

Epidemiološke i epizootiološke značajke infekcije virusom hepatitisa E na području kontinentalne Hrvatske

Jeličić, Pavle

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:105:976878>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-07**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Pavle Jeličić

Epidemiološke i epizootičke značajke infekcije
virusom hepatitisa E na području kontinentalne
Hrvatske

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

Sveučilište u Zagrebu
Medicinski fakultet

Pavle Jeličić

Epidemiološke i epizootiološke značajke infekcije
virusom hepatitisa E na području kontinentalne
Hrvatske

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, Hrvatskom veterinarskom institutu te Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Mentor rada: Izv.prof.dr.sc. Tatjana Vilibić Čavlek

Komentor rada: Izv.prof.dr.sc. Lorena Jemeršić

ZAHVALE

Zahvaljujem svojim mentoricama, izv.prof.dr.sc. Tatjani Vilibić Čavlek i izv.prof.dr.sc. Loreni Jemeršić, na stručnom vodstvu, edukaciji, vremenu i dobroti koje su nesebično darovale proteklih šest godina.

Hvala prof.dr.sc. Ljubi Barbiću, izv.prof.dr.sc. Vladimiru Stevanoviću i doc.dr.sc. Nataši Janev Holcer na sveobuhvatnoj pomoći i stručnim savjetima.

Hvala kolegama prof.dr.sc. Vlatki Brumen, doc.dr.sc. Maji Vilibić, dr.sc. Nenadu Pandaku i Blaženki Sumpor, mag.med.techn. na pomoći u prikupljanju uzoraka te dr.sc. Jeleni Prpić na pomoći u molekularnoj dijagnostici.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegicama i kolegama iz Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, Službe za zdravstvenu ekologiju i Odjela za virološku serologiju te izv.prof.dr.sc. Krunoslavu Capaku.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito supruzi Tanji i kćerima Mili i Niki, na podršci, ohrabrenju i ljubavi bez čega izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

Od srca zahvaljujem svima koji su mi bili pomoć na putu.

Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima Jasni i Milanu.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. GRAĐA I UMNOŽAVANJE VIRUSA HEPATITISA E	2
1.1.1. Građa virusa hepatitisa E.....	2
1.1.2. Umnožavanje virusa hepatitisa E.....	3
1.2. GENOTIPOVI VIRUSA HEPATITISA E.....	4
1.3. EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E	6
1.3.1. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa E u svijetu	6
1.3.2. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa E u Hrvatskoj	7
1.3.3. Putevi prijenosa infekcije virusom hepatitisa E.....	9
1.4. PATOGENEZA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E	10
1.4.1. Patogeneza fulminantnog hepatitisa	11
1.5. KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E.....	12
1.6. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA INFEKCIJU VIRUSOM HEPATITISA E	14
1.7. DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E	15
1.7.1. Serološka dijagnostika infekcije virusom hepatitisa E	15
1.7.2. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitisa E	16
1.8. LIJEČENJE HEPATITISA E	18
1.8.1. Liječenje akutnog hepatitisa E	18
1.8.1.1. Liječenje trudnica.....	18
1.8.2. Liječenje kroničnog hepatitisa E.....	19
1.9. CJEPIVO PROTIV HEPATITISA E.....	20
2. HIPOTEZA.....	21
3. CILJEVI RADA.....	22
3.1. OPĆI CILJEVI:.....	22
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:	22
4. MATERIJALI I METODE (ISPITANICI - UZORAK)	23
4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA.....	23
4.2. ISPITIVANA POPULACIJA	23
4.3. VELIČINA UZORKA	23
4.3.1. Veličina uzorka po populacijskoj skupini	24
4.3.2. Veličina uzorka životinja.....	25
4.4. METODE	27

4.4.1.	Anketni upitnik.....	27
4.4.2.	Dijagnostika virusa hepatitisa E	29
4.4.3.	Statistička obrada rezultata.....	38
5.	REZULTATI	39
5.1.	HEV SEROPREVALENCIJA KOD PROFESIONALNO IZLOŽENIH I NEIZLOŽENIH OSOBA.....	39
5.2.	HEV PREVALENCIJA U KONJA, PASA I MAČAKA	55
6.	RASPRAVA	58
7.	ZAKLJUČCI	66
8.	SAŽETAK.....	69
9.	SUMMARY.....	70
10.	POPIS LITERATURE	71
11.	BIOGRAFIJA	87

POPIS OZNAKA I KRATICA

HEV - virus hepatitisa E

RNK - ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic Acid*)

HIV - virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)

IgM - imunoglobulini klase M

IgG - imunoglobulini klase G

RH - Republika Hrvatska

HELS - zdravlje-okoliš-životni stil (engl. *Health-Environment-Life Style*)

HZJZ - Hrvatski zavod za javno zdravstvo

KBC - Klinički bolnički centar

ŠNZ - Škola narodnog zdravlja

ELISA - imunoenzimski test (engl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

ORF - otvoreno područje kodiranja (eng. *Open Reading Frame*)

RT-PCR - lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)

RdRp - RNK-ovisna RNK polimeraza (engl. *RNA-dependent RNA polymerase*)

HVR - hipervarijabilna regija

MT - metil transferaza

PCP - papainu-nalik cisteinska proteaza

HSPG - heparan sulfatni proteoglikan

POR - prevalencijski omjer izgleda (engl. *Prevalence Odds Ratio*)

PR - omjer prevalencija (engl. *Prevalence Ratio*)

1. UVOD I SVRHA RADA

Virus hepatitisa E (HEV) je mali, neovijeni virus koji pripada porodici *Hepeviridae*, unutar koje razlikujemo dva roda: *Orthohepevirus* (razreda A, B, C i D) te *Piscihepevirus* [1]. Sojevi roda *Orthohepevirus* razreda A su ujedno i najznačajniji s javnozdravstvenog aspekta. Uzrokuju epidemijske, endemijske, sporadične i zoonotske slučajeve akutnog hepatitisa diljem svijeta [2]. Do sada je opisano osam genotipova HEV-a koji su pripadnici roda *Orthohepevirus*, razreda A. Genotipovi 1 (HEV1) i 2 (HEV2) inficiraju isključivo ljude, dok su genotipovi 3 (HEV3) i 4 (HEV4) izolirani iz ljudi i različitih vrsta sisavaca, posebice domaćih svinja, divljih svinja, jelena i zečeva [3]. Genotipovi 5 (HEV5) i 6 (HEV6) su izolirani iz divljih svinja, a genotipovi 7 (HEV7) i 8 (HEV8) su izolirani iz deva [4]. Novi genotipovi HEV se i dalje izdvajaju prvenstveno iz životinja, a njihov utjecaj na zdravlje životinja, kao i zoonotski potencijal, još nije poznat.

HEV je otkriven za vrijeme sovjetske okupacije Afganistana 1980-ih, nakon što je u vojnom kampu izbila epidemija hepatitisa nepoznate etiologije. Kako bi dokazao da se radi o novom uzročniku hepatitisa, član istraživačkog tima je pojeo ekstrakt fekalija zaraženih vojnika nakon čega je i on sam razvio simptome hepatitisa. Iz njegove stolice je tada elektronskom mikroskopijom otkriven novi virus koji nazvan HEV [2]. Nakon toga, endemski HEV dokazan je u mnogim zemljama u razvoju.

HEV je danas vodeći uzročnik virusnog hepatitisa u Svijetu te je odgovoran za enterične epidemije u zemljama u razvoju i sporadične slučajeve kako u zemljama u razvoju tako i u razvijenim zemljama [5]. Virus se uglavnom prenosi kontaminiranom vodom za piće i/ili konzumacijom kontaminiranog i nedovoljno termički obrađenog mesa. Isto tako, postoje zapisi o prijenosu infekcije putem kontaminiranog povrća s ekoloških uzgoja obrađenih svinjskim gnojem [6,7].

HEV1 i HEV2 prevladavaju u zemljama u razvoju, dok su ostali genotipovi, uključujući HEV3 i HEV4, izdvojeni i iz životinja, pri čemu su svinje glavni rezervoari infekcije. Genotipovi HEV5-8 su izolirani isključivo iz životinja (HEV5 i HEV6 iz divljih svinja, a HEV7 i HEV8 iz deva). Iako je tijekom bolesti najčešće asimptomatski, HEV uzrokuje akutni hepatitis koji može biti težeg tijeka kod pacijenata s postojećom bolešću jetre i kod trudnica u zemljama u razvoju. Tijek i ishod bolesti uvelike ovise i o genotipu virusa koji je uzrokovao infekciju, odnosno o njegovoj virulenciji. Genotipovi

3 i 4 najčešće uzrokuju blaži oblik infekcija koje mogu imati i van-hepatičke manifestacije te mogu dovesti do kroničnog hepatitisa u bolesnika s kompromitiranim imunitetom [8-11]

Kako epidemiološke i epizootiološke značajke HEV infekcije još uvijek nisu dovoljno istražene, spoznaje o HEV prevalenciji u Hrvatskoj u specifičnim populacijskim skupinama i analiza čimbenika rizika unutar ispitivanih skupina, kao i istraživanje prevalencije u do sada neistraženih vrsta životinja, poput konja i pasa te njihova međuovisnost u ovom radu bit će originalni znanstveni doprinos epidemiologiji i epizootiologiji HEV infekcije u Hrvatskoj i svijetu, a omogućit će planiranje posebnih preventivnih javnozdravstvenih mjera.

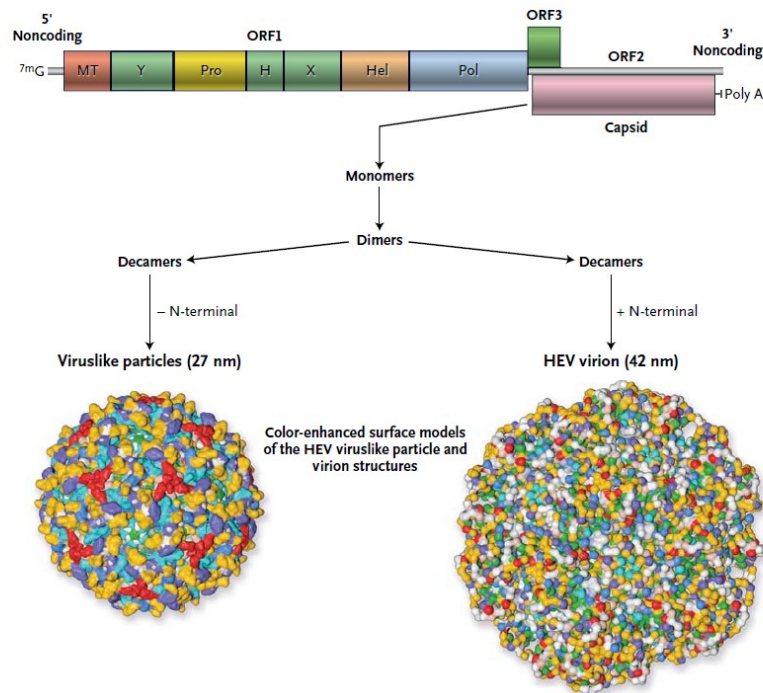
1.1. GRAĐA I UMNOŽAVANJE VIRUSA HEPATITISA E

1.1.1. Građa virusa hepatitisa E

HEV je neovijeni virus promjera 27-34 nm. Ispod vanjske kapside virusa nalazi se jednolančana pozitivna molekula RNK duljine 7,2 kb koja završava kratkim 5' i 3' nekodirajućim regijama između kojih su prepoznata tri djelomično preklapajuća otvorena područja kodiranja (engl. *open reading frame*; ORF1, 2 i 3) [12]. Pojedini sojevi HEV1 genotipa sadrže i dodatni ORF4, čiji proteinski proizvod pojačava djelovanje RNK-ovisne RNK polimeraze (engl. *RNA-dependent RNA polymerase*; RdRp). Genom virusa sadrži i X, Y te hipervarijabilnu regiju (HVR) koje sudjeluju u replikaciji virusa (slika 1) [13].

ORF1 čini najduži dio genoma (5kb) i kodira nestrukturane proteine, prvenstveno odgovorne za vezanje virusa na stanične receptore i replikaciju virusa. ORF1 kodira metil transferazu (MT), papainu-nalik cisteinsku proteazu (PCP), RNK helikazu (Hel) i RdRp. ORF1 kodira i manje proteine do danas nedovoljno poznatih funkcija X, Y i HVR. Dokazano je da X i HVR utječu na patogenost virusa, dok je Y domena postojana i jednaka u svih HEV genotipova. ORF2 kodira strukturni kapsidni protein. ORF3 kodira mali protein koji ima više funkcija, a koji ujedno omogućuje izlazak virusa iz stanice. Na kraju 5' RNK genoma se nalazi 7-metilguanozin (7mG), a 3' kraj je poliadeniliran (poli A). Sastavljanje viriona započinje stvaranjem kapsidnih monomera (sa ili bez regije N-kraja), koja se samostalno povezuje u dimere i dekamere. Dekameri kojima

nedostaje kapsidni N-kraj sastavljaju se u provirusne čestice, a dekameri pune duljine koji uključuju i kapsidni N-kraj enkapsuliraju virusnu RNK te tvore virione pune veličine.



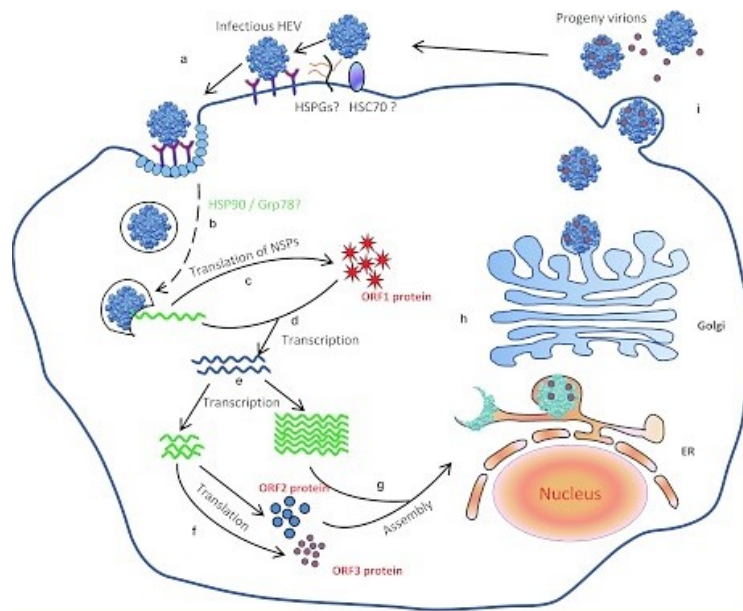
Slika 1. Struktura i organizacija genoma virusa hepatitisa E

Izvor: Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, i sur. Hepatitis E. Lancet. 2012;379:2477-88.

1.1.2. Umnožavanje virusa hepatitisa E

U procesu umnožavanja HEV-a, prvi korak je vezivanje virusa za receptore stanica domaćina poput heparan sulfatnih proteoglikana (HSPG), a posebice proteoglikana Hsc70. Potom virus ulazi u stanicu [13-17], vrlo vjerojatno uz pomoć HSPG90 i glukozom reguliranog proteina 78 (Grp78). Nakon ulaska u stanicu, dolazi do razgradnje kapside i oslobađa se virusni genom koji se potom u citoplazmi stanice domaćina izravno veže na ribosome i prevodi u poliprotein, koji se cijepa u strukturne i nestrukturne proteine ORF1. Među tim proteinima nastaje i RdRp koja transkripcijom pozitivnog lanca RNK stvara negativnu kopiju RNK koja služi kao predložak za sintezu pozitivnog lanca RNK genoma. Dio novih molekula RNK nisu cjelovite već subgenomske i služe za translaciju proteina koji kodiraju regije ORF2 i ORF3 poput

viroporina i proteina kapside koji onda u polimernom obliku obuhvaćaju drugi dio molekula RNK koje su cjelovite, stvarajući nove viruse. Novonastali se virusi potom transportiraju do stanične membrane gdje uz pomoć proteina kodiranog od ORF3 napuštaju zaraženu stanicu domaćina (slika 2) [18,19].



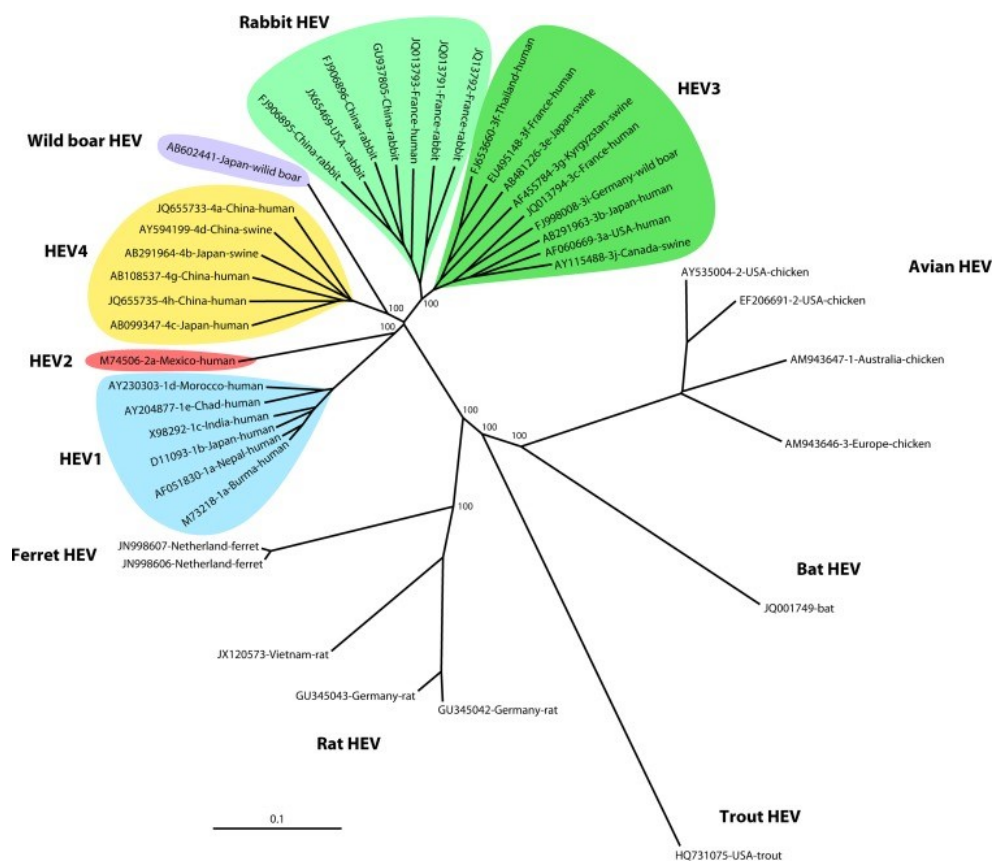
Slika 2. Životni ciklus virusa hepatitisa E

Izvor: Cao D, Meng XJ. Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerg Microbes Infect.* 2012;1(8):e17.

1.2. GENOTIPOVI VIRUSA HEPATITISA E

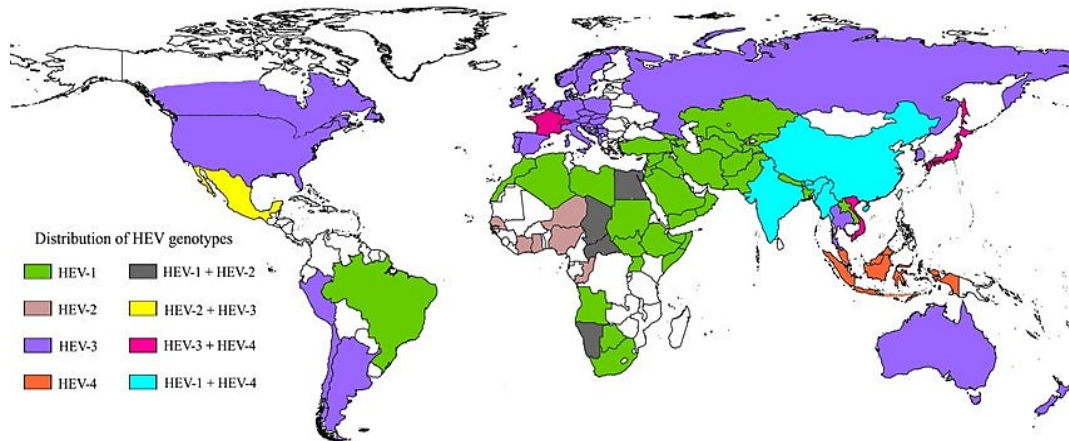
Identifikacijom sve većeg broja sojeva HEV-a u različitim domaćina došlo se do taksonomske sheme koja porodicu *Hepeviridae* dijeli na dva roda: *Piscihepevirus* (virus izdvojen iz pastreve) i *Ortohepevirus* (sojevi sisavaca i ptica) (slika 3) [20,21]. Ovaj je posljednji rod podijeljen u četiri vrste, ortohepevirus A, ortohepevirus B (koji inficira ptice), ortohepevirus C (koji inficira glodavce, kukcojede i mesojede) i ortohepevirus D (koji inficira šišmiše). Najveća vrsta, ortohepevirus A, uključuje osam genotipova koji inficiraju ljude (HEV1-4 i 7), svinje (HEV3 i 4), zečeve (HEV3), divlje svinje (HEV3, 4, 5, i 6), mungose (HEV3), jelene (HEV3), jastrebove (HEV4) i deve (HEV7 i 8) [4]. Među četiri glavna genotipa, HEV1 i HEV2 ograničeni su na ljude i nalaze se u zemljama u razvoju, odnosno endemski su u krajevima tropske Azije, Afrike i Južne Amerike te se obično prenose fekalno-oralnim putem. HEV3 je široko

rasprostranjen diljem svijeta, a HEV4 se nalazi uglavnom u Aziji (slika 4), premda postoje slučajevi prijavljeni i u Europi, moguće uneseni uvoznom hranom. Genotipovi HEV3 i HEV4 prenose se zoonotski od svinja, divljih svinja, jelena i mungosa njihovim izlučevinama ili konzumacijom termički nedovoljno obrađenog mesa [22]. Zečji sojevi koji su srodni HEV3 genotipu nedavno su opisani kod ljudi [23]. Dokazano je da primatelj transplantirane jetre koji je konzumirao devino meso i mlijeko izlučuje HEV7 [24]. Prijenos HEV-a s tvorova, štakora, šišmiša, ptica ili pastreve nije dokazan [22].



Slika 3. Filogenetsko stablo virusa hepatitisa E

Izvor: Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. Clin Microbiol Rev. 2014;27(1):116-38.



Slika 4. Raspodjela genotipova virusa hepatitisa E

Izvor: Pallerla SR, Harms D, Johne R, Todt D, Steinmann E, Schemmerer M, i sur. Hepatitis E Virus Infection: Circulation, Molecular Epidemiology, and Impact on Global Health. *Pathogens*. 2020;9(10):856.

1.3. EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E

1.3.1. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa E u svijetu

HEV je uzročnik feko-oralno prenosivog hepatitisa te je odgovoran za više od 50% slučajeva akutnog hepatitisa u endemskim zemljama [3]. Najveća incidencija dokazana je u Aziji, Africi i Srednjoj Americi (Meksiko), gdje je HEV vodeći uzročnik akutnih hepatitisa [2]. Procjenjuje se da godišnje 3,4 milijuna ljudi oboli od akutnog HEV-a, sa 70.000 smrtnih slučajeva i 3.000 mrtvorođenih [25]. Sporadični slučajevi HEV-a u zapadnim europskim zemljama su ranije većinom bili bilježeni u putnika koji se vraćaju iz endemskih područja [26]. Međutim, sve su češći autohtoni, sporadični slučajevi HEV-a u razvijenim državama Europe, Azije (Japan), Australiji i Sjedinjenim Američkim Državama [27].

Istraživanja su utvrdila povezanost zemljopisnog prebivališta s HEV infekcijom [28,29]. Prema dostupnim podacima, seroprevalencija varira od 3,4% u Japanu [30], 10,4% u Indiji [31], 13% u Iranu i Ujedinjenom Kraljevstvu [32,33] pa sve do 25% u Kini [34]. Prevalencija se također razlikuje u pojedinim populacijskim skupinama. Istraživanje iz Francuske pokazalo je viši HEV seropozitivitet u šumskih radnika (31%) pri čemu se pokazalo da su posebice drvosječe pod povećanim rizikom [35]. Slično je

istraživanje provedeno u Njemačkoj u populaciji lovaca, pri čemu je nađena seroprevalencija od 21%, dok je u općoj populaciji iznosila 17% [34]. Studije provedene u Danskoj, Moldaviji i Švedskoj su pokazale da uzgajivači svinja imaju visok HEV seropozitivitet (13%-51,1%) [35-36], dok istraživanje iz Nizozemske pokazuje da je HEV seroprevalencija u veterinaru koji rade sa svinjama 13% [38]. Međutim, neka istraživanja nisu dokazala razliku u prevalenciji između profesionalno izloženih i neizloženih osoba. Tako npr. u Italiji nije nađena značajna razlika u prevalenciji HEV-a u uzgajivača svinja (3,3%) u odnosu na opću populaciju (2,9%) [39]. U Estoniji je viša prevalencija nađena u radnika na svinjogojkim farmama (13,4%), dok je u lovaca iznosila svega 4,2% [40]. Istraživanje provedeno u Portugalu pokazalo je čak nešto nižu prevalenciju HEV-a u veterinaru koji rade s malim životinjama (kućni ljubimci) (9,9%) u odnosu na opću populaciju (13,3%) [41].

Rizični čimbenici za HEV infekciju još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Prema podacima iz literature, čini se da češće obolijevaju muškarci, iako podaci o seroprevalenciji često ne pokazuju značajno odstupanje među spolovima [2,42]. No, u nekim je radovima opisana nešto viša prevalencija u žena [43]. Pojedini su autori dokazali višu prevalenciju u stanovnika ruralnih područja [44,45], dok drugi nisu našli povezanost prebivališta i HEV seroprevalencije [46,47]. Korištenje bunara kao izvora vode je dokazano kao čimbenik rizika za HEV infekciju u nekim zemljama [44], dok u drugima to nije potvrđeno [48]. U jednoj je studiji nađena viša prevalencija HEV IgM protutijela u osoba koje su primale transfuzije krvi, dok se prevalencija HEV IgG protutijela nije razlikovala [44]. Španjolski su autori opisali višu IgG prevalenciju u osoba koje su imale operativne zahvate u anamnezi [46].

1.3.2. Seroprevalencija infekcije virusom hepatitisa E u Hrvatskoj

U Hrvatskoj je prvi autohtoni slučaj HEV-a opisan u Zagrebu 2012. godine [49]. Na području Hrvatske je do sada objavljeno nekoliko istraživanja HEV prevalencije u specifičnim populacijskim skupinama (tablica 1). Istraživanje provedeno u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu dokazalo je HEV IgM/IgG protutijela u 10,7% u bolesnika s povišenim vrijednostima transaminaza u kojih je isključen akutni hepatitis A-C te u 1,1% u HIV-pozitivnih osoba [50]. Pilot istraživanje provedeno 2014. godine u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u manjoj skupini profesionalno

neizloženih osoba pokazalo je seroprevalenciju od 5,6% [51]. Nadalje, u Klinici za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“ u Zagrebu je od 2011. do 2014. godine testirano 1107 bolesnika na HEV, pri čemu je anti-HEV-protutijela imalo njih 117 (10,6%). Akutna HEV-infekcija dokazana je u 25 (2,3%) bolesnika [52]. HEV IgM/IgG seroprevalencija među dobrovoljnim darivateljima analizirana je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu 2014. godine. U istraživanje je uključeno 1036 dobrovoljnih darivatelja krvi pri čemu je 20,2% ispitanika bilo pozitivno na HEV IgG protutijela, a 4,4% na IgM protutijela [53]. Istraživanje, provedeno u 2018. godini, na 394 bolesnika na hemodijalizi pokazalo je seropozitivitet od 27,9% na HEV IgG protutijela te 0,04% na HEV IgM protutijela [54] dok je istraživanje na 438 bolesnika s kroničnom bolesti jetre pokazalo seropozitivitet od 15,1% na HEV IgG protutijela te 4,5% na HEV IgM protutijela [55].

Tablica 1. Seroprevalencija HEV-a na području Hrvatske

Godina	Populacijska skupina	N testiranih	HEV IgM i/ili IgG	HEV RNK	Izvor
2011-2013	Bolesnici s akutnim hepatitisom	504	IgM/IgG 10,7%	5/14 IgM pozitivnih	[50]
	HIV-pozitivne osobe	88	IgM/IgG 1,1%	0	
2011-2014	Bolesnici s akutnim hepatitisom	1107	IgG 10,6% IgM 2,3%	10/25 IgM pozitivnih	[52]
2014	Dobrovoljni darivatelji krvi	1036	IgG 20,2% IgM 4,4%	0	[53]
2014-2015	Zdravstveni djelatnici	214	IgM/IgG 2,7%	0	[51]
	Sudionici domovinskog rata		IgM/IgG 8,6%		
	Ovisnici o alkoholu		IgM/IgG 8,9%		
	Intravenski korisnici droga		IgM/IgG 6,1%		
2018	Bolesnici na hemodijalizi	394	IgG 27,9% IgM 0,04%	0	[54]
2019	Bolesnici s transplantiranom jetrom	242	IgG 24,4%	0	[56]
2020	Bolesnici s kroničnom bolesti jetre	438	IgG 15,1% IgM 4,5%	0	[55]

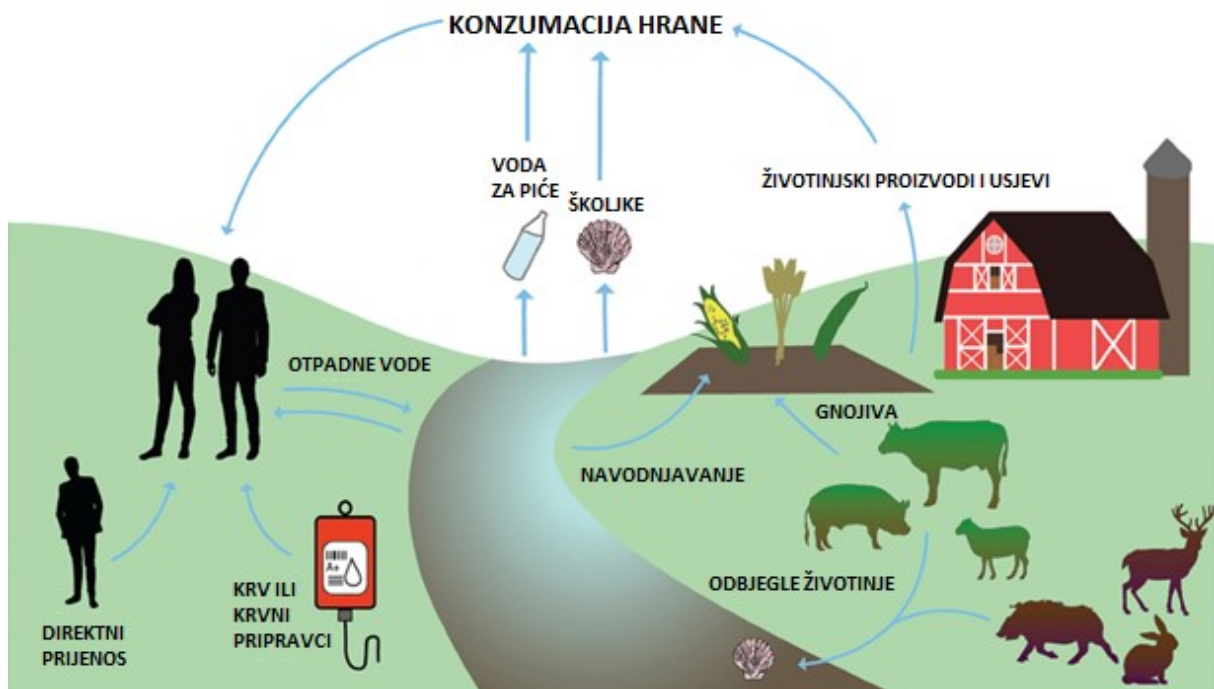
Također su izrađene i smjernice za dijagnostiku i liječenje imunokompetentnih i imunokompromitiranih osoba te je obzirom na utvrđenu seroprevalenciju i dotadašnja iskustva, zaključeno da testiranje na HEV treba uvrstiti u dijagnostički panel za bolesnike s povišenim vrijednostima aminotransferaza [52]. Rizični čimbenici za HEV infekciju, mogući izvori infekcije kao i uloga zoonotskog prijenosa su do sada djelomično istraženi na području Hrvatske [57-61]. Naime, iako su rađena opsežna istraživanja u životinja te su domaća i divlja svinja dokazano rezervoari HEV infekcije, ostaje mogućnost prepoznavanja i drugih vrsta životinja koje do danas na području Republike Hrvatske (RH) nisu istražene, kao što su kućni ljubimci (psi i mačke) te konji. Podaci o prevalenciji u tih životinja omogućili bi bolje razumijevanje epidemiološke situacije i potencijalnih izvora HEV infekcije u RH.

1.3.3. Putevi prijenosa infekcije virusom hepatitisa E

HEV se uglavnom prenosi feko-oralnim putem kao posljedica fekalne kontaminacije vode za piće, no može se prenijeti i konzumacijom mesa zaraženih životinja, transfuzijom zaražene krvi/krvnih pripravaka te vertikalnim prijenosom s trudnice na fetus [2]. U zemljama u razvoju, zagađena voda uzrokuje velike epidemije HEV gdje su, najzastupljeniji, HEV1 i HEV2 ograničeni na ljude [62]. U razvijenim dijelovima Svijeta, a tako i u Europi, su zastupljeniji genotipovi HEV3 i HEV4 koji se pretežno prenose zoonotski konzumacijom svinjskog mesa i mesa divlje svinje ili putem njihovih izlučevina [63]. Tijek i ishod bolesti, kao i načini širenja uvelike ovise o genotipu virusa.

Donedavno se zaraza HEV-om povezivala samo s putovanjem u endemske krajeve. Pojava autohtonih slučajeva HEV-a u neendemskim područjima promijenila je epidemiološku sliku uključivši nove moguće rezervoare te putove širenja HEV-a. Detekcija genotipova 3 i 4 u ljudi ukazala je na zoonotsko podrijetlo infekcije [64]. Gotovo sve autohtone HEV infekcije u Europi u ljudi i svinja uzrokovane su genotipom 3 [65-71]. Svinje su značajan rezervoar HEV-a posvuda u svijetu [65-67], a u Nepal su to i glodavci [71]. Prisutnost anti-HEV protutijela dokazana je i u drugim vrstama životinja: štakora, pasa, mačaka, ovaca, koza, konja, šišmiša, peradi (kokoš), mungosa, goveda, deva i riba (pastrve) [71]. HEV je dokazan u domaćih i divljih svinja u Hrvatskoj. Na svinjogojskim farmama, HEV RNK nađena je, ovisno o županiji, u

15,2% svinja, dok je u divljih svinja nađena u 11,5% pretraženih jedinki [59]. Seroprevalencija u domaćih svinja iznosi 32,9%, odnosno u divljih 31,1%. Neki radovi upućuju na prijenos virusa na ljude konzumiranjem nedovoljno termički obrađenog svinjskog mesa, posebice nekuhanih jetrenih svinjskih kobasica [66]. HEV RNK je u Hrvatskoj izdvojena i iz jetre žutoglog miša [60].



Slika 5. Putevi prijenosa virusa hepatitisa E

Prema: Treagus S, Wright C, Baker-Austin C, Longdon B, Lowther J. The Foodborne Transmission of Hepatitis E Virus to Humans. Food Environ Virol. 2021;13(2):127-45.

1.4. PATOGENEZA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E

Patogeneza hepatitisa E je slabo istražena te je naše trenutačno razumijevanje patogeneze HEV infekcije uglavnom temeljeno na podacima iz životinjskih modela i sustava staničnih kultura, uz neke dodatne informacije od ljudi, relativno nepotpuno [72]. Nakon ulaska u organizam kroz probavni sustav, putem kontaminirane hrane ili vode (feko-oralnim putem), virus se najprije umnožava u limfnom tkivu crijeva, a potom krvlju dopire u jetru. Nakon infekcije kod ljudi slijedi period inkubacije od 2 do 10 tjedana [73]. U tom periodu se HEV replicira u citoplazmi hepatocita, primarnom mjestu infekcije i oslobađa u žuč te izlučuje stolicom. Istraživanja na majmunima su pokazala

da se replikacija virusa u hepatocitima pojavljuje oko 7 dana nakon parenteralne inokulacije i zahvaća do 70-90% hepatocita [74]. Pretpostavlja se kako se replikacija nastavlja sve do nastanka oštećenja hepatocita, što naposljetku, kod ljudi, dovodi do pojave kliničke bolesti nakon prosječnog perioda inkubacije od 3 tjedna (raspon 2-10 tjedana). Viremija je kratkotrajna i pojavljuje se nekoliko dana prije pojave simptoma i doseže vrhunac s razinama serumskih transaminaza te traje 2-3 tjedna nakon toga i povezana je s fekalnim izlučivanjem HEV-a koje traje nešto dulje od viremije [75,75].

Oštećenje jetre uzrokovano HEV infekcijom može biti imuno posredovano citotoksičnim T stanicama i prirodnim ubilačkim stanicama, jer HEV nema citopatski učinak [77-79]. U životinjskim modelima HEV infekcije, čini se da se porast razine transaminaza u serumu i pojava ozljede jetre pojavljuju istovremeno s pojavom specifičnih protutijela i smanjenjem stupnja viremije. Ova otkrića upućuju na to da oštećenje hepatocita tijekom HEV infekcije može biti povezano s ubijanjem stanica zaraženih HEV-om imunološkim odgovorom domaćina, a ne izravnim učinkom replikacije virusa. Stoga je vjerojatno da intenzitet imunološkog odgovora domaćina određuje ishod akutne HEV infekcije, bilo da je riječ o supkliničkoj, samoograničavajućoj bolesti ili zatajenju jetre. U HEV3 infekciji, imunokompromitirane osobe, kao što su one koje primaju imunosupresivne lijekove nakon transplantacije solidnih organa, često ne uspijevaju eliminirati HEV i razviju kronični hepatitis E [77-79].

Kod svinja je utvrđeno da se osim stolicom virus izlučuje i putem mokraćnog sustava i drugih tjelesnih izlučevina [80].

1.4.1. Patogeneza fulminantnog hepatitisa

Fulminantni hepatitis najčešće se javlja kod muškaraca i žena koji boluju od kronične jetrene bolesti [81] te u trudnica [82].

Kod trudnica zaraženih s HEV1 koje žive u zemljama u razvoju, HEV1 uzrokuje višu smrtnost majki za 30%, pri čemu se većina smrtnih slučajeva događa u trećem tromjesečju trudnoće [83]. Razlog još uvijek nije jasan, ali bi genotip mogao barem djelomično objasniti lošiji ishod u trudnica, jer HEV3 nije osobito smrtonosan za trudnice [84,84]. Nema podataka o utjecaju infekcije uzrokovane s HEV4 genotipom na tijek trudnoće.

1.5. KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E

Klinička slika HEV infekcije razlikuje se ovisno o endemskom području i genotipu pa je tako u visoko endemskim područjima najčešći uzročnik virusnih hepatitisa HEV1 pri čemu klinička manifestacija infekcije varira od supkliničkih do fulminantnih hepatitisa. Po tome, s kliničkog stajališta, hepatitis E je sličan hepatitisu A, s akutnom samoograničavajućom i simptomatskom kliničkom slikom koja varira u težini, od supkliničkih do fulminantnih oblika [86].

U pravilu se u do 20% bolesnika infekcija očituje srednje teškim simptomima, no HEV1 može dovesti do smrtnog ishoda u 0,5 do 4% slučajeva. Inkubacija je u prosjeku oko 40 dana (15 do 60 dana), a početni simptomi su obično nespecifični - malaksalost, gubitak apetita, bol u mišićima, bol u abdomenu, vrućica, mučnina i povraćanje. Desetak dana nakon pojave općih simptoma može se razviti žutica uz taman urin i blijedu stolicu [87-89].

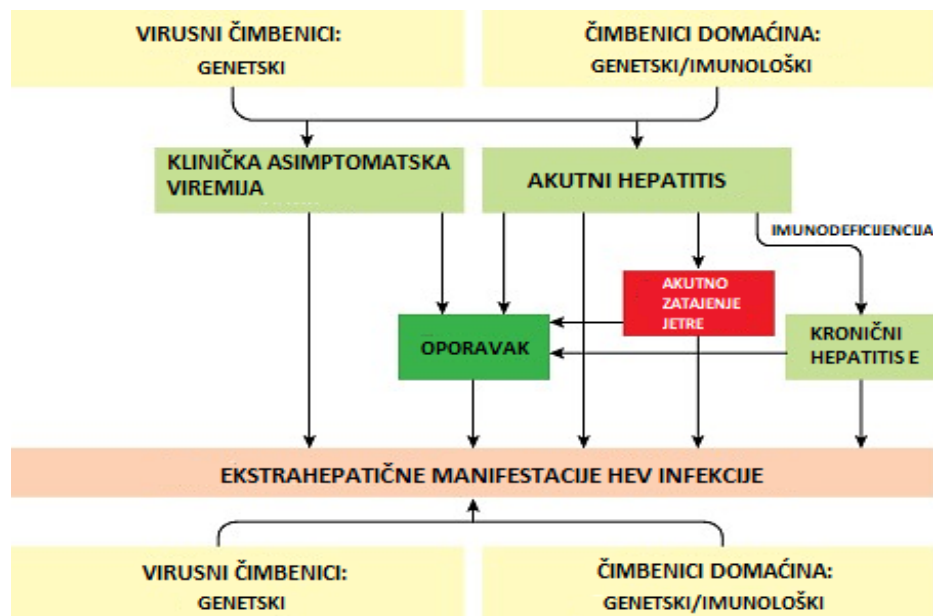
Viremija je prolazna te je prisutna u preikteričnoj fazi i nestaje brzo nakon prvih simptoma, odnosno nakon pojave protutijela, osim ukoliko bolest ne progredira u kronični oblik. Izlučivanje virusa stolicom započinje nekoliko dana (prosječno 5 dana) prije pojave žutice i traje oko 2-3 tjedna. Bolest obično prolazi za jedan do četiri tjedna [52].

Iako je većina HEV infekcija blagog kliničkog tijeka ili asimptomatska te prolazi spontano, neke mogu biti teške, uzrokujući fulminantni hepatitis i ekstrahepatične manifestacije, uključujući neurološke i bubrežne [83]. Kronična HEV infekcija može se pojaviti kod bolesnika s oslabljenim imunološkim sustavom. Iako je umor najčešći simptom kronične HEV infekcije, većina bolesnika nema simptoma i ima samo blago povišenje jetrenih enzima [90]. Ipak, kronične HEV infekcije mogu dovesti do oštećenja jetrene strukture, uključujući čvorove, fibrozne promjene i kasniju cirozu [91].

Većina HEV infekcija uzrokovanih genotipovima 3 i 4 protječe asimptomatski, dok je klinički simptomatska infekcija obično blažeg tijeka [25]. Donedavno se smatralo da HEV uzrokuje samo akutni hepatitis, ali je studija u Francuskoj pokazala da je 8 od 14 primatelja presatka organa s akutnom autohtonom HEV infekcijom uzrokovanom genotipom 3 razvilo kronični hepatitis [42]. Osim navedenog istraživanja, daljnje studije su također pokazale da kod imunokompromitiranih pacijenta HEV infekcija ne prolazi

samolimitirajući, već da isti mogu razviti kronični hepatitis i cirozu ako su zaraženi s HEV3 ili HEV4 genotipom [92,92]. Nasuprot tome, kronična HEV infekcija do sada nije primijećena u slučajevima zaraženim s HEV1 i HEV2 genotipom [92,94]. Slučajevi kroničnog HEV-a zabilježeni su i u osoba zaraženih HIV-om te osoba s tumorima hematopoetskog sustava [95-98]. Trudnice također predstavljaju rizičnu skupinu za HEV infekciju, posebice u slučaju infekcije u posljednjem tromjesečju trudnoće, budući da se češće razvija akutni fulminantni hepatitis [99] uz smrtnost od 15-25% [100], dok je smrtnost kod opće populacije 0,1-3% [101].

HEV infekcije ne utječu samo na jetru, već mogu utjecati i na druge organske sustave. Poremećaji kao što su Guillain-Barreov sindrom (GBS), neuralgična amiotrofija (NA), limfom, pankreatitis, trombocitopenija, virusni meningitis, tiroiditis, miokarditis, krioglobulinemija, glomerulonefritis, Henoch-Schönleinova purpura i miastenija gravis se također povezuju s HEV infekcijom [92]. Iako su neke serije slučajeva, životinjski modeli i seroepidemiološke studije ukazivale na povezanost između HEV infekcije i ekstrahepatičnih manifestacija, točni temeljni patofiziološki mehanizmi još nisu dokazani. Ipak, imunološki posredovane reakcije i izravno virusno (citopatsko) oštećenje tkiva najčešći su pretpostavljeni mehanizmi nastanka ekstrahepatičnih manifestacija [92].

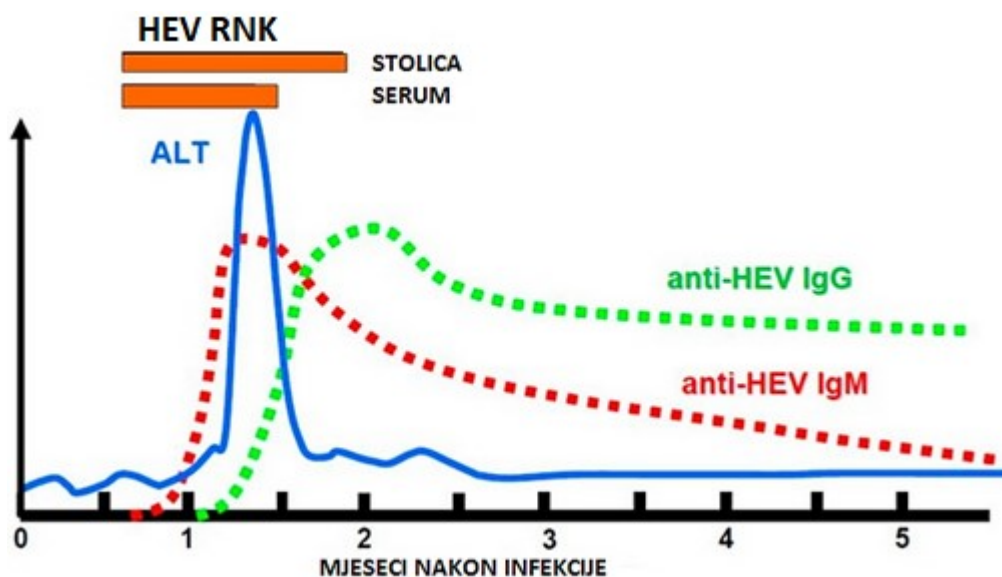


Slika 6. Klinički tijek hepatitisa E

Prema: Pischke S, Hartl J, Pas SD, Lohse AW, Jacobs BC, Van der Eijk AA. Hepatitis E virus: Infection beyond the liver? J Hepatol. 2017;66(5):1082-95.

1.6. IMUNOLOŠKI ODGOVOR NA INFEKCIJU VIRUSOM HEPATITISA E

Anti-HEV protutijela kod bolesnika su uglavnom prisutna već kod pojave simptoma bolesti. Anti-HEV IgM protutijela otkrivaju se u ranoj fazi kliničke bolesti i mogu biti prisutna nekoliko mjeseci. Anti-HEV IgG protutijela pojavljuju se ubrzo nakon pojave IgM-a i mogu se detektirati nekoliko godina (slika 7). Kapsidni protein sadrži nekoliko epitopa odgovornih za tvorbu neutralizacijskih protutijela [102]. Stvaranje protutijela protiv HEV-a može se potaknuti i cijepljenjem. Jedino danas dostupno komercijalno cjepivo je Hecolin® (Xiamen Innovax Biotech, Xiamen, Kina), koje se sastoji od dijela HEV kapsidnog proteina, p239 i pruža zaštitu od infekcije hepatitisom E od najmanje 4,5 godine [103,104].



Slika 7. Tijek akutne HEV infekcije

Prema: Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis Pathogenesis. Viruses. 2016;8(8):212.

1.7. DIJAGNOSTIKA INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E

HEV infekcija je slična drugim oblicima akutnih virusnih hepatitisa ljudi zbog čega ih ne možemo razlikovati na temelju kliničke slike. Stoga je dijagnozu hepatitisa E moguće potvrditi samo laboratorijskim pretragama. U slučaju kliničkih simptoma koji upućuju na akutni hepatitis, dijagnostiku HEV-a treba provesti nakon što su isključeni uobičajeni uzročnici virusnih hepatitisa (virusi hepatitisa A, B i C, Epstein-Barr virus, citomegalovirus) [52]. HEV infekcija se može dijagnosticirati serološkom dijagnostikom, odnosno neizravno, otkrivanjem serumskih anti-HEV protutijela ili molekularnom dijagnostikom, odnosno izravno, otkrivanjem genoma HEV-a u krvi ili drugim tjelesnim tekućinama. Serološku i molekularnu dijagnostiku uvijek treba provoditi istodobno pri čemu su navedene metode komplementarne i jedna metoda ne isključuje drugu (slika 8) [52].

Infekcija HEV-om može biti dokazana i primjenom testova za dokazivanje prisutnosti slobodnog kapsidnog antigena virusa u krvi [105-107]. Premda je ova metoda manje osjetljiva i specifična od molekularnih metoda, ona ipak omogućuje razlikovanje akutne od kronične infekcije u imunokompromitiranih akutno inficiranih pacijenata, a i manje je zahtjevna u provedbi te je značajno jeftinija [106].

Pored navedenih, koristi se i metoda umnožavanja HEV-a u staničnim kulturama. Premda je opisano niz pokušaja uzgoja virusa na stanicama podrijetlom od čovjeka te različitih vrsta životinja, sam virus je pokazao iznimnu zahtjevnost za uzgoj i do danas je uspješno umnožen u linijskim staničnim kulturama hepatoma PLC/PRF/5 i A549 stanicama karcinoma pluća čovjeka [108].

1.7.1. Serološka dijagnostika infekcije virusom hepatitisa E

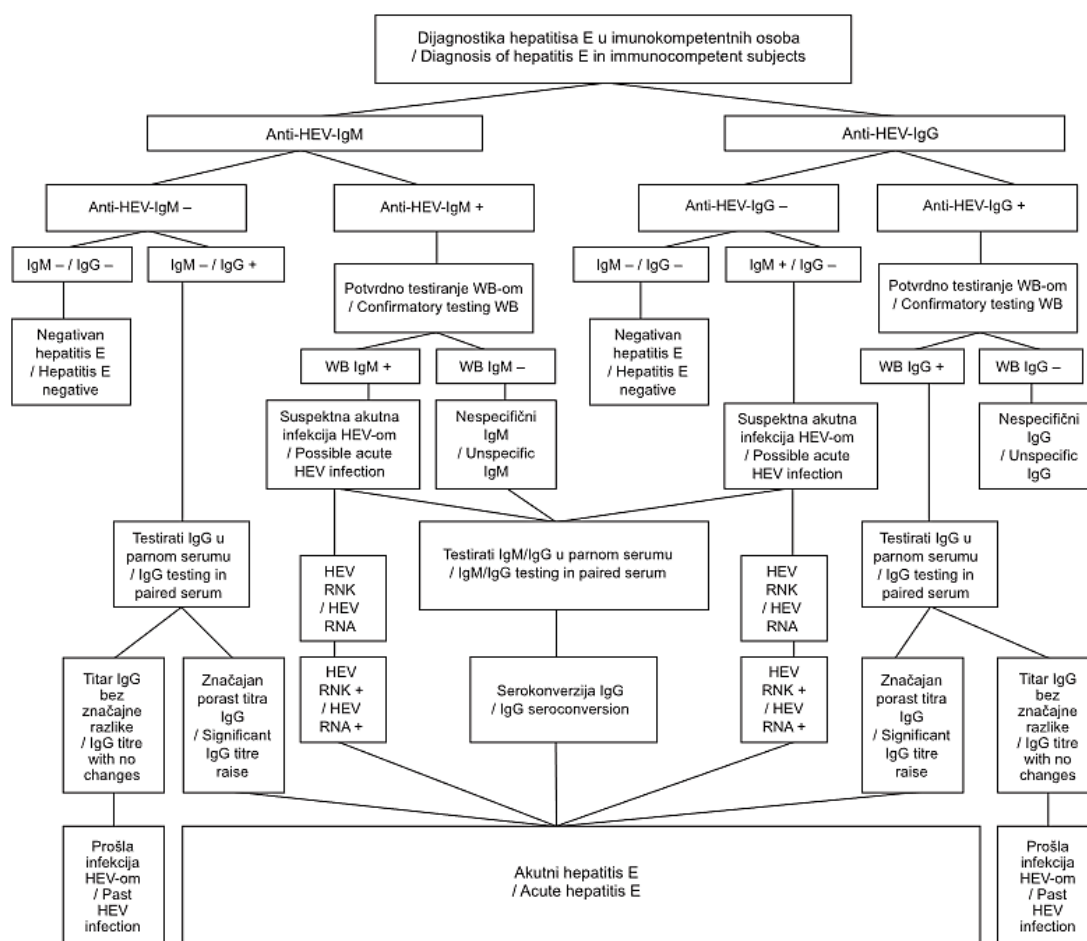
Osnovna dijagnostička metoda za otkrivanje anti-HEV IgA, IgM i IgG protutijela u serumu su imunoenzimski testovi (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA), jer su visoko osjetljivi, dostupni, jeftini i brzi. Osobe sa simptomima hepatitisa se testiraju u tijeku akutne faze kako bi se izbjegli lažno negativni nalazi kao što je slučaj kod autoimunih i reumatoloških bolesti [109].

Inkubacija HEV infekcije traje od 2 do 6 tjedana, nakon čega se javlja kratkotrajan IgM odgovor na koji se nastavlja pojava IgG protutijela koja ostaju prisutna duže

vrijeme (slika 7). Komercijalni ELISA testovi i tzv. brzi imunokromatografski testovi, temeljeni na ORF2/ORF3 peptidima ili rekombinantnim HEV antigenima, mogu otkriti prisutnost IgM ili IgG protutijela induciranih s četiri glavna genotipa HEV, koji predstavljaju jedinstveni serotip [110,111]. Ne postoji serološka dijagnostika specifična za određeni genotip. Jedna kineska studija pratila je kinetiku anti-HEV protutijela nakon HEV infekcije [112]. Razina anti-HEV IgM protutijela je dosegla vrhunac već tijekom kliničke manifestacije bolesti te je ostala na relativno visokim razinama tijekom 8 tjedana. Razina IgM protutijela se brzo smanjivala, padajući ispod razine detekcije kod većine bolesnika nakon 32 tjedna. Razina HEV IgG protutijela rasla je tijekom akutne faze infekcije te je dosegla najvišu razinu oko 4 tjedna nakon pojave simptoma i zadržala se na visokim razinama više od jedne godine [112]. Točno trajanje anti-HEV IgG protutijela nije poznato. U drugom istraživanju, anti-HEV IgG protutijela detektirana su kod gotovo polovice bolesnika koji su imali hepatitis E 14 godina ranije [113]. Mogućnost reinfekcije HEV-a ne može se isključiti budući da nije poznato je li imunost nakon preboljele bolesti doživotna i jesu li protutijela zaštitna [114].

1.7.2. Molekularna dijagnostika infekcije virusom hepatitisa E

Za postavljanje dijagnoze kroničnog hepatitisa E ključna je molekularna dijagnostika čime se utvrđuje prisutnost genoma HEV-a, odnosno HEV RNK u kliničkim uzorcima. Navedeno je izuzetno važno kod imunokompromitiranih bolesnika, kod kojih serološki odgovor može biti oslabljen i neadekvatan za postavljanje dijagnoze [114,115]. Molekularna dijagnostika HEV-a se najčešće radi dvjema metodama, kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-qPCR) [116] i PCR metodom uz prethodnu reverznu transkripciju čime nastali proizvod može biti naknadno sekvenciran i genotipiziran (slika 8) [117].



Slika 8. Smjernice za dijagnostiku hepatitisa E u imunokompetentnih bolesnika

Izvor: Đaković Rode O, Jemeršić L, Vince A. Hepatitis E in Croatia - guidelines for diagnosis and treatment. Liječ vjesn. 2016;138(9-10):289-96

Nije moguće tipiziranje genotipova HEV-a serološkim metodama budući da su genotip specifična protutijela u testovima križno reaktivna [52]. Serološki testovi koji se temelje samo na tipno-specifičnim antigenima ne mogu detektirati sve genotipove pa rezultat može biti lažno negativan. Testovi imaju različitu osjetljivost i specifičnost te nema optimalnog testa koji bi bio zlatni standard, pa tako i rezultati epidemioloških istraživanja seroprevalencije, čak i iz istih područja, mogu biti različiti ovisno o vrsti upotrijebljenog testa [35-44].

1.8. LIJEČENJE HEPATITISA E

1.8.1. Liječenje akutnog hepatitisa E

Do danas nisu odobreni specifični lijekovi za liječenje HEV infekcija. Srećom, u većini slučajeva akutna HEV infekcija prolazi spontano i ne zahtijeva nikakvo specifično liječenje. Međutim, akutna HEV infekcija može napredovati do teškog hepatitisa i zatajenja jetre, osobito u trudnica i bolesnika s kroničnim bolestima jetre. U teškim slučajevima poput teškog hepatitisa i zatajenja jetre, liječenjem ribavirinom zabilježena je brza eliminacija virusa i normalizacija jetrenih enzima [118]. U tim je slučajevima postojala velika varijacija u terapijskim dozama i trajanju liječenja ribavirinom, bez značajnijih nuspojava [119]. Iako ne postoji alternativna mogućnost liječenja ribavirinom u akutnom i teškom hepatitisu ili pri zatajenju jetre uzrokovanom HEV-om, učinkovitost ribavirina još uvijek nije razjašnjena opsežnim studijama ili randomiziranim, kontroliranim ispitivanjima. U nekim slučajevima primjenjivani su kortikosteroidi za usporavanje progresije zatajenja jetre u bolesnika s fulminantnim hepatitisom E [94].

1.8.1.1. Liječenje trudnica

Trenutne mogućnosti liječenja trudnica s teškim hepatitisom ili zatajenjem jetre povezane s HEV1 ili HEV2 znatno su ograničene. Liječenje ribavirinom je kontraindicirano u trudnica zbog mogućeg teratogenog učinka. Međutim, Sinclair i sur. [120] nisu izvijestili o teratogenosti ribavirina u trudnica koje su bile zaražene virusom hepatitisa C (HCV) i koje su bile izravno ili neizravno izložene ribavirinu. Izostanak teratogenih učinaka ribavirina u posljednjem tromjesečju može se djelomično objasniti već završenom organogenezom. Stoga se, ovisno o svakom pojedinom slučaju, ribavirin može predložiti trudnicama koje su zaražene HEV-om u posljednjem tromjesečju trudnoće, uzimajući u obzir vrlo visoku stopu smrtnosti (gotovo 20%) HEV infekcije u tom razdoblju. Kao alternativni pristup, u liječenju trudnica zaraženih HEV1 ili HEV2 može se primijeniti suportivna terapija uz praćenje testova za procjenu funkcije jetre. U indiciranim slučajevima, treba razmotriti ranu transplantaciju jetre [121].

1.8.2. Liječenje kroničnog hepatitisa E

1.8.2.1. Liječenje bolesnika s transplantiranim solidnim organima

Terapijski pristup prve linije za primatelje solidnih organa koji imaju kroničnu infekciju HEV3 ili HEV4 trebao bi biti smanjenje doze imunosupresivnih lijekova, osobito onih koji čije su ciljne stanice T limfociti [122,123], nakon čega slijedi monoterapija ribavirinom u bolesnika u kojih se ne uspijeva ukloniti virus [124].

Terapija interferonom se također pokazala učinkovitom u liječenju bolesnika s kroničnim hepatitisom E nakon transplantacije jetre [125]. Interferon se ne može koristiti za liječenje kroničnog hepatitisa E kod bolesnika kojima su transplantirani bubrezi, srce ili pluća zbog povećane opasnosti od odbacivanja transplantata [126].

1.8.2.2. Liječenje HIV-pozitivnih bolesnika

U malom broju HIV-pozitivnih bolesnika s HEV koinfekcijom (5) primijenjeni su antivirusni lijekovi, od čega jednom pacijentu samo pegilirani interferon kroz šest mjeseci [127], jednom samo ribavirin kroz tri mjeseca [128], a dvojici kroz šest mjeseci [128] te jednom bolesniku pegilirani interferon kroz šest mjeseci nakon čega je slijedila kombinirana terapija s pegiliranim interferonom i ribavirinom kroz tri mjeseca [95].

Osim jednog bolesnika koji je primio 6-mjesečnu monoterapiju ribavirinom, svi su bolesnici imali trajni virološki odgovor [129].

1.8.2.3. Liječenje hematoloških bolesnika

Tri hematološka bolesnika s kroničnom HEV infekcijom primala su ili samo pegilirani interferon ili samo ribavirin tijekom tri mjeseca, što je rezultiralo trajnim virološkim odgovorom [130-133].

1.8.2.4. Liječenje pacijenata sa teškom akutnom HEV infekcijom

Antivirusni lijekovi korišteni su za liječenje malog broja bolesnika s akutnom infekcijom HEV1 ili HEV3. Bolesnici s već postojećom kroničnom bolešću jetre ili

teškim ili fulminantnim hepatitisom procijenjeni su kao visokorizični [134-136]. Bolesnici su liječeni monoterapijom ribavirinom, što je rezultiralo brzom eliminacijom virusa i, u nekim slučajevima, izbjegavanjem transplantacije jetre.

1.9. CJEPIVO PROTIV HEPATITISA E

U 2010. godini, provedena je procjena učinkovitosti cjepiva protiv HEV-a, temeljenom na HEV-1 genotipu i proteinu kodiranom iz ORF 2. Procjena je uključivala rezultate u kliničkom ispitivanju faze 3, provedene na više od 100 000 sudionika iz Kine [137]. U ovom kliničkom ispitivanju faze 3, dugotrajna učinkovitost i sigurnost ovog cjepiva istraživana je tijekom više od četiri godine u cijepljenoj skupini (n=56302 sudionika) u usporedbi s kontrolnom skupinom (n=56302 sudionika). Autori ovog ispitivanja identificirali su samo 60 slučajeva hepatitisa E, a sedam ih je pripadalo cijepljenoj skupini. Nadalje, nisu uočene značajnije nuspojave povezane s cjepivom [137]. Zbog endemske prisutnosti HEV1 i HEV4 u Kini, zaštitni učinak ovog cjepiva mogao bi se pretpostaviti za HEV1 i HEV4, ali se ovi nalazi ne mogu ekstrapolirati za infekcije HEV3. Stoga je Kineski nacionalni institut za zdravlje odlučio provesti ispitivanje prve faze kako bi se testirala sigurnost ovog cjepiva, a ispitivanja druge i treće faze će uslijediti nakon tog ispitivanja. Nadalje, u tijeku je veliko testiranje cjepiva protiv HEV na više od 20000 trudnica u Bangladešu. Rezultati ove studije će biti vrlo važni za razumijevanje učinkovitosti i sigurnosti primjene cjepiva protiv HEV u trudnica koje su pod visokim rizikom od infekcije sojevima genotipa HEV1.

2. HIPOTEZA

Profesionalna izloženost žvotinjama je čimbenik rizika za HEV infekciju.

3. CILJEVI RADA

3.1. OPĆI CILJEVI:

1. Procijeniti HEV prevalenciju u stanovnika kontinentalne Hrvatske.
2. Procijeniti HEV prevalenciju u odabраних vrsta domaćih životinja na području kontinentalne Hrvatske.
3. Analizirati čimbenike rizika za HEV infekciju u Hrvatskoj.

3.2. SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Procijeniti HEV prevalenciju u populaciji profesionalno izloženih osoba (lovci, šumari, veterinari).
2. Procijeniti HEV prevalenciju u populaciji profesionalno neizloženih osoba (trudnice, odrasla opća populacija).
3. Procijeniti HEV prevalenciju u slučajno odabranom uzorku konja i pasa (obzirom na tradiciju uzgoja konja i sve većeg broja pasa kao kućnih ljubimaca).
4. Molekularnom dijagnostikom utvrditi moguću povezanost izvora infekcije u ljudi i životinja.

4. MATERIJALI I METODE (ISPITANICI - UZORAK)

4.1. DIZAJN ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je presječno istraživanje (engl. *cross-sectional study*) u kojem je profesionalna izloženost životinjama čimbenik rizika, a ishod pozitivitet na HEV IgM protutijela kao dokaz akutne infekcije i na HEV IgG protutijela kao dokaz ranije preboljele infekcije.

Istraživanje je provedeno na području kontinentalne Hrvatske i trajalo je godinu dana (listopad 2016. - listopad 2017. godine). Prikladni uzorci su prikupljeni iz raznih zdravstvenih ustanova (medicina rada Poliklinike Sveti Rok, trudnička ambulanta Kliničkog bolničkog centra (KBC) „Sestre milosrdnice“, savjetovišta i prijamna ambulanta Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ), dnevna bolnica Psihijatrijske bolnice Vrapče).

4.2. ISPITIVANA POPULACIJA

1. U istraživanje su uključene osobe starije od 18 godina koje žive u kontinentalnom području RH. Ispitanici su sami ispunili anketni upitnik te im je uzeto 5 ml krvi (serum) za testiranje na HEV.
2. U istraživanje su uključeni nasumično izabrani konji i psi s istog područja kontinentalne Hrvatske odakle su prikupljeni humani uzorci te im je uzeto 2 ml krvi (serum) za testiranje na HEV.

4.3. VELIČINA UZORKA

Veličina uzorka profesionalno izloženih osoba je određena na temelju podataka o prevalenciji HEV kod životinja (Hrvatski veterinarski institut), dok je veličina uzorka profesionalno neizloženih osoba određena na temelju procijenjene seroprevalencije u pilot istraživanju HZJZ, provedenom 2014. godine (oko 5%) [50].

4.3.1. Veličina uzorka po populacijskoj skupini

1. Lovci - uz očekivanu prevalenciju od 10% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 15%: 65 osoba.
2. Šumari - uz očekivanu prevalenciju od 8% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 15%: 50 osoba.
3. Veterinari - uz očekivanu prevalenciju od 7% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 15%: 45 osoba.
4. Odrasla opća populacija - uz očekivanu prevalenciju od 5% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 10%: 75 osoba.

Nasumični odabir uzoraka seruma ispitanika proveden je među pacijentima Referentnog centra za dijagnostiku i praćenje virusnih zoonoza HZJZ, Odjela za ginekologiju i porodništvo KBC „Sestre milosrdnice“, Psihijatrijske bolnice Vrapče i Medicine rada Poliklinike sveti Rok te kao takav predstavlja prigodni uzastopni uzorak.

Uzorci su uzeti od ispitanika prilikom njihovih liječničkih pregleda te su ispitanici prije ispunjavanja upitnika i davanja uzorka krvi pročitali i potpisali informirani pristanak koji ih je detaljno upoznao s istraživanjem, rizicima, osiguranjem tajnosti podataka i ostalim za njih važnim informacijama.

Anonimnost ispitanika osigurana je šifriranjem upitnika i uzorka krvi - za svakog je ispitanika generirana slučajna šifra. Šifru je dobio ispitanik te je stavljena na upitnik, na kuvertu u koju je pohranjen upitnik i na epruvetu u koju je izvađen uzorak krvi odnosno odvojen serum. Serumi su dobiveni centrifugiranjem pune krvi na 3000 o/min i transportirani hladnim lancem (+4°C) u HZJZ te pohranjeni na -20°C do testiranja. Dio uzorka predviđenih za molekularnu dijagnostiku pohranjen je na -70°C do izvođenja testa.

Tijekom istraživanja prikupljeni su podaci o sociodemografskim karakteristikama i rizičnim čimbenicima za HEV infekciju prema anketnom upitniku.

4.3.2. Veličina uzorka životinja

Zbog nedostatka podataka o HEV prevalenciji kod pasa i konja u Hrvatskoj, smanjenjem intervala pouzdanosti kod životinja želimo u ovom istraživanju dobiti što preciznije podatke o HEV prevalenciji kod pasa i konja, pa je stoga veličina uzorka životinja:

1. Konji - uz očekivanu prevalenciju od 10% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 6%: 384 konja.
2. Psi - uz očekivanu prevalenciju od 10% i ukupnu širinu intervala pouzdanosti od 7%: 282 psa.

Nasumični odabir uzoraka seruma životinja načinjen je između ostalih uzoraka seruma podrijetlom iz kontinentalne Hrvatske dostavljenih na laboratorijsko pretraživanje drugih bolesti. Ostatni serumi su ostavljeni zbog mogućnosti provedbe predviđenog istraživanja.

Uzimanje inicijalnih uzoraka seruma životinja provodilo se radi provedbe Programa nadzora drugih zaraznih bolesti sukladno Naredbi o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju u tekućoj godini (NN 31/16) koje je odobrilo i koji se provode za potrebe Ministarstva poljoprivrede RH.

Ukupno je pretraženo 264 uzorka seruma konja, 308 uzoraka seruma pasa i 88 uzoraka seruma mačaka pri čemu su svi pretraživani uzorci seruma uzeti nasumičnim odabirom iz arhive Virološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su bili pohranjeni pri -20° C. Broj ispitanih konja je manji od predviđenog, jer je tijekom epidemije COVID-19 bilo obustavljeno prikupljanje uzoraka konja radi provedbe Programa nadzora drugih zaraznih bolesti, tako da nije bilo dostatno spremljenih arhivskih uzoraka. Međutim, prema procjenama Hrvatske agencije za poljoprivredu i hranu o broju konja (18.656) u kontinentalnoj Hrvatskoj [138] s očekivanom prevalencijom od 10% te uz 95% vjerojatnost i 5% preciznost, broj pretraženih uzoraka konja je reprezentativan.

Metode uzorkovanja su u skladu s pravilima veterinarske struke gdje se u obzir uzima minimalna patnja za životinje. Prikupljanje uzoraka od životinja proveli su isključivo doktori veterinarske medicine sukladno dodijeljenim javnim ovlastima za provedbu Naredbe prema pravilima struke i Etičkom kodeksu.

Svi postupci na životinjama koji su se proveli u okviru ovog istraživanja u skladu su sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06), Izmjenama i dopunama Zakona o zaštiti životinja (NN 37/13) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13).

Analize uzoraka te provedba istraživanja u životinja su provedeni na osnovi međuinstitucijskih potpisanih ugovora o suradnji, dok se provedba istraživanja na ljudima bazirala na resursima i uspostavljenoj suradnji proizašlim iz provedbe projekta „Primjena humanog biomonitoringa za procjenu izloženosti živi tijekom prenatalnog perioda u dvije Hrvatske regije uporabom standardizirane metodologije Svjetske zdravstvene organizacije“ (*Implement a human biomonitoring survey of prenatal exposure to mercury in two Croatian regions using the standardized WHO methodology* - EUCCR01408071). Broj ispitanika nije bio ograničen niti je bilo financijskih interesa koji bi utjecali na objektivnost istraživanja.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo HZJZ (br. 80327/1-16, odobreno 25.5.2016.), KBC „Sestre milosrdnice“ (br. EP-7811/16-22, odobreno 12.2.2016.) i Psihijatrijske bolnice Vrapče (Ur.broj: 23-402/2-16, odobreno 2.2.2016.) te je na osnovu toga Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu prihvatio prijedlog doktorskog rada (Klasa:643-03-01-16; Ur.Broj:380-59-10106-16-56/3, odobreno 29.11.2016.). Istraživanje je provedeno u skladu sa svim primjenjivim smjernicama čiji je cilj osigurati pravilno provođenje istraživanja te sigurnost osoba koje u njemu sudjeluju, uključujući „Osnove dobre kliničke prakse“ i „Helsinšku deklaraciju“.

4.4. METODE

4.4.1. Anketni upitnik

Podaci o sociodemografskim karakteristikama, životnim navikama te potencijalnim čimbenicima rizika za HEV infekciju prikupljeni su pomoću anketnog upitnika. U istraživanju se koristio modificirani anketni upitnik Zdravlje-Okoliš-Životni stil (engl. HELS; *Health-Environment-Life Style*) koji je sastavljen na Katedri za zdravstvenu ekologiju i medicinu rada Škole narodnog zdravlja (ŠNZ) "Andrija Štampar" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U upitnik su bile uključene sljedeće varijable: spol; godina rođenja; stručna sprema; zanimanje; bračni status; higijensko-sanitarni uvjeti; prehrambene navike; kontakt s domaćim životinjama (pas, konj, svinja, zec i dr.); konzumacija samoprerađivanog mesa; bavljenje lovom; anamnestički podatak o kirurškom zahvatu i transfuziji krvi; putovanje u inozemstvo; tetoviranje, piercing.

Upitnik za osobu koja dolazi na testiranje na hepatitis E

Spol: <input type="radio"/> M	<input type="radio"/> Ž	Godina rođenja:
Mjesto prebivališta: <input type="radio"/> Grad	<input type="radio"/> Prigradsko naselje	<input type="radio"/> Selo
Koliko članova broji vaše kućanstvo:		
Stručna sprema: <input type="radio"/> Nezavršena OŠ	<input type="radio"/> OŠ	<input type="radio"/> SSS <input type="radio"/> VŠS/VSS
Koje je vaše zanimanje:		
Bračni/intimni status: <input type="radio"/> U braku	<input type="radio"/> Razveden/a	
<input type="radio"/> Samac/sama	<input type="radio"/> U stalnoj vezi	<input type="radio"/> Udovac
Koristi li vaše kućanstvo gradski vodovod: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor ne, navesti odakle dobivate vodu (zdenac, kupovna flaširana voda):		
Kako je u vašem kućanstvu riješena kanalizacija:		
<input type="radio"/> Komunalna	<input type="radio"/> Septička jama	<input type="radio"/> Procjedna jama <input type="radio"/> Ostalo
Kako je u vašem kućanstvu riješen odvoz smeća:		
<input type="radio"/> Komunalni odvoz	<input type="radio"/> Spaljivanje	<input type="radio"/> Gnojnica <input type="radio"/> Zatrpavanje
Imate li podrum u kući: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE		
Provodite li mjere suzbijanja glodavaca u podrumu? <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE		
Skladištite li hranu koju konzumirate u podrumu? <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE		
Koliko često konzumirate sljedeće namirnice:		
Školjke: <input type="radio"/> Svaki tjedan	<input type="radio"/> Mjesečno	<input type="radio"/> Vrlo rijetko
Meso divljači: <input type="radio"/> Svaki tjedan	<input type="radio"/> Mjesečno	<input type="radio"/> Vrlo rijetko
Jestive iznutrice (jetra): <input type="radio"/> Svaki tjedan	<input type="radio"/> Mjesečno	<input type="radio"/> Vrlo rijetko
Imate li kućne ljubimce: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, navesti koje:		
Imate li domaće životinje: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, navesti koje:		
Jedete li svinjske prerađevine vlastite proizvodnje: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, navesti koje:		
Jeste li često putovali u inozemstvo? <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, u koje države:		
Jeste li ikada primali transfuziju krvi? <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, navesti kada:		
Jeste li ikada bili na operativnom zahvatu: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE Ako je odgovor da, navesti kada:		
Tetoviranje i piercing: <input type="radio"/> DA <input type="radio"/> NE		

4.4.2. Dijagnostika virusa hepatitisa E

4.4.2.1. Serološka dijagnostika humanih uzoraka

HEV IgM i IgG protutijela u ljudskim uzorcima dokazana su pomoću komercijalnih dijagnostičkih ELISA testova (Euroimmun, Lübeck, Njemačka). Inicijalno reaktivni rezultati potvrđeni su pomoću komercijalnog immunoblot testa (Mikrogen, Neuried, Njemačka).

Anti-Hepatitis E virus ELISA IgM

Sadržaj testa:

1. Mikrotitarska pločica presvučena rekombinantnim antigenima HEV genotipa 1 i 3
2. Kalibrator (IgM, humani)
3. Pozitivna kontrola (IgM, humani)
4. Negativna kontrola (IgM, humani)
5. Konjugat (anti-humanu IgM, kozji, obilježen peroksidazom)
6. Pufer za razrjeđivanje seruma (sadrži IgG/RF apsorbens; antihumani IgG, kozji)
7. Otopina za ispiranje
8. Otopina kromogenog supstrata (tetrametilbenzidin; TMB/H₂O₂)
9. Otopina za zaustavljanje reakcije (0.5 M sumporna kiselina)

Izvođenje testa:

Prije izvođenja testa, uzorci se razrjeđuju u omjeru 1:101 (10 µl seruma + 1,0 ml pufera) te inkubiraju 10 min na sobnoj temperaturi.

1. Stavi se 100 µl kalibratora, pozitivne i negativne kontrole te uzoraka seruma u odgovarajuće udubine mikrotitarske pločice (prema protokolu).

Protokol za izvođenje testa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	P 6										
B	Poz	P 7										
C	Neg	P 8										
D	P 1	P 9										
E	P 2	P 10										
F	P 3											
G	P 4											
H	P 5											

- Izvuče se sadržaj te ispere tri puta s 300 µl otopine za ispiranje.
- Stavi se 100 µl konjugata u svaku udubinu te inkubira 30 min na sobnoj temperaturi.
- Izvuče se sadržaj te ispere tri puta s 300 µl otopine za ispiranje.
- Stavi se 100 µl kromogen supstrata u svaku udubinu te inkubira 15 min na sobnoj temperatura (zaštićeno od danjeg svjetla).
- Stavi se 100 µl otopine za zaustavljanje reakcije.

Rezultat se očitava spektrofotometrijski pri valnoj duljini 450 nm (uz referentnu valnu duljinu 620 nm) unutar 30 minuta od dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

Izračunavanje rezultata i interpretacija:

Omjer=optička gustoća (OD) uzorka/OD kalibratora

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

Anti-Hepatitis E virus ELISA IgG

Sadržaj testa:

1. Mikrotitarska pločica presvučena rekombinantnim antigenima HEV genotipa 1 i 3
2. Kalibrator 1; 25 IU/ml (IgG, humani)
3. Kalibrator 2; 10 IU/ml (IgG, humani)
4. Kalibrator 3; 2 IU/ml (IgG, humani)
5. Kalibrator 4; 0,5 IU/ml (IgG, humani)
6. Pozitivna kontrola (IgG, humani)
7. Negativna kontrola (IgG, humani)
8. Konjugat (anti-humani IgG, zečji, obilježen peroksidazom)
9. Pufer za razrjeđivanje seruma
10. Otopina za ispiranje
11. Otopina kromogen supstrata (tetrametilbenzidin; TMB/H₂O₂)
12. Otopina za zaustavljanje reakcije (0.5 M sumporna kiselina)

Izvođenje testa:

Prije izvođenja testa, uzorci se razrjeđuju u omjeru 1:101 (10 µl seruma + 1,0 ml pufera).

1. Stavi se 100 µl kalibratora, pozitivne i negativne kontrole te uzoraka seruma u odgovarajuće udubine mikrotitarske pločice (prema protokolu za semikvantitativnu ili kvantitativnu analizu).

Protokol za izvođenje testa:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C 3	P 6					C 1	P 3				
B	Poz	P 7					C 2	P 4				
C	Neg	P 8					C 3	P 5				
D	P 1	P 9					C 4	P 6				
E	P 2	P 10					Poz	P 7				
F	P 3						Neg	P 8				
G	P 4						P 1	P 9				
H	P 5						P 2	P 10				

2. Izvuče se sadržaj te ispere tri puta s 300 µl otopine za ispiranje.
3. Stavi se 100 µl konjugata u svaku udubinu te inkubira 30 min na sobnoj temperaturi.
4. Izvuče se sadržaj te ispere tri puta s 300 µl otopine za ispiranje.
5. Stavi se 100 µl kromogen supstrata u svaku udubinu te inkubira 15 min na sobnoj temperatura (zaštićeno od danjeg svjetla).
6. Stavi se 100 µl otopine za zaustavljanje reakcije.

Rezultat se očitava spektrofotometrijski pri valnoj duljini 450 nm (uz referentnu valnu duljinu 620 nm) unutar 30 minuta od dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

Izračunavanje rezultata i interpretacija:

Omjer=OD uzorka/OD kalibratora

Semikvantitativna analiza:

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

Kvantitativna analiza:

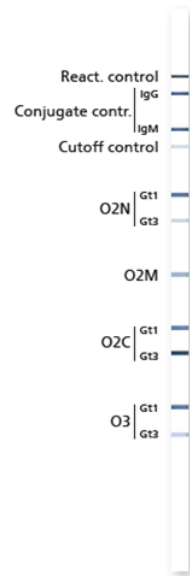
IU/ml	< 1,6	Negativan
	≥ 1,6 - < 2,2	Graničan
	≥ 2,2	Pozitivan

recomWell HEV IgG

Sadržaj testa:

1. Stripovi s rekombinantnim antigenima HEV genotipa 1 i 3
2. Otopina za razrjeđivanje
3. Otopina za ispiranje

4. Otopina kromogen supstrata (tetrametilbenzidin; TMB)
 5. Konjugat (anti-humani IgG, zečji, obilježen peroksidazom)
- Strip s rekombinantnim HEV antigenima



Izvođenje testa:

1. Stripovi se stave u odgovarajuće odjeljke kadice i doda 2 ml pufera, 20 μ l nerazrijeđenog seruma te inkubira 60 min na drmalici.
2. Izvuče se sadržaj i ispere tri puta po 5 min s 2 ml otopine za ispiranje.
3. Stavi se 2 ml konjugata te inkubira 45 min na drmalici.
4. Izvuče se sadržaj i ispere tri puta po 5 min s 2 ml otopine za ispiranje.
5. Stavi se 1,5 ml kromogen supstrata te inkubira 8 min na drmalici.
6. Izvuče se sadržaj te zaustavi reakcija dodavanjem destilirane vode.
7. Stripovi se osuše te očita rezultat.

Očitavanje i interpretacija rezultata:

Procjena intenziteta linija:

Nema reakcije	-
Vrlo slab intenzitet (slabiji od cut-off linije)	+ / -
Slab intenzitet (kao cut-off linija)	+
Jak intenzitet (jači od cut-off linije)	++
Vrlo jak intenzitet	+++

Procjena reaktivnosti na pojedine antigene:

Antigen	Bodovi
O2N	1
O2C	4
O2M	1
O3	2

Interpretacija:

Zbroj bodova	Tumačenje
≤ 2	Negativan
3	Graničan
≥ 4	Pozitivan

4.4.2.2. Serološka dijagnostika uzoraka životinja

Za serološko pretraživanje seruma konja, pasa i mačaka u istraživanju je korišten komercijalni ELISA test (ID.vet, Grabels, Francuska).

ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi®species

Sadržaj testa:

1. Mikrotitarska pločica presvučena s HEV antigenima
2. Konjugat (obilježen peroksidazom)
3. Pozitivna kontrola
4. Negativna kontrola
5. Puferska otopina 2 (otopina za razrjeđivanje seruma)
6. Puferska otopina 3 (otopina za razrjeđivanje konjugata)
7. Koncentrirana otopinu za ispiranje (20X)
8. Otopina kromogen supstrata (TMB)
9. Otopina za zaustavljanje reakcije (0,5 M)

Izvođenje testa

1. U svaku udubinu mikrotitarske pločice stavi se 190 μL puferne otopine 2 (otopina za razrjeđivanje seruma).
2. U četiri udubine se stave 10 μl pozitivne, odnosno negativne kontrola te u po dvije udubine svakog pretraživanog uzorka seruma te inkubira 45 min na 21°C.
3. Izvuče se sadržaj te ispere 3 puta s po 300 μL radne otopine za ispiranje.
4. Načini se radna otopina konjugata (koncentrirani konjugat se razrijedi s pufernom otopinom 3 u omjeru 1:10).
5. Stavi se 100 μl razrijeđenog konjugata te inkubira 30 min na 21°C.
6. Izvuče se sadržaj te ispere 3 puta s po 300 μL radne otopine za ispiranje.
7. Stavi se 100 μl otopine supstrata te inkubira 15 min na 21°C.
8. Stavi se 100 μl otopine za zaustavljanje reakcije.

Rezultat se očitava spektrofotometrijski pri valnoj duljini 450 nm unutar 30 minuta od dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije.

Validacija testa

Izvođenje testa smatra se valjanim ako je:

- Srednja vrijednost očitanih rezultata za pozitivnu kontrolu $> 0,350$
- Optička gustoća (OD) pozitivne kontrole > 0.350
- Omjer srednje vrijednosti očitanih rezultata za pozitivnu kontrolu i srednje vrijednosti rezultata za negativnu kontrolu > 3
- OD pozitivne kontrole / OD negativne kontrole > 3

Izračunavanje i interpretacija rezultata

Nakon očitavanja rezultata, izračunava se omjer očitane srednje vrijednosti optičke gustoće (OD) pojedinog pretraživanog seruma i srednje vrijednosti očitanih rezultata pozitivne kontrole te se dobiveni broj množi sa 100 kako bi bio izražen u postocima. Na ovaj način za svaki pretraživani serum izračunat je kompeticijski postotak u odnosu na pozitivnu kontrolu prema sljedećoj formuli:

$$S/P = (\text{OD Uzorka} / \text{OD Pozitivne kontrola}) \times 100$$

Sukladno vrijednosti kompeticijskog postotka rezultat pretrage pojedinog seruma može biti:

- a. pozitivan - kompeticijski postotak veći ili jednak 70% ($S/N \% \geq 70\%$)
- b. sumnjiv - kompeticijski postotak veći od 60% i manji od 70% ($70\% < S/N \% < 60\%$)
- c. negativan - kompeticijski postotak manji ili jednak 60% ($S/N \% \leq 60\%$)

4.4.2.3. RT-PCR

Virusna RNK izdvojena je uporabom kompleta EZ1 Virus Mini Kit (Qiagen, SAD) na aparatu EZ1 Advanced XL (Qiagen, SAD). Konačni volumen izdvojene RNK bio je 50 μ L. Dobivena RNK pohranjena je na -80°C do testiranja.

Protokol za dokaz konzerviranog odsječka unutar ORF3 regije [116].

Umnažanje konzerviranog odsječka unutar ORF3 regije genoma učinjeno je pomoću kompleta 1Step RT-PCR Probe ROX L Kit (highQu), uzimajući 3 μ L RNK u ukupnom volumenu reakcijske smjese od 20 μ L [57,59]. Početnice i proba opisane su u radu Jothikumar i sur. (2006.) [116]. TaqMan® proba JHEV-P označena je na 5'-kraju signalnom molekulom 6-carboxyfluorescein (FAM) i prigušivačem, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (BioTez Berlin-Buch GmbH, Berlin, Njemačka) na 3'-kraju (tablica 1).

Početnice i probe te njihov nukleotidni slijed

Naziv početnice	Sekvencija (5'→3')
Nizvodna početnica JVHEV-F	5' GGTGGTTTCTGGGGTGAC 3'
Uzvodna početnica JVHEV-R	5' AGGGGTTGGTTGGATGAA 3'
Proba JVHEV-P	FAM-5' TGATTCTCAGCCCTTCGC 3'-BHQ1

PCR mješavina pripravljena je prema uputi. U svaku mikroeprijetu je stavljeno 17 μ L PCR mješavine te po 3 μ L izdvojene RNK.

Priprema PCR mješavine

Reagens	Dodani volumen reagenasa po reakciji
Voda slobodna od nukleaza	N x 3,0 µL
Mix početnice/proba	N x 2,0 µL
RT3 Mix, 20x	N x 2,0 µL
1Step RT-PCR Mix 2x	N x 10,0 µL
Ukupni volumen	N x 17,0 µL

Postupak umnožavanja učinjen je u *real-time* uređaju BioRad.

Temperaturni profili pojedinih ciklusa za uređaj CFX96 Real-Time System (Bio Rad)

Reverzna transkripcija	50 °C / 10 min
Aktivacija Taq inhibitora	95 °C / 2 min
PCR amplifikacija (45 ciklusa)	95 °C / 5 sek
60 °C / 1 min*	

*Akvizicija fluorescencije (FAM) je na kraju svakog ciklusa pri 60 °C

Očitavanje rezultata

Nakon završenog postupka, rezultati su prikazani kao Ct (*cycle threshold*) vrijednost za svaki uzorak zasebno. Analiza je valjana ukoliko su pozitivne kontrole dale pozitivan rezultat u očekivanom rasponu, a negativne kontrole negativan rezultat.

Tumačenje rezultata

Uzorci koji imaju Ct vrijednost < 40 su pozitivni na odsječak unutar ORF3 regije HEV. Uzorci koji imaju Ct vrijednost > 40 i linearnu amplifikacijsku krivulju, kao i uzorci koji nemaju prikazanu Ct vrijednost su negativni na odsječak unutar ORF3 regije HEV.

Svi uzorci s dokazanim HEV protutijelima testirani su na prisutnost HEV RNK i to postojanog odsječka unutar ORF3 regije genoma, pomoću kvantitavnog RT-PCR postupka u stvarnom vremenu prethodno opisanog od strane Jothikumar i sur., 2006 [116]. Serološka dijagnostika provedena je u Odjelu za virološku serologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, a molekularna dijagnostika u Odjelu za virologiju Hrvatskog veterinarskog instituta.

4.4.3. Statistička obrada rezultata

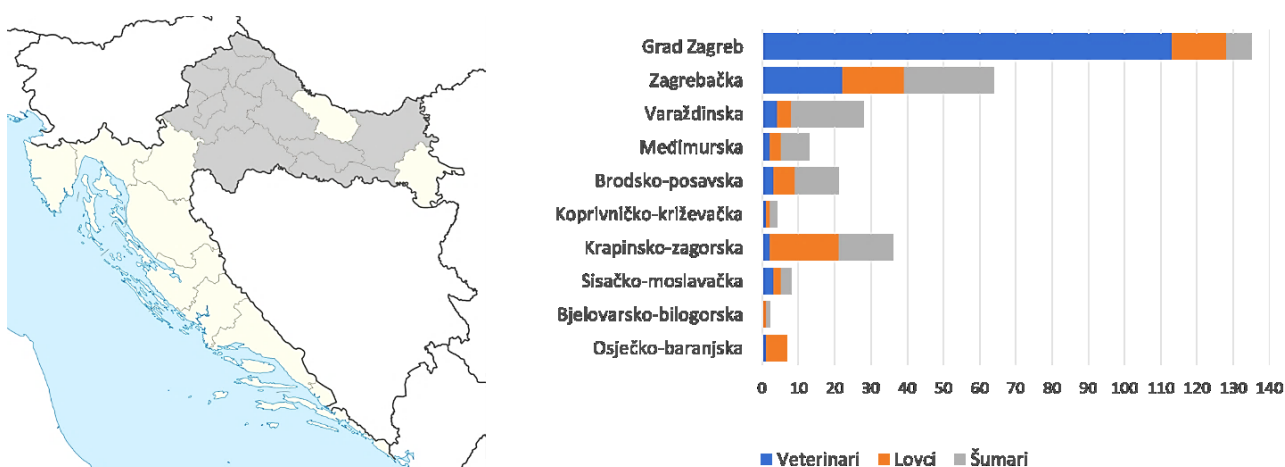
Podaci su prikazani tablično i grafički. Za sve kategorijske varijable su pored apsolutnih vrijednosti i pripadajućih udjela izračunati i pripadajući 95% intervali pouzdanosti (engl. *confidence interval*; CI). Krična vrijednost z-skora za izračunavanje 95% CI bila je 1,96. Razlike u kategorijskim varijablama između HEV pozitivnih i HEV negativnih ispitanika analizirane su Fisherovim egzaktnim testom, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim testom u slučajevima kada su tablice bile formata većeg od 2x2. Izračunao se omjer prevalencija (engl. *prevalence ratio*; PR) i prevalencijski omjer izgleda (engl. *prevalence odds ratio*; POR) pojedinih zanimanja u odnosu na pozitivan HEV nalaz. Sve značajne varijable u bivarijatnoj usporedbi stavljene su u multivarijatni regresijski model predikcije pozitivnog HEV nalaza (binarna logistička regresija). P vrijednosti < 0,05 su smatrane statistički značajnima. U analizi se koristila programska podrška MedCalc® Statistical Software version 20.022 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021).

5. REZULTATI

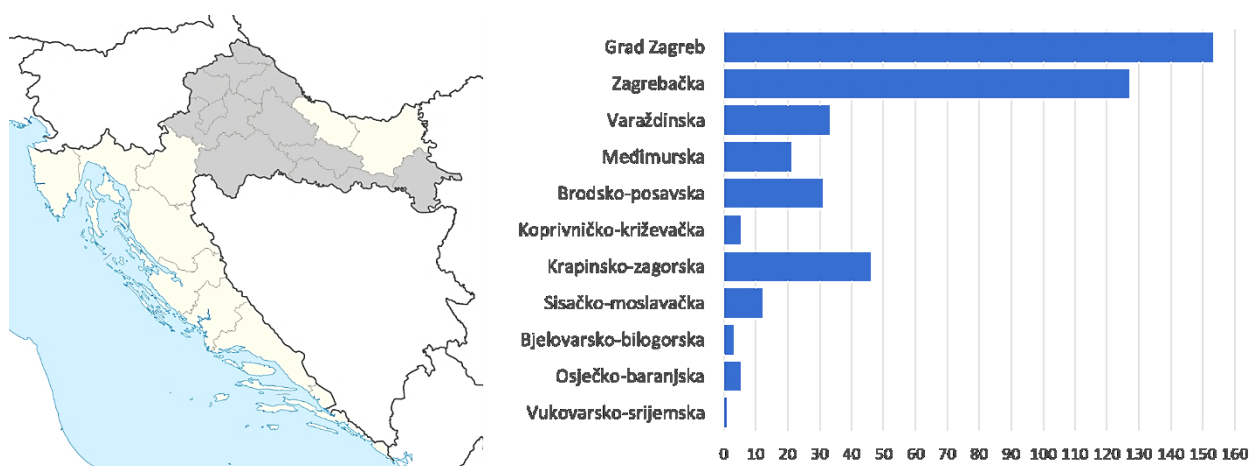
5.1. HEV SEROPREVALENCIJA KOD PROFESIONALNO IZLOŽENIH I NEIZLOŽENIH OSOBA

U istraživanje je uključeno ukupno 573 ispitanika: 318 ispitanika (55,5%) koji su svrstani u skupinu rizičnih zanimanja (veterinari, lovci i šumari) te 255 (44,5%) ispitanika bez rizika (opća populacija i trudnice).

Raspodjela ispitanika po županijama prikazana je na slikama 9 (izložena skupina) i 10 (neizložena skupina).



Slika 9. Raspodjela ispitanika izložene skupine po županijama



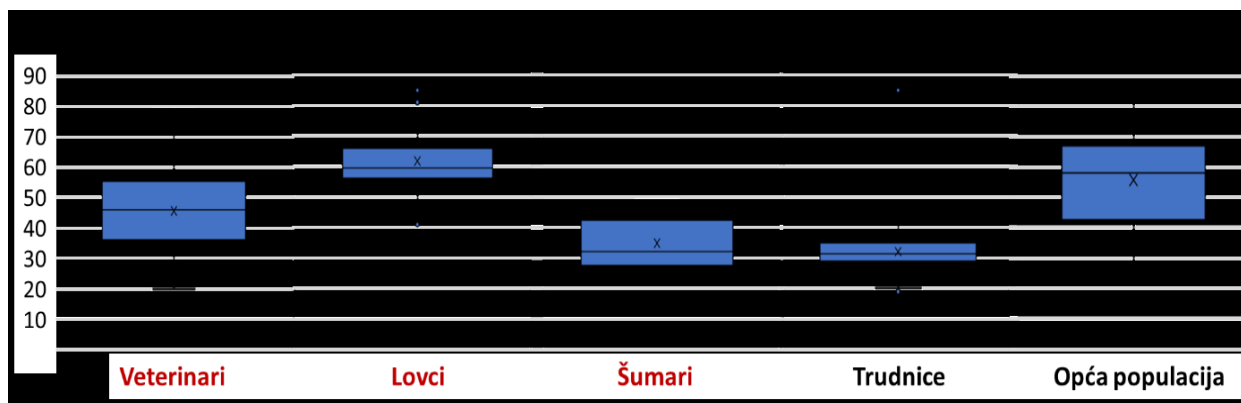
Slika 10. Raspodjela ispitanika neizložene skupine po županijama

Opisna statistika nalaza HEV, rizičnih skupina obzirom na zanimanje, spol, dob, mjesto prebivališta, broj ukućana, stručnu spremu i život s partnerom kod svih ispitanika uključenih u istraživanje prikazana je u tablici 2 i slici 11. Među rizičnim skupinama, najzastupljeniji su bili veterinar, 151 ispitanik (26,4% cjelokupnog uzorka). Veća je bila zastupljenost ženskog spola (304 osobe, 53,2%). Glede mjesta prebivališta, broja ukućana, stručne spreme i života s partnerom, najveća je bila zastupljenost osoba u dobi 30-39 godina (29,2%), prebivališta u gradu (54,6%), broja ukućana manjeg od 3 (58,6%) te srednje stručne spreme (54,5%).

Tablica 2. Raspodjela ispitanika po demografskim značajkama i rizičnim skupinama

		N*	%	95% CI	
Skupina	Bez rizika	255	44,5%	40,5%	48,6%
	Rizična skupina	318	55,5%	51,4%	59,5%
Rizična skupina	Veterinar	151	26,4%	22,9%	30,1%
	Lovac	74	12,9%	10,4%	15,8%
	Šumar	93	16,2%	13,4%	19,4%
Spol	Muški	267	46,8%	42,7%	50,9%
	Ženski	304	53,2%	49,1%	57,3%
Dobne skupine	<30 godina	102	18,9%	15,7%	22,3%
	30-39 godina	158	29,2%	25,5%	33,1%
	40-49 godina	99	18,3%	15,2%	21,7%
	50-59 godina	101	18,7%	15,6%	22,1%
	>=60 godina	81	15,0%	12,2%	18,2%
Mjesto prebivališta	Selo	167	32,7%	28,7%	36,8%
	Prigradsko naselje	65	12,7%	10,0%	15,8%
	Grad	279	54,6%	50,3%	58,9%
Broj ukućana	≤3	280	58,6%	54,1%	62,9%
	>3	198	41,4%	37,1%	45,9%
Stručna sprema	OŠ	63	12,3%	9,7%	15,4%
	SSS	279	54,5%	50,2%	58,8%
	VŠS i VSS	170	33,2%	29,2%	37,4%
Živi s partnerom	Ne	100	20,4%	17,1%	24,2%
	Da	389	79,6%	75,8%	82,9%

*ispitanici koji su ispunili upitnik



Slika 11. Medijan (IQR) dobi u pojedinim populacijskim skupinama

Tablica 3 prikazuje opisnu statistiku okolišnih i stambenih uvjeta koji se povezuju s povećanim rizikom zaraze HEV-om. Većina ispitanika navela je kao izvor pitke vode gradski vodovod - njih 431 (84,7%). Komunalnu kanalizaciju je imalo 320 (62,9%) ispitanika, komunalni odvoz smeća 501 (98,6%) ispitanika, a kućne ljubimce njih 265 (52,2%). Više od polovice ispitanika je imalo podrum (234; 54,6%) te je kod više od polovice ispitanika provedena deratizacija u podrumu (264; 52,1%). Većina ispitanika se izjasnila da ne skladište hranu koju konzumiraju u podrumu (385; 75,9%). Što se tiče domaćih životinja, većina ispitanika je odgovorila da ih nema (348; 71,3%), za razliku od kućnih ljubimaca koje ima više od polovice ispitanika (265; 52,2%).

Tablica 3. Rizični čimbenici za HEV infekciju

		N*	%	95% CI	
Opskrba vodom	Gradski vodovod	431	84,7%	81,4%	87,6%
	Zdenac	70	13,8%	11,0%	16,9%
	Flaširana voda	4	0,8%	0,3%	1,9%
	Ostalo	4	0,8%	0,3%	1,9%
Kanalizacija	Komunalna	320	62,9%	58,6%	67,0%
	Septička	185	36,3%	32,3%	40,6%
	Ostalo	4	0,8%	0,3%	1,9%
Odvoz smeća	Komunalni odvoz	501	98,6%	97,3%	99,4%
	Spaljivanje	5	1,0%	0,4%	2,1%
	Gnojnica	2	0,4%	0,1%	1,3%
Podrum	Ne	234	46,0%	41,7%	50,3%
	Da	275	54,0%	49,7%	58,3%
Deratizacija u podrumu	Ne	243	47,9%	43,6%	52,3%
	Da	264	52,1%	47,7%	56,4%
Skladištenje hrane za konzumaciju u podrumu	Ne	385	75,9%	72,1%	79,5%
	Da	122	24,1%	20,5%	27,9%
Kućni ljubimci	Ne	243	47,8%	43,5%	52,2%
	Da	265	52,2%	47,8%	56,5%
Domaće životinje	Ne	348	71,3%	67,2%	75,2%
	Da	140	28,7%	24,8%	32,8%

*ispitanici koji su ispunili upitnik

Opisna statistika prehrambenih navika koje se povezuju s povećanim rizikom zaraze HEV-om prikazana je u tablici 4. Više od 90% ispitanika ne jede školjke ili ih jede vrlo rijetko, dok meso divljači vrlo rijetko ili nikad jede nešto više od tri četvrtine ispitanika. Većina ispitanika ili jede iznutrice vrlo rijetko (njih 296; 65,5%) ili mjesečno (120; 26,5%). Konzumaciju svinjskih prerađevina vlastite proizvodnje navelo je 55,0% ispitanika.

Tablica 4. Prehrambene navike ispitanika

		N*	%	95% CI	
Konzumacija školjki	Nikad	60	13,3%	10,4%	16,6%
	Rijetko	374	82,7%	79,1%	86,0%
	Mjesečno	16	3,5%	2,1%	5,5%
	Tjedno	2	0,4%	0,1%	1,4%
Konzumacija mesa divljači	Nikad	20	4,4%	2,8%	6,6%
	Rijetko	324	71,7%	67,4%	75,7%
	Mjesečno	89	19,7%	16,2%	23,5%
	Tjedno	19	4,2%	2,6%	6,4%
Konzumacija iznutrica (jetra)	Nikad	25	5,5%	3,7%	7,9%
	Rijetko	296	65,5%	61,0%	69,8%
	Mjesečno	120	26,5%	22,6%	30,8%
	Tjedno	11	2,4%	1,3%	4,2%
Konzumacija svinjskih prerađevina vlastite proizvodnje	Ne	204	45,0%	40,5%	49,6%
	Da	249	55,0%	50,4%	59,5%

*ispitanici koji su ispunili upitnik

Opisna statistika ostalih mogućih rizičnih čimbenika prikazana je u tablici 5. Samo jedna četvrtina ispitanika je putovala u inozemstvo, transfuziju krvi je primilo njih 44 (9,7%), operativni zahvat je imalo 230 (50,8%), a tetovažu ili piercing ima 72 (16,0%) ispitanika.

Tablica 5. Ostali potencijalni rizični čimbenici za HEV infekciju

		N*	%	95% CI	
Putovanje u inozemstvo	Ne	369	75,6%	71,7%	79,3%
	Da	119	24,4%	20,7%	28,3%
Transfuzija krvi	Ne	410	90,3%	87,3%	92,8%
	Da	44	9,7%	7,2%	12,7%
Operativni zahvat	Ne	223	49,2%	44,6%	53,8%
	Da	230	50,8%	46,2%	55,4%
Tetoviranje i piercing	Ne	378	84,0%	80,4%	87,2%
	Da	72	16,0%	12,8%	19,6%

*ispitanici koji su ispunili upitnik

Seroprevalencija HEV-a u cjelokupnom uzorku iznosila je 8,9% (95% CI=6,8-11,4%). Razlike u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza s obzirom na rizične skupine i sociodemografske značajke ispitanika (spol, dob, mjesto prebivališta, broj ukućana, stručna spremu i život s partnerom) prikazane su u tablici 5. Pozitivna HEV IgG protutijela značajno su zastupljenija u rizičnoj skupini 12,6% (95% CI=9,3-16,6%) naspram 4,3% (95% CI=2,3-7,3%) u skupini bez rizika, $P < 0,001$. Također, dokazan je porast seroprevalencije HEV-a s dobi. Najniža je prevalencija opažena u dobnoj skupini <30 godina (2,9%; 95% CI=0,8-7,6%), a najviša u dobnoj skupini ≥ 60 godina (23,5%; 95% CI=15,3-33,5%). Kod ostalih testiranih varijabli nije bilo značajnih razlika (tablica 6).

Tablica 6. Seroprevalencija HEV infekcije s obzirom na sociodemografske značajke ispitanika

		HEV IgG protutijela								p
		Negativan				Pozitivan				
		N*	%	95% CI	N*	%	95% CI			
Zanimanje	Bez rizika	244	95,7%	92,7%	97,7%	11	4,3%	2,3%	7,3%	<0,001
	Rizična skupina	278	87,4%	83,4%	90,7%	40	12,6%	9,3%	16,6%	
Izloženi	Veterinar	128	84,8%	78,4%	89,8%	23	15,2%	10,2%	21,6%	<0,001
	Lovac	63	85,1%	75,8%	91,8%	11	14,9%	8,2%	24,2%	
	Šumar	87	93,5%	87,2%	97,3%	6	6,5%	2,7%	12,8%	
Neizloženi	Opća populacija	126	93,3%	88,2%	96,7%	9	6,7%	3,3%	11,8%	0,065
	Trudnice	118	98,3%	94,8%	99,7%	2	1,7%	0,3%	5,2%	
Spol	Muški	238	89,1%	85,0%	92,4%	29	10,9%	7,6%	15,0%	0,130
	Ženski	282	92,8%	89,4%	95,3%	22	7,2%	4,7%	10,6%	
Dobne skupine** (godine)	<30	99	97,1%	92,4%	99,2%	3	2,9%	0,8%	7,6%	<0,001
	30-39	147	93,0%	88,3%	96,2%	11	7,0%	3,8%	11,7%	
	40-49	94	94,9%	89,3%	98,0%	5	5,1%	2,0%	10,7%	
	50-59	90	89,1%	81,9%	94,1%	11	10,9%	5,9%	18,1%	
	≥60	62	76,5%	66,5%	84,7%	19	23,5%	15,3%	33,5%	
Mjesto prebivališta**	Selo	151	90,4%	85,3%	94,2%	16	9,6%	5,8%	14,7%	0,144
	Prigradsko naselje	54	83,1%	72,6%	90,7%	11	16,9%	9,3%	27,4%	
	Grad	255	91,4%	87,7%	94,3%	24	8,6%	5,7%	12,3%	
Broj ukućana	≤3	258	92,1%	88,6%	94,9%	22	7,9%	5,1%	11,4%	0,301
	>3	177	89,4%	84,5%	93,1%	21	10,6%	6,9%	15,5%	
Stručna sprema**	OŠ	58	92,1%	83,5%	96,9%	5	7,9%	3,1%	16,5%	0,467
	SSS	254	91,0%	87,3%	94,0%	25	9,0%	6,0%	12,7%	
	VŠS i VSS	149	87,6%	82,1%	91,9%	21	12,4%	8,1%	17,9%	
Živi s partnerom	Ne	88	88,0%	80,6%	93,3%	12	12,0%	6,7%	19,4%	0,565
	Da	350	90,0%	86,7%	92,7%	39	10,0%	7,3%	13,3%	

*ispitanici koji su ispunili upitnik; **Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Razlike u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza obzirom na okolišne i stambene uvjete prikazane su u tablici 7. Osobe koje su imale kućne ljubimce imale su i značajno višu HEV seroprevalenciju ($p=0,039$), dok značajnih razlika u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza po pitanju ostalih varijabli nije bilo (posjedovanje domaćih životinja, podruma, različitih vrsta kanalizacije i vrsta opskrbe vodom).

Tablica 7. Prevalencija HEV IgG protutijela s obzirom na okolišne i stambene uvjete

		HEV IgG protutijela								p
		Negativan				Pozitivan				
		N*	%	95% CI		N*	%	95% CI		
Opskrba vodom**	Gradski vodovod	388	90,0%	86,9%	92,6%	43	10,0%	7,4%	13,1%	0,694
	Zdenac	63	90,0%	81,4%	95,4%	7	10,0%	4,6%	18,6%	
	Flaširana	4	100,0%			0	0,0%			
	Ostalo	3	75,0%	28,4%	97,2%	1	25,0%	2,8%	71,6%	
Kanalizacija**	Komunalna	287	89,7%	86,0%	92,7%	33	10,3%	7,3%	14,0%	0,781
	Septička	167	90,3%	85,4%	93,9%	18	9,7%	6,1%	14,6%	
	Ostalo	4	100,0%			0	0,0%			
Odvoz smeća?***	Komunalni	450	89,8%	86,9%	92,2%	51	10,2%	7,8%	13,1%	1,000
	Spaljivanje	5	100,0%			0	0,0%			
	Gnojnica	2	100,0%			0	0,0%			
Podrum	Ne	212	90,6%	86,4%	93,8%	22	9,4%	6,2%	13,6%	0,668
	Da	246	89,5%	85,4%	92,7%	29	10,5%	7,3%	14,6%	
Kućni ljubimci	Ne	226	93,0%	89,3%	95,7%	17	7,0%	4,3%	10,7%	0,039
	Da	232	87,5%	83,2%	91,1%	33	12,5%	8,9%	16,8%	
Domaće životinje	Ne	313	89,9%	86,5%	92,8%	35	10,1%	7,2%	13,5%	0,629
	Da	124	88,6%	82,5%	93,0%	16	11,4%	7,0%	17,5%	
Deratizacija u podrumu	Ne	220	90,5%	86,4%	93,7%	23	9,5%	6,3%	13,6%	0,670
	Da	236	89,4%	85,3%	92,7%	28	10,6%	7,3%	14,7%	
Skladištite li hranu u podrumu	Ne	349	90,6%	87,4%	93,3%	36	9,4%	6,7%	12,6%	0,346
	Da	107	87,7%	81,0%	92,6%	15	12,3%	7,4%	19,0%	

*ispitanici koji su ispunili upitnik; **Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Razlike u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza obzirom na prehrambene navike koji se povezuju s povećanim rizikom zaraze HEV prikazane su u tablici 8. Najviša prevalencija pozitivnog HEV nalaza opažena je kod ispitanika koji ne konzumiraju školjke ($p=0,004$) za razliku od ispitanika koji konzumiraju meso divljači, iznutrice i svinjske prerađevine vlastite proizvodnje, gdje nije bilo značajne razlike u prevalenciji.

Tablica 8. Prevalencija HEV IgG protutijela s obzirom na prehrambene navike

		HEV IgG protutijela								p
		Negativan				Pozitivan				
		N*	%	95% CI		N*	%	95% CI		
Konzumacija školjki**	Nikad	45	75,0%	63,0%	84,6%	15	25,0%	15,4%	37,0%	0,004
	Rijetko	342	91,4%	88,3%	94,0%	32	8,6%	6,0%	11,7%	
	Mjesečno	14	87,5%	65,6%	97,3%	2	12,5%	2,7%	34,4%	
	Tjedno	2	100,0%			0	0,0%			
Konzumacija mesa divljači**	Nikad	19	95,0%	78,9%	99,5%	1	5,0%	0,5%	21,1%	0,104
	Rijetko	294	90,7%	87,2%	93,5%	30	9,3%	6,5%	12,8%	
	Mjesečno	75	84,3%	75,7%	90,7%	14	15,7%	9,3%	24,3%	
	Tjedno	15	78,9%	57,4%	92,4%	4	21,1%	7,6%	42,6%	
Konzumacija iznutrica (jetra)**	Nikad	25	100,0%			0	0,0%			0,070
	Rijetko	267	90,2%	86,4%	93,2%	29	9,8%	6,8%	13,6%	
	Mjesečno	102	85,0%	77,8%	90,5%	18	15,0%	9,5%	22,2%	
	Tjedno	9	81,8%	53,3%	96,0%	2	18,2%	4,0%	46,7%	
Konzumacija svinjskih prerađevina vlastite proizvodnje	Ne	186	91,2%	86,7%	94,5%	18	8,8%	5,5%	13,3%	0,216
	Da	218	87,6%	83,0%	91,2%	31	12,4%	8,8%	17,0%	

*ispitanici koji su ispunili upitnik; **Fisher-Freeman-Haltonov egzaktni test

Nije bilo značajnih razlika u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza obzirom na ostale potencijalne rizične čimbenike kao što su putovanje u inozemstvo, transfuzije krvi, operacijski zahvati te tetoviranje i piercing (tablica 9).

Tablica 9. Prevalencija HEV IgG protutijela s obzirom na ostale potencijalne rizične čimbenike

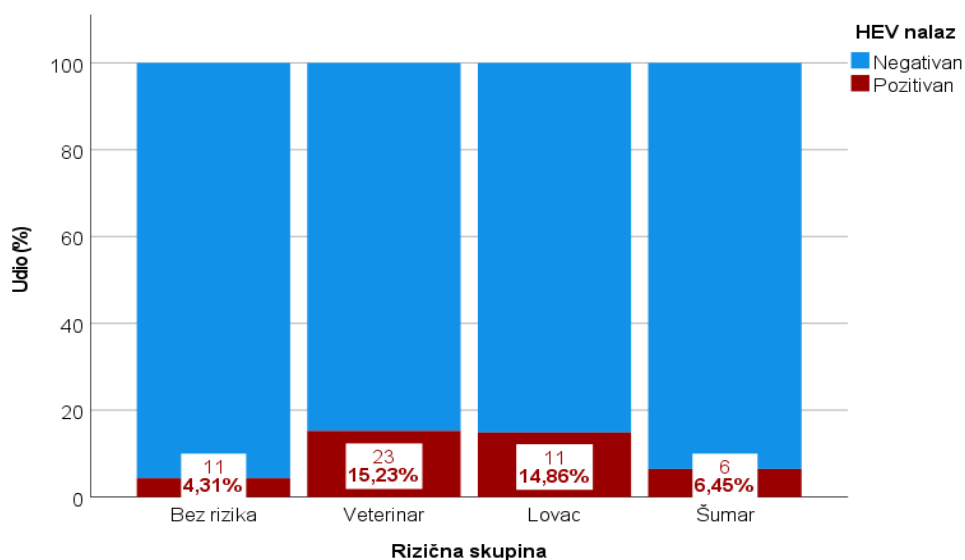
		HEV IgG protutijela								p
		Negativan				Pozitivan				
		N*	%	95% CI	N*	%	95% CI			
Putovanje u inozemstvo	Ne	329	89,2%	85,7%	92,0%	40	10,8%	8,0%	14,3%	0,621
	Da	108	90,8%	84,6%	95,0%	11	9,2%	5,0%	15,4%	
Transfuzija krvi	Ne	369	90,0%	86,8%	92,6%	41	10,0%	7,4%	13,2%	0,120
	Da	36	81,8%	68,6%	91,0%	8	18,2%	9,0%	31,4%	
Operativni zahvat	Ne	197	88,3%	83,6%	92,1%	26	11,7%	7,9%	16,4%	0,570
	Da	207	90,0%	85,6%	93,4%	23	10,0%	6,6%	14,4%	
Tetoviranje i piercing	Ne	335	88,6%	85,1%	91,5%	43	11,4%	8,5%	14,9%	0,540
	Da	66	91,7%	83,6%	96,4%	6	8,3%	3,6%	16,4%	

*ispitanici koji su ispunili upitnik

Razlike u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza obzirom na rizične skupine prema zanimanjima (veterinar, lovac, šumar i bez rizika) prikazane su u tablici 10. Najveća prevalencija pozitivnih HEV nalaza bila je kod veterinaru: 15,2% (95% CI=10,2-21,6%) te se značajno razlikovala od prevalencije u populaciji bez rizika, 4,3% (95% CI=2,3%-7,3%), $P < 0,001$ (tablica 10, slika 12), ali se nije značajno razlikovala od lovaca koji su imali prevalenciju od 14,9% (95% CI=8,2-24,2%), $p = 0,943$ (tablica 10, slika 12).

Tablica 10. Prevalencija HEV IgG protutijela s obzirom na zanimanje

		HEV IgG protutijela								p
		Negativan				Pozitivan				
		N	%	95% CI		N	%	95% CI		
Rizična skupina	Bez rizika	244	95,7%	92,7%	97,7%	11	4,3%	2,3%	7,3%	<0,001
	Veterinar	128	84,8%	78,4%	89,8%	23	15,2%	10,2%	21,6%	
	Lovac	63	85,1%	75,8%	91,8%	11	14,9%	8,2%	24,2%	
	Šumar	87	93,5%	87,2%	97,3%	6	6,5%	2,7%	12,8%	



Slika 12. Razlike u prevalenciji pozitivnih i negativnih HEV nalaza obzirom na rizične skupine prema zanimanjima (veterinar, lovac, šumar i bez rizika)

U tablici 11 su prikazani prevalencijski omjeri šansi (POR) za HEV seropozitivitet s obzirom na populacijske skupine prema zanimanju te s obzirom na dob, spol, konzumaciju različite hrane, kućne ljubimce i transfuziju krvi. Značajne razlike u HEV seropozitivitetu pojavljuju se u populacijskoj skupini veterinaru u odnosu na neizložene populacije (POR 3,06; 95% CI=1,27-7,42) te u osoba starije životne dobi (POR 1,67; 95% CI=1,23-2,26). Mjesto prebivališta, konzumacija školjki, konzumacija mesa divljači, konzumacija iznutrica, prisutnost kućnih ljubimaca i transfuzija krvi nisu značajno doprinosili HEV seropozitivitetu.

Tablica 11. Analiza rizika za HEV seropozitivitet

	POR	95% CI		p
Populacijska skupina				0,028
Neizloženi (ref.)				
Veterinar	3,059	1,261	7,422	0,013
Lovac	1,268	0,353	4,558	0,717
Šumar	0,792	0,210	2,993	0,731
Ženski Spol	1,171	0,486	2,821	0,726
Dobne skupine (svakih 10 godina)	1,666	1,228	2,260	0,001
Mjesto prebivališta				0,329
Selo (ref.)				
Prigradsko naselje	2,069	0,724	5,915	0,175
Grad	1,088	0,461	2,565	0,847
Konzumacija školjki				0,250
Nikada (ref.)				
Rijetko	0,387	0,147	1,021	0,055
Mjesečno	0,224	0,022	2,253	0,204
Tjedno	0,000	0,000		1,000
Konzumacija mesa divljači				0,483
Nikada (ref.)				
Rijetko	0,517	0,048	5,574	0,587
Mjesečno	0,973	0,086	10,986	0,982
Tjedno	1,000	0,072	13,921	1,000
Konzumacija iznutrica (jetra)				0,897
Nikada (ref.)				
Rijetko	6,308	0,374	106,313	0,201
Mjesečno	11,165	0,649	191,829	0,096
Tjedno	17,000	0,733	394,212	0,077
Kućni ljubimci	1,617	0,770	3,394	0,204
Transfuzija krvi	0,852	0,280	2,590	0,777

Najveći omjer prevalencija za pozitivan HEV nalaz imali su veterinari u odnosu na skupinu bez rizika te je iznosio 3,53 (95% CI=1,77-7,04), $P < 0,001$. Sličan omjer prevalencija imali su i lovci u odnosu na skupinu bez rizika s 3,44 (95% CI=1,55-7,63), $P < 0,001$ (tablice 12 do 18).

Tablica 12. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz veterinara u odnosu na skupinu bez rizika

Omjer prevalencija (PR)	3,531
95% CI	1,7715 - 7,0381
z statistika	3,585
Razina značajnosti	$p = 0,0003$

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	3,9858
95% CI	1,8834 - 8,4352
z statistika	3,615
Razina značajnosti	$p = 0,0003$

Tablica 13. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz lovaca u odnosu na skupinu bez rizika

Omjer prevalencija (PR)	3,4459
95% CI	1,5566 - 7,6283
z statistika	3,051
Razina značajnosti	$p = 0,0023$

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	3,873
95% CI	1,6057 - 9,3417
z statistika	3,014
Razina značajnosti	$p = 0,0026$

Tablica 14. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz šumara u odnosu na skupinu bez rizika

Omjer prevalencija (PR)	1,4956
95% CI	0,5692 - 3,9295
z statistika	0,817
Razina značajnosti	p = 0,4141

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	1,5298
95% CI	0,5492 - 4,2611
z statistika	0,813
Razina značajnosti	p = 0,4160

Tablica 15. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz veterinara u odnosu na lovce

Omjer prevalencija (PR)	1,0247
95% CI	0,5283 - 1,9875
z statistika	0,0721
Razina značajnosti	p = 0,9425

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	1,0291
95% CI	0,4721 - 2,2433
z statistika	0,0722
Razina značajnosti	p = 0,9424

Tablica 16. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz veterinaru u odnosu na šumare

Omjer prevalencija (PR)	2,3609
95% CI	0,9985 - 5,5823
z statistika	1,957
Razina značajnosti	p = 0,0504

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	2,6055
95% CI	1,0189 - 6,6624
z statistika	1,999
Razina značajnosti	p = 0,0456

Tablica 17. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz lovaca u odnosu na šumare

Omjer prevalencija (PR)	2,3041
95% CI	0,8940 - 5,9381
z statistika	1,728
Razina značajnosti	p = 0,0840

Prevalencijski omjer izgleda (POR)	2,5317
95% CI	0,8893 - 7,2078
z statistika	1,74
Razina značajnosti	p = 0,0818

Tablica 18. Izračun omjera prevalencija (PR) i prevalencijskog omjera izgleda (POR) za HEV pozitivan nalaz svih rizičnih zanimanja zajedno u odnosu na skupinu bez rizika

Omjer prevalencija (PR)	2,916
95% CI	1,5274 - 5,5668
z statistika	3,244
Razina značajnosti	p = 0,0012
Prevalencijski omjer izgleda (POR)	3,1916
95% CI	1,6023 - 6,3574
z statistika	3,301
Razina značajnosti	p = 0,0010

Multivarijatni regresijski model predikcije pozitivnog HEV nalaza prikazan je u tablici 19. U binarni logistički regresijski model svrstane su statistički značajne varijable u prethodnim bivarijatnim analizama. Regresijski model je statistički značajan ($P < 0,001$), opisuje 19,9% varijance zavisne varijable te uspješno klasificira 19,9% ispitanika. U ovom multivarijatnom modelu kao značajne prediktorske varijable se izdvajaju veterinari (u odnosu na skupinu bez rizika) s prevalencijskim omjerom izgleda (POR) od 2,94 (95% CI=1,27-6,82), $p=0,012$ te starije dobne skupine s POR od 1,73 (95% CI=1,30-2,29), $P < 0,001$, a kontrolirano na utjecaj ostalih varijabli u regresijskom modelu.

Tablica 19. Multivarijantni regresijski model predikcije pozitivnog HEV nalaza: binarna logistička regresija

	POR	95% CI		p
		Donji	Gornji	
$\chi^2=44,75$, $df=8$, $P<0,001$;				
$R^2=19,9\%$;				
Uspješnost klasifikacije 90,1%				
Rizična skupina: bez rizika (ref.)				0,021
Veterinar	2,94	1,27	6,82	0,012
Lovac	1,32	0,47	3,73	0,599
Šumar	0,78	0,25	2,43	0,675
Dobne skupine	1,73	1,30	2,29	<0,001
Konsumacija školjki: nikad (ref.)				0,392
Vrlo rijetko	0,50	0,22	1,13	0,093
Mjesečno	0,37	0,04	3,35	0,373
Svaki tjedan	0,00	0,00		1,000
Kućni ljubimci	1,65	0,82	3,32	0,163

5.2. HEV PREVALENCIJA U KONJA, PASA I MAČAKA

Sveukupno je pretraženo 264 uzorka seruma konja, 308 uzoraka seruma pasa i 88 uzoraka seruma mačaka pri čemu su svi pretraživani uzorci seruma uzeti nasumičnim odabirom iz arhive Virološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, gdje su bili pohranjeni pri -20° C. Broj ispitanih konja je manji od predviđenog, jer je tijekom epidemije COVID-19 bilo obustavljeno prikupljanje uzoraka konja u sklopu provedbe Programa nadzora drugih zaraznih bolesti, tako da nije bilo dostatno spremljenih arhivskih uzoraka.

Ukupno 264 uzorka seruma konja su uzeti od životinja s područja pet kontinentalnih županija RH (slika 13), Grada Zagreba, Bjelovarsko-bilogorske, Osječko-baranjske, Varaždinske i Vukovarsko-srijemske županije od čega je 41,0% muških te 59,0% ženskih u dobi od 18 mjeseci do 15 godina.

Uzorci seruma 308 pasa su uzeti od životinja s područja tri županije, Grad Zagreb, Brodsko-posavska i Zagrebačka županija od čega je 51,0% muških te 49,0% s rasponom dobi od 2 mjeseca do 17 godina.

Mačke primarno nisu bile predviđene prvotnim planom istraživanja, ali kako je ostalo 88 arhivskih uzoraka, odlučili smo ih serološki analizirati i uključiti u ovo istraživanje. Većina uzoraka je uzeta od mačaka iz Grada Zagreba od čega 51,0% muških te 49,0% ženskih s rasponom dobi od 2 mjeseca do 18 godina.

Dob i spol životinja uključenih u istraživanje prikazani su u tablici 20.

Tablica 20. Značajke životinjskih vrsta uključenih u istraživanje

Vrsta životinje	Spol: N (%)		Dob
	M	Ž	
Konji	108 (41)	156 (59)	18 mj. - 15 god.
Psi	157 (51)	151 (49)	2 mj. - 17 god.
Mačke	49 (51)	43 (49)	2 mj. - 18 god.



Slika 13. Županije uzorkovanja uzoraka seruma životinja

Od pretraženih 264 uzorka seruma konja s područja pet županija RH svi rezultati bili su negativni. Negativni rezultati su dobiveni i pretraživanjem 88 uzoraka seruma mačaka. Pretraživanjem 308 seruma pasa s područja tri županije u jednog psa iz županije Grad Zagreb su dokazana protutijela na HEV tako da je seroprevalencija u pasa iznosila 0,3% (tablica 21). Obzirom na nalaz jednog seropozitivnog psa, jedna četvrtina svih uzoraka pasa je dodatno pretražena pomoću RT-PCR u stvarnom vremenu. Svi pretraženi uzorci bili su negativni na prisutnost HEV RNK.

Tablica 21. Rezultati pretraživanja konja, pasa i mačaka na HEV infekcije

ŽUPANIJA	VRSTA ŽIVOTINJA					
	KONJI		PSI		MAČKE	
	Pretraženo	Pozitivno	Pretraženo	Pozitivno	Pretraženo	Pozitivno
Bjelovarsko-bilogorska	22	0	-	-	-	-
Brodsko-posavska	-	-	44	0	-	-
Grad Zagreb	66	0	232	1	80	0
Osječko-baranjska	50	0	-	-	-	-
Varaždinska	72	0	-	-	1	0
Vukovarsko-srijemska	54	0	-	-	-	-
Zagrebačka	-	-	32	0	5	0
Ukupni broj uzoraka/Seroprevalencija (%)	264	0,0%	308	0,3%	86	0,0%

6. RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja su potvrdili postavljenu hipotezu prema kojoj je ustanovljeno da je HEV seroprevalencija u djelatnostima koje u svom radnom opisu imaju kontakte sa životinjama viša od one u opće populacije.

Ovo je ujedno i prvo istraživanje seroprevalencije HEV u skupinama osoba profesionalno izloženih životinjama (veterinari, šumari i lovci) u Hrvatskoj. Naši su rezultati pokazali statistički značajnu razliku seroprevalencije HEV infekcije u profesionalno izloženoj skupini (12,6%) u odnosu na neizloženu skupinu (opća populacija i trudnice - 4,3%). Omjer prevalencija za pozitivan HEV nalaz svih rizičnih zanimanja zajedno u odnosu na skupinu bez rizika također je bio skoro trostruko viši (PR=2,91) što profesionalnu izloženost životinjama čini čimbenikom rizika za HEV infekciju. Najveći omjer prevalencija za pozitivan HEV nalaz imali su veterinari u odnosu na skupinu bez rizika te je iznosio 3,53. Sličan omjer prevalencija imali su i lovci u odnosu na skupinu bez rizika s 3,44.

Zoonotski rizik prijenosa HEV-a dobro je poznat, dok ostale putove prijenosa tek treba utvrditi [58]. Nadalje, stope seroprevalencije HEV infekcije se znatno razlikuju ovisno o geografskoj regiji i testiranim populacijskim skupinama. Predloženi putovi prijenosa povezani s profesionalnom izloženosti uključuju čest kontakt s rezervoarima zoonotskog HEV-a, poput svinja i drugih vrsta divljih životinja (uglavnom divljih svinja) [139]. Šumarski radnici, lovci i veterinari predstavljali su rizičnu (izloženu) populaciju u ovom istraživanju. Seroprevalencija HEV-a bila je značajno viša u izloženoj populaciji u usporedbi s neizloženom populacijom. U izloženih osoba, seroprevalencija je bila slična u veterinarima (15,2%) i lovaca (14,9%), dok je bila niža u šumarskih radnika (6,5%).

Ovisno o rizičnim skupinama u ovom istraživanju nije dokazana statistički značajna razlika seroprevalencije anti-HEV protutijela kod šumara u odnosu na skupinu bez rizika (opća populacija) što su pokazala i neka istraživanja u svijetu. Tako npr. u Italiji nije nađena značajna razlika u prevalenciji HEV-a u uzgajivača svinja (3,3%) u odnosu na opću populaciju (2,9%) [39]. Također nije nađena razlika u seroprevalenciji u šumara (14%) u odnosu na kontrolnu skupinu (9,5%) [139].

Seroepidemiološke studije provedene u šumarskih radnika na području Europe pokazale su seroprevalenciju od 31% u Francuskoj (2002-2003. godine) [35] te 18% u

Njemačkoj (Brandenburg, 2008. godine) [140]. Novija su istraživanja dokazala HEV protutijela u 2,2% šumarskih radnika u zapadnoj Poljskoj (Poznan, 2014. godine) [141], 5% šumarskih radnika u istočnoj Poljskoj (Lublinsko vojvodstvo, 2014-2015. godine) [142] te 14% šumarskih radnika u sjevernoj Italiji (područje Trenta, 2014-2015. godine) [139].

Iako je u više studija dokazano da su šumarski radnici u većem riziku od obolijevanja od hepatitisa E [35], istraživanje na području Francuske je po prvi puta pokazalo da posebice drvosječe imaju visok rizik od HEV infekcije. U skupini drvosječa je seropozitivno bilo njih 37,2% u usporedbi s lovočuvarima/rendžerima i šumarima (20,0% odnosno 24,8% seropozitivnih) [35]. Bliski kontakt s fecesom divljih svinja u šumama bi mogao objasniti višu prevalenciju HEV infekcije u ovoj rizičnoj skupini.

Seroprevalencija HEV-a u lovaca obuhvaćenih ovim istraživanjem (14,9%) je bila dvostruko viša nego u općoj populaciji. Prethodna istraživanja uz dokaz virusne RNK u 11,5% pretraživanih divljih svinja i seroprevalenciju od 31,1% [59] ukazuju kako je upravo izravni kontakt s divljim svinjama važan čimbenik rizika širenja infekcije u ovoj promatranoj skupini. Dvije studije koje su provedene u poljskih lovaca u razdoblju od 2010. do 2012. godine pokazale su seroprevalenciju od 25% [143], odnosno 22% [144]. Sličan je seropozitivitet (25%) dokazan u talijanskih lovaca s područja Lacija testiranih tijekom sezone lova (listopad-siječanj) [39] kao i njemačkih lovaca (21%) s područja središnje Njemačke testiranih tijekom 2013. godine [34]. Za razliku od navedenih istraživanja, samo 4,2% lovaca iz 9 regija Estonije je imalo protutijela na HEV u 2013. godini [39] kao i 3,81% lovaca iz istočne Poljske (Lublinsko vojvodstvo) testiranih u razdoblju od 2014. do 2015. godine [142].

Provedena su i istraživanja učestalosti HEV infekcija u veterinarima. Godine 2009. prikupljeni su uzorci seruma sudionika nacionalnog Veterinarskog kongresa u Helsinkiju. Od testiranih finskih veterinarima, njih 10,2% je imalo protutijela na HEV. Neočekivano, najviši je seropozitivitet od 17,8% dokazan u veterinarima male prakse [145]. U istraživanju provedenom u skupini veterinarima u Norveškoj tijekom 2013. godine, HEV IgG seroprevalencija je iznosila 14%. Kada je analizirana povezanost seroprevalencije s radnim iskustvom, veterinari koji su radili sa svinjama su imali dvostruko višu seroprevalenciju u odnosu na one koji nisu radili sa svinjama (22% naspram 9%) [146]. Studije provedene na području Kine (pokrajina Jilin, provincija Shandong i autonomna regija Inner Mongolia, 2013-2015. godine) pokazale su visok

seropozitivitet u veterinaru, u rasponu od 26,7% [147] to 43,7% [148]. Nadalje, visoka učestalost HEV seropozitivnih veterinaru koji rade sa svinjama (23%) je nađena u Sjedinjenim Američkim Državama. Osim povezanosti seropozitiviteta s dobi, nije dokazana značajna razlika u prevalenciji HEV protutijela između veterinaru koji rade u kliničkoj praksi, veterinaru zaposlenih na sveučilištima, u industriji te studenata veterinarske medicine [149].

Vrlo nizak seropozitivitet (2,6%) je nađen kod veterinaru u Estoniji. Važno je napomenuti da su svi seropozitivni veterinaru bili veterinaru male prakse, a neki od njih su i sami bili vlasnici pasa ili mačaka [150]. Većina ispitanika uključenih u naše istraživanje su isto tako bili veterinaru male prakse te je na HEV protutijela bilo pozitivno njih 15,2%. U nekim su državama uočene regionalne razlike u seroprevalenciji HEV infekcije, kao npr. u Poljskoj, gdje je seropozitivitet u veterinaru iznosio od 10% do visokih 42,4% [144].

Dok je u našem istraživanju seroprevalencija u veterinaru bila značajno viša (15,2%) u odnosu na opću populaciju (4,3%), istraživanje provedeno u Portugalu pokazalo je čak nešto nižu prevalenciju HEV-a u veterinaru koji rade s malim životinjama (kućni ljubimci) u odnosu na opću populaciju (9,9% naspram 13,3%) [41].

Obzirom na navedeno pretpostavlja se da češći kontakti sa svinjama predstavljaju rizični čimbenik za infekciju HEV. U Estoniji je prevalencija u radnika na svinjogojским farmama iznosila 13,4% [40] dok istraživanje iz Tajlanda nije pokazalo povezanost između HEV seroprevalencije i čestog izravnog kontakta sa svinjama [151].

Dobro je poznato da trudnice zaražene s HEV, posebno genotipom HEV1, koje žive u zemljama u razvoju, imaju smrtnost do 30%, pri čemu se većina smrtnih slučajeva događa u trećem tromjesečju trudnoće [77,83]. Iako u RH još nije detektiran niti jedan humani slučaj infekcije genotipom HEV1, u ovom istraživanju smo ustanovili seroprevalenciju HEV među trudnicama od 1,7% dok je seroprevalencija HEV među općom populacijom 6,7%. Navedeno se za Hrvatsku može objasniti općenito mlađom dobi trudnica, visokim higijensko-sanitarnim standardom te povećanom sviješću o zdravim navikama tijekom trudnoće što uključuje zdravu prehranu i izbjegavanje rizičnih čimbenika za HEV. Isto je navedeno kao objašnjenje niske seroprevalencije HEV u libanonskom istraživanju koje je dokazalo seroprevalenciju HEV među 450 trudnica od 0,22% [152]. Francuska studija iz 2014. godine je pokazala

seroprevalenciju HEV među trudnicama od 7,7% [153], slično kao i istraživanja iz Argentine provedena u razdoblju od 2015-2017. godine, 8,4% [154]. Istraživanje u zapadnom Iranu tijekom 2018.-2019. godine je dokazalo seroprevalenciju HEV među trudnicama od 4,3% [155] što odgovara rezultatima meta analize iz 2020. godine koja je obuhvatila 52 studije na 11.663 trudnice te pokazala seroprevalenciju HEV od 3,5% (95% CI=1,4-6,4) u asimptomatskih trudnica (od kojih je većina iz visokoendemskih područja) te seroprevalenciju HEV u simptomatskih trudnica od 49,6% (95% CI=42,6-56,7) s podacima samo iz zemalja u kojima je HEV endemski [156].

Prema podacima iz literature, čini se da od hepatitisa E češće obolijevaju muškarci, iako podaci o seroprevalenciji često ne pokazuju značajno odstupanje među spolovima [2,42]. Nekoliko je studija otkrilo spolne razlike u seropozitivnosti na HEV, pa su tako u nekim istraživanjima muškarci imali višu seroprevalenciju usporedbi sa ženama [157,144], dok je u drugima opisana nešto viša prevalencija u žena [43]. Naše istraživanje nije dokazalo značajnu razliku u seropozitivnosti između muškaraca (10,9%) i žena (7,2%). Slično tome, niti istraživanje iz Njemačke nije otkrilo razlike u seroprevalenciji između muškaraca i žena [34].

U ovom istraživanju smo ustanovili značajne razlike u seroprevalenciji ovisno o dobi ispitanika. Najviša je prevalencija anti-HEV protutijela dokazana kod osoba starijih od 60 godina (23,5%) u odnosu na osobe mlađe od 30 godina (2,9%) te dobne skupine 30-39 godina (7,0%), 40-49 godina (5,1%) i 50-59 godina (10,9%). Brojni drugi radovi također potvrđuju da su starije osobe u većem riziku za HEV infekciju od mlađih osoba [149,158-162]. Porast seroprevalencije s dobi vjerojatno odražava kumulativnu izloženost HEV-u tijekom vremena [139]. Slično našim rezultatima, poljska je studija pokazala da je postotak lovaca pozitivnih na prisutnost protutijela najviši u dobnoj skupini 70+ godina (42,1%), sa statistički značajnom razlikom u odnosu na druge dobne skupine (18,3-20,4%) [143]. Porast seroprevalencije s dobi je uočen i u njemačkih lovaca te doseže vrhunac u osoba u dobi od 70 do 79 godina [34]. Nasuprot tome, druga njemačka studija provedena na šumarskim radnicima nije pronašla statistički značajnu povezanost seropozitivnosti s dobi [140]. Slično, nije uočena povezanost seroprevalencije HEV-a s dobi kod norveških veterinarara [146].

U ovom istraživanju, seroprevalencija se nije razlikovala s obzirom na stručnu spremu ispitanika (7,9-12,4%). Slično tome, u istraživanju provedenom u sjevernom dijelu Argentine također nije dokazana povezanost seroprevalencije sa stručnom

spremom [163]. U dva ranija istraživanja (Koreja i Nigerija) koja su analizirala korelaciju stope seropozitiviteta sa stručnom spremom je pak dokazana obrnuta korelacija tj. osobe niže spreme su imale značajno višu seroprevalenciju u odnosu na one s višom, odnosno visokom stručnom spremom [44-45].

Interhumani prijenos HEV-a je još uvijek predmet rasprave. U ovom istraživanju nije bilo razlike u seroprevalenciji u osoba koje žive s partnerom (10,0%) u odnosu na samce (12,0%). Bračni status kao rizični čimbenik dokazan je u jednom istraživanju. Viša seroprevalencija HEV infekcije u osoba koje su u braku može upućivati na mogućnost interhumanog prijenosa između osoba koje su u bliskom kontaktu [44]. Čini se da je prijenos HEV infekcije s osobe na osobu rijedak. Međutim, moguće je da je upravo na taj način došlo do prijenosa HEV1 tijekom izbijanja epidemije u Ugandi [164].

Isključujući transfuziju i transplantaciju solidnih organa, nozokomijalni prijenos HEV infekcije je neuobičajen. Međutim, molekularne studije pružile su dokaze o ovom rijetkom događaju na hematološkom odjelu u Francuskoj. Prvi pacijent zarazio se nakon što je došao u kontakt s nedijagnosticiranim, kronično zaraženim pacijentom koji se liječio u istoj jedinici [70].

Iako je infekcija HEV1 tijekom trudnoće povezana s teškim kliničkim ishodom majke i može se prenijeti na fetus i novorođenče, kod trudnica zaraženih s HEV3 i HEV4 ove komplikacije nisu uočene [84,84]. Patogenetski mehanizmi prijenosa genotipova HEV3 i HEV4 s majke na dijete nisu poznati.

U nekim su studijama prehrambene navike bile povezane s HEV seropozitivnošću. Konzumiranje svinjskih iznutrica više od dva puta tjedno povezano je s višom seroprevalencijom anti-HEV IgG u ruralnoj zajednici na Tajlandu [151] što se pokazalo i u našem istraživanju. Rizik od zaraze HEV-om odnosno udio HEV seropozitivnih to je veći što je učestalost konzumacije svinjske jetre češća. U ovom istraživanju HEV seroprevalencija je iznosila 9,8% u ispitanika koji konzumiraju iznutrice vrlo rijetko, 19% u ispitanika koji konzumiraju mjesečno te 18,2% u ispitanika koji konzumiraju iznutrice svaki tjedan. U skupini ispitanika koji su naveli podatak da nikad ne jedu iznutrice, nije dokazana niti jedna seropozitivna osoba.

U Francuskoj je prisutnost anti-HEV IgG protutijela povezana s konzumacijom svinjskog mesa, kobasica od svinjske jetre, mesa divljači, iznutrica i kamenica. Suprotno tome, pijeće flaširane vode povezano je s nižom stopom HEV IgG seroprevalencije [165]. U našem istraživanju nije nađena statistički značajno viša

seroprevalencija u osoba koje konzumiraju svinjske prerađevine vlastite proizvodnje (12,4%) u odnosu na osobe koje ih ne konzumiraju (8,8%). Isto tako, seroprevalencija se nije značajno razlikovala u osoba koje konzumiraju meso divljači u odnosu na one koji ne konzumiraju.

U Italiji je velik broj HEV seropozitivnih osoba naveo podatak o konzumaciji sirove ili termički nedovoljno obrađene hrane, osobito školjki (dagnje) i neflaširane vode za piće [166]. Vrlo je zanimljiv rezultat našeg istraživanja seroprevalencija HEV-a vezano uz konzumaciju školjaka. Naime, ispitanici koji su naveli podatak da nikad ne konzumiraju školjke ili ih konzumiraju rijetko imali su značajno višu seroprevalenciju (15,4% odnosno 6,4%) u odnosu na one koji ih konzumiraju češće (2,7%). Zbog vrlo malog broja u pojedinim testiranim skupinama, ovo ograničenje svakako treba uzeti u obzir pri tumačenju rezultata. Međutim, školjke (kamenice i dagnje) iz Jadrana su istraživane na prisutnost RNK HEV i redovito su polučile negativan rezultat [61].

Pojedini su autori dokazali višu seroprevalenciju u stanovnika ruralnih područja [44,45], dok drugi nisu našli povezanost prebivališta i HEV seroprevalencije [46,47]. U ovom istraživanju nije ustanovljena povezanost između prebivališta (ruralno/urbano) i HEV seroprevalencije, što se razlikuje od istraživanja provedenog u Hrvatskoj tijekom 2014.-2015. godine u kojem je nađena korelacija između HEV seropozitiviteta i mjesta prebivališta. Osobe iz ruralnih područja imale su sedam puta viši rizik za seropozitivitet nego osobe iz gradskih područja [51]. Konzumacija svinjskih prerađevina vlastite proizvodnje uz češći kontakti sa svinjama su pretpostavljeni rizični čimbenici u ruralnoj populaciji.

Korištenje potoka ili bunara kao izvora pitke vode dokazano je kao čimbenik rizika za HEV infekciju u nekim zemljama [29]. U ovom istraživanju nismo utvrdili statistički značajnu razliku u seropozitivitetu između onih osoba koje kao izvor pitke vode koriste sustav javne vodoopskrbe (7,4%) i osoba koje koriste privatne bunare (4,6%). U skupini osoba koji piju flaširanu vodu nije bilo HEV seropozitivnih, no radilo se o vrlo malom uzorku od svega četiri ispitanika zbog čega ove rezultate treba tumačiti s oprezom.

Rad sa septičkim jamama prepoznat je kao značajan čimbenik rizika za HEV infekciju u Nizozemskoj [167]. Naše istraživanje, međutim, nije dokazalo višu seroprevalenciju u onih osoba koje imaju septičke jame (6,1%) i onih koji su priključeni na javnu kanalizaciju (7,3%). U ovoj studiji nismo pronašli razliku u seroprevalenciji

HEV-a s obzirom na vrstu vodoopskrbe i odlaganje otpada, što se podudara s rezultatima ranijeg hrvatskog istraživanja [51].

Kao mogući rizični čimbenici za HEV infekciju, analizirani su i putovanje u inozemstvo, ranije transfuzije krvi, operativni zahvati te tetoviranje i piercing.

Kao i u studiji provedenoj u Nizozemskoj koja je dokazala vrlo nizak rizik za HEV infekciju u putnika koji su boravili u endemskim područjima kroz kraće vrijeme [168], rezultati ovog istraživanja nisu pokazali značajnu povezanost seroprevalencije HEV-a i putovanja.

Iako je viremija tijekom HEV infekcije kratkotrajna, u posljednjih je godina dokazano nekoliko slučajeva prijenosa HEV-a putem transfuzije krvi u ne-endemskim područjima. Dokazana prevalencija HEV RNK u asimptomatskih dobrovoljnih davatelja krvi iznosi od 0,001 do 0,28% [169]. U jednoj je studiji u Nigeriji nađena viša prevalencija HEV IgM protutijela u osoba koje su primale transfuzije krvi, dok se prevalencija HEV IgG protutijela nije razlikovala [44]. Analizirajući transfuziju krvi kao mogući rizični čimbenik, u ovom istraživanju nije dokazana razlika u seroprevalenciji u osoba koje su navele podatak o transfuziji u odnosu na one koji nisu primali transfuzije krvi što se podudara s rezultatima španjolskih autora (46).

U nedavno objavljenom preglednom radu koji je obuhvatio 1.099.717 ispitanika iz 287 istraživanja analiziran je utjecaj različitih rizičnih čimbenika na HEV seroprevalenciju. Za razliku od spomenutih studija, dokazana je statistički značajno viša seroprevalencija u osoba koje su primale transfuzije krvi, putnika u endemska područja te osoba koje su imale nezavršenu odnosno završenu samo osnovnu školu [170].

Kirurški zahvat također nije dokazan kao mogući rizični čimbenik za HEV infekciju u ovom istraživanju. Za razliku od naših rezultata, u španjolskoj studiji provedenoj među odraslom populacijom Katalonije HEV IgG protutijela češće su pronađena kod pacijenata koji su imali manje kirurške zahvate (46).

Isto tako, u ovom istraživanju nije dokazana povezanost seropozitiviteta i tetovaža/piercinga što se podudara s rezultatima sličnih istraživanja (44,46).

U ovoj studiji, posjedovanje kućnih ljubimaca bilo je povezano s višom seroprevalencijom HEV-a, sa stopom seropozitivnosti od 12,5% kod ispitanika koji su izjavili da imaju mačku/psa u usporedbi sa 7,0% kod onih koji nisu imali kućne ljubimce. Kontakt s domaćim životinjama nije bio povezan sa seropozitivnošću na HEV. U

jordanskoj studiji nije utvrđeno da je posjedovanje životinja u domaćinstvu, uključujući domaće životinje i kućne ljubimce, čimbenik rizika za HEV infekciju [171].

Istraživanje iz Španjolske provedeno među psima i mačkama je pokazalo HEV seroprevalenciju od 6,4% (odnosno 9,9% među psima i 2,8% među mačkama) [162], dok niti u jedne životinje nije detektirana HEV RNK. Naše je istraživanje dokazalo samo jednog seropozitivnog psa među 308 ispitanih pasa, dok među pretraženim konjima i mačkama nije bilo pozitivnih na HEV protutijela. Mogući razlog navedenim razlikama u seroprevalenciji je taj što su u Španjolskoj studiji uključene u istraživanje i ulične životinje što bi poduprlo pretpostavku da je glavni put stjecanja HEV infekcije alimentarni, tj. ulične životinje se hrane otpacima koje nalaze na ulici za koje je veći rizik da su kontaminirani HEV-om. Viša HEV seroprevalencija u pasa bi mogla imati objašnjenje u činjenici da psi za razliku od mačaka prakticiraju koprofagiju, a potvrđeno je da se HEV izlučuje i putem stolice. Isto tako, ulični psi imaju veći krug kretanja, pa je i područje izloženosti potencijalnim izvorima zaraze veće. Za razliku od našeg istraživanja, sličnu seroprevalenciju kod mačaka su potvrdila istraživanja iz Italije i Turske (3,1% odnosno 5,4%) [172,173]. S druge strane, istraživanje iz Velike Britanije o HEV seroprevalenciji u pasa je pokazalo slične rezultate kao i naše istraživanje. Naime britanski su istraživači utvrdili HEV seroprevalenciju od 0,8%, pri čemu su u istraživanje bili uključeni zdravi psi, psi sa kliničkom slikom hepatitisa te psi sa nespecifičnom kliničkom slikom. Zanimljiv je podatak da su dvije seropozitivne životinje bili psi iz skupine zdravih pasa [174]. U tri istraživanja prevalencije HEV-a među psima iz Kine nije bilo pozitivnih pasa među testiranim životinjama [175-177]. Stoga domaća i divlja svinja, te njihove sirovine i proizvodi i dalje predstavljaju glavne izvore infekcije virusom hepatitisa E u Hrvatskoj. Međutim, dodatna istraživanja životinja, moguće otvore nove spoznaje o izvorima ove širuće infekcije.

7. ZAKLJUČCI

1. Profesionalna izloženost životinjama je čimbenik rizika za HEV infekciju.
Dokazana je statistički značajna razlika seroprevalencije u ispitanika u rizičnoj skupini (profesionalno izloženi životinjama) obzirom na zanimanje: 12,6% (95% CI=9,3-16,6%) naspram 4,3% (95% CI=2,3-7,3%) u skupini bez rizika, $p < 0,001$ te je odbačena nul hipoteza.
2. Zanimanja mogu biti čimbenik rizika za infekciju hepatitisom E.
Dokazan je omjer prevalencija za pozitivan HEV nalaz svih rizičnih zanimanja zajedno u odnosu na skupinu bez rizika te je iznosio 2,916 (95% CI=1,53-5,57), $p = 0,0012$.
3. Veterinarska djelatnost je najznačajniji relativni čimbenik rizika u promatranim skupinama.
Najviša seroprevalencija anti-HEV bila je u skupini veterinara: 15,2% (95% CI=10,2-21,6%).
Najveći omjer prevalencija za pozitivan HEV nalaz imali su veterinari u odnosu na skupinu bez rizika te je iznosio 3,53 (95% CI=1,77-7,04), $p < 0,001$. Sličan omjer prevalencija imali su i lovci u odnosu na skupinu bez rizika s 3,44 (95% CI=1,55-7,63), $p < 0,001$.
Ovisno o rizičnim skupinama, dokazana je statistički značajna razlika seroprevalencije anti-HEV u odnosu na kontrolnu skupinu: u skupini veterinara [15,2%, POR=3,98; 95% CI (POR)=1,88-8,43, $p < 0,001$] te u skupini lovaca [14,9%, POR=3,87; 95% CI (POR)=1,60-9,34, $p < 0,05$], dok se nije značajno razlikovala u skupini šumara [6,45%; POR=1,53; 95% CI (POR)=0,55 - 4,26, $p > 0,05$].
4. Trudnice ne predstavljaju rizičnu skupinu za infekciju HEV-om u Hrvatskoj
Ustanovljena je seroprevalencija anti-HEV među trudnicama od 1,7% dok je seroprevalencija anti-HEV među općom populacijom 6,7%.
5. Spol nije čimbenik rizika za HEV infekciju.
Obzirom na spol, nije dokazana značajna razlika seroprevalencije anti-HEV u muškaraca (10,7%) i žena (7,2%); $p = 0,130$.

6. Dob je čimbenik rizika za HEV infekciju.
Obzirom na dob, dokazana je značajna razlika seroprevalencije anti-HEV između dobnih skupina ispitanika ($p < 0,001$). Najviši seropozitivitet dokazan je za dobne skupine 50-59 godina - 10,9% (95% CI=5,9%-18,1%) te dobne skupine ≥ 60 godina - 23,5% (95% CI=15,3-33,5%).
7. Ovisno o okolišnim i stambenim čimbenicima, dokazana je statistički značajna razlika seroprevalencije anti-HEV u osoba koje imaju kućne ljubimce u odnosu na one koji ih nemaju ($p=0,039$).
Značajna razlika seroprevalencije anti-HEV nije dokazana s obzirom na opskrbu vodom ($p=0,694$), kanalizaciju ($p=0,781$), način zbrinjavanja otpada ($p=1,000$), posjedovanje podruma ($p=0,669$), držanje domaćih životinja ($p=0,629$), provedenu deratizaciju ($p=0,670$) te skladištenje hrane u podrumu ($p=0,346$).
8. Mjesto prebivališta, broj ukućana, stručna sprema i život s partnerom nisu čimbenici rizika za HEV infekciju.
Ovisno o demografskim karakteristikama, nije dokazana značajna razlika seroprevalencije anti-HEV s obzirom na mjesto prebivališta ($p=0,144$), broj ukućana ($p=0,301$), stručnu spremu ($p=0,467$) te život s partnerom ($p=0,565$).
9. Prehrambene navike nisu čimbenici rizika infekcijom HEV-om.
Ovisno o prehrambenim navikama, dokazana je značajna razlika seroprevalencije anti-HEV obzirom na konzumaciju školjki ($p=0,004$). Najviši seropozitivitet dokazan je u skupini ispitanika koji nikada ne konzumiraju školjke - 25,9% (95% CI=15,4-37%), dok značajna razlika seroprevalencije anti-HEV nije dokazana s obzirom na konzumaciju mesa divljači ($p=0,104$), konzumaciju iznutrica (jetra) ($p=0,070$) i konzumaciju svinjskih prerađevina vlastite proizvodnje ($p=0,216$).
10. Ostali čimbenici rizika iz istraživanja ne utječu na infekciju HEV-om.
Ovisno o ostalim rizičnim čimbenicima, nije dokazana značajna razlika obzirom na putovanja u inozemstvo ($p=0,621$), transfuziju krvi ($p=0,120$), operacijske zahvate ($p=0,570$) i tetoviranje i piercing ($p=0,540$).
11. Kao značajne prediktorske varijable izdvajaju se veterinari (u odnosu na skupinu bez rizika) s prevalencijskim omjerom izgleda (POR) od 2,94 (95% CI=1,27-6,82), $p=0,012$ te starije dobne skupine s POR od 1,73 (95% CI=1,30-

2,29), $P < 0,001$, a kontrolirano na utjecaj ostalih varijabli u regresijskom modelu.

12. Pretraživanjem 264 uzorka seruma konja i 88 uzoraka seruma mačaka dobiveni su negativni rezultati dok su pretraživanjem 308 seruma pasa u jednog dokazana protutijela za HEV (seroprevalencija u pasa 0,3%). Obzirom su molekularnim metodama polučeni negativni rezultati, istraživanjem nije dokazana niti jedna akutna HEV infekcija. Budući je nađen jedan pas pozitivan na HEV protutijela, četvrtina preostalih uzoraka seruma pasa su pretraženi na HEV RNK pri čemu ista nije dokazana niti u jednom uzorku.

8. SAŽETAK

Infekcija virusom hepatitisa E (HEV) u novije doba predstavlja značajan javnozdravstveni problem. Stope seroprevalencije uvelike se razlikuju ovisno o geografskoj regiji i skupini stanovništva. Cilj ove studije bio je analizirati seroprevalenciju HEV-a u izloženoj (zanimanja povezana sa životinjama) i neizloženoj populaciji te analizirati okolišne čimbenike rizika za HEV. U istraživanje su bili uključeni šumarski radnici (N=93), lovci (N=74) i veterinari (N=151) koji su predstavljali izloženu populaciju. Opća populacija (N=135) i trudnice (N=120) činile su kontrolnu skupinu. Protutijela IgG na HEV otkrivena su pomoću ELISA i potvrđena imunoblot testom. Seroprevalencija HEV-a značajno se razlikovala između skupina: veterinari 15,2%, lovci 14,9%, šumarski radnici 6,5%, opća populacija 7,1%, trudnice 1,7%. Uočeno je značajno povećanje seropozitivnosti s dobi od 2,9% kod osoba mlađih od 30 godina do 23,5% kod osoba starijih od 60 godina. Sociodemografske karakteristike (spol, stupanj obrazovanja, područje stanovanja, broj članova kućanstva), prehrambene navike (konzumacija mesa divljači, iznutrica, proizvoda od svinjskog mesa), uvjeti okoliša i stanovanja (opskrba pitkom vodom, vrsta odvodnje/kanalizacije, odlaganje otpada, domaće životinje) nisu bili povezani sa seropozitivnošću na HEV. Međutim, pojedinci koji su prijavili posjedovanje kućnog ljubimca bili su češće seropozitivni u usporedbi s onima koji nisu imali kućne ljubimce (12,5% prema 7,0%).

9. SUMMARY

Hepatitis E virus (HEV) infection is a significant public health problem in recent times. The seroprevalence rates differ greatly according to geographic region and population group. The aim of this study was to analyze the seroprevalence of HEV in exposed (animal-related professions) and non-exposed populations and to analyze the environmental risk factors for HEV. The study included forestry workers (N=93), hunters (N=74) and veterinarians (N=151) who represented the exposed population. General population (N=135) and pregnant women (N=120) constituted the control group. HEV IgG antibodies were detected using enzyme-linked immunosorbent assay and confirmed by immunoblot test. The HEV seroprevalence differed significantly between groups: veterinarians 15.2%, hunters 14.9%, forestry workers 6.5%, general population 7.1%, pregnant women 1.7%. A significant increase in the seropositivity with age was observed from 2.9% in individuals less than 30 years to 23.5% in those older than 60 years. Sociodemographic characteristics (gender, educational level, area of residents, number of household members), eating habits (game meat, offal, pork products consumption), environmental and housing conditions (drinking water supply, type of water drainage/sewer, waste disposal, domestic animals) were not associated with the HEV seropositivity. However, individuals who reported a pet ownership were more often seropositive compared who did not have pet animals (12.5% vs 7.0%).

Epidemiological and epizootiological characteristics of hepatitis E infection in continental Croatia, Pavle Jeličić, 2023.

10. POPIS LITERATURE

1. Smith DB, Simmonds P, Members Of The International Committee On The Taxonomy Of Viruses Study Group, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, i sur. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95:2223-32.
2. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Xia NS, Ijaz S, Izopet J, i sur. Hepatitis E. *Lancet.* 2012;379:2477-88.
3. Khuroo MS, Kamili S, Jameel S. Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet.* 1995; 345:1025-6.
4. Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, Woo PCY. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4):869.
5. Kamar N, Dalton HR, Abravanel F, Izopet J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(1):116-38.
6. Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HH, Vennema H, Duizer E, i sur. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):381-7.
7. Rodríguez-Lázaro D, Cook N, Ruggeri FM, Sellwood J, Nasser A, Nascimento MS, i sur. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiol Rev.* 2012;36(4):786-814.
8. Ijaz S, Vyse AJ, Morgan D, Pebody RG, Tedder RS, Brown D. Indigenous hepatitis E virus infection in England: more common than it seems. *J Clin Virol.* 2009;44:272-6.
9. Bazerbachi F, Haffar S, Garg SK, Lake JR. Extra-hepatic manifestations associated with hepatitis E virus infection: a comprehensive review of the literature. *Gastroenterol Rep.* 2016;4(1):1-15.
10. Moal V, Ferretti A, Devichi P, Colson P. Genome sequence of hepatitis E virus genotype 3e from a chronically infected kidney transplant recipient. *J Clin Microbiol.* 2014;11:3967-72.
11. Fujiwara S, Yokokawa Y, Morino K, Hayasaka K, Kawabata M, Shimizu T. Chronic hepatitis E: a review of the literature. *J Viral Hepat.* 2014;21:78-89.

12. Xing L, Li TC, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, i sur. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway. *J Biol Chem* 2010;285:33175-83.
13. Nair VP, Anang S, Subramani C, Madhvi A, Bakshi K, Srivastava A, i sur. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus. *PLoS Pathog.* 2016;12(4):e1005521.
14. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83:12714-24.
15. Zhou Y, Emerson SU. P.302 Heat shock cognate protein 70 may mediate the entry of hepatitis E virus into host cells. *J Clin Virol.* 2006;36(2):S155.
16. Chandra V, Taneja S, Kalia M, Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci.* 2008;33:451-64.
17. Jameel S. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert Rev Mol Med.* 1999;1999:1-16.
18. Meng XJ. Recent advances in Hepatitis E virus. *J Viral Hepat.* 2010;17:153-61.
19. Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res.* 2011;161:47-58.
20. Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, i sur. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(11):2645-6.
21. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, Oliveira-Filho EF, Ulrich RG, Johne R, i sur. Proposed reference sequences for Hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol.* 2016;97:537-42.
22. Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis.* 2013;33:41-9.
23. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeu S, Boucher S, i sur. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:1274-81.
24. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, i sur. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016;150:355-7.

25. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55:988-97.
26. Zuckerman JN. Hepatitis E and the traveller. *Travel Med Infect Dis*. 2003;1(2):73-6.
27. Ijaz S, Arnold E, Banks M, Bendall RP, Cramp ME, Cunningham R, i sur. Non-travel associated hepatitis E in England and Wales: demographic, clinical, and molecular epidemiological characteristics. *J Infect Dis*. 2005;192:1166-72.
28. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, i sur. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol*. 2002;40(1):117-22.
29. Meng QF, You HL, Wang WL, Zhou N, Dong W, Cong W. Seroprevalence and risk factors of hepatitis E virus infection among children in China. *J Med Virol*. 2015;87(9):1573-7.
30. Takeda H, Matsubayashi K, Sakata H, Sato S, Kato T, Hino S, i sur. A nationwide survey for prevalence of hepatitis E virus antibody in qualified blood donors in Japan. *Vox Sang*. 2010;99:307-13.
31. Kumar T, Shrivastava A, Kumar A, Laserson KF, Narain JP, Venkatesh S, i sur. Viral Hepatitis Surveillance--India, 2011-2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015;64(28):758-62.
32. Asaei S, Ziyaeyan M, Moeini M, Jamalidoust M, Behzadi MA. Seroprevalence of Hepatitis A and E Virus Infections Among Healthy Population in Shiraz, Southern Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(7):e19311.
33. Zhuang W, Ding X, Lyu C, Xiang L, Teng H, Li J. Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in Jiangsu Province, East China. *Int J Infect Dis*. 2014;26:9-11.
34. Schielke A, Ibrahim V, Czogiel I, Faber M, Schrader C, Dremsek P, i sur. Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*. 2015;15:440.
35. Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boué F, i sur. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol*. 2012;50(9):2888-93.

36. Norder H, Sundqvist L, Magnusson L, Østergaard Breum S, Löfdahl M, Larsen LE, i sur. Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill.* 2009;14:20-8.
37. Olsen B, Axelsson-Olsson D, Thelin A, Weiland O. Unexpected high prevalence of IgG-antibodies to hepatitis E virus in Swedish pig farmers and controls. *Scand J Infect Dis.* 2006;38:55-8.
38. Drobeniuc J, Favorov MO, Shapiro CN, Bell BP, Mast EE, Dadu A, i sur. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J Infect Dis.* 2001;184:1594-7.
39. Vulcano A, Angelucci M, Candelori E, Martini V, Patti AM, Mancini C, i sur. HEV prevalence in the general population and among workers at zoonotic risk in Latium Region. *Ann Ig.* 2007;19(3):181-6.
40. Ivanova A, Tefanova V, Reshetnjak I, Kuznetsova T, Geller J, Lundkvist Å, i sur. Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food Environ Virol.* 2015;7(4):403-12.
41. Mesquita JR, Valente-Gomes G, Conceição-Neto N, Nascimento MS. Pet veterinarians have no increased risk of hepatitis E compared to the general population. *J Med Virol.* 2014;86(6):954-6.
42. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med.* 2009;361:1025-7.
43. Straková P, Kříž B, Rudolf I, Hubálek Z. Seroprevalence study of hepatitis E virus infection in two districts of the Czech Republic. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2014;63(2):92-4.
44. Junaid SA, Agina SE, Abubakar KA. Epidemiology and associated risk factors of hepatitis e virus infection in plateau state, Nigeria. *Virology (Auckl).* 2014;5:15-26.
45. Yoon Y, Jeong HS, Yun H, Lee H, Hwang YS, Park B, i sur. Hepatitis E Virus (HEV) seroprevalence in the general population of the Republic of Korea in 2007-2009: a nationwide cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2014;14:517.
46. Buti M, Domínguez A, Plans P, Jardí R, Schaper M, Espuñes J, i sur. Community-based seroepidemiological survey of hepatitis E virus infection in Catalonia, Spain. *Clin Vaccine Immunol.* 2006;13(12):1328-32.

47. Tessé S, Lioure B, Fornecker L, Wendling MJ, Stoll-Keller F, Bigaillon C, i sur. Circulation of genotype 4 hepatitis E virus in Europe: First autochthonous hepatitis E infection in France. *J Clin Virol*. 2012;54:197-200.
48. Ditah I, Ditah F, Devaki P, Ditah C, Kamath PS, Charlton M. Current epidemiology of hepatitis E virus infection in the United States: low seroprevalence in the National Health and Nutrition Evaluation Survey. *Hepatology*. 2014;60(3):815-22.
49. Čivljak R, Đaković Rode O, Jemeršić L, Topić A, Turalija I, Kuzman I i sur. Prikaz bolesnika iz Zagreba s autohtonim hepatitisom E. *Infektol Glasn*. 2013;33:35-9.
50. Đaković Rode O, Jemeršić L, Brnić D, Pandak N, Mikulić R, Begovac J, i sur. Hepatitis E in patients with hepatic disorders and HIV-infected patients in Croatia: is one diagnostic method enough for hepatitis E diagnosis? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(12):2231-6.
51. Vilibic-Cavlek T, Vilibic M, Kolaric B, Jemersic L, Kucinar J, Barbic L, i sur. Seroepidemiology of hepatitis E in selected population groups in Croatia: a prospective pilot study. *Zoonoses Public Health*. 2016;63(6):494-502.
52. Đaković Rode O, Jemeršić L, Vince A. Hepatitis E in Croatia - guidelines for diagnosis and treatment. *Liječ vjesn*. 2016;138(9-10):289-96.
53. Miletić M, Vuk T, Hećimović A, Stojić Vidović M, Jemeršić L, Jukić I. Estimation of the hepatitis E assay-dependent seroprevalence among Croatian blood donors. *Transfus Clin Biol*. 2019;26:229-33.
54. Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Knotek M, Kudumija B, Ilic M, Gulin M, i sur. Seroepidemiology of hepatitis E in patients on haemodialysis in Croatia. *Int Urol Nephrol*. 2020;52:371-8.
55. Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Jemersic L, Vilibic-Cavlek T. The Burden of Hepatitis E Infection in Chronic Liver Diseases in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2020;21:67-8.
56. Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Vilibic-Cavlek T, Jemersic L, Prpic J, Dakovic-Rode O, i sur. Hepatitis E seroprevalence and associated risk factors in Croatian liver transplant recipients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20190302.
57. Jemeršić L, Keros T, Maltar Lj, Barbić Lj, Vilibić Čavlek T, Jeličić P, i sur. Differences in hepatitis E virus (HEV) presence in naturally infected seropositive domestic pigs and wild boars - an indication of wild boars having an important role in HEV epidemiology. *Veterinary Archives*. 87(6):651-63.

58. Mrzljak A, Jemersic L, Savic V, Balen I, Ilic M, Jurekovic Z, i sur. Hepatitis E Virus in Croatia in the "One-Health" Context. *Pathogens*. 2021;10(6):699.
59. Jemeršić L, Prpić J, Brnić D, Keros T, Pandak N, Dakovic-Rode O. Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017. *BMC Infec Dis*. 2019;19:269.
60. Prpić J, Keros T, Vucelja M, Bjedov L, Đaković Rode O, Margaletić J, i sur. First evidence of hepatitis E virus infection in a small mammal (yellow-necked mouse) from Croatia. *PLoS One*. 2019;14(11):e0225583.
61. Prpić J, Černi S, Škorić D, Keros T, Brnić D, Cvetnić Ž, i sur. Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol*. 2015;7(3):195-205.
62. Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, i sur. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: The role of water treatment methods. *Clin Infect Dis*. 2006;42:1685-91.
63. Nicand E, Bigaillon C, Tessé S. Hepatitis E: An emerging disease? *Pathol Biol*. 2009;57:203-11.
64. de Niet A, Zaaijer HL, ten Berge I, Weegink CJ, Reesink HW, Beuers U. Chronic hepatitis E after solid organ transplantation. *Neth J Med*. 2012;70:261-6.
65. Purdy MA, Khudyakov YE. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Res*. 2011;161:31-9.
66. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, i sur. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*. 2010;202:825-34.
67. Bouquet J, Tessé S, Lunazzi A, Eloit M, Rose N, Nicand E, i sur. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:2018-25.
68. Fogeda M, Avellón A, Cilla CG, Echevarría JM. Imported and autochthonous virus strains in Spain. *J Med Virol*. 2009;81:1743-9.
69. Mansuy JM, Abravanel F, Miedouge M, Mengelle C, Merviel C, Dubois M, i sur. Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol*. 2009;44:74-7.

70. Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, i sur. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:110-4.
71. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010;41(6):46.
72. Wedemeyer H, Rybczynska J, Pischke S, Krawczynski K. Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection. *Semin Liver Dis.* 2013;33:71-8
73. Viswanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): A critical study: *Epidemiology.* *Indian J Med Res.* 1957;45:1-29.
74. Ticehurst J, Rhodes LL Jr, Krawczynski K, Asher LV, Engler WF, Mensing TL, i sur. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J Infect Dis.* 1992;165:835-45.
75. Tsarev SA, Emerson SU, Reyes GR, Tsareva TS, Legters LJ, Malik IA, i sur. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:559-63.
76. Aggarwal R, Kini D, Sofat S, Naik SR, Krawczynski K. Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. *Lancet.* 2000;356:1081-2.
77. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med.* 2007;147(1):28-33.
78. Tanaka T, Takahashi M, Kusano E, Okamoto H. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for hepatitis E virus. *J Gen Virol.* 2007;88:903-11.
79. Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, i sur. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol.* 2008;153:1703-13.
80. Tsarev SA, Tsareva TS, Emerson SU, Govindarajan S, Shapiro M, Gerin JL, i sur. Successful passive and active immunization of cynomolgus monkeys against hepatitis E. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:10198-202.
81. Kumar A, Aggarwal R, Naik SR, Saraswat V, Ghoshal UC, Naik S. Hepatitis E virus is responsible for decompensation of chronic liver disease in an endemic region. *Indian J Gastroenterol.* 2004;23:59-62.

82. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 2008;28:1190-9.
83. Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses.* 2016;8(8):212.
84. Anty R, Ollier L, Péron JM, Nicand E, Cannavo I, Bongain A, i sur. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J Clin Virol.* 2012;54:76-8.
85. Tabatabai J, Wenzel JJ, Soboletzki M, Flux C, Navid MH, Schnitzler P. First case report of an acute hepatitis E subgenotype 3c infection during pregnancy in Germany. *J Clin Virol.* 2014;61:170-2.
86. Emerson SU, Purcell RH. Hepatitis E virus. *Rev Med Virol.* 2003;13:145-54.
87. Dalton HR, Pas SD, Madden RG, van der Eijk AA. Hepatitis e virus: current concepts and future perspectives. *Curr Infect Dis Rep.* 2014;16:399.
88. Ahmed A, Ali IA, Ghazal H, Fazili J, Nusrat S. Mystery of hepatitis e virus: recent advances in its diagnosis and management. *Int J Hepatol.* 2015;2015:872431.
89. Pérez-Gracia MT, García M, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Current Knowledge on Hepatitis E. *J Clin Transl Hepatol.* 2015;3:117-26.
90. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, i sur. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology.* 2011;140:1481-9.
91. Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med.* 2008;358:859-60.
92. Geng Y, Zhang H, Huang W, J Harrison T, Geng K, Li Z, i sur. Persistent hepatitis e virus genotype 4 infection in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Hepat Mon.* 2014;14:e15618.
93. Meisner S, Polywka S, Memmler M, Nashan B, Lohse AW, Sterneck M, i sur. Definition of chronic hepatitis E after liver transplant conforms to convention. *Am J Transplant.* 2015;15:3011-2.
94. Kamar N, Selves J, Mansuy JM, Ouezzani L, Péron, J-M, Guitard J, i sur. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2008;358:811-7.
95. Dalton HR, Keane FE, Bendall R, Mathew J, Ijaz S. Treatment of chronic hepatitis E in a patient with HIV infection. *Ann Intern Med.* 2011;155:479-80.

96. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, i sur. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatology Res.* 2007;37:113-20.
97. Ollier L, Tieulie N, Sanderson F, Heudier P, Giordanengo V, Fuzibet JG, i sur. Chronic hepatitis after hepatitis E virus infection in a patient with non-Hodgkin lymphoma taking rituximab. *Ann Intern Med.* 2009;150:430-1.
98. Labrique AB, Zaman K, Hossain Z, Saha P, Yunus M, Hossain A, i sur. Epidemiology and risk factors of incident hepatitis E virus infections in rural Bangladesh. *Am J Epidemiol.* 2010;172:952-61.
99. Bonney JH, Kwame-Aryee RA, Obed S, Tamatey AA, Barnor JS, Armah NB, i sur. Fatal hepatitis E viral infection in pregnant women in Ghana: a case series. *BMC Res Notes.* 2012;5:478.
100. Coursaget P, Buisson Y, Enogat N, Bercion R, Baudet JM, Delmaire P, i sur. Hepatitis E virus infections in France and Africa, In Buisson Y, Coursaget P, Kane M (ed), *Enterically transmitted hepatitis viruses.* Tours, France: La Simarre; 1996. p 201-12.
101. Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008;48 494-503.
102. Tang X, Yang C, Gu Y, Song C, Zhang X, Wang Y, i sur. Structural basis for the neutralization and genotype specificity of hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:10266-71.
103. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, i sur. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2010;376:895-902.
104. Zhang J, Zhang XF, Huang SJ, Wu T, Hu YM, Wang ZZ, i sur. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. *N Engl J Med.* 2015;372:914-22.
105. Zhao C, Geng Y, Harrison TJ, Huang W, Song A, Wang Y. Evaluation of an antigen-capture EIA for the diagnosis of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 2015;22(11):957-63.
106. Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron JM, Alric L, Kamar N, i sur. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol.* 2016;79:1-5.

107. Behrendt P, Bremer B, Todt D, Brown RJ, Heim A, Manns MP, i sur. Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate Between Acute and Chronic HEV Infection. *J Infect Dis.* 2016;214(3):361-8.
108. Fu RM, Decker CC, Dao Thi VL. Cell Culture Models for Hepatitis E Virus. *Viruses.* 2019;11(7):608.
109. Lupulović D. Razvoj i primena različitih laboratorijskih metoda za dijagnostikovanje infekcije izazvane hepatitis E virusom kod svinja i ljudi. PhD Thesis. Serbia: University of Novi Sad; 2013.
110. Emerson SU, Clemente-Casares P, Moiduddin N, Arankalle VA, Torian U, Purcell RH.. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol.* 2006;87:697-704.
111. Engle RE, Yu C, Emerson SU, Meng XJ, Purcell RH. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4576-80.
112. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, i sur. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One.* 2010;5:e13560.
113. Khuroo MS, Kamili S, Dar MY, Moecklii R, Jameel S. Hepatitis E and long-term antibody status. *Lancet.* 1993;341:1355.
114. Abravanel F, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Muscari F, Sallusto F, i sur. Hepatitis E virus reinfections in solid-organ-transplant recipients can evolve into chronic infections. *J Infect Dis.* 2014;209:1900-6.
115. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Miedougé M, Peron JM, Alric L, i sur.. Performance of anti--HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol.* 2013;58:624-8.
116. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods.* 2006;131:65-71.
117. van der Poel WH, Verschoor F, van der Heide R, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, i sur. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:970-6.

118. Péron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E in western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *J Hepatol.* 2011;54:1323-4.
119. Pischke S, Hardtke S, Bode U, Birkner S, Chatzikyrkou C, Kauffmann W, i sur. Ribavirin treatment of acute and chronic hepatitis E: a single-centre experience. *Liver Int.* 2013;33:722-6.
120. Sinclair SM, Jones JK, Miller RK, Greene MF, Kwo PY, Maddrey WC. The Ribavirin Pregnancy Registry: An Interim Analysis of Potential Teratogenicity at the Mid-Point of Enrollment. *Drug Saf.* 2017;40:1205-18.
121. Kar P, Sengupta A. A guide to the management of hepatitis E infection during pregnancy. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;13:205-11.
122. Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JH, i sur. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transpl.* 2008;14:547-53.
123. Kamar N, Abravanel F, Selves J, Garrouste C, Esposito L, Lavayssiere L, i sur. Influence of immunosuppressive therapy on the natural history of genotype 3 hepatitis-E virus infection after organ transplantation. *Transplantation.* 2010;89:353-60.
124. Kamar N, Legrand-Abravanel F, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus: what transplant physicians should know. *Am J Transplant.* 2012;12:2281-7.
125. Haagsma EB, Riezebos-Brilman A, van den Berg AP, Porte RJ, Niesters HG. Treatment of chronic hepatitis E in liver transplant recipients with pegylated interferon alpha-2b. *Liver Transpl.* 2010;16:474-7.
126. Rostaing L, Izopet J, Baron E, Duffaut M, Puel J, Durand D. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alpha in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1995;59:1426-31.
127. Jagjit Singh GK, Ijaz S, Rockwood N, Farnworth SP, Devitt E, Atkins M, i sur. Chronic hepatitis E virus as a cause of cryptogenic cirrhosis in HIV. *J Infect.* 2012;66:103-6.
128. Hajji H, Gerolami R, Solas C, Moreau J, Colson P. Chronic hepatitis E resolution in a human immunodeficiency virus (HIV)-infected patient treated with ribavirin. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;41:595-7.

129. Neukam K, Barreiro P, Macias J, Avellon A, Cifuentes C, Martin-Carbonero L, i sur. Chronic hepatitis E in HIV patients: rapid progression to cirrhosis and response to oral ribavirin. *Clin Infect Dis*. 2013;57:465-8.
130. Alric L, Bonnet D, Beynes-Rauzy O, Izopet J, Kamar N. Definitive clearance of a chronic hepatitis E virus infection with ribavirin treatment. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:1562-3.
131. Alric L, Bonnet D, Laurent G, Kamar N, Izopet J. Chronic hepatitis E virus infection: successful virologic response to pegylated interferon- α therapy. *Ann Intern Med*. 2010;153:135-6.
132. Mallet V, Nicand E, Sultanik P, Chakvetadze C, Tesse S, Thervet E, i sur. Brief communication: case reports of ribavirin treatment for chronic hepatitis E. *Ann Intern Med*. 2010;153:85-9.
133. Versluis J, Pas SD, Agteresch HJ, de Man RA, Maaskant J, Schipper ME, i sur. Hepatitis E virus: an underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2013;122:1079-86.
134. Gerolami R, Borentain P, Raissouni F, Motte A, Solas C, Colson P. Treatment of severe acute hepatitis E by ribavirin. *J Clin Virol*. 2011;52:60-2.
135. Goyal R, Kumar A, Panda SK, Paul SB, Acharya SK. Ribavirin therapy for hepatitis E virus-induced acute or chronic liver failure: a preliminary report. *Antivir Ther*. 2012;17:1091-6.
136. Peron JM, Dalton H, Izopet J, Kamar N. Acute autochthonous hepatitis E in Western patients with underlying chronic liver disease: a role for ribavirin? *J Hepatol*. 2011;54:1323-4.
137. Zhu FC, Zhang J, Zhang XF, Zhou C, Wang ZZ, Huang SJ, i sur. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:895-902.
138. HAPIH. Kopitari - Godišnje izvješće 2020. [pristupljeno 16.8.2022.] Dostupno na: <https://cdn.agroklub.com/upload/documents/godisnje-izvjesce-kopitari-2020-web-1.pdf>;
139. Monini M, Ostanello F, Dominicis A, Tagliapietra V, Vaccari G, Rizzoli A, i sur. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Forestry Workers from Trentino-Alto Adige Region (Northern Italy). *Pathogens*. 2020;9:568.

140. Dremsek P, Wenzel J, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup M, i sur. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3-and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201:189-200.
141. Bura M, Bukowska A, Michalak M, Bura A, Nawrocki M, Karczewski M, i sur. Exposure to hepatitis E virus, hepatitis A virus and *Borrelia* spp. infections in forest rangers from a single forest district in western Poland. *Adv Clin Exp Med.* 2018;27:351-5.
142. Weiner M, Tokarska-Rodak M, Plewik D, Pańczuk A, Szepeluk A, Krajewska M. The Serological Surveillance of Hepatitis E virus among Hunters and Foresters in Eastern Poland. *Pol J Microbiol.* 2017;66(2):277-9.
143. Sadkowska-Todys M, Baumann-Popczyk A, Wnukowska N, Popczyk B, Kucharczyk B, Gołąb E. Occurrence and prevalence of selected zoonotic agents: *Echinococcus multilocularis*, *Trichinella spiralis* and hepatitis E virus (HEV) in the population of Polish hunters--results of the study conducted in 2010-2012. *Przegl Epidemiol.* 2015;69(4):673-8, 823-7.
144. Baumann-Popczyk A, Popczyk B, Gołąb E, Rożej-Bielicka W, Sadkowska-Todys M. A cross-sectional study among Polish hunters: seroprevalence of hepatitis E and the analysis of factors contributing to HEV infections. *Med Microbiol Immunol.* 2017;206:367-78.
145. Kantala T, Kinnunen PM, Oristo S, Jokelainen P, Vapalahti O, Maunula L. Hepatitis E Virus Antibodies in Finnish Veterinarians. *Zoonoses Public Health.* 2017;64(3):232-8.
146. Lange H, Øverbø J, Borgen K, Dudman S, Hoddevik G, Urdahl AM, i sur. Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol Infect.* 2017;145(1):181-6.
147. Kang YH, Cong W, Zhang XY, Wang CF, Shan XF, Qian AD. Hepatitis E virus seroprevalence among farmers, veterinarians and control subjects in Jilin province, Shandong province and Inner Mongolia Autonomous Region, China. *J Med Virol.* 2017;89(5):872-7.
148. Yue N, Wang Q, Zheng M, Wang D, Duan C, Yu X, i sur. Prevalence of hepatitis E virus infection among people and swine in mainland China: A systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health.* 2019;66:265-75.

149. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol.* 2002;40:117-22.
150. Lassen B, Janson M, Neare K, Tallo T, Reshetnjak I, Kuznetsova T, et al. Prevalence of Antibodies Against Hepatitis E Virus in Veterinarians in Estonia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017;17(11):773-6.
151. Hinjoy S, Nelson KE, Gibbons RV, Jarman RG, Mongkolsirichaikul D, Smithsuwan P, et al. A cross-sectional study of hepatitis E virus infection in healthy people directly exposed and unexposed to pigs in a rural community in northern Thailand. *Zoonoses Public Health.* 2013;60(8):555-62.
152. Ismail MB, Khodor S, Osman M, Mallat H, Dabboussi F, Hamze M. Seroprevalence of hepatitis E virus in pregnant women in northern Lebanon. *East Mediterr Health J.* 2020;26(5):580-5.
153. Renou C, Gobert V, Locher C, Moumen A, Timbely O, Savary J, et al. Prospective study of hepatitis E virus infection among pregnant women in France. *Viol J.* 2014;11:68.
154. Kenarkoohi A, Falahi S, Ghelijie F, Mirzaei A. Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection Among Pregnant Women in Ilam, West of Iran. *Infect Disord Drug Targets.* 2021;21(5):e270421187571.
155. Tissera G, Lardizabal MC, Torres SB, Fantilli AC, Martínez Wassaf MG, Venezuela F, et al. Hepatitis E virus infection in pregnant women, Argentina. *BMC Infect Dis.* 2020;20(1):368.
156. Bigna JJ, Modiyinji AF, Nansseu JR, Amougou MA, Nola M, Kenmoe S, et al. Burden of hepatitis E virus infection in pregnancy and maternofetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020;20:426
157. Joon A, Rao P, Shenoy SM, Baliga S. Prevalence of Hepatitis A virus (HAV) and Hepatitis E virus (HEV) in the patients presenting with acute viral hepatitis. *Indian J Med Microbiol.* 2015;33 Suppl:102-5.
158. Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, Hazeldine S, Remnarace R, Usama W, et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence

- in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:784-90.
159. Christensen PB, Engle RE, Hjort C, Homburg KM, Vach W, Georgsen J, i sur. Time trend of the prevalence of hepatitis E antibodies among farmers and blood donors: a potential zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis*. 2008;47:1026-31
160. Christensen PB, Engle RE, Jacobsen SE, Krarup HB, Georgsen J, PurcellRH. High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users. *J Med Virol*. 2002;66:49-55.
161. Park HK, Jeong SH, Kim JW, Woo BH, Lee DH, Kim HY i sur. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC Infectious Diseases*. 2012;12:142.
162. Caballero-Gómez J, Rivero-Juarez A, Jurado-Tarifa E, Jiménez-Martín D, Jiménez-Ruiz E, Castro-Scholten S, i sur. Serological and molecular survey of hepatitis E virus in cats and dogs in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2022;69:240-8.
163. Remondegui C, Ceballos S, Arce LP, Pintado E, Vidaurre R, Nitschko H, i sur. Serologic evidence of the circulation of the hepatitis E virus and the prevalence of antibodies against hepatitis A in an indigenous population in northern Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2021;53(4):314-24.
164. Teshale EH, Howard CM, Grytdal SP, Handzel TR, Barry V, Kamili S, i sur. Hepatitis E epidemic, Uganda. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):126-9.
165. Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, i sur. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology*. 2016;63(4):1145-54.
166. La Fauci V, Facciola A, Riso R, Calimeri S, Lo Giudice D, Squeri R. Seroprevalence of HEV antibodies in a sample of pregnant women in the city of Messina. *Ann Ig*. 2017;29:232-8
167. Tulen AD, Vennema H, van Pelt W, Franz E, Hofhuis A. A case-control study into risk factors for acute hepatitis E in the Netherlands, 2015-2017. *J Infect*. 2019;78(5):373-81.
168. Elfrink F, van Rijckevorsel GG, van Gool T, van den Hoek A, Sonder GJ. Low risk of hepatitis E among Dutch short-term travelers. *J Travel Med*. 2012;19(3):202-4.

169. Cheung CKM, Wong SH, Law AWH, Law MF. Transfusion-transmitted hepatitis E: What we know so far? *World J Gastroenterol*. 2022;28(1):47-75.
170. Li P, Ji Y, Li Y, Ma Z, Pan Q. Estimating the global prevalence of hepatitis E virus in swine and pork products. *One Health*. 2022;14:100362.
171. Obaidat MM, Roess AA. Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E infection in Jordan's population: First report. *Int J Infect Dis*. 2018;66:121-5.
172. Capozza P, Martella V, Lanave G, Beikpour F, Di Profio F, Palombieri A, i sur. A surveillance study of hepatitis E virus infection in household cats. *Res Vet Sci*. 2021;137:40-3.
173. Cagirgan AA, Yildirim Y, Okulmus C. The first evidence of zoonotic hepatitis E virus (HEV) exposure in domestic cats in Türkiye. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2022;86:101820.
174. McElroy A, Hiraide R, Bexfield N, Jalal H, Brownlie J, Goodfellow I, i sur. Detection of Hepatitis E Virus Antibodies in Dogs in the United Kingdom. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128703.
175. Zhang W, Shen Q, Mou J, Gong G, Yang Z, Cui L, i sur. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health*. 2008;55:291-8.
176. Liu J, Zhang W, Shen Q, Yang S, Huang F, Li P, i sur. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among pet dogs in the Jiang-Zhe area of China. *Scand J Infect Dis*. 2009;41:291-5.
177. Geng J, Fu H, Wang L, Wang X, Guan J, Chang YB, i sur. Hepatitis E virus (HEV) genotype and the prevalence of anti-HEV in 8 species of animals in the suburbs of Beijing. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2010;31:47-50.

11. BIOGRAFIJA

Pavle Jeličić rođen je u Zenici, BiH, 16. studenog 1978. god. Dio djetinjstva proveo je u Njemačkoj gdje je završio deset razreda osnovne škole i trogodišnju srednju školu. Studij na Medicinskom fakultetu u Zagrebu započeo je 1998. godine gdje je bio demonstrator na predmetima anatomija i temelji neuroznanosti. Diplomirao je 2004. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Pripravnički staž obavio je 2004. i 2005. godine na Klinici za traumatologiju Zagreb. Potom su uslijedila prva radna iskustva, i to u privatnoj tvrtci za razminiranje, nakon čega 2007. godine započinje specijalizaciju iz epidemiologije u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, a 2012. godine i užu specijalizaciju iz zdravstvene ekologije. Poslijediplomski studij „Leadership and Management in Healthcare Service“ na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završava 2014. godine te stječe titulu sveučilišnog magistra upravljanja u zdravstvu. U akademskoj godini 2014./15. započeo je Poslijediplomski sveučilišni doktorski studij biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon položenih specijalističkih ispita radi kao specijalist epidemiologije i zdravstvene ekologije te od 2016. godine kao voditelj službe za zdravstvenu ekologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. Od 2019. godine obnaša dužnost prvog dopredsjednika Hrvatskog društva za zdravstvenu ekologiju pri Hrvatskom liječničkom zboru.