

Neuroinvazivne virusne zoonoze na području Hrvatske

Bašić, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:608559>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-19**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Sara Bašić

**Neuroinvazivne virusne zoonoze na području
Hrvatske**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za virološku serologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Tatjane Vilibić-Čavlek i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023/2024.

Rezultati prikazani u radu dio su:

- Projekta Hrvatske zaklade za znanost: IP-2016-06-7456: Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske; CRONEUROARBO (voditeljica: izv. prof. dr. sc. Tatjana Vilibić Čavlek)
- European Union NextGenerationEU projekta Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske br. NPOO 1 Hrvatskog veterinarskog instituta: Epidemiologija ptičjih flavivirusa u kontekstu „Jednog zdravlja“; FLAVIR (voditelj: doc. dr. sc. Vladimir Savić)

POPIS KRATICA

CSL	Cerebrospinalni likvor
EIA (engl. <i>enzyme immunoassay</i>)	Imunoenzimski test
IFA (engl. <i>indirect immunofluorescent assay</i>)	Indirektni imunofluorescentni test
IgG (engl. <i>immunoglobulin G</i>)	Imunoglobulin G
IgM (engl. <i>immunoglobulin M</i>)	Imunoglobulin M
KMEV	Virus krpeljnog encefalitisa
mRNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)	Glasnička ribonukleinska kiselina
VNT (engl. <i>virus neutralization test</i>)	Test neutralizacije virusa
RNA (engl. <i>ribonucleic acid</i>)	Ribonukleinska kiselina
PRNT (engl. <i>plaque-reduction neutralization test</i>)	Neutralizacijski test redukcije plakova
SŽS	Središnji živčani sustav
TOSV	Toscana virus
USUV	Usutu virus
VZN	Virus Zapadnog Nila

SADRŽAJ

SAŽETAK	
SUMMARY	
1. UVOD	1
1.1. Virus krpeljnog encefalitisa	1
1.2. Virus Zapadnog Nila	4
1.3. Usutu virus	7
1.4. Toscana virus	9
2. HIPOTEZA	11
3. CILJ RADA	11
4. ISPITANICI I METODE	12
4.1. Ispitanici	12
4.2. Metode	12
5. REZULTATI	18
6. RASPRAVA	22
7. ZAKLJUČCI	25
8. ZAHVALE	26
9. LITERATURA	27
10. ŽIVOTOPIS	31

SAŽETAK

Neuroinvazivne virusne zoonoze na području Hrvatske

Sara Bašić

Neuroinvazivni arbovirusi kao što je virus krpeljnog encefalitisa (KMEV), virus Zapadnog Nila (VZN), Usutu virus (USUV) i Toscana virus (TOSV) značajni su uzročnici infekcija na području Europe. Cilj ovog rada bio je istražiti učestalost i epidemiološke značajke arbovirusnih infekcija u hospitaliziranih bolesnika s neuroinvazivnim oblikom bolesti na području Hrvatske. U istraživanje je uključeno 776 bolesnika u dobi od 6 do 90 godina testiranih u razdoblju od 2017. do 2023. godine. Dijagnoza je potvrđena prema kliničkim i laboratorijskim kriterijima Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *European Centre for Disease Control and Prevention*; ECDC) dokazom virusne RNA u krvi/likvoru/urinu ili IgM protutijela u likvoru. Neuroinvazivna infekcija je potvrđena u 174 (22,4%) bolesnika. Najučestaliji dokazani arbovirus bio je KMEV (51,1%), potom VZN (44,9%) dok su sporadično dokazani i TOSV (2,3%) te USUV (1,7%). Analizom dobi oboljelih uočeno je da su najstariji bili bolesnici s VZN infekcijom (medijan 69; IQR=59-77 godina), potom USUV (medijan 60; IQR=42-71 godina), KMEV (medijan 49; IQR=25-59 godina) i TOSV (medijan 21; IQR=21-37 godina). Bolesnici s KMEV većinom su bili muškog spola (69,6%, omjer muškaraca i žena 2,3:1) za razliku od VZN od kojeg je oboljelo 57,6% muškaraca i 42,4% žena (omjer muškaraca i žena 1,3:1). Uočena je sezonska pojavnost arbovirusnih infekcija u razdoblju od travnja do studenog. KMEV je imao dva vrška, veći od travnja do kolovoza te manji u listopadu i studenom. Najveći broj VZN infekcija dokazan je u kolovozu i rujnu. KMEV, VZN i USUV dokazani su na području kontinentalnih županija, a TOSV samo na području priobalja (Splitsko-dalmatinska županija). Rezultati ovog rada potvrdili su značaj arbovirusa u etiologiji neuroinvazivnih infekcija na području Hrvatske (22,4% bolesnika imalo je dokazanu arbovirusnu infekciju), posebice u kontinentalnim županijama Stoga arboviruse treba uključiti u rutinske dijagnostičke algoritme u bolesnika koji razviju simptome neuroinvazivne bolesti za vrijeme sezone prijenosa.

Ključne riječi: arbovirusi, neuroinvazivne infekcije, epidemiologija, Hrvatska

SUMMARY

Neuroinvasive viral zoonoses in Croatia

Sara Bašić

Neuroinvasive arboviruses such as tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), and Toscana virus (TOSV) are significant causes of infections in Europe. The aim of this study was to analyze the prevalence and epidemiological characteristics of arbovirus infections in hospitalized patients with neuroinvasive disease in Croatia. The study included 776 patients aged between 6 and 90 years tested in the period from 2017 to 2023. The diagnosis was confirmed according to the clinical and laboratory criteria of the European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) by the detection of viral RNA in blood/cerebrospinal fluid/urine or IgM antibodies in cerebrospinal fluid. Neuroinvasive infection was confirmed in 174 (22.4%) patients. The most frequently detected arbovirus was TBEV (51.1%), followed by WNV (44.9%), while TOSV (2.3%) and USUV (1.7%) were detected sporadically. By analyzing the age of patients, it was observed that patients with WNV infection were the oldest (median 69; IQR=59-77 years), then USUV (median 60; IQR=42-71 years), TBEV (median 49; IQR=25-59 years) and TOSV (median 21; IQR = 21-37 years). Patients with TBE were mostly males (69.6%, male-to-female ratio 1.7:1) in contrast to WNV, which affected 57.6% of men and 42.4% of women (male-to-female ratio 1.3:1). Arboviral infections showed seasonal distribution from April to November. The TBE had two peaks, the larger one from April to August and the smaller one in October and November. The highest number of WNV infections was observed in August and September. TBE, WNV, and USUV were detected in continental counties, and TOSV only in the coastal area (Split-Dalmatia County). The results of this study confirmed the importance of arboviruses in the etiology of neuroinvasive infections in Croatia (22.4% of patients had confirmed arbovirus infection), especially in continental counties. Therefore, arboviruses should be included in routine diagnostic algorithms in patients who develop symptoms of neuroinvasive disease during the transmission season.

Keywords: arboviruses, neuroinvasive infections, epidemiology, Croatia

1. UVOD

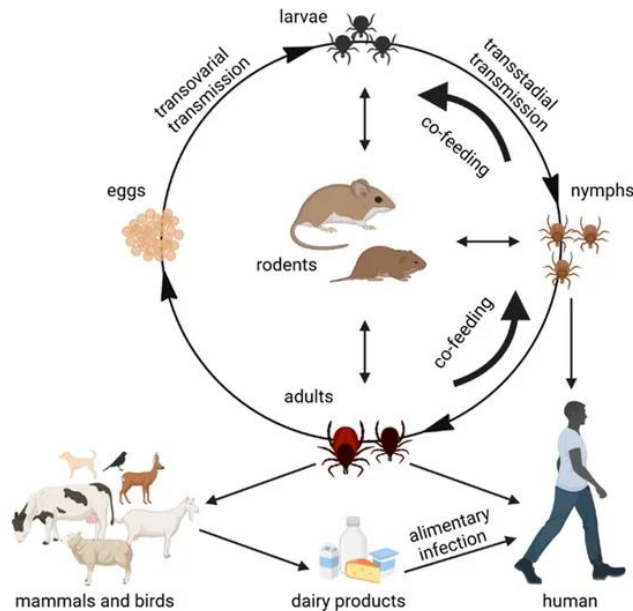
Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije i Zdravstvene organizacije za zdravlje životinja, zoonoze čine 60% svih zaraznih bolesti. Najčešće su virusne zoonoze, posebice arbovirusne infekcije koje su značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta diljem svijeta (1). Iako su većinom asimptomatske, arbovirusne se infekcije u nekih bolesnika mogu očitovati i kliničkom slikom infekcije središnjeg živčanog sustava (SŽS; meningitis, encefalitis, mijelitis) s posljedičnim smrtnim ishodom. U skupini arbovirusa, najčešći uzročnici neuroinvazivnih bolesti su flavivirusi: virus krpeljnog encefalitisa (KMEV), virus zapadnog Nila (VZN) te Usutu virus (USUV). U mediteranskim je područjima rasprostranjen i Toscana virus (TOSV) iz skupine bunyavirusa (2).

1.1. Virus krpeljnog encefalitisa

KMEV je kuglasti, ovijeni mali virus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Orthoflavivirus*, serokompleksu krpeljnog encefalitisa. Postoje tri glavna podtipa ovog virusa: europski, sibirski i dalekoistočni podtip čiji nazivi ukazuju na njihovu proširenost na prostoru Europe i Azije. KMEV se razlikuje od ostalih članova roda prema svojoj otpornosti na kiselu sredinu. Virus ostaje infektivan do dva sata u želučanom soku zbog čega se može zaraziti konzumacijom mlijeka inficirane životinje (3, 4).

KMEV se prenosi horizontalno između krpelja i sisavaca, a moguć je i vertikalni prijenos u krpeljima. U prirodnom ciklusu prijenosa nužna je prisutnost inficiranih vektora i rezervoara između kojih se, za vrijeme hranjenja krpelja, virus može prenositi u oba smjera. Dokazano je da više od 16 vrsta krpelja može biti vektor KMEV, no dvije su vrste krpelja značajne za održavanje virusa u prirodi: *Ixodes ricinus* - vektor europskog podtipa te *Ixodes persulcatus* - vektor dalekoistočnog i sibirskog podtipa. Krpelj prolazi kroz tri oblika za vrijeme svog razvojnog ciklusa: larva, nimfa i odrasli oblik. Larve i nimfe češće se hrane na malim glodavcima (miševi, voluharice), a odrasli se oblici krpelja uobičajeno hrane na većim divljim (jeleni, lisice) i domaćim životinjama (koze, ovce, goveda). Za svaku razvojnu fazu krpelju je potreban obrok krvi te se hrane tri puta na različitim domaćinima. Krpelji mogu virus prenositi transstadijski i transovarijski, što znači da je moguć prijenos virusa između različitih razvojnih oblika

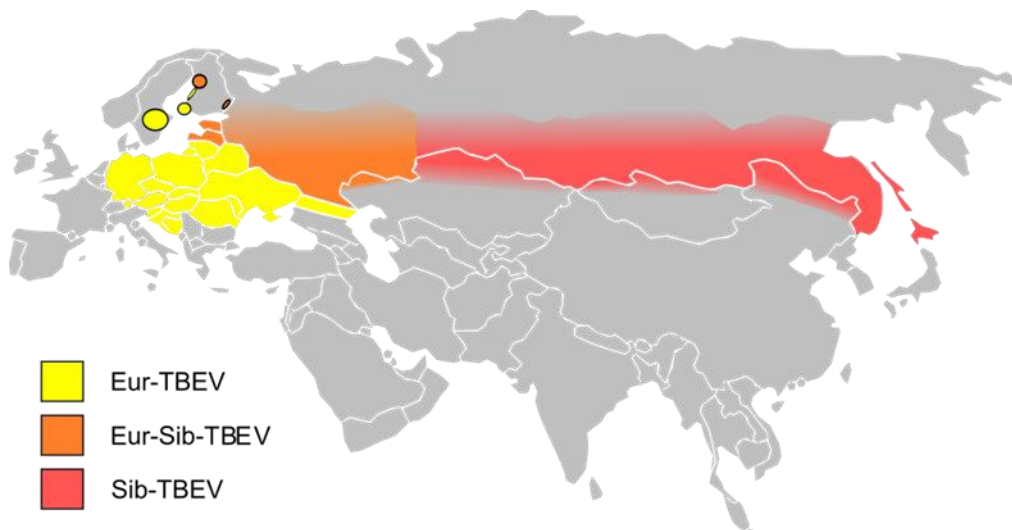
kao i na sljedeće generacije (5). Bolest se na čovjeka najčešće prenosi ugrizom krpelja, ali i enteralnim unosom nepasteriziranog mlijeka ili mliječnih proizvoda zaraženih životinja, krava i koza (slika 1) (4, 5).



Slika 1. Prirodni ciklus virusa krpeljnog encefalitisa

Izvor: Lickova M, Havlikova SF, Skavikova M, Klempa B. Routes of TBEV transmission within the life cycle of ixodid ticks. [slika s interneta]. 30.12.2021. [1.2.2024.] Dostupno na <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/1/56>

Krpeljni se encefalitis pojavljuje endemski na područjima rasprostranjenosti krpelja vrste *I. ricinus* u zapadnoj i srednjoj Europi te na područjima rasprostranjenosti vrste *I. persulcatus* u europskom dijelu Rusije i na Dalekom istoku (slika 2). Podtipovi se razlikuju i po patogenosti te kliničkoj slici infekcije u ljudi. Sojevi dalekoistočnog podtipa zahvaćaju moždano deblo i gornje dijelove kralježnične moždine uzrokujući mlohavu paralizu gornjih ekstremiteta zbog oštećenja donjih motoričkih neurona. Sibirski sojevi virusa također uzrokuju teške te nerijetko i kronične infekcije, no s nešto nižom smrtnošću. Europski sojevi virusa slabije su virulentni, a infekcije su blaže s niskom smrtnošću (3).



Slika 2. Geografska rasprostranjenost virusa krpeljnog encefalitisa

Izvor: Wikipedia, dostupno na: https://en.wikipedia.org/wiki/Tick-borne_encephalitis#/media/File:EurAsia_TBE-belt.svg

KMEV pokazuje sezonsku pojavnost, ovisno o aktivnosti krpelja tijekom godine te se infekcije bilježe od travnja do listopada. Najčešće obolijevaju osobe koje žive u prirodi, izletnici te seosko stanovništvo u dobi od 15 do 59 godina (3, 6).

Infekcija uglavnom prolazi asimptomatski dok rjeđe nastaje infekcija SŽS-a. Klinički su oblici KMEV abortivni (tzv. „febrilna glavobolja“), meningealni, encefalitički i encefalomijelitični. Bolest u većini slučajeva ima akutni tijek, ali može imati i subakutni tijek. Infekcija uzrokovana europskim podtipom KMEV u više od polovice oboljelih ima bifazičan tijek: prva faza ima simptome slične influenci u trajanju od sedam dana nakog čega nastupa remisija od tri do 10 dana. Prvu fazu karakterizira febrilitet uz klonulost te opći alglički sindrom. Druga faza ima nagli početak uz simptome meningitisa ili encefalitisa. Bolest je blaža u djece te poprima teži oblik u starijoj dobi uz veći rizik od trajnih posljedica. Smrtnost je 1-2%, a približno 20% oboljelih ima posljedice u obliku blagih neuropsihijatrijskih simptoma. Paraliza se rijetko pojavljuje kao komplikacija širenja bolesti na kralježničnu moždinu i živce. Infekcija dalekoistočnim sojevima obično ima monofazičan tijek uz visoku smrtnost (20%) i trajne neurološke posljedice u 30-60% preživjelih (3, 4).

Dijagnoza KMEV postavlja se na temelju kliničke slike i epidemioloških podataka, a potvrđuje se najčešće serološkim pretragama krvi i cerebrospinalnog likvora (CSL). Serološkim pretragama dokazuju se IgM i IgG protutijela. Molekularnim

se metodama (lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije; RT-PCR) može dokazati virusna RNA u krvi i CSL-u. Liječenje je simptomatsko (4).

Opće mjere prevencije KMEV uključuju izbjegavanje kontakta s grmljem pri boravku u prirodi u endemskim žarištima, zaštitu od direktnog kontakta s krpeljima nošenjem odjeće s dugim rukavima i nogavicama, uporabou repelenata te temeljit pregled tijela poslije boravka u prirodi zbog ranog uočavanja i uklanjanja krpelja. Uzevši u obzir mogućnost prijenosa KMEV putem mlijeka i mliječnih proizvoda, od preventivnih mjera valja naglasiti i pasterizaciju mlijeka radi inaktivacije virusa. Specifična metoda prevencije od KMEV jest aktivna imunizacija cjepivom. Cijepljenje u tri doze se preporučuje osobama koje su izložene krpeljima radi profesije ili rekreacije u endemskim žarištima (3, 5).

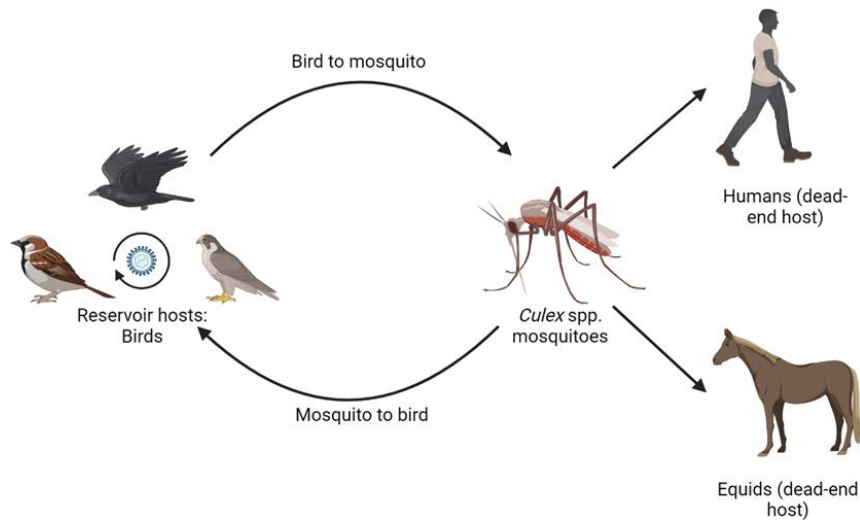
1.2. Virus Zapadnog Nila

VZN pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Orthoflavivirus*, serokompleksu japanskog encefalitisa. Do sada je opisano osam genskih linija, od kojih humane infekcije najčešće uzrokuju linije 1 i 2 (7).

Primarni rezervoar i domaćin virusa u prirodi su različite vrste ptica, a vektori komarci rodova *Culex*. Ptice mogu dulje vremena biti inficirane što pogoduje širenju virusa. Za razliku od ptica, druge životinje i ljudi imaju nisku razinu viremije pa postaju krajnji domaćini (slika 3). Gotovo jedini način prijenosa infekcije na sisavce i ljude jest ubodom zaraženog komarca. Komarac se zarazi nakon hranjenja krvlju inficirane ptice te se VZN umnožava i izlučuje iz žlijezda slinovnica. Moguć je i transovarijalni prijenos u komarcima. Prijenos s čovjeka na čovjeka je moguć putem transfuzije inficirane krvi, dojenjem te transplantacijom organa (6, 8).

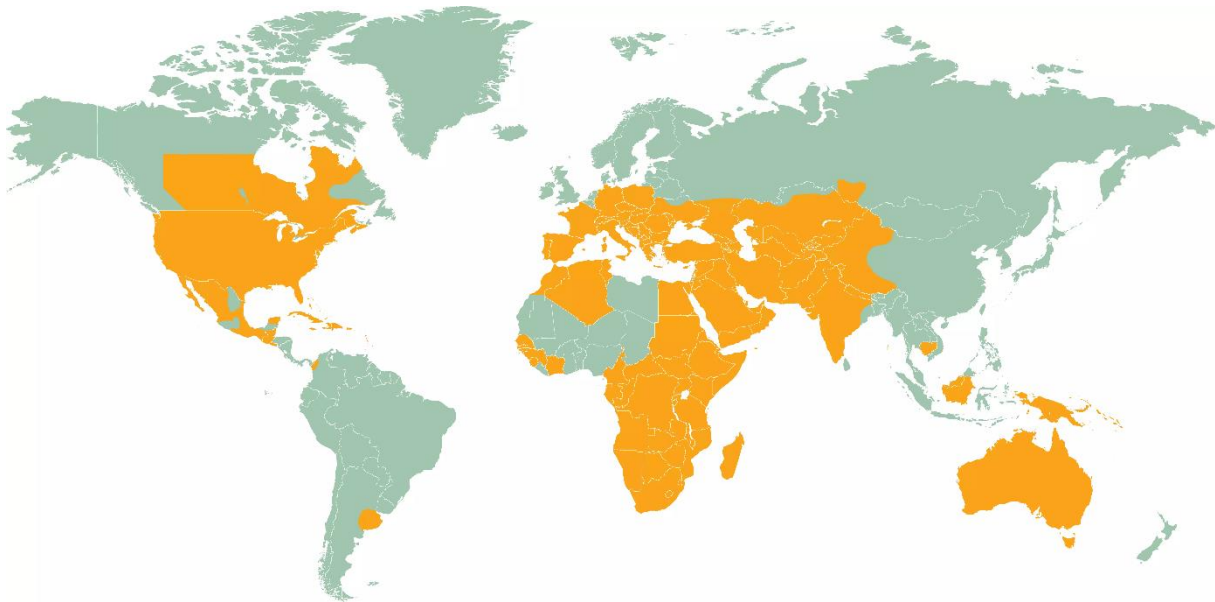
VZN se pojavljuje u zemljama Sredozemlja, na Bliskom istoku, Africi i u jugozapadnoj Aziji. U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) se pojavio 1999. godine u New Yorku te se proširio po čitavoj sjevernoj Americi. Velika epidemija registrirana je u SAD-u 2012. godine. Na području Europe neuroinvazivne infekcije su zabilježene su u brojnim državama, najviše u Italiji, Mađarskoj, Rumunjskoj i Grčkoj. Uz učestalu sezonsku pojavu bolesti, u novije vrijeme dolazi do endemizacije bolesti u svijetu,

uključujući Europu te je VZN danas jedan od najrasprostranjenijih arbovirusa (9, 10). Geografska rasprostranjenost VZN-a prikazana je na slici 4.



Slika 3. Prirodni ciklus virusa Zapadnog Nila

Izvor: JMM Profile: West Nile virus. Microbiology Society. Dostupno na: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001730>



Slika 4. Geografska rasprostranjenost virusa Zapadnog Nila

Izvor: Care plus: Tips and advice for safe travels. West Nile virus. Dostupno na: <https://www.careplus.eu/en/tips-and-advice-for-safe-travels/protection-from-tropical-diseases/west-nile-virus/>

Oko 80% VZN infekcija prolazi asimptomatski. Nespecifičnu febrilnu bolest (VZN groznica) razvija 20% oboljelih. VZN groznica je blagog tijeka i povoljne prognoze. Smrtnost je niska, a uzrok smrti može biti egzacerbacija predliježećih bolesti. Neuroinvazivni oblik bolesti razvija manje od 1% oboljelih. Rizični faktori za razvoj težih oblika bolesti su starija životna dob i imunosupresija. Od neuroinvazivnih oblika bolesti može se razviti meningitis, encefalitis i encefalomijelitis te se pojedini simptomi često preklapaju. VZN meningitis javlja se u oko 40% neuroinvazivnih oblika bolesti, češće u mlađoj dobnoj skupini. VZN encefalitis ima veći mortalitet te se najčešće javlja u starijoj životnoj dobi i kod imunosuprimiranih bolesnika. Vrlo često dulje od godinu dana nakon ozdravljenja zaostaju posljedice u obliku tremora ili ataksije. VZN mijelitis se očituje u obliku akutne mlohave kljenuti sličnoj infekciji virusom poliomijelitisa, a posljedica je virusne infekcije donjeg motornog neurona ili prednjih rogova kralježnične moždine. Kod ovog se oblika bolesti može javiti paraliza ošita i međurebrenih mišića koja zahtijeva mehaničku ventilaciju. Smrtnost VZN mijelitisa je više od 50%, a vrlo često je nakon uspješne uspostave samostalne respiracije godinama potrebna terapija kisikom (11, 12).

Dijagnostika VZN-a provodi se izravnim (izolacija, molekularna dijagnostika) i neinvazivnim metodama. Virus je moguće izolirati iz krvi, CSL-a te u postmortalno uzetim uzorcima tkiva. Za izolaciju su potrebni biosigurnosni uvjeti trećeg stupnja (BSL-3) pa se provodi uglavnom referentnim laboratorijima. U molekularnoj dijagnostici koriste se klasični RT-PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu (*real-time* RT-PCR). Dijagnostika VZN-a uglavnom se provodi serološki, detekcijom protutijela u serumu i CSL-u (7). Zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima pozitivan rezultat imunoenzimskog (EIA) testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testovima kao što je neutralizacijski test redukcije plakova (engl. *plaque-reduction neutralization test*; PRNT) i test neutralizacije virusa (VNT). U serološkoj se dijagnostici koristi i određivanje aviditeta IgG protutijela, osobito za razlikovanje akutne infekcije VZN-om u bolesnika s dugom perzistencijom IgM protutijela (13).

Budući da ne postoji zaštita cjepivom kod ljudi, valja istaknuti važnost nespecifičnih mjera prevencije. Preventivne mjere su kontrola populacije komaraca adulticidnim i larvicidnim dezinfekcijskim postupcima. Pri boravku u prirodi preporučuje se nanošenje repelenta, nošenje dugih rukava, nošenje dugih hlača i čarapa. Valja izbjegavati boravak u prirodi u zoru i sumrak, kada su komarci najaktivniji.

Također, preporučuje se ukloniti vodu iz mjesta gdje se ona može zadržavati duže od tjedan dana kao što su plastične boce, limenke i vaze za cvijeće (13).

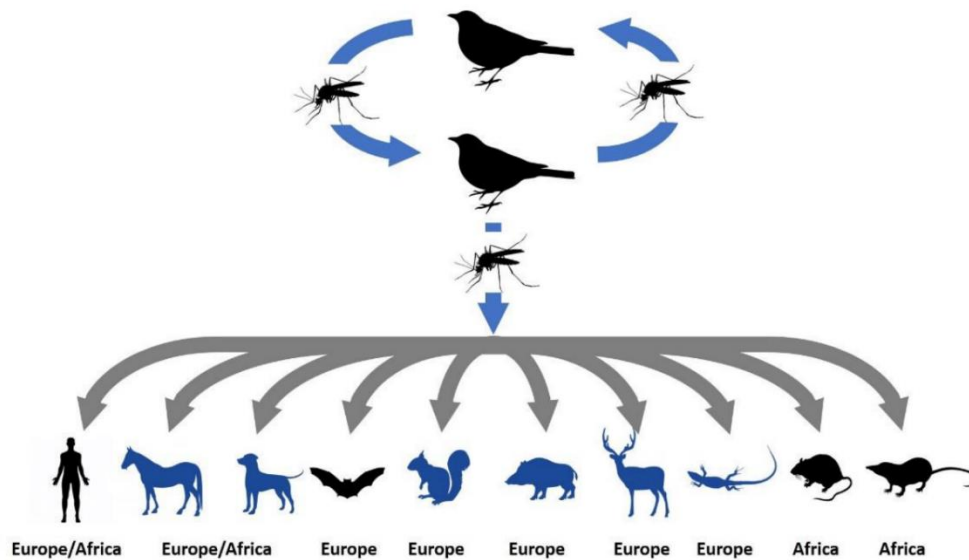
1.3. Usutu virus

USUV je maleni, ovijeni kuglasti virus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Orthoflavivirus*, serokompleksu japanskog encefalitisa. Do sada je opisano 8 genskih linija, tri afričke (Afrika 1-3) te pet europskih (Europa 1-5) (14).

USUV je prvi put izoliran iz komarca *Culex neavei*, 1959. godine u Južnoj Africi. Nakon toga virus je izoliran iz različitih vrsta komaraca i ptica u Ugandi, Nigeriji, Senegal, Obali Bjelokosti i Srednjoafričkoj Republici, no uginuća ptica nisu zabilježena. U ljudi je zabilježena infekcija USUV-om 1981. i 2004. godine na području Srednjoafričke Republike i Burkine Faso. USUV je opisan u Europi 2001. godine u ptica u Austriji, a zatim i u drugim europskim državama, međutim virus je kasnije potvrđen retrospektivno u arhiviranim tkiva uginulih ptica na području Toscanne iz 1996. godine što se smatra prvim nalazom na području Europe (15).

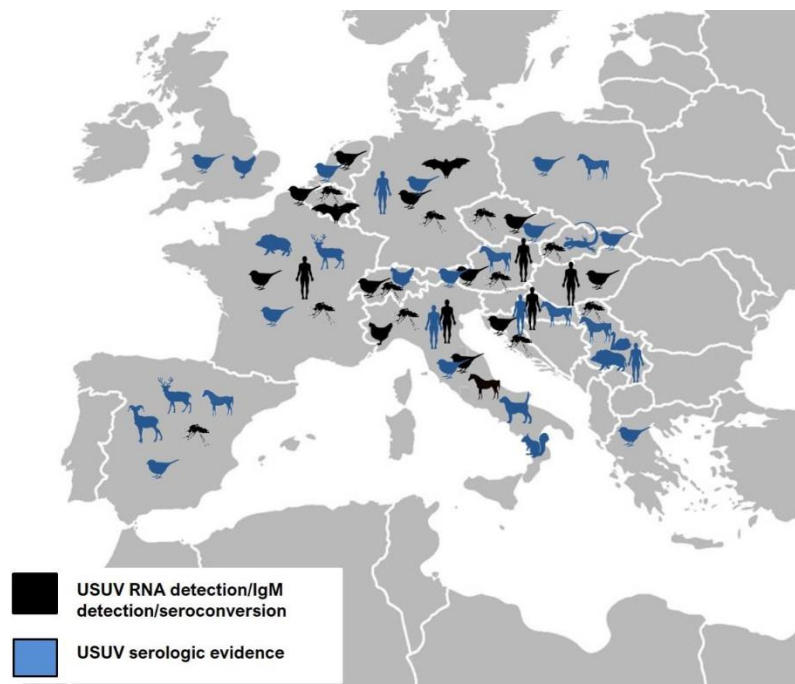
Prirodni ciklus USUV-a vrlo je sličan prirodnom ciklusu VZN-a. Rezervoari virusa su različite vrste divljih ptica, a vektori komarci (slika 5), uglavnom roda *Culex*, no virus je dokazan i u drugim vrstama komaraca. Zaražene ptice selice su svojim migracijama odgovorne za širenje virusa u nova područja. Endemsko održavanje USUV-a je omogućeno i prezimljavanjem virusa u zaraženim komarcjma te ponovnim uspostavljanjem prirodnog ciklusa između vektora i rezervoara na početku nove sezone (14, 15).

Smatra se da je USUV preko inficiranih ptica selica prenesen na područje Europe iz endemskih područja Afrike. U Europi se bolest uzrokovana USUV-om pojavljuje sezonski (od srpnja do listopada) što je vezano uz aktivnost vektora (14). rasprostranjenost USUV-a na području Europe prikazana je na slici 6.



Slika 5. Prirodni ciklus Usutu virusa

Izvor: Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, i sur.. *Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. Pathogens. 2020;9(9):699.*



Slika 6. Geografska rasprostranjenost Usutu virusa na području Europe

Izvor: Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, i sur.. *Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. Pathogens. 2020;9(9):699.*

Nedostatna je istraženost ovog virusa, te je do sada opisano nešto više od 100 infekcija USUV-om kod ljudi s kliničkim znakovima bolesti. Infekcija koju izaziva USUV većinom je asimptomatska, a nekada može doći do razvoja Usutu groznice, febrilne praćene osipom i glavoboljom. U imunokompromitiranih bolesnika može doći do razvoja encefalitisa i meningitisa (3, 16, 17).

USUV se uzgaja na staničnoj kulturi majmuskog bubrega (Vero) gdje nakon četiri dana dolazi do pojave citopatskog učinka. Virusna RNA dokazuje se RT-PCR metodom u serumu i CSL-u. Viremija u ljudi je kratkotrajna s niskim razinama virusa, stoga se dijagnoza u većini slučajeva potvrđuje serološkim metodama (EIA, imunofluorescentni test; IFA). Moguće su križne reakcije s drugim flavivirusa, radi čega je potrebno pozitivne rezultate EIA testa potvrditi neutralizacijskim testovima.

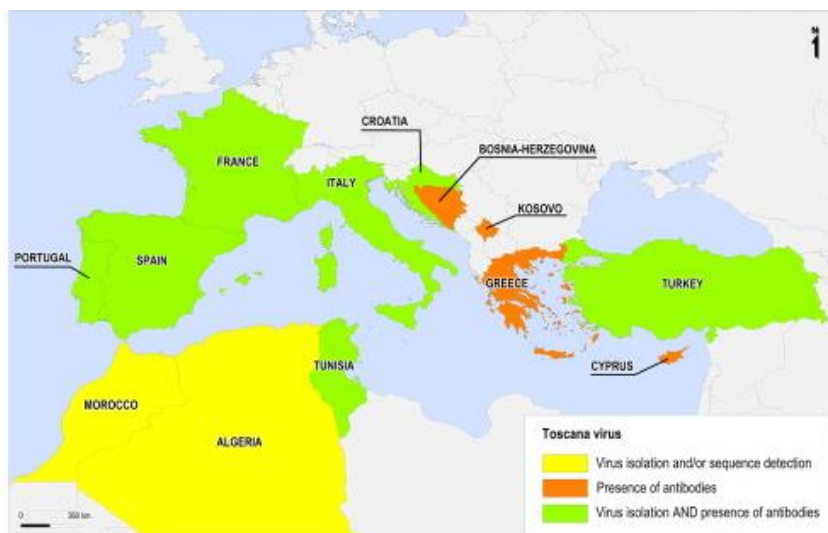
Ne postoji cjepivo protiv USUV-a pa su nespecifične mjere prevencije od velike važnosti, kao i u slučaju VZN-a (15).

1.4. Toscana virus

TOSV je arbovirus koji se prenosi flebotomima (nevidima). TOSV pripada porodici *Phenuiviridae*, rodu *Phlebovirus*, napuljskom serokompleksu papatači groznice. To je kuglasti virus, sadrži lipidnu ovojnicu i površinske glikoproteinske izdanke na kojima su smješteni hemaglutinin i antigene varijante koje potiču stvaranje neutralizacijskih protutijela. Genom virusa čini jednolančana negativna (-) RNA (18).

Rasprostranjenost TOSV povezana je s rasprostranjenošću flebotoma. Flebotomi su mali insekti aktivni noću. Ženke se hrane krvlju, a mužjaci biljnim sokovima. Virus se prijenosi tijekom hranjenja ženke nevida krvlju na životinje i ljude. Sezonska se aktivnost nevida javlja od travnja do listopada na prostorima umjerene klime, dok je u tropskim područjima virus aktivan tokom cijele godine (18, 19).

U mnogim su Europskim zemljama uz Sredozemno more zabilježene epidemije uzrokovane TOSV-om (slika 7). TOSV je zabilježen u Italiji, Francuskoj, Španjolskoj, Portugalu. Opisani su i slučajevi neuroivazivne TOSV infekcije u Hrvatskoj na području Dalmacije, a protutijela su dokazana u 53% stanovnika priobalja i 33,6% stanovnika dalmatinskih otoka (19).



Slika 7. Geografska rasprostranjenost Toscana virusa

Izvor: Charrel RN, Toscana Virus Infection. U: Ergönül Ö, Can F, Madoff L, Akova M (Ur.). *Emerging Infectious Diseases*, Academic Press, Elsevier Inc. 2014, str. 111-119.

TOSV je najpatogeniji flebovirus te u ljudi može biti uzročnik febrilne bolesti, ali ima tropizam i za SŽS pa može uzrokovati i neuroinvazivnu bolest (meningitis/encefalitis). Infekcije se uglavnom pojavljuju na prostorima gdje su lošiji životni uvjeti.

Dijagnostika TOSV-a uključuje izravne i neizravne metode. Izolacija virusa moguća je iz krvi, plazme i CSL-a. Virus stvara citopatološki učinak na staničnim kulturama majmuskog bubrega (Vero) i bubrega hrčka (BHK-21). Detekcija RNA u CSL-u moguća je svega 2-3 dana nakon pojave simptoma. Upravo zbog kratkotrajne i niske viremije serološka dijagnostika je "zlatni standard" u dijagnostici TOSV-a. Najčešće se izvodi EIA i IFA). IgM protutijela upućuju na akutnu infekciju, a razlikovanja IgG i IgM protutijela je moguće pomoću imunoblot testa (18).

2. HIPOTEZA

Neuroinvazivni arbovirusi uzročnici su neuroinvazivnih infekcija na području Hrvatske uz sezonsku pojavnost, vezano uz aktivnost vektora.

3. CILJ RADA

Prema podacima Referentnog centra Ministarstva zdravstva za epidemiologiju, u Hrvatskoj se godišnje prijavljuje oko 200 slučajeva neuroinvazivnih infekcija od kojih u 80-90% etiologija nije razjašnjena. To se posebno odnosi na emergentne neuroinvazivne arboviruse koji, osim KMEV i VZN-a nisu uključeni u rutinske dijagnostičke algoritme. Stoga njihova proširenost i klinički značaj u Hrvatskoj nisu dovoljno istraženi.

Cilj ovog rada je istražiti učestalost neuroinvazivnih arbovirusa (KMEV, VZN, USUV i TOSV) u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom oboljelih u sezoni prijenosa arbovirusnih infekcija te analizirati epidemiološke značajke arbovirusnih infekcija (raspodjela po dobi i spolu, sezonska pojavnost, geografska rasprostranjenost).

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 776 hospitaliziranih bolesnika s neuroinvazivnom infekcijem u dobi od 6 do 90 godina oboljelih u sezoni prijenosa arbovirusa (travanj-studenj) u razdoblju od 2017. do 2023. godine. Na virusnu etiologiju neuroinvazivne bolesti ukazivao je nalaz CSL-a (pleocitoza, predominacija mononukleara, povišene vrijednosti proteina, uredan nalaz glukoze). Ispitanici su bili s područja 19 od 21 hrvatskih županija (slika 8).



Slika 8. Geografska raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom

4.2. Metode

Bolesnicima su oduzeti uzorci likvora, urina i seruma. Uzorci likvora i urina testirani su na prisutnost KMEV, VZN, USUV i TOSV RNA. Uzorci seruma i likvora bolesnika testirani su na prisutnost KMEV, VZN, USUV i TOSV IgM i IgG protutijela.

Dijagnoza neuroinvazivne arbovirusne bolesti potvrđena prema kliničkim i laboratorijskim kriterijima Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti, ECDC (20) na temelju:

- a) dokaza virusne RNA u krvi/CSL/urinu
- b) dokaza specifičnih IgM protutijela u CSL
- c) i/ili dokaza IgM i IgG protutijela u serumu uz potvrdu pomoću VNT.

4.2.1. Molekularna dijagnostika

Izdvajanje RNA iz kliničkih uzoraka učinjeno je komercijalno dostupnim testom *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, Mannheim, Njemačka). Za RT-PCR korišten je komercijalno dostupan test *Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix* (Agilent Technologies, SAD), specifične početnice i dvostruko označene probe. Prisutnost virusnih genoma testirana je metodom RT-PCR u stvarnom vremenu protokolima: KMEV – prema Schwaiger i Casinotti, 2006. (21), VZN – prema Tang i sur., 2006. (22), USUV – prema Nikolay i sur., 2014. (23) te TOSV – prema Weidmann i sur., 2008. (24).

4.2.2. Serološka dijagnostika

Specifična IgG i IgM protutijela određena su pomoću komercijalnih dijagnostičkih EIA i IFA testova (Euroimmun, Lübeck, Njemačka) te *in-house* VNT-a (za uzorke s dokazanim križno-reaktivnim protutijelima).

EIA – KMEV, VZN, USUV IgM/IgG

Sadržaj testa:

1. Mikrotitarska pločica presvučena s antigenom (12 stripova s 8 udubina)
2. Kalibrator (IgG/IgM, humani)
3. Pozitivni kontrolni serum (IgG/IgM, humani)
4. Negativni kontrolni serum (IgG/IgM, humani)
5. Konjugat (antihumani IgG/IgM - kozji, obilježen peroksidazom)
6. Pufer za razrijeđivanje seruma - za dokaz IgM sadrži IgG/RF apsorbens (antihumani IgG)
7. Pufer za ispiranje

8. Otopina kromogen-susprata (TMB/H₂O₂)

9. Otopina za zaustavljanje reakcije (stop otopina - 0,5 M sumporna kiselina)

Izvođenje testa:

Određivanje IgM/IgG protutijela: Ispitivani serum razrijeđuje se 1:101 (10 µl seruma + 1,0 ml pufera za razrijeđivanje) te se inkubira 10 min na sobnoj temperaturi.

1. Stavi se 100 µl kalibratora, pozitivne i negativne kontrole te ispitivanog seruma u odgovarajuće udubine mikrotitarske pločice (prema protokolu; IgM stupci 1-4, IgG stupci 7-10) te se inkubira 30 min na sobnoj temperaturi.

Protokol za izvođenje ELISA testa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	S6	S14	S22			C1	S4	S12	S20		
B	Poz.	S7	S15	S23			C2	S5	S13	S21		
C	Neg.	S8	S16	S24			C3	S6	S14	S22		
D	S1	S9	S17				Poz.	S7	S15	S23		
E	S2	S10	S18				Neg.	S8	S16	S24		
F	S3	S11	S19				S1	S9	S17			
G	S4	S12	S20				S2	S10	S18			
H	S5	S13	S21				S3	S11	S19			

2. Pločica se ispere 3x s 300 µl pufera za ispiranje.

3. U svaku udubinu stavi se 100 µl konjugata (antihumani IgG/IgM obilježen peroksidazom) te se inkubira 30 min na sobnoj temperaturi.

4. Pločica se ispere 3x s 300 µl pufera za ispiranje.

5. U svaku udubinu stavi se 100 µl kromogen supstrata te se inkubira 15 min na sobnoj temperaturi (zaštićeno od danjeg svjetla).

6. U svaku udubinu stavi se 100 µl stop otopine.

Očitavanje apsorpcijske vrijednosti (*Optical Density*; OD) se vrši spektrofotometrijski pri 450/620 nm unutar 30 min od dodavanja stop otopine.

Izračunavanje rezultata:

OD kalibratora označava gornju granicu referentnog raspona neinficiranih osoba (*cut-off*).

IgM Omjer = $\frac{\text{OD ispitivanog seruma}}{\text{OD kalibratora}}$

IgG Očitava se s kalibracijske krivulje

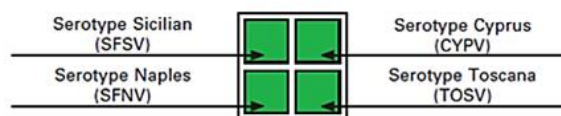
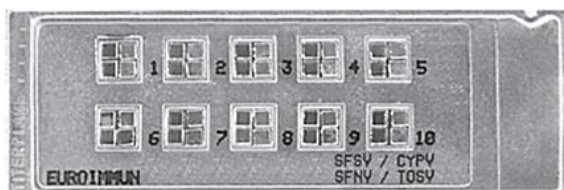
IgM Omjer	< 0,8	Negativan
	≥ 0,8 - < 1,1	Graničan
	≥ 1,1	Pozitivan

IgG RU/ml	< 16	Negativan
	16 - 22	Graničan
	> 22	Pozitivan

IFA – TOSV IgG/IgM (Sandfly fever Mosaic)

Sadržaj testa:

1. Stakalaca s BIOCHIPOVIMA presvučenim s antigenima (slika 9)
2. Konjugat (antihumani IgG/IgM - obilježen fluoresceinom; FITC)
3. Pozitivni kontrolni serum (IgM/IgG, humani)
4. Negativni kontrolni serum (IgM/IgG, humani)
5. Apsorbens (anti-humani IgG)
6. Pufer za razrijeđivanje seruma
7. Soli za fosfatni (PBS) pufer pH 7.2
8. Tween 20
9. Medij za fiksiranje
10. Pokrovna stakalca



Slika 9. Test za detekciju protutijela na viruse papatači groznice i Toscana virus

Izvor: Euroimmun, Lübeck, Njemačka. Dostupno na:
http://mail3.euroimmun.de/fileadmin/template/images/pdf/tropen_UK.pdf

Određivanje IgM protutijela: ispitivani serum se razrijeđuje 1:10 (11,1 μ l I + 100 μ l apsorbensa) te se inkubira s 15 min na sobnoj temperaturi i zatim razrijeđuje 1:100 u PBS-Tween.

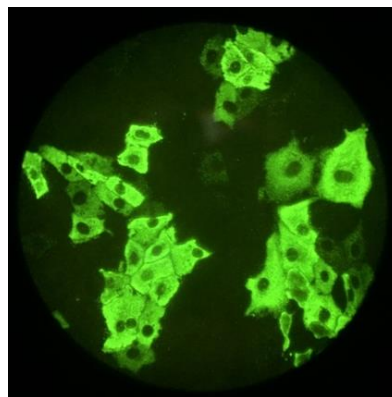
Određivanje IgG protutijela: ispitivani serum se razrijeđuje 1:100 u PBS-Tween (razrijeđenog 1:10 + 100 μ l PBS-Tween).

Izvođenje testa:

1. Stavi se 25 μ l razrijeđenog seruma u svako polje predmetnog stakalca.
2. Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi (18-25°C).
3. Stakalce se ispere 5 min u PBS-Tween.
4. Stavi se 20 μ l konjugata u svako polje.
5. Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi (18-25°C).
6. Ispere se 5 min u PBS-Tween.
7. Stavi se 10 μ l medija za fiksiranje po svakom polju. Stavi se pokrovnica te mikroskopira.

Očitavanje rezultata:

Pozitivna reakcija: prisutnost protutijela na TOSV uzrokuje fluorescenciju u citoplazmi inficiranih stanica. Intenzitet fluorescencije mora biti kao kod pozitivne kontrole (slika 10).



Slika 10. Test indirektna imunofluorescencije: pozitivna IgG protutijela na Toscana virus

Izvor: Odjel za virološku serologiju, Hrvatski zavod z javno zdravstvo

Kvalitativna evaluacija:

IgM/IgG reaktivnost	
Nema reakcije u razrijeđenju 1:100	Negativan
Pozitivna reakcija u razrijeđenju 1:100	Pozitivan; ranija ili akutna infekcija.

Kvantitativna evaluacija IgM/IgG:

Fluorescencija u razrijeđenju				
1:10	1:100	1:1000	1:10000	Titar protutijela
slabo pozitivan	negativan	negativan	negativan	1:10
umjereno pozitivan	negativan	negativan	negativan	1:32
jako pozitivan	slabo pozitivan	negativan	negativan	1:100
jako pozitivan	umjereno pozitivan	negativan	negativan	1:320
jako pozitivan	jako pozitivan	slabo pozitivan	negativan	1:1000
jako pozitivan	jako pozitivan	umjereno pozitivan	negativan	1:3200
jako pozitivan	jako pozitivan	jako pozitivan	slabo pozitivan	1:10000

Test neutralizacije virusa

Kao antigen za VNT je korišteni su virusi uzgojeni u Vero E6 staničnoj kulturi. Titar virusa (doza virusa koja inficira 50% inokuliranih staničnih kultura; TCID₅₀) je izračunat pomoću Reed and Muench formule.

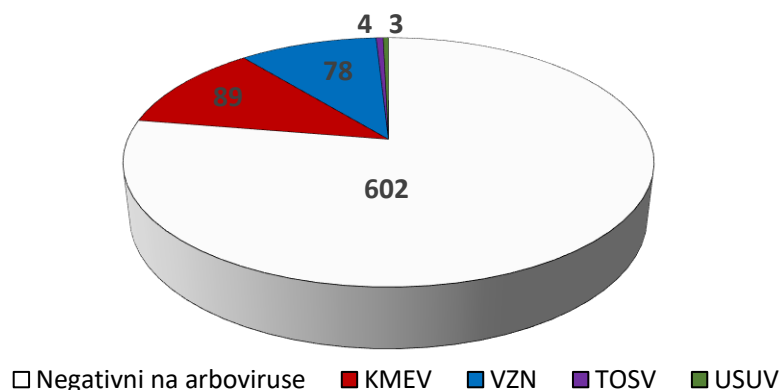
Izvođenje testa:

1. Uzorci seruma inaktiviraju se toplinom (30 min/56°C) te se naprave dvostruka serijska razrijeđenja počevši od 1:5.
2. Jednaka količina (25 µL) inaktiviranog razrijeđenog seruma i 100 TCID₅₀ virusa pomiješa se i inkubira tijekom jednog sata na temperaturi od 37°C s CO₂.
3. Dodaje se 50 µL 2x10⁵ Vero E6 stanica/mL u svaku udubinu
4. Pločica se inkubira na temperaturi od 37°C s CO₂ i počevši od trećeg dana, inokulirane stanice se jednom dnevno pregledavaju na pojavu CPU.

Titar neutralizacijskih protutijela u serumu ≥ 10 te titar protutijela u CSL-u ≥ 5 je smatran pozitivnim rezultatom.

5. REZULTATI

Neuroinvazivna arbovirusna infekcija dokazana je u 174/776 (22,4%) bolesnika, od čega su najčešći dokazani uzročnici bili KMEV (11,5%) i VZN (10,1%) (slika 11).



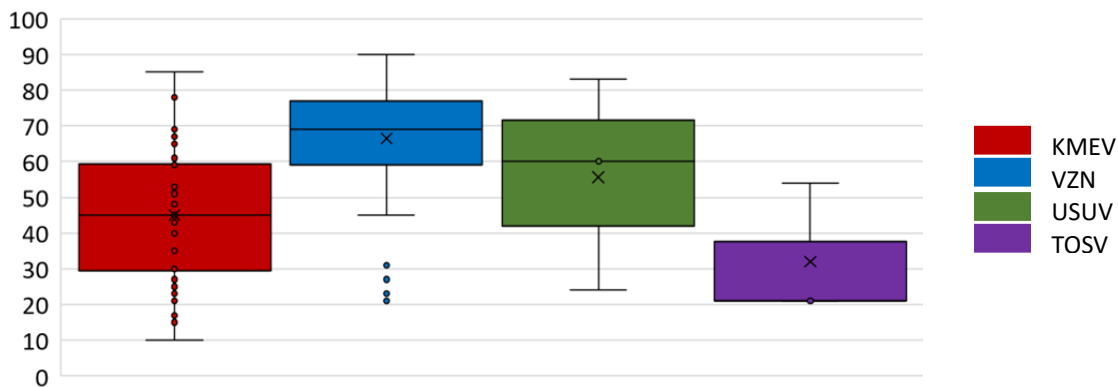
Slika 11. Učestalost detekcije arbovirusa (N) u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom

U ukupnom broju dokazanih arbovirusa (N=174), najčešći je bio KMEV u 89 (51,1%) bolesnika, a zatim VZN u 78 (44,9%) bolesnika. Sporadično su zabilježene i infekcije uzrokovane TOSV (4; 2,3%) te USUV (3; 1,7%) (tablica 1).

Tablica 1. Neuroinvazivni arbovirusi dokazani na području Hrvatske (N=174)

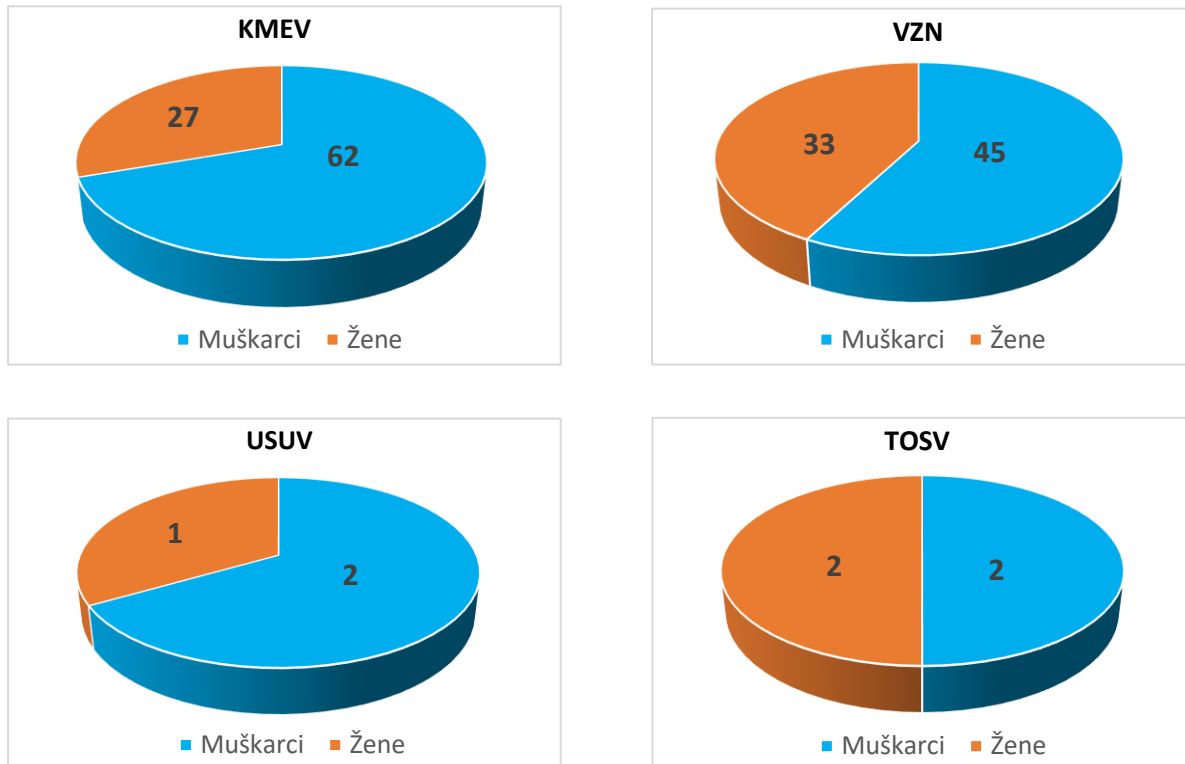
Virus	N (%) dokazanih infekcija
Virus krpeljnog encefalitisa	89 (51,1%)
Virus Zapadnog Nila	78 (44,9%)
Usutu virus	3 (1,7%)
Toscana virus	4 (2,3%)

Analizom dobi oboljelih osoba, najstariji su bili bolesnici s VZN infekcijom (medijan 69 godina, interkvartilni raspon; IQR=59-77), zatim USUV infekcijom (medijan 60 godina, IQR=42-71). Bolesnici s KMEV bili su srednje životne dobi (medijan 45 godina, IQR=25-59), dok su oboljeli od TOSV bili pretežito mlađe životne dobi (medijan 21 godina, IQR=21-37) (slika 12).



Slika 12. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom po dobi (godine; medijan/IQR)

Slika 13 prikazuje raspodjelu bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom po spolu. Približno dvije trećine bolesnika oboljelih od KMEV-a (62/89; 69,6%) su bili muškog spola. U skupini bolesnika oboljelih od VZN-a bilo je 45 (57,6%) muškaraca te 33 (42,4%) žena. Infekcije USUV-om su dokazane u dva muškarca i jedne žene dok je TOSV dokazan u dva muškarca i dvije žene.

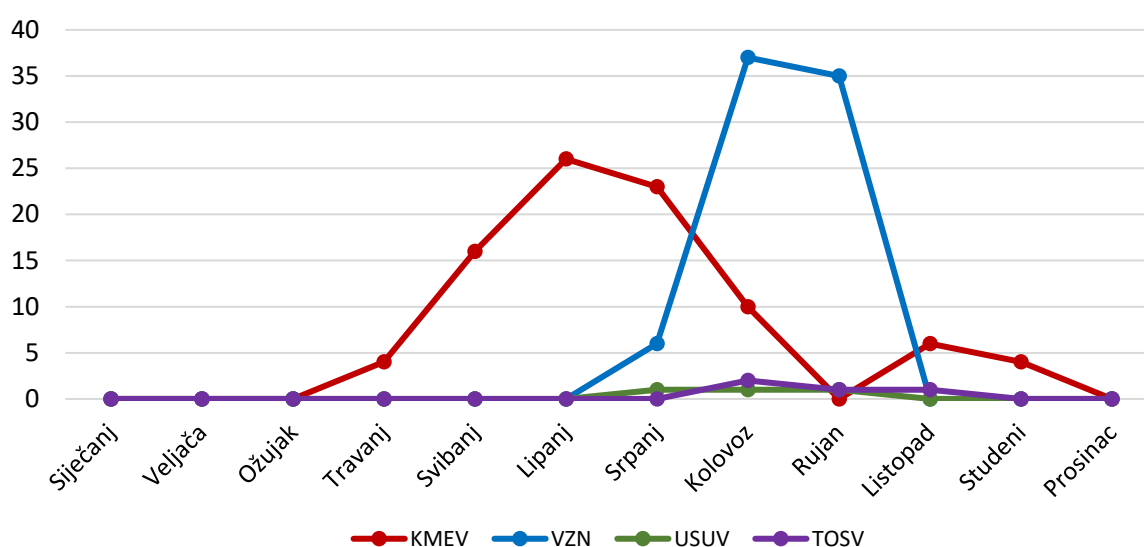


Slika 13. Raspodjela bolesnika (N) s neuroinvazivnom infekcijom po spolu

Sezonska raspodjela neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija prikazana je na slici 14. Uočena je karakteristična sezonska pojavnost, vezana uz aktivnost vektora.

Infekcije KMEV-om zabilježene su u razdoblju od travnja do kraja studenog. Uočena su dva vrška, veći proljetno-ljetni (travanj-kolovoz) te manji jesenski (listopad-studeni). Najveći broj infekcija zabilježen (49; 55,1%) je u lipnju i srpnju.

Infekcije VZN-om pojavljivale su se u razdoblju od srpnja do rujna s najvećim brojem zaraženih u kolovozu (37; 47,4%) i rujnu (35; 44,8%). USUV prisutan je u periodu od srpnja do kraja rujna, a TOSV od kolovoza do kraja listopada.

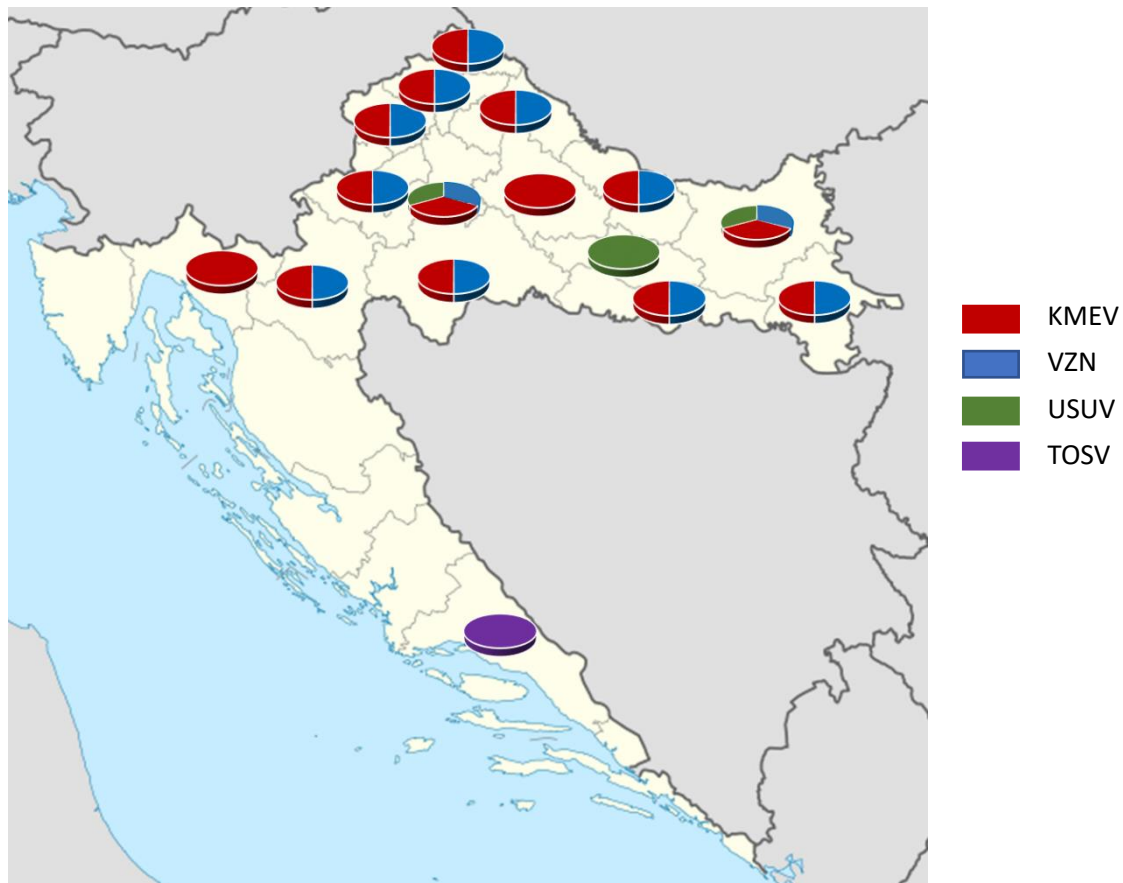


Slika 14. Sezonska raspodjela neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija (N oboljelih)

Geografska raspodjela najčešćih arbovirusnih uzročnika neuroinvazivnih bolesti je prikazana na slici 15.

Tijekom ispitivanog razdoblja, KMEV se pojavljivao u svim kontinentalnim županijama s izuzetkom Požeško-slavonske županije. Bolesnici s infekcijom uzrokovanom VZN-om su bili s područja 12 kontinentalnih županija: Karlovačke, Zagrebačke, Krapinsko-zagorske, Varaždinske, Međimurske, Sisačko-moslavačke, Koprivničko-križevačke, Virovitičko-podravske, Vukovarsko-srijemske, Brodsko-posavske, Osječko-baranjske te Grada Zagreba.

USUV je dokazan u Zagrebačkoj, Osječko-baranjskoj i Požeško-slavonskoj županiji. Svi oboljeli od infekcije TOSV-om bili su iz Splitsko-Dalmatinske županije ili su boravili na tom području.



Slika 15. Geografska raspodjela neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija

6. RASPRAVA

U razdoblju od 2017. do 2023. godine, na području Hrvatske, neuroinvazivna arbovirusna infekcija dokazana je u 174 hospitalizirana bolesnika. U ukupnom broju dokazanih infekcija najučestaliji su bili KMEV (51,1%) i VZN (44,9%) uz sporadični dokaz TOSV (2,3%) i USUV (1,7%).

KMEV je dokazan u 89 bolesnika, pretežito osoba muškog spola (69,5%, omjer muškaraca naspram žena 2,3:1) srednje životne dobi (medijan 45 godina). Slična je raspodjela po spolu i dobi uočena i u velikom istraživanju provedenom u 19 zemalja Europske Unije/Europske ekonomske zajednice u razdoblju od 2012. do 2020. godine koje je obuhvatilo 24,974 bolesnika s dijagnozom KME. U europskim je zemljama također dominirao muški spol (59,5%), dok je prosječna dob oboljelih iznosila 49 godina (25). Viša učestalost KME u muškaraca može se objasniti profesionalnom izloženošću krpeljima/virusu, kao što su npr. šumari i lovci.

U Hrvatskoj je uočena sezonska pojavnost KMEV s dva vrška, većim proljetno-ljetnim (travanj-kolovoz) i manjim jesenskim vrškom (listopad-studenj). Bimodalna pojavnost KMEV uočena je i u većem dijelu europskih država. Iako je prijenos KME dokazan tijekom cijele godine, većina bolesnika (98,8%) oboljela je u razdoblju od travnja do studenog. U usporedbi s rezultatima ovog rada, prvi je vršak zabilježen u prvom tjednu srpnja (mjesec dana kasnije), dok je drugi manji bio krajem rujna (mjesec dana ranije). Sezonska se pojavnost razlikovala ovisno o geografskom području pa je glavni epidemijski vršak u hladnijim sjevernim zemljama uočen nešto kasnije u srpnju i kolovozu u usporedbi sa zemljama srednje i južne Europe gdje je bio u lipnju i srpnju (25). Neke zemlje centralne Europe, primjerice Njemačka i Poljska, uglavnom imaju samo jedan godišnji maksimum pojave KME u ljetnim mjesecima (srpanj-kolovoz) (26).

Analizirajući geografsku distribuciju KME u Hrvatskoj, potvrđena je kontinuirana aktivna cirkulacija virusa u ranije dokazanim prirodnim žarištima kontinentalnih županija (27), gdje su infekcije zabilježene u svim županijama osim Požeško-slavonske.

U ovom su istraživanju VZN infekcije dokazane u 78 bolesnika, također češće u muškaraca (57,6%) u odnosu na žene (42,4%), no je taj omjer bio manji (1,3:1) u odnosu na KME. Oboljeli od VZN-a bili su stariji od bolesnika s KME s medijanom dobi 69 godina. Osobe starije životne dobi kao i bolesnici s predliježećim bolestima

prepoznate su rizične skupine za VZN infekciju u brojnim istraživanjima (28). Medijan dobi bolesnika s VZN infekcijom u europskim državama je bio isti kao i kod naših bolesnika (69 godina). Omjer muškaraca također je bio veći u odnosu na žene u većini zemalja prosječno iznosio 1,5:1, s rasponom od 1,3 u 2010. i 2012. godini do 2,7 u 2015. godini (29). Promjene u urođenom i stečenom imunitetu povezane sa starenjem vjerojatan su razlog povećane osjetljivosti na VZN infekciju i teže kliničke slike dokazane kod starijih osoba (30).

Područja s dokazanim VZN infekcijama u razdoblju od 2017. do 2023. godine bila su ista kao i u razdoblju do 2017. godine (31, 32), dok su humane infekcije prvi put prijavljene u Karlovačkoj, Koprivničko-križevačkoj i Virovitičko-podravskoj županiji.

USUV je još uvijek neprepoznat i zanemaren uzročnik neuroinvazivnih infekcija, s tek nešto više od 100 opisanih humanih infekcija na području Europe (33-35). U razdoblju od 2017. do 2023. godine, neuroinvazivna USUV infekcija dokazana je u tri bolesnika s područja kontinentalne Hrvatske. Do sada je u Hrvatskoj uz spomenuta tri bolesnika, USUV infekcija dokazana i tijekom epidemije VZN infekcije 2013. godine u tri oboljele osobe iz sjeverozapadnih županija što je ujedno bio i prvi dokaz kliničkih slučajeva humane neuroinvazivne USUV infekcije u našoj zemlji (17, 31).

Iako seroepidemiološke studije ukazuju na proširenost TOSV u priobalju (36), humane klinički simptomatske infekcije su zabilježene rijetko na području Dalmacije (37). U ovom je istraživanju neuroinvazivna TOSV infekcija dokazana u četiri bolesnika. Analizirajući dob oboljelih osoba, zanimljiv je podatak da se pretežito radilo o vrlo mladim osobama (medijan dobi 21 godina), što je neuobičajeno za neuroinvazivni oblik ove bolesti. Istraživanja provedena u europskim državama pokazala su pojavnost TOSV u svim dobnim skupinama, dok je medijan dobi oboljelih osoba iznosio 45 godina (38). U endemskim je područjima Italije uočena slična je dobna raspodjela neuroinvazivnih TOSV infekcija, gdje je 38,5% oboljelih bilo mlađe od 40 godina, 36,3% u dobi 40-59 godina te 25,3% u dobi iznad 60 godina (39).

Bolesnici s TOSV obuhvaćeni ovim istraživanjem oboljeli su u kasno ljeto i ranu jesen (kolovoz-listopad). U Europi sezonska pojavnost TOSV varira od travnja do studenog, dok je vrhunac epidemije uočen tijekom najtoplijih ljetnih mjeseci (srpanj-rujan) (38).

Sve oboljele osobe od TOSV infekcije bile su stanovnici ili su boravile na području Splitsko-dalmatinske županije. Ovakva se geografska distribucija podudara s rezultatima ranijih istraživanja (37).

Prisutnost dokazanih arbovirusa na području Hrvatske u više od 20% bolesnika hospitaliziranih s kliničkom slikom infekcije SŽS-a potvrđuje njihov značaj u etiologiji neuroinvazivnih bolesti. Stoga je pravovremena dijagnostika od izuzetne važnosti budući da se sezonska pojavnost i klinička slika arbovirusnih infekcija preklapa s drugim uzročnicima meningitisa/encefalitisa kao što su enterovirusi, virusi herpes simplex, varicella-zoster virus, *Listeria monocytogenes* i dr. od kojih je za neke dostupna terapija. Zbog toga u dijagnostičku obradu bolesnika s aseptičkim meningitisom koji su oboljeli tijekom sezone prijenosa arbovirusa, uz re-emergentne viruse (KMEV, WNV) treba uključiti i zanemarene neuroinvazivne arboviruse kao što su USUV i TOSV (40).

7. ZAKLJUČCI

1. Neuroinvazivna arbovirusna infekcija dokazana je u 174 (22,4%) hospitaliziranih bolesnika.
2. Od ukupno dokazanih arbovirusa, najčešće dokazani bio je KMEV (51,1%), zatim VZN (44,9%). Sporadično su dokazani i TOSV (2,3%) te USUV (1,7%).
3. Analizom dobi oboljelih osoba, najstariji su bili bolesnici s VZN (medijan 69 godina), zatim USV (medijan 60 godina), KMEV (medijan 49 godina) i TOSV (medijan 21 godina).
4. Oboljeli od KME bili su pretežito muškog spola (69,5%, omjer muškaraca naspram žena 2,3:1), za razliku od VZN infekcije (57,6% muškaraca i 42,4% žena, omjer muškaraca naspram žena 1,3:1).
4. Uočena je sezonska pojavnost arbovirusa od travnja do studenog. KMEV je imao dva vrška, veći od travnja do kolovoza te manji u listopadu i studenom. Najveći broj VZN infekcija uočen je u kolovozu i rujnu.
5. KMEV, VZN i USUV dokazani su na području kontinentalnih županija, a TOSV u priobalju.

8. ZAHVALE

Najviše bih se željela zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Tatjani Vilibić Čavlek na podršci, savjetima i razumijevanju te za stručnu i velikodušnu pomoć tijekom pisanja ovog diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na ljubavi, strpljenju i podršci tokom mojeg odrastanja i studiranja.

Na kraju, voljela bih se zahvaliti svim svojim prijateljima koji su tu bili za mene u teškim trenucima.

9. LITERATURA

1. Ghai R, Barton Behravesh C. CDC Yellow Book 2024. Zoonoses - The One Health Approach. Dostupno na: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2024/environmental-hazards-risks/zoonoses-one-health-approach-#diseases>
2. Vilibić-Čavlek T, Savić V, Židovec-Lepej S, Bogdanić M, Stevanović V, Barbić Lj. Emerging and neglected viral zoonoses in Europe. U: Rodriguez-Morales AJ. (ur). Current Topics in Zoonoses. IntechOpen: London, United Kingdom, 2023. DOI: 10.5772/intechopen.112779.
3. Punda-Polić V, Vilibić Čavlek T. Flavivirusi. U: Kalenić S, ur. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada, 2019, str. 501-507.
4. Baršić B, Markotić A, Kurolt IC, Begovac J, Lukić L. Flavivirusi: Krpeljni meningoencefalitis, virus zapadnog Nila, dengue, žuta groznica. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 552-553.
5. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Pandak N, Pem-Novosel I, Stevanović V, Kaić B, i sur. Virus krpeljnog encefalitisa: Epidemiološka i klinička slika, dijagnostika i prevencija. Acta med Croatica 2014; 68:393-404.
6. Worku DA. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology. J Clin Med. 2023; 12(21):6859.
7. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Ljubin-Sternak S, Pem-Novosel I, Stevanović V, Gjenero-Margan I, i sur. Infekcija Virusom Zapadnog Nila: re-emergentna bolest u Hrvatskoj. Liječ Vjesn 2013; 135:156-161.
8. Soto RA, McDonald E, Annambhotla P, Velez JO, Laven J, Panella AJ, i sur. West Nile Virus Transmission by Solid Organ Transplantation and Considerations for Organ Donor Screening Practices, United States. Emerg Infect Dis. 2022; 28(2):403-406.
9. Simonin Y. Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges. Viruses 2024; 16(4):599.
10. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Petrovic T, Toplak I, Barbic Lj, Petric D, i sur. Emerging trends in the epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Southern Europe. Front Vet Sci 2019; 6:437. doi: 10.3389/fvets.2019.00437

11. Sejvar JJ. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses* 2014; 6:606-623.
12. Santini M, Haberle S, Židovec-Lepej S, Savić V, Kusulja M, Papić N, i sur. Severe West Nile Virus Neuroinvasive Disease: Clinical Characteristics, Short and Long-term Outcomes. *Pathogens* 2022; 11:52.
13. Vilibic-Cavlek T, Kristofic B, Savic V, Kolaric B, Barbic Lj, Tabain I, i sur. Diagnostic significance of IgG avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018; 51(5):591-595.
14. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic Lj, Tabain I, Stevanovic V, i sur. Epidemiology of Usutu virus: the European scenario. *Pathogens* 2020; 9(9):E699.
15. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Stevanović V, Mlinarić-Galinović G. Usutu virus: novi flavivirus u Hrvatskoj. *Liječ Vjesn* 2015; 137: 46-51.
16. Cadar D, Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses* 2022; 15(1):77.
17. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic Lj, Savic V, Stevanovic V, i sur. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August-September 2013: clinical and laboratory features. *J Neurovirol* 2015; 21(1):92-97.
18. Šalamun M. Prevalencija infekcija uzrokovanih flebovirusima na području Hrvatske 2017. i 2018. godine [diplomski rad na internetu]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet 2017. Dostupno na: <https://repositorij.mef.unizg.hr/islandora/object/mef:2426>.
19. Punda-Polić V, Vilibić Čavlek T. Bunyavirusi. U: Kalenić S, ur. *Medicinska mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 2019, str. 508-513.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. EU Case Definitions. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics/eu-case-definitions>
21. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 2003; 27:136-45.
22. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol* 2006; 36:177-82.

23. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M i sur. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J Virol Methods* 2014; 197:51-4.
24. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lô MM i sur. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol* 2008; 41:138-42.
25. Heuverswyn JV, Hallmaier-Wacker LK, Beauté J, Gomes Dias J, Haussig JM, Busch K i sur. Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020. *Euro Surveill* 2023; 28:2200543.
26. Grygorczuk S, Mierzynska D, Zdrodowska A, Zajkowska J, Pancewicz S, Kondrusik M i sur. Tick-borne encephalitis in north-eastern Poland in 1997-2001: a retrospective study. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:904-9.
27. Vilibic-Cavlek T, Krcmar S, Bogdanic M, Tomljenovic M, Barbic L, Roncevic D, i sur. An Overview of Tick-Borne Encephalitis Epidemiology in Endemic Regions of Continental Croatia, 2017-2023. *Microorganisms* 2024; 12(2):386.
28. McDonald E, Mathis S, Martin SW, Staples JE, Fischer M, Lindsey NP. Surveillance for West Nile Virus Disease-United States, 2009-2018. *MMWR Surveill Summ.* 2021; 70(No. SS-1):1-15.
29. Young JJ, Haussig JM, Aberle SW, Pervanidou D, Riccardo F, Sekulić N, i sur. Epidemiology of human West Nile virus infections in the European Union and European Union enlargement countries, 2010 to 2018. *Euro Surveill* 2021; 26: 2001095.
30. Yao Y, Montgomery RR. Role of Immune Aging in Susceptibility to West Nile Virus. *Methods Mol Biol* 2016; 1435:235-247.
31. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, Pem-Novosel I, Slavic-Vrzic V, Lesnikar V, i sur. First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection* 2014; 42(4):689-695.
32. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Klobucar A, Ferenc T, Ilic M, Bogdanic M, i sur. Emerging Trends in the West Nile Virus Epidemiology in Croatia in the 'One Health' Context, 2011-2020. *Trop Med Infect Dis* 2021; 6(3):140.

33. Pecorari M, Longo G, Grottola A, Sabattini A, Tagliazucchi S, Savini G i sur. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:19446.
34. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P i sur. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September, 2009. *Euro Surveill* 2009; 14:19448.
35. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, De Rui ME, Franchin E, Pagni S i sur. Clinical and virological findings with patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. *Euro Surveill* 2019; 24(47):1900180.
36. Punda-Polić V, Jerončić A, Mohar B, Šiško-Kraljević K. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:200-3.
37. Punda-Polic V, Mohar B, Duh D, Bradaric N, Korva M, Fajs L i sur. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J Clin Virol* 2012; 55:4-7.
38. ECDC. Toscana virus infection. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/toscana-virus-infection>, pristupljeno 20.4.2023.
39. Riccò M, Peruzzi S. Epidemiology of Toscana Virus in Italy (2018-2020), a summary of available evidences. *Acta Biomed* 2021; 92:e2021230.
40. Vilibic-Cavlek T, Janev-Holcer N, Bogdanic M, Ferenc T, Vujica Ferenc M, Krcmar S, i sur. Current Status of Vector-Borne Diseases in Croatia: Challenges and Future Prospects. *Life* 2023; 13(9):1856.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19. rujna 1999. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje sam stekla u Velikoj Gorici. Pohađala sam Umjetničku školu Franje Lučića, odjel za klavir u Velikoj Gorici. Maturirala sam 2018. godine u Matematičko-prirodoslovnoj gimnaziji Velika Gorica te sam iste godine upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Osijeku. 2019. godine sam upisala Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija pokazala sam interes za infektologiju te internu medicinu, posebice endokrinologiju. Aktivno govorim engleski jezik te posjedujem osnovno znanje njemačkog jezika.