

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Detekce a charakterizace kmenů viru Usutu
(*Flaviviridae, Flavivirus*) v populacích kosa
černého (*Turdus merula*)

Diplomová práce

Tomáš Kašpar

Vedoucí práce: Mgr. Václav Hönig, Ph.D.
Konzultant: RNDr. Martin Palus, Ph.D.

České Budějovice 2019

Kašpar T., 2019 Detekce a charakterizace kmenů viru Usutu (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) v populacích kosa černého (*Turdus merula*).

[Detection and characterisation of multiple strains of Usutu virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in populations of the Eurasian blackbird (*Turdus merula*). Mgr. Thesis, in Czech.] – **59 p.**, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In this work, detection of the Usutu virus genomic RNA was performed in samples of common blackbirds (and song thrushes) using molecular biology methods. In case of positive results, the nucleotide sequence of the selected parts of the genomic RNA was determined and phylogenetic analysis was performed. Furthermore, multiple strains of the virus were isolated using mammalian and mosquito cell lines and characterized.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 11. 12. 2019

.....

Tomáš Kašpar

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli Mgr. Václavu Hönigovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady, trpělivost, ochotu, přátelský přístup a čas, který mi během mé práce věnoval. Dále pak RNDr. Martinu Palusovi, Ph.D., Ing. Martě Zemanové a zbývajícím členům Laboratoře arbovirologie Parazitologického ústavu BC AV ČR za veškerou pomoc v průběhu této vědecké práce. Poděkování patří také doc. RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za poskytnutí zázemí a samotnou možnost pracovat v této laboratoři. Mé poděkování také patří kolegům detašovaného pracoviště Ústavu biologie obratlovců AV ČR ve Valticích a kolegům z Ústavu patologické morfologie a parazitologie na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně, kteří se na tomto projektu také podíleli. Nakonec bych chtěl poděkovat své přítelkyni a rodině za jejich ochotu a podporu během celého studia.

1. Úvod.....	6
1.1. Obecná charakteristika virů	6
1.2. Obecná charakteristika flavivirů	7
1.2.1. Rod <i>Flavivirus</i>	7
1.2.2. Morfologie flavivirů.....	7
1.2.3. Vstup do buňky a replikace viru.....	8
1.2.4. Klasifikace rodu <i>Flavivirus</i>	9
1.3. Virus Usutu	9
1.3.1. Morfologie viru	10
1.3.2. Hostitel a vektor viru Usutu	11
1.3.3. Tkáňový tropismus viru	13
1.3.4. Prevence a ochrana.....	14
1.3.5. Geografické rozšíření	15
2. Cíle práce	17
3. Materiál a metody	18
3.1. Vzorky	18
3.2. Buněčné linie	20
3.3. Homogenizace vzorků tkání.....	20
3.4. Izolace RNA.....	21
3.5. Jednokroková RT-PCR	21
3.6. Separace na agarózovém gelu	22
3.7. Purifikace PCR produktů a příprava sekvenční reakce	22
3.8. Reverzní transkripce	23
3.9. Polymerázová řetězová reakce.....	23
3.10. Fylogenetická analýza	25
3.11. Izolace viru	25
3.12. Plaková titrace	25
3.13. Nepřímá imunofluorescence.....	26
4. Výsledky	27
4.1. Screening vzorků a výskyt viru ve tkáních.....	27
4.2. Fylogenetická analýza.....	28
4.3. Variabilita sekvencí v příslušných liniích.....	37
4.4. Izolace a množení viru na buněčných kulturách	37
4.5. Nepřímá imunofluorescence	39
5. Diskuze.....	40
6. Závěr	45
7. Seznam použité literatury	46
8. Přílohy.....	57

1. Úvod

1.1. Obecná charakteristika virů

Viry jsou malé infekční částice replikující se uvnitř živých buněk ostatních organismů, přičemž mohou infikovat všechny typy živých organismů od bakterií, přes protozoa až po rostlinné a živočišné buňky (Koonin *et al.*, 2006). Viry existují ve formě nezávislých částic, virionů, které se skládají z nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) obklopené ochranným proteinovým pláštěm zvaným kapsida. Ta je vytvořená z identických proteinových podjednotek zvaných kapsomery. Způsob uspořádání kapsomer udává výsledný tvar kapsidu (např. ikosaedrická, helikální, složená či komplexní struktura). V případě obalených virů obsahuje virová částice kolem kapsidy i obalové lipidy získané z buněčné membrány hostitelské buňky (Caspar & Klug, 1962). Je otázkou, zdali lze viry chápat jako živé organismy nebo jen jako organické struktury interagující se živými organismy. Důvod, proč jsou považovány za živé, je ten, že mají geny, vyvíjejí se přirozeným výběrem a mohou se reprodukovat tím, že vytvářejí vícečetné klony. Na druhou stranu nemají buněčnou strukturu, ani metabolismus a k replikaci, transkripci i translaci genetické informace potřebují výpomoc hostitelské buňky (Rybicki, 1990).

Viry mohou invadovat do cizího organismu mnoha způsoby. Může to být sexuálním kontaktem, vdechnutím aerosolu, poraněním, pozřením kontaminované potravy anebo pomocí vektoru, což je v širokém smyslu slova jakékoli agens, které nese a přenáší infekční patogen do jiného živého organismu (Last, 2001). Poslední zmíněný způsob invaze je z pohledu zdraví člověka i zvířat významný zejména v případě přenosu (zoonotických) virových infekcí členovci. Členovci (především klíšťata a komáři) jsou hlavní skupinou přenašečů patogenů v živočišné říši. Většina těchto přenašečů je hematofágní, což znamená, že se živí krví v některých nebo ve všech fázích svého životního cyklu (Garcia, 1999). Přenos vektorem můžeme dále dělit na mechanický a biologický. Mechanický znamená, že původce nemoci se vyskytuje na povrchu těla nebo ve střevě vektoru, ale nemnoží se. Biologický přenos je charakterizován tím, že se patogenní agens ve vektoru množí (případně prodělavá část svého vývojového cyklu) a poté je přenesen na hostitele (např. malárie nebo žlutá zimnice).

Dalším důležitým článkem při přenosu viru jsou rezervoáry. Ty můžeme definovat jako populaci organismů nebo specifické prostředí, ve kterém patogen přirozeně žije a množí se, aniž by (většinou) způsobil onemocnění.

1.2. Obecná charakteristika flavivirů

Čeleď *Flaviviridae* zahrnuje čtyři rody – *Flavivirus*, *Hepacivirus* (virus hepatitidy C), *Pegivirus* (virus hepatitidy G) a *Pestivirus*. Viry spadající do jednotlivých rodů jsou biologicky odlišné, ale fyzikálně-chemické vlastnosti a organizaci genomu mají velice podobnou (Simmonds *et al.*, 2017; Stapleton *et al.*, 2011).

1.2.1. Rod *Flavivirus*

Rod *Flavivirus* obsahuje více než 75 dosud popsáných virů, z nichž přibližně 30 má význam pro zdraví člověka. Virus žluté zimnice (YFV), virus dengue (DENV), virus západního Nilu (WNV), virus japonské encefalitidy (JEV), virus encefalitidy St. Louis (SLEV), virus Zika (ZIKV) či virus klíšťové encefalitidy (TBEV) patří v globálním měřítku mezi nejdůležitější virové patogeny člověka. Onemocnění způsobená těmito viry se liší od mírného febrilního onemocnění doprovázeného vyrážkou, až po život ohrožující hemoragické horečky, hepatitidy a encefalitidy. Prvním popsáným flavivirem, který je patogenní pro člověka, byl virus žluté zimnice. Během vyšetřování epidemie této nemoci v Havaně v roce 1900 Walter Reed, James Carroll a jejich kolegové zjistili, že původce této nemoci je virus přenášený komárem *Aedes aegypti*. Po identifikaci původce onemocnění a zejména jeho vektoru byl zahájen eradikační proces založený na snížení počtu tohoto druhu komára. Ten měl za následek odstranění tohoto onemocnění hlavně z měst nacházejících se na pobřeží (Burrell *et al.*, 2017).

1.2.2. Morfologie flavivirů

Flaviviry jsou sférické viry o průměru 40-60 nm obsahující jednovláknovou pozitivně nabitou RNA, což je řadí do IV. třídy Baltimorské klasifikace virů. Genom je obalen ikosaedrickou kapsidou, která je pokryta lipidovou dvouvrstvou. Povrch virových částic obsahuje dva virové proteiny, protein E (“envelope“) a M (“membrane“). Glykoprotein E je hlavní antigenní determinantou zprostředkovávající vazbu a fúzi při vstupu viru do buňky (Lindenbach *et al.*, 2007).

1.2.3. Vstup do buňky a replikace viru

Mechanismus vstupu flavivirů do buňky dosud nebyl do detailu popsán. První krok v infekci buňky zahrnuje vazbu glykoproteinu E na buněčný receptor (nebo receptory). V posledních letech bylo identifikováno několik vazebných faktorů jako například: heparan sulfát, protein teplotního šoku 70 a 80 nebo C-lektinové receptory. Poté, co se virus naváže na vhodný receptor, dojde k receptorem zprostředkované endocytóze. Po internalizaci do hostitelské buňky je endocytární vezikula nesoucí virus transportována do časných endozómů, které následně zrají do pozdních endozómů. Kvůli nízkému pH uvnitř endozómů dochází ke konformačním změnám virového obalového proteinu E, což vede k fúzi virové membrány s endozomální membránou a následnému uvolnění nukleokapsidu do cytoplazmy (Smit *et al.*, 2011).

K replikaci flavivirového genomu dochází v tzv. replikačním komplexu vázaném na vnější membránu endoplazmatického retikula. Tento komplex se sestává z virových nestrukturních proteinů, virové RNA a dosud neidentifikovaných hostitelských proteinů (Lindenbach *et al.*, 2007). Replikační cyklus flavivirů se skládá ze syntézy RNA, vytvoření čepičky („RNA capping“) a metylace RNA. Nukleová kyselina uvolněná do cytoplazmy, v tomto případě RNA s pozitivní polaritou ((+) RNA), slouží jako templát pro vytvoření komplementárního vlákna s negativní polaritou ((-) RNA) pomocí virové RNA dependentní RNA polymerázy a vznikne tak dvouvláknový intermediát. (-) RNA ve dvouvláknovém meziprojektu poté slouží jako templát pro generování nového (+) RNA vlákna. K rozvolnění dsRNA dochází aktivitou virové helikázy (nestrukturní protein NS3). Vznikající pozitivní vlákno syntetizované na (-) RNA templátu vytlačí již existující (+) vlákno. Nově vytvořená dsRNA je poté znovu použita jako templát pro generování dalších kopií (+) RNA. Nově vzniklé (+) RNA jsou dále metylovány a opatřeny čepičkou („RNA capping“) (Klema *et al.*, 2015). V hrubém endoplasmatickém retikulu jsou virové částice shromažďovány a dochází zde ke štěpení proteinu C od komplexu C-prM-E pomocí virové proteázy NS2B/NS3. Tento proces je důležitý pro následné štěpení proteinů prM a E signální peptidázou hostitelské buňky, což má za následek vytvoření nezralých částic složených z heterodimerů proteinů prM-E. Dále jsou pak viriony transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou obaleny do váčků pro sekreci. Těsně před uvolněním virionu z hostitelské buňky je pr fragment odštěpen od proteinu M buněčnou furinovou proteázou. Štěpením pr fragmentu se změní konformace proteinu E, čímž se vytvoří zralé částice. Rozdíly v hladinách exprese těchto proteáz v různých buňkách

vedou k heterogenní populaci částic: zralé, nezralé a částečně zralé (Krol *et al.*, 2019). Posledním krokem je exocytóza, při které získají svůj obal (Klema *et al.*, 2015).

1.2.4. Klasifikace rodu *Flavivirus*

Řada flavivirů patří mezi arboviry, tedy viry, které jsou mezi obratlovčími hostiteli přenášeny pomocí členovců (komárů, klíšťat a dalších). Některé flaviviry patogenní pro člověka jsou zoonózy, což jsou nákazy přenosné ze zvířete na člověka, ale obtížně přenosné nebo zcela nepřenosné z člověka na člověka (např. TBEV, WNV atd.). Pro jiné je pak člověk (zejména v urbánních cyklech) i významným či hlavním hostitelem podílejícím se na cirkulaci viru (např. YFV) (Huang *et al.*, 2014). Podle hostitele a typu vektoru můžeme flaviviry rozdělit do 4 skupin:

A) Přenos viru zprostředkovaný komárem („mosquito-borne viruses“) – YFV, DENV, JEV a další (Huang *et al.*, 2014).

B) Přenos viru zprostředkovaný klíšťaty („tick-borne viruses“) - TBEV (savci) nebo virus Kama (mořští ptáci) (Bartíková *et al.*, 2017).

C) Flaviviry, u kterých dosud nebyl popsán vektor („no known vector viruses“) – virus Rio Bravo (Blitvich & Firth, 2017).

D) Viry specifické pro hmyz („insect-specific viruses“), které neinfikují obratlovce – virus Palm Creek (Hall-Mendelin *et al.*, 2016).

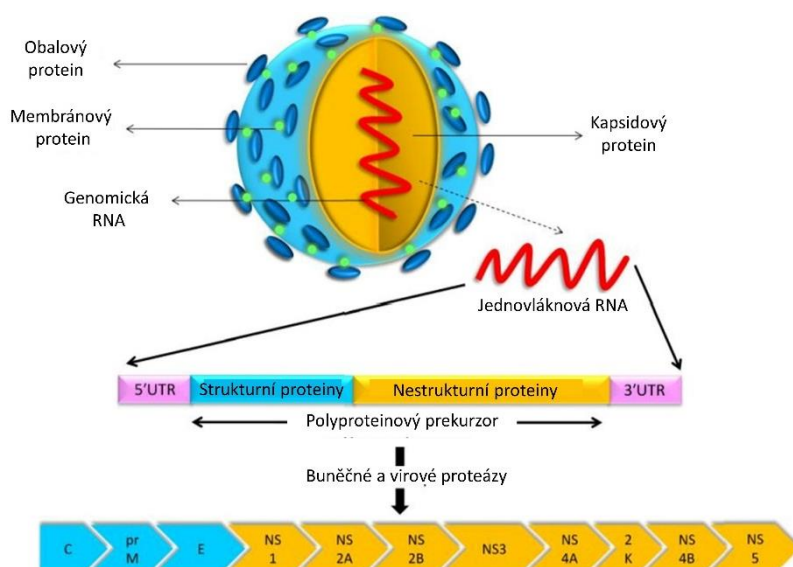
1.3. Virus Usutu

Virus Usutu (USUV) je komáry přenášený virus patřící do rodu *Flavivirus* čeledi *Flaviviridae*. Sérologicky je virus Usutu klasifikován jako člen antigenního komplexu (sérokomplexu) viru japonské encefalitidy (JEV). Na rozdíl od jiných zástupců patřících do čeledi *Flaviviridae*, jako je WNV, YFV a DENV, v současné době neexistují žádné komplexní studie o vlastnostech a replikaci USUV. Na základě struktury genomu se však dá předpokládat, že se tento virus chová podobně jako výše zmíněné flaviviry (Weissenböck *et al.*, 2010). Virus Usutu byl poprvé izolován v roce 1959 z dospělé samice komára *Culex neavei* ve

Svazijsku (dnes království Eswatini) v oblasti Natal v jižní Africe poblíž řeky, podle které byl následně pojmenován (Nikolay *et al.*, 2011; Pauli *et al.*, 2014).

1.3.1. Morfologie viru

Obecně odpovídá morfologie viru Usutu charakteristikám uvedeným výše pro čeled' *Flaviviridae* – malý sférický virion o průměru 40-60 nm je obalen lipidovou dvouvrstvou odvozenou z hostitelské buňky. Pod lipidovou dvouvrstvou se nachází ikosaedrální kapsida, která chrání jednovláknovou molekulu RNA s pozitivní polaritou o délce přibližně 11 000 nukleotidů (Gaibani & Rossini, 2017). Genom viru Usutu kóduje jeden dlouhý polyprotein o velikosti 3400 aminokyselin ohraničený dvěma netranslatovanými oblastmi (3' a 5' UTR). Virový polyprotein je štěpen buněčnými a virovými proteázami. První tři geny v pořadí kódují strukturální proteiny: kapsidový protein (C), prekurzorový membránový protein a samotný membránový protein (prM a M) a obalový protein (E). Zbylá část genomu kóduje 7 nestrukturních proteinů s enzymatickou a regulační aktivitou: NS1 (inhibuje přenos signálu z TLR3 (Toll-like receptor) a interferuje s funkcí komplementu), NS2A (inhibuje aktivaci IFN- β a je nezbytný pro kompletaci virionu), NS2B (kofaktor serinové proteázy NS3), NS3 (serinová proteáza, 5'-RNA-trifosfatáza, nukleosid-trifosfatáza a ATP-dependentní RNA helikáza), NS4A (modifikuje endoplazmatické retikulum), NS4B (blokuje IFN odpověď); NS5 (RNA-dependentní RNA polymeráza, metyltransferáza) (Pauli *et al.*, 2014). Schéma virové částice a genomu viru Usutu je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1: Schéma genomu viru Usutu (upraveno dle Ashraf *et al.*, 2015).

1.3.2. Hostitel a vektor viru Usutu

Virus je udržován v přirozeném životním cyklu ornitofilními druhy komárů (zejména rodu *Culex*) coby jeho hlavními vektory a ptáky jako hlavními hostiteli. Lidé jsou pouze náhodnými hostiteli a na cirkulaci viru se pravděpodobně nijak nepodílí (Roesch *et al.*, 2019).

Komáři

Komáři rodu *Culex* jsou považováni za hlavní vektory USUV. Tento rod obsahuje převážně ornitofilní druhy, nicméně dnes je známo, že mnoho druhů má velký rozsah hostitelů a živí se nejen krví ptáků, ale také obojživelníků, plazů, a také krví lidí a dalších savců. Kromě komára *Cx. neavei* byl USUV izolován také z jiných druhů jako je *Cx. perfuscus*, *Cx. quinquefasciatus* nebo *Cx. pipiens*. Poslední jmenovaný je považován za nejběžnější vektor tohoto viru a *Cx. quinquefasciatus* patří pak mezi nejvíce antropofilní vektory USUV (Calzolari *et al.*, 2012; Fros *et al.*, 2015; Nikolay *et al.*, 2011). Dále byl USUV detekován také u jiných druhů komárů, jako jsou *Aedes albopictus*, *Ae. japonicus*, *Ae. vexans* (taxonomie dle (Wilkerson *et al.*, 2015)), *Anopheles maculipennis*, *An. plumbeus*, *Coquillettidia richiardii*, *Culiseta annulata* a některé druhy rodů *Ochlerotatus* a *Mansonia* (Camp *et al.*, 2019; Lebl *et al.*, 2015; Mancini *et al.*, 2017). Nicméně jako kompetentní vektory pro přenos USUV byly prokázány pouze druhy rodu *Culex* a dále pak *Ae. albopictus*, který sice vykazuje nižší kompetenci pro USUV než komáři rodu *Culex*, ale virus prokazatelně překonává střevní bariéru a replikuje se v těle komára (Fros *et al.*, 2015; Hernández-Triana *et al.*, 2018; Roesch *et al.*, 2019). S ohledem na bionomii různých druhů komárů se u komára *Cx. neavei* předpokládá, že se účastní sylvatického cyklu přenosu viru v Africe, zatímco druhy jako *Cx. quinquefasciatus* mohou fungovat jako epizootický-epidemický vektor (Nikolay *et al.*, 2011).

Ptáci

Kromě komárů byl USUV také izolován z některých druhů ptáků. První izoláty byly získány z ptáků pocházejících z Afriky (Nigérie) jako je zoborožec hvízdavý (*Bycanistes fistulator*), bulbul malý (*Eurillas virens*) nebo drozd rudozobý (*Turdus libonyana*) (Nikolay *et al.*, 2011). Nicméně žádný z těchto zmíněných ptáků nepatří mezi tažné druhy, což naznačuje, že pravděpodobně nejsou zapojeny do šíření toho viru z Afriky do Evropy. Přítomnost protilátek proti USUV byla ovšem prokázána u mnoha stěhovavých druhů ptáků odchycených v Evropě např.: poštolka obecná (*Falco tinnunculus*), rákosník obecný (*Acrocephalus scirpaceus*), moták pochop (*Circus aeruginosus*), vlaštovka obecná (*Hirundo rustica*), pěnice pokřovní (*Sylvia curruca*) či lejsek černohlavý (*Ficedula hypoleuca*) (Meister *et al.*, 2008).

Tyto druhy mohou hrát klíčovou roli při přenosu USUV z Afriky do Evropy, zatímco druhy jako jsou straka obecná (*Pica pica*), vrabec domácí (*Passer domesticus*) a kos černý (*Turdus merula*) mohou být zodpovědní za šíření tohoto viru v Evropě (Nikolay, 2015). Ačkoli byl virus několikrát objeven u různých druhů komárů a ptáků v Africe, nikdy zde nebyl spojován s klinickým onemocněním ptáků nebo savců (kromě velmi vzácných infekcí člověka), a proto nepřitahoval větší vědeckou pozornost (Nikolay *et al.*, 2011; Saiz & Blazquez, 2017). V létě 2001 se však USUV nečekaně objevil ve střední Evropě, konkrétně ve Vídni, a byl zodpovědný za velké úhyny v populacích kosa černého a puštíka vousatého (*Strix nebulosa*) (Weissenböck *et al.*, 2002). Po histologickém vyšetření bylo zjištěno, že ptáci zasažení touto epidemií trpěli hepatosplenomegalií, nekrózami v nervové tkáni, játrech a slezině a lézemi v myokardu. Virus byl prokázán v mozkové tkáni pomocí tří metod – imunohistochemií, hybridizací *in situ* a reverzní transkriptázovou polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) (Chvala *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že někteří pěvci (zvláště kos černý) a některé druhy sov (puštíka vousatý) vykazují vyšší míru citlivosti k infekci USUV než ostatní druhy, co se týče klinických projevů i mortality (Becker *et al.*, 2012; Chvala *et al.*, 2004; Rijks *et al.*, 2016).

Další obratlovci

Kromě již zmíněných živočichů byl USUV zaznamenán u koní v Itálii (2008-2009), Srbsku (2008-2009), Chorvatsku (2011), Španělsku (2011-20120) a Maroku (2012), kde byl také zaznamenán jeden případ u psa (Clé *et al.*, 2019). Jak ukazuje studie Savini *et al.* (2011), tak koně nejsou příliš vhodnými hostiteli pro tento virus. V roce 2013 byly v jihozápadním Německu nalezeny dva kadávery netopýra hvízdavého (*Pipistrellus pipistrellus*), u kterých byl ze tkáně mozku detekován USUV. Z výsledků Cadar *et al.* (2014) vyplývá, že i netopýři pravděpodobně přispívají k cirkulaci tohoto viru. U prasete divokého (*Sus scrofa*) (Srbsko 2011–2012), jelena evropského (*Cervus elaphus*), daňka evropského (*Dama dama*), muflona (*Ovis aries musimon*) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*) nebyl sice USUV detekován přímo, ale byly zjištěny protilátky specifické proti tomuto viru (Saiz & Blazquez, 2017). Virus Usutu byl dále detekován u hlodavců z Afriky - krysa obecná (*Rattus rattus*), krysa mnohobradavková (*Mastomys natalensis*) a hmyzožravců - bělozubka (*Crocidura* sp.). U těchto živočichů nebyly pozorovány žádné projevy nemoci ani příznaky, které by poukazovaly na patogenní infekci. To naznačuje, že hlodavci by mohli být zapojeni do replikačního cyklu USUV jako hostitel nebo jako rezervoár (Diagne *et al.*, 2019).

Infekce člověka

U většiny lidí je průběh infekce asymptomatický a v případě příznaků se nejčastěji jedná o horečku, vyrážku a žloutenku. Zejména u imunokompromitovaných pacientů se může navíc rozvinout neurologické onemocnění s postižením centrálního nervového systému (nejčastěji meningoencefalitida) (Clé *et al.*, 2019). První případ nákazy člověka byl zaznamenán v roce 1981 ve Středoafričské republice, kdy pacient trpěl vyrážkou a horečkou. V dalším případě se k původním symptomům přidala ještě žloutenka (Clé *et al.*, 2019; Saiz & Blazquez, 2017). V Evropě byl u člověka tento virus poprvé zaznamenán v roce 2009 v Itálii, a to u dvou pacientů, u kterých způsobil meningoencefalitidu (Pecorari *et al.*, 2009). Stav jednoho z těchto dvou pacientů byl natolik vážný, že bylo nutné, aby podstoupil ortotropní transplantaci jater (Cavrini *et al.*, 2009). Později byla neuroinvazivní infekce, způsobená USUV, popsána také v Chorvatsku v roce 2013 (Calzolari *et al.*, 2012). Tyto případy ukazují, že USUV může být pro člověka patogenní. Vzhledem k tomu, že nelze vyloučit, že se v budoucnu objeví virulentnější kmeny, které by mohly představovat vážné ohrožení lidského zdraví (Nikolay *et al.*, 2011), je na místě pokračovat v „surveillance“ tohoto viru a vyvíjet postupy pro diagnostiku (odlišení od jiných flavivirových neuroinfekcí) a léčbu této infekce.

V roce 2012 bylo v Německu v rámci programu pro sérologické sledování lidí testováno 4200 vzorků lidského séra, kde pouze jeden vykazoval neutralizační protilátky proti tomuto viru (Allering *et al.*, 2012). Obdobně nízká séroprevalence byla zjištěna u dárců krve v Itálii (v endemické oblasti Ferrara) a v Rakousku. U většiny dárců (kromě 2) s pozitivními protilátkami proti USUV nebyly zaznamenány žádné příznaky (Aberle *et al.*, 2018; Gaibani *et al.*, 2012). U některých dárců krve byl virus detekován přímo pomocí RT-PCR (Aberle *et al.*, 2018; Gaibani *et al.*, 2012).

1.3.3. Tkáňový tropismus viru

Virus Usutu se replikuje v řadě buněčných linií a kultur lidského nebo zvířecího původu, například: HeLa (lidské – epiteliální buňky cervixu), Vero (opičí – buňky z ledvin), PK-15 (prasečí – buňky z ledvin), BHK-21 (křeček – fibroblastové buňky ledvin), primární fibroblasty husího embrya a buňky ledvin koní (Bakonyi *et al.*, 2005). Cytopatický efekt se projevil pouze u některých buněk (např. Vero, PK-15) (Clé *et al.*, 2019). Silný cytopatický účinek byl také pozorován u lidských nervových buněk (neuronů, astrocytů, mikroglíí a lidských neuronálních kmenových buněk) (Salinas *et al.*, 2017).

Virus Usutu byl detekován v mozku, srdci, játrech, ledvinách, plicích a střevech tkání laboratorně infikovaných myší a přirozeně infikovaných ptáků, a tento tkáňový tropismus je podobný jako u viru západního Nilu (Chvala *et al.*, 2004; Weissenböck *et al.*, 2004a). Ukázalo se však, že zatímco apoptóza neuronů je obecným rysem flavivirové infekce, tak demyelinizace neuronů je unikátní pro infekci USUV (Weissenböck *et al.*, 2004a). Schopnost replikace USUV v takovém počtu buněk různého původu by mohla souviset s jejím přenosovým cyklem, který zahrnuje replikaci v komárech a v celé řadě obratlovčích hostitelů, jako jsou ptáci, savci (včetně lidí) a další (Saiz & Blazquez, 2017).

1.3.4. Prevence a ochrana

Dosud neexistují žádné vakcíny ani léky specifické proti infekci USUV. Zatím jedinou úspěšnou profylaxí je zabránit kontaktu s komárem hlavně tam, kde je USUV endemický, nebo kde byl hlášen výskyt tohoto viru. Toho lze dosáhnout použitím repelentu proti hmyzu, používáním moskytiér a ochranných sítí do oken, zakrýt co nejvyšší procento kůže, kde by mohl komár sát a také zbytečně nevycházet ven v době, kdy je aktivita komárů nejvyšší. Až dosud bylo u lidí pozorováno jen málo symptomatických infekcí, a proto zatím nejsou zkušenosti s léčbou. Dosavadní postupy jsou založeny na léčení symptomů a podpurných opatřeních, jako jsou intravenózní antipyretika, zabránění dehydratace, podpora dýchání a prevence proti sekundárním infekcím. Na druhou stranu byly popsány látky s efektem ovlivňující replikaci viru *in vitro* jako – inhibitor acetyl-CoA karboxylázy TOFA a MEDICA 16 a inhibitory autofagie 3-methyladenin nebo wortmannin (Blázquez *et al.*, 2013; Merino-Ramos *et al.*, 2016; Pauli *et al.*, 2014; Saiz & Blazquez, 2017).

Virus Usutu a další viry patřící do sérokomplexu japonské encefalitidy mají společné antigenní vlastnosti, což se odráží v potenciálu indukovat zkříženě reaktivní protilátky. Zkřížená reaktivita protilátek mezi různými flaviviry je pro diagnostické účely nevýhodná, protože zabraňuje identifikaci specifického patogenu pomocí sérologických testů. Nicméně zkřížená reaktivita může být výhodná pro tvorbu flavivirových vakcín proti různým, ale antigenně příbuzným patogenům v sérokomplexu japonské encefalitidy (Merino-Ramos *et al.*, 2014). Zkřížená reaktivita v diagnostických testech byla prokázána s protilátkami proti viru západního Nilu (Stiasny *et al.*, 2013). V některých případech může přítomnost zkříženě reagujících protilátek, získaných během primární infekce, zvýšit infekčnost a zhoršit výsledek onemocnění v případě infekce virem antigenně podobným. Tento jev se jmenuje „antibody-

dependent enhancement“ (ADE) a byl pozorován *in vitro* a je stále předmětem diskuse u několika virů, především flavivirů, jako je DENV (Beck *et al.*, 2013).

1.3.5. Geografické rozšíření

Jak už bylo zmíněno výše, tak USUV byl poprvé objeven v roce 1959 v jižní Africe. V Africe virus neustále cirkuluje a byl detekován v Senegal, Ugandě, Středoafričské republice, Nigérii, Burkině Faso, Pobřeží slonoviny a v Keni. Mimo Afriku byl virus detekován v roce 2001 ve Vídni, kde způsobil rozsáhlé úhyny v populacích kosa černého a puštíka vousatého. Z retrospektivní analýzy uchovaných tkání mrtvých ptáků pocházejících z Toskánska v Itálii bylo ovšem zjištěno, že se USUV vyskytuje v Evropě už od roku 1996 (Weissenböck *et al.*, 2013). Počet mrtvých ptáků v roce 2001 ve Vídni, u nichž byl USUV detekován, byl relativně nízký, avšak tento počet vzrostl v extrémně horkém létě v roce 2003 (Brugger & Rubel, 2009; Chvala *et al.*, 2004). V následujících letech došlo k poklesu úhynů ptáků v této oblasti, což mohlo být způsobeno vytvořením imunity, respektive neutralizačních protilátek proti tomuto viru. Na druhou stranu došlo k rozšíření USUV do okolních oblastí (Meister *et al.*, 2008). V posledních letech, 2017-2018, byla na tomto území zachycena RNA tohoto viru u 24 dárců krve (Aberle *et al.*, 2018; Bakonyi *et al.*, 2017).

V Maďarsku byl tento virus poprvé detekován v roce 2005 v Budapešti u kosa černého a v následujícím roce přibylo dalších 6 záchytů (Bakonyi *et al.*, 2007).

V létě v roce 2006 byl virus detekován u mrtvých ptáků ve Švýcarsku konkrétně v Curychu. Od roku 2008 byla pozorována výrazně nižší úmrtnost u divokých ptáků a v ten samý rok byla poprvé potvrzena infekce USUV mimo Curych (Steinmetz *et al.*, 2011).

V letech 2006-2008 byla infekce USUV diagnostikována v severní Itálii u dvou kosů černých a u třech sov – puštíka vousatého, kulíška nejmenšího (*Glaucidium passerinum*) a sovice krahujové (*Surnia ulula*) (Manarolla *et al.*, 2010). Dále pak byl zachycen v letech 2017-2018 v oblasti Lazia u pěti dárců krve (Carletti *et al.*, 2019).

Ve Španělsku byl USUV poprvé objeven v roce 2006 na území Katalánska ve směsném vzorku komára *Culex pipiens* (Vázquez *et al.*, 2011). Dále pak byl detekován v roce 2012 u dvou drozdů zpěvných (*Turdus philomelos*), u nichž způsobil encefalitidu (Höfle *et al.*, 2013).

V Německu byl virus poprvé prokázán ve směsném vzorku komára *Cx. pipiens pipiens* v roce 2010. O rok později došlo k rozšíření viru do jihozápadní oblasti, kde způsobil úhyny v populacích kosů, drozdů a některých druhů sov (Becker *et al.*, 2012). Na území Německa se tento virus od té doby vyskytuje endemicky (Michel *et al.*, 2019).

V ten samý rok byl zaznamenán první záchyt toho viru na území České republiky v Brně, kde byl izolován z kosa černého (Hubálek *et al.*, 2014).

V Belgii byl tento virus poprvé identifikován v roce 2012 u hýla obecného (*Pyrrhula pyrrhula*) a strakapouda velkého (*Dendrocopos major*), kde u obou ptáků způsobil neurologické příznaky. O čtyři roky později byly po celé zemi zaznamenány vysoké úhyny ptáků spojené s infekcí USUV. Navíc v letech 2017-2018 byl virus izolován také z netopýrů (*Pipistrellus pipistrellus*) a tato zjištění společně naznačují, že USUV dokázal vytvořit přenosový cyklus mezi místními druhy ptáků, netopýrů a komárů a přezimovat v oblastech, které se posléze staly endemickými (Benzarti *et al.*, 2019; Garigliany *et al.*, 2014).

V roce 2015 byl zaznamenán zvýšený počet úhynů v populacích kosa černého ve východní Francii, kde bylo zjištěno, že se jedná také o USUV (Lecollinet *et al.*, 2016). O rok dříve byl tento virus poprvé izolován v Srbsku ze směsného vzorku komárů (Kemenesi *et al.*, 2018). Výskyt viru byl dále potvrzen v roce 2016 v Nizozemsku, kde došlo ke značným úhynům u kosů a některých druhů sov (Rijks *et al.*, 2016).

V ten samý rok byla také zaznamenána zvýšená aktivita viru v Belgii a Francii, kam byl zanesen s největší pravděpodobností z Německa infikovanými ptáky žijícími na tomto území, ačkoli nelze vyloučit ani roli migrujících ptáků nebo komárů (Cadar *et al.*, 2017). Sérologicky byl kontakt s USUV také prokázán u ptáků v Anglii, Polsku, Řecku a v Srbsku (Gaibani & Rossini, 2017).

2. Cíle práce

1. Vypracovat rešerši k problematice biologie a epidemiologie viru Usutu (zejména v Evropě)
2. Ve vzorcích tkání kosů černých (*Turdus merula*) se pokusit detekovat virus Usutu pomocí molekulárně biologických metod
3. V případě pozitivních záchytů stanovit nukleotidovou sekvenci vybraných částí genomické RNA viru a provést základní fylogenetickou analýzu
4. Pokusit se o izolaci viru na savčích a komářích buněčných liniích a charakterizovat množení viru v těchto liniích

3. Materiál a metody

Praktická část diplomové práce byla zpracovávána v Laboratoři arbovirologie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR.

3.1. Vzorky

Vzorky pro detekci viru byly získány z kadáverů kosa černého (*T. merula*) a drozda zpěvného (*T. philomelos*), které byly shromážděny v rámci projektu „Role volně žijících zvířat ve městech v koloběhu vektory přenášených zoonotických patogenů s důrazem na *Anaplasma phagocytophilum*“, GAČR:17-16009S, 2017-2019. Pitvy byly prováděny našimi kolegy z Ústavu patologické morfologie a parazitologie na Veterinární a farmaceutické univerzitě v Brně. Vzorky tkání pro detekci byly následně uchovány v pufru RLT (Qiagen) při -80°C. Alikvóty vzorků tkání pro izolaci byly uchovány bez pufru při -80 °C. Celkem se jednalo o 65 jedinců. Padesát pět vzorků pocházelo z kosa černého (*T. merula*) a 10 z drozda zpěvného (*T. philomelos*). Kadávery pocházely z Brna, Českých Budějovic a Prahy a jejich blízkého okolí. Místa nálezů jednotlivých vzorků jsou zaznamenána v Obr. 2. Detailní informace k jednotlivým vzorkům (včetně GPS souřadnic míst nálezů) jsou uvedeny v Příloze P1.

Dále jsme z detašovaného pracoviště Ústavu biologie obratlovců AVČR ve Valticích obdrželi dva již zhomogenizované vzorky komárů: 16-99 *Culex modestus* (směsný vzorek 52 samic komára *Cx. modestus*, lokalita: Hlohovecký rybník, obec Hlohovec, datum sběru: 1.9.2016) a "136" *Cx. pipiens* (směsný vzorek 42 samic komára *Cx. pipiens*, lokalita: rybník Černičný, obec Lomnice nad Lužnicí, datum sběru: 13.-14.8. 2018); a jeden vzorek kosa černého 001TM10 (samice, lokalita: Břeclav centrum, datum sběru: 24.7. 2018). Tyto vzorky byly již dříve pozitivně testovány na přítomnost genomické RNA USUV.

3.2. Buněčné linie

Pro naše experimenty byly použity savčí (PS) a komáří buněčné linie (C6/36). Savčí buněčná linie PS, původně získána z buněk prasečích ledvin („porcine kidney stable“), byla kultivována v médiu Leibovitz L15 (*Biosera*) s 3 % prekolostrálního telecího séra (PTS) (*Biosera*), 1 % směsi antibiotik a antimykotik (ATB) (*Biosera*) a 1 % L-glutaminu (GL) (*Biosera*). Buňky byly inkubovány při 37 °C. Pravidelné pasáže byly prováděny metodou suché trypsinizace. Tato linie byla používána pro izolaci a titraci viru a pro nepřímou imunofluorescenci.

Komáří buněčná linie C6/36, původně získána z epitelálních buněk komára *Aedes albopictus* byla kultivována v médiu Leibovitz L15 (*Biosera*) s 10 % bovinního fetálního séra (BOFES) (*Biosera*), 5 % tryptozofosfátového bujónu (*Sigma-Aldrich*), 1 % ATB (*Biosera*) a 1 % GL (*Biosera*). Buňky byly inkubovány při 28 °C. Pravidelné pasáže byly prováděny metodou suché trypsinizace. Tyto buňky byly používány pro izolaci viru a pro nepřímou imunofluorescenci.

3.3. Homogenizace vzorků tkání

Před homogenizací byl ke vzorkům přidán čerstvý beta-merkaptoetanol (10 ul / 1 ml pufri RLT). Ze vzorků tkání byly pomocí sterilních homogenizačních ocelových kuliček o průměru 5 mm (*Qiagen*) a automatického homogenizátoru Tissue Lyzer II vytvořeny 30% (w/v) suspenze. Parametry homogenizace se lišily pro jednotlivé tkáně (Tab. I). Se vzorky bylo po celou dobu manipulováno na ledu, homogenizace probíhala v předchlazených adaptérech. Po homogenizaci bylo do vzniklého homogenátu přidáno 20 µl proteinázy K (*Qiagen*), aby došlo ke kompletní lýze tkání. Následně byly za občasného vortexování vzorky inkubovány 30 min při 56 °C. Po lýze byly vzorky krátce centrifugovány a supernatant odebrán do nové sterilní zkumavky. Vzorky pro izolaci RNA byly skladovány při -80 °C.

Tab. I: Parametry homogenizace pro jednotlivé tkáně.

Tkáň	Homogenát (%)	Čas homogenizace (min)
1. Krev	-	-
2. Plíce	30	1
3. Játra	30	0,5
4. Slezina	30	0,5
5. Ledviny	30	3
6. Mozek	30	2

3.4. Izolace RNA

Extrakce RNA byla prováděna pomocí kitu QIAamp® Viral RNA Mini Kit (*Qiagen*) dle pokynů výrobce s modifikacemi popsány níže. Pro izolaci bylo použito 140 µl 30% homogenátu (nebo stejný objem vzorku krve). V rámci izolace byla provedena digesce DNA na kolonci (10 ul DNázy + 70 ul pufru RDD) (RNase free DNase Set, *Qiagen*). Celkový eluční objem byl 60 µl pufru AVE. Z důvodů zajištění vyššího výtěžku byl eluát znovu použit pro opakovanou eluci. Zkumavky s izolovanou RNA byly skladovány při -80 °C.

3.5. Jednokroková RT-PCR

Screening vzorků na přítomnost flavivirové RNA byl prováděn pomocí jedнокrokové reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) kitem OneStep RT-PCR (*Qiagen*) podle pokynů výrobce. Byly použity univerzální primery specifické pro viry rodu *Flavivirus*, v koncentraci 0,6 µM (Scaramozzino *et al.*, 2001). Jako templát posloužila RNA získaná z homogenátů vzorků tkáně. Poměry jednotlivých složek mastermixu a průběh programu jsou uvedeny níže (Tab. II a III).

Tab. II: Složení reakční směsi.

Master Mix	1 reakce (µl)	Finální koncentrace
Voda „RNase free“	11	-
Pufr 5x	5	2,5 mM Mg ²⁺
dNTP	1	400 µM
Forward primer	1	0,6 µM
Reverse primer	1	0,6 µM
Enzyme mix	1	-
Templát (RNA)	5	-
Celkový objem	25	

Tab. III: Čas a teplota pro jednotlivé reakce jednokrokové RT-PCR.

Počet opakování	Reakce	Čas (min)	Teplota (°C)
	Reverzní transkripce	60	50
	Počáteční aktivace polymerázy a deaktivace reverzní transkriptázy	15	95
40x	Denaturace	1	94
	Nasedání primerů	1	57
	Syntéza nového řetězce	1	72
	Finální syntéza	3	72

3.6. Separace na agarózovém gelu

Pro separaci produktů PCR byl použit 2% agarózový gel do jehož jamek byla přidána směs 10 μ l produktu PCR a 3 μ l nanášecího pufru (*ThermoFisher scientific*) s barvivem Sybr Green (*Sigma Aldrich*). Pro odhad velikosti separovaných fragmentů byl použit velikostní standard GENERULER 100 bp PLUS (*ThermoFisher scientific*). Separace probíhala při 125 V po dobu 30-45 min.

3.7. Purifikace PCR produktů a příprava sekvenační reakce

PCR produkt odpovídající očekávané velikosti, byl enzymaticky purifikován přidáním 0,2 μ l alkalické fosfatázy (*ThermoFisher scientific*) a 0,2 μ l exonukleázy I (*ThermoFisher scientific*). Jednotlivé kroky purifikace, čas a teplota jsou zaznamenány v Tab. IV. Následně byly vzorky spolu s primery zaslány na sekvenaci (*SeqMe*).

Tab. IV: Čas a teplota jednotlivých kroků enzymatické purifikace.

Program	Čas (min)	Teplota (°C)
Inkubace	15	37
Deaktivace	15	80

3.8. Reverzní transkripce

Transkripce RNA do cDNA pro sekvenační a následnou fylogenetickou analýzu byla provedena pomocí kitu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (*Roche*) podle pokynů výrobce. Primer mix a RT mix byl připraven podle Tab. V a VI. Pro tuto reverzní transkripci byly jako primery použity náhodné hexamery. Jako templát posloužila RNA získaná z homogenátů vzorků tkáně. Jednotlivé kroky reakce můžeme vidět v Tab. VII. Vzniklá cDNA byla uchovávána při -20 °C.

Tab. V: Reagencie pro přípravu Primer mixu.

Primer mix	
Reagencie	Objem (μl)
RNA templát	5
Random Hexamer Primer/FLAVI R	2
Voda RNase free	6
Celkový objem	13

Tab. VI: Reagencie pro přípravu RT mixu.

RT mix	
Reagencie	Objem (μl)
Reakční pufr	4,0
RNase inhibitor	0,5
dNTP	2,0
Transcriptor reverzní transkriptáza	0,5
Celkový objem	7,0

Tab. VII: Čas a teplota jednotlivých reakcí.

Reakce	Čas (min)	Teplota (°C)
Nasedání primerů	10	25
Syntéza	60	50
Inaktivace RT	5	85

3.9. Polymerázová řetězová reakce

Přepsaná cDNA byla dále podrobena PCR za použití sady primerů (Tab. VIII) specifických pro úseky genů kódujících část proteinu prM, kompletní protein M a E (pozice: 565-2475 bp) a dále pak část proteinu NS4B a kompletní protein NS5 (pozice: 7276-10 302

bp) viru Usutu. Nukleotidové pozice jsou číslovány podle sekvence kmenu Vienna – gb: AY453411. Master mix byl připraven podle Tab. IX.

Tab. VIII: Sady použitých primerů specifických pro virus Usutu.

Označení primerů	Sekvence	Teplota nasedání (°C)	Protein	Zdroj
Usu488	F-GACCATCAACGCGACTGATA	55	prM/E	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu1401	R-CAGAGCTGGTAGAACCATGT			
Usu1155	F-CTAGCCACTGTCTCAGATGT	50	E	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu1608	R-ATGTAGTATGCCTCGGTGTT			
Usu1326	F-GACACTCATGGCAACTATTC	55	E	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2014)
Usu1892	R-TCCGTACACATGCTATAGGT			
Usu1537	F-GGTTGAACACCGAGGCATAC	55	E	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu2505	R-CTTGTCCACAGCGCAACTCT			
Usu7314	F-AGAACAGCGGCCGGAATCAT	55	NS4/ NS5	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu8033	R-GACAAGTTCCAGCCATAGC			
Usu7757	F-AAGAGGCCATCACTGAAGTC	55	NS5	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu8599	R-TTCCGTGGTAGGTCCAGGTC			
Usu8499	F-ACATACCAACCAGGAGAAGA	55	NS5	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2014)
Usu9213	R-TTCAACACCTCCTCCAGAAT			
Usu9170	F-AGGACCATTGGTTAGGAAGA	57	NS5	(Weissenböck <i>et al.</i> , 2004b)
Usu9704	R-GGCTTGACAACACAATCATC			
Usu9600	F-GCTGTGAGAACCTGGCTCTT	50	NS5	(Bakonyi <i>et al.</i> , 2004)
Usu10592	R-GCAGCACCGTCTACTCAACT	50	NS5	(Hönig <i>et al.</i> , 2019)

Tab. IX: Reagencie a jejich množství pro přípravu master mixu.

Master Mix	1 reakce (µl)
PCR voda	8,5
PPP Combi Mastermix	12,5
Forward primer	1,0
Reverse primer	1,0
Templát (cDNA)	2,0
Celkový objem	25,0

Po tomto kroku následovala elektroforéza, purifikace, příprava sekvenační reakce a sekvenace (viz 3.6. Separace na agarózovém gelu, 3.7. Purifikace PCR produktů a příprava sekvenační reakce).

3.10. Fylogenetická analýza

Všechny sekvence byly „alignovány“ (seřazeny) pomocí algoritmu MAFFT v7.388 (Kato *et al.*, 2002; Kato & Standley, 2013) a dále upraveny v programu Geneious Prime v2019.1.3. Pro následné fylogenetické analýzy byly pro každý sekvenovaný úsek zvoleny vhodné substituční modely pomocí programu Jmodel (Darriba *et al.*, 2012; Guindon and Gascuel, 2003). Fylogenetické vztahy byly následně rekonstruovány pomocí dvou přístupů maximum likelihood – PHYML (Guindon *et al.*, 2010) a Monte Carlo Markovovy řetězce – Bayesovská inference (MrBayes) (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

3.11. Izolace viru

U vybraných vzorků mozkové tkáně pozitivních v jedнокrokové RT-PCR byly provedeny pokusy o izolaci viru na savčích (PS) a komářích (C6/36) buněčných liniích. Vzorky tkání byly homogenizovány, jak bylo popsáno výše (viz 3.3. Homogenizace vzorků tkání) ovšem pro tento účel v médiu (L15 v kombinaci s 3 % PTS, 1 % ATB a 1 % GL) tak, aby vznikla 25% (w/v) suspenze. Suspenze byla přefiltrována pomocí bakteriologického filtru (0,2 µm Syringe filter, VWR) a 2 ml stříkačky typu „luer lock“ (VWR). K připraveným buňkám v 6-jamkovém panelu (1,5 milionů buněk ve 3 ml media na jamku) bylo přidáno 100 µl suspenze a buňky byly inkubovány 3 h v atmosféře 0,5 % CO₂ při odpovídající teplotě. Po inkubaci byly buňky promyty fosfátem pufrovaným fyziologickým roztokem (PBS) (Biosera) a bylo přidáno čerstvé medium. První, druhý a pátý den po infekci byly prováděny odběry vzorků média (2 ml), objem média byl nahrazen médiem čerstvým.

3.12. Plaková titrace

Po izolaci viru z vybraných vzorků mozkové tkáně byl zjištěn jeho titr pomocí plakové titrace. Virová suspenze (20 µl) byla rozředěna desítkovou ředící řadou ve 180 µl média (L15 v kombinaci s 3 % PTS, 1 % ATB a 1 % GL) ve 24-jamkovém panelu (TPP Biotech). Buněčná suspenze (300 µl; buňky PS) o koncentraci 4×10^5 buněk/ml byla přidána do každé jamky. Po 4 hodinové inkubaci v atmosféře 0,5 % CO₂ při 37 °C byly jamky překryty 400 µl „pokrývky“ (směs 2x koncentrovaného kultivačního média a 3% karboxymethylcelulózy v poměru 1:1). Po 5 dnech inkubace (0,5 % CO₂, 37 °C) byl panel promyt fyziologickým roztokem a obarven

naftalenovou černí, která nám umožnila vyhodnotit počet plaků odpovídající počtu živých virových částic ve vzorku. Výsledek byl vyjádřen ve formě počtu plaketových jednotek na ml původní suspenze.

3.13. Nepřímá imunofluorescence

Buňky linií PS a C6/36 byly nasazeny v koncentraci 2×10^4 buněk na jamku ve 200 μ l media na komůrkové mikroskopické sklíčko typu (*ThermoFisher scientific*, typ „chamber slide“). Následně byly buňky infikovány virem o multiplicitě infekce 0,1 virionu na buňku a inkubovány 3 dny při 37 °C pro PS a 28 °C pro C6/36.

Po inkubaci byly vzorky fixovány 4% paraformaldehydem. Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě byly jamky promyty 3 x 5 min roztokem PBS-Tween (0,05% Tween 20 (*Sigma Aldrich*) v PBS). Pro permeabilizaci preparátu (detekce intracelulárních molekul) byly buňky 30 min inkubovány v 0,3 % Triton X-100/PBS-Tween při laboratorní teplotě, následně opět promyty (3 x 5 min v PBS-Tween). K blokování nespecifických vazebných míst byl použit blokační roztok (10 % BOFES a 5% kozí sérum (*Biosera*) v PBS-Tween) po dobu 30 min při 37°C. Následovala inkubace s primární protilátkou (monoklonální myší protilátka proti flavivirovému proteinu E – MAB10216, *Sigma Aldrich*) ředěné 1:250, přes noc na 4 °C. Následující den, po 3 x 5 min promytí buněk PBS-Tween, byla přidána sekundární protilátka (kozí polyklonální proti myšimu antigenu značená fluorescenční barvou Alexa Fluor 488 - A11029, *ThermoFisher scientific*) ředěná 1:500, 1 h při 37°C. Po 3 x 5 min promytí od sekundární protilátky bylo pro obarvení jader buněk a montování preparátu použito DAPI Fluoroshield (*Sigma Aldrich*).

4. Výsledky

4.1. Screening vzorků a výskyt viru ve tkáních

V rámci screeningového vyšetření byla flavivirová RNA zachycena u celkem 20 jedinců kosa černého (*T. merula*) (Tab. X). Detailní informace (přístupové číslo v databázi GenBank, linie a místo nálezu) o pozitivních vzorcích jsou zaznamenány v Příloze P2. Sekvence získaných PCR produktů a následná analýza potvrdila u všech pozitivních vzorků virus Usutu. V žádném z testovaných vzorků drozda zpěvného (*T. philomelos*) nebyla zachycena flavivirová RNA.

Tab. X: Počty jedinců kosa černého (*T. merula*) a drozda zpěvného (*T. philomelos*) pocházející z Brna, Českých Budějovic a Prahy testované na přítomnost flavivirové RNA; rok nálezu a výsledek screeningového testování.

Oblast	Rok	<i>Turdus merula</i> (TM)	<i>Turdus philomelos</i> (TP)	Počet pozitivních/testovaných (TM; TP)
Brno	2017	19	5	9/19; 0/5
	2018	13	1	5/13; 0/1
	2019	9	0	0/9; 0/0
České Budějovice	2017	12	4	0/12; 0/4
Praha	2018	8	0	6/8; 0/0

V rámci porovnání orgánů byla flavivirová RNA detekována u všech pozitivních jedinců v mozku. U ostatních orgánů byl vždy alespoň jeden ze vzorků pozitivního jedince negativní (Tab. XI).

Tab. XI: Procento záchytu viru v jednotlivých orgánech. U některých kadáverů nebyly dostupné všechny typy tkání.

Tkáň	Počet pozitivních/testovaný	Přítomnost virové RNA (%)
Mozek	20/20	100,0
Játra	16/19	84,2
Sval	17/19	89,5
Krev	16/18	88,9

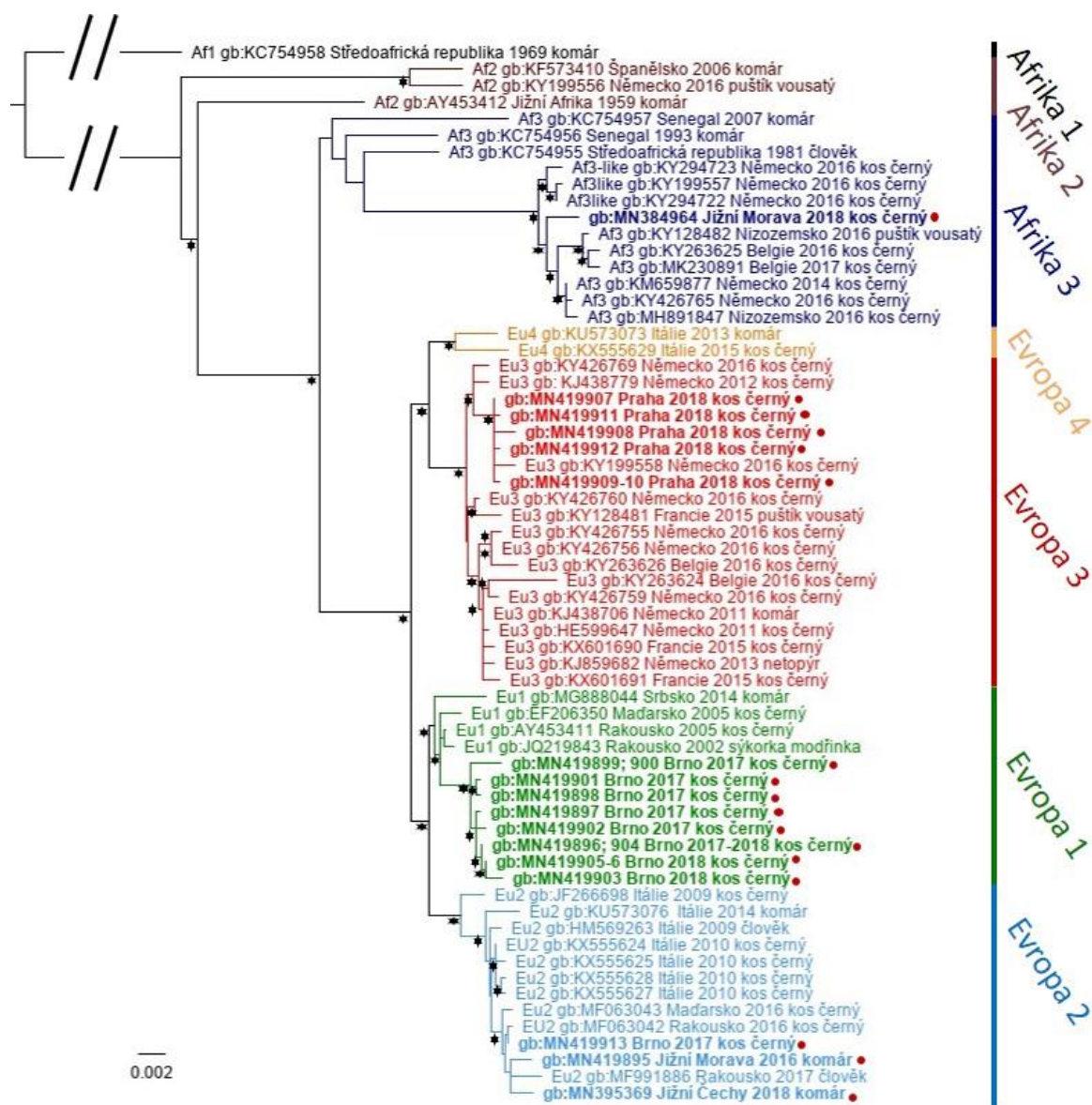
4.2. Fylogenetická analýza

Získali jsme část kódující sekvence pro protein PrM (565-975 bp) a kompletní kódující úseky pro proteiny M (655-879 bp) a E (976-2 475 bp), dále část kódující sekvence pro protein NS4b (7 276-7 587 bp) a kompletní sekvenci kódující protein NS5 (7 588-10 302 bp).

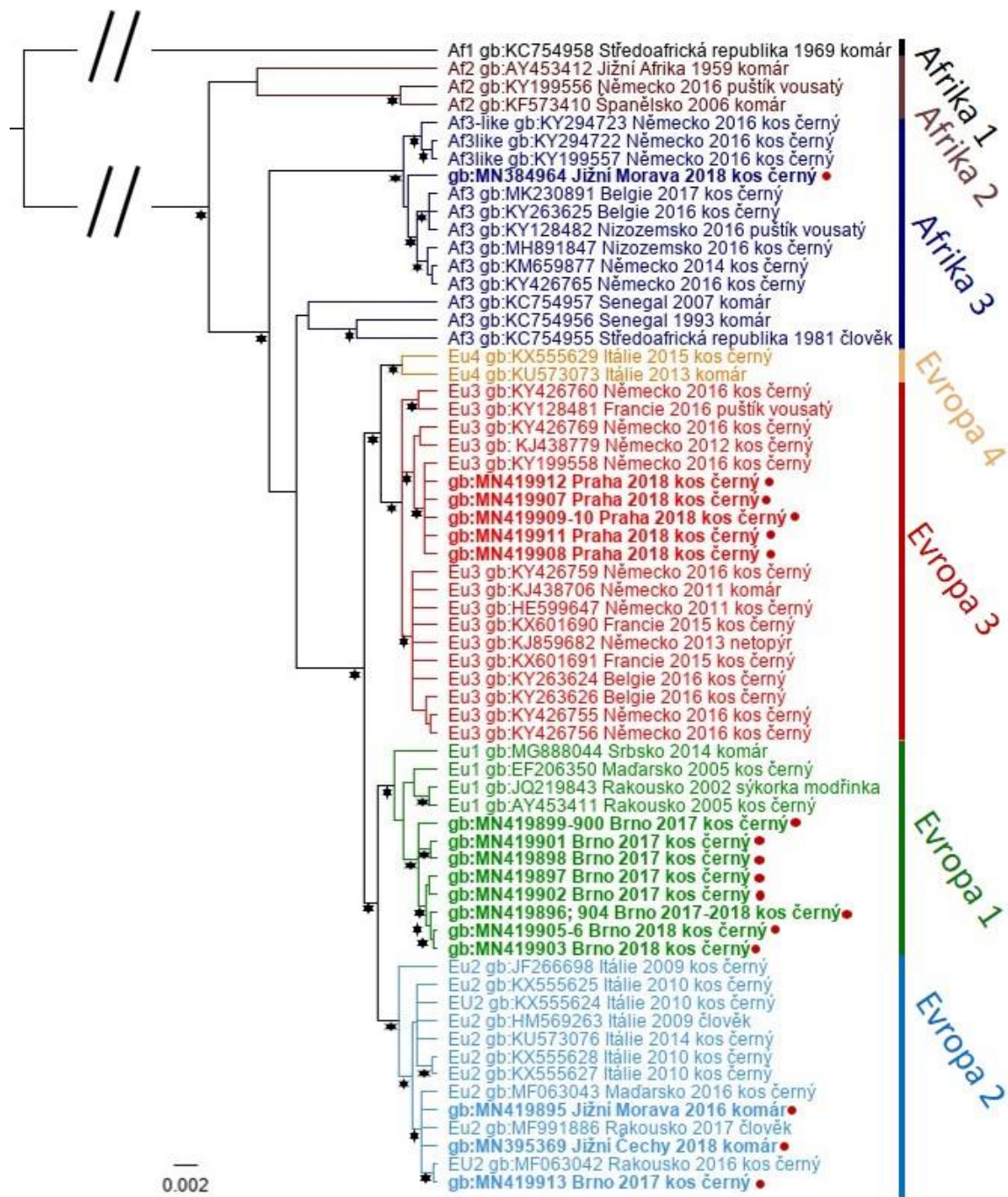
Na těchto úsecích byla provedena fylogenetická analýza s cílem přiřadit naše vzorky k dříve definovaným genetickým liniím viru (Bakonyi *et al.*, 2014, 2007; Bakonyi *et al.*, 2017; Becker *et al.*, 2012; Benzarti *et al.*, 2019; Cadar *et al.*, 2014, 2015, 2017; Calzolari *et al.*, 2017; Čabanová *et al.*, 2019; Engel *et al.*, 2016; Kemenesi *et al.*, 2018; Lecollinet *et al.*, 2016; Nikolay *et al.*, 2013; Rijks *et al.*, 2016; Savini *et al.*, 2011; Sieg *et al.*, 2017; Weissenböck *et al.*, 2002). Pro tuto práci byl vytvořen datový soubor námi získaných sekvencí a vybraných celogenomových sekvencí z databáze GenBank. Pro každý ze sekvenovaných úseků (prM-M-E; NS4b-NS5) byly vytvořeny stromy pomocí metody Maximum-likelihood a Bayesovské inference (Obr. 3-6).

Z fylogenetických stromů vytvořených na základě analýzy úseku NS4b/NS5 (Obr. 3, 4) můžeme vyčíst, že i přes rozdílné metody zpracování dat jsme získali stejné výsledky, co se týče přiřazení našich sekvencí k definovaným genetickým liniím v rámci viru. Sekvence vzorků pocházejících z Brna jsou řazeny do „středoevropské“ linie Evropa 1, spolu se sekvencemi pocházejícími z Rakouska a Maďarska. Vzorky pocházející z Prahy jsou řazeny do linie Evropa 3, kde byly do nejbližší příbuznosti zařazeny sekvence z příhraniční oblasti východního Německa. Dále bylo zjištěno, že sekvence získaná z kadáveru kosa z Brna (264TM10) a obě sekvence získané z homogenátů komárů (2Cx-136; 3Cx-16-99) se řadí do

linie Evropa 2. Dále můžeme pozorovat sekvenci pocházející z kosa nalezeného v Břeclavi (001TM10), která je zařazena jako jediná z námi získaných sekvencí do linie Afrika 3. Pro tento vzorek bylo možné získat pouze sekvenci pro úsek NS4b-NS5. Důvodem byla pravděpodobně degradace genomické RNA ve vzorku.

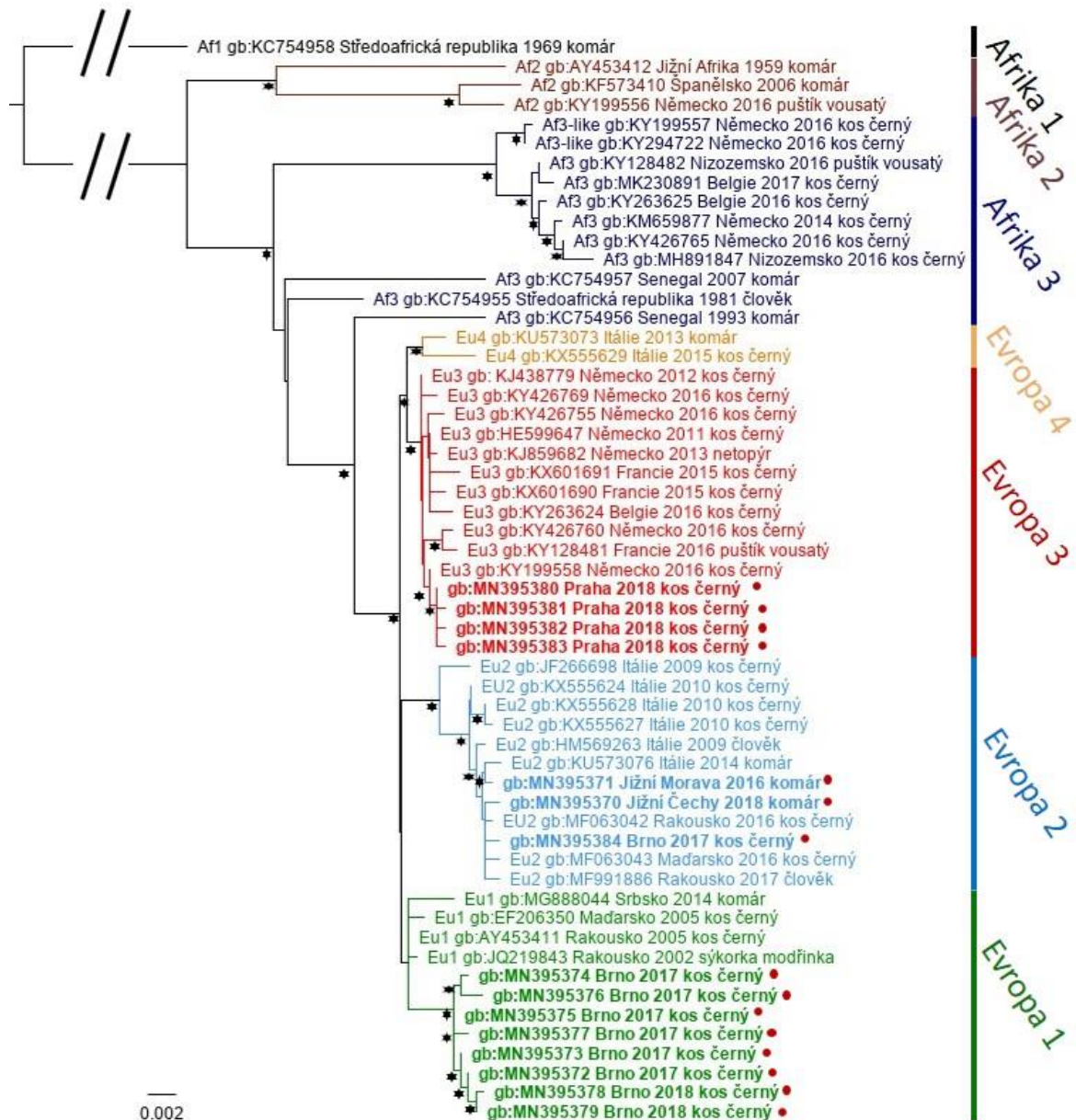


Obr. 3: Fylogenetická analýza získaných sekvencí viru Usutu pro proteiny NS4b a NS5 za použití metody Maximum-likelihood (PHYML). Pro tuto analýzu byl zvolen substituční model GTR+G, bootstrapová analýza o 1 000 replikacích, bootstrap >50 % označen *. Jako „outgroup“ byla použita sekvence gb: KC754958 (Af1). Linie Evropa 1 (Eu1) je značena zelenou barvou, linie Evropa 2 (Eu2) modrou, linie Evropa 3 (Eu3) červenou, linie Evropa 4 (Eu4) oranžovou, Afrika 1 (Af1) černou, linie Afrika 2 (Af2) hnědou a linie Afrika 3 (Af3) tmavě modrou. Popisky obsahují kód sekvence v databázi GenBank, oblast, rok původu a zdroj vzorku.

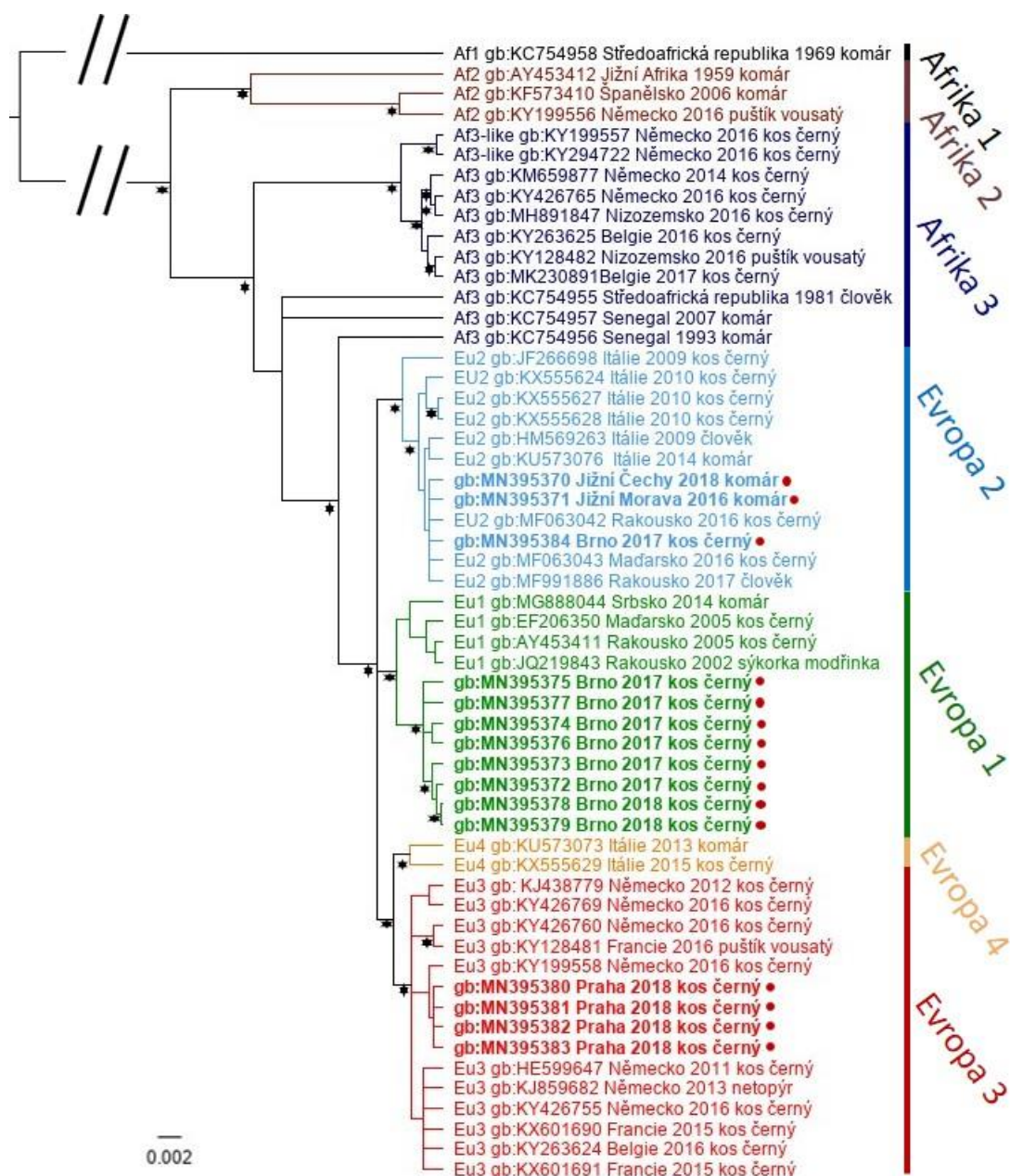


Obr. 4: Fylogenetická analýza získaných sekvencí viru Usutu pro proteiny NS4b a NS5 za použití Bayesovské analýzy. Pro tuto analýzu byl zvolen substituční model GTR+G, 1 000 000 generací. Jako „outgroup“ byla použita sekvence gb: KC754958 (Af1). Uzly s posteriorní pravděpodobností >95 % byly označeny *. Linie Evropa 1 (Eu1) je značena zelenou barvou, linie Evropa 2 (Eu2) modrou, linie Evropa 3 (Eu3) červenou, linie Evropa 4 (Eu4) oranžovou, Afrika 1 (Af1) černou, linie Afrika 2 (Af2) hnědou a linie Afrika 3 (Af3) tmavě modrou. Popisky obsahují kód sekvence v databázi GenBank, oblast, rok původu a zdroj vzorku.

U analýz úseku preM/M/E (Obr. 5, 6) můžeme opět vidět, že zařazení našich sekvencí do jednotlivých genetických linií je stejné jako v případě segmentu NS4b/NS5. Brněnské sekvence spadají do linie Evropa 1, pražské sekvence spadají do linie Evropa 3 a sekvence z Brna (264TM10), Břeclavi (2Cx-136) a z Lomnice nad Lužnicí (3Cx-16-99) spadají do linie Evropa 2 jak tomu bylo i v předchozích výsledcích.



Obr. 5: Fylogenetická analýza získaných sekvencí viru Usutu pro částečné kódující sekvence proteinu PrM a kompletní kódující sekvence pro proteiny M a E za použití metody Maximum-likelihood (PHYML). Byl použit substituční model TrN+I a bootstrapová analýza o 1000 replikacích. Hodnoty bootstrapové analýzy >50 % jsou označeny *. Jako „outgroup“ byla použita sekvence gb: KC754958 (Af1). Linie Evropa 1 (Eu1) je značena zelenou barvou, linie Evropa 2 (Eu2) modrou, linie Evropa 3 (Eu3) červenou, linie Evropa 4 (Eu4) oranžovou, Afrika 1 (Af1) černou, linie Afrika 2 (Af2) hnědou a linie Afrika 3 (Af3) tmavě modrou. Popisky sestávají z kódu sekvence v databázi GenBank, oblasti a roku původu a zdroje vzorku.



Obr. 6: Fylogenetická analýza získaných sekvencí viru Usutu pro proteiny PrM a E za použití Bayesovské analýzy. Byl použit substituční model GTR+I a 1 000 000 generací. Jako „outgroup“ byla použita nukleotidová sekvence KC754958 (AF1). Větve s posteriorní pravděpodobností >95 % byly označeny *. Linie Evropa 1 (Eu1) je značena zelenou barvou, linie Evropa 2 (Eu2) modrou, linie Evropa 3 (Eu3) červenou, linie Evropa 4 (Eu4) oranžovou, Afrika 1 (Af1) černou, linie Afrika 2 (Af2) hnědou a linie Afrika 3 (Af3) tmavě modrou. Popisky sestávají z kódu sekvence v databázi GenBank, oblasti a roku původu a zdroje vzorku.

Výskyt námi detekovaných genetických linií USUV v České republice je v kontextu dalších pozitivních záchytů v Evropě zobrazen na Obr. 7 (Bakonyi *et al.*, 2014, 2007; Bakonyi *et al.*, 2017; Becker *et al.*, 2012; Benzarti *et al.*, 2019; Cadar *et al.*, 2014, 2015, 2017; Calzolari *et al.*, 2017; Čabanová *et al.*, 2019; Engel *et al.*, 2016; Kemenesi *et al.*, 2018; Lecollinet *et al.*, 2016; Nikolay *et al.*, 2013; Rijks *et al.*, 2016; Savini *et al.*, 2011; Sieg *et al.*, 2017; Weidinger *et al.*, 2019; Weissenböck *et al.*, 2002).

4.3. Variabilita sekvencí v příslušných liniích

Pro každý protein byla vypočtena průměrná hodnota počtu nukleotidových a aminokyselinových záměn na pozici mezi jednotlivými sekvencemi v rámci jedné linie. Nejprve byly vzájemně porovnány všechny sekvence patřící do jedné linie. Získané hodnoty byly následně zprůměrovány a vztaženy na celkový počet nukleotidů nebo aminokyselin (Tab. XII).

Tab. XII: Nukleotidová a aminokyselinová variabilita pro jednotlivé linie viru Usutu a kódující sekvence proteinů. Eu 1 – Evropa 1, Eu2 – Evropa, Eu3 – Evropa 3.

Protein	Linie	Počet nukleotidových substitucí na pozici	Počet aminokyselinových substitucí na pozici
část proteinu PrM	Eu1	0,0021	0,0000
	Eu2	0,0016	0,0048
	Eu3	0,0008	0,0000
protein E	Eu1	0,0016	0,0006
	Eu2	0,0017	0,0021
	Eu3	0,0005	0,0005
část proteinu NS4b	Eu1	0,0010	0,0000
	Eu2	0,0021	0,0000
	Eu3	0,0000	0,0000
protein NS5	Eu1	0,0018	0,0016
	Eu2	0,0022	0,0000
	Eu3	0,0009	0,0004

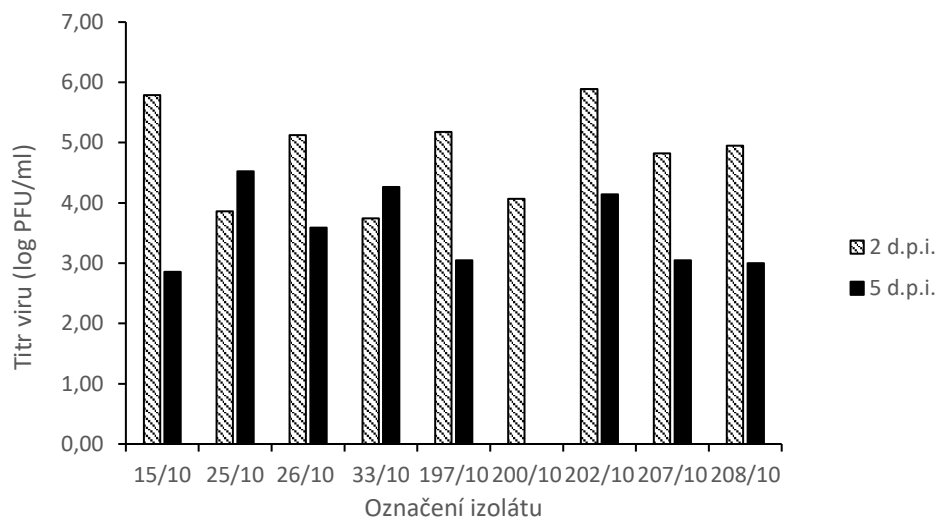
Z této tabulky můžeme vidět že nejvyšší počet nukleotidových a aminokyselinových záměn se vyskytuje u linie Eu2.

4.4. Izolace a množení viru na buněčných kulturách

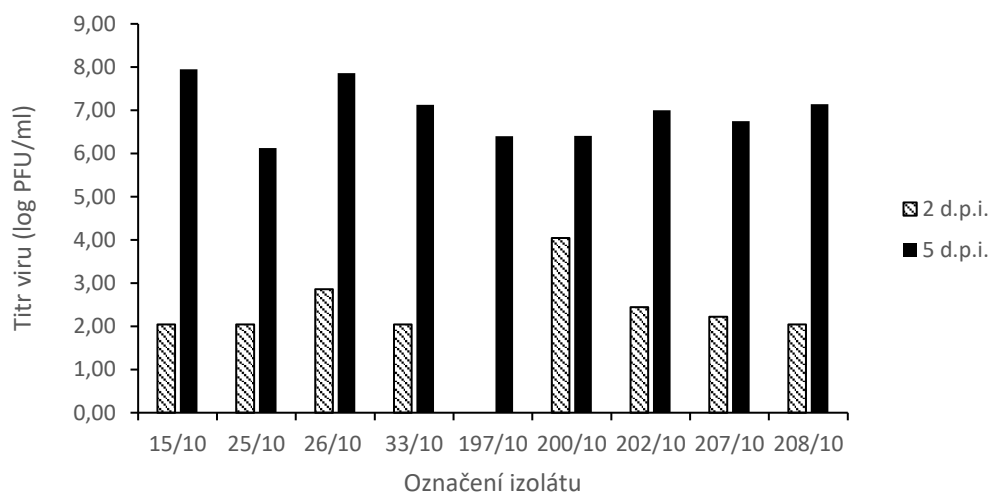
Vybrané homogenáty vzorků mozkové tkáně pozitivní v jednokrokové RT-PCR byly použity na izolaci viru na savčích (PS) a komářích (C6/36) buněčných liniích. Virus Usutu byl izolován z 9 vzorků vždy se stejným výsledkem u obou buněčných kultur. Identita viru byla ověřena pomocí sekvenování. Aktivní replikace viru byla prokázána pomocí plakové titrace.

Pro plakovou titraci byly použity vzorky supernatantu, odebírané 2. a 5. den po infekci savčích (PS) a komářích (C6/36) buněčných linií (Obr. 8 a 9). Na savčí buněčné linii (PS) se virus množil rychleji na začátku kultivace (tedy 2. den) a následně, zřejmě kvůli cytopatickému efektu, došlo ke zpomalení množení viru a množství viru bylo menší 5. den po

infekci než v den druhý. U komáří buněčné linie (C6/36) můžeme pozorovat opačný efekt, kde dochází k postupnému zvyšování množství viru. U této linie nebyl cytopatický efekt pozorován (Obr. 10).



Obr. 8: Množství viru v supernatantech buněčných kultur linie PS infikovaných mozgovými suspenzemi z kadáverů kosů. Množství viru bylo stanoveno pomocí plakové titrace na buňkách PS pro intervaly 2 a 5 dnů po infekci. d. p. i. – dnů po infekci.

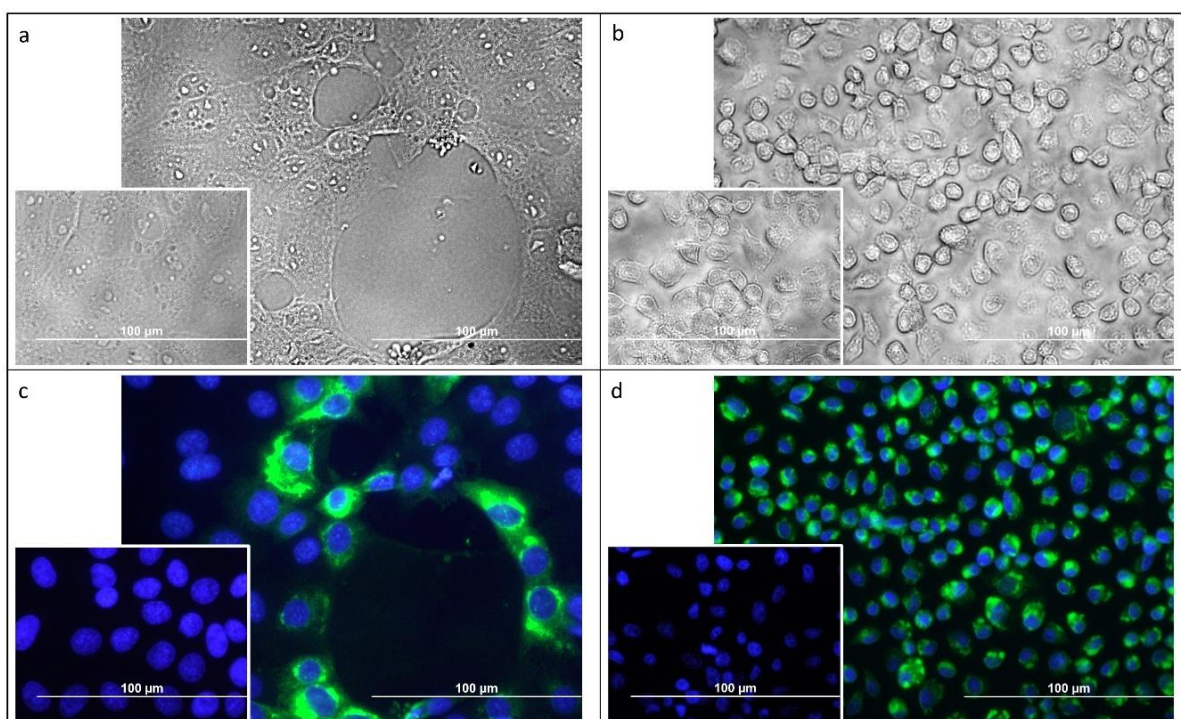


Obr. 9: Množství viru v supernatantech buněčných kultur komářích buněk C6/36 infikovaných mozgovými suspenzemi z kadáverů kosů. Množství viru bylo stanoveno pomocí plakové titrace na buňkách PS pro intervaly 2 a 5 dnů po infekci. d. p. i. – dnů po infekci.

4.5. Nepřímá imunofluorescence

Imunofluorescenčním barvením byla vizualizována infekce USUV u savčích PS a komářích C6/36 buněčných kultur (Obr. 10). Značená protilátka byla zaměřena proti flavivirovému povrchovému antigenu (protein E).

Zatímco u buněčné linie PS můžeme pozorovat výrazný cytopatický efekt (**a**), u buněčné linie C6/36 k žádným výrazným změnám nedošlo (**b**). Při porovnání proinfikovanosti obou linií bylo zjištěno, že u C6/36 (**d**) je mnohonásobně vyšší a činí 95,5%, kdežto u buněčné linie PS je to pouze 13,3% (**c**) (stanoveno pro izolát 202TM10 linie Evropa 1).



Obr. 10: Infekce savčích PS (a, c) a komářích C6/36 (b, d) buněčných linií kmeny viru Usutu (202TM10), které byly izolovány z tkání kosa černého. Negativní kontrola – malý obrázek, infikované buněčné kultury – velké obrázky (3 dny po infekci), flavivirový protein E – zelená barva, jádra buněk – modrá barva. Obrázky a, b – světelná mikroskopie; c, d – fluorescenční mikroskopie.

5. Diskuze

V dnešní době je USUV rozšířen prakticky po celém Evropském kontinentu. V některých oblastech, například Německa nebo Rakouska, se nyní tento virus vyskytuje endemicky (Bakonyi *et al.*, 2017; Cadar *et al.*, 2014). V České republice byl USUV doposud zachycen pouze výjimečně a výhradně v oblasti jižní Moravy (Hubálek *et al.*, 2014, Rudolf *et al.*, 2015), která sousedí s endemickou oblastí v Rakousku. Naše studie prokázala, že na území České republiky se USUV vyskytuje i mimo toto endemické území, a to ve středních (Praha – Zbraslav) a jižních Čechách (Lomnice nad Lužnicí). V Zbraslavi se přítomnost viru projevila zvýšeným úhynem jedinců kosa černého – u většiny (75 %) shromážděných kadáverů kosů z této oblasti byl ve tkáních USUV prokázán. Na základě tohoto zjištění byly testovány vzorky tkání mrtvých jedinců kosa černého nalezených v Brně (jižní Morava) a Českých Budějovicích. U některých těchto náhodně sebraných vzorků byl virus opět detekován.

V České republice, konkrétně v Brně, byl USUV (linie Evropa 1) poprvé prokázán u kosa černého v roce 2011 (Hubálek *et al.*, 2014) a následně ze směsného vzorku komárů v roce 2013 (Rudolf *et al.*, 2015). Fylogenetická analýza námi získaných sekvencí potvrdila, že se v Brně tato linie vyskytuje stále. Jedna sekvence získaná v rámci této práce (gb: MN395375) dokonce vykazuje 100% identitu se sekvencí získanou Hubálkem *et al.* (2014). Zatímco v Praze byly získané sekvence zařazeny pouze do jedné linie (Evropa 3), tak v Brně se vyskytovaly kmeny spadající hned do tří linií: Evropa 1, Evropa 2 a Afrika 3. V případě linie Evropa 1 se tedy zřejmě jedná o endemický výskyt. Rozšíření kmenů z linie Evropa 1 bylo dříve známo pouze z území Rakouska, Maďarska a Srbska. Nicméně od roku 2005 není v Rakousku hlášena cirkulace virů z této linie (Chvala *et al.*, 2007) a naopak převažují kmeny linie Evropa 2. Aktivita kmenů z této linie byla popsána i v Maďarsku v letech 2005, 2010, 2011 a 2015 (Bakonyi *et al.*, 2017) a Srbsku v roce 2014 (Kemenesi *et al.*, 2018). Weidinger *et al.* (2019) ve své práci zmiňuje, že na území Rakouska se nově od roku 2017 nachází také linie Afrika 3. Vzhledem ke geografické blízkosti lze předpokládat, že se tato linie na naše území dostala právě z Rakouska. Další možnou zemí, ze které mohla být tato linie přenesena do České republiky je Německo, kde se již vyskytuje endemicky (Cadar *et al.*, 2017). Bohužel v databázích nejsou dostupné vhodné sekvence rakouských kmenů linie Afrika 3 pro ověření této hypotézy.

Způsob, jakým se USUV dostal do Česka, není jasný. Nicméně předpokládáme, že kmeny linie Evropa 1 a Evropa 2 mohly být přeneseny na jižní Moravu z oblasti Vídně,

protože naše vzorky vykazují vyšší homologii s rakouskými sekvencemi než s italskými, které jsou v těchto liniích také přítomny (Becker *et al.*, 2012; Weissenböck *et al.*, 2002). U sekvencí získaných z oblasti Prahy předpokládáme, že se na naše území dostaly z východu Německa. Z fylogenetické analýzy vyplývá, že pražské sekvence spadají do jednoho klastru spolu se sekvencí z Drážďan (Sieg *et al.*, 2017). Hypotéza nedávného zanesení viru je také podporována skutečností, že všechny sekvence pocházející z Prahy vykazovaly mezi sebou velmi nízkou variabilitu a v místních populacích kosů vyvolaly vysokou mortalitu. Obecně je za hlavní mechanismus šíření tohoto viru považována zejména migrace ptáků, ale v úvahu také připadá mezinárodní obchod s ptáky nebo šíření kompetentními druhy komárů (Engel *et al.*, 2016; Ziegler *et al.*, 2016).

V této studii jsme se nezaměřovali jen na detekci USUV v populacích kosa černého ale také na jedince, patřící do stejného řádu pěvců, drozda zpěvného. Přestože v jiných studiích Becker *et al.* (2012) a Michel *et al.* (2019) byl virus u tohoto druhu detekován, v našem případě byly všechny vzorky pocházející z drozda zpěvného negativní. A to i přesto, že nadpoloviční většina drozdů pocházela z endemické oblasti jižní Moravy. To může být vysvětleno nižší citlivostí drozda zpěvného vůči infekci v porovnání s kosem černým (Becker *et al.*, 2012; Michel *et al.*, 2019; Weidinger *et al.*, 2019). Pravděpodobnost nálezu kadáveru drozda zpěvného, který uhynul v důsledku infekce USUV je tedy nižší než u kosa černého.

Ze všech shromážděných kadáverů kosa černého, v rámci této práce, byla většina negativní. U těchto jedinců byla v naprosté většině příčina úmrtí poměrně zjevná (sražení autem, náraz do skla apod.). U kosů, jimž byla později ve tkáni detekována RNA USUV, naopak nebyly nalezeny žádné zjevné známky příčiny úmrtí. Na základě našich výsledků nelze s jistotou tvrdit, že právě detekovaný virus ve tkáni je příčinou úmrtí. Nicméně je známo, že tento virus způsobuje úhyny v populacích kosa černého (Weidinger *et al.*, 2019), napadá centrální nervový systém kosů, způsobuje u nich meningoencefalitidy a histopatologické změny mozku a dalších orgánů neslučitelné se životem (Bakonyi *et al.*, 2017; Chvala *et al.*, 2004). Kromě mozkové tkáně byl USUV detekován také v několika dalších orgánech (játra, slezina, atd.), což odpovídá předchozím zjištěním (Chvala *et al.*, 2007, 2004). Virus Usutu způsobuje nejen poškození nervových buněk, ale i rozsáhlé orgánové léze vedoucí k multiorgánovému selhání a smrti jedince (Chvala *et al.*, 2004).

Při porovnání průběhu infekce USUV u populací kosa černého v oblastech Prahy a Brna lze nalézt několik odlišností. Jak jsem již zmínil výše, tak v endemické oblasti jižní

Moravy se převážně vyskytují dvě linie viru – Evropa 1 a 2. Tyto stejné linie vedly k propuknutí infekce postihující zejména kosa černého na území Rakouska, které sousedí s oblastí jižní Moravy (Bakonyi *et al.*, 2017; Weidinger *et al.*, 2019). Jak popisuje ve své práci Meister *et al.* (2008), tak během několika let od prvního propuknutí infekce v Rakousku (2001) došlo ke zvýšení séroprevalence v zasažených populacích a tím i ke snížení podílu neimunních a k infekci citlivých jedinců a úhyny již nebyly tak masivní. Stejně tak v oblasti Brna nebyly zaznamenány masové úhyny kosů. Naše záchyty USUV pocházejí z náhodně nalezených kadáverů na poměrně velkém území a za dlouhé časové období. Kmeny pocházející z Prahy vykazují vysokou příbuznost s kmeny patřícími do linie Evropa 3, které v oblasti východního Německa způsobily masivní úhyn v populaci tohoto pěvce (Sieg *et al.*, 2017). Podobný průběh byl pak zaznamenán právě i v Praze - Zbraslavi, kdy došlo k vyšším úhynům jedinců kosa černého na relativně malém území. Příčinou této rozdílné dynamiky může být, že byl virus do oblasti Zbraslavi introdukován prvně a našel tak populaci kosů imunologicky nepřipravenou. Další možností je, že kmeny linie Evropa 3 obecně vykazují vůči kosům vyšší míru patogenity v porovnání s liniemi Evropa 1 a 2. Bohužel zatím neexistuje studie zabývající se přímým srovnáním virulence mezi těmito liniemi. Tuto teorii však nepřímě potvrzuje vytvoření „herd immunity“ (imunity v rámci hejna) v populacích kosa černého po propuknutí infekce v Rakousku (Meister *et al.*, 2008), kdežto v Německu tento jev pozorován nebyl (Michel *et al.*, 2019; Ziegler *et al.*, 2015).

Kromě již zmíněných kadáverů kosa černého byl USUV, v rámci této práce, také detekován ve směsných vzorcích komára *Cx. pipiens* a *Cx. modestus*. Jak už bylo uvedeno výše, komár *Cx. pipiens* je považován za nejběžnějšího vektora toho viru (Calzolari *et al.*, 2012; Nikolay *et al.*, 2011). *Cx. modestus* je považován za významného vektora příbuzného flaviviru WNV (Zannoli & Sambri, 2019). Virus Usutu byl detekován u těchto dvou druhů komárů i v jiných studiích s tím rozdílem, že u *Cx. pipiens* byl detekován opakovaně (Calzolari *et al.*, 2012; Nikolay, 2015), zatímco *Cx. modestus* pouze jednou (Rudolf *et al.*, 2015). Rudolf *et al.* (2015) ve své studii zmiňují, že tito komáři mohou hrát roli při udržování USUV v rámci sylvatického cyklu.

Jediný podstatný rozdíl v topologii fylogenetických stromů zkonstruovaných na základě segmentů sekvencí pro proteiny NS4b-NS5 a prM-E je pozice sekvencí spadajících do linie Afrika 3. Důvodem této nestabilní klasifikace je pravděpodobně malý počet sekvencí řazených do linie Afrika 3, které mají přímý původ přímo v Africe. Nicméně naše sekvence

(gb: MN384964) je zařazena do stabilní větve sekvencí patřících do linie Afrika 3, které mají původ v Evropě.

Virus Usutu je schopen se replikovat jak v komářích buňkách tak v širokém spektru buněk savčích (Barr *et al.*, 2016). Námi zvolené buněčné linie, komáří buňky (C6/36) a savčí buňky PS (prasečí ledvina) se ukázaly být vhodnými kandidáty pro izolaci viru z infikovaných tkání i pro následné pomnožení. Komáří buněčná linie C6/36 má defektní dráhu pro RNA interferenci, což je základní obranný systém proti virům a i proto je tedy vhodným modelem pro kultivaci virů (Brackney *et al.*, 2010). Jak už bylo zjištěno dříve (Bakonyi *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2016; Clé *et al.*, 2019), USUV způsobuje u savčí linie PS cytopatický efekt, což se shoduje i s výsledky v této práci. Zároveň je to pravděpodobnou příčinou, proč se virus u této linie množil rychleji na začátku kultivace a následně byl pozorován pokles titru. U linie komářích buněk, u které cytopatický efekt pozorován nebyl, se množství viru postupně navyšovalo. Pro budoucí kultivační pokusy se kromě savčí linie PS jeví jako vhodná alternativa také buněčná linie Vero, která je také permissivní pro infekci tímto virem a byl u ní pozorován cytopatický efekt (Clé *et al.*, 2019).

V této práci byla používána mozková tkáň, která ve screeningovém vyšetření vykazovala stoprocentní záchyt viru. Mimo mozkovou tkáň byly testovány také vzorky jater, svalů a krve. Nicméně záchyt viru byl u těchto orgánů znatelně nižší. V ostatních studiích (Becker *et al.*, 2012; Roesch *et al.*, 2019; Weissenböck *et al.*, 2002) byl dále virus detekován ve slezině, plicích, autonomních gangliích gastrointestinálního traktu, ledvinách a v srdci, z čehož vyplývá, že USUV je distribuován téměř po celém těle hostitele. V naší práci tyto orgány nemohly být testovány na přítomnost USUV, protože vzorky, s kterými jsme pracovali pocházeli ze studie, která byla primárně určená pro jiné účely a proto jsme měli k dispozici jen vybrané tkáně.

V rámci sekvenční analýzy kmene Bologna pocházejícího z lidského pacienta byly identifikovány dvě aminokyselinové záměny, které jsou popisovány jako potenciální determinanty neurovirulence pro člověka, neboť jsou sdílené s některými dalšími neurovirulentními flaviviry (Chambers *et al.*, 1998; Gaibani *et al.*, 2013; Gould & Higgs, 2009; Sánchez *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). První byla objevena u strukturního proteinu E (S595G) a druhá u nestrukturního proteinu NS5 (D3425E). Po srovnání našich sekvencí s tímto italským kmenem a dalšími zástupci z linie Evropa 2 z databáze GenBank byly tyto dvě konkrétní záměny nalezeny také u třech našich sekvencí spadajících do stejné linie.

Domníváme se, že se jedná spíše o mutace společné pro celou linii, nicméně i tak nelze vyloučit, že mohou mít i vztah k neurovirulenci či obecné infektivitě pro člověka, protože kmeny této line jsou často detekovány u symptomatických pacientů (Pacienti *et al.*, 2019) i asymptomatických dárců krve (Aberle *et al.*, 2018). Aminokyselinová záměna (D3425E) spadá do domény RNA dependetní RNA polymerázy proteinu NS5 a byla pozorována také u jiných flavivirů, které jsou zařazeny do sérokomplexu JEV (např. JEV, DENV a WNV) (Gaibani *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2010). Studie na WNV ukázaly, že substituce v prakticky stejných pozicích v těchto dvou genech byly spojeny se schopností viru invadovat do centrálního nervového systému (Chambers *et al.*, 1998; Gould & Higgs, 2009; Sánchez *et al.*, 2005). Doména DIII proteinu E pravděpodobně zprostředkovává interakci mezi virem a receptorem (ry) hostitelské buňky a je také určujícím faktorem virového tropismu. Specifické substituce v této doméně poté ovlivňují např. infekčnost virových částic, virulenci nebo schopnost vyhnout se neutralizujícím protilátkám (Chu *et al.*, 2005; Gould & Higgs, 2009). Tyto dvě substituce detekované u našich třech sekvencí mohou tedy hrát roli ve změně tropismu a v neuroinvazivním šíření tohoto viru v lidském těle (Gaibani *et al.*, 2013).

V další fázi projektu zaměřeného na USUV bychom se rádi soustředili na bližší charakteristiku jednotlivých kmenů a porovnání genetických linií. Zejména by bylo vhodné potvrdit nebo vyvrátit hypotézu, že kmeny v linii Evropa 3 jsou virulentnější než kmeny linie Evropa 1. K tomu je zapotřebí stanovit replikační křivky na různých buněčných kulturách (savčí, komáří a ptačí) a proinfikovanost buněk. V ideálním případě provést i stanovení křivky přežívání kosů po infekci zástupci jedné a druhé linie.

6. Závěr

V této práci se podařilo úspěšně detekovat genomickou RNA viru Usutu celkem ve 20 vzorcích tkání pocházejících z kosa černého (*T. merula*). Virus byl nejefektivněji detekován z mozkové tkáně, kde byla virová RNA detekována u všech pozitivních jedinců. V žádném z testovaných vzorků drozda zpěvného (*T. philomelos*) nebyla flavivirová RNA prokázána.

U pozitivních vzorků byla stanovena nukleotidová sekvence proteinů E a NS5, a část sekvence kódující proteiny prM a NS4b. Z těchto částí byla následně vypracována fylogenetická analýza, která nám odhalila, že na území České republiky se nyní vyskytují již čtyři různé linie USUV. V Praze se jedná o linii Evropa 3 a na jižní Moravě jsou to linie Evropa 1, Evropa 2, a Afrika 3, které v této endemické oblasti cirkulují současně. Kromě toho byl virus spadající do linie Evropa 2 nalezen i ve vzorcích komárů (*Cx. pipiens*) pocházejících z oblasti jižních Čech.

Pomocí izolace na savčích (PS) a komářích (C6/36) buněčných kulturách bylo získáno celkem 9 kmenů viru Usutu.

Velká část této práce byla použita pro přípravu článku publikovaného v žurnálu *Microorganisms*: Hönig, V., Palus, M., Kaspar, T., Zemanova, M., Majerova, K., Hofmannova, L., Papezik, P., Sikutova, S., Rettich, F., Hubalek, Z., Rudolf, I., Votypka, J., Modry, D., Ruzek, D., 2019. Multiple Lineages of Usutu Virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019). *Microorganisms* 7 (Příloha P3).

7. Seznam použité literatury

Aberle, Stephan W., Jolanta Kolodziejek, Christof Jungbauer, Karin Stiasny, Judith H. Aberle, Alexander Zoufaly, Michael Kai Hourfar, Lisa Weidner a Norbert Nowotny. „Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018". *Eurosurveillance* 23, č. 43 (2018). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>.

Allering, Ludger, Hanna Jöst, Petra Emmerich, Schaubberger Günther, Erik Lattwein, Michael J. Schmidt, Erhard Seifried, Vittorio Sambri, Kai M. Hourfar a Jonas Schmidt-Chanasit. „Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from South-West Germany, 2012". *Eurosurveillance* 17, č. 50 (2012).

Ashraf, Usama, Jong Chul Ye, Xindi Ruan, Shengfeng Wan, Bibo Zhu a Shengbo Cao. „Usutu virus: An emerging flavivirus in Europe". *Viruses*, (2015). <https://doi.org/10.3390/v7010219>.

Bakonyi, Tamás, Núria Busquets a Norbert Nowotny. „Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 14, č. 5 (2014): 324–29. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1510>.

Bakonyi, Tamás, Károly Erdélyi, René Brunthaler, Ádám Dán, Herbert Weissenböck a Norbert Nowotny. „Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016". *Emerging Microbes & Infections* 6, č. 10 (2017): e85. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.72>.

Bakonyi, Tamás, Károly Erdélyi, Krisztina Ursu, Emőke Ferenczi, Tibor Csörgő, Helga Lussy, Sonja Chvala, C Bukovsky, Tanja Meister, Herbert Weissenböck a Norbert Nowotny. „Emergence of Usutu virus in Hungary". *Journal of Clinical Microbiology* 45, č. 12 (2007): 3870–74. <https://doi.org/10.1128/JCM.01390-07>.

Bakonyi, Tamás, Ernest A. Gould, Jolanta Kolodziejek, Herbert Weissenböck a Norbert Nowotny. „Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African strain SAAR-1776 and other flaviviruses". *Virology* 328, č. 2 (2004): 301–10. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.005>.

Bakonyi, Tamás, Christof Jungbauer, Stephan W. Aberle, Jolanta Kolodziejek, Katharina Dimmel, Karin Stiasny, Franz Allerberger a Norbert Nowotny. „Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017 – Raising awareness for diagnostic challenges". *Eurosurveillance* 22, č. 41 (2017). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644>.

Bakonyi, Tamás, Helga Lussy, Herbert Weissenböck, Ákos Hornyák a Norbert Nowotny. „*In vitro* host-cell susceptibility to Usutu virus". *Emerging Infectious Diseases* 11, č. 2 (2005): 298–301. <https://doi.org/10.3201/eid1102.041016>.

Barr, Kelli L., Benjamin D. Anderson, Dhani Prakoso a Maureen T. Long. „Working with Zika and Usutu viruses *in vitro*". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10, č. 8 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004931>.

Bártíková, Pavlína, Viera Holíková, Mária Kazimírová a Iveta Štibrániová. „Tick-borne viruses". *Acta Virologica* 61, č. 4 (2017): 413–27. https://doi.org/10.4149/av_2017_403.

Beck, Cécile, Miguel Angel Jimenez-Clavero, Agnès Leblond, Benoît Durand, Norbert Nowotny, Isabelle Leparç-Goffart, Stéphan Zientara, Elsa Jourdain, a Sylvie Lecollinet. „Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease". *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, č. 11 (2013): 6049–83. <https://doi.org/10.3390/ijerph10116049>.

Becker, Norbert, Hanna Jöst, Ute Ziegler, Martin Eiden, Dirk Höper, Petra Emmerich, Elisabeth Fichet-Calvet, D U Ehichioya, Christina Czajka, Martín Gabriel, Bernd Hoffmann, Martin Beer, Klara Tenner-RÁCz, Paul Racz, Stephan Günther, Michael Wink, Stefan Bosch, Armin Konrad, Martin Pfeffer, Martin H. Groschup a Jonas Schmidt-Chanasit. „Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany". *PLoS ONE* 7, č. 2 (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032604>.

Benzarti, Emna, Michaël Sarlet, Mathieu Franssen, Daniel Cadar, Jonas Schmidt-Chanasit, Jose Felipe Rivas, Annick Linden, Daniel Desmecht a Mutien Garigliany. „Usutu virus epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of virus endemization and ongoing introduction events". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (2019). <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2469>.

Blázquez, Ana-Belén, Estela Escribano-Romero, Teresa Merino-Ramos, Juan-Carlos Saiz a Miguel A. Martín-Acebes. „Infection with Usutu virus induces an autophagic response in mammalian cells". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7, č. 10 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002509>.

Blitvich, Bradley J. a Andrew E. Firth. „A review of flaviviruses that have no known arthropod vector". *Viruses* 9, č. 6 (2017). <https://doi.org/10.3390/v9060154>.

Brackney, Doug E., Jaclyn C. Scott, Fumihiko Sagawa, Jimmy E. Woodward, Neil A Miller, Faye D. Schilkey, Joann Mudge, Jeffrey Wilusz, Ken E Olson, Carol D Blair a Gregory D. Ebel. „C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4, č. 10 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000856>.

Brugger, Katharina a Franz Rubel. „Simulation of climate-change scenarios to explain Usutu-virus dynamics in Austria". *Preventive Veterinary Medicine* 88, č. 1 (2009): 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.023>.

Cadar, Daniel, Norbert Becker, Renata de Mendonca Campos, Jessica Börstler, Hanna Jöst a Jonas Schmidt-Chanasit. „Usutu virus in bats, Germany, 2013". *Emerging Infectious Diseases* 20, č. 10 (2014): 1771–73. <https://doi.org/10.3201/eid2010.140909>.

Cadar, Daniel, Stefan Bosch, Hanna Jöst, Jessica Börstler, Mutien-Marie Garigliany, Norbert Becker a Jonas Schmidt-Chanasit. „Putative lineage of novel African Usutu virus, Central Europe". *Emerging Infectious Diseases* 21, č. 9 (2015): 1647–50. <https://doi.org/10.3201/eid2109.142026>.

Cadar, Daniel, Renke Lühken, Henk P. van der Jeugd, Mutien Garigliany, Ute Ziegler, Markus Keller, Jennifer Lahoreau, Lars Lachmann, Norbert Becker, Marja Kik, Bas B. Oude Munnink,

Stefan Bosch, Egbert Tannich, Annick Linden, Volker Schmidt, Marion P. G. Koopmans, Jolianne M. Rijks, Daniel Desmecht, Martin H. Groschup, Chantal B.E.M. Reusken a Jonas Schmidt-Chanasit. „Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016". *Eurosurveillance* 22, č. 4 (2017). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452>.

Mattia Calzolari, Paolo Gaibani, Romeo Bellini, Francesco Defilippo, Anna Pierro, Alessandro Albieri, Giulia Maioli, Andrea Luppi, Giada Rossini, Agnese Balzani, M Tamba, Giorgio Galletti, Antonio Gelati, Marco Carrieri, Giovanni Poglayen, Francesca Cavrini, Silvano Natalini, Michele Dottori, Vittorio Sambri, Paola Angelini a Paolo Bonilauri. „Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna region (Italy) in 2010". *PloS One* 7, č. 5 (2012): e38058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038058>.

Calzolari, Mattia, Chiara Chiapponi, Paolo Bonilauri, Davide Lelli, Laura Baioni, Ilaria Barbieri, Antonio Lavazza, Stefano Pongolini, Michele Dottori a Ana Moreno. „Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014". *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 51 (2017): 255–62. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.03.022>.

Camp, Jeremy V., Jolanta Kolodziejek a Norbert Nowotny. „Targeted surveillance reveals native and invasive mosquito species infected with Usutu virus". *Parasites & Vectors* 12, č. 1 (2019): 46. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3316-z>.

Carletti, Fabrizio, Francesca Colavita, Francesca Rovida, Elena Percivalle, Fausto Baldanti, Ida Ricci, Claudio De Liberato, Francesca Rosone, Francesco Messina, Eleonora Lalle, Licia Bordi, Francesco Vairo, Maria Rosaria Capobianchi, Giuseppe Ippolito, Giuseppina Cappiello, Alberto Spanò, Silvia Meschi, Concetta Castilletti. „Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, Central Italy, 2017 to 2018". *Eurosurveillance* 24, č. 3 (2019). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649>.

Cavrini, Francesca, Paolo Gaibani, Gary C. Longo, Anna Maria Pierro, Giada Rossini, Paolo Bonilauri, Giorgio Enrico Gerunda, Fabrizio di Benedetto, Alberto Pasetto, Massimo Girardis, Michele Dottori, Maria Paola Landini, Vittorio Sambri „Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009". *Eurosurveillance* 14, č. 50 (2009): 19448. <https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19448-en>.

Clé, Marion, Cécile Beck, Stefany Salinas, Sylvie Lecollinet, Stella Gutiérrez, Philippe Van de Perre, Thierry Baldet, Vincent Foulongne a Youri Simonin. „Usutu virus: A new threat?" *Epidemiology and Infection* 147 (2019). <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213>.

Cortese, Mirko, Sarah Goellner, Eliana Gisela Acosta, Christopher John Neufeldt, Olga Oleksiuk, Marko Lampe, Uta Haselmann, Charlotta Funaya, Nicole L Schieber, Paolo Ronchi, Martin Schorb, Priit Pruunsild, Yannick Schwab, Laurent Chatel-Chaix, Alessia Ruggieri a Ralf Bartenschlager. „Ultrastructural characterization of Zika virus replication factories". *Cell Reports* 18, č. 9 (2017): 2113–23. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.014>.

Čabanová, Viktória, Silvie Šikutová, Petra Straková, Oldřich Šebesta, Bronislava Vichová, Dana Zubříková, Martina Miterpáková, Ján Mendel, Zuzana Hurníková, Zdenek Hubálek, Ivo Rudolf. „Co-circulation of West Nile and Usutu flaviviruses in mosquitoes in Slovakia, 2018". *Viruses* 11, č. 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/v11070639>.

Dalton, Harry R., Jens Dreier, Gabi Rink, Andrea Hecker, Karin Janetzko, David Juhl, Karen Bieback, et al. „Usutu virus". *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 41, č. 1 (2014): 73–82. <https://doi.org/10.1159/000357106>.

Darriba, Diego, Guillermo L. Taboada, Ramón Doallo a David Posada. „jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing". *Nature methods* 9, č. 8 (2012): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.

Diagne, Moussa Moïse, Marie Henriette Dior Ndione, Nicholas Di Paola, Gamou Fall, André Pouwedeou Bedekelabou, Pape Mbacké Sembène, Ousmane Faye, Paolo Marinho de Andrade Zanotto a Amadou Alpha Sall. „Usutu virus isolated from rodents in Senegal". *Viruses* 11, č. 2 (2019). <https://doi.org/10.3390/v11020181>.

Engel, Dimitri, Hanna Jöst, Michael Wink, Jessica Börstler, Stefan Bosch, Mutien-Marie Garigliany, Artur Jöst, Christina Czajka, Renke Lühken, Ute Ziegler, Martin H. Groschup, Martin Pfeffer, Norbert Becker, Dániel Cadar a Jonas Schmidt-Chanasit. „Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa". *mBio* 7, č. 1 (2016). <https://doi.org/10.1128/mBio.01938-15>.

Fros, Jelke J, Pascal Miesen, Chantal B F Vogels, Paolo Gaibani, Vittorio Sambri, Byron E. E. Martina, Constantianus J M Koenraadt, Ronald P van Rij, Just M. Vlak, Willem Takken a Gorben P Pijlman. „Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in North-Western Europe". *One Health* 1 (2015): 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.08.002>.

Gaibani, Paolo, Francesca Cavrini, Ernest A. Gould, Giada Rossini, Anna Pierro, Maria Paola Landini a Vittorio Sambri. „Comparative genomic and phylogenetic analysis of the first Usutu virus isolate from a human patient presenting with neurological symptoms". *PLoS ONE* 8, č. 5 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064761>.

Gaibani, Paolo, Anna Pierro, Rosa Alicino, Giada Rossini, Francesca Cavrini, Maria Paola Landini, a Vittorio Sambri. „Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from Northern Italy". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 12, č. 5 (2012): 431–33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0813>.

Gaibani, Paolo a Giada Rossini. „An overview of Usutu virus". *Microbes and Infection* 19, č. 7–8 (2017): 382–87. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.05.003>.

Garigliany, Mutien-Marie, Didier Marlier, Klara Tenner-Racz, Martin Eiden, Dominique Cassart, Frédéric Gandar, Martin Beer, Jonas Schmidt-Chanasit a Daniel Desmecht. „Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in North-West Europe". *Veterinary Journal* 199, č. 1 (2014): 191–93. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.017>.

Gould Ernest A. a Stephen Higgs „Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103, č. 2 (2009): 109–21. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.07.025>.

Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk a Olivier Gascuel. „New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0". *Systematic Biology* 59, č. 3 (2010): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

Guindon, Stéphane a Olivier Gascuel. „A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood". *Systematic Biology* 52, č. 5 (2003): 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>.

Hall-Mendelin, Sonja, Breeanna J. McLean, Helle Bielefeldt-Ohmann, Jody Hobson-Peters, Roy A. Hall a Andrew F. van den Hurk. „The insect-specific Palm Creek virus modulates West Nile virus infection in and transmission by Australian mosquitoes". *Parasites & Vectors* 9 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1683-2>.

Hernández-Triana, Luis M., Maria Fernández de Marco, Karen L. Mansfield, Leigh Thorne, Sarah Lumley, Denise Marston, Anthony A. Fooks a Nick Johnson. „Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin". *Parasites & Vectors* 11 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2959-5>.

Höfle, Ursula, Virginia Gamino, Isabel G. Fernández de Mera, Atilio J. Mangold, José-Antonio Ortíz a José de la Fuente. „Usutu virus in migratory song thrushes, Spain". *Emerging Infectious Diseases* 19, č. 7 (2013): 1173–75. <https://doi.org/10.3201/eid1907.130199>.

Hönig, Vaclav, Martin Palus, Tomas Kaspar, Marta Zemanova, Karolina Majerova, Lada Hofmannova, Petr Papezik, et al. „Multiple lineages of Usutu virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in blackbirds (*Turdus merula*) and mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019)". *Microorganisms* 7, č. 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110568>.

Huang, Yan-Jang S., Stephen Higgs, Kate McElroy Horne a Dana L. Vanlandingham. „Flavivirus-mosquito interactions". *Viruses* 6, č. 11 (2014): 4703–30. <https://doi.org/10.3390/v6114703>.

Hubálek, Zdenek, Jiří Halouzka, Zina Juřicová, Silvie Šikutová, Ivo Rudolf, Marcel Honza, Jana Jankov'a, Josef Chytil, František Marec a Jiljí Sitko. „Serologic survey of birds for West Nile flavivirus in Southern Moravia (Czech Republic)". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8, č. 5 (2008): 659–66. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0283>.

Hubálek, Zdenek, Ivo Rudolf, Miroslav Čapek, Tamás Bakonyi, Lenka Betášová a Norbert Nowotny. „Usutu virus in blackbirds (*Turdus Merula*), Czech Republic, 2011-2012". *Transboundary and Emerging Diseases* 61, č. 3 (2014): 273–76. <https://doi.org/10.1111/tbed.12025>.

Huelsenbeck, John P. a Fredrik Ronquist. „MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees". *Bioinformatics* 17, č. 8 (2001): 754–55. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>.

Chambers, Thomas J., Menachem Halevy, A Nestorowicz, Charles M. Rice a Shlomo Lustig. „West Nile virus envelope proteins: nucleotide sequence analysis of strains differing in mouse neuroinvasiveness". *The Journal of General Virology* 79 (10) (1998): 2375–80. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-10-2375>.

Chu, Justin Jang-Hann, Ravikumar Rajamanonmani, Jie Li, Raghavan Bhuvanakantham, Julien Lescar a Mary Mah-Lee Ng. „Inhibition of West Nile virus entry by using a recombinant domain iii from the envelope glycoprotein". *The Journal of General Virology* 86, č. Pt 2 (2005): 405–12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80411-0>.

Chvala, Sonja, Tamás Bakonyi, C Bukovsky, Tanja Meister, Katharina Brugger, Franz Rubel, Norbert Nowotny a Herbert Weissenböck. „Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005". *Veterinary Microbiology* 122, č. 3–4 (2007): 237–45. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.01.029>.

Chvala, Sonja, Jolanta Kolodziejek, Norbert Nowotny a Herbert Weissenböck. „Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria". *Journal of Comparative Pathology* 131, č. 2–3 (2004): 176–85. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.03.004>.

Katoh, Kazutaka, Kazuharu Misawa, Kei-ichi Kuma a Takashi Miyata. „MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform". *Nucleic Acids Research* 30, č. 14 (2002): 3059–66. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>.

Katoh, Kazutaka a Daron M. Standley. „MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability". *Molecular Biology and Evolution* 30, č. 4 (2013): 772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

Kemenesi, Gábor, Dóra Buzás, Brigitta Zana, Kornélia Kurucz, Bosiljka Krtinic, Anett Kepner, Fanni Földes a Ferenc Jakab. „First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014". *Infection, Genetics and Evolution* 63 (2018): 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.05.012>.

Klema, Valerie J., Radhakrishnan Padmanabhan a Kyung H. Choi. „Flaviviral replication complex: Coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping". *Viruses* 7, č. 8 (2015): 4640–56. <https://doi.org/10.3390/v7082837>.

Krol, Ewelina, Gabriela Brzuska a Boguslaw Szewczyk. „Production and biomedical application of flavivirus-like particles". *Trends in Biotechnology* 37, č. 11 (2019): 1202–16. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.013>.

Lebl, Karin, Carina Zित्रa, Katja Silbermayr, Adelheid Obwaller, Dominik Berer, Katharina Brugger, Melanie Walter, Beate Pinior, Hans-Peter Fuehrer a Franz Rubel. „Mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) and their relevance as disease vectors in the city of Vienna, Austria". *Parasitology Research* 114, č. 2 (2015): 707–13. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4237-6>.

Lecollinet, Sylvie, Yannick Blanchard, Christine Manson, Steeve Lowenski, Eve Laloy, H. S. Quenault, Fabrice Touzain, Pierrick Lucas, Cyril Eraud, Céline Bahuon, Stéphan Zientara, Cécile Beck a Anouk Decors. „Dual emergence of Usutu virus in common blackbirds, Eastern France, 2015". *Emerging Infectious Diseases* 22, č. 12 (2016): 2225–27. <https://doi.org/10.3201/eid2212.161272>.

Lindenbach, Brett, Heinz J. Thiel a Charles M. Rice. „Flaviviridae: The viruses and their replication". *Fields Virology*, (2007), 1101–51.

Manarolla, Giovanni, Tamás Bakonyi, D. Gallazzi, Lorenzo Crosta, Herbert Weissenböck, Gerry M. Dorrestein a Norbert Nowotny. „Usutu virus in wild birds in Northern Italy". *Veterinary Microbiology* 141, č. 1–2 (2010): 159–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.036>.

Mancini, Giuseppe, Fabrizio Montarsi, Mattia Calzolari, Gioia Capelli, Michele Dottori, Silvia Ravagnan, Davide Lelli, Mario Chiari, Adriana Santilli, Michela Quaglia, Valentina Federici, Federica Monaco, Maria Goffredo a Giovanni Savini. „Mosquito species involved in the circulation of West Nile and Usutu viruses in Italy". *Veterinaria Italiana* 53, č. 2 (2017): 97–110. <https://doi.org/10.12834/VetIt.114.933.4764.2>.

Martín-Acebes, Miguel A., Ana-Belén Blázquez, Rodrigo Cañas-Arranz, Ángela Vázquez-Calvo, Teresa Merino-Ramos, Estela Escribano-Romero, Francisco Sobrino a Juan-Carlos Saiz. „A recombinant DNA vaccine protects mice deficient in the alpha/beta interferon receptor against lethal challenge with Usutu virus". *Vaccine* 34, č. 18 (2016): 2066–73. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.015>.

Meister, Tanja, Helga Lussy, Tamás Bakonyi, Silvie Šikutová, Ivo Rudolf, Wolfgang Vogl, H. K. Winkler, Hans Frey, Zdenek Hubálek, Norbert Nowotny a Herbert Weissenböck. „Serological evidence of continuing high Usutu virus (*Flaviviridae*) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria". *Veterinary Microbiology* 127, č. 3–4 (2008): 237–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.023>.

Merino-Ramos, Teresa, Ana-Belén Blázquez, Estela Escribano-Romero, Rodrigo Cañas-Arranz, Francisco Sobrino, Juan-Carlos Saiz a Miguel A. Martín-Acebes. „Protection of a single dose west nile virus recombinant subviral particle vaccine against lineage 1 or 2 strains and analysis of the cross-reactivity with Usutu virus". *PLoS ONE* 9, č. 9 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108056>.

Merino-Ramos, Teresa, Ángela Vázquez-Calvo, Josefina Casas, Francisco Sobrino, Juan-Carlos Saiz a Miguel A. Martín-Acebes. „Modification of the host cell lipid metabolism induced by hypolipidemic drugs targeting the acetyl coenzyme a carboxylase impairs West Nile virus replication". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, č. 1 (2016): 307–15. <https://doi.org/10.1128/AAC.01578-15>.

Michel, Friederike, Michael Sieg, Dominik Fischer, Markus Keller, Martin Eiden, Maximilian Reuschel, Volker Schmidt, Rebekka Schwehn, Monika Rinder, Sylvia Urbaniak, Kerstin Elisabeth Mueller, Martina Schmoock, Renke Lühken, Patrick Wysocki, Christine Fast, Michael Lierz, Rüdiger Korbel, Thomas W. Vahlenkamp, Martin H. Groschup a Ute Ziegler.

„Evidence for West Nile virus and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018". *Viruses* 11, č. 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/v11070674>.

Nikolay, Birgit. „A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap?" *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 109, č. 10 (2015): 609–18. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trv066>.

Nikolay, Birgit, Mawlouth Diallo, Cheikh Saad Bouh Boyea a Amadou Alpha Sall. „Usutu virus in Africa". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, č. 11 (2011): 1417–23. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631>.

Nikolay, Birgit, Anne Dupressoir, Cadhla Firth, Ousmane Faye, Cheikh S. Boye, Mawlouth Diallo a Amadou A. Sall. „Comparative full length genome sequence analysis of Usutu virus isolates from Africa". *Virology Journal* 10 (2013): 217. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-217>.

Pacenti, Monia, Alessandro Sinigaglia, Thomas Martello, Elena De Rui, Elisa Franchin, Silvana Pagni, Elektra Peta, Silvia Riccetti, Adelaide Milani, Fabrizio Montarsi, Gioia Capelli, Carlo Giovanni Doroldi, Francesco Bigolin, Luca Santelli, L Nardetto, Marco Zoccarato, Luisa Barzon. „Clinical and virological findings in patients with Usutu virus infection, Northern Italy, 2018". *Eurosurveillance* 24, č. 47 (2019): 1900180. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900180>.

Pauli, Georg, Ursula Bauerfeind, Johannes Blümel, Reinhard Burger, Christian Drosten, Albrecht Dr. Gröner, Lutz Guertler, Margarethe Heiden, Martin Hildebrandt, Bernd Jansen, Ruth Offergeld, Rainer Seitz, Uwe Schlenkrich, Volkmar Schottstedt, Johanna Strobel a Hannelore Willkommen. „Usutu virus". *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 41, č. 1 (2014): 73–82. <https://doi.org/10.1159/000357106>.

Pecorari, Monica, Gary C. Longo, William Gennari, Antonella Grottola, Am Sabbatini, Sara Tagliazucchi, Giovanni Savini, Federica Monaco, M. Goldinger Simone, Rossella Colomba Lelli a Fabio Rumpianesi. „First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009". *Eurosurveillance* 14, č. 50 (2009): 19446. <https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19446-en>.

Rijks, J. Q., Marja Kik, Roy Slaterus, Rpb Foppen, Arjan Stroo, Jooske Ijzer, Julia Ståhl, Andrea Gröne, M Koopmans a HP van der Jeugd, C Reusken. „Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016". *Eurosurveillance* 21, č. 45 (2016). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30391>.

Roesch, Ferdinand, Alvaro Fajardo, Gonzalo Moratorio a Marco Vignuzzi. „Usutu virus: An arbovirus on the rise". *Viruses* 11, č. 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/v11070640>.

Rudolf, Ivo, Tamás Bakonyi, Oldřich Šebesta, Ján Mendel, Juraj Peško, Lenka Betášová, Hana Blažejová, Kristýna Venclíková, Petra Straková, Norbert Nowotny a Zdenek Hubálek. „Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. „*Parasites & Vectors*", 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26459018>.

Saiz, Juan-Carlos a Ana-Belén Blazquez. „Usutu virus: Current knowledge and future perspectives". *Virus Adaptation and Treatment*, (2017). <https://doi.org/10.2147/VAAT.S123619>.

Salinas, Sara, Oriane Constant, Caroline Desmetz, Jonathan Barthelemy, Jean-Marc Lemaitre, Ollivier Milhavet, Nicolas Nagot, Vincent Foulongne, Florence E Perrin, Juan-Carlos Saiz, Sylvie Lecollinet, Philippe Van de Perre a Yannick Simonin. „Deleterious effect of Usutu virus on human neural cells". *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11, č. 9 (2017): e0005913. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005913>.

Sambri, Vittorio, Martin H. Groschup, Alexandra Bialonski, Norbert Becker, Deborah Maus, Martin Eiden, Hanna Jöst, Stephan Günther a Jonas Schmidt-Chanasit. „Isolation of Usutu virus in Germany". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, č. 3 (2011): 551–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0248>.

Sánchez, Melissa D., Theodore C. Pierson, Douglas McAllister, Sheri L. Hanna, Bridget A. Puffer, Laura E. Valentine, Mariam M. Murtadha, James A. Hoxie a Robert W. Doms. „Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus". *Virology* 336, č. 1 (2005): 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.02.020>.

Savini, Giovanni, Federica Monaco, Calogero Terregino, Annapia Di Gennaro, Luca Bano, Chiara Pinoni, Roberta De Nardi, Paolo Bonilauri, Monica Pecorari, Luigina Di Gialleonardo, Lebona Bonfanti, Andrea Polci, Paolo Calistri a Rossella Colomba Lelli. „Usutu virus in Italy: An emergence or a silent infection?" *Veterinary Microbiology* 151, č. 3–4 (2011): 264–74. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.03.036>.

Scaramozzino, Natale, Jean Marc Crance, Alain Jouan, Dominique Debriel, F Stoll, Daniel Garin. „Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences". *Journal of Clinical Microbiology* 39, č. 5 (2001): 1922–27. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1922-1927.2001>.

Sieg, Michael, Volker Schmidt, Ute Ziegler, Markus Keller, Dirk Höper, Kristin Heenemann, Antje Rueckner, Hermann Nieper, Aemero Muluneh, Martin H. Groschup, Thomas W. Vahlenkamp. „Outbreak and cocirculation of three different Usutu virus strains in Eastern Germany". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 17, č. 9 (2017): 662–64. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2096>.

Smit, Jolanda M., Bastiaan Moesker, Izabela Rodenhuis-Zybert a Jan Wilschut. „Flavivirus cell entry and membrane fusion". *Viruses* 3, č. 2 (2011): 160–71. <https://doi.org/10.3390/v3020160>.

Steinmetz, Hanspeter W., Tamás Bakonyi, Herbert Weissenböck, Jean-Michel Hatt, Ulrike Eulenberger, Nadia Robert, Richard Hoop a Norbert Nowotny. „Emergence and establishment of Usutu virus infection in wild and captive avian species in and around Zurich, Switzerland—Genomic and pathologic comparison to other central European outbreaks". *Veterinary Microbiology* 148, č. 2 (2011): 207–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.09.018>.

Stiasny, Karin, Stephan W. Aberle, Franz X Heinz. „Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections". *Eurosurveillance* 18, č. 43 (2013): 20614. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.43.20614>.

Turell, Michael J. „Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses". *Journal of the American Mosquito Control Association* 28, č. 4s (2012): 123–26. <https://doi.org/10.2987/8756-971X-28.4.123>.

Vázquez, Ana, Santiago Ruiz, Laura Herrero, Juana Moreno, Francisca Molero, Antonio Magallanes, Maria Paz Sánchez-Seco, Jordi Figuerola a Antonio Tenorio. „West Nile and Usutu viruses in mosquitoes in Spain, 2008–2009". *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 85, č. 1 (2011): 178–81. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0042>.

Vázquez-Calvo, Ángela, Juan-Carlos Saiz, Francisco Sobrino a Miguel A. Martín-Acebes. „Inhibition of enveloped virus infection of cultured cells by valproic acid". *Journal of Virology* 85, č. 3 (2011): 1267–74. <https://doi.org/10.1128/JVI.01717-10>.

Weidinger, Pia, Jolanta Kolodziejek, Tamás Bakonyi, René Brunthaler, Károly Erdélyi, Herbert Weissenböck a Norbert Nowotny. „Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017-2018". *Transboundary and Emerging Diseases*, (2019). <https://doi.org/10.1111/tbed.13351>.

Weissenböck, Herbert, Zdenek Hubálek, Tamás Bakonyi a Norbert Nowotny. „Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases". *Veterinary Microbiology*, 140, č. 3 (2010): 271–80. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.025>.

Weissenböck, Herbert, Tamás Bakonyi, Sonja Chvala a Norbert Nowotny. „Experimental Usutu virus infection of suckling mice causes neuronal and glial cell apoptosis and demyelination". *acta neuropathologica* 108, č. 5 (2004): 453–60. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0916-1>.

Weissenböck, Herbert, Tamás Bakonyi, Giacomo Rossi, Paolo Mani a Norbert Nowotny. „Usutu virus, Italy, 1996". *Emerging Infectious Diseases* 19, č. 2 (2013): 274–77. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121191>.

Weissenböck, Herbert, Jolanta Kolodziejek, Angelika Url, Helga Lussy, Barbara Rebel-Bauder a Norbert Nowotny. „Emergence of Usutu virus, an african mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, Central Europe". *Emerging Infectious Diseases* 8, č. 7 (2002): 652–56. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094>.

Wilkerson, Richard C., Yvonne-Marie Linton, Dina M. Fonseca, Ted R. Schultz, Dana C. Price a Daniel A. Strickman. „Making mosquito taxonomy useful: A stable classification of tribe aedini that balances utility with current knowledge of evolutionary relationships". *PLOS ONE* 10, č. 7 (2015): e0133602. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133602>.

Williams, M. C., David Ian Hewitt Simpson, A. J. Haddow, E. M. Knight. „The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites*

(theobald) in the entebbe area of Uganda". *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 58 (1964): 367–74. <https://doi.org/10.1080/00034983.1964.11686258>.

Zannoli, Silvia a Vittorio Sambri. „West Nile virus and Usutu virus co-circulation in Europe: Epidemiology and implications". *Microorganisms* 7, č. 7 (2019). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070184>.

Zhang, Shuliu, Evgeniy I Bovshik, Rodrigo A Maillard, Gregory D. Gromowski, David E Volk, Catherine H. Schein, Claire Y-H Huang, David Gorenstein, James C. Lee, Alan D. T. Barrett a David W. C. Beasley „Role of BC loop residues in structure, function and antigenicity of the West Nile virus envelope protein receptor-binding domain iii". *Virology* 403, č. 1 (2010): 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.038>.

Ziegler, Ute, Christine Fast, Martin Eiden, Sabine Bock, Christoph Schulze, Dirk Höper, Andreas Ochs, Patricia Schlieben, Markus Keller, Dorothee E. Zielke, Renke Lühken, Dániel Cadar, Doreen Walther, Jonas Schmidt-Chanasit a Martin H. Groschup. „Evidence for an independent third Usutu virus introduction into Germany". *Veterinary Microbiology* 192 (2016): 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.06.007>.

Ziegler, Ute, Hanna Jöst, Kerstin Elisabeth Mueller, Dominik Fischer, Monika Rinder, Dieter Thomas Tietze, Klaus-Jürgen Danner, Norbert Becker, Jasmin Skuballa, Hans-Peter Hamann, Stefan Bosch, Christine Fast, Martin Eiden, Jonas Schmidt-Chanasit a Martin H. Groschup. „Epidemic spread of Usutu virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses". *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 15, č. 8 (2015): 481–88. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1746>.

8. Přílohy

P1: Detailní informace k jednotlivým vzorkům. TM – *T. merula*, TX – *T. philomelos*;
Výsledek screeningu na přítomnost flavivirové RNA pomocí jednokrokové reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce *neg.* – *negativní*, *poz.* – *pozitivní*

Označení vzorku	Druh (TM, TX)	Datum	Místo	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka	Výsledek screeningu
013	TM	2017	Brno	49°11'55.786"	16°36'29.479"	neg.
015	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
016	TM	2017	Brno	49°12'21.629"	16°29'29.433"	neg.
019	TM	2017	Brno	49°12'48.180"	16°35'33.407"	poz.
020	TM	2017	Chudčice	49°17'15.635"	16°27'24.082"	neg.
025	TM	2017	Brno	49°13'36.030"	16°30'33.548"	poz.
026	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
028	TX	2017	Chudčice	49°17'15.635"	16°27'24.082"	neg.
029	TX	2017	České Budějovice	48°58'41.647"	14°26'49.180"	neg.
033	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
035	TM	2017	České Budějovice	48°58'07.80"	14°28'05.82"	neg.
036	TM	2017	České Budějovice	48°58'6.525"	14°28'6.938"	neg.
037	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
038	TM	2017	Hluboká nad Vltavou	49°3'39.78"	14°24'39.471"	neg.
042	TM	2017	Brno	49°12'51.360"	16°38'14.775"	poz.
043	TX	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
044	TX	2017	Brno	49°14'20.805"	16°32'9.751"	neg.
054	TM	2017	České Budějovice	48°57'27"	14°28'12"	neg.
055	TX	2017	České Budějovice	48°58'17.225"	14°27'55.815"	neg.
067	TM	2017	České Budějovice	48°57'59.940"	14°27'47.340"	neg.
071	TX	2017	České Budějovice	48°58'35.642"	14°26'53.100"	neg.
072	TM	2017	České Budějovice	48°58'31.44"	14°30'04.56"	neg.
079	TX	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
097	TM	2017	Brno	49°13'28.362"	16°31'1.976"	neg.
100	TM	2017	Brno	49°16'15.158"	16°35'47.066"	neg.
101	TM	2017	Brno	49°13'2.515"	16°36'51.924"	neg.
102	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
103	TM	2017	České Budějovice	49°03'26.4"	14°26'15.5"	neg.
104	TM	2017	České Budějovice	48°57'27"	14°28'12"	neg.
105	TX	2017	České Budějovice	48°58'41.647"	14°26'49.180"	neg.
106	TM	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
108	TM	2017	České Budějovice	48°58'6.525"	14°28'6.938"	neg.
109	TM	2017	Kuřim	49°17'56.370"	16°32'17.080"	neg.
110	TX	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.

113	TX	2017	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
114	TM	2017	České Budějovice	48°58'47.972"	14°27'13.146"	neg.
115	TX	2017	Vrábče	48°55'2.453"	14°22'33.294"	neg.
117	TM	2017	České Budějovice	48°58'32.2"	14°30'02.0"	neg.
128	TM	2017	České Budějovice	48°58'39.187"	14°26'53.039"	neg.
147	TM	2017	České Budějovice	48°57'37.2"	14°29'03.3"	neg.
156	TM	2018	Chudčice	49°17'17.651"	16°27'27.790"	neg.
157	TM	2018	Kuřim	49°18'11.924"	16°31'52.843"	neg.
158	TM	2018	Kuřim	49°18'10.916"	16°31'52.920"	neg.
161	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
168	TM	2018	Chudčice	49°17'18.457"	16°27'34.587"	neg.
169	TM	2018	Chudčice	49°17'15.635"	16°27'24.700"	neg.
195	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
196	TM	2018	Brno	49° 12' 44,1"	16° 35' 33,212"	poz.
197	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
198	TM	2018	Brno	49° 12' 39,89"	16° 35' 35,657"	neg.
199	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
200	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
201	TX	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	neg.
202	TM	2018	Brno	49°13'3.392"	16°35'52.181"	poz.
205	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 58' 17.72"	14° 23' 9.96"	poz.
206	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 58' 1.85"	14° 23' 21.84"	poz.
207	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 57' 16.31"	14° 22' 48.72"	poz.
208	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 57' 43.42"	14° 23' 16.66"	poz.
209	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 57' 31.46"	14° 22' 2.93"	poz.
210	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 57' 39.56"	14° 23' 15.79"	poz.
211	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 58' 18.01"	14° 22' 51.78"	neg.
212	TM	2018	Praha Zbraslav	49° 57' 27.22"	14° 23' 0.13"	neg.
229	TM	2018	Brno	49° 11' 42.14"	16° 36' 22.43"	neg.
230	TM	2018	Brno	49° 11' 42.14"	16° 36' 22.43"	neg.
254	TM	2019	Brno	49° 13' 33.9"	16° 33' 22.92"	neg.
263	TM	2017	Brno	49° 11' 55.54"	16° 36' 44.89"	neg.
264	TM	2017	Brno	49° 11' 46.75"	16° 36' 48.85"	poz.
265	TM	2017	Brno	49° 11' 54.17"	16° 36' 52.6"	neg.
268	TM	2019	Brno	49°13'6.953"	16°35'40.805"	neg.
269	TM	2019	Brno	49°13'6.953"	16°35'40.805"	neg.

P2: Detailní informace o vzorcích pozitivních na genomickou RNA viru Usutu (rok a místo nálezů, přístupové číslo v databázi GenBank a linie).

Označení vzorku	Zdroj	Datum	Místo	prM/M/E - Gb číslo	NS4B-NS5 - Gb číslo	Linie
015	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	-	-	-
019	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395372	MN419896	Eu1
025	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395373	MN419897	Eu1
026	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395374	MN419898	Eu1
033	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395375	MN419899	Eu1
037	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395375	MN419900	Eu1
042	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395376	MN419901	Eu1
106	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395377	MN419902	Eu1
196	<i>Turdus merula</i>	2018	Brno	MN395378	MN419903	Eu1
197	<i>Turdus merula</i>	2018	Brno	MN395372	MN419904	Eu1
199	<i>Turdus merula</i>	2018	Brno	-	-	-
200	<i>Turdus merula</i>	2018	Brno	MN395379	MN419905	Eu1
202	<i>Turdus merula</i>	2018	Brno	MN395379	MN419906	Eu1
205	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395380	MN419907	Eu3
206	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395381	MN419908	Eu3
207	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395380	MN419909	Eu3
208	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395380	MN419910	Eu3
209	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395382	MN419911	Eu3
210	<i>Turdus merula</i>	2018	Praha Zbraslav	MN395383	MN419912	Eu3
264	<i>Turdus merula</i>	2017	Brno	MN395384	MN419913	Eu2
001TM10	<i>Turdus merula</i>	2018	Břeclav	-	MN384964	Af3
2Cx_136	<i>Culex pipiens</i>	2018	Jižní Čechy	MN395370	MN395369	Eu2
3Cx16-99	<i>Culex modestus</i>	2016	Jižní Morava	MN395371	MN419895	Eu2

P3: Publikovaný článek: Multiple Lineages of Usutu Virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019). Dostupné online: <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/568ss>



Article

Multiple Lineages of Usutu Virus (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016–2019)

Vaclav Hönig^{1,2,*} , Martin Palus^{1,2} , Tomas Kaspar^{1,3}, Marta Zemanova¹, Karolina Majerova^{1,4} , Lada Hofmannova⁵, Petr Papezik⁵, Silvie Sikutova⁶, Frantisek Rettich⁷, Zdenek Hubalek⁶ , Ivo Rudolf⁶ , Jan Votypka^{1,4} , David Modry^{1,5,8} and Daniel Ruzek^{1,2}

¹ Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic; palus@paru.cas.cz (M.P.); tomas18@seznam.cz (T.K.); marta.zemanova@paru.cas.cz (M.Z.); karolina.majerova@natur.cuni.cz (K.M.); jan.votypka@natur.cuni.cz (J.V.); modryd@vfu.cz (D.M.); ruzekd@paru.cas.cz (D.R.)

² Department of Virology, Veterinary Research Institute, 62100 Brno, Czech Republic

³ Faculty of Science, University of South Bohemia, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

⁴ Department of Parasitology, Faculty of Science, Charles University, 12800 Prague, Czech Republic

⁵ Department of Pathology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, 61242 Brno, Czech Republic; Lada.Hurkova@seznam.cz (L.H.); Reptimania@email.cz (P.P.)

⁶ Institute of Vertebrate Biology, Czech Academy of Sciences, 60365 Brno, Czech Republic; sikutova@ivb.cz (S.S.); zhubalek@brno.cas.cz (Z.H.); rudolf@ivb.cz (I.R.)

⁷ Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, 10000 Prague, Czech Republic; rettich@szu.cz

⁸ CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, 61242 Brno, Czech Republic

* Correspondence: honig@paru.cas.cz; Tel.: +420-387-775-463

Received: 7 October 2019; Accepted: 15 November 2019; Published: 16 November 2019



Abstract: Usutu virus (USUV) is a flavivirus (*Flaviviridae*: *Flavivirus*) of an African origin transmitted among its natural hosts (diverse species of birds) by mosquitoes. The virus was introduced multiple times to Europe where it caused mortality of blackbirds (*Turdus merula*) and certain other susceptible species of birds. In this study, we report detection of USUV RNA in blackbirds, *Culex pipiens* and *Cx. modestus* mosquitoes in the Czech Republic, and isolation of 10 new Czech USUV strains from carcasses of blackbirds in cell culture. Multiple lineages (Europe 1, 2 and Africa 3) of USUV were found in blackbirds and mosquitoes in the southeastern part of the country. A single USUV lineage (Europe 3) was found in Prague and was likely associated with increased mortalities in the local blackbird population seen in this area in 2018. USUV genomic RNA (lineage Europe 2) was detected in a pool of *Cx. pipiens* mosquitoes from South Bohemia (southern part of the country), where no major mortality of birds has been reported so far, and no flavivirus RNA has been found in randomly sampled cadavers of blackbirds. The obtained data contributes to our knowledge about USUV genetic variability, distribution and spread in Central Europe.

Keywords: Usutu virus; blackbird; mosquito; *Culex* spp.

1. Introduction

Usutu virus (USUV) is a flavivirus (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) transmitted by ornithophilic mosquitoes. The virus was isolated from a number of mosquito species of the genera:

Aedes, *Anopheles*, *Culex*, *Culiseta*, *Ochlerotatus* summarized in [1]), hence they are considered as potential vectors. Nevertheless, vector competence was experimentally proven only for *Culex* spp. [2–5]. A variety of resident (e.g., Eurasian magpie (*Pica pica*), domestic pigeon (*Columba livia domestica*), hooded crow (*Corvus cornix*), carrion crow (*Corvus corone*), Eurasian nuthatch (*Sitta europea*), great tit (*Parus major*)) and partially migratory or migratory (e.g., Euroasian blackbird (*Turdus merula*), song thrush (*T. philomelos*), white stork (*Ciconia ciconia*), common redstart (*Phoenicurus phoenicurus*), and European robin (*Erithacus rubecula*)) bird species are considered the probable natural (reservoir) hosts in Europe, based on serologic evidence and direct proof of the virus [1,6,7], although the virus was also found in other vertebrates, such as bats [8], rodents and a shrew [9]. Passeriform and strigiform birds are particularly sensitive to the infection in the sense of symptomatic disease (symptoms include: featherless heads, apathy, inability to fly, incoordination, splenomegaly, necrosis in liver and spleen, and signs of encephalitis) frequently followed by death [10–14]. Infections of humans are mostly associated with asymptomatic course [15–17] or mild symptoms including fever, rash or jaundice [18]. Predominantly although not exclusively, in immunocompromised patients, USUV may cause infections of central nervous system [19–21].

Like other flaviviruses, the genomic +ssRNA of USUV encodes three structural proteins forming viral capsid (protein C), membrane (prM/M) and envelope (E). The remaining part of the genome encodes seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) [22,23]. Protein E as a major surface-exposed protein plays a crucial role in the virus-host cell and virus-immune system interactions. NS5 protein is a viral RNA-dependent RNA polymerase and methyltransferase [24].

Usutu virus was first isolated in African Swaziland from a mosquito *Cx. naevei* in 1959 [25]. In Europe, the so far oldest documented occurrence of USUV is dated back in 1996. It was retrospectively detected in a dead blackbird from Italy [26]. The first large outbreak among blackbirds occurred in Austria in 2001 [27]. Thereafter, the virus was repeatedly introduced to Europe from Africa most probably by migratory birds and established diverse genetic lineages in Europe [23]. Currently, the occurrence of multiple lineages of USUV is reported in various biological samples (birds, mosquitoes, human) from 15 European countries [28]. In the Czech Republic, two strains of USUV (both lineage Europe 1) were isolated from dead blackbirds found in 2011 and 2012 in the city of Brno (South Moravia—south-eastern part of the country neighboring with Austria) [29] and in a pool of *Cx. modestus* mosquitoes sampled in 2013 in South Moravia [30].

There are reports of multiple USUV outbreaks mainly among blackbirds from other European countries e.g., [10,11,31–33]; however, information about USUV spread and genetic heterogeneity in the Czech Republic is limited. Since there are substantial changes in the distribution of different genetic lineages of USUV currently occurring throughout Europe, the information about the circulating strains and lineages in the individual European countries is of high importance. In this study, we tested the samples of dead blackbirds found during a season of increased blackbird mortality in the outskirts of Prague city in 2018 and randomly sampled in two other cities (Brno and Ceske Budejovice) in the Czech Republic in 2017–2019 for the presence of USUV RNA. Herein, we report a detection of multiple USUV lineages in blackbirds, *Culex pipiens* and *Cx. modestus* mosquitoes in the Czech Republic, and isolation of 10 USUV strains from carcasses of blackbirds using cell culture. This data contributes to our knowledge about USUV genetic variability, distribution and spread in Central Europe.

2. Materials and Methods

2.1. Sample Collection

Cadavers of blackbirds (*Turdus merula*) were collected in three cities (and their surroundings) in the Czech Republic: Prague (2018), Brno (2017–2019) and Ceske Budejovice (2017) (Figure 1). In Prague, the blackbird cadavers were collected during a local outbreak of increased mortality, when tens of dead blackbirds were found in a period of several weeks in a specific area of approximately 2 km². Cadavers from Brno and Ceske Budejovice were acquired within a project focused on the use of

accidentally killed urban free-living animals for monitoring of tick-borne diseases and thus sampled randomly. Apart from blackbirds, 10 song thrushes (*T. philomelos*) were collected and analyzed (Table 1).

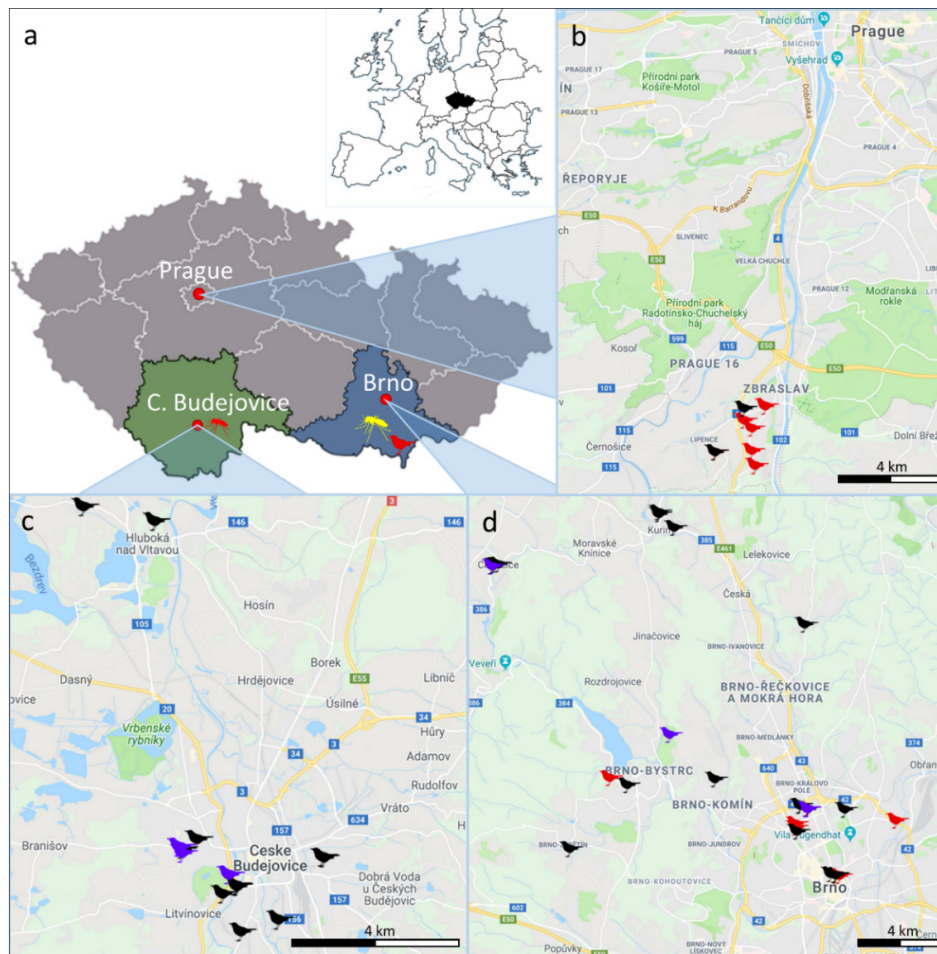


Figure 1. Localization of the cadavers of blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*) collected in 2017–2019 in the three geographical locations in the Czech Republic (indicated in black in the overview map of Europe) and used for detection of Usutu virus (USUV). (a) Localization of the three main sampling sites (cities of Prague, Brno and Ceske Budejovice) and localization of the three additional USUV positive samples collected outside the area of the three cities are depicted in the map of the Czech Republic. The region of South Moravia is labeled by a blue background and the region of South Bohemia by green. Bird pictogram indicates an USUV positive blackbird, collected in the town of Breclav-South Moravia); mosquito pictograms indicate USUV positive mosquito pools (pool of *Cx. modestus* collected near Hlohovec-South Moravia in yellow, *Culex pipiens* collected near Lomnice nad Luznici-South Bohemia in red). Position of cadavers of blackbirds and song thrushes collected in the three cities are presented in the remaining maps: Prague (b), Ceske Budejovice (c), Brno (d). Blackbirds negative for USUV genomic RNA are indicated in black, USUV positive blackbirds in red, and song thrushes (all USUV negative) in violet.

Table 1. Numbers of cadavers of blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*) collected in the three geographical locations in the Czech Republic, 2017–2019.

Locality	Prague		Brno		Ceske Budejovice	Total
Year	2018	2017	2018	2019	2017	
<i>T. merula</i>	8	19	13	3	12	55
<i>T. philomelos</i>	0	5	1	0	4	10
Total	8	24	14	3	16	65

The cadavers had been exposed for an unknown time to outdoor temperatures before collection. The place, time, date of collection, and conjectured cause of death were recorded. Cadavers were stored at -80°C until necropsied.

2.2. Sample Processing and RNA Extraction

Samples of brain, liver, muscle, and blood were collected using sterile instruments for each tissue in the individual cadavers. Two specimens of each tissue (for RNA extraction and virus isolation) were created and stored at -80°C or processed immediately. One specimen of each tissue (brain, liver, muscle) was used to prepare 30% (*w/v*) suspension in lysis RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) containing beta-mercaptoethanol. Stainless-steel beads of 5-mm (Qiagen) and Tissue Lyzer II (Qiagen) were used for tissue homogenization. After mechanical disruption (30 Hz for 30 s for liver and 2 min for muscle and brain tissue), the homogenate was digested with 20 μL of proteinase K for 30 min at 56°C . The lysate was clarified by centrifugation and supernatant was collected. The blood samples were resuspended directly in 560 μL of AVL buffer. From each sample, 140 μL were used for RNA isolation using the Qiaamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions, modified as follows. On column RNase-free DNase I (Qiagen), treatment was performed for 15 min at room temperature after the first washing step and an additional AW1 wash step was included after the digestion. The RNA was eluted with 60 μL of AVE buffer. Subsequently, the membrane was washed once more with the eluate to increase the yield of RNA. Spare aliquots of PCR positive tissue samples were used for virus isolation attempts in cell cultures.

2.3. Screening for flavivirus RNA

The isolated RNA was used as a template for one-step RT-PCR (OneStep RT-PCR Kit, Qiagen). The reaction was performed according to manufacturer's instructions in a total volume of 25 μL . Universal flavivirus primers [34] in 0.4 μM final concentration and 5 μL of isolated RNA were used. The reverse transcription and PCR were performed in a thermal cycler using the following program: 50°C , 60 min—reverse transcription; 95°C , 15 min—enzyme activation, followed by 40 cycles of 95°C , 30 s—denaturation; 57°C , 30 s—primer annealing; 72°C , 1 min—extension, the program was completed by final extension 72°C , 3 min. The RT-PCR products (10 μL of each reaction) were analyzed by agarose gel electrophoresis. PCR products were enzymatically purified (Exonuclease I FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and submitted for sequencing from both sides to confirm the identity of the virus.

2.4. Sequencing and Phylogenetic Analyses

Samples positive for USUV genomic RNA (RNA isolated from the original tissue homogenates) were subjected to cDNA synthesis using the 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Random hexamer primers and 4 μL of template total RNA were used for reverse transcription. Selected portions of the USUV genome were sequenced using Sanger sequencing primer walking strategy (primer nucleotide sequences are presented in Table S1). Three additional samples were obtained during mosquito and bird surveillance for West Nile virus [35,36] and previously found to be USUV RNA positive. The samples were sequenced as described above and included in the phylogenetic analysis: sample 2Cx_136 comprised of a pool of 42 *Cx. pipiens* females sampled in South Bohemia, near Lomnice nad Luznici, in 2018; sample 3Cx_16-99 was obtained from a pool of 52 *Cx. modestus* females sampled in South Moravia, near Hlohovec, in 2016 and sample 1TM10Bre was obtained from a brain tissue of a dead blackbird found in South Moravia, town of Breclav in 2018 (Figure 1). The nucleotide sequences obtained in our study were submitted to GenBank under the following accession numbers: NS4B/NS5 section: MN384964, MN395369, MN419895-MN419913; prM/M/E section: MN395370-MN395384 (Table S2).

Geneious Prime, version 2019.0.4, including available plugins was used for manual control, analysis and assembly of the nucleotide sequences as well as for alignment of the sequences, calculations

of genetic distance, and constructions of phylogenetic trees. The sequences were aligned using MAFFT, version 7, and FTT-NS-i x1000 algorithm [37,38] and identical sequences were removed. Suitable substitution models were identified based on Akaike and Bayesian information criterion using jModelTest 2.1.9 [39]. Phylogenies were inferred based on Maximum likelihood (PHYML 3.3.20180621) [40] and Bayesian Markov Chain Monte Carlo (Mr Bayes 3.2.6) [41] approach in parallel.

2.5. Virus Isolation in Cell Culture

Brain samples of the USUV RNA positive individuals were used for isolation of the replicating virus using cell cultures. Mammalian PS (porcine kidney) [42] (Kozuch and Mayer, 1975) and mosquito C6/36 cells [43,44] (Igarashi, 1978; Singh, 1967) were seeded 1.5 million cells per well in a 6-well plate in 3 mL of PS medium (Leibowitz medium (L-15), 3% precolostral calf serum, 1% L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin) or C6/36 medium (L15, 10 % fetal bovine serum, 5 % tryptose phosphate broth, 1% L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin). The cells were cultivated for 1 day in 0.5% of CO₂ at 37 °C (PS) or 28 °C (C6/36), respectively. Brain tissue samples were homogenized in the culture media using stainless-steel beads for 1 min 30 Hz in cooled blocks of Tissue Lyzer II (Qiagen) to prepare a 30% (*w/v*) suspension. The suspension was clarified by centrifugation (10 min 33,000× *g* at 4 °C), supernatant was filtered using 0.2 µm syringe filters (VWR), and 100 µL of the filtrate were added to the prepared cells in the plate. The same volume of media used for homogenization was added in negative control wells. After 3 h of incubation at appropriate temperature (0.5% of CO₂), the medium was removed, cells were washed by 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS), 3 mL of fresh medium was added, and the cells were further cultivated. On days 1, 2, and 5 post infection, 2 mL of culture medium were sampled and replaced by fresh medium. The identity of the virus was confirmed by RT-PCR and sequencing. Virus titers were determined by plaque assay using PS cell culture, and a virus antigen was detected using a flavivirus-specific immunofluorescence staining, as described previously [45].

3. Results

3.1. Screening for USUV RNA

From the total of 55 blackbirds (*T. merula*), 20 (36%) were positive for flavivirus RNA. All positive findings were subsequently confirmed as USUV by sequencing and Blast analysis. From the total of eight individuals collected in the area of Prague, six were positive for USUV RNA. Another 14 positive blackbirds (17%) were found among randomly sampled bird cadavers in the area of Brno, whereas no positive animal was acquired in Ceske Budejovice. Of the 14 positive individuals from Brno, 9 were sampled in 2017 and 5 in 2018. All of the USUV positive blackbirds had detectable viral RNA in brain tissue. Detailed results including a comparison of different tissues are summarized in Table 2 and Table S3. None of the 10 song thrushes (*T. philomelos*) were positive for flavivirus RNA.

Table 2. Detection of Usutu virus RNA by one-step RT-PCR in tissue samples of blackbird (*Turdus merula*) cadavers. Prevalence indicates percentage of positive samples out of tested. Not all tissue samples were available for all individuals mostly due to tissue damage. Thus, tissue efficiency is expressed as a proportion of positively tested samples of a particular tissue from all positive individuals with that tissue available.

Tissue	Prevalence (N Positive/N Tested)				Tissue Efficiency (N Positive/N Positive Individuals)	
	Locality	Prague ¹	Brno	Ceske Budejovice		Total
Brain		75% (6/8)	41% (14/34)	0% (0/12)	35% (19/54)	100% (20/20)
Liver		75% (6/8)	29% (10/34)	0% (0/11)	30% (16/53)	84% (16/19)
Muscle		75% (6/8)	31% (11/35)	0% (0/11)	30% (16/54)	84% (17/19)
Blood		75% (6/8)	17% (6/33)	0% (0/9)	24% (12/50)	66% (12/18)
Total		75% (6/8)	40% (14/35)	0% (0/12)	36% (20/55)	

¹ Samples were acquired during local outbreak of increased blackbird mortality.

3.2. Sequence Analysis

We retrieved continuous nucleotide sequences from 18 of 21 positive blackbirds and both of the infected mosquito pools (from the original tissue/mosquito pool homogenates). From the prM/E protein section, we have determined an almost complete coding sequence of prM, whole coding sequence of M protein and E protein (nucleotide positions 562–2475). Furthermore, partial nucleotide coding sequences for viral NS4B peptide and complete coding regions of protein NS5 were determined (nucleotide positions 7372–10,398). In the case of the sample 001TM10Bre acquired from a dead blackbird from South Moravia in 2018, only the complete NS4B/NS5 section was obtained.

The nucleotide sequences described above were used for phylogenetic analyses in order to assign them to established genetic lineages of the virus [31,46,47]. Using the two genomic loci, multiple datasets and phylogenetic approaches, the sequences obtained from samples from Prague (2018) clustered consistently into lineage Europe 3, whereas most sequences from blackbirds collected in Brno (2017, 2018) were associated with lineage Europe 1. Single USUV strain detected in a *T. merula* collected in Brno and sequences obtained from both the USUV positive mosquito pools were placed into lineage Europe 2 (Figures 2 and 3; phylogenetic trees reconstructed based on Bayesian inference are available as supplementary data: Figures S1 and S2). There were only negligible differences in the detailed topology in the phylogenetic tree based on prM/E compared to NS4B/NS5 protein-coding sequences. The position of Africa 3 lineage strains acquired in Africa was to a certain level unstable. Nevertheless, the NS4B/NS5 sequence obtained from a blackbird collected in South Moravia clustered consistently with the Africa 3 sequences of the West European origin (Figure 2 and Figure S1).

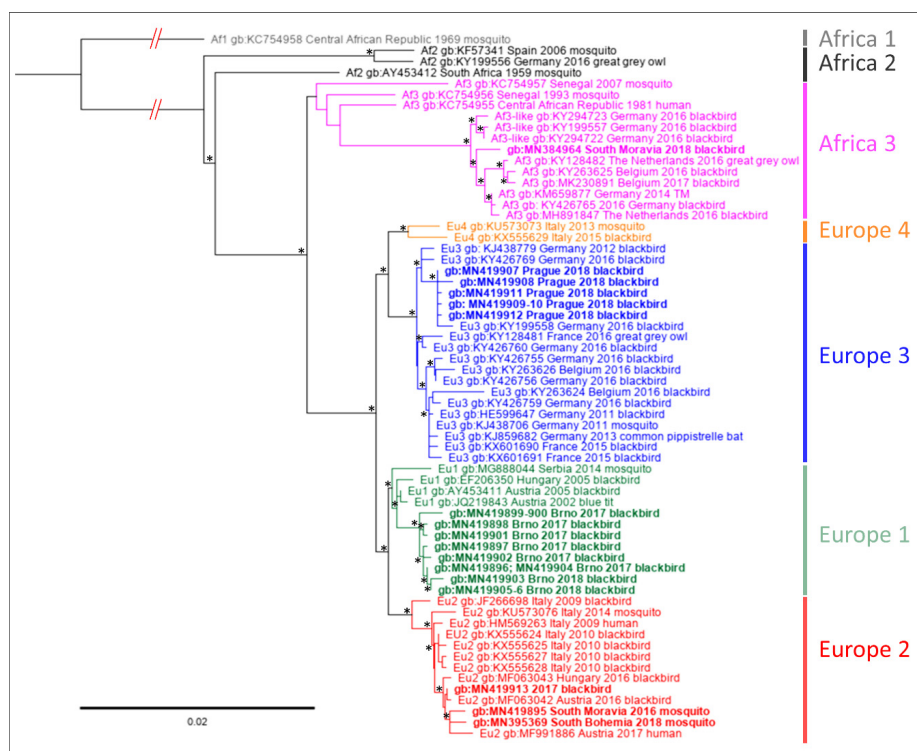


Figure 2. Phylogenetic maximum likelihood tree based on partial NS4B-coding nucleotide sequence and complete-coding sequences of NS5 protein of Usutu virus (nucleotide positions 7372–10,398 according to complete genome sequence of Vienna strain, AY453411). Sequence Africa 1, AY453412 was used as the outgroup. The code of the sequences consists of GenBank accession number, place and year of origin. The sequences obtained in this study are indicated by bold; individual geographical lineages are color-coded). The tree was generated using the GTR+I+G substitution model and 1000 replicates bootstrap analysis. Nodes with bootstrap support of <50% are indicated by asterisk. The lengths of tree branches correspond to the number of substitutions per site.

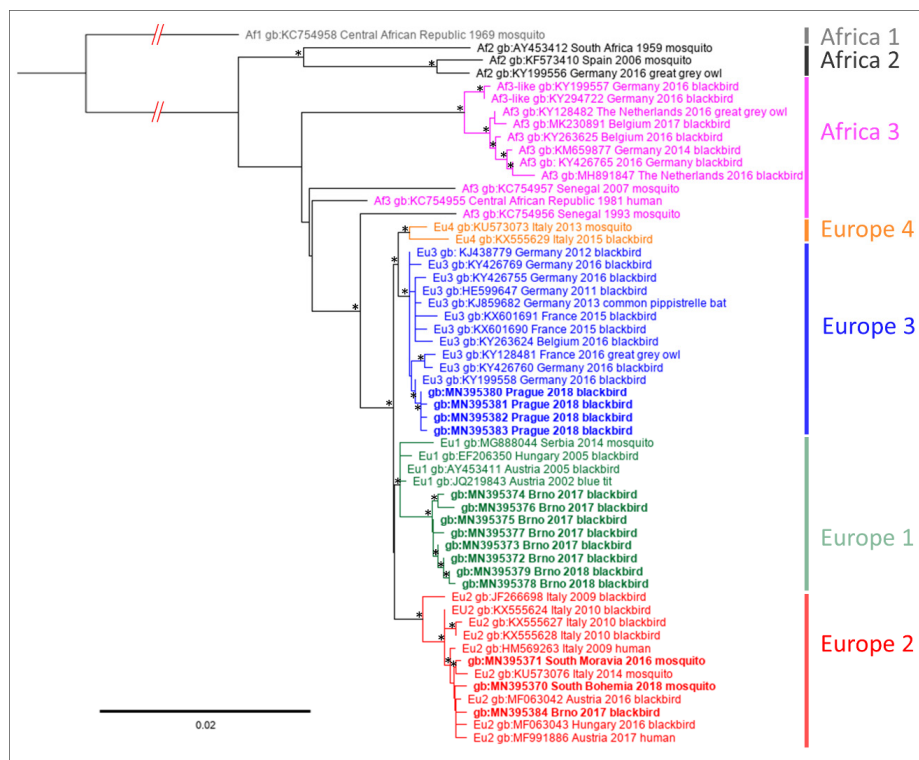


Figure 3. Phylogenetic maximum likelihood tree based on partial nucleotide sequence of prM protein and complete coding sequences of M and E proteins of Usutu virus (nucleotide positions 562–2475 according to complete genome sequence of Vienna strain, AY453411). Sequence Africa 1, AY453412, was used as the outgroup. The code of the sequences consists of GenBank accession number, place and year of origin. The sequences obtained in this study are indicated by bold; individual geographical lineages are color-coded. The tree was generated using the GTR+I substitution model and 1000 replicates bootstrap analysis. Nodes with bootstrap support of <50% are indicated by asterisk. The lengths of tree branches correspond to the number of substitutions per site.

3.3. Usutu Virus Isolation

Selected homogenates of RT-PCR positive samples were used for isolation of the virus using mammalian (PS) and mosquito (C6/36) cell lines. We have isolated USUV in 10 out of 12 samples (six of Europe 1 lineage and four of Europe 3) with the same results obtained in both cell culture systems. The active replication of the virus was confirmed using plaque assay (all the successfully isolated viral strains were obtained in both-PS and C6/36 cell lines). In PS cells, average virus titer in culture media reached $4.83 \pm 0.79 \log_{10}$ pfu/mL on day-2 post-infection (p.i.) and $2.27 \pm 1.11 \log_{10}$ pfu/mL on day-5 p.i. In C6/36 cells, average virus titer in culture media reached $3.11 \pm 1.37 \log_{10}$ pfu/mL on day 2 p.i. and $6.96 \pm 0.61 \log_{10}$ pfu/mL on day 5 p.i. In PS cells, the viral strains generated a cytopathic effect, whereas in mosquito C6/36 cells, no cytopathic effect was observed (Figure 4a,b). Immunofluorescence staining of viral E antigen revealed that only a low percentage of PS cells in culture are infected, whereas almost all C6/36 cells in the culture are antigen-positive. For example, in the case of strain 202TM10, 13.3% of PS cells were infected on day 3 p.i. compared to 95.5% of C6/36 cells (average of 10 fields with >50 cells) (Figure 4c,d).

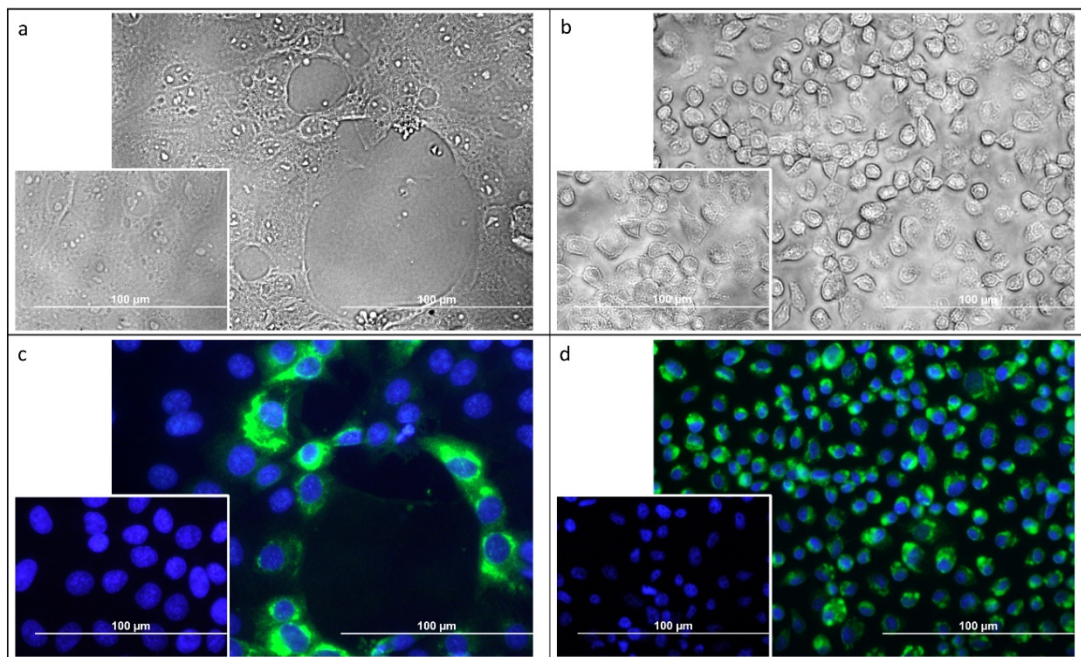


Figure 4. Mammalian, porcine kidney (PS) (a,c) and mosquito C6/36 cells (b,d) infected by the strains of Usutu virus isolated from dead blackbirds in this study. Infected cell cultures are presented in the large images and uninfected control cells in smaller images (3 days post-infection). Cytopathic effect was observed in infected PS cells (a) whereas no such changes were seen in C6/36 mosquito cells (b). Flaviviral E protein antigen was labeled using indirect immuno-fluorescence (green) in PS (c) and C6/36 cells (d). Cell nuclei were counterstained using DAPI (blue).

All the isolated strains were deposited in the Arbovirus collection of the Biology Centre Collection of Organisms (BCCO) under following identification numbers: BCCO_50_0480 to BCCO_50_0501 [48] (Table S2).

4. Discussion

In the Czech Republic, the occurrence of USUV has been reported in isolated cases and restricted to the southeastern part (South Moravia) of the country [29,30] neighboring with an USUV endemic region in Austria [14,31]. Our study was initiated by an observation of increased mortality among blackbirds outside this area in the city of Prague (central part of the country). USUV RNA was demonstrated in multiple tissues of dead blackbirds (in six out of eight individuals) sampled in the area. These USUV strains were most closely related to a strain of the Europe 3 lineage (KY199558) involved in an outbreak in eastern Germany in 2016 [33].

Interestingly, we were able to detect USUV RNA also in randomly collected dead blackbirds in the city of Brno in the area of previous occurrence, where, however, no mass mortality of blackbirds was observed. Phylogenetic analyses showed that these viral strains belong to lineages Europe 1 and 2. The Europe 1 lineage virus was found previously in this region [30] and both lineages co-circulate in neighboring Austria [31,49]. In Austria, it was described previously that USUV outbreaks among blackbirds resulted in a certain level of herd immunity, when increased seroprevalence in bird population resulted in decreased numbers of acutely infected individuals, or decreased viral loads in acutely infected birds in the years following an outbreak [50]. Nevertheless, this scenario did not take place in the more recent outbreaks in Germany [11,32]. As USUV was found repeatedly since 2010 in South Moravia [29,30], it is likely endemic to the region and possibly controlled by herd immunity in the terms of decreasing the frequency of infected birds as the source of the virus for the vectors and susceptible individuals as new potential USUV hosts. Whereas, the Europe 3 lineage USUV was

probably newly introduced to the area of Prague in 2018 and caused a local outbreak, which is similar to the situation observed in eastern Germany in the same year [32].

In some areas, USUV probably may circulate unnoticed without causing any major mortalities in (urban) populations of birds. This hypothesis is supported by the detection of the virus in a pool of mosquitoes collected in South Bohemia, the southwestern part of the country close to the city of Ceske Budejovice, where no USUV positive birds were found and no mass mortality among birds was noticed.

For the first time, an USUV strain of Africa 3 lineage was found in the Czech Republic in a dead blackbird from South Moravia region (found in the town of Breclav). USUV strains of Africa 3 and Africa 3-like lineages were repeatedly detected in Europe [46] including recent reports from eastern Germany [32,33]. Nevertheless, Austria is a probable source of the virus recorded in our study as this USUV lineage is also present in the area neighboring with South Moravia [15,49]. Unfortunately, no suitable sequences were available from this area to support this hypothesis. The detailed topology of the Africa 3 lineage was to a certain level unstable, most probably due to the low number of nucleotide sequences of African strains available in GenBank. Moreover, it was suggested previously, that Africa 3 lineage probably contains sequences of polyphyletic origin [31].

Carcasses of dead birds represent an important source of material for surveillance of USUV and other ornithophilic viruses [32,51]. As reported previously [10,14], USUV is found in multiple organs, such as liver, spleen, heart or lung. According to our results, the brain was the most suitable tissue for USUV screening compared to liver, muscle or blood, as all of the positive birds had detectable USUV RNA in the brain tissue, whereas the other tissues were negative in some of the infected individuals. Furthermore, using cell culture, we were able to isolate viable viruses even from carcasses that were for an unknown period of time (>1 day) subjected to ambient outdoor temperatures (rough estimate 15–30 °C). Mosquito C6/36 cells were highly susceptible to USUV infection, which might be associated with their deficiency in the RNA interference pathway [52]. All the USUV positive blackbirds were collected in the period of late summer (July–September) which is in accordance with the peak in large scale continual monitoring studies of birds [53] and mosquitoes [51]. No song thrushes (*T. philomelos*) were positive in our study, despite the virus which was detected in this species previously [11,32,53].

USUV was also detected in a pool of *Cx. pipiens* and in a pool of *Cx. modestus* mosquitoes. *Cx. pipiens* is considered a principal vector of USUV in Europe [1], multiple lineages were proven to be effective vectors of USUV in laboratory conditions [2,3], and there are numerous reports of detection of the virus in this vector e.g., [54–56]. Whereas, there is a single report of USUV found in *Cx. modestus* [30]. The authors suggest a possible role of *Cx. modestus* (together with *Cx. pipiens*) in the maintenance of USUV in a sylvatic cycle. *Cx. modestus* is a human biting species and is considered a potential bridge vector of the related West Nile virus (WNV) to humans [57]. Nevertheless, it remains to be elucidated whether this species is a suitable vector for USUV, as it is for WNV [58].

In conclusion, USUV presence in the Czech Republic is not restricted to the southeastern part of the country neighboring with Austria. Two genetic lineages (Europe 1 and Europe 2) probably co-circulate in this area of endemic occurrence without causing any major outbreaks in wild life. Lineage Europe 3 was probably newly introduced to the area of Prague and resulted in a local mortality of blackbirds.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/11/568/s1>, Table S1. Primers used for Sanger sequencing of the partial coding sequence of prM and NS4B proteins and complete coding sequences of M, E and NS5 proteins; Table S2. List of strains and nucleotide sequences of Usutu virus acquired in this study; Table S3. Detailed results of Usutu virus genomic RNA detection in the samples of blackbird (*Turdus merula*) cadavers collected 2017–2018 in the Czech Republic; Figure S1. Phylogenetic tree based on Bayesian Markov chain Monte Carlo analysis of partial NS4B coding nucleotide sequence and complete coding sequences of NS5 protein of Usutu virus; Figure S2. Phylogenetic tree based on Bayesian Markov chain Monte Carlo analysis of partial prM protein nucleotide coding sequence and complete coding sequences of M and E proteins of Usutu virus.

Author Contributions: Conceptualization, D.M., J.V., D.R. and V.H.; methodology, V.H. and M.P.; formal analysis, V.H. and T.K.; investigation, V.H., T.K., M.Z., M.P., K.M., L.H., P.P., S.S., Z.H. and I.R.; resources, K.M., J.V., L.H., P.P., V.H., I.R., S.S. and F.R.; data curation, L.H.; writing—original draft preparation, V.H., D.R. and M.P.; writing—review and editing, D.R., J.V., L.H., D.M., M.P., I.R., S.S. and Z.H.; visualization, V.H., M.P. and D.R.; supervision, D.M., L.H., J.V. and D.R.; project administration, L.H. and D.M.; funding acquisition, L.H., D.M. and I.R.

Funding: This research was funded by the Czech Science Foundation, grant number 17-16009S, Czech Health Research Council, grant number NV19-09-00036 and the European Regional Development Fund, project number OPVVV 16_019/0000759.

Acknowledgments: The authors would like to thank all the volunteers from the public who participated in the cadaver reporting and collection.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Nikolay, B. A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: How much do transmission cycles overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *109*, 609–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cook, C.L.; Huang, Y.-J.S.; Lyons, A.C.; Alto, B.W.; Unlu, I.; Higgs, S.; Vanlandingham, D.L. North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fros, J.J.; Miesen, P.; Vogels, C.B.; Gaibani, P.; Sambri, V.; Martina, B.E.; Koenraadt, C.J.; van Rij, R.P.; Vlak, J.M.; Takken, W.; et al. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health* **2015**, *1*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hernandez-Triana, L.M.; de Marco, M.F.; Mansfield, K.L.; Thorne, L.; Lumley, S.; Marston, D.; Fooks, A.A.; Johnson, N. Assessment of vector competence of UK mosquitoes for Usutu virus of African origin. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 381. [[CrossRef](#)]
- Nikolay, B.; Diallo, M.; Faye, O.; Boye, C.S.; Sall, A.A. Vector competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 993–996. [[CrossRef](#)]
- Saiz, J.-C.; Blazquez, A.-B. Usutu virus: Current knowledge and future perspectives. *Virus Adapt Treat* **2017**, *9*, 27–40. [[CrossRef](#)]
- Clé, M.; Beck, C.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Gutierrez, S.; Van de Perre, P.; Baldet, T.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, e232. [[CrossRef](#)]
- Cadar, D.; Becker, N.; Campos, R.d.M.; Börstler, J.; Jöst, H.; Schmidt-Chanasit, J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1771–1773. [[CrossRef](#)]
- Diagne, M.M.; Ndione, M.H.D.; Di Paola, N.; Fall, G.; Bedekelabou, A.P.; Sembène, P.M.; Faye, O.; de Andrade Zannotto, P.M.; Sall, A.A. Usutu virus isolated from rodents in Senegal. *Viruses* **2019**, *11*, 181. [[CrossRef](#)]
- Becker, N.; Jöst, H.; Ziegler, U.; Eiden, M.; Höper, D.; Emmerich, P.; Fichet-Calvet, E.; Ehichioya, D.U.; Czajka, C.; Gabriel, M.; et al. Epizootic emergence of Usutu virus in wild and captive birds in Germany. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32604. [[CrossRef](#)]
- Ziegler, U.; Jöst, H.; Müller, K.; Fischer, D.; Rinder, M.; Tietze, D.T.; Danner, K.-J.; Becker, N.; Skuballa, J.; Hamann, H.-P.; et al. Epidemic spread of Usutu virus in southwest Germany in 2011 to 2013 and monitoring of wild birds for Usutu and West Nile viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2015**, *15*, 481–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rijks, J.M.; Kik, M.L.; Slaterus, R.; Foppen, R.P.B.; Stroo, A.; IJzer, J.; Stahl, J.; Gröne, A.; Koopmans, M.G.P.; van der Jeugd, H.; et al. Widespread Usutu virus outbreak in birds in the Netherlands, 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Nowotny, N. Chapter Five—Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. In *Advances in Virus Research*; Maramorosch, K., Murphy, F.A., Eds.; Academic Press: Burlington, VT, USA, 2014; Volume 89, pp. 201–275.
- Chvala, S.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Pathology and viral distribution in fatal Usutu virus infections of birds from the 2001 and 2002 outbreaks in Austria. *J. Comp. Pathol.* **2004**, *131*, 176–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Aberle, S.W.; Kolodziejek, J.; Jungbauer, C.; Stiasny, K.; Aberle, J.H.; Zoufaly, A.; Hourfar, M.K.; Weidner, L.; Nowotny, N. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1800545. [[CrossRef](#)]
16. Allering, L.; Jöst, H.; Emmerich, P.; Günther, S.; Lattwein, E.; Schmidt, M.; Seifried, E.; Sambri, V.; Hourfar, K.; Schmidt-Chanasit, J. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south-west Germany, 2012. *Eurosurveillance* **2012**, *17*, 20341.
17. Bakonyi, T.; Jungbauer, C.; Aberle, S.W.; Kolodziejek, J.; Dimmel, K.; Stiasny, K.; Allerberger, F.; Nowotny, N. Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017—Raising awareness for diagnostic challenges. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 617–644. [[CrossRef](#)]
18. Nikolay, B.; Diallo, M.; Boye, C.S.B.; Sall, A.A. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1417–1423. [[CrossRef](#)]
19. Cavrini, F.; Gaibani, P.; Longo, G.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Bonilauri, P.; Gerunda, G.E.; Gerundi, G.E.; Di Benedetto, F.; Pasetto, A.; et al. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August–September 2009. *Eurosurveillance* **2009**, *14*, 19448.
20. Cavrini, F.; Pepa, M.E.D.; Gaibani, P.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Landini, M.P.; Sambri, V. A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 221–223. [[CrossRef](#)]
21. Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grottola, A.; Sabbatini, A.M.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M.L.; Lelli, R.; et al. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August–September 2009. *Eurosurveillance* **2009**, *14*, 19446.
22. Bakonyi, T.; Gould, E.A.; Kolodziejek, J.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Complete genome analysis and molecular characterization of Usutu virus that emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and other flaviviruses. *Virology* **2004**, *328*, 301–310. [[PubMed](#)]
23. Engel, D.; Jöst, H.; Wink, M.; Börstler, J.; Bosch, S.; Garigliany, M.-M.; Jöst, A.; Czajka, C.; Lühken, R.; Ziegler, U.; et al. Reconstruction of the evolutionary history and dispersal of Usutu virus, a neglected emerging arbovirus in Europe and Africa. *mBio* **2016**, *7*, e01938. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Bollati, M.; Alvarez, K.; Assenberg, R.; Baronti, C.; Canard, B.; Cook, S.; Coutard, B.; Decroly, E.; de Lamballerie, X.; Gould, E.A.; et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Res.* **2010**, *87*, 125–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Williams, M.C.; Simpson, D.I.H.; Haddow, A.J.; Knight, E.M. The isolation of West Nile virus from man and of Usutu virus from the bird-biting mosquito *Mansonia aurites* (Theobald) in the Entebbe area of Uganda. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1964**, *58*, 367–374. [[CrossRef](#)]
26. Weissenböck, H.; Bakonyi, T.; Rossi, G.; Mani, P.; Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 274–277. [[CrossRef](#)]
27. Weissenböck, H.; Kolodziejek, J.; Url, A.; Lussy, H.; Rebel-Bauder, B.; Nowotny, N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne Flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 652–656. [[CrossRef](#)]
28. Cheng, Y.; Tjaden, N.B.; Jaeschke, A.; Lühken, R.; Ziegler, U.; Thomas, S.M.; Beierkuhnlein, C. Evaluating the risk for Usutu virus circulation in Europe: Comparison of environmental niche models and epidemiological models. *Int. J. Health Geog.* **2018**, *17*, 35. [[CrossRef](#)]
29. Hubalek, Z.; Rudolf, I.; Capek, M.; Bakonyi, T.; Betasova, L.; Nowotny, N. Usutu virus in blackbirds (*Turdus merula*), Czech Republic, 2011–2012. *Transbound Emerg. Dis.* **2014**, *61*, 273–276. [[CrossRef](#)]
30. Rudolf, I.; Bakonyi, T.; Sebesta, O.; Mendel, J.; Pesko, J.; Betasova, L.; Blazejova, H.; Venclikova, K.; Strakova, P.; Nowotny, N.; et al. Co-circulation of Usutu virus and West Nile virus in a reed bed ecosystem. *Parasit. Vectors* **2015**, *8*, 520. [[CrossRef](#)]
31. Bakonyi, T.; Erdelyi, K.; Brunthaler, R.; Dan, A.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010–2016. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, 1–7. [[CrossRef](#)]
32. Michel, F.; Sieg, M.; Fischer, D.; Keller, M.; Eiden, M.; Reuschel, M.; Schmidt, V.; Schwehn, R.; Rinder, M.; Urbaniak, S.; et al. Evidence for West Nile Virus and Usutu virus infections in wild and resident birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses* **2019**, *11*, 674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sieg, M.; Schmidt, V.; Ziegler, U.; Keller, M.; Höper, D.; Heenemann, K.; Rückner, A.; Nieper, H.; Muluneh, A.; Groschup, M.H.; et al. Outbreak and cocirculation of three different Usutu virus strains in Eastern Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 662–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Scaramozzino, N.; Crance, J.-M.; Jouan, A.; DeBriel, D.A.; Stoll, F.; Garin, D. Comparison of Flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of Flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 1922–1927. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rudolf, I.; Blazejova, H.; Sebesta, O.; Mendel, J.; Pesko, J.; Betasova, L.; Strakova, P.; Sikutova, S.; Hubalek, Z. West Nile virus (lineage 2) in mosquitoes in southern Moravia—Awaiting the first autochthonous human cases. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2018**, *67*, 44–46. [[PubMed](#)]
36. Rudolf, I.; Rettich, F.; Betasova, L.; Mendel, J.; Hubalek, Z.; Sikutova, S. West Nile virus (lineage 2) detected for the first time in mosquitoes in Southern Bohemia: New WNV endemic area? *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* **2019**, in press.
37. Katoh, K.; Standley, D.M. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 772–780. [[CrossRef](#)]
38. Katoh, K.; Misawa, K.; Kuma, K.; Miyata, T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3059–3066. [[CrossRef](#)]
39. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. jModelTest 2: More models, new heuristics and high-performance computing. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772. [[CrossRef](#)]
40. Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)]
41. Huelsenbeck, J.P.; Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 754–755. [[CrossRef](#)]
42. Kozuch, O.; Mayer, V. Pig kidney epithelial (PS) cells: A perfect tool for the study of flaviviruses and some other arboviruses. *Acta Virol.* **1975**, *19*, 498. [[PubMed](#)]
43. Singh, K.R.P. Cell culture derived from larvae of *Aedes albopictus* (Skuse) and *Aedes aegypti* (L.). *Curr. Sci.* **1967**, *36*, 506–508.
44. Igarashi, A. Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J. Gen. Virol.* **1978**, *40*, 531–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sirmarova, J.; Salat, J.; Palus, M.; Hönig, V.; Langhansova, H.; Holbrook, M.R.; Ruzek, D. Kyasanur forest disease virus infection activates human vascular endothelial cells and monocyte-derived dendritic cells. *Emerg. Microbes. Infect.* **2018**, *7*, 175. [[CrossRef](#)]
46. Cadar, D.; Lühken, R.; van der Jeugd, H.; Garigliany, M.; Ziegler, U.; Keller, M.; Lahoreau, J.; Lachmann, L.; Becker, N.; Kik, M.; et al. Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30452. [[CrossRef](#)]
47. Calzolari, M.; Chiapponi, C.; Bonilauri, P.; Lelli, D.; Baioni, L.; Barbieri, I.; Lavazza, A.; Pongolini, S.; Dottori, M.; Moreno, A. Co-circulation of two Usutu virus strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *51*, 255–262. [[CrossRef](#)]
48. Biology Centre Collection of Organisms: Collection of Arboviruses Home Page. Available online: <http://www.arboviruscollection.cz/index.php?lang=en> (accessed on 15 November 2019).
49. Weidinger, P.; Kolodziejek, J.; Bakonyi, T.; Brunthaler, R.; Erdelyi, K.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
50. Meister, T.; Lussy, H.; Bakonyi, T.; Sikutova, S.; Rudolf, I.; Vogl, W.; Winkler, H.; Frey, H.; Hubálek, Z.; Nowotny, N.; et al. Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet. Microbiol.* **2008**, *127*, 237–248. [[CrossRef](#)]
51. Calzolari, M.; Gaibani, P.; Bellini, R.; Defilippo, F.; Pierro, A.; Albieri, A.; Maioli, G.; Luppi, A.; Rossini, G.; Balzani, A.; et al. Mosquito, bird and human surveillance of West Nile and Usutu viruses in Emilia-Romagna region (Italy) in 2010. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38058. [[CrossRef](#)]
52. Brackney, D.E.; Scott, J.C.; Sagawa, F.; Woodward, J.E.; Miller, N.A.; Schilkey, F.D.; Mudge, J.; Wilusz, J.; Olson, K.E.; Blair, C.D.; et al. C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2010**, *4*, e856. [[CrossRef](#)]
53. Chvala, S.; Bakonyi, T.; Bukovsky, C.; Meister, T.; Brugger, K.; Rubel, F.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet. Microbiol.* **2007**, *122*, 237–245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Cabanova, V.; Sikutova, S.; Strakova, P.; Sebesta, O.; Vichova, B.; Zubrikova, D.; Miterpakova, M.; Mendel, J.; Hurnikova, Z.; Hubalek, Z.; et al. Co-circulation of West Nile and Usutu flaviviruses in mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses* **2019**, *11*, 639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Scheuch, D.E.; Schäfer, M.; Eiden, M.; Heym, E.C.; Ziegler, U.; Walther, D.; Schmidt-Chanasit, J.; Keller, M.; Groschup, M.H.; Kampen, H. Detection of Usutu, Sindbis, and Batai viruses in mosquitoes (Diptera: Culicidae) collected in Germany, 2011–2016. *Viruses* **2018**, *10*, 389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tamba, M.; Bonilauri, P.; Bellini, R.; Calzolari, M.; Albieri, A.; Sambri, V.; Dottori, M.; Angelini, P. Detection of Usutu virus within a West Nile virus surveillance program in Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *11*, 551–557. [[CrossRef](#)]
57. Balenghien, T.; Fouque, F.; Sabatier, P.; Bicout, D.J. Horse-, bird-, and human-seeking behavior and seasonal abundance of mosquitoes in a West Nile virus focus of southern France. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 936–946. [[CrossRef](#)]
58. Balenghien, T.; Vazeille, M.; Grandadam, M.; Schaffner, F.; Zeller, H.; Reiter, P.; Sabatier, P.; Fouque, F.; Bicout, D.J. Vector competence of some French *Culex* and *Aedes* mosquitoes for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 589–596. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).