



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**  
Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap (BVF)

# **Metoder för övervakning av West Nile virus**

Exempel på integrerad veterinär- och humanmedicin

*Julia Heyman*

*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:33*



# Metoder för övervakning av West Nile virus

Exempel på integrerad veterinär- och humanmedicin

## Methods for surveillance of West Nile virus

Examples of integrated veterinary and human medicine

*Julia Heyman*

**Handledare:** *Susanna Sternberg Lewerin, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2017:33

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** *West Nile virus, övervakning, folkhälsa, seroprevalens, sentinel, vektor*

**Key words:** *West Nile virus, surveillance, public health, seroprevalence, sentinels, vectors*

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING .....	3
MATERIAL OCH METODER .....	3
LITTERATURÖVERSIKT .....	4
West Nile Virus .....	4
Klinisk övervakning .....	4
Hästar .....	4
Döda fåglar .....	5
Övervakning av seroprevalens .....	6
Hästar .....	6
Fåglar .....	7
Hundar .....	7
Andra djur .....	8
Entomologiska studier .....	8
Myggor .....	8
DISKUSSION .....	8
LITTERATURFÖRTECKNING .....	13



## SAMMANFATTNING

West Nile virus är ett vektorburet RNA-virus som i naturen vidmakthålls i en transmissionscykel mellan myggor och fåglar. I vektorerna amplifieras viruset och vid blodmål kan fåglar infekteras och då uppnå tillräckligt hög viremi för att andra myggor ska smittas. Den myggart som oftast är bärare av viruset är *Culex pipiens*. Vektorerna kan även smitta andra vertebrater, och både människor och hästar riskerar vid en infektion att drabbas av allvarlig neurologisk sjukdom.

WNV har under de senaste åren spritts till nya regioner och även etablerat endemiska cykler där det inte tidigare övervintrat. På grund av detta och den allvarliga sjukdomsbilden krävs att länder där WNV kan introduceras eller har introducerats, implementerar övervakningssystem som så tidigt som möjligt kan indikera viruscirkulation. Dessa kan innefatta påvisande av antikroppar mot WNV eller viruspartiklar. Då en något högre andel infekterade hästar än människor utvecklar kliniska symtom, har hästar använts som sentineldjur vid passiv övervakning. Kliniker identifierar då hästar som uppvisar neurologiska symtom och därmed betraktas som misstänkta fall. Om de efter analys konstateras vara bärare av viruset, bekräftas viruscirkulation i området.

Hästar har också använts som sentineldjur inom aktiv övervakning, tillsammans med andra arter som har visats serokonvertera utan kliniska symtom. Studier har gjorts på hundar och fåglar, men även vilda djur som förväntas vara mer exponerade för vektorerna. I framför allt USA tycks viruset orsaka en ökad mortalitet bland vissa fågelarter, vilket därför ansetts vara ett kännetecken för utbrott av WNV. Detta fenomen verkar inte vara lika förekommande i Europa. Det görs även entomologiska studier för att kartlägga virusets utbredning genom att vektorer samlas in och provtas.

Många av de övervakningssystem som tillämpats fordrar ett nära samarbete mellan instanser inom både veterinär- och humanmedicin. Exempelvis krävs kompetenta kliniker för upptäckt av symtom hos hästar, och ett nära samarbete med humansjukvården för att förekomst av viruset snabbt ska upptäckas. En tidig varning om att WNV cirkulerar ger sjukvården förbättrade möjligheter att vidta säkerhetsåtgärder för prevention av vidare spridning. Åtgärderna kan vara ökad kontroll av blod- och organ donationer som utgör en risk för smitta mellan människor. Målet med den här litteraturstudien är att ge en överblick över olika metoder som använts vid övervakning av WNV, samt genom detta belysa fördelarna med ett interdisciplinärt arbetssätt inom folkhälsoområdet.

## SUMMARY

West Nile virus is a vector-borne RNA virus that is sustained in a transmission cycle between mosquitos and birds. In the vectors the virus is amplified and during blood meals the birds can become infected and experience viremia levels sufficient to transmit the virus to other mosquitos. The vector species most likely to carry the virus is *Culex pipiens*. Mosquitos can also infect other vertebrates, and if infected, both humans and horses risk developing severe neurological disease.

WNV has lately spread to new regions as well as establishing endemic cycles where it has never overwintered before. Because of this and the severe clinical picture, countries where WNV can be introduced or has been introduced, implement surveillance systems to indicate virus circulation at the earliest possible stage. These may include detection of seroprevalence or virus prevalence. As the proportion of clinical cases among infected individuals is higher in horses than in humans, horses have been used as sentinels in passive surveillance. Practising veterinarians thus identify horses with neurological symptoms, which thereby are considered suspected cases. If they are found to be positive upon analysis, virus circulation is confirmed in the area.

Horses have also been used as sentinels in active surveillance, along with many other species that have been found to seroconvert without showing clinical signs. Studies have included dogs and birds, but also wild animals that are considered to be more exposed to the vectors. In USA reporting of dead birds has been used to identify outbreaks of WNV, since outbreaks there have been characterized by increased mortality in some bird populations. This however seems to be a less common phenomenon in Europe. Entomological studies are also carried out by collecting and sampling vectors in order to survey the virus prevalence.

Many of the surveillance systems that are applied require collaboration between veterinary and human medicine. Two examples are the skilled clinicians needed for observations of ill horses, and the close cooperation with human health care necessary for the occurrence of WNV to be noted. An early warning of virus circulation gives public health agencies better opportunity to take safety measures for prevention of further dissemination. Measures can for example be to enhance the control of blood and organ donations that present a risk of human-to-human infection. The purpose of this literature study is to give an overview of different methods used for surveillance of WNV, and thus highlight the benefits of an interdisciplinary approach in public health.



## INLEDNING

Nya sjukdomar (emerging diseases) brukar definieras som sjukdomar som introduceras i en ny population, eller som under senare tid fått en snabbt ökande incidens alternativt geografisk utbredning (Morse, 1995). För sjukdomar med allvarliga konsekvenser finns starka incitament för myndigheter att kartlägga den orsakande patogenens utbredning och bygga upp en beredskap för eventuella utbrott. Konsekvenserna kan vara av ekonomisk karaktär, eller bestå av allvarlig hälsofara för människor eller djur.

West Nile Virus (WNV) är ett virus som på senare tid fått en ökad spridning och tycks på en del platser i Europa ha fått ett permanent fäste och etablerats i en endemisk cykel (Monaco *et al.*, 2011). Det är ett spännande exempel att studera utifrån flera synpunkter, till exempel ur en zoonotisk aspekt då allvarlig sjukdom orsakad av viruset kan drabba både människor och djur. År 2014 rapporterades inom EU 77 humanfall av WNV, varav 7 i Grekland och Rumänien hade dödlig utgång (EFSA & ECDC, 2015). Även ur ett klimatperspektiv är WNV intressant eftersom viruset är vektorburet och vektorernas utbredning kan tänkas påverkas av ett förändrat klimat.

Effektiva metoder för övervakning av smittspridning är därför av stor vikt för ett lands beredskap inför en eventuell introduktion av viruset. I fallet WNV har en rad olika tillvägagångssätt prövats och utvärderats. Syftet med den här litteraturstudien är att genom exemplet WNV undersöka och belysa hur veterinärmedicin framgångsrikt kan integreras i folkhälsoarbete. Detta genom att ge en översikt över ett urval av de metoder som använts för kartläggning och bevakning av smittläget. De olika metodernas relevans och effektivitet kommer också behandlas.

Djur- och folkhälsa är beroende av varandra, något man i början av 2000-talet ville ta fasta på genom att lansera begreppet *One Health*. Ett av de mest uppenbara exemplen på detta är sjukdomar som vi delar med våra vilda och domesticerade djur, och så många som 60 % av kända humansjukdomar är zoonoser (OIE, 2017). WNV hör till den gruppen, och om ett interdisciplinärt arbetssätt används för att kontrollera sjukdomen och ger goda resultat, kan det bana väg för liknande projekt för andra patogener.

## MATERIAL OCH METODER

Litteratursökningen har till största delen gjorts med hjälp av databasen Web of Science med undantag för en artikel som hittades genom sökning i Scopus. Sökbegrepp som användes var ord som "West Nile virus", "horse\*", "human\*", "sentinel\*" och "surveillance". Fokus lades på artiklar om ämnet som publicerats på 2000-talet. Referenser i artiklarna som hittats har också använts om de funnits vara relevanta.

## LITTERATURÖVERSIKT

### West Nile Virus

West Nile virus är ett virus tillhörande familjen *Flaviviridae* och genus *Flavivirus*. Det ingår i de japanska encefaliternas serologiska grupp, och bland viralt orsakade encefaliter är WNV det mest spridda i världen (Chancey *et al.*, 2015). Det är ett litet, höljeförsett, enkelsträngat RNA-virus som i naturen vidmakthålls i en smittcykel mellan fåglar och myggor, men myggorna kan också överföra smittan till exempelvis hästar och människor (Shoba & Abraham, 2016). Fåglar anses vara den viktigaste delen i virusets livscykel, eftersom de utvecklar en tillräckligt hög viremi för att myggor ska kunna infekteras vid blodmål. Genom vertikal transmission från myggor till ägg tror man att viruset klarar av att övervintra på en plats (Chancey *et al.*, 2015).

Viruset kan hos människa ge neurologiska symtom, men vanligare är en övergående feber som drabbar 20–30 % av alla smittade. Cirka 1 av 150 infekterade personer insjuknar i meningit eller encefalit, men hos majoriteten utvecklas endast en subklinisk infektion (Petersen & Marfin, 2002). Även hästar serokonverterar i de flesta fall utan uppvisande av klinisk sjukdom, men hos cirka 8 % av exponerade immunologiskt naiva djur utvecklas allvarlig neurologisk sjukdom. Detta i form av encefalomyelit med ataxi som mest uttalade symtom. Letaliteten bland drabbade hästar varierar mellan 22 och 44 % (Angenvoort *et al.*, 2013).

Att WNV infekterar och därmed kan orsaka klinisk sjukdom hos hästar utnyttjas för att genom passiv övervakning ge en indikation om viruscirkulation i ett område. Även ökad dödlighet bland fåglar kan peka på närvaro av viruset. Detta ger ett tydligt exempel på hur veterinärmedicin används för prevention av sjukdom hos både människor och djur. Många andra djurarter som exponeras för viruset serokonverterar utan kliniska symtom, men antikroppar kan då påvisas i serum. På så sätt möjliggörs aktiv övervakning som också den innebär ett interdisciplinärt arbetssätt där veterinär- och humanmedicin knyts samman.

### Klinisk övervakning

#### Hästar

Av ryggradsdjuren är hästar relativt känsliga för infektionen, och en högre andel hästar än människor uppvisar neurologiska symtom som en kliniker kan upptäcka. Klinisk övervakning av i första hand hästar har på flera platser använts som en metod för att bevaka spridningen av WNV. Detta möjliggör passiv övervakning av smittläget, men metodens känslighet förutsätter att veterinärer klarar av att känna igen symtom som stämmer överens med sjukdomsbilden. En annan premis är att hästpopulationen inte är vaccinerad, och uppfylls de kraven kan hästar fungera som så kallade sentineldjur. Dessa får då funktionen av ”vaktposter” som vid ett eventuellt insjuknande indikerar viruscirkulation. Vid sentinelövervakning fokuserar man på specifika subpopulationer för att öka chanserna till detektion av sjukdomen i fråga. Det gör också arbetet mer kostnadseffektivt eftersom hela populationen inte provtas (Halliday *et al.*, 2007).

De symtom som kliniker bör försöka observera för att identifiera misstänkta fall av WNV kan vara diffusa och svåra att skilja från andra neurologiska sjukdomstillstånd. I en studie från Andalusien undersökte man därför med hjälp av en fall-kontrollstudie vilka specifika symtom som kunde förknippas med infektion av WNV. Underlaget till båda grupperna utgjordes av hästar som uppvisade neurologiska symtom, med eller utan feber. De som konfirmerades vara positiva betraktades som fall, de negativa som kontroll. Resultaten visade att de kliniska symtomen i hög grad kunde variera, men de fyra tecken som var signifikant mer associerade till konstaterat positiva fall var fotofobi, affekterade kranialnerver, näsflöde och förlamning av extremiteter. (Saegerman *et al.*, 2014)

Passiv övervakning av hästar som uppvisar dessa symtom har prövats i olika regioner i Spanien, där veterinärer fått i uppgift att ta blodprov på hästar vid föreliggande misstanke om infektion med WNV. I tidigare nämnda studie från Andalusien användes en ELISA där alla flavivirus som ingår i de japanska encefaliterna går att detektera. Positiva fall konfirmerades därefter med en IgM-ELISA specifik för WNV samt ett serumneutralisationstest. Med hjälp av PCR-teknik försökte man också påvisa förekomst av virus i cerebrospinalvätskan på konfirmerade fall. I samma studie fastslås att kliniska data kan höja beredskapen och därmed sänka samhällets kostnader, genom att ett eventuellt utbrott tidigare upptäcks. Ovaccinerade hästar konstateras även fungera som tidiga sentineldjur eftersom människor som insjuknar gör det samtidigt eller strax efter att hästarna uppvisar symtom. (Saegerman *et al.*, 2014)

I en annan studie som gjordes i Katalonien etablerades ett övervakningsprogram som bland annat innefattade liknande passiv övervakning av hästar med neurologiska symtom. Där kunde dock inga fall av WNV konstateras (Alba *et al.*, 2013). En observation som gjordes i studien var att intresset från djurägare och kliniker avtog efter en tid, något som påpekas kunna försämra övervakningens effektivitet på sikt.

### **Döda fåglar**

Även övervakning genom provtagning av döda fåglar har prövats som metod för att tidigt detektera WNV. I en artikel om hur detta implementerats i USA konstateras att metoden kan fungera som bekräftelse av en pågående epizooti och även definiera geografiska områden där risken för humansjukdom är höjd (Mostashari *et al.*, 2003). I en studie i Kalifornien jämfördes effektivitet och kostnad mellan olika metoder och där fastslogs att allmänhetens rapportering av döda fåglar var den som resulterade i flest upptäckta positiva fall per 1000 dollar. De andra ingående metoderna var insamling av myggor och användning av sentinelhöns (Healy *et al.*, 2015).

Analys av döda fåglar för kontroll av WNV har prövats även i Europa. I Storbritannien samlades under en sjuårsperiod 2072 döda fåglar in för provtagning, men samtliga prover gav då negativt resultat. En del av de arter som testades var sådana som under vinterhalvåret befinner sig i områden där WNV cirkulerar, men dessa utgjorde dock endast 44 fåglar. Det gick därför inte att dra några slutsatser kring risken för introduktion av WNV genom migrerande fåglar. I artikeln påpekas att om stannfåglar i Storbritannien utgör en naiv population, borde mortaliteten bland dessa arter vara högre än bland migrerande vid en eventuell introduktion av WNV. Detta förutsatt att populationen är känslig för infektion.

Därför bör arter som är stannfåglar vara bäst lämpade för övervakning där man letar efter ökad dödlighet bland fåglar. (Brugman *et al.*, 2013)

Det har bedrivits en del forskning på olika fågelarters kompetens som värd och hur de reagerar på infektion med WNV. Över 70 olika arter har vid olika försök inokulerats experimentellt för att undersöka viremi, antikroppsproduktion, virusutsöndring och kliniska symtom. Generellt pekar resultaten på att familjer inom ordningarna tättingar (*Passeriformes*) och vadarfåglar (*Charadriiformes*) verkar vara de mest kompetenta värdarna för viruset. Bland tättingarna utmärker sig särskilt kråkfåglar (*Corvidae*), finkar (*Fringillidae*) och sparvfinkar (*Passeridae*), men betydande variationer kan ses både mellan olika arter och viruslinjer. Värdkompetensen baseras på viremins intensitet och duration samt värdens mottaglighet för infektion. Att ta hänsyn till är dock att denna typ av forskning mest har bedrivits på amerikanska fågelarter och med den amerikanska linjen av WNV, vilket gör att resultaten inte nödvändigtvis är applicerbara på europeiska förhållanden. (Pérez-Ramírez *et al.*, 2014)

## Övervakning av seroprevalens

### Hästar

Hästar är känsliga för WNV, och i många länder har undersökningar av seroprevalens hos hästar utgjort en viktig del i de övervakningsåtgärder som vidtagits. I Italien tycks viruset numera ha fått ett visst fäste, och man har använt sig av bland annat entomologiska studier på myggor och antikroppsbasead övervakning av hästar för att detektera aktiv viruscirkulation.

År 2011 gjordes en studie i nordöstra Italien med just det syftet, där man valde att använda IgM som markör. IgM-antikroppar kan nämligen detekteras från 7 – 12 dagar upp till två månader efter infektion, och någon längre persistens finns inte dokumenterad. Hästar med IgM kan därmed betraktas som relativt nyligen smittade och ge bättre och mer aktuell information om den pågående viruscirkulationen. IgG-antikroppar mot WNV kan däremot hittas i serum tre månader efter infektion och finnas kvar i flera år, och ger därför sämre information om eventuell ny WNV-incidens. (Mulatti *et al.*, 2012)

Enligt artikeln som beskriver studien har tidigare forskning visat att passiv övervakning av hästar är mest kostnadseffektivt för tidig detektion av WNV. Den metoden var dock enligt artikelförfattarna inte applicerbar i nordöstra Italien 2011, då viruset där tycks ha blivit endemiskt. Det påpekas att den typen av övervakning är viktig för att upptäcka nyintroducerade sjukdomar, men att dess relevans minskar när sjukdomen är regelbundet återkommande. Då beror kliniska fall på flera faktorer som tidigare viruscirkulation, bakgrundsimmuniteten i populationen och i vilken grad hästar vaccinerar. Andra metoder som exempelvis aktiv övervakning av seroprevalens blir då mer tillämpliga. (Mulatti *et al.*, 2012)

IgM-antikroppar anses vara den bästa serologiska markören för en infektion, men de har också påvisats hos vaccinerade djur (Angenwoort *et al.*, 2013). Detta försvårar tolkningen av provresultat från djur i populationer där vaccinationer genomförts, och därför har man på en del håll undersökt möjligheten att använda alternativ till hästar som sentineldjur. I södra Spanien provtog man kliniskt friska mulor och åsnor för att undersöka seroprevalensen för

antikroppar mot WNV. De positiva resultaten visade att detta kan vara ett alternativ i områden där hästarna är vaccinerade (García-Bocanegra *et al.*, 2012).

### **Fåglar**

Många länder har implementerat användning av utegående fjäderfä som sentineldjur. I till exempel Makedonien har man genom regelbundna blodprover kunnat kartlägga utbredning och påvisa seroprevalens för WNV i god tid innan humanfall konstaterats (Chaintoutis *et al.*, 2014). I studien från Makedonien användes slumpvis utvalda fjäderfän från flera olika av landets provinser och i åldrarna 45 dagar till 5 månader. Detta för att förvissa sig om att eventuella antikroppar inte kunde vara maternellt överförda eller ha uppstått under en tidigare smittoperiod.

I Tjeckien gjordes en studie på sothönan för att undersöka deras potential som sentineldjur, eftersom de lever i våtmarker där förekomst av myggor normalt är god (Straková *et al.*, 2015). Antikroppar mot WNV påvisades men artikelförfattarna påpekar dock att vid tolkning av resultaten måste hänsyn tas till att fåglarna rör sig över stora geografiska områden. Detta gör att det inte går att säga med exakthet var de blivit infekterade. Oavsett var fåglarna smittats kan resultaten emellertid ge en indikation om risken för att viruset ska introduceras till nya områden. Detta genom att myggor på plats kan infekteras och föra smittan vidare.

I sydvästra Tyskland har man i ett försök testat screening av ägg från utegående höns som en metod för att upptäcka maternella antikroppar mot viruset (Börstler *et al.*, 2016). Även om man i den studien inte kunde påvisa förekomst, påtalas fördelen av att inte behöva samla in blodprover från levande djur. Detta är vanligtvis något som medför mycket administrativt arbete och krav på etiska tillstånd från myndigheter.

### **Hundar**

WNV upptäcktes första gången i Uganda och på flertalet platser i Afrika har hundar använts för serologiska undersökningar av virusets förekomst. I en studie från Marocko konstaterades en nästan lika hög förekomst av antikroppar hos militärhundar som hos hästar. Eftersom hundarna har en kortare livslängd kan detta eventuellt visa på att den populationen utsätts för en högre exponering. Resultaten indikerar att hundar kan utgöra ett alternativ som sentineldjur, framför allt i områden där hästar vaccineras. Vaccinering av hästuppopulationen omöjliggör passiv övervakning av kliniska symtom som metod för att tidigt upptäcka viruscirkulation. (Durand *et al.*, 2016)

I en studie gjord i Saskatchewan i Kanada hittades en hög seroprevalens för antikroppar mot WNV bland hundar. Hundarna i studien var inte arbetande utan husdjur, varför deras potential som sentineldjur framhålls eftersom de i hög grad delar samma miljö som sina ägare. De kan därför ge viktig information om vilken risk som föreligger för mänsklig smitta (Gaunt *et al.*, 2015). Även i Houston gjordes en studie på unga hundars seroprevalens, där det kunde konstateras att det första fallet av humansjukdom tycktes komma sex veckor efter påvisande av antikroppar hos hundarna. Dessutom sammanföll toppar i hundarnas seroprevalens med ökning av antalet humanfall (Resnick *et al.*, 2008).

## **Andra djur**

Att hästar, som tidigare nämnts, ofta vaccineras bidrar till att man behöver hitta alternativa sentineldjur för serologiska undersökningar rörande WNV. En fördel med att använda vilda djur till det syftet är att de ofta rör sig över stora områden och är exponerade för vektorer som kan bära på WNV. I Serbien undersöktes seroprevalens hos vildsvin och rådjur genom analyser av blodprov från djur som jagats i olika regioner i landet. I samma studie tittade man även på seroprevalensen hos tamgrisar i olika åldrar från tre stängda, isolerade anläggningar med artificiell ventilation. Det konstaterades att viruset cirkulerade bland samtliga grupper och att tamgrisar skulle kunna utgöra ett alternativ till hästar för övervakning av prevalens. (Escribano-Romero *et al.*, 2015)

Även i Rumänien har förekomst av antikroppar mot WNV undersökts hos vildsvin, där resultatet blev en hög procent positiva prover. Detta visar att vildsvin kan fungera bra som indikatorer på virusets cirkulation och ge ökad kunskap om dess ekologi. (Pâslaru *et al.*, 2016)

## **Entomologiska studier**

### **Myggor**

I flertalet studier som gjorts har även entomologiska undersökningar på myggor utförts. Till skillnad från serologiska undersökningar på värdar, är målet med entomologiska studier av den här typen i stället att påvisa virus som uppförökats i vektorerna. Med PCR-teknik kan man vid positiva fynd amplifiera virusets RNA och delar av dess genom kan då sekvenseras. I en italiensk artikel beskrivs hur myggor samlades in från olika regioner både i syfte att undersöka vilka arter som var de huvudsakliga vektorerna och för att utreda virusets förekomst och utbredning. Genom studien konstaterades arten *Culex pipiens* vara den troligaste vektorn för WNV. Betydelsen av ett välfungerande entomologiskt övervakningssystem underströks också genom att förekomst bland myggor kunde konstaterades långt innan människor insjuknade. Värdefull information inhämtades också om vilka linjer av viruset som cirkulerar i området. (Calzolari *et al.*, 2013)

## **DISKUSSION**

West Nile Virus tycks ha en plats i ett komplext ekosystem, vars omfattning det krävs ytterligare forskning inom ämnet för att fullständigt förstå. Det finns flera metoder för att detektera dess förekomst och kartlägga spridningen, bland annat genom identifiering av kliniska fall bland hästar, människor och även fåglar. Detta görs också genom undersökning av seroprevalens hos en lång rad arter. Flera av dessa metoder visar att övervakning förutsätter ett nära samarbete mellan veterinär- och humanmedicin. (Rizzo *et al.*, 2016)

Vid val av djurart för antikroppsdetektion finns olika aspekter att ta hänsyn till, till exempel att djuret inte är vaccinerat och att det rör sig i områden med risk för förekomst av viruset. Det är också av stor vikt att kunna identifiera miljö- och klimatrelaterade riskfaktorer för

förekomst av viruset, för att bättre kunna rikta insatserna. I en studie fokuserad på Europa påvisades bland annat närhet till våtmarker, flyttfågelvägar samt tidigare utbrott av WNV som riskfaktorer (Tran *et al.*, 2014). Det kan också vara aktuellt att välja ett djur som delar samma miljö som människan för att bättre kunna förutsäga risken för humansjukdom, som påtalades i den kanadensiska studien från Saskatchewan (Gaunt *et al.*, 2015).

När man undersökt förekomsten av antikroppar hos fåglar finns både studier gjorda på vilda och tama populationer. I det senare fallet har exempelvis utegående fjäderfä använts som sentineldjur. En fördel med vilda fåglar är att chanserna att hitta positiva fall kan öka i och med att fåglarna rör sig över större områden och kanske på platser där högre risk för infektion föreligger. En nackdel är att eftersom de inte är stationära, som tamfåglar vanligtvis är, går det inte att fastslå var fågeln smittats och någon exakt information om var infekterade vektorer finns erhålls därför inte. Av den anledningen kan det argumenteras att tamhöns som sentineldjur ger mer relevant information om den omedelbara risken för humansjukdom, eftersom de befinner sig i samma miljö som människor. För områden där viruset aldrig tidigare påvisats men förmodas kunna dyka upp, kan däremot vilda fåglar utgöra ett bra alternativ för att i ett större perspektiv få en överblick över hur viruset rör sig, tack vare deras eventuellt högre exponering. Provtagning underlättas naturligtvis om fåglarna är domesticerade, vilket kan vara ytterligare en aspekt att ta hänsyn till. (Straková *et al.*, 2015)

Metoden som väljs bör vara effektiv i det avseende att den ger en tillräckligt känslig detektion, och detta helst till en låg kostnad. Inom det ämnet finns flera artiklar skrivna, bland annat en från Kalifornien, USA (Healy *et al.*, 2015). I den studien jämfördes effektivitet och lönsamhet för ett antal olika metoder, och man kom fram till att allmänhetens rapportering av döda fåglar var ett effektivt sätt att detektera virusaktivitet, förutsatt att känsliga fågelarter fanns i området. Om så inte var fallet var insamling av vektormyggor i kombination med analys av sentinelhöns ett bra alternativ. Majoriteten av kostnaderna för hönsen och myggfällorna var för laboratorieanalyser, medan det för döda fåglar var insamling, underhåll av en telefonlinje för allmänhetens inrapportering samt transport. I artikeln beskrivs det ideala övervakningssystemet som ett där passiv övervakning av döda fåglar genom hela säsongen ingår för kartläggning av virusets utbredning. Systemet skulle också innefatta analys av vektorerna under tidig säsong för att detektera förändringar i virusaktivitet, samt provtagning av sentinelhöns under sen säsong för att fastställa slutet av smittoperioden.

Europa har ett annorlunda smittläge än USA, och vilka metoder som har visat sig mest effektiva verkar skilja sig åt. I en studie där man jämförde olika övervakningssystem utformningar i Europa erhöles resultatet att passiv övervakning av hästar visade sig vara det mest kostnadseffektiva sättet att tidigt identifiera förekomst av WNV (Chevalier *et al.*, 2011). Den jämförelsen inkluderade inte analys av döda fåglar, eftersom det inte implementerats som övervakningsmetod i Europa i samma utsträckning som i USA. Aktiv övervakning av vektorerna bedömdes vara den dyraste metoden. En fransk studie jämförde tre metoder med avseende på sensitivitet och specificitet, och där ingick även mortalitet bland fåglar (Faverjon *et al.*, 2016). Artikelförfattarna menade att detta fenomen har observerats vid utbrott de senaste åren även i Europa, och att metodens relevans därför bör utvärderas. De övriga metoder som jämfördes i studien var rapportering av neurologiska symtom samt mortalitet

hos hästar. Resultaten pekade på att om bara en metod användes, var klinisk övervakning av hästar den som genererade högst detektion. Samtidigt kunde man visa att den mest framgångsrika metoden bör ha med flera variabler, och innefatta både observationer av kliniska symtom på hästar och inrapportering av döda fåglar. Det kan dock tilläggas att mortalitet inom hästpopulationen för ett virus som WNV troligtvis är en parameter värd att inkludera.

Det tycks finnas en diskussion om huruvida fynd av döda fåglar fungerar lika bra som metod på båda sidor om Atlanten. I USA har en ökad mortalitet bland fåglar länge betraktats som ett kännetecken för utbrott av WNV, men detta har inte observerats i samma omfattning i Europa. Skälen till detta är inte helt klarlagda men flera studier har gjorts för att påvisa samband som skulle kunna ge en förklaring. I en undersökning som gjordes på europeiska kajor (*Corvus monedula*) testades mortalitet och viremi efter inokulering med olika europeiska och en amerikansk viruslinje (Lim *et al.*, 2014). En ökad mortalitet kunde ses inom alla grupper utom en, men ingen resulterade i en lika hög mortalitet som setts när amerikanska kråkor (*Corvus brachyrhynchos*) infekterats i USA. Inte heller viremin nådde upp till nivåer som uppvisats hos amerikanska kråkor. Artikelförfattarna menar att eftersom mortaliteten varierade tyder det på att vilken viruslinje som är inblandad kan ha betydelse för hur fåglar drabbas, men att även värdfaktorer kan påverka. Detta eftersom den amerikanska viruslinjen inte orsakade lika hög mortalitet hos kajorna som hos kråkor vid utbrott i USA.

En annan mindre studie gjordes på svartkråkor (*Corvus corone*) för att undersöka två olika europeiska viruslinjers virulens (Dridi *et al.*, 2013). Resultaten visade visserligen att samtliga djur drabbades av sjukdom men att de inte tycktes nå upp till samma höga nivåer av virusamplifiering som kråkor i USA.

Av stor vikt är att veta om viruset är endemiskt för att välja en passande metod för detektion. I de flesta länder i Europa är WNV fortfarande ett nytt virus där passiv klinisk övervakning kan tänkas vara bäst lämpad för att tidigt upptäcka spridning. I till exempel USA hanterar man däremot en smitta som redan finns etablerad och därför kräver andra, mer aktiva metoder för kartläggning. Även i Italien kan WNV vara på väg att etablera en endemisk cykel inom vissa värdpopulationer. I en studie där man jämförde genomsekvenser från viruset som orsakade ett utbrott 2008 och ett annat från 2009 fann man mer än 99 % överensstämmelse. Detta och andra faktorer talar för att WNV nu tycks ha övervintrat i regionen i populationer av myggor och lokala vilda fåglar. (Monaco *et al.*, 2011)

Spridningen av WNV i Europa bör följas noggrant och på grund av det komplexa ekosystem viruset är en del av, måste varje vektorarts utbredning beaktas. Den mygga som tycks vara den troligaste vektorn är *Culex pipiens* och det finns ett antal artiklar som beskriver dess förekomst. För att myggorna ska fungera effektivt som vektorer för WNV krävs det längre perioder med temperaturer över 30 °C. Av det skälet förefaller virusets spridning till Skandinavien inte vara en omedelbar risk, trots att arten redan finns i ett flertal regioner i Sverige (Lundström *et al.*, 2013). En förändring i klimatet, vektorernas utbredningsområde eller patogenens virulens skulle dock kunna förändra den bilden, och det är därför viktigt att samtliga dessa aspekter bevakas. Exempelvis har man i en svensk studie om myggor kunnat visa den geografiska utbredningen och relativa förekomsten av de två syskonvektorerterna



*Culex pipiens* och *Culex torrentium* i Sverige (Hesson *et al.*, 2011). I studien kom man fram till att *C. torrentium* är den dominerande arten och att *C. pipiens* minskar i korrelation med ökad latitud. Artikelförfattarna påpekar att den forskning som har gjorts på myggornas vektoregenskaper i första hand har gjorts på *C. pipiens*. Eftersom *C. torrentium* i Sverige och i flera andra europeiska länder är den till antalet största arten bör man därför vidare utreda dess egenskaper som vektor, och dess potentiella del i spridningen av patogener som WNV.

En annan entomologisk studie gjord på dessa två arter bekräftar att *C. torrentium* är vanligare än *C. pipiens* i norra och centrala Europa. Studien visar dock även att om säsongen tack vare gynnsamt väder och klimat förlängs, kommer andelen *C. pipiens* att öka även i nordligare regioner (Hesson *et al.*, 2013). Detta kan ha betydelse för ett land som Sverige, som befinner sig på breddgrader där en förlängd säsong definitivt skulle ha en inverkan på de två myggpopulationernas utbredning.

WNV tycks alltså blivit endemiskt i södra Europa och samtidigt spridits norrut till platser där det tidigare inte förekommit. Att kartan över virusets utbredning ständigt måste ritas om kan relateras till att de ingående djurarterna i dess livscykel, myggor och vilda fåglar, kan röra sig långa sträckor och över stora områden. I en polsk studie som publicerades 2015 kunde förekomst av antikroppar mot WNV påvisas hos såväl vilda fåglar, en häst som hos människor i Polen (Niczyporuk *et al.*, 2015). Resultaten pekar på att WNV nu faktiskt förekommer i så pass nordliga klimatzoner i Europa och att det redan kan vara etablerat i ekosystem i Polen.

Ur ett svenskt perspektiv är dessa resultat värda att uppmärksamma. Att viruset tycks förekomma i Polen visar att det redan kan finnas i vår geografiska närhet och klara av klimatzoner liknande de skandinaviska. Känt är att den vektor som sannolikt skulle vara bärare av viruset finns i Sverige, och att längre säsonger gör att dess utbredning förskjuts norrut (Hesson *et al.*, 2013). I Norden dominerar en annan myggart, men dess egenskaper som vektor är inte tillräckligt utredda och mer forskning krävs för att beskriva dem (Hesson *et al.*, 2011). Viktigt att observera är även pågående klimatförändringar, som vid en förhöjd dygnstemperatur i norra Europa kanske ytterligare skulle underlätta spridningen av WNV till högre latituder.

WNV är en patogen som ger tydliga exempel på att goda resultat med övervakning kan uppnås när flera vetenskapliga områden arbetar interdisciplinärt. Att viruset är en zoonos har utnyttjats på en rad platser genom användning av sentineldjur, där olika djurpopulationer får agera vaktposter och indikera viruscirkulation. Vid den typen av övervakning integreras naturligt veterinärmedicin med humanmedicin, då veterinärers expertis kan komma i fråga vid till exempel provtagning eller klinisk bedömning. Ett konkret exempel är hur man arbetat i Italien med att implementera ett övervakningssystem, där man inom humansjukvården tagit hjälp av entomologiska och veterinära undersökningar. Veterinärernas roll var att provta misstänkta fall av WNV hos hästar, och vid en eventuell konfirmering infördes aktiv övervakning i den berörda regionen och screening av bloddonationer. (Rizzo *et al.*, 2016)

Författarna till artikeln där det integrerade övervakningsarbetet i Italien beskrivs, betonar nyttan av att använda övervakning av både vektorer, djur och människor. Skulle WNV

detekteras i ett område kan myndigheter och sjukvårdsinstanser förvarnas, och därefter vidta aktiva preventiva åtgärder för att förhindra ytterligare spridning. Gällande exempelvis bloddonationer är det av avgörande betydelse att en förhöjd risk för smitta kan identifieras, för att vidare spridning av viruset ska kunna förhindras. De lyckade resultaten från övervakningen i Italien har gjort att man i en del regioner överväger att vidare utveckla användningen av data från vektor- och djurövervakning, för att aktivera säkerhetsåtgärder vid blod- och organdonationer. (Rizzo *et al.*, 2016)

Vilken övervakningsmetod som är mest kostnadseffektiv och har bäst chans att upptäcka positiva fall verkar variera beroende på vilken region det rör sig om. Detta kan ha flera förklaringar, till exempel hur olika studier har utformats. Det kan också vara kopplat till faktorer hos värden, vilka viruslinjer som cirkulerar och huruvida dessa skiljer sig åt med avseende på virulens (Lim *et al.*, 2014). Eventuellt påverkas exempelvis fåglar i varierande grad beroende på vilken viruslinje de smittats av, men mer forskning på området behövs för att säkerställa detta.

Sammanfattningsvis verkar områdesövergripande övervakningsprogram för WNV ge mest information och goda resultat, men de regionala förutsättningarna måste hela tiden tas i beaktande. För platser där man tenderar att vaccinera hästuppopulationen kan exempelvis andra arter bli aktuella som sentineldjur. Därför är det positivt att studier görs för att se över seroprevalensen även inom andra populationer i ekosystemet. Mycket forskning bedrivs också på vilka miljö- och klimatfaktorer som ökar incidensen av insjuknade i WNV. Detta är något som bland annat kan ge sjukvården en bra möjlighet att i tid höja sin beredskap (Tran *et al.*, 2014).

Hur myndigheter i världen har hanterat spridningen av WNV ger flera goda exempel på hur veterinärmedicin framgångsrikt kan ingå i integrerade övervakningssystem tillsammans med humanmedicin. På många platser har man även arbetat interdisciplinärt med entomologiska studier för att också kunna inhämta information om smittläget bland vektorerna. För en komplex patogen som WNV är den typen av multilaterala projekt antagligen nödvändiga för att öka förståelsen kring virusets utbredning, virulens och plats i olika ekosystem.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Alba, A., Allepuz, A., Napp, S., Soler, M., Selga, I., Aranda, C., Casal, J., Pages, N., Hayes, E.B. & Busquets, N. (2013). Ecological Surveillance for West Nile in Catalonia (Spain), Learning from a Five-Year Period of Follow-up. *Zoonoses and Public Health*, vol. 61 (3), ss. 181-191. DOI: 10.1111/zph.12048.
- Angenwoort, J., Brault, A.C., Bowen, R.A. & Groschup, M.H. (2013). West Nile viral infection of equids. *Veterinary Microbiology*, vol. 167 (1-2), ss. 168-180. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.013>.
- Brugman, V.A., Horton, D.L., Phipps, L.P., Johnson, N., Cook, A.J.C, Fooks, A.R. & Breed, A.C. (2013). Epidemiological perspectives on West Nile virus surveillance in wild birds in Great Britain. *Epidemiology and Infection*, vol. 141 (6), ss. 1134-1142. DOI: <https://doi.org/10.1017/S095026881200177X>.
- Börstler, J., Engel, D., Petersen, M., Poggensee, C., Jansen, S., Schmidt-Chanasit, J. & Lühken, R. (2016). Surveillance of maternal antibodies against West Nile virus in chicken eggs in South-West Germany. *Tropical Medicine & International Health*, vol. 21 (5), ss. 687-690. DOI: 10.1111/tmi.12676.
- Calzolari, M., Monaco, F., Montarsi, F., Bonilauri, P., Ravagnan, S., Bellini, R., Cattoli, G., Cordioli, P., Cazzin, S., Pinoni, C., Marini, V., Natalini, S., Goffredo, M., Angelini, P., Russo, F., Dottori, M., Capelli, G. & Savini, G. (2013). New incursions of West Nile virus lineage 2 in Italy in 2013: the value of the entomological surveillance as early warning system. *Veterinaria Italiana*, vol. 49 (3), ss. 315-319. DOI: 10.12834/VetIt.1308.04.
- Chaintoutis, S.C., Dovas, C.I., Danis, K., Gewehr, S., Mourelatos, S., Hadjichristodoulou, C. & Papanastassopoulou, M. (2014). Surveillance and Early Warning of West Nile Lineage 2 Using Backyard Chickens and Correlation to Human Neuroinvasive Cases. *Zoonoses and Public Health*, vol. 62 (5), ss. 344-355. DOI: 10.1111/zph.12152.
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E. & Rios, M. (2015). The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *BioMed Research International*, vol. 2015, artikel-ID 376230. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/376230>.
- Chevalier, V., Lecollinet, S. & Durand, B. (2011). West Nile Virus in Europe: A Comparison of Surveillance System Designs in a Changing Epidemiological Context. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11 (8), ss. 1085-1091. DOI: 10.1089/vbz.2010.0234.
- Dridi, M., Vangeluwe, D., Lecollinet, S., van den Berg, T. & Lambrecht, B. (2013). Experimental infection of Carrion crows (*Corvus corone*) with two European West Nile virus (WNV) strains. *Veterinary Microbiology*, vol. 165 (1-2), ss. 160-166. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.12.043>.
- Durand, B., Haskouri, H., Lowenski, S., Vachier, N., Beck, C. & Lecollinet, S. (2016). Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection*, vol. 144 (9), ss. 1857-1864. DOI: <http://doi.org/10.1017/S095026881600011X>.

- Escribano-Romero, E., Lupulović, D., Merino-Ramos, T., Blázquez, A-B., Gospava, L., Lazić, S., Saiz, J-C. & Petrović, T. (2015). West Nile virus surveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary Microbiology*, vol. 176 (3-4), ss. 365-369. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.005>.
- European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 2015;13 (12). DOI: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- Faverjon, C., Andersson, M.G., Anouk, D., Tapprest, J., Tritz, P., Sandoz, A., Kutasi, O., Sala, C. & Leblond, A. (2016). Evaluation of a Multivariate Syndromic Surveillance System for West Nile Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 16 (6), ss. 382-390. DOI: 10.1089/vbz.2015.1883.
- García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Jaén-Téllez, J.A., Napp, S., Fernández-Morente, M. & Arenas, A. (2012). Use of sentinel serosurveillance of mules and donkeys in the monitoring of West Nile virus infection. *The Veterinary Journal*, vol. 194 (2), ss. 262-264. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.017>.
- Gaunt, M.C., Waldner, C. & Taylor, S.M. (2015). Serological Survey of West Nile Virus in Pet Dogs from Saskatchewan, Canada. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 15 (12), ss. 755-758. DOI: 10.1089/vbz.2015.1780.
- Halliday, J.E.B., Meredith, A.L., Knobel, D.L., Shaw, D.J., de C Bronsvort, B.M. & Cleaveland, S. (2007). A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 4 (16), ss. 973-985. DOI: 10.1098/rsif.2007.0237.
- Healy, J.M., Reisen, W.K., Kramer, V.L., Fischer, M., Lindsey, N.P., Nasci, R.S., Macedo, P.A., White, G., Takahashi, R., Khang, L. & Barker, C.M. (2015). Comparison of the Efficiency and Cost of West Nile Virus Surveillance Methods in California. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 15 (2), ss. 147-155. DOI: 10.1089/vbz.2014.1689.
- Hesson, J.C., Rettich, F., Merdić, E., Vignjević, G., Östman, Ö., Schäfer, M., Schaffner, F., Foussadier, R., Besnard, G., Medlock, J., Scholte, E.-J. & Lundström, J.O. (2013). The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Medical and Veterinary Entomology*, vol. 28 (2), ss. 179-186. DOI: 10.1111/mve.12024.
- Hesson, J.C., Östman, Ö., Schäfer, M. & Lundström, J.O. (2011). Geographic Distribution and Relative Abundance of the Sibling Vector Species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, vol. 11 (10), ss. 1383-1389. DOI: 10.1089/vbz.2011.0630.
- Lim, S.M., Brault, A.C., van Amerongen, G., Sewbalaksing, V.D., Osterhaus, A.D.M.E., Martina, B.E.E. & Koraka, P. (2014). Susceptibility of European jackdaws (*Corvus monedula*) to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile viruses. *Journal of General Virology*, vol. 95, ss. 1320-1329. DOI: 10.1099/vir.0.063651-0.
- Lundström, J.O., Schäfer, M.L., Hesson, J.C., Blomgren, E., Lindström, A., Wahlqvist, P., Halling, A., Hagelin, A., Ahlm, C., Evander, M., Broman, T., Forsman, M. & Persson Vinnersten, T.Z. (2013). The geographic distribution of mosquito species in Sweden. *Journal of the European Mosquito*

*Control Association*, vol. 31, ss. 21-35. Tillgänglig: [http://e-m-b.org/sites/e-m-b.org/files/JEMCA%2831%2921-35\\_1.pdf](http://e-m-b.org/sites/e-m-b.org/files/JEMCA%2831%2921-35_1.pdf) [2017-02-17].

- Monaco, F., Savini, G., Calistri, A., Polci, A., Pinoni, C., Bruno & R., Lelli, R. (2011). 2009 West Nile disease epidemic in Italy: First evidence of overwintering in Western Europe? *Research in Veterinary Science*, vol 91 (2), ss. 321-326. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.008>.
- Morse, S.S. (1995). Factors in the Emergence of Infectious Diseases. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 1 (1), ss. 7. DOI:10.3201/eid0101.950102.
- Mostashari, F., Kulldorff, M., Hartman, J.J., Miller, J.R. & Kulasekera, V. (2003). Dead Bird Clusters as an Early Warning System for West Nile Virus Activity. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9 (6), ss. 641-646. DOI: 10.3201/eid0906.020794.
- Mulatti, P., Bonfanti, L., Capelli, G., Capello, K., Lorenzetti, M., Terregino, C., Monaco, F., Ferri, G. & Marangon, S. (2012). West Nile Virus in North-Eastern Italy, 2011: Entomological and Equine IgM-Based Surveillance to Detect Active Virus circulation. *Zoonoses and Public Health*, vol. 60 (5), ss. 375-382. DOI: 10.1111/zph.12013.
- Niczyporuk, J.S., Samorek-Salamonowicz, E., Lecollinet, S., Pancewicz, S.A., Kozdruń, W. & Czekaj, H. (2015). Occurrence of West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Horses, and Humans in Poland. *BioMed Research International*, 19 mars. DOI: 10.1155/2015/234181.
- Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) (2017). *One Health*. <http://www.oie.int/en/for-the-media/onehealth/> [2017-02-28].
- Pâslaru, A., Porea, D., Savuța, G. & Oșlobanu, L. (2016). West Nile Virus Serosurveillance in Wild Boars from the East of Romania. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*, vol. 73 (1), ss. 144-148. DOI: 10.15835/buasvmcn-vm: 11934.
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F. & Jiménez-Clavero, M.Á. (2014). Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus. *Viruses*, vol. 6 (2), ss. 752-781. DOI: 10.3390/v6020752.
- Petersen, L.R. & Marfin, A.A. (2002) West Nile Virus: A Primer for the Clinician. *Annals of Internal Medicine*, vol. 137 (3), ss. 173-179. DOI: 10.7326/0003-4819-137-3-200208060-00009.
- Resnick, M.P., Grunenwald, P., Blackmar, D., Hailey, C., Bueno, R. & Murray, K.O. (2008). Juvenile Dogs as Potential Sentinels for West Nile Virus Surveillance. *Zoonoses and Public Health*, vol. 55 (8-10), ss. 443-447. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01116.x.
- Rizzo, C., Napoli, C., Venturi, G., Pupella, S., Lombardini, L., Calistri, P., Monaco, F., Cagarelli, R., Angelini, P., Bellini, R., Tamba, M., Piatti, A., Russo, F., Palù, G., Chiari, M., Lavazza, A., Bella, A. & the Italian WNV surveillance working group (2016). West Nile Virus Transmission: Results from the Integrated Surveillance System in Italy, 2008 to 2015. *Eurosurveillance*, vol. 21 (37). DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.37.30340>.
- Saegerman, C., Alba-Casals, A., García-Bocanegra, I., Dal Pozzo, F. & van Gale, G. (2014). Clinical Sentinel Surveillance of Equine West Nile Fever, Spain. *Transboundary and Emerging diseases*, vol. 63 (2), ss. 184-193. DOI: 10.1111/tbed.12243.

Shoba, D. & Abraham, A.S. (2016). Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen. *Infectious Diseases*, vol. 48 (8), ss. 571-586. DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/23744235.2016.1164890>.

Straková, P., Šikutová, S., Jedličková, P., Sitko, J., Rudolf, I. & Hubálek, Z. (2015). The common coot as sentinel species for the presence of West Nile and Usutu flaviviruses in Central Europe. *Research in Veterinary Science*, vol. 102, ss. 159-161. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.08.002>.

Tran, A., Sudre, B., Paz, S., Rossi, M., Desbrosse, A., Chevalier, V. & Semenza, J.C. (2014). Environmental predictors of West Nile fever risk in Europe. *International Journal of Health Geographics*, vol. 13 (26). DOI: 10.1186/1476-072X-13-26.