271 (2008)
84. Work T.H., Hurlbut H.S., Taylor R.M.: Indigenous wild birds of the Nile Delta as potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **4**, 872–888 (1955)
85. Zak I.T., Altinok D., Merline J.R., Chander S., Kish K.K.: West Nile virus infection. *AJR Am. J. Roentgenol.* **184**, 957–961 (2005)