

Učestalost detekcije protutijela na virus Tahyna u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom

Markelić, Domagoj

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:105:180153>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Domagoj Markelić

**Učestalost detekcije protutijela na virus Tahyna
u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za virologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Tatjane Vilibić Čavlek, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021./2022.

Istraživanje je financirala Hrvatska zaklada za znanost, projekt br. 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, dr. med).

POPIS KRATICA

RNA (engl. *ribonucleic acid*)

RNP (engl. *ribonucleoprotein complex*)

RT-qPCR (engl. *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*)

VNT (engl. *virus neutralization test*)

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

IgG (engl. *immunoglobulin G*)

IgM (engl. *immunoglobulin M*)

IFA (engl. *indirect immunofluorescence assay*)

Ribonukleinska kiselina

Ribonukleoproteinski kompleks

Lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije

Test neutralizacije virusa

Imunoenzimski test

Imunoglobulin G

Imunoglobulin M

Indirektni imunofluorescentni test

SADRŽAJ

SAŽETAK	
SUMMARY	
1. Uvod	1
1.1. Građa i umnožavanje Tahyna virusa	1
1.2. Epidemiološke značajke infekcije Tahyna virusom	3
1.3. Klinička slika infekcije Tahyna virusom	5
1.4. Dijagnostika infekcije Tahyna virusom	6
1.5. Tahyna virus na području Hrvatske	6
2. Hipoteza	7
3. Cilj rada	7
4. Ispitanici i metode	8
4.1. Ispitanici	8
4.2. Metode	10
5. Rezultati	11
6. Rasprava	17
7. Zaključci	20
8. Zahvale	21
9. Popis literature	22
10. Životopis	26

SAŽETAK

Učestalost detekcije protutijela na virus Tahyna u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom

Domagoj Markelić

Tahyna orthobunyavirus (TAHV) je arbovirus koji spada porodicu *Peribunyaviridae*, rod *Orthobunyavirus*, seroskupinu kalifornijskog encefalitisa. U ljudi, TAHV infekcije većinom prolaze asimptomatski, no mogu se očitovati i kao akutna bolest čiji simptomi sličje gripi te rjeđe meningitis. Rezervoari virusa su zečevi i ježevi, a glavni vektor je komarac poplavnih područja *Aedes vexans*. Virus je raširen po cijelom kontinentalnom dijelu Europe, Kini i dijelovima Afrike.

Cilj ovog rada je istražiti učestalost detekcije protutijela na TAHV u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom te analizirati epidemiološke značajke TAHV infekcije na području Hrvatske. U istraživanje je uključeno 218 bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom nedokazane etiologije hospitaliziranih tijekom pet uzastopnih sezona prijenosa arbovirusa (travanj 2017. godine - listopad 2021. godine). U testiranoj je skupini bilo 144 (66,1%) muškaraca te 74 (39,9%) žena u dobi od 5 do 91 godine. U svih su bolesnika uzeti uzorci seruma i cerebrospinalnog likvora (CSL) koji su testirani na prisutnost TAHV protutijela testom neutralizacije virusa.

TAHV neutralizacijska (NT) protutijela dokazana su u 22 (10,1%) bolesnika. U dva bolesnika s meningitisom, NT protutijela su nađena i u CSL što je ukazivalo na nedavnu infekciju. Dokazana je statistički značajna razlika u prevalenciji NT protutijela s obzirom na dob. Seroprevalencija je progresivno rasla od 1,8% u bolesnika mlađih od 30 godina do 24,4% u bolesnika starijih od 70 godina ($p=0,001$). Seropozitivnost se nije razlikovala značajno između muškaraca i žena (11,1% naspram 8,1%; $p=0,485$) te između stanovnika prigradskih i seoskih područja u odnosu na stanovnike gradskih područja (10,5% naspram 9,8%; $p=0,882$). Nadalje, nije nađena značajna razlika u seropozitivnosti kod bolesnika u kojih se bolest očitovala meningitisom, meningoencefalitisom, mijelitisom ili febrilnom glavoboljom (8,5-15,4%; $p=0,702$). Rezultati logističke regresije pokazali su da bolesnici stariji od 70 godina imaju značajno viši rizik za seropozitivitet u odnosu na bolesnike mlađe od 30 godina (OR=18,064, 95%CI=2,207-147,809; RR=13,902; 95%CI=1,851-104,393).

Ključne riječi: Tahyna virus, neuroinvazivna infekcija, seroprevalencija, Hrvatska

SUMMARY

Detection of Tahyna virus antibodies in patients with neuroinvasive infection

Domagoj Markelić

Tahyna orthobunyavirus (TAHV) is a mosquito-borne arbovirus of the family *Peribunyaviridae*, genus *Orhtobunyavirus*, California encephalitis virus serogroup. The majority of TAHV infections are asymptomatic. Human disease caused by TAHV is an influenza-like illness or less often meningitis. The vertebrate hosts for TAHV are hares, rabbits, hedgehogs and rodents while floodwater mosquitoes *Aedes vexans* are considered the principal arthropod vectors. The virus is widespread through continental Europe, China and some parts of Africa.

The aim of this study is to determine the prevalence of TAHV antibodies in patients with neuroinvasive infection and to analyze the epidemiological characteristics of TAHV infection in Croatia. The study included 218 patients with unsolved neuroinvasive infection hospitalized during the five consecutive arbovirus transmission seasons (April 2017 - October 2021). In the tested group, there were 144 (66.1%) males and 74 (39.9%) females aged 5 to 91 years. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples were collected in all patients and tested for TAHV antibodies using a virus neutralization test (VNT).

TAHV neutralizing (NT) antibodies were detected in serum samples of 22 (10.1%) patients. In two patients presented with meningitis, NT antibodies were also detected in the CSF suggesting a recent TAHV infection. There was a statistically significant difference in the prevalence of NT antibodies according to age. The seroprevalence increased from 1.8% in patients less than 30 years to 24.4% in patients over 70 years ($p=0.001$). The TAHV seropositivity did not differ significantly between males and females (13.2% vs. 8.1%, $p=0.485$) and inhabitants of suburban/rural and urban areas (12.8% vs. 10.6%, $p=0.882$). In addition, there was no difference in the seropositivity rates among patients presented with meningitis, meningoencephalitis, myelitis or febrile headache (8.5-15.4%; $p=0.702$). Results of the risk analysis showed that age is a risk factor for TAHV infection. Patients older than 70 years showed a significantly higher risk for seropositivity than those under 30 years (OR=18.064, 95%CI=2.207-147.809; RR=13.902; 95%CI=1.851-104.393).

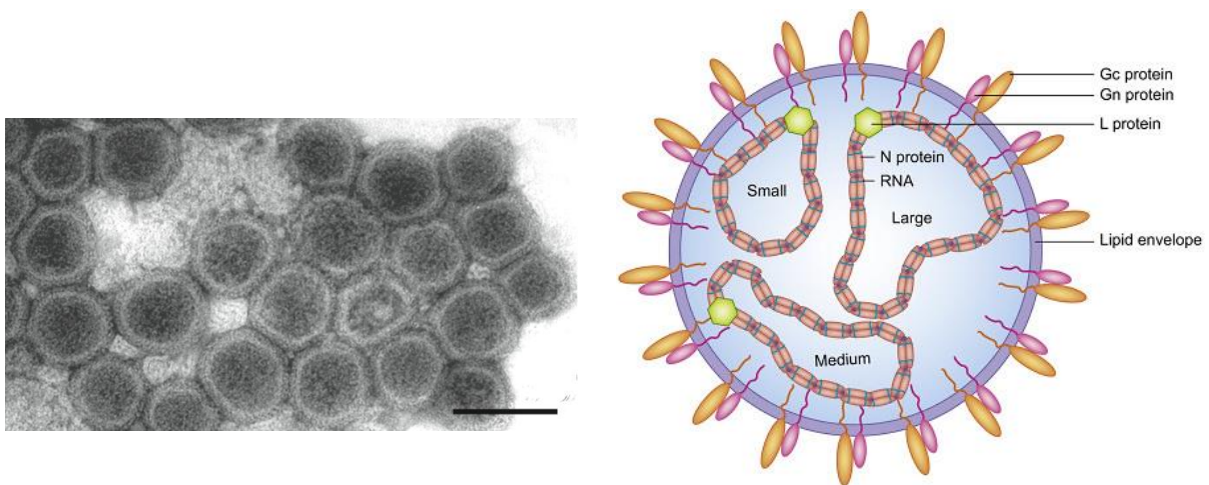
Keywords: Tahyna virus, neuroinvasive infection, seroprevalence, Croatia

1. Uvod

Tahyna orthobunyavirus (TAHV) izoliran je 1958. godine iz skupnog uzorka komaraca *Aedes caspius* sakupljenih u selu Tahyna, Slovačka (1). Bolest u ljudi uzrokovana TAHV („Valtice groznica”) je potvrđena tijekom 1960-ih godina nakon izolacije virusa iz bolesnika s akutnom bolesti čiji simptomi sličje gripi, u gradu Valtice (Južna Moravska, Češka Republika). TAHV je prvi izolirani virus u Europi koji se prenosi ubodom komarca (2).

1.1. Građa i umnožavanje Tahyna virusa

TAHV spada u porodicu *Peribunyaviridae*, rod *Orthobunyavirus* te seroskupinu kalifornijskog encefalitisa (3). TAHV je obavijeni virus, kuglasta oblika, promjera 80-120 nm (slika 1). U ovojnici, koja je građena od lipidnog dvosloja, nalaze se dva površinska glikoproteina (Gn i Gc) koji kao heterodimeri strše s površine virusne čestice tvoreći izdanke dužine 5-10 nm (4). Na glikoproteinskim se izdancima nalaze hemaglutinin i determinante odgovorne za tvorbu neutralizacijskih (NT) protutijela. Genom je sastavljen od tri segmenta jednolančane negativne RNA pri čemu se svaki nalazi u zasebnoj kapsidi spiralne simetrije i označen je prema veličini: mali (S), srednji (M) i veliki (L).



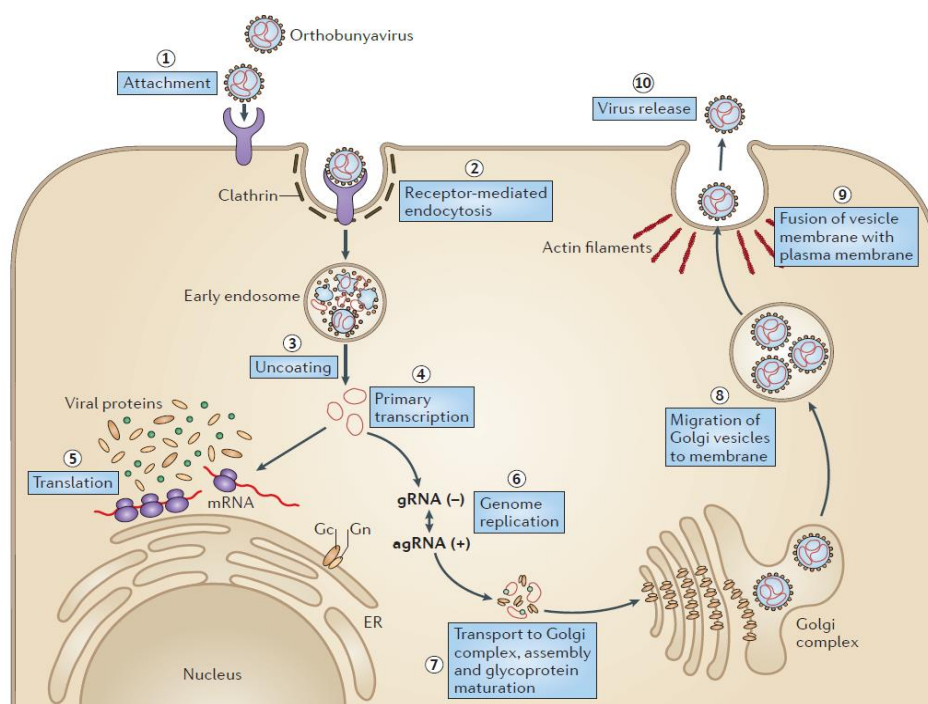
Slika 1. Građa bunyavirusa

Izvor: Bunyaviridae - Figures. Dostupno na: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/206/bunyaviridae-figures

Izvor: Chen Y, Dessau M, Rotenberg D, Rasmussen DA, Whitfield AE. Entry of bunyaviruses into plants and vectors. *Adv Virus Res.* 2019;104:65-96.

L segment kodira L protein odnosno RNA-ovisnu RNA polimerazu; M segment kodira prekursore površinskih glikoproteina, koje proteaze domaćina cijepaju u zrele glikoproteine, Gn i Gc, koji sudjeluju u vezanju za receptore i ulazak viriona u stanicu; S segment kodira proteine nukleokapside (N) te nestrukturane proteine čija je uloga modulacija antivirusnog odgovora stanice domaćina. Ukupno, virus sadrži četiri strukturalna proteina: N, Gn i Gc te L protein. Sve tri nukleokapside su kružnog oblika pri čemu virusna RNA, N protein i L protein tvore ribonukleoproteinski kompleks (RNP) koji služi kao minimalna funkcionalna jedinica za transkripciju i translaciju virusa (5,6).

Umnožavanje virusa se odvija u citoplazmi stanice domaćina (slika 2).



Slika 2. Umnožavanje bunyavirusa

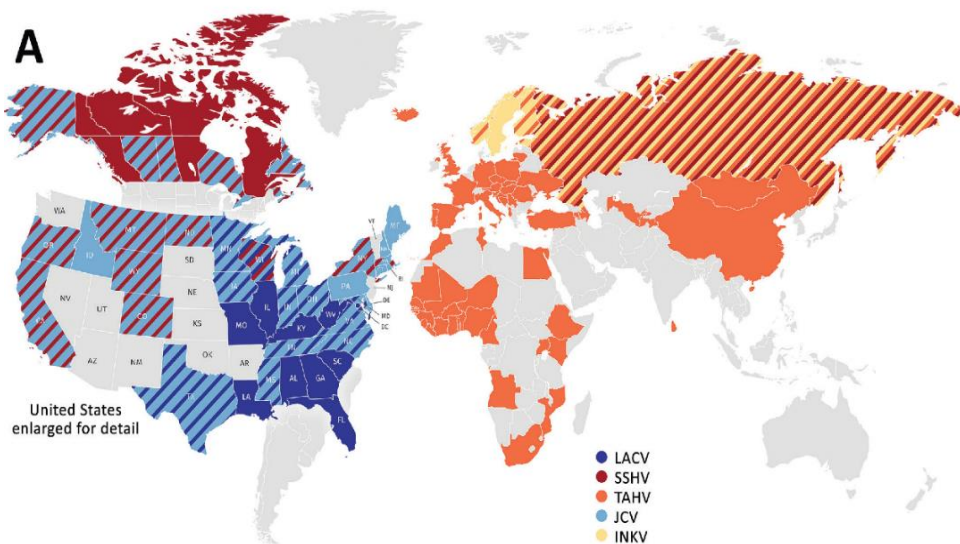
Izvor: Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol.* 2014;12(10):673-85. doi: 10.1038/nrmicro3332.

Početni korak u umnažanju je prepoznavanje i vezanje viriona za stanicu domaćina površinskim glikoproteinima, Gn i Gc. Nakon vezanja dolazi do ulaska viriona u stanicu domaćina procesom endocitoze. Pretpostavlja se da acidifikacijom endosoma dolazi do konformacijskih promjena Gn i Gc pri čemu dolazi do oslobađanja iz endosoma nakon čega se virusni genom oslobađa u citoplazmu. Slijedi primarna transkripcija mRNA iz virusne negativne RNA u čemu sudjeluju L i N protein. Sljedeći korak je translacija mRNA u

nestrukturne i strukturne proteine potrebne za daljnje umnažanje virusa. Kod L i S segmenata translacija se odvija u slobodnim ribosomima, dok se kod M segmenta translacija odvija u ribosomima vezanim za membranu hrapavog endoplazmatskog retikuluma. Nakon translacije, glikoproteini Gn i Gc kao dimeri iz endoplazmatskog retikuluma odlaze u Golgijev kompleks, a istovremeno dolazi do replikacije virusnog genoma u citoplazmi. Nastali RNP također odlaze u Golgijev kompleks u kojem se odvija morfogeneza i sazrijevanje virusne čestice. Pupanjem iz Golgijevog aparata virusne čestice se pomoću vezikula oslobađaju u citoplazmu, a iz stanice izlaze procesom egzocitoze pri čemu nastaju novi zreli virioni (7,8).

1.2. Epidemiološke značajke infekcije Tahyna virusom

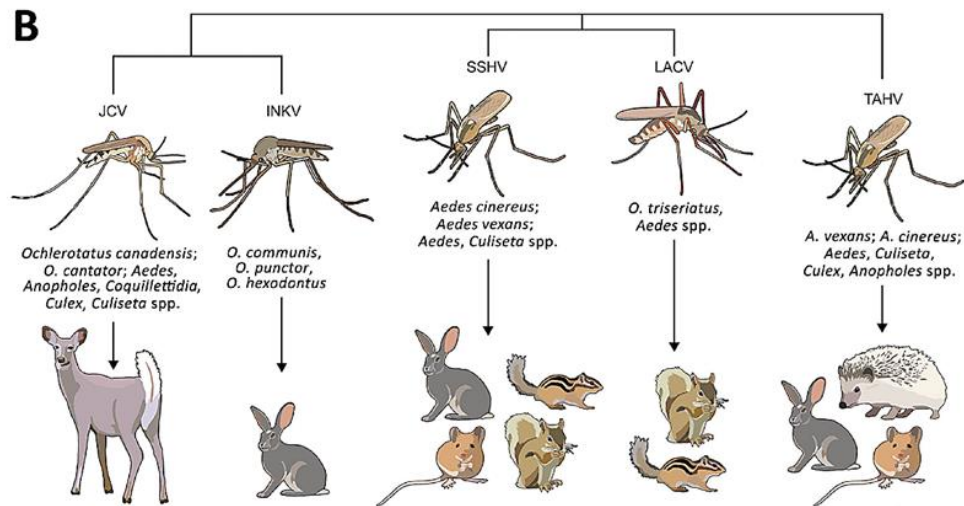
TAHV je široko rasprostranjen u kontinentalnom dijelu Europe što dokazuje detekcija i izolacija virusa iz komaraca te detekcija protutijela u životinja i ljudi (9-11). Izvan Europe, TAHV infekcije su zabilježene u Aziji (južni dio Sibira i Daleki Istok, Turska, Armenija, Azerbajdžan, Tadžikistan, Uzbekistan) i Africi (Tunis, Maroko, Egipat, Etiopija, Mozambik, Uganda, Kenija, Angola, Južna Afrika, Zapadna Afrika). Pored toga, protutijela na TAHV su nađena u Šri Lanki i Kini (10, 12-15). Nadalje, TAHV sekvence su dokazane u dva simptomatska bolesnika u Kini u 2006. godine (slika 3A) (16).



Slika 3A. Geografska rasprostranjenost orthobunyavirusa seroskupine kalifornijskog encefalitisa

Izvor: Evans AB, Winkler CW, Peterson KE. Differences in Neuropathogenesis of Encephalitic California Serogroup Viruses. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25(4):728-738. doi: 10.3201/eid2504.181016.

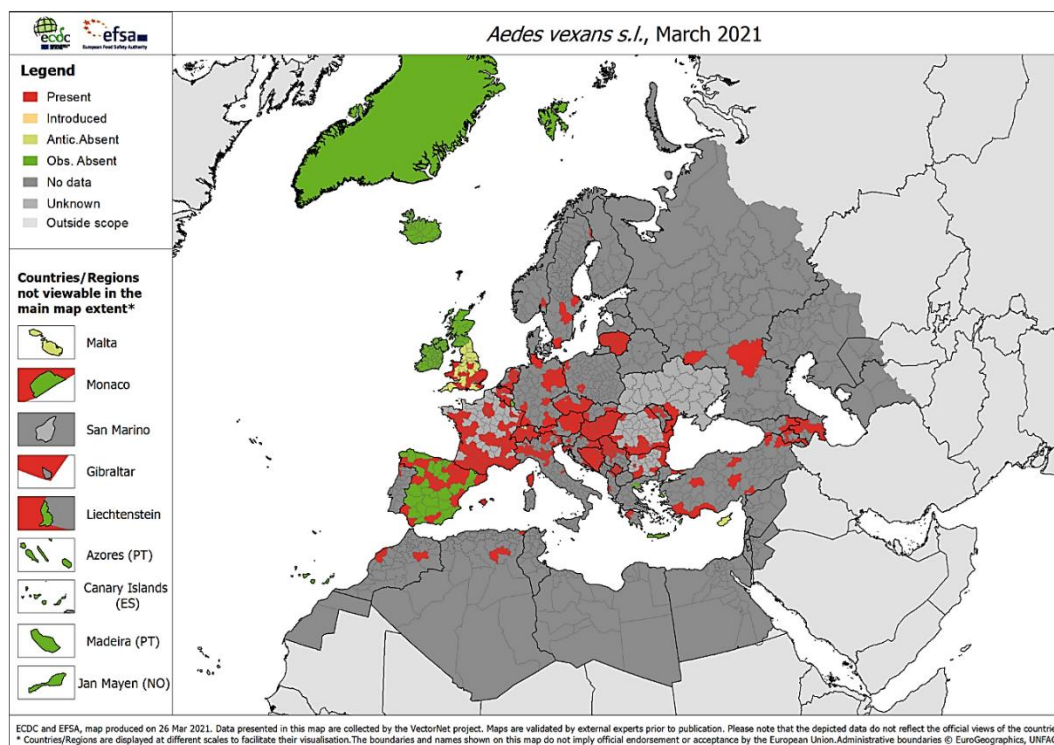
U silvatičnom ciklusu, prirodni domaćini TAHV su kunići, zečevi, ježevi i mali glodavci, dok se poplavni komarci *Aedes vexans* smatraju glavnim vektorima (slika 3B i 4).



Slika 3B. Prirodni ciklus orthobunyavirusa seroskupine kalifornijskog encefalitisa

Izvor: Evans AB, Winkler CW, Peterson KE. Differences in Neuropathogenesis of Encephalitic California Serogroup Viruses. *Emerg Infect Dis* 2019; 25(4):728-738.

Ljudi se zaraze ulaskom u područje gdje obitavaju vektori i rezervoari virusa te zbog kratkotrajne i niske viremije predstavljaju slučajne ili krajnje domaćine. Prirodna žarišta TAHV su vlažna staništa niske nadmorske visine (ekosustav poplavnih šuma), a ponekad su to i periurbana područja (2).



Slika 4. Rasprostranjenost poplavnih komaraca *Aedes vexans* na području Europe

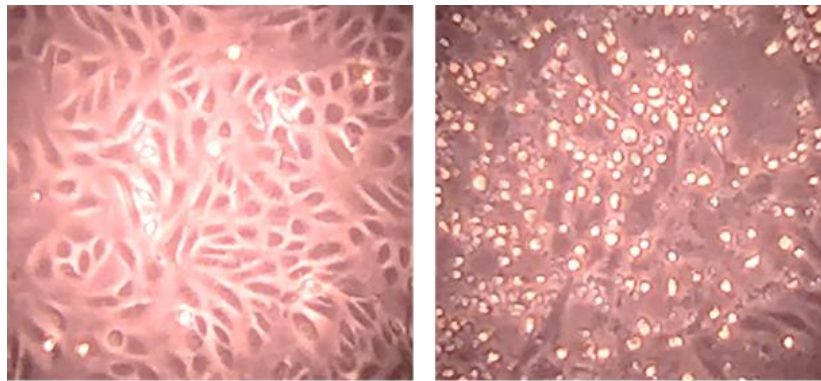
Izvor: ECDC. Distribution maps of native mosquitoes. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>

1.3. Klinička slika infekcije Tahyna virusom

Većina TAHV infekcija prolazi asimptomatski. Bolest u ljudi uzrokovana TAHV je akutna bolest čiji simptomi sličje gripi koja se pojavljuje u kasno ljeto i ranu jesen, većinom u djece (2). Klinička slika je blaža u odraslih nego u djece (17). Nakon inkubacijskog razdoblja od 3 do 7 dana, najčešće kliničke manifestacije bolesti su vrućica, gastrointestinalni poremećaji te ponekad atipična pneumonija i miokarditis. Do sada nije zabilježen niti jedan smrtni slučaj uzrokovan TAHV infekcijom (18). Usprkos jasnoj povezanosti s neuroinvazivnošću (meningitismom), TAHV infekcija je još uvijek zanemarena bolest sa svega nekoliko zabilježenih slučajeva kliničke infekcije u ljudi u posljednjih nekoliko desetljeća (19). Međutim, prevalencija NT protutijela od 60 do 80% je redovito zabilježena u odrasloj populaciji u nekim endemskim područjima poput Češke Republike (20).

1.4. Dijagnostika infekcije Tahyna virusom

TAHV se može uzgojiti u staničnoj kulturi majmuskog bubrega (Vero) u kojoj stvara citopatski učinak (slika 5). Dijagnostika TAHV većinom se provodi dokazom TAHV RNA metodom lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-qPCR) ili detekcijom specifičnih protutijela. Test neutralizacije virusa (VNT) predstavlja „zlatni standard“ u serološkoj dijagnostici TAHV (12). Zbog nedostatka komercijalno dostupnih seroloških testova, ova se dijagnostika provodi uglavnom u referentnim laboratorijima zbog čega je bolest poddijagnosticirana.



Slika 5. Vero stanice (A); citopatski učinak TAHV (B)

Izvor: Referentni centar Ministarstva zdravstva za dijagnostiku i praćenje virusnih zoonoza,
Hrvatski zavod za javno zdravstvo

1.5. Tahyna virus na području Hrvatske

U Hrvatskoj, prvi serološki dokaz prisutnosti TAHV datira od 1970-ih godina. Vrlo rijetke seroepidemiološke studije su dokazale TAHV protutijela u 7,9% stanovnika sjevernoistočne Hrvatske te vrlo nisku seroprevalenciju (0,2-1,47%) u stanovnika Hrvatskog primorja (21,22). Samo jedan rad (1984-1988. godine) je zabilježio protutijela koja inhibiraju hemaglutinaciju na TAHV u serumu uzetom od slobodno živućih smeđih medvjeda (*Ursus arctos*) sakupljenih u nacionalnim parkovima Plitvička jezera i Risnjak (23).

2. Hipoteza

Infekcije uzrokovane TAHV su prisutne na području Hrvatske.

3. Cilj rada

Cilj ovog rada je istražiti učestalost detekcije protutijela na TAHV u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom oboljelih u sezoni prijenosa arbovirusnih infekcija te analizirati epidemiološke značajke ove infekcije na području Hrvatske .

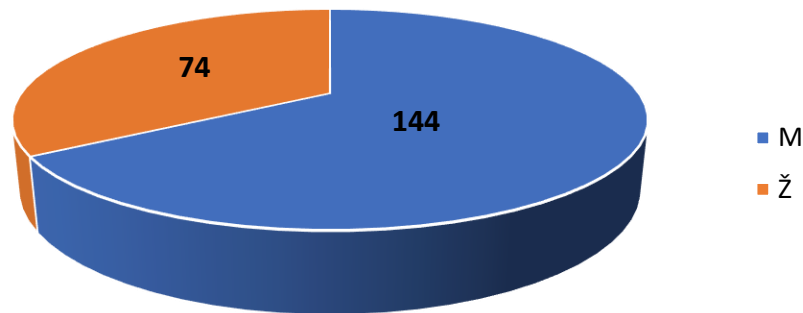
Seroprevalencija će se analizirati u različitim populacijskim skupinama s obzirom na: dob, spol, kliničku sliku, mjesto prebivališta te geografsko područje.

4. Ispitanici i metode

4.1. Ispitanici

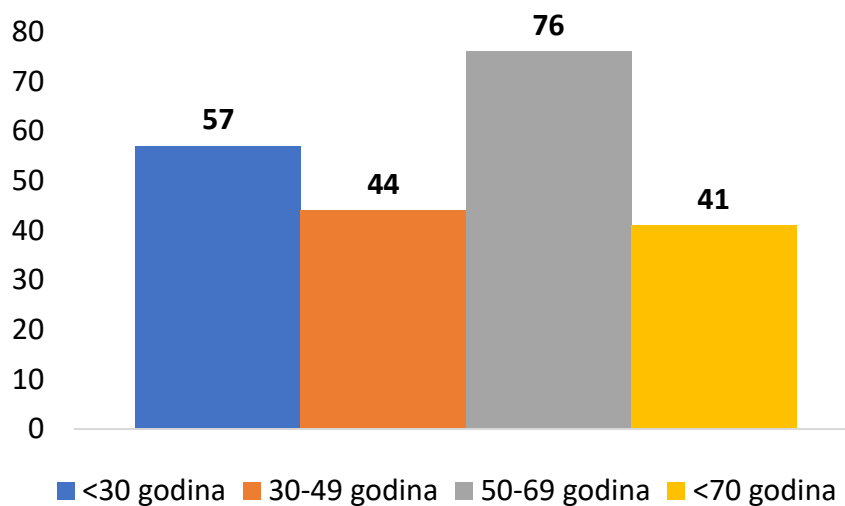
U istraživanje je uključeno 218 bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom nedokazane etiologije hospitaliziranih tijekom pet uzastopnih sezona prijenosa arbovirusa (travanj 2017. godine - listopad 2021. godine). Na virusnu etiologiju neuroinvazivne bolesti ukazivao je nalaz cerebrospinalnog likvora; CSL (pleocitoza, predominacija mononukleara, povišeni proteini, uredan nalaz glukoze). Dijagnostičkom obradom isključeni su najčešći neutrotropni virusi (enterovirusi, herpes simplex virus, varicella-zoster virus) te arbovirusi: virus krpeljnog encefalitisa, West Nile virus, Usutu virus i Toscana virus.

U testiranoj je skupini bilo 144 (66,1%) muškaraca te 74 (39,9%) žena u dobi od 5 do 91 godine (slika 6).



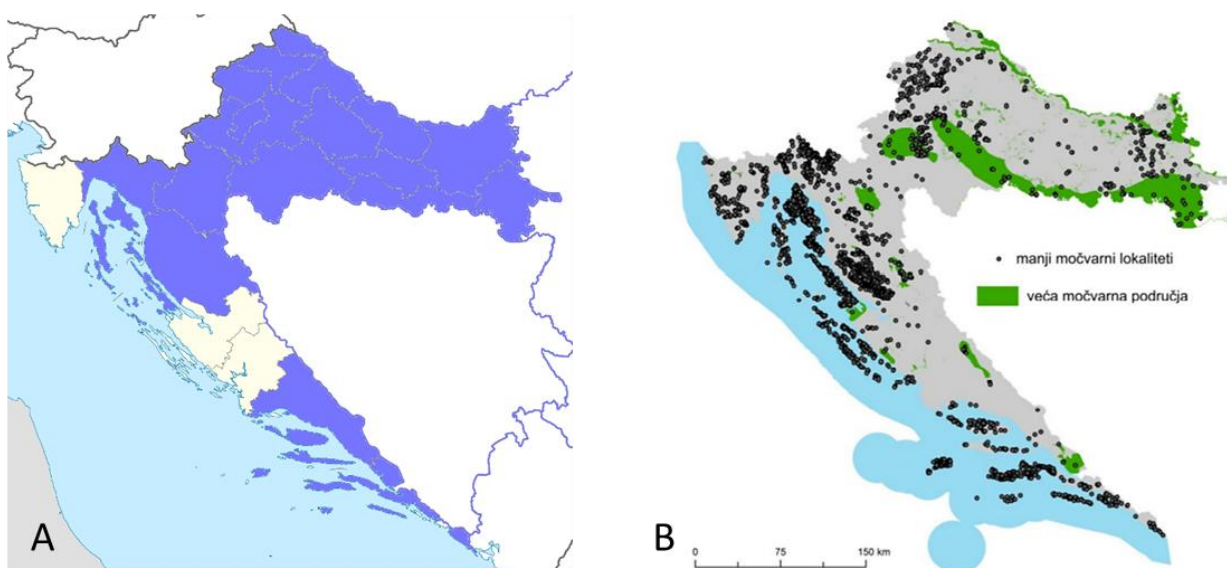
Slika 6. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom po spolu

Bolesnici su podijeljeni u sljedeće dobne skupine (slika 7): <30 godina – 57 (26,1%) bolesnika; 30-49 godina – 44 (20,2%) bolesnika; 50-69 godina – 76 (34,9%) bolesnika te >70 godina – 41 (18,8%) bolesnika.



Slika 7. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom po dobnim skupinama

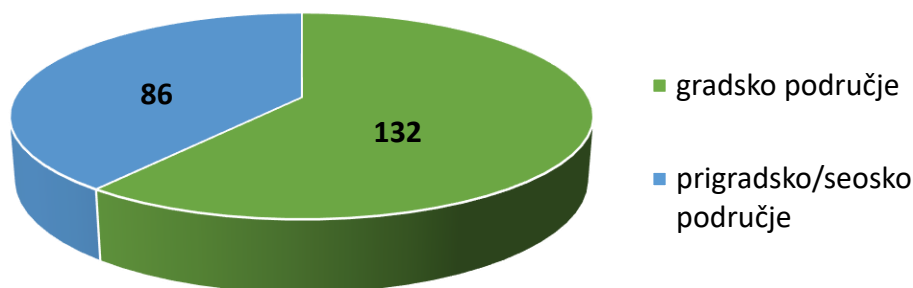
Bolesnici su bili s područja 17/21 hrvatskih županija, svih kontinentalnih te 4/7 primorskih županija (slika 8).



Slika 8. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom po županijama (A); Močvarna područja u Hrvatskoj prema Inventarizaciji močvarnih staništa 2003. godine (B): U Hrvatskoj je projektom inventarizacije močvarnih staništa identificirano i kartirano oko 3,800 močvarnih područja, od kojih je 11 velikih močvarnih kompleksa u ukupnoj površini od 800,000 hektara.

Izvor: Zavod za zaštitu okoliša i prirode Republike Hrvatske

S obzirom na mjesto prebivališta, 132 (60,5%) bolesnika su bili stanovnici gradskih područja, a 86 (39,5%) prigradskih ili seoskih područja (slika 9).



Slika 9. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom prema mjestu prebivališta

4.2. Metode

U svih su bolesnika uzeti uzorci seruma i CSL koji su testirani na prisutnost TAHV NT protutijela metodom VNT.

Kao antigen za VNT je korišten TAHV soj UVE/TAHV/1958/CS/92 uzgojen u Vero E6 staničnoj kulturi. Titar virusa (doza virusa koja inficira 50% inokuliranih staničnih kultura; TCID₅₀) je izračunat pomoću Reed and Muench formule. Uzorci seruma su inaktivirani toplinom (30 min/56°C) te su napravljena dvostruka serijska razrijeđenja počevši od 1:5. Jednaka količina (25 µL) inaktiviranog razrijeđenog seruma i 100 TCID₅₀ TAHV je pomiješana i inkubirana tijekom jednog sata na temperaturi od 37°C s CO₂. Na kraju dodano je 50 µL 2x10⁵ Vero E6 stanica/mL u svaku jažicu. Pločice su inkubirane na temperaturi od 37°C s CO₂ i, počevši od trećeg dana, inokulirane stanice su jednom dnevno pregledavane na pojavu citopatskog učinka. Titar NT protutijela je definiran kao recipročna vrijednost najvećeg razrijeđenja seruma koje pokazuje 50% neutralizacije. Titar serumskih NT protutijela ≥ 10 i titar protutijela u CSL-u ≥ 5 je smatran pozitivnim rezultatom.

Statistička obrada rezultata

Razlike u seroprevalenciji s obzirom na demografske i kliničke značajke bolesnika su testirane X² testom. Jačina povezanosti zavisnih (pozitivan VNT) te nezavisnih varijabli je analizirana logističkom regresijom. Statistička analiza učinjena je programom Stata (ver.16).

5. Rezultati

Kliničke prezentacije u bolesnika s neuroinvazivnom bolesti bile su meningitis (141/64,7%), meningoencefalitis (56/25,7%), mijelitis (8/3,7%) i febrilna glavobolja (13/5,9%).

TAHV NT protutijela su dokazana u uzorcima seruma 22 (10,1%) bolesnika. U dva bolesnika s meningitisom (tablica 1), NT protutijela su također potvrđena u CSL-u. Visoki titar NT protutijela u uzorcima seruma (titrovi 640 i 320) kao i pozitivni CSL (titrovi 10 i 5) ukazivali su na nedavnu TAHV infekciju.

Tablica 1. Klinički, laboratorijski i virološki nalazi u bolesnika s nedavnom TAHV infekcijom

Značajka	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Referentne vrijednosti
Demografske i kliničke značajke			
Dob	75	59	
Spol	M	Ž	
Datum početka bolesti	Lipanj 2019.	Listopad 2020.	
Klinička dijagnoza	Meningitis	Meningitis	
Klinički simptomi	Vrućica, glavobolja, opća slabost	Vrućica, glavobolja, opća slabost, mučnina, fotofobija	
Predliježeće bolesti	-	Hipertenzija	
Ishod bolesti	Oporavak	Oporavak	
Prebivalište	Urbano	Ruralno, blizina rijeke	
Nalaz CSL			
Stanice (mm ³)	412	218	< 5
Mononukleari (%)	78	70	100
Proteini (g/L)	0,7	1,3	0,17-0,37
Glukoza (mmol/L)	3,1	2,2	2,5-3,3
Rezultati seroloških testova			
Serum (titar)	320	640	≥ 10 pozitivan
CSL (titar)	5	10	≥ 5 pozitivan

Učestalost detekcije TAHV protutijela s obzirom na demografske i kliničke značajke bolesnika je prikazana u tablici 2.

Tablica 2. Učestalost detekcije TAHV NT protutijela u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom

Značajka	Testirani N (%)	TAHV NT protutijela N (%)	95%CI	p
Spol				0,485
Muški	144 (66,1)	16 (11,1)	6,5 – 17,4	
Ženski	74 (33,9)	6 (8,1)	3,0 – 16,8	
Dobna skupina				0,001
<30 godina	57 (26,1)	1 (1,8)	0,0 – 9,4	
30-49 godina	44 (20,2)	2 (4,6)	0,6 – 15,5	
50-69 godina	76 (34,9)	9 (11,8)	5,6 – 21,3	
≥70 godina	41 (18,8)	10 (24,4)	12,4 – 40,3	
Područje prebivališta				0,882
Gradsko	132 (60,5)	13 (9,8)	5,3 – 16,2	
Prigradsko/seosko	86 (39,5)	9 (10,5)	4,9 – 18,9	
Klinička prezentacija				0,702
Febrilna glavobolja	13 (5,9)	2 (15,4)	1,9 – 45,4	
Meningitis	141 (64,7)	12 (8,5)	4,4 – 14,2	
Meningoencefalitis	56 (25,7)	7 (12,7)	5,3 – 24,5	
Mijelitis	8 (3,7)	1 (14,3)	0,4 – 57,8	

Medijan dobi seropozitivnih bolesnika je iznosio 63 (IQR=53-72) godine. Dokazana je statistički značajna razlika u prevalenciji NT protutijela s obzirom na dob. Seroprevalencija je raslo progresivno od 1,8% u bolesnika mlađih od 30 godina do 24,4% u bolesnika starijih od 70 godina (p=0,001). Seropozitivnost na TAHV se nije značajno razlikovala između muškaraca i žena (11,1% naspram 8,1% p=0,485) te između stanovnika prigradskih i seoskih područja i stanovnika gradskih područja (9,8% naspram 10,5%, p=0,882) (tablica 2). Nadalje, nije nađena značajna razlika u seropozitivnosti kod bolesnika u kojih se bolest očitovala meningitisom

(10,4%), meningoencefalitisom (12,7%), mijelitisom (14,3%) ili febrilnom glavoboljom (15,4%).

Rezultati logističke regresije pokazali su da je starija životna dob rizični čimbenik za TAHV infekciju (tablica 3a i b). Bolesnici stariji od 70 godina imaju značajno viši rizik za seropozitivnost u odnosu na bolesnike mlađe od 30 godina (OR=18,064, 95%CI=2,207-147,809; RR=13,902; 95%CI=1,851-104,393). Spol i mjesto prebivališta nisu značajno povezani s TAHV seroprevalencijom. Isto tako, nije nađena povezanost između seropozitivnosti i kliničke prezentacije bolesti.

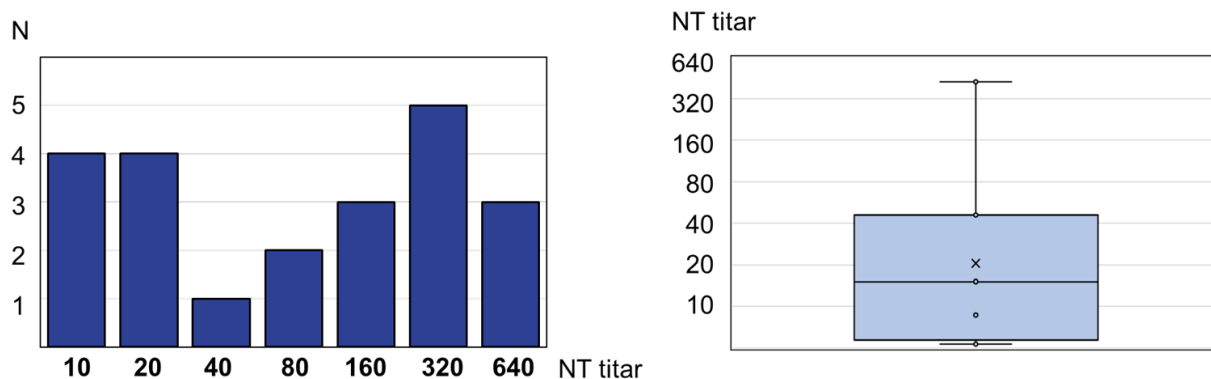
Tablica 3. Logistička regresija analize rizika za TAHV seropozitivitet

a) Omjer rizika (OR)			
Značajka	OR	95%CI OR	p
Muški (Ref.) naspram ženski spol	1,375	0,513 – 3,678	0,525
Dob			
<30 godina	Ref.		
30-49 godina	2,666	0,233 – 30,400	0,429
50-69 godina	7,522	0,924 – 61,200	0,059
≥70 godina	18,064	2,207 – 147,809	0,007
Gradsko (Ref.) naspram prigradsko/seosko prebivalište	1,069	0,436 – 2,623	0,882
Klinička prezentacija			
Febrilna glavobolja	Ref.		
Meningitis	0,503	0,099 – 2,542	0,406
Meningoencefalitis	0,802	0,146 – 4,402	0,799
Mijelitis	0,916	0,068 – 12,322	0,947

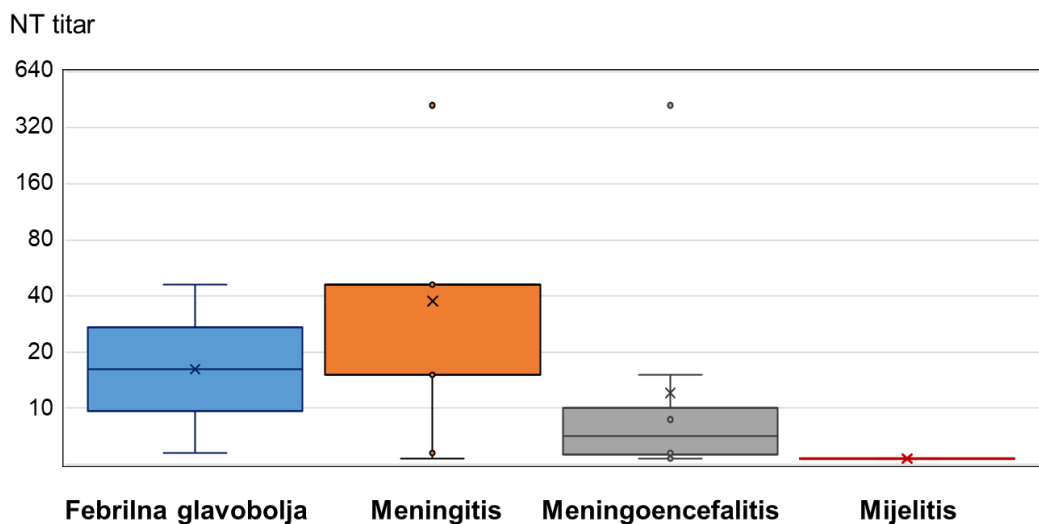
b) Relativni rizik (RR)

Značajka	RR	95%CI RR	p
Muški (Ref.) naspram ženski spol	1,389	0,567– 3,401	0,471
Dob			
<30 godina	Ref.		
30-49 godina	2,590	0,242 – 27,662	0,430
50-69 godina	6,750	0,880 – 51,770	0,066
≥70 godina	13,902	1,851 – 104,393	0,009
Gradsko (Ref.) naspram prigradsko/seosko prebivalište	1,062	0,474 – 2,377	0,882
Klinička prezentacija			
Febrilna glavobolja	Ref.		
Meningitis	0,545	0,136 – 2,179	0,391
Meningoencefalitis	0,827	0,193 – 3,528	0,797
Mijelitis	0,928	0,101 – 8,529	0,947

Raspodjela titra NT protutijela u TAHV seropozitivnih bolesnika je prikazana na slikama 10 i 11. Medijan titra protutijela iznosio je 160 (IQR=20-320).

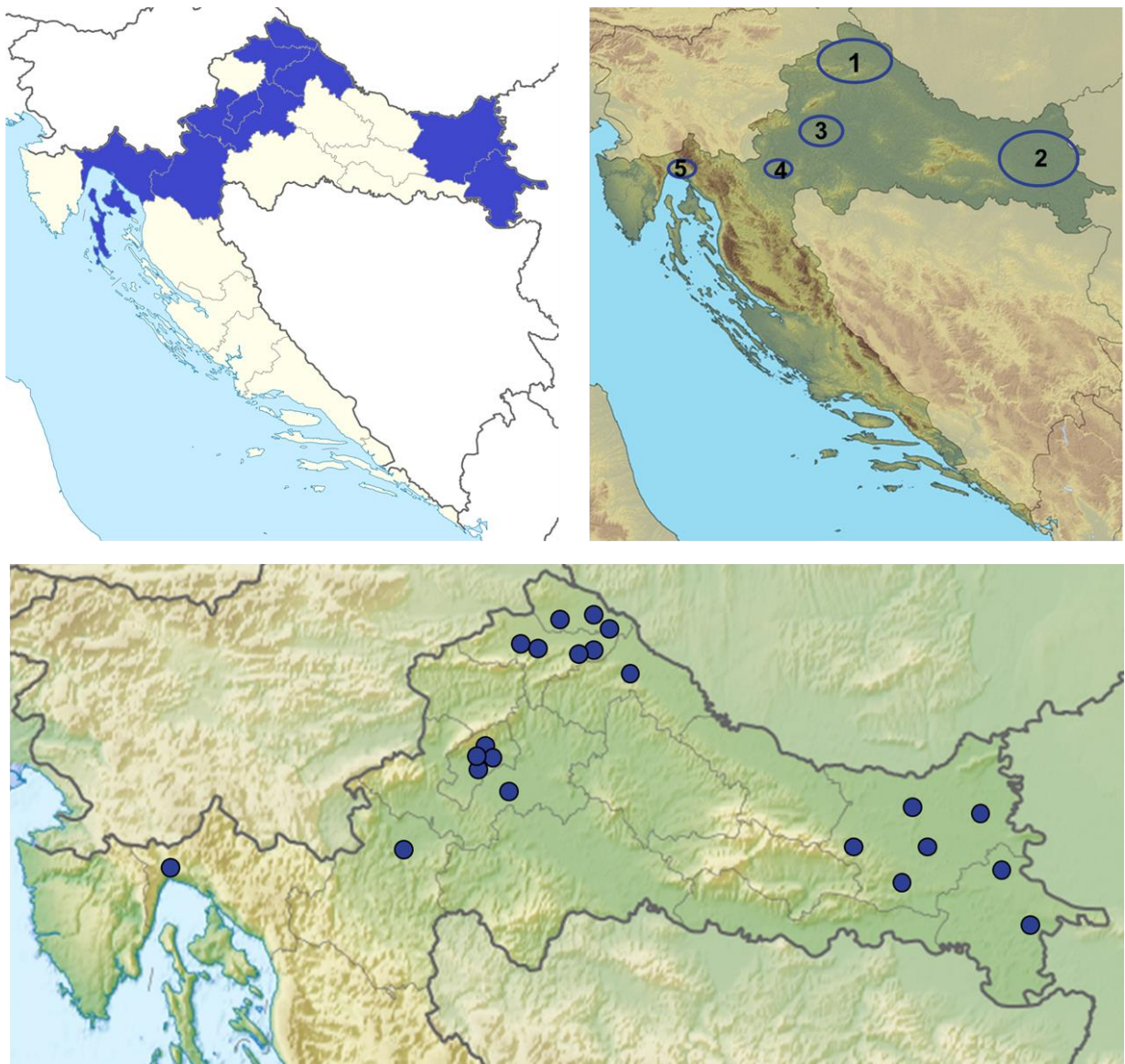


Slika 10. Raspodjela titra TAHV NT protutijela u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom



Slika 11. Medijan titra TAHV NT protutijela s obzirom na kliničku dijagnozu

Geografska rasprostranjenost TAHV seropozitivnih bolesnika prikazana je na slici 12. Bolesnici su bili s područja 9 hrvatskih županija: 8 kontinentalnih te jedne primorske županije. Većina oboljelih (90,5%) su bili stanovnici poplavnih nizina uz rijeku Dravu, Bednju i Muru (1), Dravu i Dunav (2), Savu (3) te Dobru (4). Prosječna nadmorska visina prebivališta seropozitivnih osoba iznosila je 128 metara (raspon 12-323 metra) nadmorske visine. Lokacija 5 je na području hrvatskog priobalja, na ušću rijeke Rječine koje se nalazi na 12 metara nadmorske visine.



Slika 12. Geografska rasprostranjenost TAHV seropozitivnih bolesnika

6. Rasprava

Iako seroepidemiološke studije ukazuju na prisutnost TAHV u populaciji Hrvatske, do sada nisu zabilježeni klinički slučajevi. Broj dokazanih infekcija je vrlo vjerojatno manji zbog blagih kliničkih simptoma u većine oboljelih.

U ovom istraživanju dokazana je prisutnost TAHV NT protutijela u uzorcima seruma 22 (10,1%) bolesnika što ukazuje na raniju izloženost virusu. Nadalje, prisutnost visokog titra NT protutijela u serumu (titar 640 i 320) uz prisutnost protutijela u CSL-u (titar 10 i 5) u dva bolesnika s meningitisom upućuje na nedavnu TAHV infekciju.

Ukupna seroprevalencija kod bolesnika s neuroinvazivnom bolesti od 10,1% dokazana u ovom istraživanju je slična seroprevalenciji u populaciji iz sjeveroistočnih regija Hrvatske (7,9%) koja je dokazana 1970-ih godina (22). Međutim, ranija istraživanja su pokazala vrlo nisku stopu seroprevalencije (0,2%-1,47%) kod stanovnika Hrvatskog primorja (21). Važno je napomenuti da su u ovom istraživanju svi osim jednog TAHV seropozitivnog bolesnika bili stanovnici kontinentalnog dijela Hrvatske.

Epidemiološka istraživanja provedena u općoj populaciji diljem svijeta pokazala su značajne regionalne razlike u TAHV seroprevalenciji. Tijekom 1960-ih godina, TAHV infekcije su bile zabilježene u centralnom i južnom dijelu Europe pri čemu su bile najčešće u centralnoj Europi gdje 30,3-61,9% populacije posjeduje protutijela (24). Viša seroprevalencija u ljudi povezana je sa životom blizu rijeka i nedavnim poplavljanjima u poplavnim ekosustavima Europe (17,19). Nekoliko istraživanja seroprevalencije su provedena u Češkoj Republici tijekom 1970-ih godina. Stope seroprevalencije od 17,8% i 42% su zabilježene Južnoj Moravskoj (25), 20,6% u slivu rijeke Odre i 1,1% u regiji Karvina. Nadalje, TAHV NT protutijela su nađena u 16,6% šumskih radnika (izložena populacija) iz različitih šumskih područja Sjeverne Moravske i 5,5% osoba u kontrolnoj skupini (stanovnici Jablunkova i Trineca, područja s minimalnom zastupljenosti komaraca) (26). Vrlo visoka seropozitivnost (53,8%) je zabilježena u području Breclav, Južna Moravska, tijekom devastirajućih poplava koja se su dogodile 1997. godine (27). Istraživanje provedeno 1995. godine kod šumskih radnika u Sloveniji pokazalo je ukupnu seroprevalenciju od 1%. Najveći seropozitivitet je zabilježen u sjevernim regijama (Slovenj Gradec 1,9%; Bled 1,98%; Celje 2,5%) (28). Tijekom 2000-ih godina prevalencija NT protutijela u Češkoj Republici je iznosila 16,5% (ruralna područja uz rijeke Vltava i Laba koja su pogođena poplavama, 2002. godine) (17), 36,3% u Kamerunu (ruralna sela na jugu, 2002-2003. godine) (29) i 4,5-18,3% u Kini (Xinjiang, 2007-2008. godine) (30). Značajno niža stopa seroprevalencije (2%) je zabilježena u Iraku (Nasirija, 2012-2013. godine) (31). Epidemiološke studije u Narodnoj Demokratskoj Republici Laos su

pokazale da su urbane i ruralne sredine visoko endemska područja za TAHV. Nekoliko istraživanja provedenih u selima u Nakai regiji su, koristeći metodu ELISA, dokazala seropozitivitet od 30,45% u 2007. godini i 29,06% u 2010. godini (32). U 2011. godini, TAHV protutijela su zabilježena prvi put u Alpama. Od 0,3% VNT pozitivnih donora krvi iz Tirola, vrtlarenje se pokazalo kao značajni rizični čimbenik za seropozitivitet. Međutim, zbog malog broja seropozitivnih osoba i činjenice da je vrtlarenje česta rekreacijska aktivnost kod starijih osoba u Tirolu, nije bilo moguće sa sigurnošću razaznati radi li se o vrtlarenju kao neovisnom rizičnom čimbeniku ili čimbeniku povezanom sa životnom dobi. Rekreacijske aktivnosti poput planinarenja, bicikliranja, plivanja, branja gljiva, lova i druge aktivnosti na otvorenom nisu rizični čimbenici za TAHV seropozitivitet (33).

U nekoliko su studija testirane simptomatske osobe na prisutnost TAHV protutijela. Bolesnici s vrućicom testirani su u kineskoj studiji (Xinjiang, 2007. godine). TAHV IgG protutijela su dokazana u 13,0% bolesnika metodom IFA, dok 5,3% su bili pozitivni na IgM i IgG protutijela što je i potvrđeno dokazom NT protutijela (15). Još je jedno istraživanje na području Kine (Geermu, Qinghai-Tibetanska visoravan, 2009. godine) provelo probir bolesnika s vrućicom u ruralnim klinikama koji su razvili simptome tijekom ljeta. TAHV IgM protutijela su dokazana u 2,2% bolesnika, dok ih je 0,9% bilo pozitivno na TAHV RNA (16). U 2015. godini, TAHV protutijela su dokazana u 37,7% bolesnika u dobi do 18 godina koji su imali vrućicu i osip u Narodnoj Demokratskoj Republici Laos. Osim toga, vrlo visoka stopa seropozitiviteta je nađena u bolesnika sa simptomima dengue i chikungunya groznice: 92,20% (2013. godine) odnosno 54,68% (2016. godine) (32). Samo je jedna studija provedena u Rusiji (Sverdlovsk regija, 1994. godine) analizirala prevelanciju TAHV u bolesnika s encefalitisom, kada su TAHV protutijela dokazana u 60% bolesnika (34).

Rezultati ovog rada su dokazali povezanost TAHV seropozitiviteta s dobi. Seroprevalencija je rasla značajno s dobi ispitanika u rasponu od 1,8% u bolesnika ispod 30 godina pa sve do 24,4% u bolesnika iznad 70 godina. U endemskim područjima Češke Republike također je uočen porast TAHV seroprevalencije s dobi, što se podudara s rezultatima ovog rada (17). Najviša stopa pozitiviteta je dokazana u osoba dobne skupine iznad 59 godina (17,53%) u usporedbi s djecom u dobnim skupinama 0-5 godina i 6-14 godina sa stopom seroprevalencije od 0% odnosno 0,56% (35).

U ovom radu, većina seropozitivnih osoba (90,9%) su stanovnici poplavnih područja duž rijeka s prosječnom nadmorskom visinom mjesta stanovanja od 128 metara (raspon 12-323 metra). U Alpama, TAHV infekcije su zabilježane na nadmorskoj visini od 335 do 1221 metara

(prosječno 497 metara) (33), dok su u Kini dokazane na višim nadmorskim visinama (2800 metara) (16).

U Češkoj Republici, prevalencija TAHV protutijela je viša u područjima u blizini poplavnih šuma koje su glavno stanište za razmnožavanje komaraca (od 13,6% na udaljenosti >6 kilometara do 28,2% na udaljenosti <1 kilometra) (17). Svi TAHV seropozitivni bolesnici iz Hrvatske bili su iz kontinentalnih predjela u kojima su poplavni komarci *Ae. vexans*, glavni vektori TAHV, visoko rasprostranjeni, uključujući Primorsko-goransku županiju smještenu na hrvatskom primorju (36, 37). U istočnim regijama Hrvatske (poplavna područja rijeke Drave), *Ae. vexans* je najčešća vrsta koja čini do 86% ukupne populacije komaraca na tom području (38).

Iako u ovom radu su muškarci bili češće seropozitivni (11,1%) od žena (8,1%), ta razlika nije značajna. Slično našim rezultatima, povezanost spola i seroprevalencije nije pronađena niti u Češkoj Republici (9). U Alpskoj regiji Tirol u centralnom dijelu Europe, većina seropozitivnih donora krvi su bili muškarci, ali zbog malog broja pozitivnih osoba, ovi se rezultati trebaju interpretirati s oprezom (33). Razlika u seroprevalenciji između muškaraca i žena također je opažena u nekim provincijama Narodne Demokratske Republike Laos. Dok su više stope seropozitiviteta pronađene u muškaraca u Čampasak provinciji u 2013. godini (67,44% naspram 24,75%) i u glavnom gradu Vientiane u 2016. godini (30,68% naspram 23,99%), više stope seropozitiviteta su pronađene u žena u Vientiane provinciji u 2015. godini (22,95% naspram 14,1%) (32).

TAHV seropozitivni bolesnici iz Hrvatske su bili većinom iz sjeverozapadnih i istočnih dijelova (90,9% svih seropozitivnih osoba). Geografska rasprostranjenost TAHV seropozitivnih bolesnika se preklapa s područjima gdje su zabilježene akutne infekcije uzrokovane drugim neuroinvazivnim arbovirusima poput virusa krpeljnog encefalitisa, West Nile virusa i Usutu virusa tijekom istog vremenskog razdoblja u Hrvatskoj (39, 40).

Svakako treba spomenuti i ograničenja ovog rada. S obzirom da VNT mjeri ukupne TAHV imunoglobuline, a ne pojedine klase imunoglobulina, potrebni su parni uzorci seruma kako bi se dokazala dinamika titra protutijela i potvrdila akutna infekcija. Za većinu bolesnika u ovom radu su bili dostupni samo jedan uzorak seruma i CSL-a.

Rezultati ovog istraživanja potvrdili prisutnost TAHV na području Hrvatske. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja na velikom uzorku simptomatskih i asimptomatskih osoba iz različitih geografskih područja kako bi se odredila točna (sero)prevalencija i klinički značaj ove zanemarene arbovirusne infekcije u populaciji Hrvatske.

7. Zaključci

1. Kliničke prezentacije bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom hospitaliziranih u razdoblju od 2017. do 2021. godine bile su meningitis (64,7%), meningoencefalitis (25,7%), mijelitis (3,7%) i febrilna glavobolja (5,9%).
2. TAHV NT protutijela dokazana su u uzorcima seruma 22 (10,1%) bolesnika što ukazuje na izloženost virusu.
3. U dva bolesnika s meningitisom, TAHV NT protutijela dokazana su i u CSL što uz visok titar protutijela u serumu upućuje na nedavnu TAHV infekciju.
4. TAHV seroprevalencija se značajno razlikovala između dobnih skupina: od 1,8% kod mlađih od 30 godina do 24,4% kod starijih od 70 godina ($p=0,001$).
5. Seropozitivitet se nije značajno razlikovao između muškaraca i žena (11,1% naspram 8,1%; $p=0,485$), između stanovnika prigradskih i seoskih područja te gradskih središta (10,5% naspram 9,8%; $p=0,882$) te s obzirom na kliničku sliku (8,5%-15,4%; $p=0,702$).
6. Bolesnici stariji od 70 godina imaju značajno viši rizik za TAHV seropozitivitet u odnosu na bolesnike mlađe od 30 godina (OR=18,064, 95%CI=2,207-147,809; RR=13,902, 95%CI=1,851-104,393).
7. Spol i mjesto prebivališta (gradsko, prigradsko/seosko) nisu rizični čimbenici za TAHV seropozitivitet.

8. Zahvale

Najviše se želim zahvaliti svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Tatjani Vilibić Čavlek, na razumijevanju, pristupačnosti i susretljivosti te stručnoj i nesebičnoj pomoći pri pisanju ovog rada.

Hvala mojim roditeljima na podršci i strpljenju tijekom cijelog mog školovanja. Napokon je gotovo, barem za sada.

Na kraju, hvala mojim prijateljima i kolegama s kojima sam zajedno prošao kroz studij.

9. Popis literature

1. Bardos V, Danielova V. The Tahyna virus-a virus isolated from mosquitoes in Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1959;3:264-76.
2. Hubálek, Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res*. 2008;103(Suppl 1):S29-43. doi: 10.1007/s00436-008-1064-7.
3. ICTV. Genus: Orthobunyavirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/peribunyaviridae/1238/genus-orthobunyavirus.
4. Contigiani M, Díaz L, Tauro L. Bunyaviruses. U: Brisola Marcondes C, ur. *Arthropod Borne Disease*. Cham: Springer; 2017. Str. 137-54.
5. Hopkins FR, Álvarez-Rodríguez B, Heath GR, Panayi K, Hover S, Edwards TA, Barr JN, Fontana J. The Native Orthobunyavirus Ribonucleoprotein Possesses a Helical Architecture. *mBio*. 2022 Jun 28:e0140522. doi: 10.1128/mbio.01405-22. [Epub ahead of print].
6. Elliott RM. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(10):673-85. doi: 10.1038/nrmicro3332.
7. Punda-Polić V, Vilibić Čavlek T. Bunyavirusi. U: Kalenić S, i sur., ur. *Medicinska mikrobiologija*. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 508-13.
8. Evans AB, Peterson KE. Throw out the Map: Neuropathogenesis of the Globally Expanding California Serogroup of Orthobunyaviruses. *Viruses*. 2019;11(9):794. doi:10.3390/v11090794.
9. Hubálek Z, Zeman P, Halouzka J, Juricová Z, Stovícková E, Bálková H, Sikutová S, Rudolf I. Antibodies against mosquito-borne viruses in human population of an area of Central Bohemia affected by the flood of 2002. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2004;53(3):112-20.
10. Hubalek Z, Sebesta O, Pesko J, Betasova L, Blazejova H, Venclikova K, Rudolf I. Isolation of Tahyna Virus (California Encephalitis Group) From *Anopheles hyrcanus* (Diptera, Culicidae), a Mosquito Species New to, and Expanding in, Central Europe. *J Med Entomol*. 2014;51(6):1264-7. doi: 10.1603/ME14046.
11. Camp JV, Haider R, Porea D, Oslobanu LE, Forgách P, Nowotny N. Serological surveillance for Tahyna virus (California encephalitis orthobunyavirus, Peribunyaviridae) neutralizing antibodies in wild ungulates in Austria, Hungary and Romania. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(4):459-63. doi: 10.1111/zph.12457.

12. Atkinson B, Hewson R. Emerging arboviruses of clinical importance in Central Asia. *J Gen Virol*. 2018;99(9):1172-84. doi: 10.1099/jgv.0.001125.
13. Bárdos V, Sixl W, Wisidagama CL, Halouzka J, Stünzner D, Hubálek Z, Withalm H. Prevalence of arbovirus antibodies in sera of animals in Sri Lanka. *Bull World Health Organ*. 1983;61(6):987-90.
14. Arunagiri CK, Perera LP, Abeykoon SB, Peiris JS. A serologic study of California serogroup bunyaviruses in Sri Lanka. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(3):377-82. doi: 10.4269/ajtmh.1991.45.377.
15. Lu Z, Lu XJ, Fu SH, Zhang S, Li ZX, Yao X, i sur. Tahyna virus and human infection, China. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(2):306-9. doi: 10.3201/eid1502.08072.
16. Li W, Cao Y, Fu S, Wang J, Li M, Jiang S, i sur. Tahyna virus infection, a neglected arboviral disease in the Qinghai-Tibet Plateau of China. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014;14(5):353-7. doi: 10.1089/vbz.2013.1351.
17. Hubálek Z, Zeman P, Halouzka J, Juricová Z, Stovicková E, Bálková H, i sur. Mosquitoborne viruses, Czech Republic, 2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(1):116-8. doi: 10.3201/eid1101.040444.
18. Xia H, Wang Y, Atoni E, Zhang B, Yuan Z. Mosquito-Associated Viruses in China. *Virol Sin*. 2018;33(1):5-20. doi: 10.1007/s12250-018-0002-9.
19. Camp JV, Kniha E, Obwaller AG, Walochnik J, Nowotny N. The transmission ecology of Tahyna orthobunyavirus in Austria as revealed by longitudinal mosquito sampling and blood meal analysis in floodplain habitats. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):561. doi: 10.1186/s13071-021-05061-1.
20. Hubálek Z. History of Arbovirus Research in the Czech Republic. *Viruses*. 2021;13(11):2334. doi: 10.3390/v13112334.
21. Turković B, Brudnjak Z. Arboviruses in Croatia. *Acta Med Croatica*. 1998;52(2):87-9.
22. Vesenjāk-Hirjan J, Galinović-Weisglass M, Urlić V, Bendiš M, Miović P, Vujošević N, i sur. Occurrence of arboviruses in the Middle and the South Adriatic (Yugoslavia). In *Arboviruses in the Mediterranean Countries*; Vesenjāk-Hirjan J. Ed. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart, Germany; New York, NY, USA, 1980; Str. 303–310.
23. Madić J, Huber D, Lugović B. Serologic survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *J Wildl Dis*. 1993;29(4):572-6. doi: 10.7589/0090-3558-29.4.572.

24. Bardos V, Sefcovicova L. The presence of antibodies neutralizing Tahyna virus in the sera of inhabitants of some European, Asian, African and Australian countries. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1961;5:501-4.
25. Kolman JM, Kopecký K, Rác O. Serologic examination of human population in South Moravia (Czechoslovakia) on the presence of antibodies to arboviruses of the Alfavirus, Flavivirus, Turlock groups and Bunyamwera supergroup. *Folia Parasitol (Praha)*. 1979;26(1):55-60.
26. Heinz F, Asera J. Presence of viruse-neutralizing antibodies of the Tahyna virus in the inhabitants of North Moravia. *Folia Parasitol (Praha)*. 1972;19(4):315-20.
27. Hubálek Z, Halouzka J, Juricová Z, Příkazský Z, Záková J, Sebesta O. Surveillance of mosquito-borne viruses in Breclav after the flood of 1997. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 1999;48(3):91-6.
28. Avšič-Županc T. Medically important arboviruses in Slovenia. *Zdrav Vestn*. 1995;64:15-9. (In Slovenian)
29. Kuniholm MH, Wolfe ND, Huang CY, Mpoudi-Ngole E, Tamoufe U, LeBreton M, i sur. Seroprevalence and distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae arboviral infections in rural Cameroonian adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(6):1078-83.
30. Lv Z, Fu SH, Wang FT, Kosoy OL, Nasci RS, Liang GD. Investigation of Tahyna virus infection among unknown fever cases in Xinjiang, China. *Bing Du Xue Bao*. 2011;27(1):71-4.
31. Barakat AM, Smura T, Kuivanen S, Huhtamo E, Kurkela S, Putkuri N, i sur. The Presence and Seroprevalence of Arthropod-Borne Viruses in Nasiriyah Governorate, Southern Iraq: A Cross-Sectional Study. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(4):794-9. doi: 10.4269/ajtmh.15-0622.
32. Arbovirus Surveillance Project. Institut Pasteur du Laos. Available from: <https://www.pasteur.la/project-carried-on-in-the-lab-2016-2017-lao-fr1/research-and-development/>, accessed on 5 May 2022.
33. Sonnleitner ST, Lundström J, Baumgartner R, Simeoni J, Schennach H, Zelger R, i sur. Investigations on California serogroup orthobunyaviruses in the Tyrols: first description of Tahyna virus in the Alps. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2014;14(4):272-7. doi: 10.1089/vbz.2013.1360.

34. Glinskikh NP, Fedotova TT, Pereskokova IG, Mel'nikov VG, Volkova LI. The potentials for the comprehensive diagnosis of viral encephalitis in Sverdlovsk Province. *Vopr Virusol.* 1994;39(4):190-1.
35. Zelená H, Januska J, Raszka J. Micromodification of virus-neutralisation assay with vital staining in 96-well plate and its use in diagnostics of Tahyna virus infections. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2008;57(3):106-10.
36. Sudarić Bogojević M, Merdić E, Bogdanović T. The flight distances of floodwater mosquitoes (*Aedes vexans*, *Ochlerotatus sticticus* and *Ochlerotatus caspius*) in Osijek, Eastern Croatia. *Biologia (Bratislava).* 2011;66(4):678-83. doi:10.2478/s11756-011-0073-7.
37. European Centre for Disease Prevention and Control and European Food Safety Authority. Mosquito maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2021. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>, accessed on 2 June 2022.
38. Merdić E, Lovaković T. Population dynamic of *Aedes vexans* and *Ochlerotatus sticticus* in flooded areas of the River Drava in Osijek, Croatia. *J Am Mosq Control Assoc.* 2001;17(4):275-80.
39. 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. doi: 10.3390/tropicalmed6030140.
40. Vilibic-Cavlek T, Barbic L, Mrzljak A, Brnic D, Klobucar A, Ilic M, i sur. Emerging and Neglected Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. *Pathogens.* 2021;10(1):73. doi: 10.3390/pathogens10010073.

10. Životopis

Rođen sam 28.08.1995. godine u Zagrebu gdje sam stekao osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje. Maturirao sam 2014. godine u XV. gimnaziji i iste godine upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom akademske godine 2015./2016. sudjelovao sam aktivno u djelovanju Studentske sekcije za fiziologiju sporta. Tijekom akademske godine 2019./2020. sam obnašao funkciju asistenta predsjednika podružnice u studentskoj udruzi CroMSIC. Iste akademske godine sam sudjelovao u objavljivanju rada „Prediktori akutnih egzacerbacija KOPB-a“. Aktivno govorim engleski jezik iz kojeg imam C1 certifikat te posjedujem osnovno znanje njemačkog i španjolskog jezika.