

Prevalencija i molekularno-epidemiološke značajke neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija u Republici Hrvatskoj

Bogdanić, Maja

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:105:829231>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Bogdanić

**Prevalencija i molekularno-
epidemiološke značajke neuroinvazivnih
arbovirusnih infekcija u Republici
Hrvatskoj**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Maja Bogdanić

**Prevalencija i molekularno-
epidemiološke značajke neuroinvazivnih
arbovirusnih infekcija u Republici
Hrvatskoj**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023

Ovaj rad izrađen je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo i Hrvatskom veterinarskom institutu u Zagrebu u okviru projekta: HRZZ IP-2016-06-7456: Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske; CRONEUROARBO (voditeljica: izv.prof.dr.sc. Tatjana Vilibić Čavlek). Virusi za test neutralizacije (virus krpeljnog encefalitisa, Tahyna orthobunyavirus, Bhanja bandavirus) dobiveni su iz projekta *European Archive goes Global* (EVAg), koji je financiran iz projekta: European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (br. 653316).

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

Komentor rada: Doc.dr.sc. Vladimir Savić

Zahvala

Zahvaljujem se mentorima, izv.prof.dr.sc. Tatjani Vilibić Čavlek, prim.dr.med. i doc.dr.sc. Vladimiru Savić, dr.med.vet. na neizmjerne podršci, savjetima i stručnoj pomoći pri izradi ove disertacije.

Hvala djelatnicama Odjela za virološku serologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo: bacc.med.lab.diagn. Ljiljani Milašinčić, bacc.med.lab.diagn. Ljiljani Antolašić i bacc.med.lab.diagn. Kristini Jakopec na pomoći pri izvođenju serološke dijagnostike.

Mag.mol.biol. Željki Hruškar, djelatnici Odjela za izravnu virološku dijagnostiku Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo zahvaljujem na pomoći u molekularnoj dijagnostici.

Djelatnicima Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, prof.dr.sc. Ljubi Barbiću, izv.prof.dr.sc. Vladimiru Stevanoviću i dr.sc. Snježani Kovač hvala na pomoći u izvođenju neutralizacijskih testova.

Od srca se zahvaljujem svojim roditeljima, suprugu Branku, kćerima Miji i Leoni na razumijavanju, strpljivosti i pružanju podrške.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA RADA	1
1.1. Virus krpeljnog encefalitisa.....	2
1.2. West Nile virus	6
1.3. Usutu virus.....	10
1.4. Toscana virus	14
1.5. Tahyna orthobunyavirus	17
1.6. Bhanja bandavirus	19
2. HIPOTEZA	22
3. CILJEVI	23
3.1. Opći cilj	23
3.2. Specifični ciljevi	23
4. ISPITANICI I METODE	24
4.1. Ispitanici	24
4.2. Metode	26
4.2.1. Molekularna dijagnostika.....	26
4.2.3. Genotipizacija i filogenetska analiza dokazanih arbovirusa	33
4.2.4. Statistička obrada rezultata	34
5. REZULTATI.....	35
5.1. Virus krpeljnog encefalitisa.....	38
5.2. West Nile virus	46
5.3. Usutu virus.....	54
5.4. Toscana virus	57
5.5. Tahyna orthobunyavirus	59
5.6. Bhanja bandavirus	64
6. RASPRAVA.....	68
7. ZAKLJUČCI	82
8. SAŽETAK.....	84
9. SUMMARY	85
10. LITERATURA.....	86
11. BIOGRAFIJA.....	100

POPIS OZNAKA I KRATICA

BHAV	Bhanja bandavirus
BSL-3	(eng. <i>Biosafety level 3</i>) - Biosigurnosni uvjeti trećeg stupnja
CPU	(eng. <i>Cytopathic effect</i>) - Citopatski učinak
CSL	Cerebrospinalni likvor
DHMZ	Državni hidrometeorološki zavod Hrvatske
ECDC	(eng. <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>) - Europski Centar za kontrolu i prevenciju bolesti
ELISA	(eng. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>) - Imunoenzimski test
HI	Inhibicija hemaglutinacije
IFA	(eng. <i>Indirect immunofluorescence assay</i>) - Neizravni imunofluorescentni test
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
KME	Krpeljni encefalitis
KMEV	Virus krpeljnog encefalitisa
NGS	(eng. <i>Next generation sequencing</i>) - Sekvenciranje nove generacije
ORF	(eng. <i>Open reading frame</i>) - Otvoreno područje kodiranja
RNK	Ribonukleinska kiselina
RT-PCR	(eng. <i>Reverse transcriptase polymerase-chain reaction</i>) - Lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije
RT-qPCR	(eng. <i>Quantitative reverse transcription RT-PCR</i>) - Kvantitativna lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije
SŽS	Središnji živčani sustav
TAHV	Tahyna orthobunyavirus
TOSV	Toscana virus
USUV	Usutu virus
VNT	(eng. <i>Virus neutralization test</i>) - Test neutralizacije virusa
WNV	West Nile virus

1. UVOD I SVRHA RADA

Arbovirusi su rašireni diljem svijeta kao značajni uzročnici sistemskih i neuroinvazivnih infekcija [1-3]. U skupinu arbovirusa svrstano je više od 500 virusa, od kojih oko 150 uzrokuje bolest u ljudi. Prirodni rezervoari ovih virusa su kralježnjaci, a vektori člankonošci (komarci, krpelji, nevidi) [4]. U krpeljima se virus prenosi transstadijski i transovarijski te oni istodobno predstavljaju i rezervoare virusa [5]. Infekcija u ljudi najčešće nastaje ubodom zaraženog člankonošca. Za većinu arbovirusnih infekcija ljudi predstavljaju slučajne krajnje domaćine zbog kratkotrajne i niske viremije [6].

Posljednjih nekoliko desetljeća prisutan je globalni trend porasta arbovirusnih zoonoza [7,8]. Sve veću prijetnju u današnje vrijeme predstavljaju emergentni ili novi zoonotski virusi koji se po prvi put pojavljuju na nekom području [4,9], ali i reemergentni virusi koji se nakon određenog vremenskog razdoblja pojavljuju na prostorima na kojima su bili iskorijenjeni. Na emergenciju zaraznih bolesti znatno utječu klimatske promjene, povećana urbanizacija, česta putovanja kao i nepotpuno provođenje javnozdravstvenih mjera [7,10]. Od 1940. godine do danas zabilježeno je više od 335 emergentnih i re-emergentnih bolesti, od kojih zoonoze čine 70% [11,12]. Najčešći zoonotski arbovirusi, uzročnici infekcija u ljudi na području Europe su virus krpeljnog encefalitisa (KMEV), West Nile virus (WNV) i Toscana virus (TOSV), dok su Usutu virus (USUV), Tahyna orthobunyavirus (TAHV) te Bhanja bandavirus (BHAV) dokazani rjeđe [13-18].

Većina arbovirusnih infekcija prolazi asimptomatski. Simptomatske se infekcije očituju kao nespecifična febrilna bolest sa ili bez osipa, infekcija središnjeg živčanog sustava (SŽS), artritis/artralgija ili hemoragijska groznica [1,8]. Meningitis i encefalitis su najčešće manifestacije neuroinvazivne bolesti uzrokovane arbovirusima [1]. Teška klinička slika s mogućim smrtnim ishodom kod ljudi ukazuju na značaj ovih virusa u humanoj medicini. Dok neki arbovirusi kao npr. KMEV pokazuju izraziti neurotropizam [5,19], WNV, USUV i TOSV najčešće uzrokuju neuroinvazivnu bolest kod starijih dobnih skupina, imunokompromitiranih bolesnika te osoba s predliježećim bolestima [20,21].

Dijagnostika neuroinvazivnih arbovirusa provodi se izravnim (izolacija, molekularna dijagnostika) i neizravnim metodama (serološka dijagnostika). U akutnoj se fazi bolesti virusna RNK može dokazati u cerebrospinalnom likvoru (CSL) molekularnim metodama, a u urinu i do dva tjedna od početka bolesti [22,23]. Specifična IgM i IgG protutijela mogu se dokazati u serumu već krajem prvog tjedna bolesti, a kasnije i u CSL-u imunoenzimnim (ELISA) ili indirektnim imunofluorescentnim (IFA) testom [24].

Za prevenciju KME nužno je provođenje općih i specifičnih preventivnih mjera. Opće preventivne mjere uključuju nošenje odjeće dugih rukava i nogavica te svijetlih boja, nanošenje repelenata i pasterizaciju mlijeka budući da se KMEV može prenijeti putem mlijeka i mliječnih proizvoda. Aktivnom imunizacijom postiže se specifična zaštita te se cijepljenje preporučuje osobama koje su izložene krpeljima u endemskim žarištima [5,25].

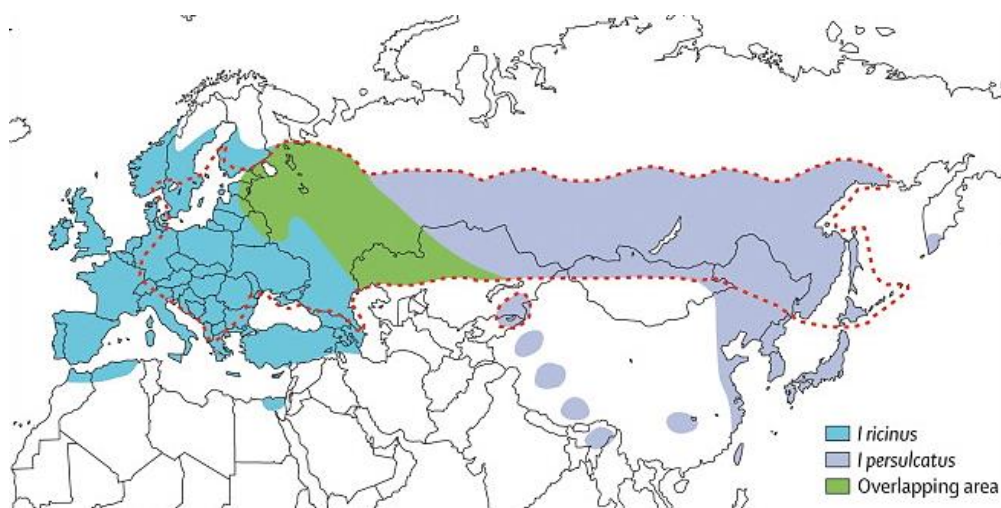
Prevencija WNV i USUV infekcije uključuje kontrolu populacije komaraca adulticidnim i larvicidnim dezinfekcijskim mjerama. Pri boravku na otvorenome savjetuje se nanošenje repelenata te nošenje odgovarajuće odjeće. Većina je komaraca najaktivnija u sumrak i pred jutro pa u to doba valja izbjegavati boravak na otvorenome. Budući da je životni ciklus komaraca vezan uz vodu, iz okućnice je potrebno ukloniti vodu iz svih mjesta na kojima se ona može zadržavati duže od tjedan dana kako se ličinke ne bi razvile u odrasle jedinke [26].

Budući da dijagnostika (re)-emergentnih arbovirusa nije uključena u rutinske laboratorijske pretrage, njihova proširenost i klinički značaj nisu dovoljno istraženi. Dokaz neuroinvasivnih arbovirusa u bolesnika s infekcijom SŽS-a, njihova proširenost, epidemiološke i kliničke značajke te genska karakterizacija predstavljaju izvorni znanstveni doprinos epidemiologiji arbovirusnih infekcija u Hrvatskoj i svijetu, a omogućit će i planiranje specifičnih preventivnih javnozdravstvenih mjera, posebice u rizičnim skupinama za ove infekcije.

1.1. Virus krpeljnog encefalitisa

KMEV je mali, kuglasti, ovijeni virus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*, serokompleksu krpeljnog encefalitisa. Genom čini jednolančana pozitivna (+) RNK koja kodira tri strukturna proteina: protein nukleokapside (C), glikoprotein ovojnice (E) i membranski protein (M) te sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [27].

Filogenetskom analizom dokazana su tri glavna podtipa KMEV: europski, dalekoistočni i sibirski koji cirkuliraju u različitim područjima, ovisno o rasprostranjenosti vektora, krpelja roda *Ixodes* (slika 1). Opisan je i himalajski podtip virusa dokazan u divljim glodavcima *Marmota himalayana* na području Tibetske visoravni (pokrajina Qinghai) te bajkalski podtip nastao rekombinacijom sibirskog i dalekoistočnog podtipa koji je izoliran iz krpelja i malih sisavaca na području Zabajkalja, Irkutska i Burjatije [13].

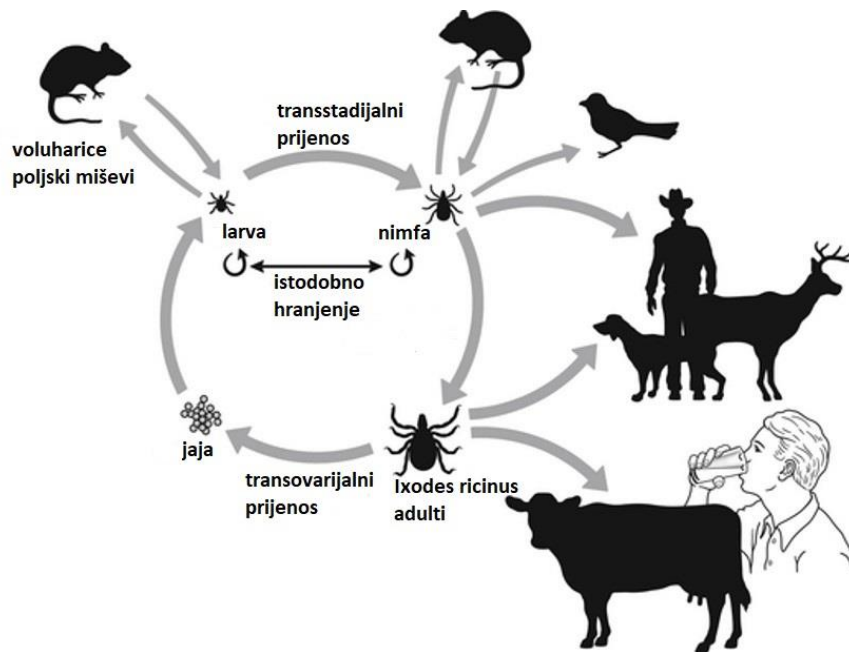


Slika 1. Geografska rasprostranjenost virusa krpeljnog encefalitisa

Izvor: Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet* 2008;371:1861-71.

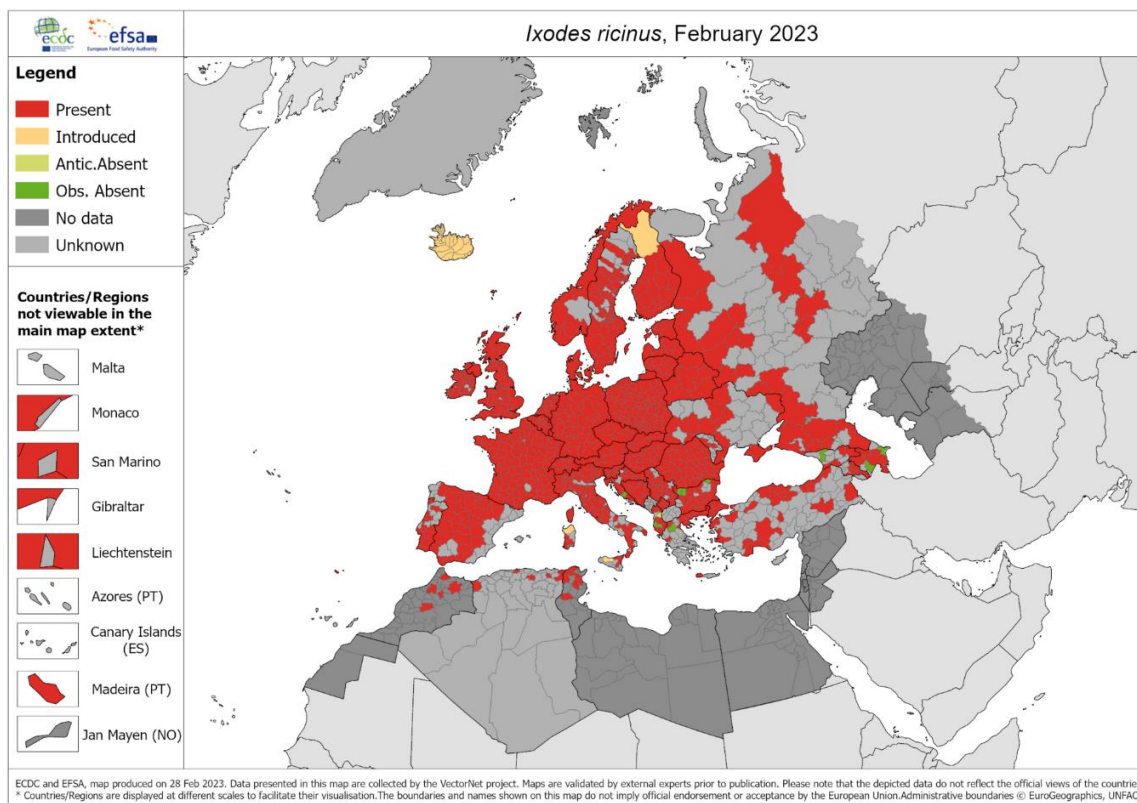
U prirodi su za održavanje virusa značajne dvije vrste krpelja: *I. ricinus* – vektor europskog podtipa i *I. persulcatus* – vektor dalekoistočnog i sibirskog podtipa virusa. U svom razvojnem ciklusu krpelji prolaze kroz tri oblika: larva, nimfa i odrasli oblik. U svakoj razvojnoj fazi krpeljima je nužan obrok krvi te se hrane tri puta na različitim domaćinima. Larve i nimfe se hrane na malim šumskim glodavcima (voluharice, miševi), a odrasli oblici na većim divljim (lisice, jeleni) i domaćim životinjama (goveda, ovce, koze) (slika 2). U krpeljima se virus prenosi transstadijski i transovarijski zbog čega je moguć prijenos uzročnika na sljedeće generacije. Mišoliki glodavci kao najznačajniji životinjski rezervoari, omogućuju endemsko održavanje virusa u prirodnim žarištima [28]. Krpelj *I. ricinus* rasprostranjen je u svim europskim državama (slika 3).

Infekcija u ljudi najčešće nastaje ubodom zaraženog krpelja, no u posljednje se vrijeme opisuju sve češće epidemije povezane s konzumacijom nepasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda od inficiranih koza i goveda jer se uzročnik može izlučivati mlijekom zaraženih životinja (slika 2) [29].



Slika 2. Prirodni ciklus virusa krpeljnog encefalitisa

Izvor: Sykes E. *Vector-borne and Other Viral Encephalitides*. Dostupno na: <https://veteriankey.com/vector-borne-and-other-viral-encephalitides/>



Slika 3. Rasprostranjenost krpelja *Ixodes ricinus* na području Europe

Izvor: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ixodes-ricinus-current-known-distribution-march-2022>

Inkubacija KME može trajati do 28 dana, no bolest se obično javlja 7-14 dana nakon ugriza krpelja. U endemskim područjima do 95% infekcija prolazi asimptomatski, dok je kod trećine zaraženih prisutna nespecifična febrilna bolest s potpunim oporavkom [30].

Kod infekcija uzrokovanih dalekoistočnim i sibirskim podtipom, tijekom bolesti je monofazičan, za razliku od tipičnog oblika bolesti uzrokovanog europskim podtipom KMEV koja ima bifazičan tijek. Prva faza bolesti nastaje kao rezultat viremije i traje 1-8 dana. Tijekom ove faze pojavljuju se nespecifični simptomi poput povišene tjelesne temperature, bolova u mišićima i zglobovima te glavobolje [30,31]. Potom nastupa asimptomatsko razdoblje (2-10 dana), nakon kojeg se kod 20-30% bolesnika javlja druga faza bolesti za koju je karakterističan nagli početak s visokom temperaturom i znakovima upale SŽS-a. Blaži oblici bolesti se opažaju kod mladih osoba, a teže kliničke slike s meningitisom ili encefalitisom se uobičajeno javljaju kod bolesnika u dobnoj skupini iznad 60 godina. Smrtnost kod europskog podtipa iznosi 1-2%, dok je znatno viša kod dalekoistočnog podtipa (20%). Kronična infekcija KMEV-om opisana je kod sibirskog podtipa virusa [5].

Iako se virusna RNK može dokazati u krvi u prvoj fazi bolesti, metode molekularne dijagnostike rijetko se koriste u rutinskoj dijagnostici KMEV zbog kratkotrajne viremije te se stoga dijagnoza obično potvrđuje serološkim postupcima. Pri pojavi neuroloških simptoma protutijela se mogu naći u serumu i CSL-u. ELISA i IFA kojima se određuju specifična IgM i IgG protutijela se najčešće koriste u serološkoj dijagnostici. Za potvrdu infekcije TBEV-om koriste se i neutralizacijski testovi zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima (WNV, USUV, virus japanskog encefalitisa) [32,33]. IgM protutijela se mogu detektirati do šest tjedana od početka bolesti, no u nekih bolesnika mogu perzistirati i više mjeseci ili čak godinama nakon infekcije. IgG protutijela dosežu najviše vrijednosti u rekonvalescenciji i perzistiraju doživotno. Kod dugotrajne perzistencije IgM protutijela, za potvrdu primarne infekcije KMEV-om koristi se određivanje aviditeta IgG protutijela kojim razlikujemo akutnu infekciju (nizak aviditet) od ranije stečene infekcije (visok aviditet) [34].

KME je rasprostranjen na širokom području od Europe do Japana. KMEV infekcija u Hrvatskoj je prvi put opisana 1953. godine u okolici Križevaca, a 1968. godine opisani su prvi klinički slučajevi u okolici Zagreba. Godine 1991. u Gorskom kotaru dokazano je novo prirodno žarište virusa. Na području sjeverozapadne Hrvatske KMEV je prisutan endemski, a sporadično se infekcije pojavljuju u cijeloj kontinentalnoj Hrvatskoj [5]. Uz Koprivničko-križevačku županiju, Međimurska županija spada u područja najveće proširenosti KMEV, u kojoj je seroprevalencija iznosila 3%, a 2007. godine bilježi se porast na 16% [5,7]. U 2015. godini zabilježena je manja epidemija KME u okolici Bjelovara povezana s konzumacijom

sirovog kozjeg mlijeka [29]. Iako rjeđe, protutijela na KMEV dokazana su i u stanovnika hrvatskog priobalja [35].

1.2. West Nile virus

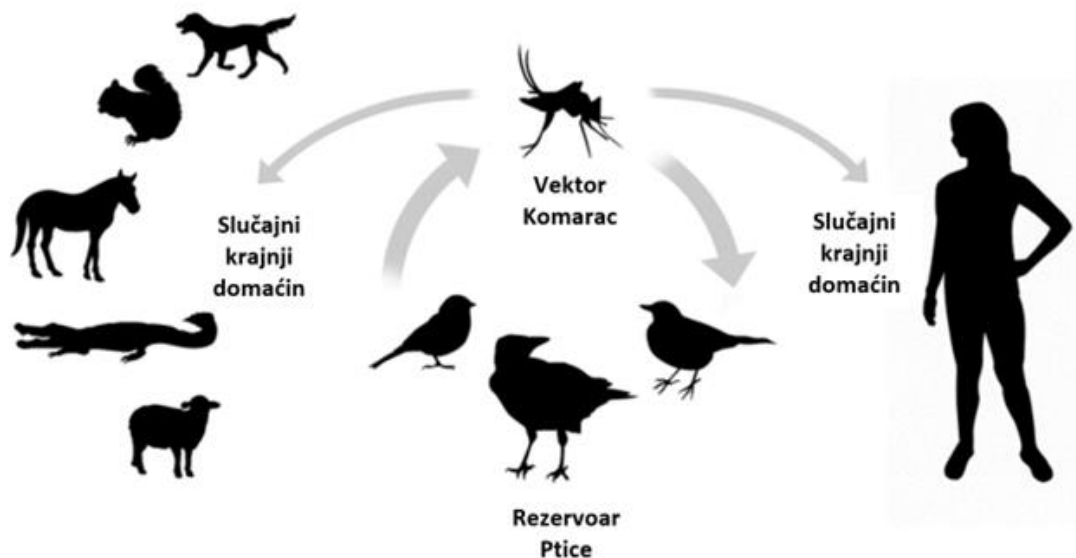
WNV je mali, kuglasti virus s ovojnicom koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*, serokompleksu japanskog encefalitisa. Genom čini jednolančana, pozitivna (+) RNK koja kodira tri strukturna proteina: protein kapside (C), glikoprotein ovojnice (E), prekursorski membranski protein (prM) te sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 [36].

Filogenetskom analizom opisano je sedam genetskih linija WNV-a (tablica 1), od kojih se dvije glavne linije (1 i 2) razlikuju 25-30% u slijedu nukleotida. Sojevi WNV linije 1 izolirani su na području Europe, Sjeverne Amerike, Afrike, Srednjeg Istoka, Australije i Indije. Linija 2 obuhvaća sojeve WNV-a na području Južne Afrike i Madagaskara, a nakon 2004. godine se širi u središnju i istočnu Europu [26,37].

Tablica 1. Genske linije West Nile virusa - prema Rizzoli i *sur.* [38]

Predložena oznaka linije	Reprezentativni soj	Napomena
Linija 1a	NY99-flamingo382-99, New York, 1999	Najrasprostranjenija WNV linija, diljem svijeta
Linija 1b	Kunjin MRM61C, Australija, 1960	Kunjin virus (različiti sojevi), Australija
Linija 1c	804994, Indija, 1980	Prisutna samo u Indiji
Linija 2	B956, Uganda, 1937	Druga po učestalosti WNV linija diljem svijeta
Linija 3	Rabensburg virus 97-103, Češka, 1997	Prisutna samo u središnjoj Europi
Linija 4a	LEIV-Krnd-88-190, Rusija, 1998	Izvorno izolirana iz krpelja <i>Dermacentor</i>
Linija 4b	HU2925/06, Španjolska	Dostupne samo djelomične sekvence
Linija 4c	WNV-Uu-LN-AT-2013, Austrija, 2013	Dokazana u <i>Uranotaenia</i> komarcima
Linija 5	Kunjin virus KUN MP502- 66, Malezija, 1966	Dostupne samo djelomične sekvence
Linija 6	Dak Ar D 5443, Senegal	Koutango virus
Linija 7	ArD9343, Senegal 1992	Dostupne samo djelomične sekvence

U prirodnom ciklusu WNV-a, različite vrste ptica su primarni domaćini i rezervoari virusa, dok su vektori komarci rodova *Culex*, *Aedes* i *Ochlerotatus*. Kod ptica se razvija visoka razina viremije, za razliku od ljudi koji nakon infekcije imaju nisku razinu viremije te stoga predstavljaju slučajne krajnje domaćine. Prijenos na ljude odvija se ubodom komarca zaraženog tijekom hranjenja krvlju inficiranih ptica (slika 4). Interhumani prijenos moguć je transplantacijom organa, transfuzijom zaražene krvi, dojenjem i transplacentalno [26,39].

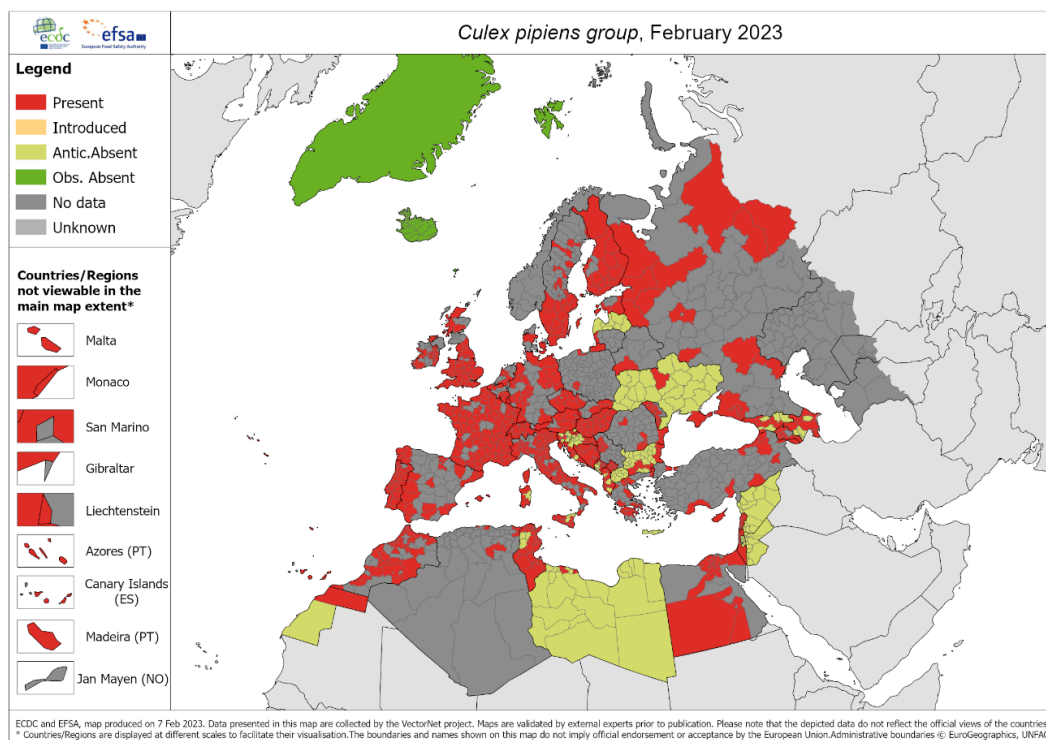


Slika 4. Prirodni ciklus West Nile virusa

Prema: Byas AD, Ebel GD. *Comparative pathology of West Nile virus in humans and non-human animals. Pathogens* 2020;7:9(1):48.

Posljednjih je godina opisano više slučajeva WNV infekcije nakon transplantacije solidnih organa u kojih rizik za razvoj neuroinvazivne bolesti iznosi više od 40% za razliku od opće populacije (1%). Nadalje, smrtnost od WNV infekcije kao i učestalost dugotrajnih neuroloških posljedica je znatno viša u transplantiranih bolesnika [40].

Rasprostranjenost komarca *Cx. pipiens*, glavnog vektora WNV-a prikazana je na slici 5.



Slika 5. Rasprostranjenost komarca *Culex pipiens* na području Europe

Izvor: Mosquito maps [internet]. Stockholm: ECDC; 2023. Dostupno na: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/mosquito-maps>

Incubacija WNV infekcije iznosi 2-14 dana. Većina infekcija (oko 80% slučajeva) uzrokovanih WNV-om prolazi asimptomatski. Nespecifična febrilna bolest (WNV groznica) se javlja kod 20% zaraženih osoba i očituje se blažom kliničkom slikom s povoljnim ishodom. Neuroinvazivna bolest koja se očituje meningitisom, encefalitisom ili sindromom poliomijelitisa javlja se u manje od 1% bolesnika. Teži oblici bolesti javljaju se u starijoj životnoj dobi i kod bolesnika koji primaju imunosupresivnu terapiju [41]. U 40% slučajeva svih neuroinvazivnih infekcija ovim virusom pojavljuje se meningitis, koji se očituje povoljnijim tijekom bolesti i kraćim oporavkom. WNV encefalitis se povezuje s visokom smrtnošću te se češće javlja kod imunokompromitiranih i osoba starijih od 55 godina. Trajne neurološke posljedice mogu biti prisutne do godinu dana kod petine osoba koje su preboljele akutnu bolest [42]. WNV poliomijelitis nastaje kao posljedica zahvaćanja donjeg motornog neurona ili prednjih rogova kralježnične moždine i manifestira se akutnom mlohavom kljenuti. Zatajenje respiratornog sustava s paralizom ošita i međurebrenih mišića je najteža komplikacija mijelitisisa koja zahtijeva mehaničku ventilaciju. Smrtnost kod neuroinvazivnih oblika iznosi oko 10% [26].

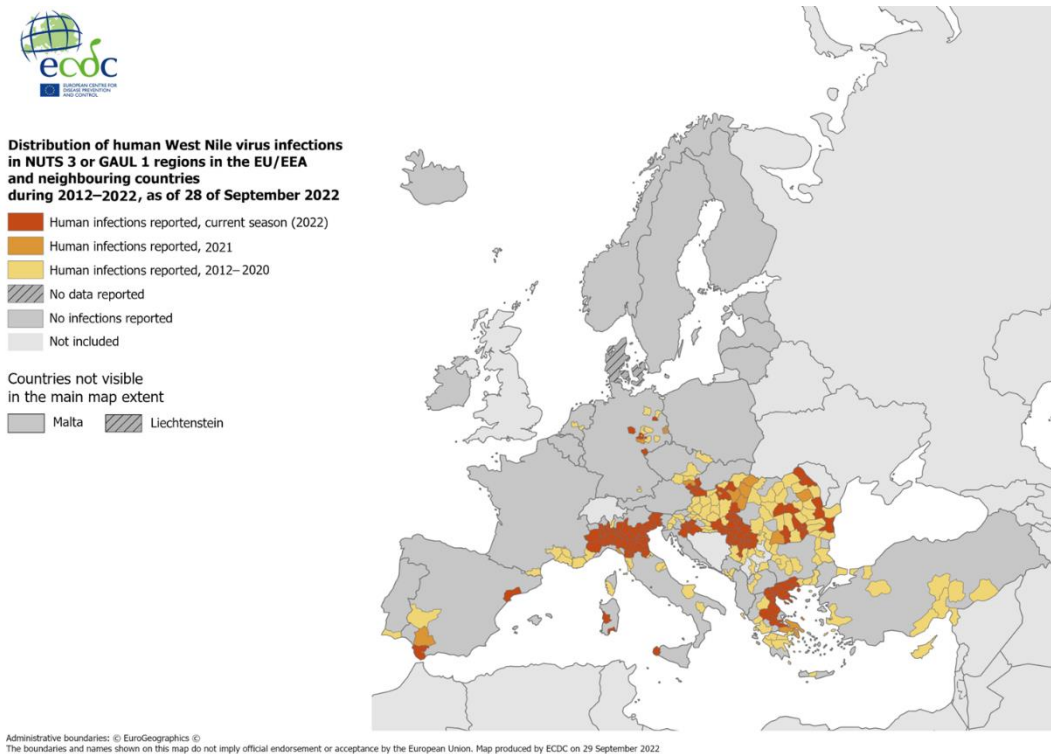
Dijagnostika infekcija uzrokovanih WNV-om uključuje izravne (izolacija, molekularna dijagnostika) i neizravne metode (serološka dijagnostika). WNV se može izolirati iz krvi, CSL-a i postmortalno dobivenih uzoraka tkiva [43]. Virus se rijetko izolira iz krvi kod bolesnika s neuroinvazivnim infekcijama zbog kratkotrajne viremije. Izolacija se provodi većinom u referentnim laboratorijima u biosigurnosnim uvjetima trećeg stupnja (BSL-3).

U molekularnoj dijagnostici, lančana reakcija polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR) je metoda izbora za dokaz WNV infekcija. U usporedbi s klasičnim RT-PCR-om koji detektira ≥ 50 kopija virusne RNK/ml, RT-PCR u stvarnom vremenu (engl. *real time RT-PCR*) ima višu osjetljivost uz manju mogućnost kontaminacije uzorka [44,45].

Serološkim se metodama (detekcija protutijela u serumu i CSL-u) potvrđuje većina infekcija uzrokovanih WNV-om. Od četvrtog do sedmog dana bolesti kod oboljelih se u serumu pojavljuju IgM protutijela koja u 36% slučajeva mogu perzistirati dulje od godinu dana [46, 47]. IgG protutijela se pojavljuju osmi dan bolesti i perzistiraju dulje vrijeme nakon preboljele infekcije [48]. Pozitivan nalaz ELISA testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testom zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima [26]. Određivanjem aviditeta IgG protutijela moguće je razlikovati akutnu WNV infekciju od ranije preboljele infekcije kod bolesnika s dugotrajnom perzistencijom IgM protutijela [49].

WNV infekcije kontinuirano se bilježe na području Europe od 2012. godine u obliku manjih ili većih epidemija te je WNV danas jedan od najrasprostranjenijih arbovirusa. Osim humanih infekcija, redovito se dokazuju infekcije u konja te ptica [50] (slika 6).

U razdoblju od 1970-1974. godine provedena su serološka istraživanja koja su dokazala protutijela na WNV u 1,2% ispitanika na području sjeveroistočne Hrvatske, 3,4% ispitanika srednje te 0,8% ispitanika južne Dalmacije [26,35]. Tijekom 2007. godine dokazan je seropozitivitet na WNV u 0,3% dobrovoljnih davatelja krvi na području sjeverozapadne Hrvatske [10]. U rujnu 2012. godine u tri županije istočne Hrvatske dokazani su prvi klinički humani slučajevi WNV infekcije u 7 osoba s neuroinvazivnom bolesti [20,26]. Tijekom 2013. godine bilježi se ponovno manja epidemija WNV neuroinvazivnih infekcija (19 oboljelih) na području sjeverozapadne Hrvatske, dok se potom kontinuirano dokazuju sporadični slučajevi u kontinentalnoj Hrvatskoj (2014-2016. godine) [20].



Slika 6. Rasprostranjenost West Nile virusa na području Europe (2012-2022. godine)

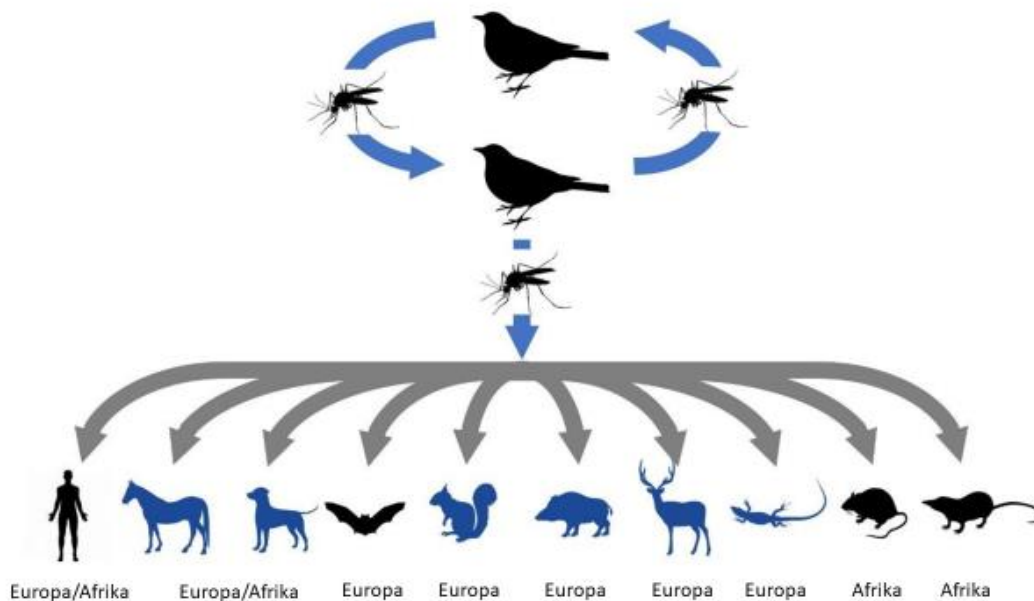
Izvor: European Center for Disease Prevention and Control. West Nile virus infection. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection>

1.3. Usutu virus

USUV je malen, kuglasti virus s ovojnicom koji se nalazi u porodici *Flaviviridae*, unutar roda *Flavivirus* te serokompleksa japanskog encefalitisa. Genom čini jednolančana, pozitivna (+) RNK koja sadrži jedno veliko otvoreno područje kodiranja (engl. *open reading frame*; *ORF*) i dvije kratke nekodirajuće regije na 3' i 5' kraju. Poliprotein koji nastaje kao produkt prevođenja ORF-a cijepa se posttranslacijski na tri strukturna (protein nukleokapside C, membranski protein M i glikoprotein) i sedam nestrukturnih proteina (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [51,52].

Filogenetskom analizom NS5 gena dokazano je osam genetskih linija: tri afričke (Afrika 1-3) i pet europskih (Europa 1-5) [53].

Prirodni ciklus USUV-a sličan je ciklusu WNV-a [52,54]. Glavni vektori virusa su komarci roda *Culex*, a rezervoar različite vrste divljih ptica (slika 7). U Europi, USUV je dokazan u komaraca *Cx. pipiens*, *Aedes albopictus*, *Anopheles maculipennis* te *Ae. caspius* [55, 56]. Ptice selice imaju važnu ulogu u širenju virusa na nova područja [57]. Izravni prijenos virusa između ptica nije opisan. Protutijela na USUV nađena su u različitim vrsta životinja (konji, psi, jeleni, vjeverice, divlje svinje) koje kao i ljudi, nakon zaraze postaju slučajni krajnji domaćini s niskim stupnjem viremije [51].



Slika 7. Prirodni ciklus Usutu virusa

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

Humani klinički slučajevi infekcije uzrokovane USUV-om opisani su rijetko (tablica 2). Inkubacijsko razdoblje traje od 2 do 14 dana. Iako je većina infekcija asimptomatska, USUV može kod ljudi uzrokovati blagu febrilnu bolest s osipom, žuticom i glavoboljom (USUV groznica) te neuroinvazivnu bolest (meningitis, encefalitis) u imunokompromitiranih bolesnika [58].

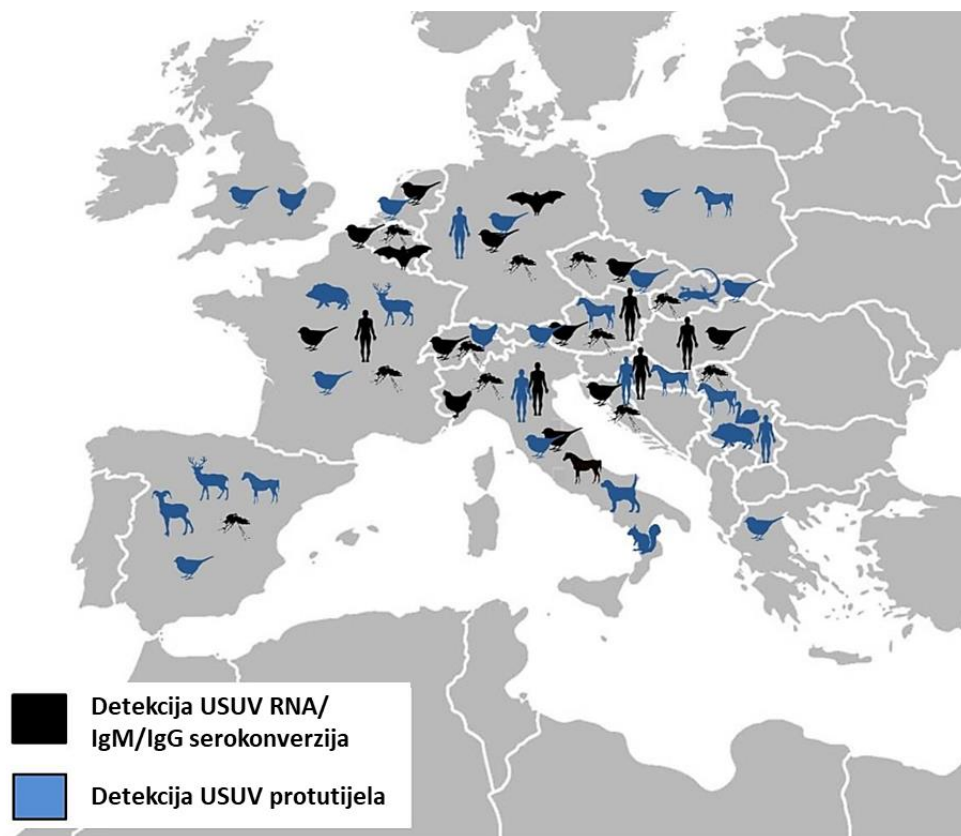
Tablica 2. Humani slučajevi infekcije uzrokovane Usutu virusom

Godina	Država	Klinička slika	Izvor
1981	Srednjoafrička Republika	Vrućica, osip	<i>Nikolay i sur.</i> [59]
1994	Burkina Faso	Vrućica, žutica	<i>Nikolay i sur.</i> [59]
2006	Austrija	Osip (USUV neutralizacijska protutijela u 25 % bolesnika)	<i>Weissenböck i sur.</i> [60]
2009	Italija	Meningoencefalitis	<i>Pecorari i sur.</i> [61] <i>Cavrini i sur.</i> [62]
2012	Njemačka	Asimptomatska USUV infekcija u dobrovoljnog davatelja krvi	<i>Allering i sur.</i> [63]
2013	Hrvatska	Meningitis, meningoencefalitis	<i>Vilibić-Čavlek i sur.</i> [20]; <i>Santini i sur.</i> [64]
2014-2015	Italija	Neutralizacijska protutijela u šumskih radnika i dobrovoljnih davatelja krvi	<i>Percivalle i sur.</i> [65]
2016	Njemačka	Asimptomatska USUV infekcija u dobrovoljnog davatelja krvi	<i>Cadar i sur.</i> [66]
2016	Francuska	Idiopatska pareza facijalisa	<i>Simonin i sur.</i> [67]
2017	Austrija	Asimptomatska infekcija u dobrovoljnog davatelja krvi	<i>Bakonyi i sur.</i> [68]
2018	Hrvatska	Meningitis, meningoencefalitis	<i>Vilibić-Čavlek i sur.</i> [20]
2018	Italija	USUV groznica, encefalitis	<i>Pacanti i sur.</i> [69]
2018	Mađarska	Meningitis	<i>Nagy i sur.</i> [70]
2021	Austrija	Vrućica, encefalitis	<i>Graninger i sur.</i> [71]

USUV se može uzgojiti u različitim vrstama staničnih kultura. Citopatski učinak (CPU) javlja se nakon četiri dana u staničnoj kulturi majmuskog bubrega (Vero), svinjskog bubrega (PK-15) i na embrionalnim fibroblastima guske (GEF) [72].

Klasičnim RT-PCR testom i RT-PCR testom u stvarnom vremenu može se dokazati USUV RNK u serumu i CSL-u. Dijagnoza se uglavnom potvrđuje serološkim metodama (ELISA, IFA) zbog kratkotrajne viremije u ljudi. Kao i kod ostalih neuroin vazivnih flavivirusa, pozitivne rezultate ELISA testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testovima zbog mogućih križnih reakcija s drugim virusima od kojih su na području Hrvatske prisutni KMEV i WNV [51].

Na području Europe USUV je prvi put opisan u Austriji 2001. godine kod uginulih kosova i sova u bečkom zoološkom vrtu [59]. U narednim je godinama virus dokazan u ptica i komaraca na području Mađarske [73], Španjolske [74], Italije [75] i Belgije [76]. Kasnije retrospektivno istraživanje pokazalo je prisutnost USUV u tkivima uginulih ptica na području Toscanne u Italiji već 1996. godine [60]. Pretpostavlja se da je pticama selicama zaraženim u endemskim područjima Afrike virus unesen u Europu [51]. Do danas je USUV dokazan u ljudi i različitim vrsta životinja na području gotovo cijele Europe (slika 8).



Slika 8. Rasprostranjenost Usutu virusa u ljudi i životinja na području Europe

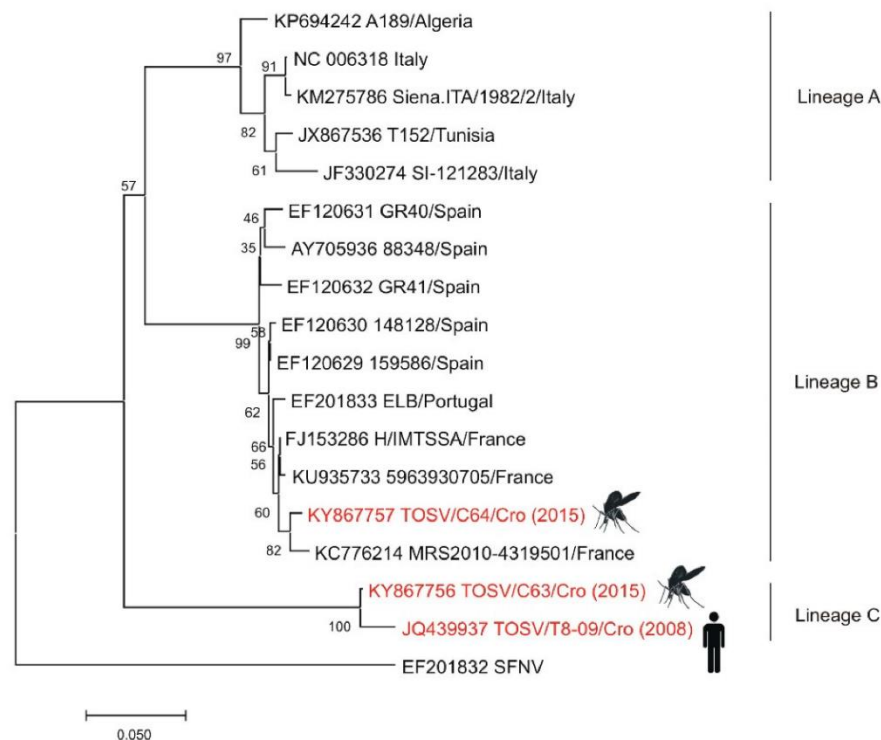
Izvor: Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, i sur. *Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. Pathogens* 2020;9:699.

Na području Hrvatske, izloženost USUV-u je prvi put dokazana kod dva seropozitivna konja u sjeverozapadnim županijama [77]. Sljedeće godine opisan je prvi serološki dokaz infekcije USUV-om, nalazom neutralizacijskih (NT) protutijela kod asimptomatske osobe u istočnoj Hrvatskoj (Vukovarsko-srijemska županija) [51]. Tijekom WNV epidemije 2013.

godine, opisani su prvi klinički slučajevi humane USUV infekcije na području Zagreba i Zagrebačke županije kada je neuroinvazivna infekcija dokazana u tri oboljele osobe [64,78].

1.4. Toscana virus

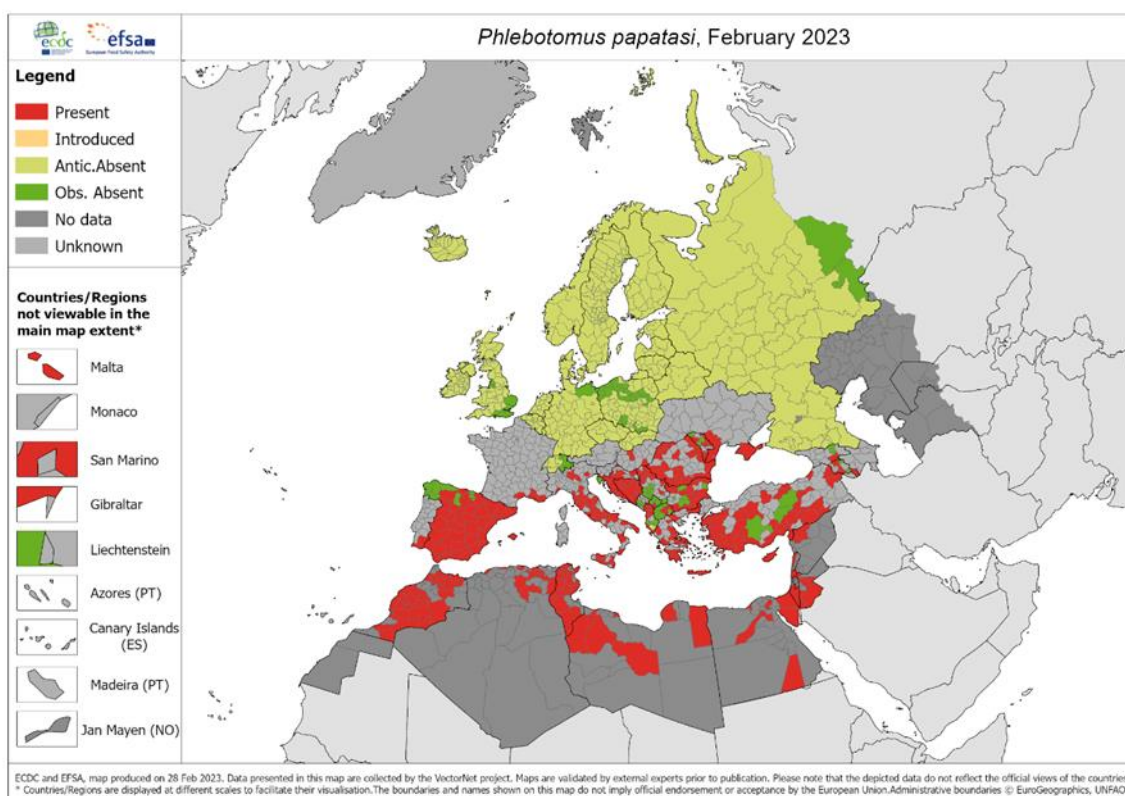
TOSV je sferični ili pleomorfni flebovirus ovijen lipidnom ovojnicom koji pripada porodici *Phenuiviridae*, rodu *Phlebovirus*. Genom čini jednolančana negativna (-) RNK koja sadrži tri segmenta: L (veliki) segment koji kodira virusnu RNK polimerazu, M (srednji) segment koji kodira glikoproteine ovojnice (Gn i Gc) i nestrukturani protein m (NSm) te S (mali) segment koji kodira nukleokapsidni protein (N) i nestrukturani protein s (NSs) [79]. Opisane su tri genetske linije virusa (A, B i C) (slika 9). Linija A je izvorno uključivala sojeve dokazane u Italiji, a linija B sojeve izolirane u Portugalu i Španjolskoj. Linija C dokazana je 2012. godine, najprije u nevidima, a potom u ljudi. Sojevi linije C nađeni su u Hrvatskoj i Grčkoj [80].



Slika 9. Genske linije Toscana virusa (sojevi s područja Hrvatske označeni su crveno)

Izvor: Vilibic-Cavlek T, Barbic Lj, Mrzljak A, Brnic D, Klobucar A, Ilic M, i sur. *Emerging and neglected viruses of zoonotic importance in Croatia. Pathogens* 2021;10:73.

Hematofagni dvokrilci (nevidi) roda *Phlebotomus* su vektori TOSV-a, a smatra se da su i rezervoari virusa. TOSV je do sada izoliran iz čovjeka i nevida, no nema dokaza da su ljudi rezervoari te stoga predstavljaju samo krajnje domaćine. Nevidi su rasprostranjeni na širokom području koje obuhvaća mediteranske zemlje (slika 10). Vektor je aktivan u ljetnim mjesecima, a virus se na ljude prenosi ugrizom ženki koje se hrane krvlju u vrijeme polaganja jaja [81].



Slika 10. Rasprostranjenost nevida *Phlebotomus papatasi* na području Europe

Izvor: *Phlebotomine sandflies maps* [internet]. Stockholm: ECDC; 2023. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/phlebotomine-maps>

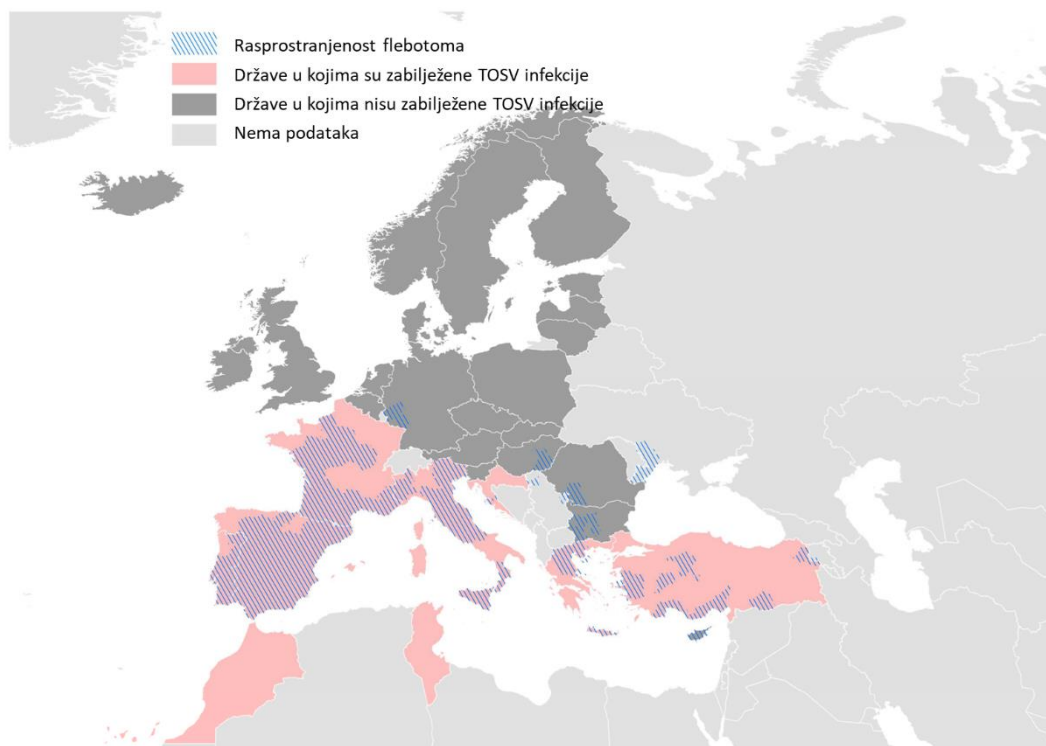
Razdoblje inkubacije traje 3 do 7 dana, a većina infekcija prolazi asimptomatski. Kod dijela oboljelih se javlja febrilna bolest s glavoboljom, mijalgijom, mučninom i povraćanjem. Zbog svoje neurotropnosti, TOSV može izazvati aseptični meningitis ili meningoencefalitis. Druge neurološke manifestacije koje su opisane kod oboljelih su periferna neuropatija, parestezije, hiporefleksija, hipotonija, hiperestezija i Guillain-Barréov sindrom [82].

TOSV infekcija najčešće se potvrđuje serološkim metodama (ELISA, IFA). IgM protutijela mogu se dokazati nekoliko mjeseci nakon izloženosti virusu, a IgG protutijela mogu perzistirati nekoliko godina. Zbog antigenske sličnosti virusa unutar skupine postoji mogućnost križnih reakcija s ostalim flebovirusima (napuljski i sicilijanski virus papatači groznice) pa je u

tim slučajevima infekciju potrebno potvrditi neutralizacijskim testovima. Virus se također može detektirati u krvi i CSL-u metodom RT-PCR, unutar jedan do dva dana od početka simptoma [83,84].

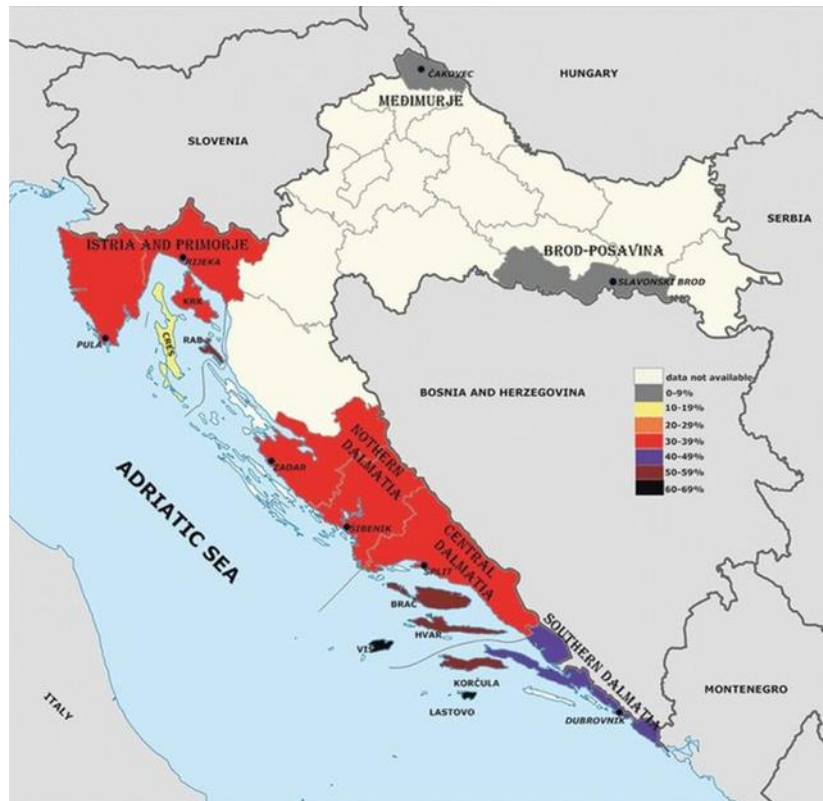
Neuroinvazivne TOSV infekcije opisuju se sporadično u mediteranskim zemljama tijekom ljetnih mjeseci (slika 11). Iako su među stanovnicima hrvatskog primorja potvrđene visoke stope seroprevalencije na TOSV, ovaj je virus još uvijek zanemaren u Hrvatskoj s tek nekoliko potvrđenih slučajeva neuroinvazivne infekcije u ljudi [78].

U Splitsko-dalmatinskoj županiji, TOSV infekcija je dokazana u četiri bolesnika hospitalizirana 2007. godine s kliničkom slikom meningitisa [85]. Međutim, seroepidemiološke studije pokazale su da je visok postotak stanovništva dalmatinskih otoka (53,9%) i priobalja (33,6%) prokužen ovim virusom, a seropozitivne osobe (6,1%) nađene su i na području sjeverozapadne Hrvatske [86] (slika 12). U entomološkom istraživanju provedenom 2015. godine prikupljeni su nevidi na pet lokacija u Hrvatskoj. Istodobna cirkulacija dviju TOSV linija (B i C) dokazana je u skupnim uzorcima nevida *Phlebotomus neglectus* [80].



Slika 11. Rasprostranjenost TOSV infekcija na području Europe (do 2018. godine)

Prema: Sigfrid L, Reusken C, Eckerle I, Nussenblatt V, Lipworth S, Messina J. i sur. *Preparing clinicians for (re-)emerging arbovirus infectious diseases in Europe. Clin Microbiol Infect* 2018;24:229-39.



Slika 12. Seroprevalencija na Toscana virus na području Hrvatske

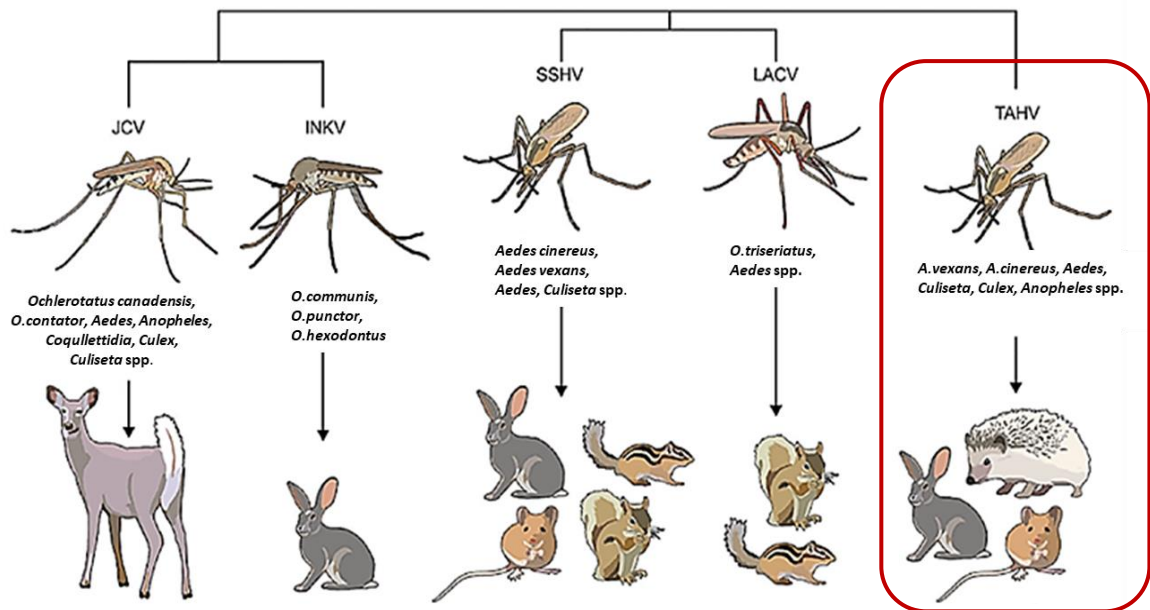
Izvor: Punda-Polić V, Jerončić A, Mohar B, Šiško Kraljević K. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:E200-3.

1.5. Tahyna orthobunyavirus

TAHV je ovijeni virus kuglastog oblika koji pripada porodici *Peribunyaviridae*, rodu *Orthobunyavirus*, serokompleksu kalifornijskog encefalitisa. Genom čini jednolančana negativna (-) RNK sastavljena od tri segmenta: veliki (L) koji kodira virusnu polimerazu, srednji (M) kodira glikoproteine ovojnice i mali (S) kodira protein nukleokapside (N) [87].

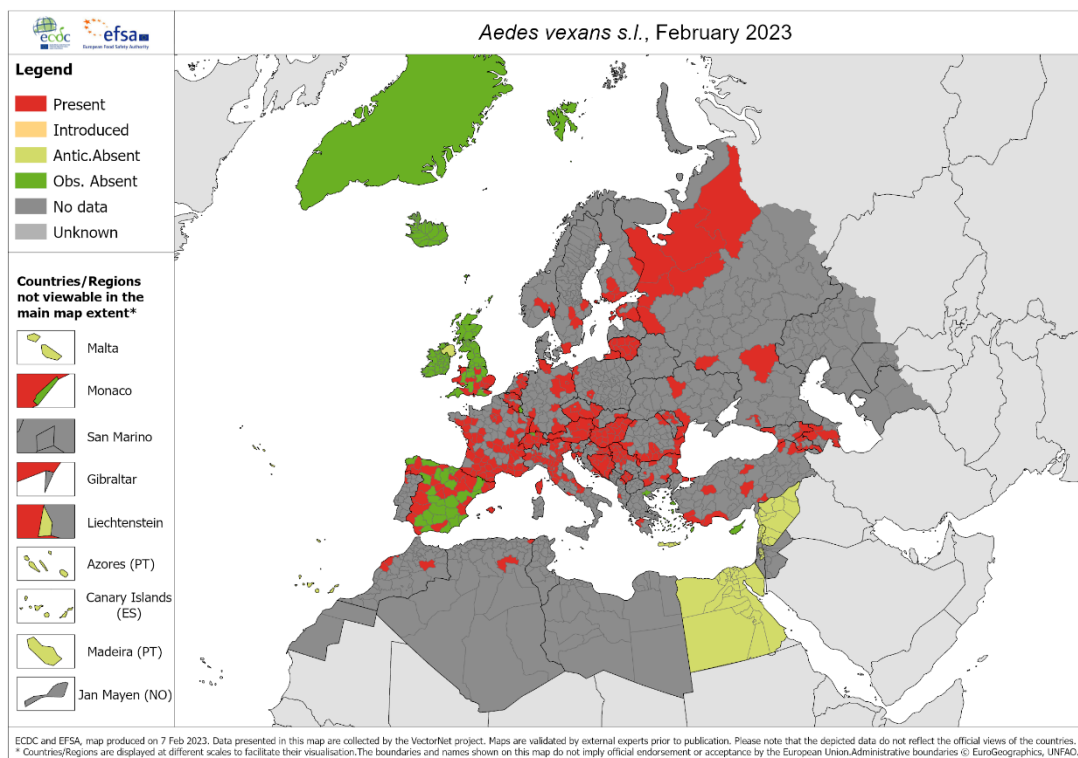
U prirodnom ciklusu virus se održava između vektora komaraca koji se hrane na zečevima, ježevima i glodavcima (rezervoari virusa). Poplavni komarci *Ae. vexans* smatraju se glavnim vektorima TAHV (slika 13). Ljudi se zaraze putem vektora koji obitavaju u vlažnim staništima niske nadmorske visine koja su prirodna žarišta TAHV kao i u prigradskim područjima [88]. Rasprostranjenost *Ae. vexans* na području Europe prikazana je na slici 14.

Iako većina infekcija prolazi asimptomatski, TAHV može uzrokovati bolest sličnu gripi koja se manifestira glavoboljom, mijalgijom, mučninom i upalom pluća. Opisane su i infekcije SŽS-a, ali bez zabilježenih fatalnih slučajeva [89].



Slika 13. Prirodni ciklus orthobunyavirusa seroskupine kalifornijskog encefalitisa

Izvor: Evans AB, Winkler CW, Peterson KE. Differences in Neuropathogenesis of Encephalitic California Serogroup Viruses. *Emerg Infect Dis* 2019;25:728-38.



Slika 14. Rasprostranjenost komarca *Aedes vexans* na području Europe

Izvor: Mosquito maps [internet]. Stockholm: ECDC. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-vexans-sl-current-known-distribution-march-2022>

Infekcije uzrokovane TAHV-om većinom se dijagnosticiraju serološkim metodama (ELISA ili IFA). Detekcija IgM specifičnih protutijela, serokonverzija ili četverostruki porast titra IgG protutijela upućuju na akutnu infekciju. VNT i dalje predstavlja „zlatni standard“ u serološkoj dijagnostici TAHV, no ova se dijagnostika provodi samo u referentnim laboratorijima. Osim serološkim metodama, virus se može dokazati RT-PCR-om, te se može izolirati u staničnim kulturama (Vero) u kojima stvara vidljiv CPU [87,89].

TAHV je široko rasprostranjen u kontinentalnom dijelu Europe što dokazuje detekcija i izolacija virusa iz komaraca te detekcija protutijela u životinja i ljudi [90,91]. Na području Hrvatske provedena je samo jedna studija seroprevalencije TAHV 1970-ih godina. Protutijela na TAHV otkrivena su u 7,9% osoba iz sjeveroistočne Hrvatske i 0,4% osoba iz Dalmacije i južnog Jadrana [92].

1.6. Bhanja bandavirus

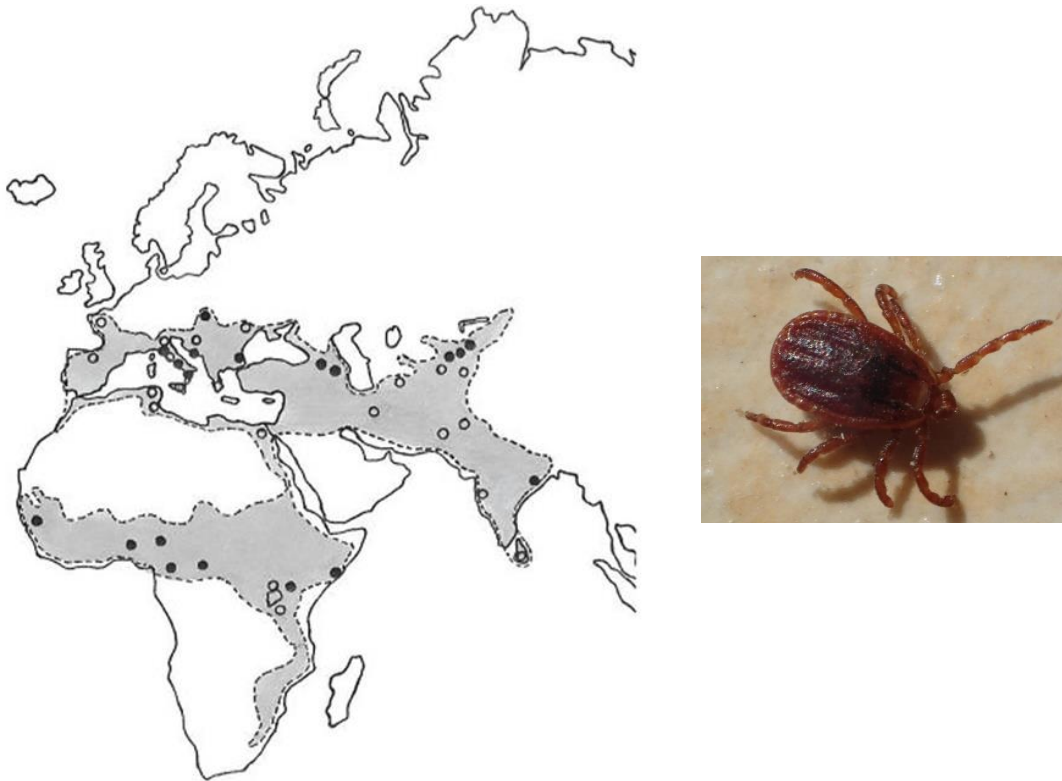
BHAV je kuglasti ovijeni virus koji pripada porodici *Phenuiviridae*, rodu *Bandavirus*. Genom je, kao i kod drugih flebovirusa, sastavljen od tri segmenta jednolančane negativne (-) RNK: veliki (L), srednji (M) i mali (S). L segment kodira virusnu polimerazu, M segment poliproteinski prekursor za Gc i Gn glikoproteine, a S segment kodira N i NSs proteine [93].

Rezervoar virusa su ovce, koze i stoka, afrički ježevi (*Atelerix albiventris*) te prugaste vjeverice (*Xerus erythropus*), a glavni vektori krpelji roda *Haemaphysalis* (slika 15). U Europi je virus opetovano izoliran iz krpelja *Haemaphysalis punctata*, *H. sulcata* i *Dermacentor marginatus*, no dokazan je i u drugim vrstama krpelja. Dok je u odraslih koza i ovaca bolest asimptomatska, mlade životinje mogu razviti meningoencefalitis.

Opisano je nekoliko slučajeva febrilne bolesti uzrokovane BHAV-om u ljudi, a rijetko i neuroinvazivne infekcije. Simptomi SŽS-a prezentirali su se meningoencefalitisom s fotofobijom, povraćanjem i parezom [94].

Iako se BHAV može dokazati izravnim metodama kao što je izolacija u staničnoj kulturi ili RT-PCR, kod većine infekcija dijagnoza se potvrđuje serološkim metodama (ELISA, IFA, VNT) [95].

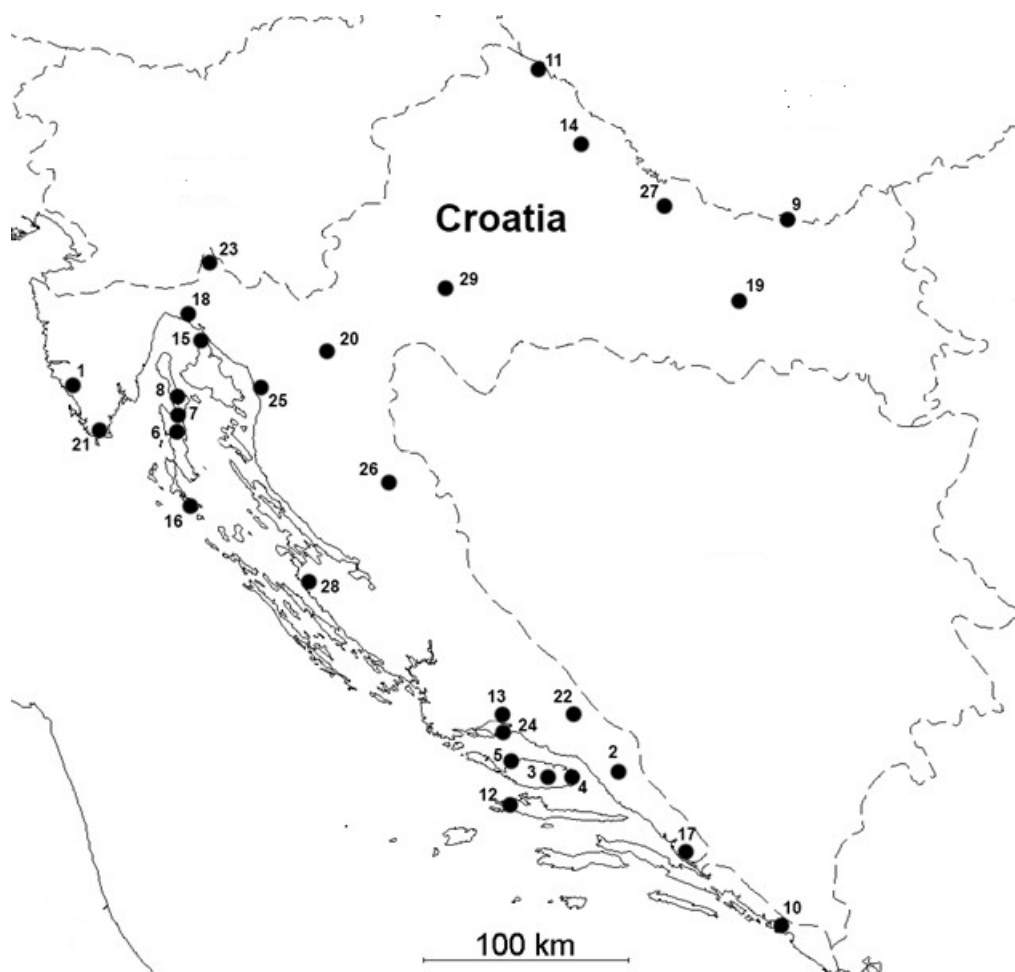
Geografska rasprostranjenost BHAV infekcija na području Europe obuhvaća Italiju, Bugarsku i Slovačku zahvaljujući pogodnoj mediteranskoj klimi. Druga europska područja s povoljnim klimatskim uvjetima za prisutnost BHAV uključuju Grčku, Španjolsku, Francusku, Albaniju, južni dio Ukrajine, Moldaviju, jugoistočnu Austriju i središnji dio Turske (slika 15) [94].



Slika 15. Rasprostranjenost Bhanja bandavirusa (lijevo); krpelj *Haemaphysalis punctata* (desno)

Izvor: Hubalek Z. Biogeography of tick-borne Bhanja virus (Bunyaviridae) in Europe. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009;2009:372691.

Na području Hrvatske, BHAV je izoliran 1974. godine iz krpelja *H. punctata* (Canestrini i Fanzago, 1878) prikupljenih na otoku Braču. Iste godine zabilježena je prva laboratorijska infekcija ljudi ovim virusom. Seroepidemiološka istraživanja provedena 1970. godine na hrvatskim otocima pokazala su NT protutijela u 31,5% (11,6-61,3%) stanovnika otoka Brača, 2,2% stanovnika zadarskih otoka i 1% stanovnika otoka Hvara. Osim u Dalmaciji, 7,1% seropozitivnih osoba otkriveno je i među stanovnicima sjeverne Hrvatske [78]. Lokacije nalaza krpelja *H. punctata* na području Hrvatske prikazani su na slici 16.



Slika 16. Nalazi krpelja *Haemaphysalis punctata* na području Hrvatske

Legenda: 1. Bale, 2. Biokovo, 3. Brač (Blato, Osridke, Sveti Toma), 4. Brač (Lašćatna), 5. Brač (Supetar), 6. Cres (Belej, Hrasta), 7. Cres (Cres, Vrana), 8. Cres (Vodice), 9. Donji Miholjac, 10. Dubrovnik, 11. Goričan, 12. Hvar, 13. Kaštela, 14. Koprivnica, 15. Krk (Njivice), 16. Lošinj (Čunski-Like, Veli Lošinj), 17. Metković, 18. Ponikve (Bakar), 19. Požega, 20. Primišlje, 21. Pula, 22. Sinj, 23. Gumance (Smrekova Draga), 24. Split, 25. Sveti Juraj (Senj), 26. Kurjak (Udbina), 27. Virovitica, 28. Zadar, 29. Zagreb-Karlovac-Sisak (Petrinja)-Bjelovar (Gornja Posavina).

Izvor: Krčmar S., Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju

2. HIPOTEZA

Arbovirusi su uzročnici infekcija na području Hrvatske, a cirkulirajući sojevi arbovirusa dokazanih u Hrvatskoj su genetski srodni sa sojevima na području Europe.

3. CILJEVI

3.1. Opći cilj:

Istražiti značaj neuroinvazivnih arbovirusa u etiologiji neuroinvazivnih bolesti na području Hrvatske.

Prema podacima Referentnog centra Ministarstva zdravstva za epidemiologiju, u Hrvatskoj se godišnje prijavljuje oko 200 slučajeva neuroinvazivnih infekcija (meningitis, encefalitis, mijelitis) od kojih u 80-90% etiologija ostaje nerazjašnjena. To se posebno odnosi na emergentne i re-emergentne neuroinvazivne arboviruse koji nisu uključeni u rutinske dijagnostičke algoritme te njihova proširenost kao i klinički značaj u Hrvatskoj nisu dovoljno istraženi.

3.2. Specifični ciljevi:

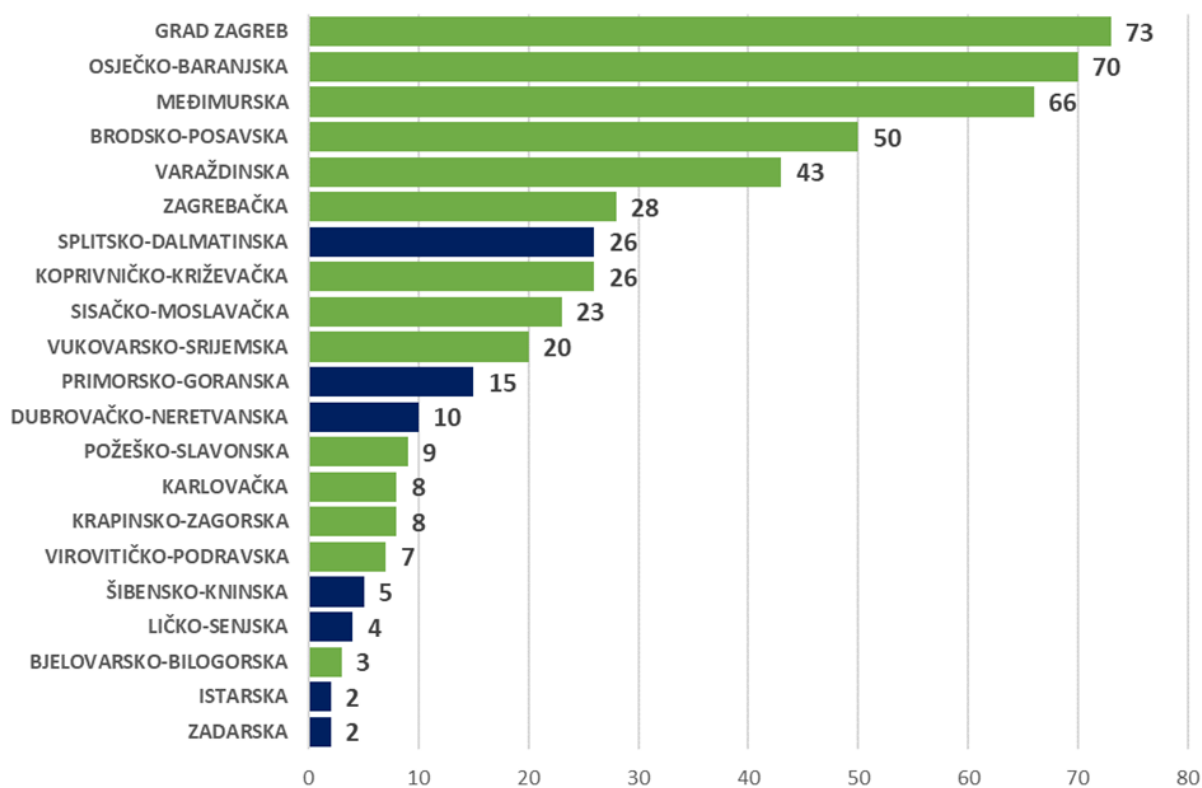
1. Odrediti prevalenciju neuroinvazivnih arbovirusa na području Hrvatske (TBEV, WNV, USUV, TOSV, TAHV, BHAV).
2. Definirati epidemiološke značajke neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija (distribucija po spolu i dobi, rizične skupine, sezonska pojavnost, geografska rasprostranjenost).
3. Definirati kliničke značajke neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija.
4. Genotipizirati i filogenetski analizirati sojeve dokazanih virusa.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

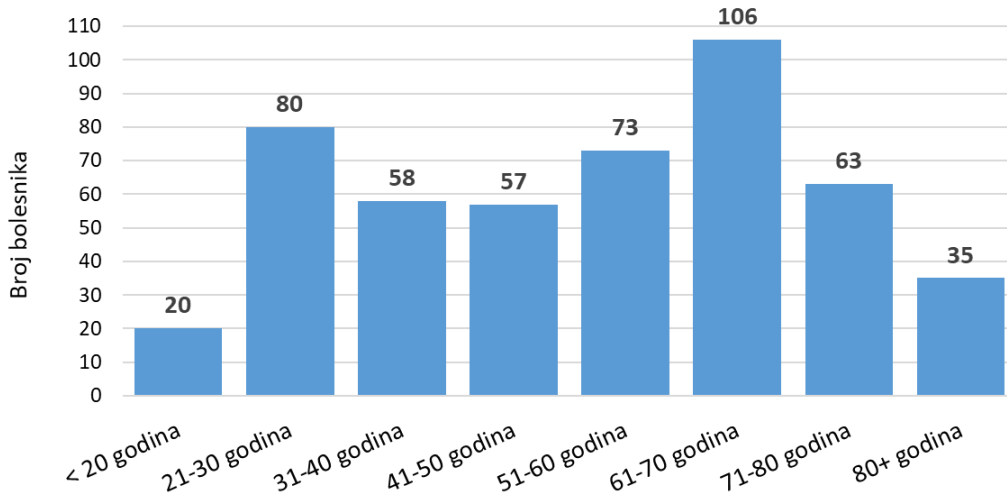
Istraživanje je obuhvatilo 492 bolesnika (životna dob ≥ 18 godina) s kliničkom slikom neuroinvazivne bolesti (meningitis, encefalitis, mijelitis) tijekom četiri uzastopne sezone prijenosa arbovirusnih infekcija (2017.-2020. godine). Probir i uključivanje bolesnika u istraživanje učinjeni su na infektološkim odjelima bolnica s područja svih hrvatskih županija (slika 17), no većim dijelom s područja kontinentalnih županija (428/87,0% bolesnika), posebice sjeverozapadnih i istočnih koje su od ranije poznata endemska područja za pojedine arboviruse kao npr. KMEV i WNV. U istraživanje su uključeni svi bolesnici iz navedenih ustanova koji su oboljeli u sezoni prijenosa arbovirusa (travanj-listopad) te su zadovoljavali kliničke kriterije za neuroinvazivnu arbovirusnu bolest prema Europskom centru za kontrolu i prevenciju bolesti (*European Centre for Disease Control and Prevention; ECDC*) [96] uz nalaz CSL-a koji je ukazivao na virusnu etiologiju bolesti.

Podaci o sociodemografskim i epidemiološkim značajkama, kliničkim simptomima te nalazi rutinskih laboratorijskih pretraga prikupljeni su anketnim upitnikom.

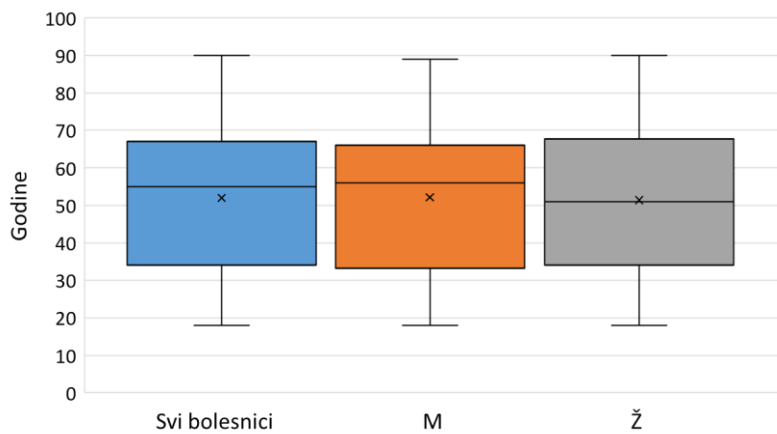


Slika 17. Raspodjela ispitanika po županijama

Raspodjela bolesnika po dobnim skupinama prikazana je na slici 18. Medijan dobi iznosio je 55 (IQR=34-67) godina. U ispitivanoj skupini bilo je 310 (63,0%) muškaraca (medijan dobi 56 godina, IQR=33-66) i 182 (37,0%) žena (medijan dobi 51 godina, IQR=34-67) (slika 19).



Slika 18. Raspodjela bolesnika po dobnim skupinama



Slika 19. Medijan dobi bolesnika uključenih u istraživanje

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (br. 80-1092/1-16, odobreno 3. lipnja 2016. godine).

4.2. Metode

Klinička dijagnoza neuroinvazivne arbovirusne bolesti postavljena je prema kriterijima ECDC koji uključuju: meningitis, encefalitis, akutnu mlohavu kljenut ili druge znakove oštećenja SŽS-a ili perifernog živčanog sustava te ostale simptome arbovirusne bolesti (glavobolja, mijalgija, artralgiya, vrtoglavica, povraćanje, kočenje šije) [96].

U svih je bolesnika dijagnoza potvrđena prema kriterijima ECDC [96] na temelju:

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

Bolesnicima su oduzeti uzorci CSL-a, urina i seruma. Uzorci CSL-a i urina testirani su na prisutnost KMEV, WNV, USUV, TOSV, TAHV i BHAV RNK. Uzorci seruma i CSL-a svih bolesnika testirani su na prisutnost KMEV, WNV, USUV i TOSV, a uzorci seruma i CSL-a bolesnika u kojih nije dokazana etiologija neuroinvazivne bolesti (N=194) dodatno su testirani na prisutnost TAHV i BHAV protutijela.

Molekularna dijagnostika učinjena je metodom RT-PCR u stvarnom vremenu. Uzorci koji su polučili pozitivnu reakciju su dodatno testirani klasičnom RT-PCR metodom te je učinjeno sekvenciranje.

Serološka dijagnostika obavljena je komercijalnim dijagnostičkim ELISA testovima (KMEV, WNV, USUV) te IFA testom (TOSV). Za detekciju TAHV i BHAV protutijela korišten je VNT. Uzorci s dokazanim križno reaktivnim protutijelima na flaviviruse potvrđeni su pomoću VNT u OIE Referentnom centru za West Nile virus (Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italija).

4.2.1. Molekularna dijagnostika

Izdvajanje RNK iz kliničkih uzoraka obavljeno je komercijalno dostupnim kompletom High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche, Mannheim, Njemačka).

Prisutnost virusnih genoma testirana je reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu u jednom koraku (RT-qPCR). Za RT-qPCR korišten je komercijalno dostupan komplet Brilliant III Ultra-Fast QRT-PCR Master Mix (Agilent Technologies, SAD), specifične početnice i dvostruko označene probe. Testiranje je učinjeno u uređaju Rotor-gene Q (Qiagen, Hilden, Njemačka). Dokazivanje genoma učinjeno je sljedećim postupcima: KMEV prema Schwaiger i Cassinotti (2006.) [97], WNV prema Tang *i sur.* (2006.) [98], USUV prema Nikolay *i sur.* (2014.) [99], TOSV prema Weidmann *i sur.* (2008.) [100],

TAHV prema Li i sur. (2015.) [101] te BHAV prema Matsuno i sur. (2013.) [93]. Početnice i probe korištene za detekciju arbovirusa navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Početnice i probe korištene za detekciju neuroinvazivnih arbovirusa

Virus	Ciljna sekvenca	Autor protokola
KMEV FP: GGG CGG TTC TTG TTC TCC RP: ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT Proba: FAM-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-TAMRA	3'NCR 68 bp 11,054-11,121	<i>Schwaiger i Cassinotti [97]</i>
WNV FP: AAG TTG AGT AGA CGG TGC TG RP: AGA CGG TTC TGA GGG CTT AC Proba: FAM-CAA CCC CAG GAG GAC TGG- TAMRA	3'NCR 92 bp 10,533-10,625 nt	<i>Tang i sur. [98]</i>
USUV FP: CAA AGC TGG ACA GAC ATC CCT-TAC RP: CGT AGA TGT TTT CAG CCC ACGT Proba: FAM-AAG ACA TAT GGT GTG GAA GCC TGA TAG GCA-TAMRA	NS5 103 bp 10,190-10,293 nt	<i>Nikolay i sur. [99]</i>
TOSV FP: GGG TGC ATC ATG GCT CTT RP: CAA TGG CAT CCA TAG TGG TCC CAG A Proba: FAM-GCA GRG ACA CCA TCA CTC TGT C-TAMRA	S segment 133 bp 364-496 nt	<i>Wiedmann i sur. [100]</i>
TAHV FP: CCA TTC CGT TAG GAT CTT CTT CCT RP: CCT TCC TCT CCG GCT TAC G' Proba: FAM-AAT GCC GCA AAA GCC AAA GCT GC-TAMRA	S gen 74 bp 186-259 nt	<i>Li i sur. [101]</i>
BHAV FP: GAT GGT TGC ATA CAC TGA RP: CTT GGC ATC ATC TTT CCA Proba: FAM-ATC CTT AAG GAG TTC GGT GAG GA-TAMRA	C segment 166 bp 28-193 nt	<i>Matsuno i sur. [93]</i>

FP=nizvodna početnica (engl. *forward primer*), RP=uzvodna početnica (engl. *reverse primer*)

Reverzna transkripcija (50°C/30 min) i inicijalna denaturacija (95°C/3 min) učinjene su prema uputama proizvođača reagensa. Temperature za PCR u skladu su s korištenim protokolima za pojedini virus (tablica 4). Fluorescencija za FAM je očitavana na kraju svakog ciklusa.

Tablica 4. Korišteni temperaturni protokoli za RT-qPCR u svarnom vremenu pri detekciji pojedinih virusa

	KMEV	WNV	USUV	TOSV	TAHV	BHAV	
Reverzna transkripcija	50°C/30 min						
Inicijalna denaturacija	95°C/3 min						
PCR	Broj ciklusa	45 x	50 x	40 x	40 x	40 x	
	Denaturacija	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15 s	95°C/15 s	94°C/20 s
	Ljepljenje C	60°C/60 s	60°C/60 s	60°C/60 s	60°C/15 s	60°C/60 s	54°C/10 s
	Ekstenzija	-			-		72°C/10 s

4.2.2. Serološka dijagnostika

Specifična IgG i IgM protutijela određena su pomoću komercijalnih dijagnostičkih ELISA i IFA testova (Euroimmun, Lübeck, Njemačka) te *in-house* VNT-a (tablica 5).

Tablica 5. Korišteni testovi za određivanje protutijela

Virus	Metoda	Naziv testa
Virus krpeljnog encefalitisa	ELISA	Anti-TBE Virus (IgM, IgG)
West Nile virus	ELISA VNT*	Anti-West Nile virus (IgM, IgG) <i>in-house</i> metoda (IgM+IgG)
Usutu virus	ELISA VNT*	Anti-Usutu virus (IgG) <i>in-house</i> metoda (IgM+IgG)
Toscana virus	IFA	Sandfly fever mosaic (SFSV, SFNV, SFCV, TOSV- IgM, IgG)
Tahyna orthobunyavirus	VNT	<i>in-house</i> metoda (IgM+IgG)
Bhanja bandavirus	VNT	<i>in-house</i> metoda (IgM+IgG)

*potvrđni testovi za uzorke s dokazanim križno-reaktivnim protutijelima

ELISA - virus krpeljnog encefalitisa, West Nile virus i Usutu virus IgM/IgG

Sadržaj testa:

1. Mikrotitarska pločica presvučena s antigenom (12 stripova s 8 udubina)
2. Kalibrator (IgG/IgM, humani)
3. Pozitivni kontrolni serum (IgG/IgM, humani)
4. Negativni kontrolni serum (IgG/IgM, humani)
5. Konjugat (antihumani IgG/IgM - kozji, obilježen peroksidazom)
6. Pufer za razrijeđivanje seruma - za dokaz IgG; za dokaz IgM sadrži IgG/RF apsorbens (antihumani IgG)
7. Pufer za ispiranje
8. Otopina kromogen-susprata (TMB/H₂O₂)
9. Otopina za zaustavljanje reakcije (stop otopina - 0,5 M sumporna kiselina)

Izvođenje testa:

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

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

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

2. Pločica se ispere 3x s 300 µl pufera za ispiranje.
3. U svaku udubinu stavi se 100 µl konjugata (antihumani IgG/IgM obilježen peroksidazom). Inkubira se 30 min na sobnoj temperaturi.
4. Pločica se ispere 3x s 300 µl pufera za ispiranje.

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

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

Očitavanje apsorpcijske vrijednosti se vrši spektrofotometrijski pri 450/620 nm unutar 30 min od dodavanja stop otopine.

Izračunavanje rezultata:

Ekstincijska vrijednost kalibratora označava gornju granicu referentnog raspona neinficiranih osoba (cut-off).

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

IgG Očitava se s kalibracijske krivulje

IgM

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

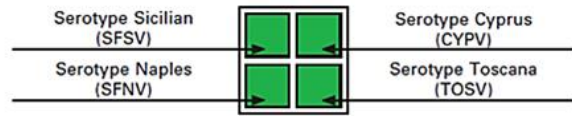
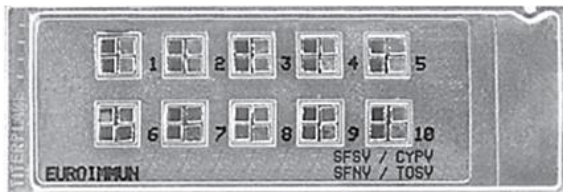
IgG

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

IFA - Toscana virus IgG/IgM (Sandfly fever Mosaic)

Sadržaj testa:

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



Slika 20. Test za detekciju protutijela na viruse papatači groznice i Toscana virus

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

Određivanje IgM protutijela: ispitivani serum se razrijeđuje 1:10 (11.1 μ l 1 + 100 μ l apsorbensa). Inkubira se 15 min na sobnoj temperaturi te zatim razrijeđuje 1:100 u PBS-Tween.

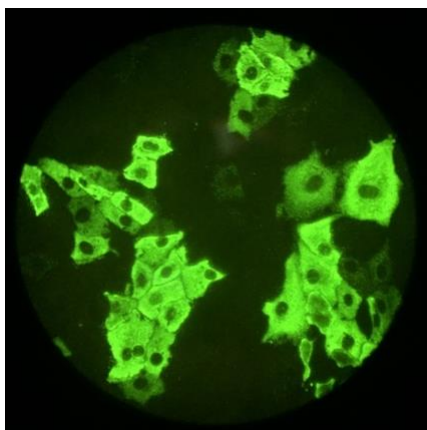
Određivanje IgG protutijela: ispitivani serum se razrijeđuje 1:100 u PBS-Tween (razrijeđenog 1:10 + 100 μ l PBS-Tween).

Izvođenje testa:

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

Očitavanje rezultata:

Pozitivna reakcija: prisutnost protutijela na TOSV uzrokuje fluorescenciju u citoplazmi inficiranih stanica. Intenzitet fluorescencije mora biti kao kod pozitivne kontrole (slika 21).



Slika 21. IFA - pozitivan uzorak seruma (IgG protutijela na Toscana virus)

Izvor: Referentni centar Ministarstva zdravstva za dijagnostiku i praćenje virusnih zoonoza, Odjel za virološku serologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo – projekt CRONEUROARBO

Kvalitativna evaluacija:

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

Kvantitativna evaluacija IgM/IgG:

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

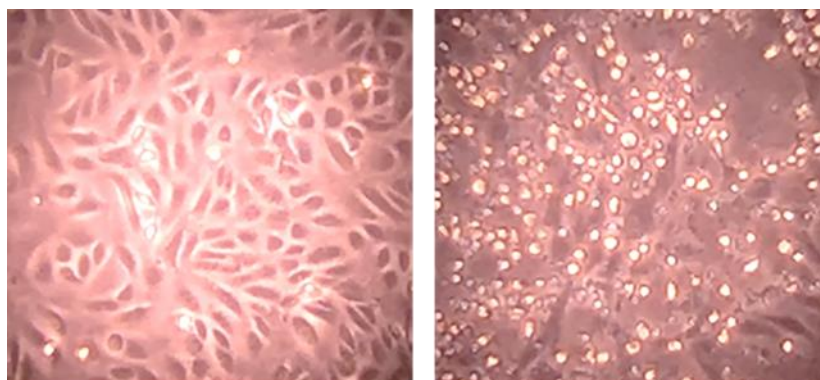
VNT (Tahyna orthobunyavirus, Bhanja bandavirus)

Kao antigen za VNT je korišten TAHV soj UVE/TAHV/1958/CS/92 (slika 22) te BHAV soj IG690 uzgojeni u Vero E6 staničnoj kulturi. Titar virusa (doza virusa koja inficira 50% inokuliranih staničnih kultura; TCID₅₀) je izračunat pomoću Reed and Muench formule.

Izvođenje testa:

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

Titar NT protutijela je definiran kao recipročna vrijednost najvećeg razrijeđenja seruma koje pokazuje 50% neutralizacije. Titar serumskih NT protutijela ≥ 10 te titar protutijela u CSL-u ≥ 5 je smatran pozitivnim rezultatom.



Slika 22. Vero stanice (lijevo); citopatski učinak TAHV (desno)

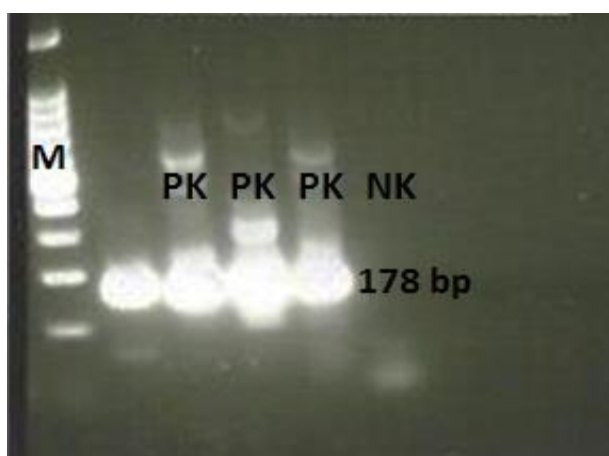
Izvor: Referentni centar Ministarstva zdravstva za dijagnostiku i praćenje virusnih zoonoza, Odjel za virološku serologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo – projekt CRONEUROARBO

4.2.3. Genotipizacija i filogenetska analiza dokazanih arbovirusa

Svi uzorci koji su polučili pozitivnu reakciju metodom RT-qPCR u stvarnom vremenu, podvrgnuti su klasičnoj RT-qPCR reakciji (slika 23), kako bi se dobili odsječci genoma dovoljne duljine za genotipizaciju. Uzorci su izlučeni nakon gel elektroforeze iz gela i

pročišćeni te je obavljeno sekvenciranje (Macrogen DNA Sequencing Service). Genotipizacija i filogenetsko grupiranje dobivenih sekvenci temeljeno je na usporedbi sa sojevima dobivenim iz banke gena (GenBank), uporabom BLAST algoritma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence su poredane pomoću ClustalW i analizirane uporabom MEGA 11 [102], dok su filogenetska stabla oblikovana uporabom metode udruživanja susjeda (*neighbour-joining*), primjenom evolucijskog modela (Kimura 2-parametra).

Iz dva uzorka urina bolesnika s neuroinvazivnom WNV infekcijom (sekvencirana Sanger metodom), pokušalo se učiniti sekvenciranje nove generacije (*Next generation sequencing; NGS*). NGS sekvenciranje nije bilo moguće zbog nedovoljne količine virusne RNK.



Slika 23. Klasični RT-qPCR u bolesnika s dokazanom RNK virusa krpeljnog encefalitisa: rezultati elektroforeze umnoženog odsječka za C protein u agaroznom gelu

Izvor: Odjel za virusologiju, Hrvatski veterinarski institut – projekt CRONEUROARBO

3.2.4. Statistička obrada rezultata

Za deskripciju podataka korištene su klasične statističke metode (tablice frekvencija, mjere centralne tendencije i raspršenosti). Razlike između grupa ispitanika testirane su parametrijskim (t-test, ANOVA) i neparametrijskim testovima (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, hi-kvadrat test, Fischerov egzaktni test) ovisno o vrsti varijabli i tipu distribucije podataka. Jačina povezanosti ishoda od interesa i nezavisnih prediktora procijenjena je logističkom regresijom. Razina pogreške tipa I (statistička značajnost) odabrana je na $\alpha=0,05$. Obrada podataka učinjena je pomoću programskog paketa STATA/MP ver.15 (StatCorp LP, SAD).

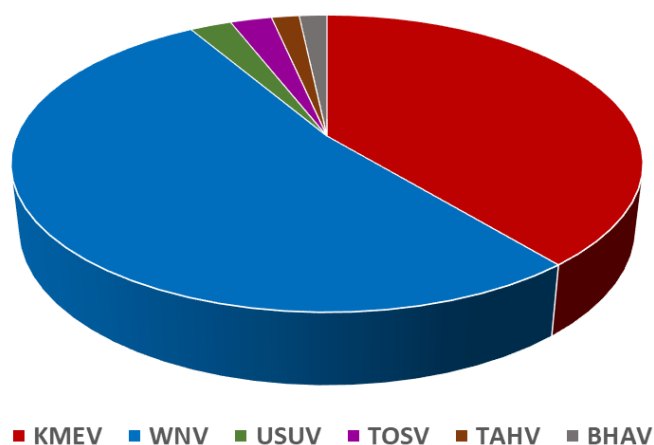
5. REZULTATI

Tijekom ispitivanog razdoblja, neuroinvazivna arbovirusna infekcija dokazana je u 118/492 (23,9%) ispitanika, od kojih je bilo 74 muškarca (62,7%) i 44 žene (37,3%). Najčešći dokazani uzročnici bili su WNV (12,6%) te KMEV (9,3%), no zabilježene su i sporadične infekcije uzrokovane USUV, TOSV, TAHV i BHAV (tablica 6).

Tablica 6 . Učestalost akutnih neuroinvazivnih infekcija i IgG seropozitivnih ispitanika

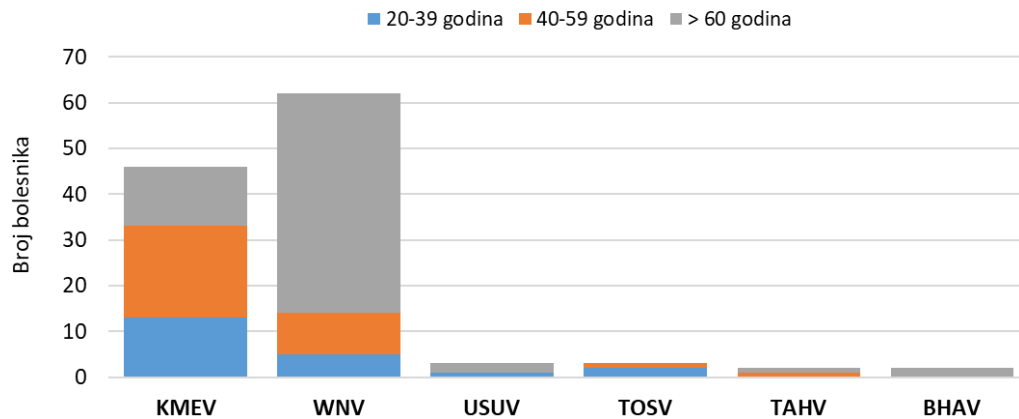
Uzročnik	Neuroinvazivna infekcija		IgG seropozitivne osobe		
	N	%	N	%	95%CI
Virus krpeljnog encefalitisa	46	9,3	9	1,8	0,8-3,4
West Nile virus	62	12,6	7	1,4	0,6-2,9
Usutu virus	3	0,6	1	0,3	0,01-1,1
Toscana virus	3	0,6	1	0,3	0,01-1,1
Tahyna orthobunyavirus	2	0,4	18	3,6	2,2-5,6
Bhanja bandavirus	2	0,4	40	8,1	5,8-10,9

Učestalost pojedinih arbovirusa u bolesnika s potvrđenom etiologijom prikazana je na slici 24. U ukupnom broju dokazanih arbovirusa (N=118), udio WNV je iznosio 52,5%, KMEV 38,9%, USUV i TOSV svaki s 2,6%, te TAHV i BHAV svaki s 1,7%.



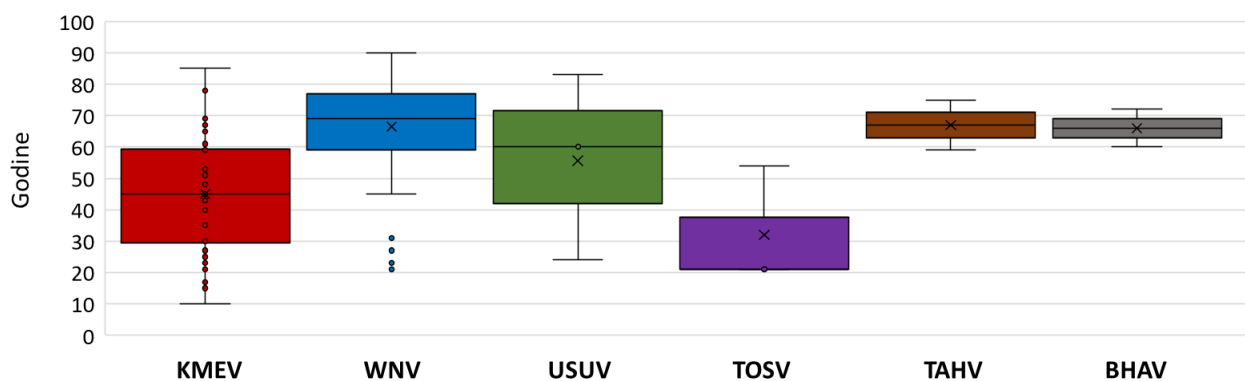
Slika 24. Učestalost pojedinih arbovirusa u ukupnom broju bolesnika s potvrđenom etiologijom neuroinvazivne bolesti

Raspodjela bolesnika po dobnim skupinama prikazana je na slici 25. Najviše oboljelih (66/55,9%) bilo je u dobnj skupini ≥ 60 godina, 31/26,3% je bilo u dobi 40-59 godina te 21/17,8% u dobi 20-39 godina.



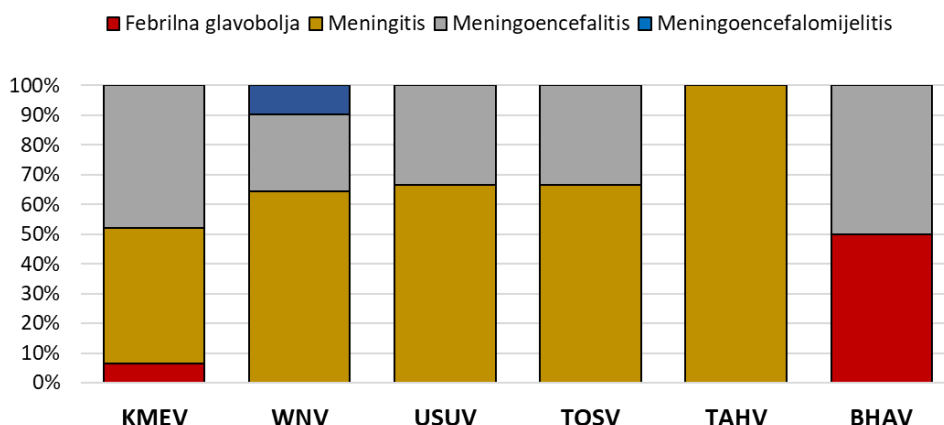
Slika 25. Raspodjela bolesnika s neuroinvazivnom arbovirusnom infekcijom po dobi

Bolesnici s neuroinvazivnom WNV infekcijom bili su najstariji (medijan 68 godina, IQR=59-76), potom bolesnici s TAHV (medijan 67 godina, IQR=63-71), BHAV (medijan 66, IQR=63-69) i USUV (medijan 60 godina, IQR=42-71). Oboljeli od KME su bili srednje životne dobi (medijan 48 godina, IQR=36-60), dok su najmlađi bili bolesnici s TOSV infekcijom (medijan 32 godine, IQR=21-38) (slika 26).



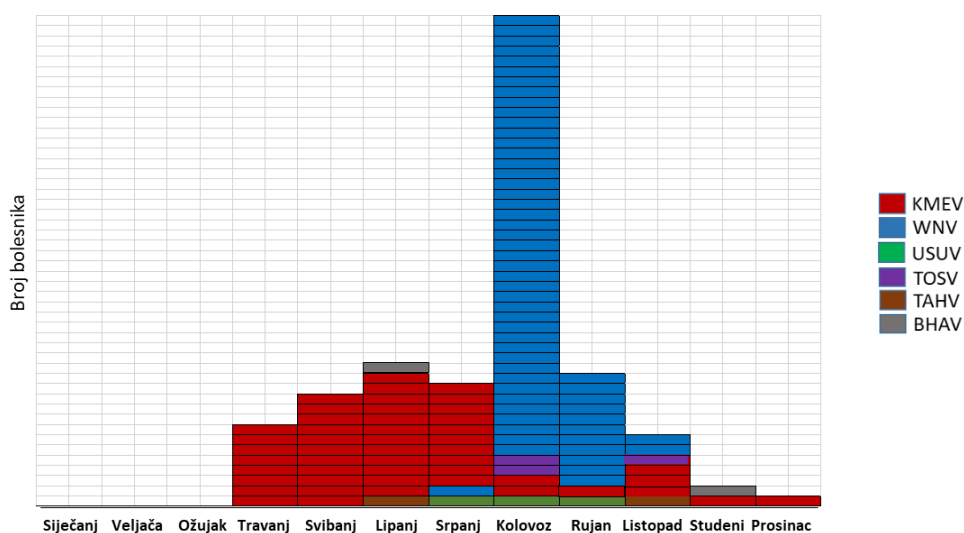
Slika 26. Medijan dobi bolesnika s neuroinvazivnom arbovirusnom infekcijom

U kliničkoj slici neuroinvazivnih infekcija dominirao je meningitis (67/56,8%) te meningoencefalitis (41/34,7%) (slika 27).



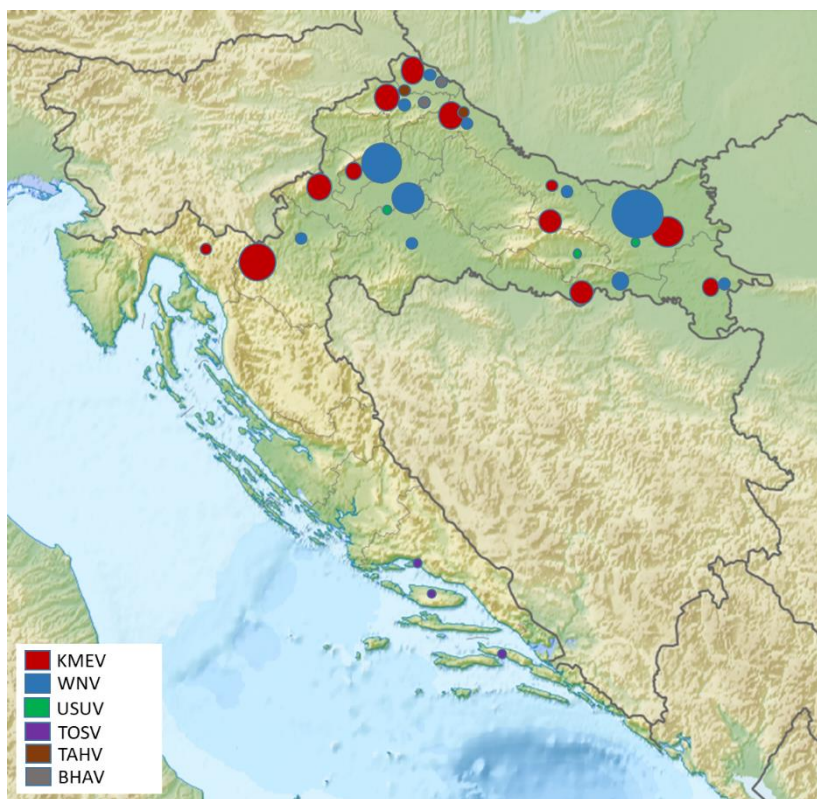
Slika 27. Kliničke prezentacije neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija

Uočena je karakteristična sezonska pojavnost arbovirusnih infekcija, u razdoblju od travnja do listopada (slika 28). Prvi slučajevi KME dokazani su već u travnju, a u pojedinim su se sezonama infekcije pojavljivale do prosinca. KME je pokazao bimodalnu pojavnost s dva vrška, većim proljetno-ljetnim (svibanj-srpanj) te manjim jesenskim (rujan-listopad). Većina WNV infekcija zabilježena je u kolovozu te rujnu. Ostali su arbovirusi (USUV, TOSV, TAHV i BHAV) dokazani u razdoblju od lipnja do studenog.



Slika 28. Sezonska pojavnost neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija (2017.-2020. godine)

Arbovirusne su infekcije dokazane u 12 kontinentalnih i dvije primorske županije (slika 29).



Slika 29. Geografska rasprostranjenost neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija, 2017.-2020. godine (veličina krugova razmjerna je broju slučajeva)

5.1. Virus krpeljnog encefalitisa

Neuroinvazivna KMEV infekcija potvrđena je u 46 bolesnika s rasponom od 7 do 18 slučajeva godišnje. Osim dokazanih akutnih infekcija, u 9 je ispitanika dokazana ranija izloženost virusu (KMEV IgG protutijela).

Muškarci su oboljevali češće u svim ispitivanim sezonama prijenosa te je ukupno 71,9% oboljelih bilo muškog spola u odnosu na 27,1% žena. Također, češće su oboljevale osobe starije od 40 godina s ukupno 71,7% oboljelih. Rizični čimbenici kod bolesnika s dokazanom KMEV infekcijom bili su česti ubodi krpelja (50,0%), često posjećivanje šumskih predjela (52,2%) te ruralno područje prebivališta (58,7%) (tablica 7).

Tablica 7. Sociodemografske i epidemiološke značajke bolesnika s dokazanim krpeljnim encefalitisom

Značajka	2017.	2018.	2019.	2020.	Ukupno
	(N=11)	(N=18)	(N=7)	(N=10)	(N=46)
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Spol					
Muškarci	8 (72,7)	14 (77,8)	5 (71,4)	6 (60,0)	33 (71,9)
Žene	3 (27,3)	4 (22,2)	2 (28,6)	4 (40,0)	13 (27,1)
Dobna skupina					
20-39 godina	3 (27,3)	3 (16,6)	3 (42,9)	4 (40,0)	13 (28,3)
40-59 godina	7 (63,7)	4 (22,2)	3 (42,9)	6 (60,0)	20 (43,4)
60 + godina	1 (9,1)	11 (61,2)	1 (14,3)	0 (0)	13 (28,3)
Rizični čimbenici					
Česti ugrizi krpelja	6 (54,5)	9 (50,0)	3 (42,8)	5 (50,0)	23 (50,0)
Često posjećivanje šumskih predjela	7 (63,6)	11 (61,1)	2 (28,6)	4 (40,0)	24 (52,2)
Ruralno područje prebivališta	7 (63,6)	10 (55,5)	5 (71,4)	5 (50,0)	27 (58,7)

U kliničkoj slici KME su podjednako učestalošću opaženi meningitis (45,7%) i meningoencefalitis (47,8%), dok je troje bolesnika (6,5%) imalo nespecifičnu febrilnu bolest s glavoboljom („febrilna glavobolja“). Najčešći klinički simptomi bili su glavobolja prisutna kod 84,7% bolesnika, klonulost (76,1%), mučnina (45,6%), vrtoglavica (39,1%) te povraćanje (36,1%). Rjeđe su bili prisutni mijalgija (28,3%) i artralgijska (21,7%). Ishod bolesti je bio djelomično poboljšanje ili potpuni oporavak kod svih bolesnika, dok smrtnih ishoda nije zabilježeno (tablica 8).

Od laboratorijskih je nalaza uočena pleocitoza u CSL-u s rasponom medijana od 105 do 261 stanica/mm³. Kod svih bolesnika prevladavale su mononuklearne stanice (raspon medijana 64-73). Vrijednosti proteina su bile povišene (105-267), dok su vrijednosti glukoze bile uredne (raspon medijana 3,0-3,3) (tablica 9).

Tablica 8. Kliničke značajke bolesnika s krpeljnim encefalitisom

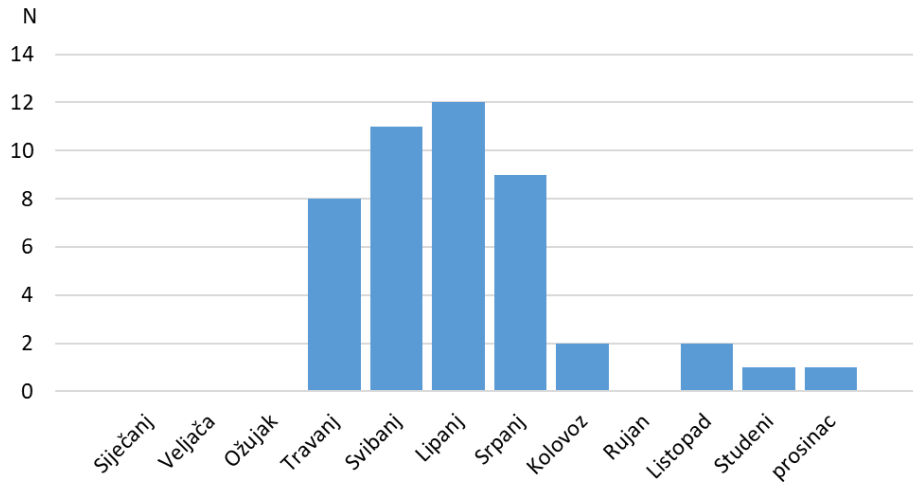
Značajka	2017.	2018.	2019.	2020.	Ukupno
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Klinička dijagnoza					
Febrilna glavobolja	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (30,0)	3 (6,5)
Meningitis	5 (45,5)	9 (50,0)	4 (57,2)	3 (30,0)	21 (45,7)
Meningoencefalitis	6 (54,5)	9 (50,0)	3 (42,8)	4 (40,0)	22 (47,8)
Klinički simptomi					
Temperatura >39°C	7 (63,6)	9 (50,0)	2 (28,6)	3 (30,0)	21 (45,6)
Glavobolja	11 (100)	16 (88,8)	6 (85,7)	6 (60,0)	39 (84,7)
Vrtoglavica	3 (27,3)	11 (61,1)	2 (28,6)	2 (20,0)	18 (39,1)
Mučnina	6 (54,5)	11 (61,1)	2 (28,6)	2 (20,0)	21 (45,6)
Povraćanje	5 (45,5)	3 (16,6)	2 (28,6)	2 (20,0)	12 (36,1)
Klonulost	9 (81,8)	16 (88,8)	5 (71,4)	5 (50,0)	35 (76,1)
Mijalgija	4 (36,4)	8 (44,4)	1 (14,3)	0 (0)	13 (28,3)
Artralgija	4 (36,4)	6 (33,3)	0 (0)	0 (0)	10 (21,7)
Ishod bolesti					
Oporavak/poboljšanje	11 (100)	18 (100)	7 (100)	10 (100)	46 (100)
Smrtni ishod	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Tablica 9. Laboratorijski nalazi u bolesnika s krpeljnim encefalitisom

Parametar	2017.		2018.		2019.		2020.	
	Medijan (IQR)		Medijan (IQR)		Medijan (IQR)		Medijan (IQR)	
Serum								
L (x10 ⁹ /L)	8,6	(7,2-10,3)	10,1	(8,7-15,8)	9,9	(7,2-11,2)	8,4	(7,2-11,2)
SE (mm/h)	21	(12-64)	14	(12-18)	12	(10-14)	12	(10-14)
CRP (mg/L)	6,8	(4,07-14,8)	5,8	(1,7-10,1)	4,9	(2,5-37,9)	4,6	(2,2-38,9)
CSL								
Broj stanica/mm ³	131	(57-612)	105	(38-365)	261	(226-268)	267	(130-338)
PMN (%)	13	(6-64)	19	(10-36)	36	(18-41)	36	(18-41)
MN (%)	73	(36-87)	69	(48-86)	64	(59-78)	64	(59-78)
Proteini (g/L)	0,8	(0,7-1,1)	0,7	(0,6-0,8)	0,8	(0,7-0,9)	0,8	(0,7-0,9)
Glukoza (mmol/L)	3,3	(2,9-3,6)	3,1	(2,9-3,6)	3,0	(2,9-3,2)	3,0	(2,9-3,2)

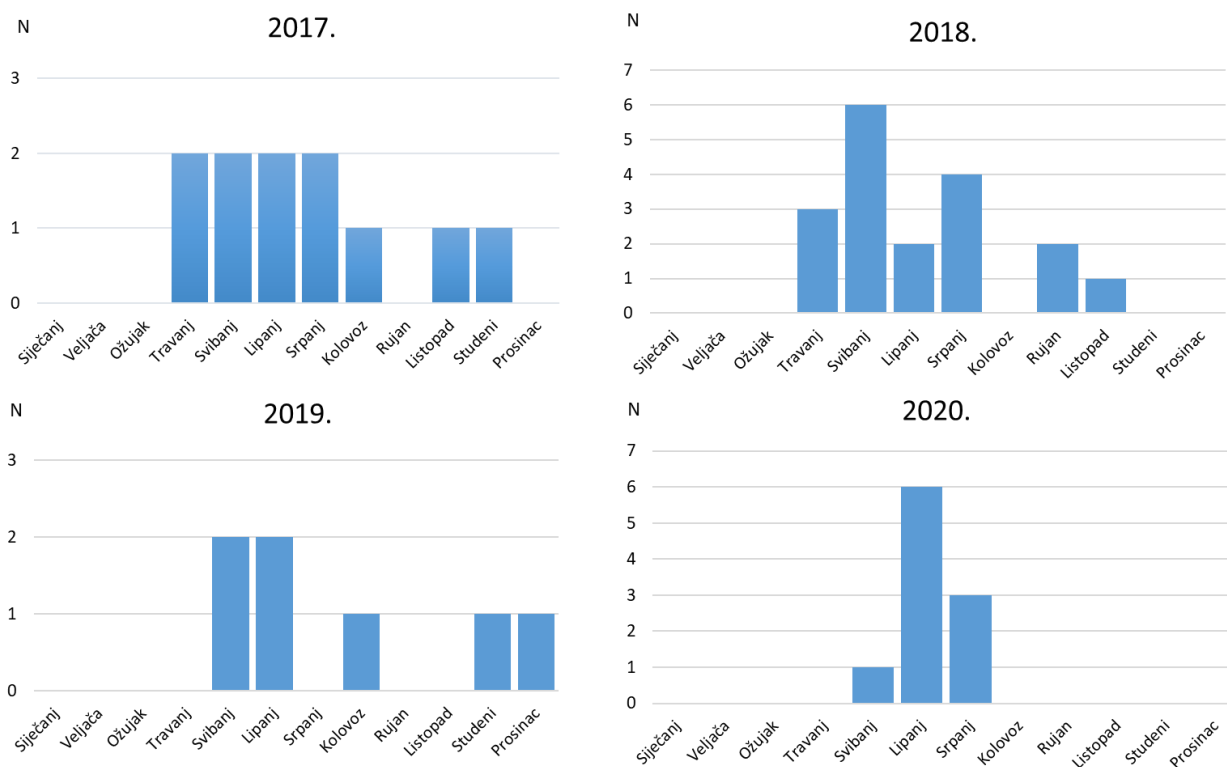
IQR= interkvartilni raspon; L=leukociti; CRP=C-reaktivni protein; SE=sedimentacija eritrocita; PMN=polimorfonukleari; MN=mononukleari

Tijekom cijelog ispitivanog razdoblja, opažena je uobičajena sezonska pojavnost KME (travanj-listopad) s dva grupiranja, većim proljetno-ljetnim i manjim jesenskim (slika 30). Najveći broj infekcija (78,2%) zabilježen je od svibnja do rujna.



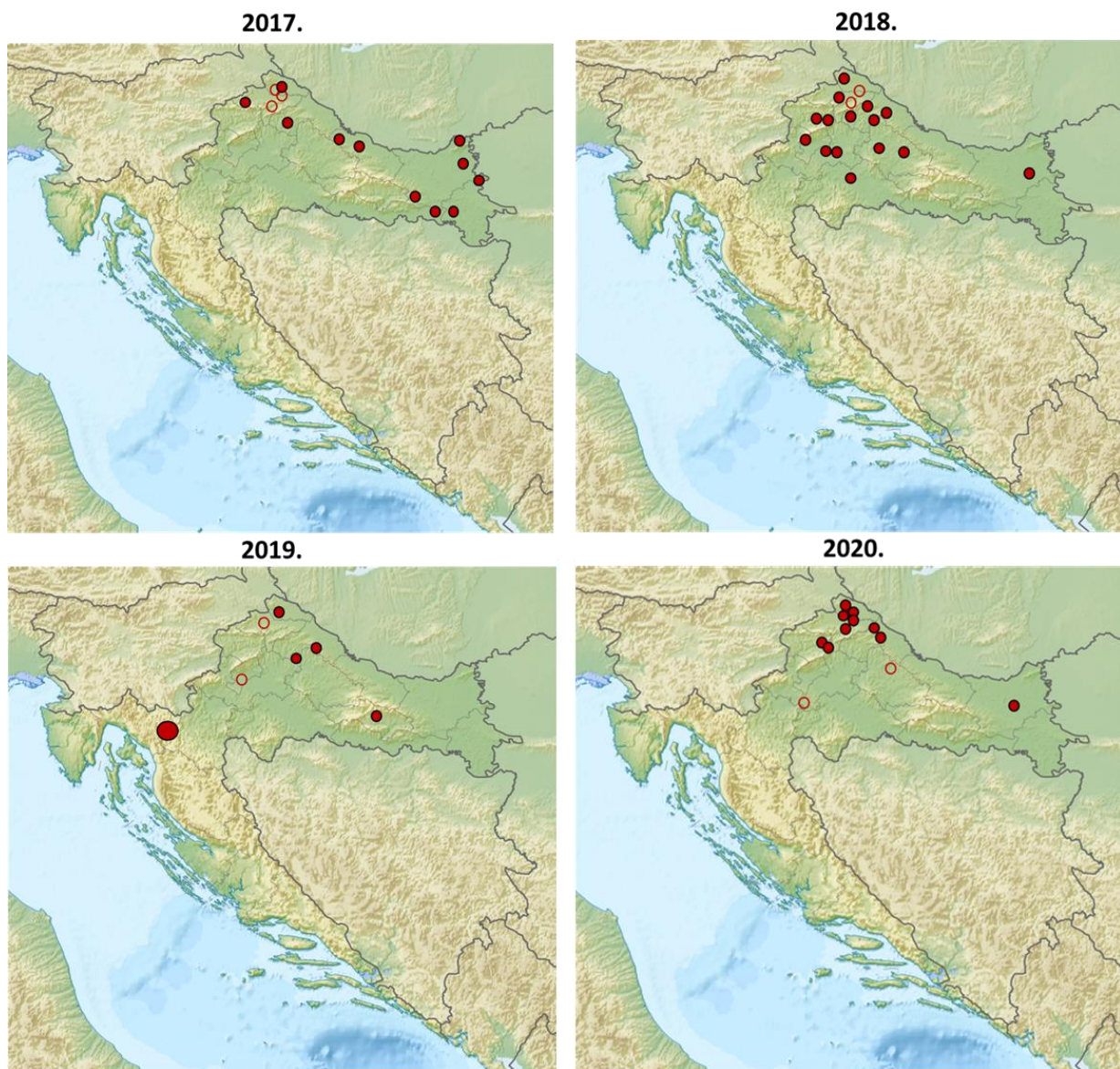
Slika 30. Sezonska pojavnost krpeljnog encefalitisa (2017.-2020. godine)

Tijekom 2017., 2018. i 2019. godine veći vršak zabilježen je u kasno proljeće i ljeto (svibanj-srpanj), dok je manji vršak zabilježen u jesen (rujan-listopad). U 2020. godini je opažen samo jedan proljetno-ljetni vršak (svibanj-srpanj). Sporadični su slučajevi KME dokazani i u studenom (2017. i 2019. godine) te u prosincu (2019. godine) (slika 31). Najviše oboljelih zabilježeno je 2018. godine kada je KMEV infekcija potvrđena u 18 bolesnika od kojih je najveći broj dokazan u svibnju (33,3%). Druga po učestalosti je 2017. godina (11 oboljelih), zatim 2020. godina (10 oboljelih) te 2019. godina (7 oboljelih), kada je uočeno jedno grupiranje (6 bolesnika) u lipnju.

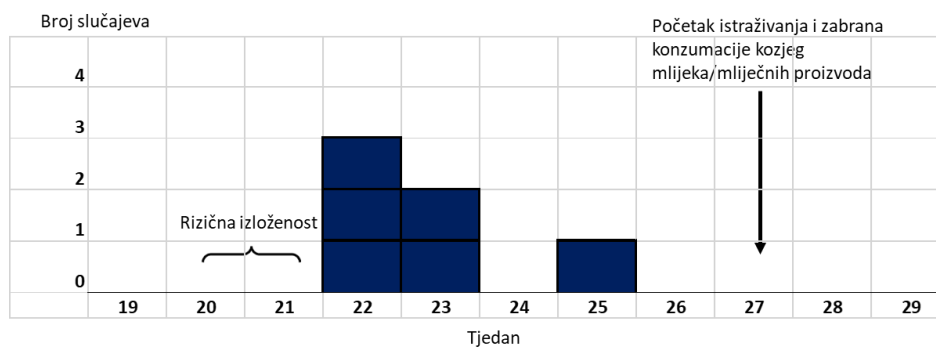


Slika 31. Sezonska pojavnost krpeljnog encefalitisa po godinama

Analizirajući geografsku rasprostranjenost KME, najveći broj infekcija zabilježen je u sjeverozapadnim (Koprivničko-križevačka, Varaždinska, Međimurska) i istočnim županijama (Osječko-baranjska) (slika 32). Krajem lipnja 2019. godine otkriveno je novo mikro-žarište KME na području Lokvi (Gorski kotar) uzrokovano alimentarnom infekcijom (slika 33). Pet od ukupno šest bolesnika konzumiralo je nepasterizirano kozje mlijeko u razdoblju od dva tjedna prije pojave simptoma, a jedan bolesnik je imao nedavni ugriz krpelja. U ovoj epidemiji većinom su oboljele osobe ženskog spola, a srednja dob oboljelih bila je 41 godina (raspon 10-85 godina). Najčešći klinički simptomi bili su vrućica (do 38°C), bolovi u mišićima, povraćanje, zimica, a kod jednog bolesnika bili su izraženi tremor i konfuzija. Troje oboljelih s dokazanom infekcijom SŽS-a bili su hospitalizirani. Epidemiološke i kliničke značajke oboljelih i kontrola prikazane su u tablicama 10 i 11.



Slika 32. Geografska rasprostranjenost virusa krpeljnog encefalitisa (puni krugovi=akutne infekcije, prazni krugovi=IgG seropozitivne osobe)



Slika 33. Grupiranje slučajeva krpeljnog encefalitisa prema datumu početka bolesti, Gorski kotar, 2019. godine

Tablica 10. Demografske značajke oboljelih od krpelnog encefalitisa i kontrola, Lokve, 2019. godine (N=12)

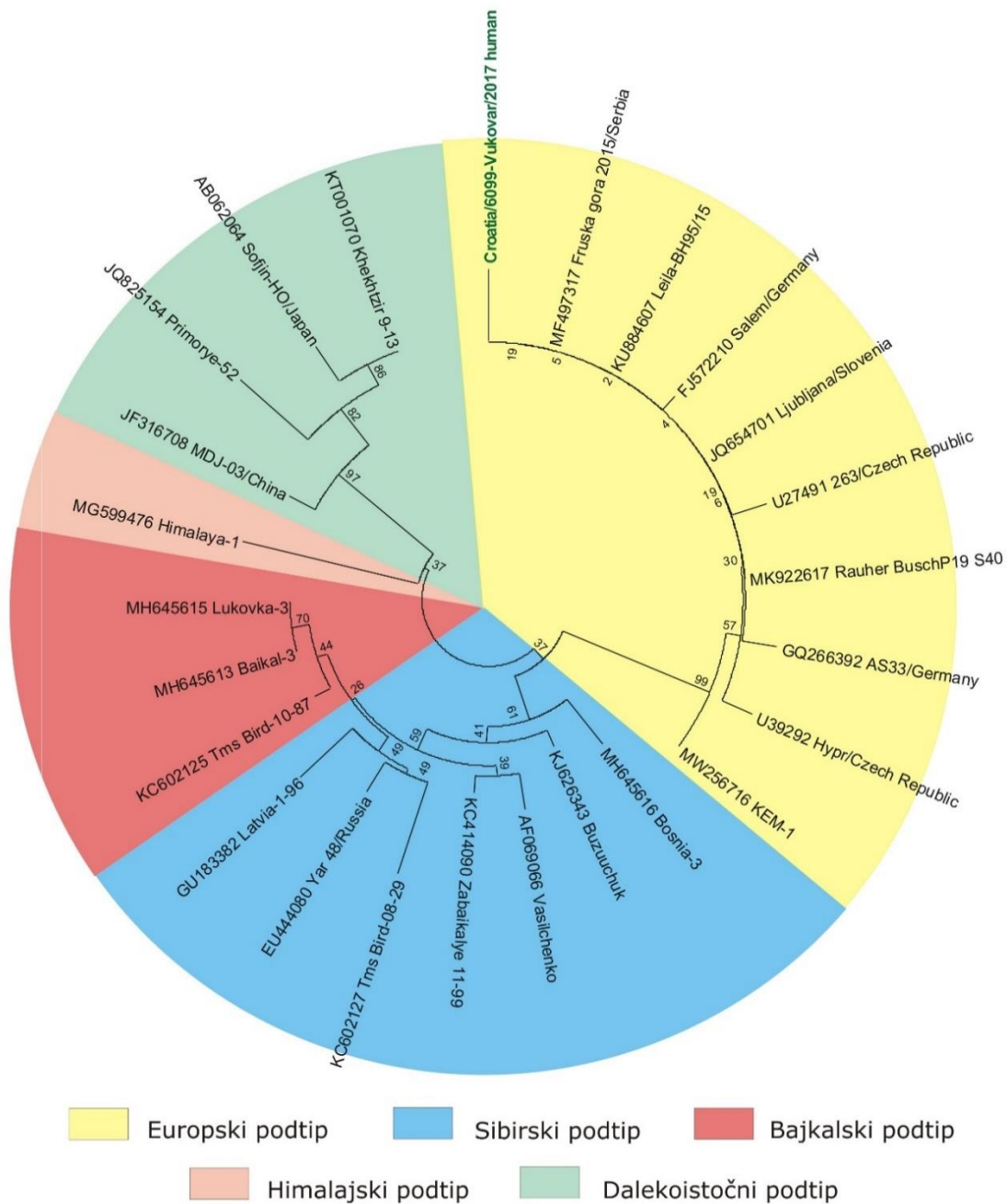
Značajka	Bolesnici N (%)	Kontrole N (%)	Ukupno N (%)
Spol			
Muški	4 (66,7)	4 (66,7)	8 (66,7)
Ženski	2 (33,3)	2 (33,3)	4 (33,3)
Zanimanje			
Student	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)
Poljoprivrednik	(16,7)	(16,7)	(16,7)
Umirovljenik	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)
Učenik	1 (16,7)	1 (16,7)	1 (16,7)
Medijan (IRQ) dobi (godine)	41 (10-85)	41 (10-85)	41 (10-85)

Tablica 11. Rizična izloženost u oboljelih od krpelnog encefalitisa i kontrola, Lokve, 2019. godine

Rizični čimbenik	Bolesnici (N=6)		Kontrole (N=6)		OR	95%CI	p
	Izloženi	%	Izloženi	%			
Konsumacija mlijeka/ mliječnih proizvoda							
Sirovo kozje mlijeko	5	83,3	1	16,7	25,0	0,8-1410,2	0,021*
Kefir	2	33,3	1	16,7	2,5	0,1-176,5	0,505
Jogurt	1	16,7	2	33,3	0,4	0,01-11,3	0,505
Kozji sir	2	33,3	2	33,3	1,0	0,05-20,8	1,000
Ugriz krpelja	1	16,7	2	33,3	0,4	0,01-11,3	0,505
Putovanje unutar mjesec dana	3	50,0	2	33,3	2,0	0,1-37,9	0,558
Vrtlarenje	1	20,0	2	33,3	0,5	0,01-14,5	0,621
Boravak u prirodi	1	20,0	2	33,3	0,5	0,01-14,5	0,621

KMEV RNK dokazana je u uzorku urina jednog bolesnika s područja Vukovarsko-srijemske županije s teškim oblikom meningoencefalitisa i parezom ramenog obruča tijekom 2017. godine.

Filogenetsko stablo je izrađeno na temelju sekvenci od 170 nukleotida 5'UTR fragmenta KMEV. Sekvence su uspoređene sa sojevima iz genske banke (GenBank), uporabom BLAST algoritma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence su poredane pomoću ClustalW i analizirane uporabom MEGA 11 [102], dok je filogenetsko stablo oblikovano uporabom metode Neighbor-Joining (udruživanje susjeda), primjenom evolucijskog modela (Kimura 2-parametra) uz 1000 replikacija. Dokazani je soj pripadao europskom podtipu KMEV (slika 34).



Slika 34. Filogenetsko stablo virusa krpeljnog encefalitisa (soj iz Hrvatske, 2017. označen je zelenom bojom)

5.2. West Nile virus

Neuroinvazivna infekcija uzrokovana WNV-om dokazana je kod 62 bolesnika. Osam je slučajeva potvrđenih u 2017. godini i 54 slučaja u 2018. godini. Tijekom 2019. i 2020. godine, akutne WNV infekcije nisu zabilježene, no u sedam bolesnika dokazana su IgG protutijela (ranija WNV infekcija).

Muškarci su oboljevali češće (54,8%) od žena kod kojih je zabilježeno 45,1% infekcija. Nadalje, infekcije su bile učestalije u osoba starijih od 60 godina (77,4% svih infekcija) u odnosu na dobnu skupinu 40-59 godina (14,5%) te 20-29 godina (8,1%).

Većina oboljelih (59,7%) navela je podatak o čestim ubodima komaraca, 51,6% je bilo iz ruralnih područja, a 72,5% su bili stanovnici poplavnih područja (tablica 12).

Tablica 12. Sociodemografske i epidemiološke značajke bolesnika s dokazanom neuroinvazivnom West Nile infekcijom

Značajka	2017.	2018.	Ukupno
	(N=8)	(N=54)	(N=62)
	N (%)	N (%)	N (%)
Spol			
Muškarci	5 (62,5)	29 (53,7)	34 (54,9)
Žene	3 (36,5)	25 (46,3)	28 (45,1)
Dobna skupina			
20-39 godina	1 (12,5)	4 (7,2)	5 (8,1)
40-59 godina	0 (0)	9 (16,2)	9 (14,5)
60+ godina	7 (87,5)	41 (76,6)	48 (77,4)
Rizični čimbenici			
Česti ubodi komaraca	1 (12,5)	36 (66,6)	37 (59,7)
Ruralno područje prebivališta	3 (37,5)	29 (53,7)	32 (51,6)
Prebivalište na poplavnom području	7 (87,5)	38 (70,3)	45 (72,5)

U kliničkoj slici WNV infekcije dominirao je meningitis sa 64,5% u odnosu na meningoencefalitis (25,8%). Meningoencefalomijelitis je dokazan u 5,1% bolesnika. Tijekom velike epidemije 2018. godine uočene su i neke rijetke kliničke prezentacije bolesti kao npr. retinitis u bolesnice s WNV meningoencefalitisom, arahnoiditis kaude equine u bolesnice s encefalomijelitisom te sindrom opsoklonusa-mioklonusa u bolesnice s encefalitisom. Isto je

tako, u jedne bolesnice s WNV encefalitisom došlo do razvoja infarkta miokarda s posljedičnim smrtnim ishodom. Povišena tjelesna temperatura ($>39^{\circ}\text{C}$) bila je prisutna kod 29,0% bolesnika. Od kliničkih simptoma najčešće su bili prisutni glavobolja (79,0%) i klonulost (72,6%), zatim vrtoglavica (41,9%), povraćanje (38,7%), mijalgija (29,0%) i artralgiya (25,8%). Većina bolesnika (90,3%) se djelomično ili potpuno oporavila. Smrtni ishod zabilježen je kod 6 bolesnika s meningoencefalomijelitisom (9,7%) (tablica 13).

Tablica 13. Kliničke značajke bolesnika s dokazanom neuroinvazivnom West Nile infekcijom

Značajka	2017.	2018.	Ukupno
	N (%)	N (%)	N (%)
Klinička dijagnoza			
Meningitis	4 (50,0)	36 (66,6)	40 (64,5)
Meningoencefalitis	3 (37,5)	13 (24,1)	16 (25,8)
Meningoencefalitis, mijelitis	1 (12,5)	5 (9,3)	6 (9,7)
Klinički simptomi			
Temperatura $>39^{\circ}\text{C}$	2 (25,0)	16 (27,8)	18 (29,0)
Glavobolja	5 (62,5)	44 (81,5)	49 (79,0)
Vrtoglavica	1 (12,5)	25 (46,3)	26 (41,9)
Mučnina	2 (25,0)	33 (61,1)	35 (56,4)
Povraćanje	2 (25,0)	22 (40,7)	24 (38,7)
Klonulost	5 (62,5)	40 (74,1)	45 (72,6)
Dezorijentiranost	2 (25,0)	0 (0)	2 (3,2)
Mijalgija	2 (25,0)	16 (29,6)	18 (29,0)
Artralgiya	1 (12,5)	15 (27,8)	16 (25,8)
Osip	2 (25,0)	6 (11,1)	8 (12,9)
Ishod bolesti			
Oporavak/poboljšanje	7 (87,5)	49 (90,7)	56 (90,3)
Smrtni ishod	1 (12,5)	5 (9,3)	6 (9,7)

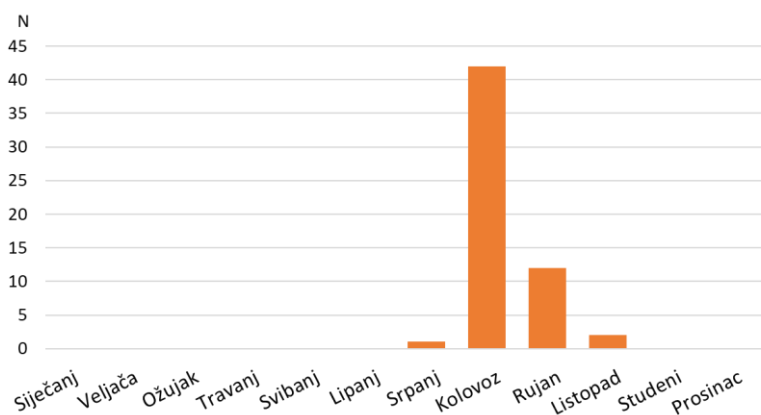
U svih bolesnika uočena je pleocitoza u CSL-u s rasponom medijana od 66 do 300 te predominacijom mononukleara (raspon medijana od 9,5 do 42) (tablica 14).

Tablica 14. Laboratorijski nalazi bolesnika s dokazanom neuroinvazivnom West Nile infekcijom

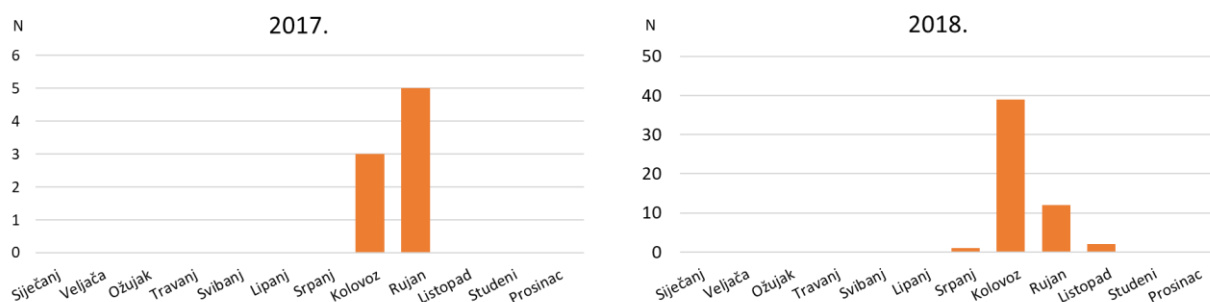
	2017.	2018.
	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)
Serum		
L ($\times 10^9/L$)	9,9 (8,9-12,6)	9,6 (7,4-11,2)
SE (mm/h)	34 (3-49)	31 (15-53)
CRP (mg/L)	4,3 (1,2-17,2)	5,7 (1,3-25,0)
CSL		
Broj stanica/mm ³	66 (25-95)	300 (133-1420)
PMN (%)	9,5 (19,0-72,5)	42 (28-69)
MN (%)	49,5 (9,5-66,7)	51 (29-65)
Proteini (g/L)	0,6 (0,6-1,0)	0,9 (0,6-1,3)
Glukoza (mmol/L)	3,6 (3,3-4,0)	3,6 (3,1-4,1)

IQR=interkvartilni raspon; L=leukociti; CRP=C-reaktivni protein; SE=sedimentacija eritrocita; PMN=polimofonukleari; MN=mononukleari

WNV infekcije pojavljivale su se u razdoblju od srpnja do listopada, s najviše oboljelih u kolovozu (67,7%) (slika 35). U 2017. godini svi oboljeli su dokazani u kolovozu i rujnu, a tijekom 2018. godine su prvi slučajevi zabilježeni već krajem srpnja, dok je najviše oboljelih dokazano u kolovozu (72,2%), zatim u rujnu (22,2%), a dva su slučaja potvrđena u listopadu (slika 36).

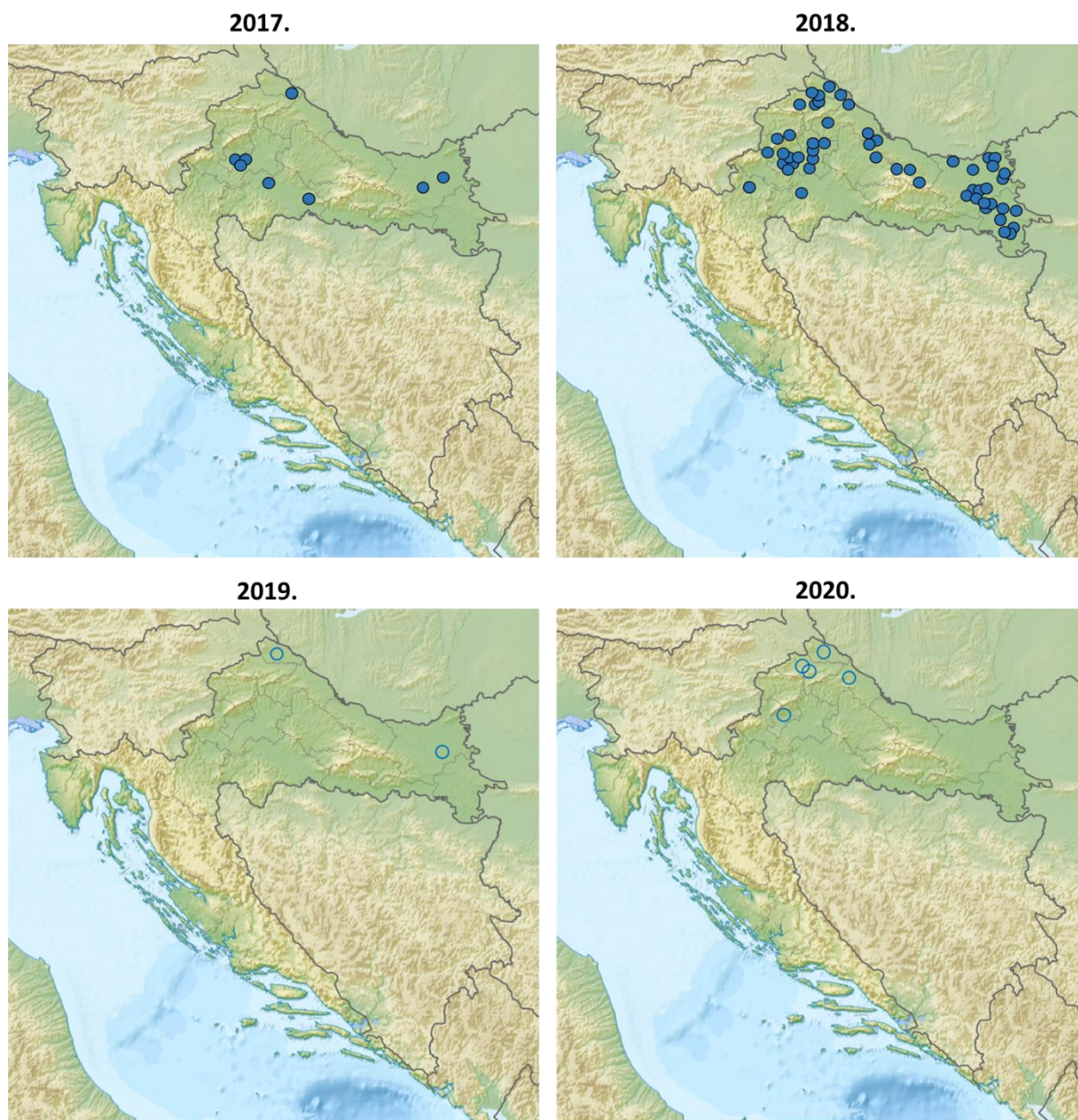


Slika 35. Sezonska pojavnost West Nile infekcija (2017.-2018. godine)



Slika 36. Sezonska pojavnost West Nile infekcija po godinama

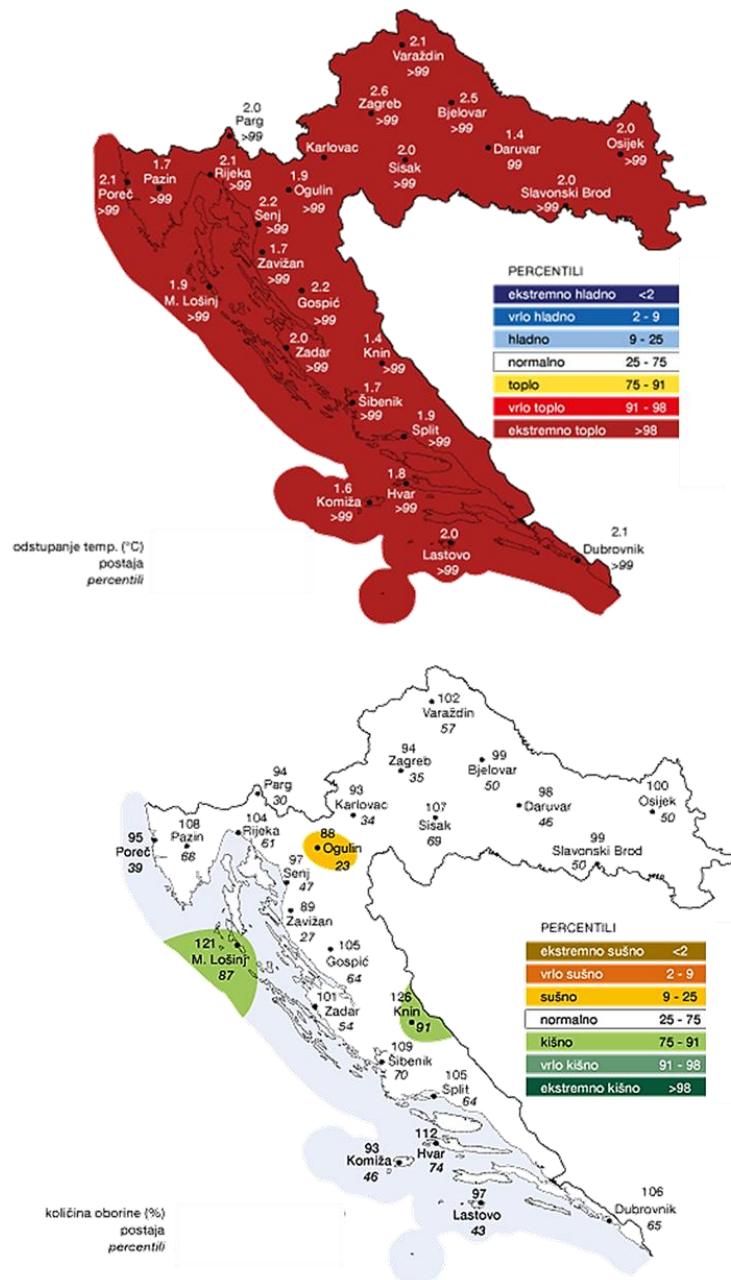
WNV infekcije dokazane su u pet kontinentalnih hrvatskih županija tijekom 2017. godine. U velikoj epidemiji 2018. godine, zahvaćeno je bilo 10 kontinentalnih županija, od kojih su u tri (Karlovačka, Koprivničko-križevačka i Virovitičko-podravska županija) infekcije dokazane prvi put. Tijekom 2018. godine najveći broj potvrđenih slučajeva dokazan je u sjeverozapadnim i istočnim županijama. U 2019. i 2020. godini nije bilo dokazanih akutnih infekcija, no dokazano je sedam IgG seropozitivnih osoba, većinom u sjeverozapadnim županijama (slika 37).



Slika 37. Geografska rasprostranjenost West Nile virusa
(puni krugovi=akutne infekcije, prazni krugovi=IgG seropozitivne osobe)

U 2018. godini analizirani su i klimatološki parametri. Prema podacima Državnog hidrometeorološkog zavoda Hrvatske (DHMZ), kategorizacija zasnovana na razdiobi percentila pokazala je da se 2018. godine cijela Hrvatska nalazila u kategoriji ekstremno topla. Srednja godišnja temperatura zraka bila je iznad višegodišnjeg prosjeka (1961.-1990. godine) s odstupanjima u rasponu od 1,4°C do 2,6°C. Analiza godišnjih količina oborina koje su izražene u postotcima (%) višegodišnjeg prosjeka (1961.-1990.) pokazuje da je u 2018. godini u

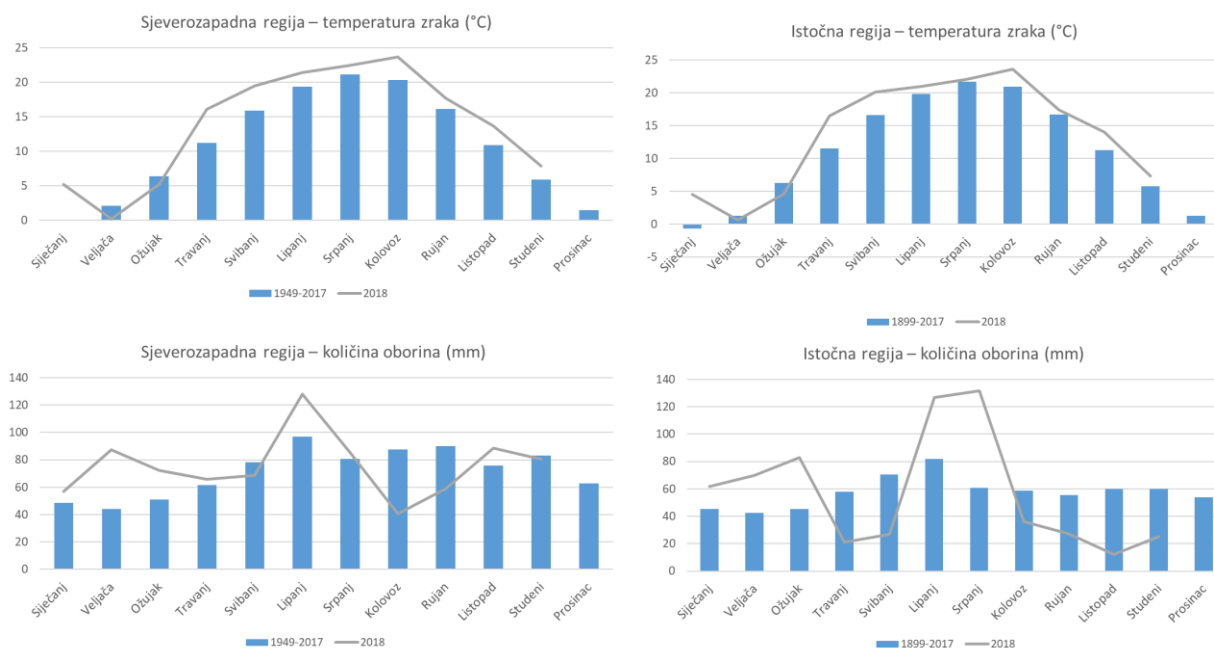
Hrvatskoj na podjednakom broju analiziranih postaja količina oborina bila viša odnosno niža od prosjeka dok je u Osijeku bila jednaka prosjeku. Usporedba s višegodišnjim prosjekom pokazuje da se količine oborina za 2018. godinu nalaze u rasponu od 88% do 126% prosjeka (slika 38) [103].



Slika 38. Srednje temperature zraka i količine oborina u Hrvatskoj u 2018. godini

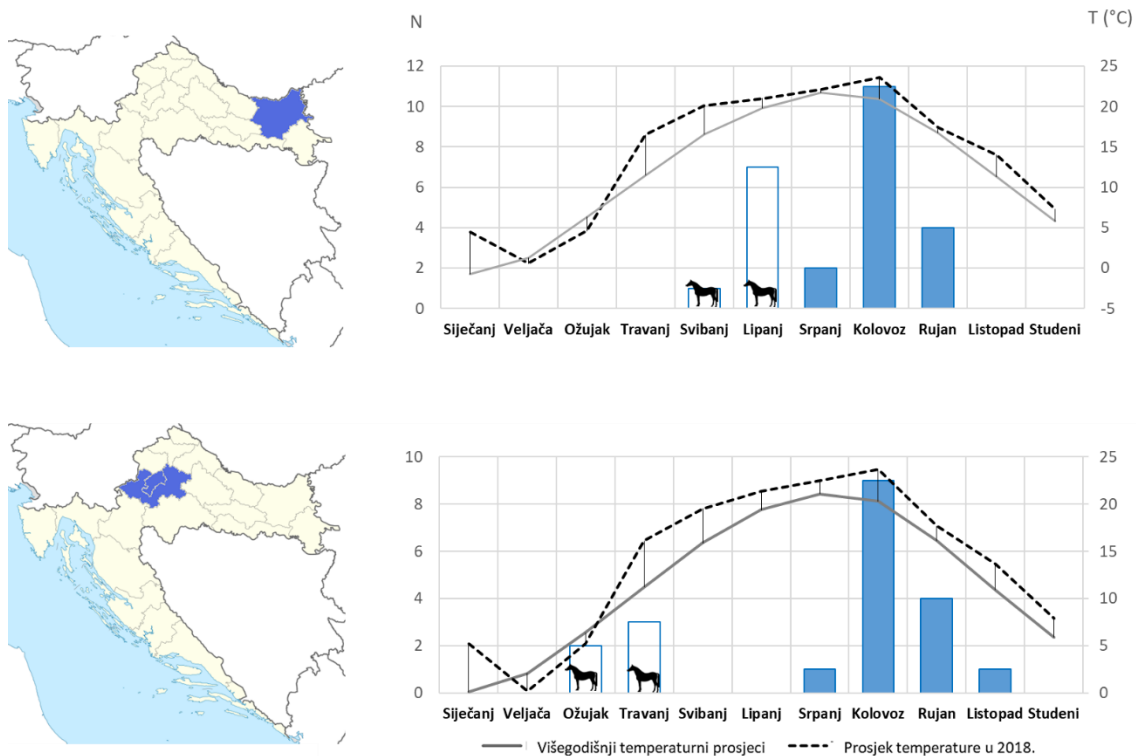
Izvor: Državni hidrometeorološki zavod, dostupno na: <https://meteo.hr/>

U dvije regije s najviše dokazanih WNV infekcija (istočna i sjeverozapadna) analiziran je utjecaj temperature i količine oborina na pojavnost bolesti. Maksimalne apsolutne temperature zraka u travnju i svibnju u obje regije bile su iznad višegodišnjeg prosjeka (1961-2017. godine). Odstupanja su iznosila 4,8-5,2°C u travnju te 3,5-4,1°C u svibnju. Prema raspodjeli percentila, toplinske prilike su u obje regije bile ekstremno tople (>99 percentila). U ljeto i jesen, apsolutne maksimalne temperature zraka su također bile više od prosjeka (0,7-3,3°C) u istočnim te 2,2-4,4°C u sjeverozapadnim regijama. U listopadu kada je zabilježen zadnji slučaj infekcije, toplinske prilike su također bile ekstremno tople (>99 percentila) na području Zagreba i okolice te vrlo tople (92-96 percentila) u istočnim područjima (slika 39).



Slika 39. Prosječne vrijednosti apsolutne maksimalne temperature zraka i oborina u dvije analizirane regije

U obje je regije uočena umjerena pozitivna korelacija između prosječne apsolutne temperature zraka i broja WNV infekcija (Pearsonov koeficijent korelacije za istočni dio $r=0,50$; za zapadni dio $r=0,49$) (slika 40).

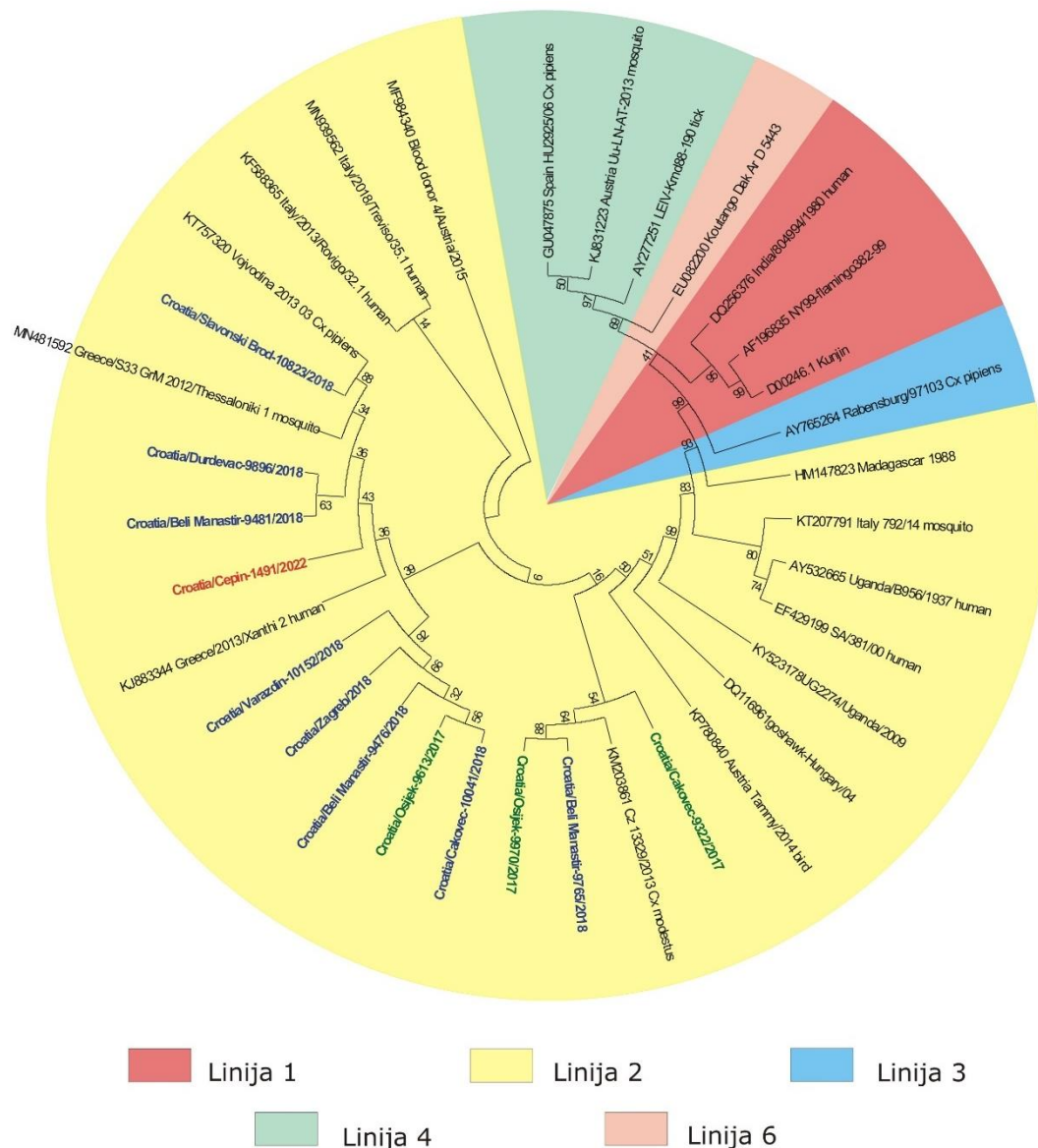


Slika 40. Pojavnost WNV infekcija u županijama s najvećim brojem slučajeva s obzirom na temperaturu, 2018. godine

Također, uočena je niska do umjerena negativna korelacija između broja slučajeva i ukupne mjesečne količine oborina (mm) u obje regije (Pearsonov koeficijent korelacije za istočni dio $r = -0,13$; za zapadni dio $r = -0,56$).

Filogenetsko stablo WNV-a prikazano je na slici 41. Od ukupno 11 sekvenciranih sojeva, tri su bila iz 2017. godine i osam iz 2018. godine.

Filogenetsko stablo je izrađeno na temelju sekvenci od 928 nukleotida gena NS5 WNV. Za odabir sekvenci korišteno je po 100 sekvenci WNV dobivenih analizom BLAST u genskoj banci (GenBank) za svaki detektirani soj WNV iz Hrvatske. Od 100 dobivenih sekvenci za svaki virus, izbačene su identične sekvence s tim da se uzimalo u obzir geografsko podrijetlo izbačenih sekvenci, odnosno onih koje su u konačnici korištene za izradu stabla. Linije su razvrstane prema Rizzoli i *sur.* [38]. Sekvence su poredane pomoću ClustalW i analizirane uporabom MEGA 11 [102], dok je filogenetsko stablo oblikovano uporabom metode Neighbor-Joining (udruživanje susjeda), primjenom evolucijskog modela (Kimura 2-parametra) uz 1000 replikacija. Svi su dokazani sojevi pripadali WNV liniji 2.



Slika 41. Filogenetsko stablo West Nile virusa: sojevi WNV na području Hrvatske označeni su zelenom (2017.) i plavom bojom (2018.)

5.3. Usutu virus

Neuroinvazivna USUV infekcija dokazana je u tri bolesnika tijekom velike epidemije WNV-a 2018. godine. U dvoje bolesnika (24 i 60 godina) infekcija se očitovala meningitisom, dok je u 83-godišnje bolesnice dokazan meningoencefalitis. Dvoje se bolesnika oporavilo u potpunosti, dok je u jednog bolesnika s predliježećom zloćudnom bolesti nastupio smrtni ishod 21. dan nakon početka bolesti (tablica 15).

Tablica 15. Epidemiološke, kliničke značajke i laboratorijski nalazi bolesnika s neuroinvazivnom Usutu infekcijom

Značajka	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Bolesnik 3
Demografske i epidemiološke značajke			
Dob	24 godine	83 godine	60 godina
Spol	Muški	Ženski	Muški
Mjesto stanovanja	Samobor	Čaglin	Našice
Vrijeme početka bolesti	Početak srpnja, 2018.	Kraj kolovoza, 2018.	Sredina rujna, 2018.
Kliničke značajke			
Klinička slika	Meningitis	Meningoencefalitis	Meningitis
Klinički simptomi	Vrućica (do 38°C), glavobolja, vrtoglavica, klonulost, mijalgija, povraćanje	Vrućica (do 38°C), glavobolja, klonulost, mijalgija, mučnina, povraćanje, blaža parapareza	Vrućica (> 39°C), glavobolja, vrtoglavica, klonulost, mijalgija, povraćanje
Predliježeće bolesti	-	Hipertenzija	Kronična limfocitna leukemija, dijabetes
Trajanje simptoma	11 dana	10 dana	21 dan
Ishod	Oporavak	Oporavak	Smrtni ishod

Tablica 16. Laboratorijski nalazi bolesnika s neuroinvazivnom Usutu infekcijom

Parametar	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Bolesnik 3	Referentni raspon
Serum				
L (x10 ⁹ /L)	14,9	10,5	4,9	3,4 – 9,7
SE (mm/h)	34	91	18	< 12
CRP (mg/L)	98	1	67,1	< 5
CSL				
Broj stanica (mm ³)	170	-	172	< 5
PMN (%)	5	-	22	0
MN (%)	95	-	78	100
Proteini (g/L)	0,35	-	0,41	0,17 – 0,37
Glukoza (mmol/L)	3,2	-	5,26	2,5 – 3,3

L=leukociti; CRP=C-reaktivni protein; SE=sedimentacija eritrocita; PMN=polimorfonukleari; MN=mononukleari

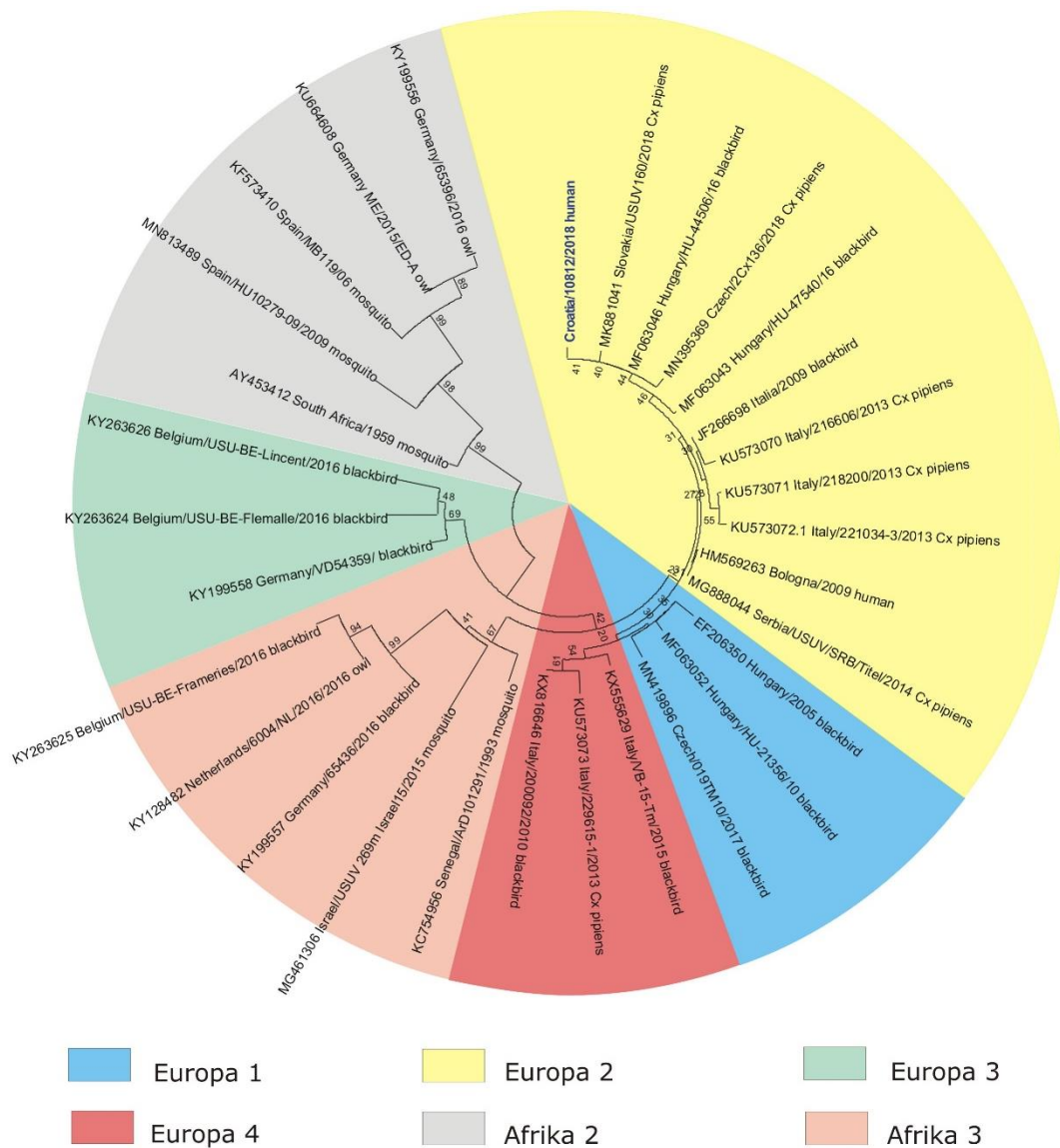
Neuroinvazivne USUV infekcije dokazane su na području Zagrebačke, Osječko-baranjske i Požeško-slavonske županije, a jedna seropozitivna osoba na području Krapinsko-zagorske županije (slika 42).



Slika 42. Geografska rasprostranjenost Usutu virusa
(puni krugovi=akutne infekcije, prazni krugovi=IgG seropozitivne osobe)

Sekvenciranje je učinjeno za jedan soj virusa dokazan u urinu bolesnika s fatalnom USUV infekcijom.

Filogenetsko stablo je izrađeno na temelju sekvenci od 543 nukleotida NS5 gena USUV-a. Za odabir sekvenci korišteno je po 100 sekvenci USUV dobivenih analizom BLAST u genskoj banci (GenBank) za svaki detektirani soj USUV iz Hrvatske. Od 100 dobivenih sekvenci za svaki virus, izbačene su identične sekvence s tim da se uzimalo u obzir geografsko podrijetlo izbačenih sekvenci, odnosno onih koje su u konačnici korištene za izradu stabla. Linije su razvrstane prema Cadar i *sur.* [66]. Sekvence su poredane pomoću ClustalW i analizirane uporabom MEGA 11 [102], dok je filogenetsko stablo oblikovano uporabom metode Neighbor-Joining (udruživanje susjeda), primjenom evolucijskog modela (Kimura 2-parametra) uz 1000 replikacija. Dokazani soj je pripadao europskoj liniji 2 (slika 43).



Slika 43. Filogenetsko stablo Usutu virusa (soj iz Hrvatske, 2018. označen je plavom bojom)

5.4. Toscana virus

Tijekom 2019. godine zabilježena je jedna TOSV infekcija, a tijekom 2020. godine kod dva bolesnika zabilježene su infekcije ovim virusom. U svih je infekcija potvrđena visokim titrom IgM i IgG protutijela na TOSV. Kod dvoje bolesnika se infekcija očitovala slikom meningitisa, a kod jednog meningoencefalitisa. Najčešći opisani klinički simptomi kod sva tri bolesnika bili su vrućica, glavobolja, mučnina i malaksalost. Svi oboljeli su se potpuno oporavili (tablica 17). Laboratorijski nalazi prikazani su u tablici 18.

Tablica 17. Epidemiološke i kliničke značajke bolesnika s neuroinvazivnom Toscana infekcijom

Značajke	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Bolesnik 3
Demografske i epidemiološke značajke			
Dob	21 godina	22 godine	54 godine
Spol	Muški	Ženski	Muški
Mjesto stanovanja	Hrvatsko primorje (Stobreč)	Kontinentalna Hrvatska (boravila na Hvaru u srpnju 2019.)	Hrvatsko primorje (boravio na Rabu, Šolti i Pelješcu)
Vrijeme početka bolesti	Kraj kolovoza, 2019.	Kraj kolovoza, 2020.	Sredina listopada, 2020.
Kliničke značajke			
Klinička slika	Meningitis	Meningoencefalitis	Meningitis
Klinički simptomi	Vrućica (do 38°C), glavobolja, mučnina, povraćanje, fotofobija, malaksalost	Vrućica (do 38°C), glavobolja, mučnina, povraćanje, fotofobija, vrtoglavica, malaksalost, artralgija, osip, desnostrani brahijalni pleksitis	Glavobolja, mučnina, povraćanje, malaksalost
Trajanje simptoma	5 dana	20 dana	5 dana
Ishod	Oporavak	Oporavak	Oporavak

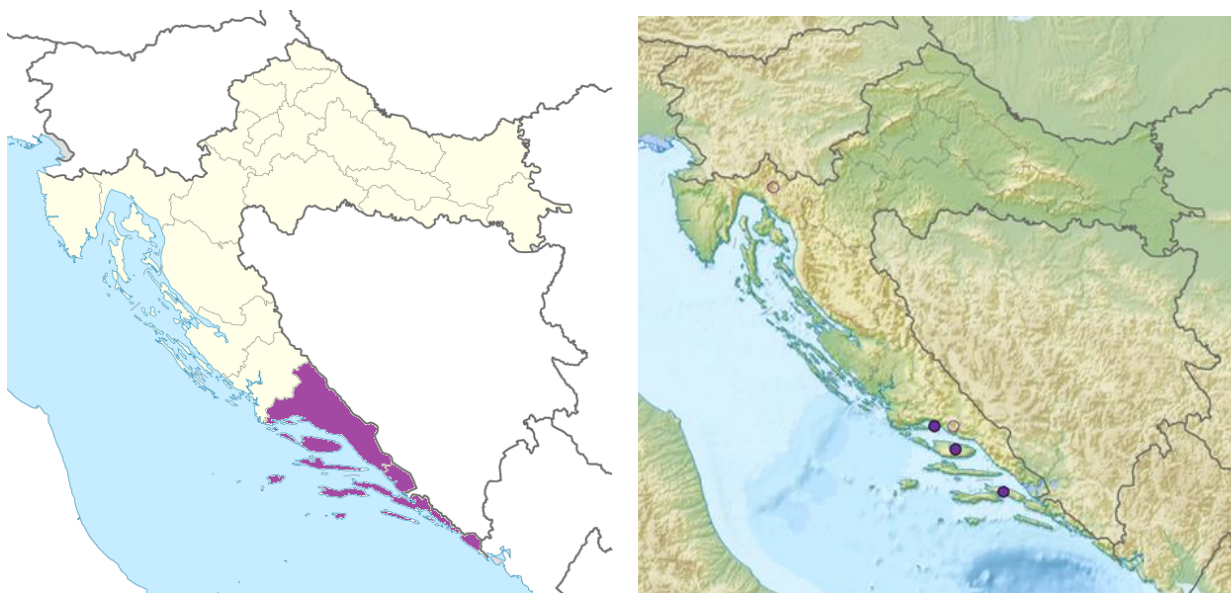
Tablica 18. Laboratorijski nalazi bolesnika s neuroinvazivnom Toscana infekcijom

Parametar	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Bolesnik 3	Referentni raspon
Serum				
L ($\times 10^9/L$)	5,8	5,3	9,0	3,4 – 9,7
SE (mm/h)	4	10	10	< 5
CRP (mg/L)	3,5	110,2	5,7	< 12
CSL				
Broj stanica (mm^3)	175	218	123	< 5
PMN (%)	10	8	14	0
MN (%)	90	92	86	100
Proteini (g/L)	0,447	0,993	1,060	0.17 – 0.37
Glukoza (mmol/L)	3,78	3,0	3,2	2.5 – 3.3

L=leukociti; CRP=C-reaktivni protein; SE=sedimentacija eritrocita; PMN=polimorfonukleari; MN=mononukleari

Svi su se bolesnici zarazili na području priobalja (Splitsko-dalmatinska i Dubrovačko-neretvanska županija (slika 44).

2019/2020.



Slika 44. Geografska rasprostranjenost Toscana virusa
(puni krugovi=akutne infekcije, prazni krugovi=IgG seropozitivne osobe)

5.5. Tahyna orthobunyavirus

Od 194 testirana bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom u kojih nije dokazana etiologija, TAHV NT protutijela su dokazana u njih 20 (10,3%; 95%CI=6,4-15,5). TAHV RNK nije dokazana niti u jednom uzorku CSL-a i urina.

Sporadični slučajevi nedavne neuroinvazivne TAHV infekcije (NT protutijela u serumu i CSL-u) su zabilježeni tijekom 2019. godine kod muškarca u dobi od 75 godina te tijekom 2020. godine kod žene u dobi od 59 godina. Kod oboje u kliničkoj slici je opisan meningitis, a od kliničkih simptoma prevladavali su vrućica, glavobolja i malaksalost. Bolesnici su se u potpunosti oporavili (tablice 19-21).

Tablica 19. Epidemiološke i kliničke značajke bolesnika s neuroinvazivnom Tahyna infekcijom

Značajka	Bolesnik 1	Bolesnik 2
Demografske i epidemiološke značajke		
Mjesto boravišta	Koprivnica	Ludbreg
Dob	75 godina	59 godina
Spol	Muški	Ženski
Početak bolesti	Sredina lipnja, 2019.	Kraj listopada, 2020.
Kliničke značajke		
Klinička slika	Meningitis	Meningitis
Klinički simptomi	Vrućica, glavobolja, malaksalost	Vrućica, glavobolja, malaksalost, mučnina, fotofobija
Predliježeće bolesti	-	Hipertenzija
Trajanje bolesti	9 dana	4 dana
Ishod	Oporavak	Oporavak

Tablica 20. Laboratorijski nalazi bolesnika s neuroinvazivnom Tahyna infekcijom

Parametar	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Referentni raspon
Serum			
L ($\times 10^9/L$)	13,3	5,8	3,4 – 9,7
SE (mm/h)	28	18	< 12
CRP (mg/L)	7,3	1,0	< 5
CSL			
Broj stanica (mm^3)	218	412	< 5
PMN (%)	70	22	0
MN (%)	70	78	100
Proteini (g/L)	1,30	0,70	0,17 – 0,37
Glukoza (mmol/L)	2,2	3,1	2,5 – 3,3

L=leukociti; SE=sedimentacija eritrocita; CRP=C-reaktivni protein; PMN=polimorfonukleari; MN=mononukleari

Tablica 21. Rezultati viroloških pretraga bolesnika s neuroinvazivnom Tahyna infekcijom

Pretraga	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Referentni raspon
RT-PCR (CSL)	Negativan	Negativan	
RT-PCR (Urin)	Negativan	Negativan	
VNT (Serum)	640	320	≥ 10 pozitivan
VNT (CSL)	10	5	≥ 5 pozitivan

Osamnaest bolesnika imalo je dokazana NT protutijela samo u serumu (ranija TAHV infekcija). Medijan dobi seropozitivnih bolesnika je iznosio 67 (IQR=63-71) godina. Prevalencija TAHV NT protutijela se značajno razlikovala s obzirom na dob bolesnika. Uočen je progresivni porast seroprevalencije od 2,0% u bolesnika mlađih od 30 godina do 27,8% u bolesnika starijih od 70 godina ($p < 0,001$). Seropozitivitet se nije razlikovao s obzirom na spol te područje prebivališta (gradsko, prigradsko/seosko). Nadalje, nije nađena značajna razlika u seroprevalenciji kod bolesnika u kojih se bolest očitovala meningitisom (9,1%), meningoencefalitisom (12,0%) ili febrilnom glavoboljom (16,9%) (tablica 22).

Tablica 22. Učestalost detekcije NT protutijela na Tahyna orthobunyavirus u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom s obzirom na sociodemografske, epidemiološke i kliničke značajke (N=194)

Značajka	Testirani N (%)	TAHV NT protutijela N (%)	95%CI	p
Spol				0,896
Muški	127 (65,4)	15 (11,8)	6,8-18,7	
Ženski	67 (34,5)	5 (7,5)	2,5-16,6	
Dobna skupina				<0,001*
<30 godina	51 (26,3)	1 (2,0)	0,05-10,4	
30-49 godina	42 (21,6)	2 (4,8)	5,8-16,2	
50-69 godina	65 (33,5)	7 (10,8)	4,4-20,9	
≥70 godina	36 (18,6)	10 (27,8)	14,2-45,2	
Područje prebivališta				0,976
Gradsko	117 (60,4)	12 (10,3)	5,4-17,2	
Prigradsko/seosko	77 (39,6)	8 (10,4)	4,6-19,5	
Klinička prezentacija				0,640
Febrilna glavobolja	12 (6,2)	2 (16,9)	2,1-48,4	
Meningitis	132 (68,1)	12 (9,1)	4,8-15,3	
Meningoencefalitis	50 (25,7)	6 (12,0)	4,5-24,3	

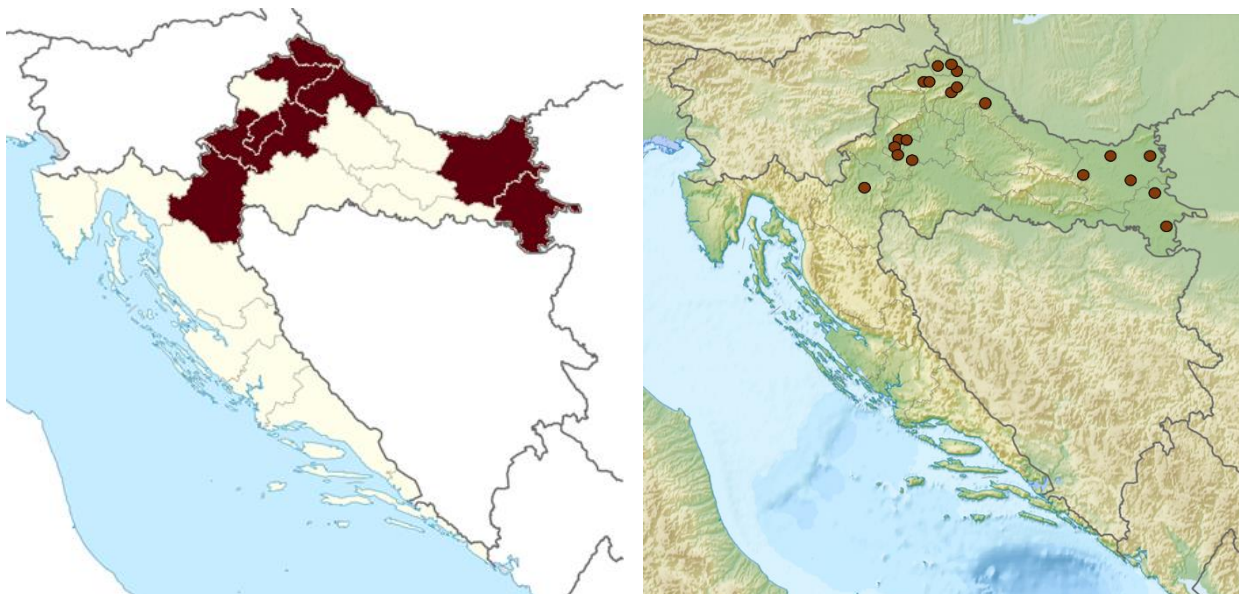
Rezultati logističke regresije pokazali su da je starija životna dob rizični čimbenik za TAHV infekciju (tablica 23). Bolesnici stariji od 70 godina imali su značajno viši rizik za seropozitivnost u odnosu na bolesnike mlađe od 30 godina (OR=19,230; 95%CI=2,332-158,544). Spol i mjesto prebivališta nisu bili značajno povezani sa seroprevalencijom na TAHV. Isto tako, nije nađena povezanost između seropozitivnosti i kliničke prezentacije bolesti.

Tablica 23. Analiza rizika za seropozitivitet na Tahyna orthobunyavirus

Značajka	OR	95%CI OR	p
Muški (Ref.) naspram ženski spol	1,660	0,576-4,786	0,347
Dob			
<30 godina	Ref.		
30-49 godina	2,500	0,218-28,575	0,461
50-69 godina	6,034	0,717-50,738	0,098
≥70 godina	19,230	2,332-158,544	0,006*
Gradsko (Ref.) naspram prigradsko/seosko prebivalište	0,900	0,350-2,311	0,826
Klinička prezentacija			
Febrilna glavobolja	Ref.		
Meningitis	2,000	0,391-10,208	0,404
Meningoencefalitis	1,466	0,257-8,368	0,666

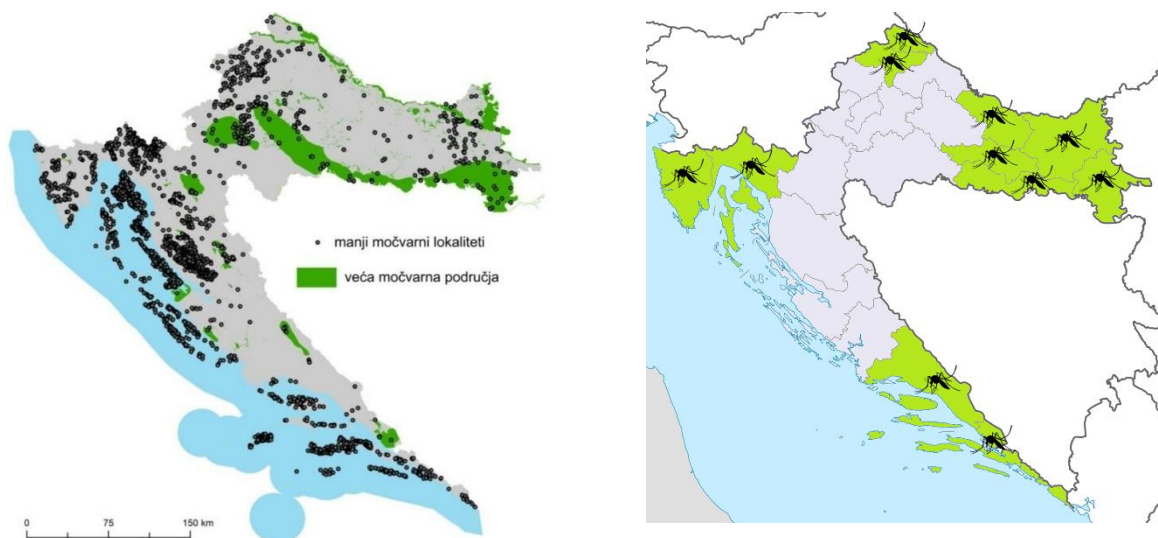
OR=omjer rizika; CI=interval pouzdanosti

TAHV seropozitivne osobe bile su s područja osam kontinentalnih hrvatskih županija. Većina oboljelih (90,5%) su bili stanovnici poplavnih nizina uz rijeku Dravu, Bednju i Muru, Dravu i Dunav, Savu te Dobru (slika 45 i 46). Prosječna nadmorska visina prebivališta seropozitivnih osoba iznosila je 128 metara (raspon 12-323).



Slika 45. Geografska rasprostranjenost Tahyna virusa

U županijama gdje su dokazane seropozitivne osobe, široko je rasprostranjena vrsta *Ae. vexans*, koji je glavni vektor TAHV (slika 46).



Slika 46. Močvarna područja u Hrvatskoj prema inventarizaciji močvarnih staništa 2003. godine (lijevo). U Hrvatskoj je projektom inventarizacije močvarnih staništa identificirano i kartirano oko 3,800 močvarnih područja, od kojih je 11 velikih močvarnih kompleksa u ukupnoj površini od 800,000 hektara; rasprostranjenost *Ae. vexans* u Hrvatskoj (desno).

Izvor: Zavod za zaštitu okoliša i prirode Republike Hrvatske

5.6. Bhanja bandavirus

Tijekom ispitivanog razdoblja, BHAV RNK nije dokazana niti u jednom uzorku CSL-a i urina, no NT protutijela su dokazana u serumu 40 (20,6%, 95%CI=15,1-27,0) bolesnika. Nedavna BHAV infekcija dokazana je serološki u dva bolesnika: 72-godišnjeg bolesnika (NT protutijela u CSL-u) te 60-godišnjeg bolesnika (NT protutijela u serumu i CSL-u). Oba su bolesnika bila iz ruralnih područja sjeverozapadne Hrvatske.

Klinički i laboratorijski nalazi te rezultati viroloških pretraga kod bolesnika s dokazanom BHAV infekcijom prikazani su u tablicama 24-26.

Tablica 24. Epidemiološke i kliničke značajke bolesnika s neuroinvazivnom Bhanja infekcijom

Značajka	Bolesnik 1	Bolesnik 2
Demografske i epidemiološke značajke		
Mjesto boravišta	Ruralno (Gojanec), blizina rijeke Plitvice	Ruralno (Donji Hrašćan), blizina rijeke Mure
Zemljopisne koordinate	46°17'10"N 16°18'10"E	46°24'43"N 16°37'30"E
Nadmorska visina	177 m	146 m
Dob	72 godina	60 godina
Spol	Muški	Muški
Početak bolesti	Studen, 2018.	Početak lipnja, 2019.
Rizični čimbenici	Nema podataka	Ugriz krpelja na glavi tijekom ribolova 14 dana prije početka simptoma
Klinička slika	Meningoencefalitis	Febrilna glavobolja
Klinički simptomi	Povišena temperatura, poremećaj stanja svijesti	Febrilna glavobolja Povišena temperatura (do 38°C), glavobolja, malaksalost
Predliježeće bolesti	Alkoholizam	-
Ishod	Poboljšanje	Oporavak

Tablica 25. Laboratorijski nalazi bolesnika s neuroinvazivnom Bhanja infekcijom

Parametar	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Referentni raspon
Serum			
L ($\times 10^9/L$)	12,3	11,1	3,4 – 9,7
CRP (mg/L)	22,8	22,6	< 5
CSL			
Broj stanica (mm^3)	144	4	< 5
PMN (%)	15	-	0
MN (%)	85	-	100
Proteini (g/L)	0,400	0,520	0,17 – 0,37
Glukoza (mmol/L)	3,4	3,0	2,5 – 3,3

L=leukociti; CRP=C-reaktivni protein; PMN=polimorfonukleari; MN=mononukleari

Tablica 26. Rezultati viroloških pretraga bolesnika s neuroinvazivnom Bhanja infekcijom

Pretraga	Bolesnik 1	Bolesnik 2	Referentni raspon
RT-PCR (CSL)	Negativan	Negativan	
RT-PCR (Urin)	Negativan	Negativan	
VNT (Serum)	20	Negativan	≥ 10 pozitivan
VNT (CSL)	20	20	≥ 5 pozitivan

VNT=test neutralizacije virusa

Učestalost detekcije BHAV NT protutijela s obzirom na sociodemografske, epidemiološke i kliničke značajke prikazana je u tablici 27. Seroprevalencija se nije značajno razlikovala s obzirom na dob te je bila visoka u svim dobnim skupinama (19,6-22,2%). Isto tako, seroprevalencija se nije razlikovala s obzirom na spol, područje prebivališta, geografsku regiju te kliničku prezentaciju bolesti.

Tablica 27 . Učestalost detekcije NT protutijela na Bhanja bandavirus u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom s obzirom na sociodemografske, epidemiološke i kliničke značajke (N=194)

Značajka	Testirani N (%)	BHAV NT protutijela N (%)	95%CI	p
Spol				0,414
Muški	127 (65,4)	24 (18,9)	12,5-26,8	
Ženski	67 (34,5)	16 (23,8)	6,3-23,9	
Dobna skupina				0,989
<30 godina	51 (26,3)	10 (19,6)	9,8-36,8	
30-49 godina	42 (21,6)	9 (21,4)	10,3-25,6	
50-69 godina	65 (33,5)	13 (20,0)	11,1-31,7	
≥70 godina	36 (18,6)	8 (22,2)	10,1-39,1	
Područje prebivališta				0,257
Gradsko	117 (60,4)	21 (17,9)	11,5-26,1	
Prigradsko/seosko	77 (39,6)	19 (24,7)	15,5-35,8	
Geografska regija				0,158
Kontinentalna - sjeverozapad	126 (64,9)	31 (24,6)	17,4-33,1	
Kontinentalna - istok	57 (29,4)	7 (12,3)	5,1-23,7	
Primorska	11 (5,7)	2 (18,2)	2,3-51,7	
Klinička prezentacija				0,387
Febrilna glavobolja	12 (6,2)	3 (25,0)	5,5-57,2	
Meningitis	132 (68,1)	21 (15,9)	10,1-23,2	
Meningoencefalitis	50 (25,7)	16 (32,0)	19,5-46,7	

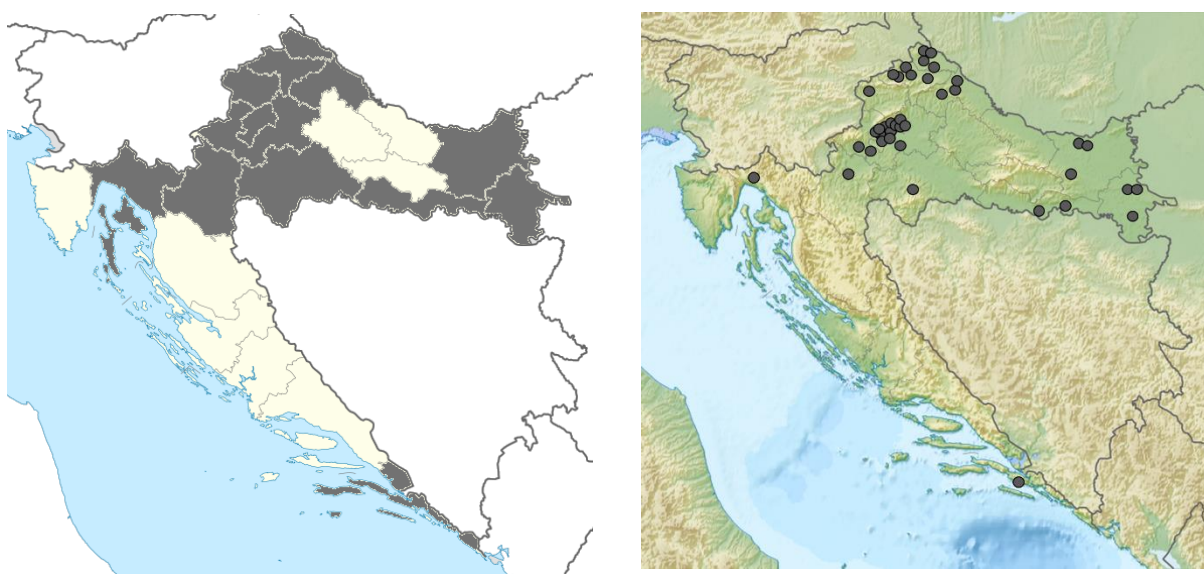
Rezultati logističke regresije nisu dokazali povezanost seroprevalencije na BHAV s dobi, spolom, mjestom prebivališta, geografskom regijom te kliničkom prezentacijom bolesti (tablica 28).

Tablica 28. Analiza rizika za seropozitivitet na Bhanja bandavirus

Značajka	OR	95%CI OR	p
Muški (Ref.) naspram ženski spol	0,742	0,362-1,519	0,415
Dob			
<30 godina	Ref.		
30-49 godina	1,118	0,407-3,071	0,828
50-69 godina	1,025	0,408-2,572	0,958
≥70 godina	1,171	0,411-3,336	0,925
Gradsko (Ref.) naspram prigradsko/seosko prebivalište	0,667	0,331-1,346	0,258
Geografska regija			
Kontinentalna - sjeverozapad	Ref.		
Kontinentalna - istok	0,429	0,176-1,043	0,062
Primorska	0,557	0,117-2,652	0,462
Klinička prezentacija			
Febrilna glavobolja	Ref.		
Meningitis	0,384	0,093-1,580	0,185
Meningoencefalitis	1,272	0,519-1,434	0,125

OR=omjer rizika; CI=interval pouzdanosti

BHAV seropozitivne osobe bile su s područja 11 kontinentalnih i dvije primorske županije (slika 47). Prosječna nadmorska visina prebivališta seropozitivnih osoba iznosila je 158 (raspon 12-400) metara.



Slika 47. Geografska rasprostranjenost Bhanja bandavirusa

6. RASPRAVA

Tijekom četverogodišnjeg razdoblja (2017-2020. godine) obuhvaćenog ovim istraživanjem, neuroin vazivna arbovirusna infekcija je potvrđena u 118 bolesnika. Najučestalije su bile infekcije uzrokovane WNV i KMEV uz sporadične slučajeve USUV, TOSV, TAHV i BHAV infekcija.

KME je dokazan kod 46 bolesnika s rasponom od 7 do 18 zabilježenih slučajeva godišnje. Potvrđena je aktivna cirkulacija KMEV u ranije dokazanim prirodnim žarištima kontinentalne Hrvatske (Koprivničko-križevačka, Varaždinska, Međimurska županija), a 2019. godine je opisano novo prirodno mikro-žarište u Gorskom kotaru. U pet od ukupno šest oboljelih u toj epidemiji izvor infekcije bilo je nepasterizirano kozje mlijeko s iste farme. Iako virus nije dokazan u mlijeku testiranih koza, serološkim testiranjem koza dokazana su NT protutijela na KMEV u njih 23%, što je više nego u ranijim istraživanjima (1,0-3,9%, neobjavljeni podaci Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu). Premda u starijih koza pozitivna IgG protutijela mogu biti rezultat ranije izloženosti virusu, a u mladih koza mogu biti rezultat imuniteta stečenog putem kolostruma, visoki titar NT protutijela ukazivao je na nedavnu infekciju [104]. U 2015. godini također je opisana manja epidemija KME u okolini Bjelovara povezana s konzumacijom sirovog kozjeg mlijeka [29], a ovaj se put prijenosa posljednjih godina sve češće bilježi i u drugim europskim zemljama (Slovačka, Češka, Poljska) [105]. Stoga su alimentarne infekcije prepoznate kao jedan od značajnih rizičnih čimbenika koji doprinose ukupnom porastu incidencije KME u Europi.

Iako rjeđe, KME je tijekom ispitivanog razdoblja dokazan i u istočnim županijama (Osječko-baranjska, Brodsko-posavska i Vukovarsko-srijemska). Na širenje KME u nekim endemskim područjima kao npr. Međimurskoj županiji ukazala su i ranija seroepidemiološka istraživanja. Seroprevalencija koja je iznosila 3% tijekom 1997. godine, porasla je na 16% 2007. godine, što ukazuje na re-emergenciju ove bolesti na području Hrvatske [10].

U Europi je KME endemski prisutan u 27 zemalja, od kojih većina bilježi porast incidencije nakon 2017. godine [106]. Češka, Njemačka i Litva imaju više od 52,9% svih dokazanih slučajeva [107]. U nekim su područjima autohtone infekcije opisane prvi put ili u novim područjima kao npr. u Nizozemskoj 2016. godine [108], Belgiji 2018. i 2020. [109] godine te Velikoj Britaniji 2019. godine [110].

Značajan porast slučajeva KME u zemljama Europske unije/Europskog gospodarskog prostora (EU/EEA) povezuje se s evolucijom virusa, promjenama u vektorima i navikama ljudi. Pretpostavlja se da je porast incidencije tijekom 2020. godine barem dijelom posljedica

pandemije COVID-19 što se povezuje s fizičkim distanciranjem ljudi koji su više boravili u šumi i bavili se vrtlarstvom [107]. U nekim se zemljama Skandinavije povećana incidencija KME povezuje s češćim rekreacijskim aktivnostima u područjima sa zaraženim krpeljima i promjenama klimatskih uvjeta koje utječu na brojnost vektora [111]. Za razliku od spomenutih zemalja, Bugarska kontinuirano ima nisku incidenciju KME sa svega nekoliko prijavljenih slučajeva, kao i Švedska i Danska [112,113]. Uvođenjem nacionalne imunizacijske kampanje 1981. godine, Austrija je postala jedina europska zemlja sa značajnim smanjenjem incidencije ove bolesti. Iste godine Austrija je bilježila oko 600 slučajeva godišnje, dok je 2010. godine detektirano svega 58 slučajeva KME [5].

U ovom je istraživanju muški spol dominirao po zastupljenosti infekcija s ukupno 71,9% u odnosu na 27,1% infekcija kod žena. Učestalija pojava KME u muškaraca uočena je tijekom sve četiri ispitivane sezone prijenosa s rasponom od 60,0% do 77,8%. Medijan dobi oboljelih iznosio je 48 godina (IQR=36-60). Prema rezultatima velikog istraživanja provedenog u 19 zemalja EU/EEA u razdoblju od 2012.-2020. godine kada je prijavljeno 24,974 slučajeva KME-a također je dominirao muški spol (59,5%), a prosječna dob oboljelih bila je 49 godina [107]. Uz češću profesionalnu izloženost muškaraca, kao jedan od mogućih razloga više incidencije KME u odnosu na žene navedeno je rjeđe provođenje zaštitnih mjera od ugriza krpelja [114]. Za razliku od navedenog, u Latviji i Švedskoj je dokazana podjednaka učestalost KME u oba spola [113,115].

U našem su istraživanju infekcije bile najučestalije (43,4% svih oboljelih) u dobnoj skupini od 40-59 godina u usporedbi s po 28,3% u dobnim skupinama 20-39 te >60 godina. Rizični čimbenici kod bolesnika s dokazanom KMEV infekcijom bili su česti ubodi krpelja (50,0%), često posjećivanje šumskih predjela (40,0%) te ruralno područje prebivališta (50,0%). Podaci iz većine europskih država također pokazuju sličnu dobnu raspodjelu tj. najveći broj infekcija u dobnoj skupini od 45-65 godina [106]. U Litvi je međutim uočena podjednaka učestalost infekcija u u dobnim skupinama ≤ 39 (38,5%) i 40-59 (36,3%) te nešto niža u dobnoj skupini >60 godina (25,3%) [116].

Karakteristična je sezonska pojavnost KMEV, vezana uz aktivnost vektora. Na području središnje Europe, maksimalna aktivnost krpelja *I. ricinus* je tijekom travnja i svibnja te ponovno u rujnu i listopadu, a *I. persulcatus* najaktivniji je od kraja travnja do početka lipnja [117]. Analizirajući pojavnost KME u Hrvatskoj, infekcije su zabilježene od travnja do listopada te su uočena dva vrška, veći ljetni (lipanj) i manji jesenski (listopad). Sličnu je sezonsku pojavnost tj. bimodalnu pojavu opisalo i istraživanje u kojem je obuhvaćeno 19 europskih zemalja. Prijenos KME bio je dokazan tijekom cijele godine, a većina bolesnika (98,8%) je razvila

simptome u razdoblju od travnja do studenog. U usporedbi s našim istraživanjem, prvi je vršak zabilježen mjesec dana kasnije (prvi tjedan srpnja), a drugi manji mjesec dana ranije (kraj rujna). Raspodjela slučajeva po mjesecima ipak se nešto razlikovala između sjevernih i južnih regija ovisno o okolišnim uvjetima povoljnim za aktivnost krpelja. Tako je glavni vrh epidemije u sjevernim zemljama uočen nešto kasnije u srpnju i kolovozu u usporedbi sa zemljama srednje i južne Europe u kojima je bio u lipnju i srpnju [107]. Za razliku od navedenog, u nekim zemljama centralne Europe, primjerice Njemačkoj i Poljskoj, većinom je prisutan samo jedan godišnji maksimum pojave KME u ljetnim mjesecima (srpanj-kolovoz) [118]. Isto je tako specifična sezonska raspodjela KME uočena u Litvi u razdoblju od 2005-2014. godine, gdje je porast slučajeva zabilježen od travnja dok je maksimum opažen u listopadu [116].

U kliničkoj slici KME u Hrvatskoj s podjednakom učestalošću opisani su meningitis (45,7%) i meningoencefalitis (47,8%). Slična učestalost meningoencefalitisa opisana je u Srbiji tijekom 2019. godine kada je zabilježen kod 50% bolesnika [119]. Meningitis se općenito češće opisuje u djece i mlađih osoba, dok se encefalitis pojavljuje pretežito kod starijih. U djece i odraslih osoba oboljelih od KME u Latviji u kliničkoj je slici dominirao meningitis (90,6%), dok su teški oblici kao meningoencefalitis i meningoencefalomijelitis dokazani u samo 8,9% bolesnika [115]. U Litvi je uočena veća pojavnost meningoencefalitisa (81%) uz monofazični tijek bolesti [116]. Podaci iz Europe ukazuju na nisku smrtnost kod KME (0,4%) [107], dok u našem istraživanju tijekom ispitivanog razdoblja nije zabilježeno smrtnih slučajeva.

Infekcija uzrokovana KMEV-om može biti asimptomatska ili simptomatska. Najčešći klinički simptomi u bolesnika obuhvaćenih ovim istraživanjem bili su glavobolja (84,7%) i klonulost (71,7%), dok je povišenu tjelesnu temperaturu imalo 45% bolesnika. U susjednoj Sloveniji u kojoj je KME također prisutan endemski su analizirane kliničke značajke oboljelih u kojih po učestalosti simptoma dominira klonulost (98%), a zatim slijede povišena tjelesna temperatura (96%) i glavobolja (85,7%). Učestalost mučnine (45%) i povraćanja (36%) u bolesnika s KME uočena je u sličnom postotku u obje zemlje [120].

KMEV RNK dokazana je u ovom istraživanju u samo jednog bolesnika s teškom kliničkom slikom i parazom ramenog obruča s područja Vukovarsko-srijemske županije. Ovaj nalaz ujedno predstavlja i prvi dokaz KMEV RNK u urinu oboljele osobe na području Hrvatske. Filogenetska analiza potvrdila je da dokazani soj pripada europskom podtipu KMEV. U ranijim je istraživanjima svega nekoliko sojeva KMEV iz vektora i životinja genski karakterizano. Virusna RNK dokazana je u krpeljima uzorkovanim s crvenodlakih lisica (*Vulpes vulpes*) na području Zagrebačke i Varaždinske županije te u slezeni dva jelena (*Cervus elaphus*) s područja Vukovarsko-srijemske i Osječko-baranjske županije. Filogenetskom analizom detektiranih

virusa dokazano je da pripadaju europskom podtipu KMEV i da su genetski srodni, čime je dodatno potvrđena endemska prisutnost bolesti i proširenost KME u kontinentalnoj Hrvatskoj [121].

Prvi serološki dokazi humanih infekcija WNV-om u Hrvatskoj zabilježeni su 1970-ih godina, no klinički slučajevi nisu prijavljeni sve do 2012. godine kad je opisana prva epidemija sa sedam slučajeva WNV neuroinvazivne bolesti na području tri istočne hrvatske županije (Osječko-baranjska, Brodsko-posavska, Vukovarsko-srijemska županija) [122]. Tijekom 2013. godine opisana je ponovno epidemija na području grada Zagreba i Zagrebačke županije (19 oboljelih osoba) [123]. Sporadične infekcije detektirane su u razdoblju od 2014. do 2016. godine. Manja epidemija s osam slučajeva uočena je ponovno u 2017. godini. Godine 2018. je zabilježena do sada najveća epidemija s 54 potvrđena autohtona slučaja neuroinvazivne bolesti i sedam slučajeva WNV groznice u deset kontinentalnih županija Hrvatske. Područja s dokazanim WNV infekcijama bila su ista kao i u razdoblju između 2012. i 2017. godine, dok su humani slučajevi po prvi put prijavljeni u Karlovačkoj, Koprivničko-križevačkoj i Virovitičko-podravskoj županiji. U istim županijama s dokazanim infekcijama u ljudi, dokazane su i akutne asimptomatske infekcije u konja koje su prethodile pojavi humanih slučajeva [20].

Broj humanih slučajeva WNV infekcije na području EU/EEA također je značajno porastao tijekom 2018. godine u usporedbi s prethodnim sezonama, a u nekim su državama kao npr. Sloveniji i Češkoj humane infekcije zabilježene po prvi put [124]. U Europi sezona prijenosa uobičajeno traje od srpnja do listopada, s najvećim brojem oboljelih od sredine kolovoza do sredine rujna. Povećani broj oboljelih tijekom 2018. godine povezuje se s ranim početkom sezone prijenosa [125]. Prve slučajeve WNV-a prijavila je Grčka neuobičajeno rano tj. već krajem svibnja. Isto je tako, prema podacima prijava bolesti u životinja, uočen rani početak sezone prijenosa i kod konja [126]. U usporedbi s ostatkom Europe i Hrvatska je zabilježila vrlo ranu sezonu WNV-a. Prve akutne infekcije u konja (pozitivna IgM protutijela) zabilježene su već u ožujku [20], dok su prvi humani slučajevi potvrđeni u srpnju s vrhuncem epidemije u kolovozu. U odnosu na prethodne sezone, sezona prijenosa bila je duža i trajala je do listopada 2018. godine.

Pretpostavlja se da klimatske promjene utječu na povećanje broja WNV infekcija u Europi posljednjih godina. Nekoliko je studija pokazalo da promjene u okolišnim čimbenicima, kao što su temperatura i količina oborina mogu biti prediktori za prijenos WNV-a. Istraživanje iz sjeverne Italije utvrdilo je povezanost između maksimalnih vrijednosti temperatura zraka u razdoblju od pet do šest tjedana prije pojave bolesti i učestalosti WNV infekcija [127].

Analizom meteoroloških podataka iz 2018. godine, prosječna količina oborina bila je iznad prosjeka u odnosu na razdoblje od 1981.-2010. godine u većem dijelu Europe. Temperature u svibnju u 2018. godini također su bile više od prosjeka u odnosu na razdoblje od 1981.-2010. godine, posebice u područjima gdje je dokazan najveći broj WNV infekcija [126].

U kontinentalnoj Hrvatskoj su tijekom cijele 2018. godine apsolutne vrijednosti temperature zraka bile su 4-5°C iznad višegodišnjih prosjeka, a u razdoblju od travnja do listopada prevladavale su ekstremno visoke temperature zraka [103]. Analizom dviju regija s najvećim brojem infekcija (istočna i sjeverozapadna), utvrđena je umjerena pozitivna korelacija između broja oboljelih i prosječnih vrijednosti mjesečnih temperatura zraka. Isto tako, niska pozitivna korelacija između broja slučajeva i temperature zraka uočena je u istim područjima i u ranijim sezonama (2012.-2017. godine). Više temperature zraka utječu na ubranu replikaciju virusa u komarcima (skraćuje se ekstrinzički inkubacijski period), produžuju njihovu sezonu razmnožavanja i povećavaju prijenos virusa na ptice [126,128]. Nedavno objavljeno istraživanje iz Amerike pokazalo je da je porast srednje tjedne temperature za 5°C povezan s 32-50% višom incidencijom WNV infekcija [129].

Opažanja koja se odnose na povezanost količine oborina i pojavu WNV-a su proturječna. Prema nekim studijama postoji korelacija između količine oborina s pojavom infekcija [127], za razliku od drugih studija prema kojima epidemiji WNV-a prethodi sušno razdoblje [130]. Naše istraživanje pokazalo je slične rezultate odnosno negativnu korelaciju između prosječne mjesečne količine oborina i broja humanih WNV infekcija [20].

Tijekom epidemija 2017. i 2018. godine obuhvaćenih ovim istraživanjem, medijan dobi bolesnika s neuroinvazivnom WNV infekcijom iznosio je 68 godina (IQR 59-76), a većina oboljelih (48/77,4 %) je bila u dobi iznad 60 godina. Omjer muškaraca naspram žena iznosio je 1,2:1. Polovica oboljelih (51,6%) su bili stanovnici ruralnih područja, a 59,7% izjavilo je da su često bili izloženi ubodima komaraca. Starije dobne skupine kao i bolesnici s predliježećim bolestima prepoznate su kao rizične skupine za WNV infekciju u brojnim istraživanjima [131]. Medijan dobi oboljelih u europskim državama je bio sličan kao i kod naših bolesnika i iznosio je 69 (IQR=52-76) godina. Omjer muškaraca je bio veći u odnosu na žene u većini zemalja, prosječno 1,5:1, s rasponom od 1,3 u 2010. i 2012. do 2,7 u 2015. godini [124]. U Grčkoj je primjerice srednja dob bolesnika bila 66 godina, dok je omjer spolova među oboljelima (ženski naspram muški) iznosio 2:1 [126]. Promjene u urođenom i stečenom imunitetu povezane sa starenjem kao što je disregulacija makrofaga, smanjena produkcija interferona od strane dendritičkih stanica i smanjena učinkovitost polimorfonuklearnih leukocita u svladavanju infekcije mogu doprinijeti povećanoj osjetljivosti na WNV infekciju kod starijih osoba [132].

Bolesnici uključeni u ovo istraživanje imali su meningitis (64,5%) ili meningoencefalitis (25,8%) kao najčešće neurološke kliničke manifestacije, no uočeni su i neki vrlo rijetki oblici bolesti. Tijekom epidemije u 2017. godini opisan je fatalni slučaj WNV encefalitisa s akutnim infarktom miokarda uz anteroseptalnu ST elevaciju [133]. Istraživanja provedena u SAD-u pokazala su da su srčane komplikacije jedan od češćih uzroka smrti tijekom WNV infekcije [134]. Retinitis uzrokovan WNV-om opisan je u bolesnika s meningoencefalitisom u 2018. godini [135]. WNV cerebelitis opisan je iste godine u šestogodišnje djevojčice [136]. Cerebelitis kao klinička manifestacija WNV infekcije u literaturi se spominje vrlo rijetko te su do sada opisana svega tri slučaja [137,138], od kojih jedan također u dječjoj dobi u prethodno zdrave 10-godišnje djevojčice [139]. Također je u jedne bolesnice opisan encefalitis s akutnom mlohavom kljenuti kod koje je vodeći nalaz magnetske rezonancije bio arahnoiditis kaude equine [140].

U našem je istraživanju mortalitet iznosio 9,7%, a sve osobe s fatalnim ishodom imale su kliničku sliku meningoencefalomijelitisa. U velikoj studiji na području SAD-a smrtnost kod neuroinvazivnih oblika WNV infekcije je bila 9%, s rasponom od 2% u bolesnika mlađih od 50 godina do 21% u bolesnika starijih od 70 godina [131].

Iako se pasivni nadzor flavivirusa u divljih ptica provodi u Hrvatskoj od 2013. godine, tijekom epidemije 2018. godine prvi put je potvrđena WNV infekcija i u dva uginula jastreba (*Accipiter gentilis*) te serološki u jednog škanjca (*Buteo buteo*) s neurološkim simptomima na području Međimurske županije. Također je dokazana visoka seroprevalencija u peradi u istočnim i sjeverozapadnim županijama [20].

WNV linija 2 koja se u Europi pojavila ranih 2000-ih godina, većinom je dokazana kao uzročnik epidemija ili sporadičnih slučajeva WNV infekcija u istočnoj i centralnoj Europi. WNV linija 1 je posljednjih godina dokazana na području Veneta (Italija, 2021. godine) gdje je učestalost ove linije viša u odnosu na liniju 2 [129].

U ranijim epidemijama u Hrvatskoj genski su karakterizirana svega dva soja dokazana za vrijeme epidemije u Zagrebu 2013. godine. Nukleotidne sekvence dobivenih amplikona bile su 100% identične i pripadale su WNV liniji 2 [141].

Filogenetska analiza ukupno 11 sojeva dokazanih u urinu bolesnika tijekom 2017. i 2018. godine također je pokazala cirkulaciju WNV linije 2. U 2018. godini, tri WNV soja iz sjeverozapadne Hrvatske grupirana su s virusima iz Grčke i Srbije. Dodatna tri soja, jedan iz sjeverne i dva iz istočnih županija grupirani su s virusima iz različitih europskih zemalja. Ovakva genska raznolikost ukazuje na različite putove unosa i cirkulaciju različitih WNV sojeva u Hrvatskoj. Prisutnost WNV linije 2 potvrđena je i u uginulim jastrebovima [20].

Prisutnost USUV-a u Europi potvrđena je retrospektivnim studijama 1996. godine u tkivima uginulih ptica na području Toscanne u Italiji [60]. Potom su uslijedili dokazi u različitim vrsta životinja (ptica, konja, šišmiša) te komaraca u više europskih država (Belgija, Češka, Francuska, Njemačka, Mađarska, Italija, Španjolska i Švicarska) što je ukazivalo na njegovu endemizaciju u Europi [142]. Humani su slučajevi, međutim opisani rijetko te je ova bolest i dalje neprepoznata i zanemarena. Neurotropizam USUV-a u ljudi potvrđen je 2009. godine kada je neuroinvazivna infekcija dokazana u dvoje bolesnika iz Italije, bolesnice s B-staničnim limfomom i bolesnika nakon transplantacije jetre [61,62]. Većina kasnije opisanih humanih infekcija također je bila na području Italije budući da je u toj zemlji USUV uključen u nacionalni program nadzora flavivirusnih infekcija od 2017. godine. Ukupno je na području Europe do sada dokazano tek nešto više od 100 humanih USUV infekcija, uključujući 30 bolesnika s neuroinvazivnim oblikom bolesti. Kao i u slučaju WNV-a, većina bolesnika s infekcijom SŽS-a je imala predliježeće bolesti, no infekcije su dokazane i u prethodno zdravih osoba. Najčešći klinički oblici su bili meningitis i meningoencefalitis [142], a opisane su i neke neuobičajene kliničke prezentacije kao idiopatska pareza facijalisa [67].

Međutim, seroepidemiološke studije ukazuju na proširenost USUV-a u ljudi u mnogim europskim državama uz seroprevalenciju od 0,02-3% među dobrovoljnim davateljima krvi do 7% u izloženim populacijama kao što su npr. šumarski radnici [142].

Prvi serološki dokaz cirkulacije USUV-a u Hrvatskoj opisan je 2011. detekcijom NT protutijela na USUV u dva konja na području sjeverozapadne Hrvatske [77]. Sljedeće godine otkriven je jedan seropozitivan stanovnik Vukovarsko-srijemske županije [51]. Prva tri humana slučaja neuroinvazivne bolesti uzrokovane USUV-om potvrđena su tijekom epidemije WNV-a 2013. godine u Zagrebu i Zagrebačkoj županiji [51, 64].

Ovo je istraživanje potvrdilo neuroinvazivnu USUV infekciju u tri bolesnika tijekom 2018. godine za vrijeme do sada najveće epidemije WNV-a. Oboljele su osobe dokazane tijekom srpnja, kolovoza i rujna u jednoj sjeverozapadnoj te dvije istočne hrvatske županije. Prvi dokaz USUV infekcije u srpnju upućivao je također na raniji početak arbovirusne sezone 2018. godine. Kao i kod WNV-a, rani početak prijenosa USUV infekcija također je uočen i u drugim europskim zemljama. Primjerice, u Austriji je USUV RNK dokazana u 18 darivatelja krvi od kojih je većina bila pozitivna već u lipnju [143].

U ovom je istraživanju USUV RNK dokazana u uzorku urina imunokompromitiranog bolesnika u dobi od 60 godina s kroničnom limfatičkom leukemijom i fatalnim meningoencefalitisom. Sekvencirani soj pripadao je USUV europskoj liniji 2.

U Hrvatskoj je 2018. godine USUV prvi put potvrđen i u moždanom tkivu jednog uginulog kosa (*Turdus merula*) u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. Također, na području sjeverozapadne Hrvatske otkriveni su USUV pozitivni skupni uzorci komaraca tijekom 2016. (*Ae. albopictus*), 2017. (*Cx. pipiens*), 2018. (*Cx. pipiens*) i 2019. godine (*Cx. pipiens*) [20,144]. Sojevi dokazani u prethodnim sezonama u uginulom kosu (Zagrebačka županija, 2018.) te dva skupna uzorka komaraca *Cx. pipiens* (Zagreb, 2018. i 2019. godine) također su pripadali europskoj liniji 2 [53].

Nakon pojave USUV europske linije 2 u Njemačkoj 2014. godine, ova je linija postala dominantna u brojnim europskim zemljama u kojima je uočena i promjena u njezinoj virulenciji. Međutim, u Europi je u ljudi potvrđena i prisutnost USUV europske linije 3 (Njemačka, Austrija), afričke linije 2 (Francuska) i afričke linije 3 (Austrija). U sjevernoj Italiji su dokazane gotovo sve europske linije (1-4) što upućuje na intenzivnu cirkulaciju virusa [53].

Prikazani podatci upućuju na kontinuirano geografsko širenje virusa i endemizaciju USUV-a u kontinentalnoj Hrvatskoj. U hrvatskom primorju do sada nema prijavljenih USUV infekcija.

TOSV je uz enteroviruse i herpesviruse jedan od najčešćih uzročnika aseptičkog meningitisa u nekim zemljama jugozapadne Europe kao npr. Francuskoj i Italiji. No u mnogim je državama ovaj virus često neprepoznat te je malo podataka o humanim klinički manifestnim infekcijama [145]. Neuroinvazivne infekcije dokazane su u stanovnika mediteranskih zemalja i putnika povratnika iz Italije, Španjolske, Portugala, Turske, Grčke i Cipra. Istraživanja seroprevalencije u ljudi provedena u Italiji, Turskoj, Grčkoj i na Korzici zabilježile su kontinuiranu cirkulaciju TOSV-a. Isto tako, istraživanja provedena u stanovnika u sjeverne Afrike (Alžir, Tunis) nakon 2012. godine pokazala su da je postotak TOSV NT protutijela mnogo viši (22%-33%) nego u jugozapadnoj Europi gdje stope seropozitiviteta ne prelaze više od 10% u endemskim područjima [82].

U Hrvatskoj su do sada opisani samo sporadični slučajevi neuroinvazivne TOSV infekcije na području Dalmacije, budući da se ova dijagnostika ne provodi rutinski. Prevalencija neuroinvazivne bolesti uzrokovane TOSV-om stoga je vjerojatno podcijenjena jer su stope seroprevalencije visoke u stanovnika primorskih županija s dokazanim IgG protutijelima u 53,9% stanovnika priobalja i 33,6% stanovnika dalmatinskih otoka te 6,1% stanovnika kontinentalnih područja [85,86].

U ovom istraživanju, neuroinvazivna TOSV infekcija je potvrđena sporadično u tri bolesnika (0,6%) koji su razvili simptome krajem kolovoza i sredinom listopada. Kod svih je dijagnoza potvrđena detekcijom visokog titra TOSV IgM i IgG protutijela, dok je RT-qPCR

bio negativan. Rezultati nedavno objavljene studije pokazali su da se specifični odgovor na protutijela brzo razvija u neuroinvazivnoj bolesti uzrokovanoj TOSV infekcijom. TOSV IgM i IgG protutijela bila su prisutna na početku pojave simptoma u 100% bolesnika [146], čime se može objasniti negativan rezultat RT-qPCR-a u uzorcima seruma i CSL-a kod naših bolesnika.

U istraživanju koje je obuhvatilo više od 1000 bolesnika s TOSV infekcijom iz Francuske, Grčke, Italije, Malte, Portugala, Rumunjske, Španjolske, Turske, uključujući i bolesnike iz Hrvatske iz ranijih godina, medijan dobi je iznosio 45 godina. Infekcije su se pojavljivale u svim dobnim skupinama pa je najmlađi bolesnik imao tri mjeseca, a najstariji 95 godina [147]. Slična je dobna raspodjela neuroinvazivnih TOSV infekcija uočena u endemskim područjima Italije, gdje je 38,5% oboljelih bilo mlađe od 40 godina, 36,3% u dobi od 40 do 59 godina te 25,3% starijih od 60 godina [148]. U našem je istraživanju dvoje bolesnika bilo u ranim dvadesetim, a jedan u ranim pedesetim godinama.

Dva bolesnika u ovom istraživanju imala su meningitis, dok je jedna bolesnica u dobi od 22 godine imala meningoencefalitis i brahijalni pleksitis. Iako je etiologija brahijalnog pleksitisa nepoznata, neki radovi ukazuju na moguću virusnu etiologiju (povezanost s nedavnom virusnom infekcijom ili cijepljenjem). U 25-55% bolesnika nedavna virusna infekcija je prethodila razvoju bolesti [149,150]. Meningitis je kao najčešća manifestacija neuroinvazivne bolesti (84,5%) opisan i u drugim endemskim područjima za TOSV [82].

U usporedbi s drugim arbovirusnim infekcijama kao što su KMEV i WNV, klinička slika meningitisa uzrokovanog TOSV-om većinom je blaža te bez dugotrajnih posljedica. Encefalitis s fatalnim ishodom opažen je uglavnom u starijih osoba [151]. Unatoč potpunom opavku unutar nekoliko tjedana kod većine bolesnika s TOSV infekcijom [21], dugotrajne posljedice (brahijalni pleksitis) uočene kod naše bolesnice ukazuju na mogućnost teže kliničke slike čak i kod mladih osoba.

U Europi se TOSV infekcije pojavljuju od travnja do studenog, s vrhuncem za vrijeme najtoplijih mjeseci (srpanj-rujan) [147]. Naši su bolesnici oboljeli u kasno ljeto i ranu jesen.

U ovom istraživanju TOSV RNK nije dokazana niti u jednog bolesnika, no 2007.-2008. godine kada je opisano pet bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom na području priobalja, filogenetskom je analizom potvrđena cirkulacija genske linije B i C [80,85].

Dokaz TOSV neuroinvazivnih infekcija na području Hrvatske ukazuje na važnost njegovog uključivanja u diferencijalnu dijagnozu aseptičnog meningitisa/meningoencefalitisa tijekom ljetnih mjeseci, posebice na području priobalja.

Iako je TAHV rasprostranjen diljem Europe, broj zabilježenih kliničkih slučajeva kao i stope seroprevalencije su znatno niže u odnosu na stvarnu prevalenciju, vjerojatno zbog nedostatka komercijalnih dijagnostičkih testova što je i razlog da se ova dijagnostika provodi samo u referentnim laboratorijima.

Seroepidemiološke studije provedene u Hrvatskoj 1970-ih godina ukazuju na prisutnost TAHV-a u hrvatskoj populaciji, ali bez opisanih kliničkih slučajeva. Budući da su kod većine oboljelih infekcije asimptomatske ili su prisutni blagi simptomi, pretpostavlja se da je, kao i u drugim zemljama, broj infekcija znatno veći.

U ovom istraživanju TAHV RNK nije dokazana niti u jednog bolesnika, no TAHV NT protutijela dokazana su u uzorcima seruma 10,3% bolesnika što je ukazivalo na raniju izloženost virusu. Nadalje, kod dva seropozitivna bolesnika s meningitisom dokazana je nedavna TAHV infekcija na što je upućivao visok titar NT protutijela u serumu (640 i 320) uz prisutna protutijela i u CSL-u.

Ukupna seroprevalencija od 10,3% kod bolesnika s neuroinvazivnom bolesti dokazana u ovom istraživanju slična je seroprevalenciji u populaciji sjeveroistočne regije Hrvatske (7,9%) opisanoj 1970-ih godina [92], za razliku od stanovnika Hrvatskog primorja koji su pokazali nisku stopu seroprevalencije (0,2%-1,47%) [152]. Slično uočenim razlikama u seropozitivitetu ovisno o geografskoj regiji, u ovom istraživanju svi TAHV seropozitivni ispitanici su bili stanovnici kontinentalnog dijela Hrvatske, posebice županija s dokazanom rasprostranjenosti glavnog vektora TAHV, komarca *Ae. vexans* [153].

Samo je jedna studija provedena 1994. godine u Rusiji analizirala prevalenciju TAHV u bolesnika s encefalitisom te su kod 60% bolesnika dokazana TAHV protutijela [154]. Više je epidemioloških istraživanja provedeno u asimptomatskih osoba (opća populacija) koja su pokazala regionalne razlike u seroprevalenciji. U centralnom i južnom dijelu Europe zabilježene su TAHV infekcije tijekom 1960-ih godina, a najčešće su bile u centralnoj Europi gdje 30,3-61,9% populacije posjeduje protutijela [155]. Tijekom 1970-ih godina provedeno je nekoliko istraživanja seroprevalencije u Češkoj Republici. U južnoj Moravskoj zabilježene su stope seroprevalencije od 17,8 % i 42% [156], u slivu rijeke Odre 20,6% te u regiji Karvina 1,1% . Nadalje, istraživanje iz Slovenije provedeno 1995. godine kod šumskih radnika pokazalo je ukupnu seroprevalenciju od 1% [157].

Simptomatske osobe također su testirane na prisutnost TAHV protutijela u nekoliko istraživanja. Tijekom 2007. godine u kineskoj studiji (pokrajina Xinjiang) testirani su bolesnici s vrućicom kod kojih su dokazana TAHV IgG protutijela u 13% bolesnika metodom IFA, a kod 5,3% bolesnika su dokazana IgM i IgG protutijela (nedavna TAHV infekcija) [158].

Rezultati našeg istraživanja pokazali su značajne razlike u učestalosti detekcije TAHV protutijela ovisno o dobi. Uočen je progresivni porast seroprevalencije s 2% u dobnoj skupini mlađih od 30 godina do 27,8% u skupini starijih od 70 godina. Porast TAHV seroprevalencije s dobi opažen je i u endemskim područjima Češke Republike, što je rezultat duže izloženosti virusu tijekom života [90].

Većina seropozitivnih osoba (90,9%) u ovom radu su stanovnici poplavnih područja kontinentalne Hrvatske s prosječnom nadmorskom visinom mjesta stanovanja od 128 metara. U Alpama su TAHV infekcije zabilježene na nadmorskoj visini od 335 do 1221 metara [17], dok su u Kini dokazane i na višim nadmorskim visinama [159].

Muškarci su u ovom radu bili češće seropozitivni (11,8%) od žena (7,5%), no ta razlika nije statistički značajna. U odnosu na naše rezultate, povezanost spola i seroprevalencije nije pronađena niti u Češkoj Republici [90]. Nasuprot tome, u provincijama Narodne Demokratske Republike Laos opažene su razlike u seroprevalenciji između muškaraca i žena. Više stope seropozitiviteta dokazane su u muškaraca u provinciji Champasak tijekom 2013. godine (67,44% naspram 24,75%) te u glavnom gradu Vientiane tijekom 2016. godine (30,68% naspram 23,99%). U žena su više stope seropozitiviteta pronađene u provinciji Vientiane tijekom 2015. godine (22,95% u odnosu na 14,1%) [160].

U našem su istraživanju TAHV seropozitivni bolesnici većinom bili iz sjeverozapadnih i istočnih dijelova Hrvatske (90,9% svih seropozitivnih osoba). Geografska distribucija TAHV seropozitivnih bolesnika preklapa se s područjima gdje su zabilježene akutne infekcije uzrokovane drugim neuroinvazivnim arbovirusima poput WNV, KMEV i USUV u istom vremenskom razdoblju u Hrvatskoj [78,161].

Jedno od ograničenja ovog istraživanja kod analize rezultata VNT-a je način uzorkovanja. Kod većine bolesnika u ovom radu dostupni su bili samo jedan uzorak seruma i CSL-a. Obzirom da VNT mjeri ukupne TAHV imunoglobuline, a ne pojedine klase imunoglobulina, potrebni su parni uzorci seruma da bi se dokazala dinamika titra protutijela i potvrdila akutna infekcija. Stoga u bolesnika s visokom titrovima NT protutijela (320 i 640) nije bilo moguće sa sigurnošću isključiti i nedavnu TAHV infekciju.

Prisutnost TAHV na području Hrvatske nedvojbeno je potvrđena rezultatima ovog istraživanja. Na to isto tako ukazuju rezultati nedavno objavljenog istraživanja koje je pokazalo seroprevalenciju na TAHV od 3,7% u asimptomatskih osoba s područja Zagreba i okolice, a NT protutijela nađena su i u 29,6% konja te 11,7% kućnih ljubimaca [162]. Obzirom na dokazane TAHV infekcije, potrebna su daljnja istraživanja na velikom uzorku asimptomatskih

i simptomatskih osoba iz različitih geografskih područja kako bi se odredila točna seroprevalencija i klinički značaj ove zanemarene arbovirusne infekcije u hrvatskoj populaciji.

Nakon prve izolacije BHAV iz krpelja na otoku Braču 1974. godine, opisana je i prva laboratorijska infekcija. Godinu dana kasnije je BHAV dokazan u bolesnice s meningoencefalitisom i spastičkom kvadriparezom koja je tri tjedna prije pojave simptoma boravila u sjevernom dijelu Hrvatske gdje je također potvrđena prisutnost krpelja *H. punctata* [163]. Još su dvije laboratorijske infekcije potvrđene dvije godine kasnije [164]. Seroepidemiološka istraživanja provedena 1970-ih godina na hrvatskim otocima pokazala su NT protutijela u 31,5% (11,6-61,3%) stanovnika otoka Brača, 2,2% stanovnika zadarskih otoka i 1% stanovnika otoka Hvara, dok na otoku Mljetu nije nađeno seropozitivnih osoba. Osim u Dalmaciji, 7,1% seropozitivnih osoba otkriveno je i među stanovnicima sjeverne Hrvatske [163].

U ovom je istraživanju ukupna seroprevalencija na BHAV u bolesnika s nedokazanom etiologijom neuroinvazivne bolesti iznosila 20,6%. U dva je bolesnika (72 i 60 godina) iz ruralnih područja sjeverozapadne Hrvatske (Varaždinska i Međimurska županija) dokazana nedavna BHAV infekcija (dokaz NT protutijela u serumu i CSL-u u prvog te protutijela u CSL-u u drugog bolesnika). U nekih je bolesnika s neuroinvazivnom WNV infekcijom, posebice u ranoj fazi bolesti opažena pojava IgM protutijela u CSL-u prije nego u serumu [165], što može objasniti dokazana NT protutijela samo u likvoru u 72-godišnjeg bolesnika.

U Hrvatskoj je 1979-1980. godine provedena studija u dvije geografski različite kontinentalne regije koja je uključila mlade stalno naseljene osobe i BHAV seronegativne novo doseljene osobe u sjevernoj Hrvatskoj duž mađarske granice (regija 1) te novo doseljene osobe u područje duž talijanske granice (Slovenija, regija 2) koje su na tom području boravile godinu dana. U sjevernom je dijelu krajolik ravničarski (95-128 m nadmorske visine) uz nešto brežuljaka i umjerenu klimu. Drugo područje je do 600 m nadmorske visine uz mediteransku klimu. Srednja dob ispitanika bila je 20,5 (raspon 17-23) godina. Protutijela koja inhibiraju hemaglutinaciju (HI) na BHAV detektirana su u 5,53% stanovnika sjeverne Hrvatske, dok su u novopridošlih osoba nakon godine dana BHAV HI protutijela dokazana u 3,27% testiranih uzoraka. Također, HI protutijela dokazana su u 1,95% uzoraka u doseljenih osoba duž talijanske granice. Uočena pojava serokonverzija pokazatelj je nedavne cirkulacije BHAV-a u ispitivanim područjima. Analizirajući seropozitivne stalno naseljene ispitanike po geografskim regijama, u regiji 1 je najveća učestalost detektiranih protutijela (7,96%) bila u najzapadnijim područjima (Goričan, okolica Koprivnice) te je pokazala trend smanjivanja prema istoku (okolica Virovitice 5,26%, Podravska Slatina-Donji Miholjac 2,46%). Isto je tako uočena viša učestalost

serokonverzije u ispitanika u zapadnim (6,62%) u odnosu na istočna područja (0,82 i 1,85%). U regiji 2, u 1,95% ispitivanih osoba je došlo do serokonverzije nakon godinu dana [166]. I u ovom je istraživanju uočena razlika u seroprevalenciji između sjeverozapadnih i istočnih regija (24,6% naspram 12,3%), dok je nešto viša bila u priobalnim područjima (18,2%), no te razlike nisu dosegle statističku značajnost ($p=0,062$). Valja napomenuti, da su u istraživanje većinom bili uključeni bolesnici iz kontinentalnih županija te samo 11 bolesnika iz primorja, stoga ove rezultate, posebice one u primorskim županijama treba tumačiti s oprezom.

Slično istraživanju u ljudi (1979-1980.), na istim su područjima pretraživani psi na prisutnost BHAV. HI protutijela su dokazana u 6,25% uzoraka seruma pasa u okolini Koprivnice te 11,11% uzoraka u okolini Virovitice. Na području Zagreba, u okolini Donjeg Miholjca te u Sloveniji duž talijanske granice nisu zabilježene seropozitivne životinje [167].

Seroprevalencija u ovom istraživanju nije se značajno razlikovala između dobnih skupina te je iznosila od 19,6% do 22,2%. Zanimljivo je da je 19,6% seropozitivnih osoba zabilježeno već u bolesnika mlađih od 30 godina. Isto tako, nije bilo značajne razlike u seropozitivitetu s obzirom na područje prebivališta (gradsko 17,9%; prigradsko/seosko 24,7%) te kliničku prezentaciju bolesti. Analizirajući dob BHAV seropozitivnih osoba u istraživanju na Braču (1975.-1977.), uočena je također visoka seroprevalencija u svim dobnim skupinama. Već u najmlađoj dobnoj skupini (7-9 godina) seropozitivno je bilo 25,42% djece, a u dobi 10-16 godina 15,32%. U skupini odraslih (>30 godina) seroprevalencija je iznosila 34,51-35,13% [168]. Treba napomenuti da je Brač bio jedno od endemskih žarišta za BHAV u Hrvatskoj što je razlog dvostruko više seroprevalencije u djece i adolescenata u odnosu na naše rezultate.

Na području Europe, nekoliko studija analiziralo je seroprevalenciju u općoj populaciji, uglavnom u visoko endemskim područjima, dok su podaci o seroprevalenciji u bolesnika s neuroinvazivnom bolešću vrlo oskudni. Prema studiji provedenoj u četiri različite regije Češke, testirani su odrasli bolesnici s kliničkom slikom meningoencefalitisa i „viroze“ u razdoblju od 1975. do 1983. godine. BHAV NT protutijela pronađena su u 2,9% bolesnika [169]. Druga studija objavljena 1982. godine analizirala je prevalenciju BHAV protutijela u dva područja u Južnoj Moravskoj (Znojmo i Breclav) i jednog područja u istočnoj Slovačkoj (Rožnava). BHAV NT protutijela otkrivena su u 5,4% testiranih osoba [18].

Nekoliko istraživanja provedenih 1980-ih godina analiziralo je seroprevalenciju BHAV-a u specifičnim populacijskim skupinama. Niska seropozitivnost od 0,9% otkrivena je među šumarskim radnicima u Sloveniji s najvišom seroprevalencijom (7%) u Kočevju [157]. Niske stope seroprevalencije utvrđene su i kod poljoprivrednika u Slovačkoj. Seropozitivne osobe bile

su iz južnih dijelova Slovačkog krša (Rožnava 2,6% i Trebišov 1,1%), planinskog područja koje graniči s Mađarskom [170].

U Hrvatskoj je krpelj *H. punctata* zabilježen u devet različitih vrsta domaćina, uglavnom kopitara [171]. U svih osam do sada opisanih prirodnih žarišta BHAV u Europi pronađene su mnoge zajedničke biogeografske značajke: srednja nadmorska visina je 200-850 m; česti tipovi tla su rendzina, crvenica, les te smeđe šumsko tlo; krajolik je agrarni, a klima mediteranska s najvećim količinama oborina zimi te suhim i vrućim ljetima. Na području centralne Europe su povoljna kserotermna (suha) staništa, koja su mikroklimatski vrlo slična klimi južne Europe i njenom termofilnom tipu vegetacije. Sva prirodna žarišta BHAV povezana su s ispašom domaćih preživača (uglavnom ovaca i koza) kao glavnim domaćinima lokalne faune krpelja. Navedene zajedničke biogeografske značajke su prediktori za BHAV u Europi [94].

U ovom je istraživanju prosječna nadmorska visina prebivališta BHAV seropozitivnih osoba iznosila 158 metara. Iako je seroprevalencija u stanovnika prigradskih i seoskih područja bila gotovo dvostruko viša u usporedbi sa stanovnicima gradskih područja (15,6% naspram 8,5%), ova razlika nije bila statistički značajna. U ranijim su istraživanjima (Brač, 1975. i 1977.) analizirane i životinje te su nađena BHAV NT protutijela u gotovo svih testiranih ovaca. Mjesta uzorkovanja seropozitivnih životinja su bila do 500 m nadmorske visine [168].

Ograničenje ovog istraživanja koje svakako treba spomenuti je način uzorkovanja. Iako su u istraživanje bili uključeni bolesnici s područja svih hrvatskih županija, većina (87,0%) je bila iz kontinentalnih regija što je moglo dijelom utjecati na učestalost detekcije pojedinih arbovirusa. To se posebice odnosi na TOSV koji je u promatranom razdoblju, dokazan sporadično kao uzročnik neuroinvazivnih infekcija i koji je, obzirom na distribuciju vektora flebotoma u Hrvatskoj, najrasprostranjeniji na području priobalja. No, budući da je većina infekcija uzrokovanih TOSV-om prolazi asimptomatski, stvarna prevalencija ovog virusa u bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom ne bi trebala biti značajno viša od dokazane.

Prisutnost arbovirusa na području Hrvatske potvrđuje njihov značaj u etiologiji neuroinvazivnih bolesti. Posebice treba istaknuti dokaz TAHV i BHAV za koje nema podataka od posljednjih istraživanja provedenih 1970-ih i 1980-ih godina. Budući da se klinička slika i sezonska pojavnost ovih virusa preklapa s drugim uzročnicima meningitisa/encefalitisa kao što su enterovirusi, virusi herpes simplex, varicella-zoster virus, *Listeria monocytogenes* i dr. od kojih je za neke dostupna terapija, od izuzetne je važnosti pravovremena dijagnostika. Stoga u dijagnostičku obradu bolesnika s aseptičkim meningitisom koji su oboljeli tijekom sezone arbovirusa, uz re-emergentne viruse (KMEV, WNV) svakako treba uključiti i zanemarene neuroinvazivne arboviruse kao što su USUV, TOSV, TAHV i BHAV.

7. ZAKLJUČCI

1. U razdoblju od 2017.-2020. godine, neuroinvazivna arbovirusna infekcija dokazana je u 118 (23,9%) bolesnika čime je potvrđena hipoteza da su arbovirusi prošireni na području Hrvatske.
2. U ukupnom broju bolesnika s dokazanom etiologijom, najučestaliji uzročnik je bio WNV (52,5%), zatim KMEV (38,9%), a sporadično su dokazani USUV (2,6%), TOSV (2,6%), TAHV (1,7%) te BHAV (1,7%).
3. Neuroinvazivne arbovirusne infekcije bile su češće u muškaraca (62,7%) u odnosu na žene (37,3%).
4. Više od polovice bolesnika (55,9%) je bilo u dobnoj skupini ≥ 60 godina. Prosječna životna dob oboljelih iznosila je: KME medijan 48 (IQR=36-60) godina, WNV medijan 68 (IQR=59-76) godina, USUV medijan 60 (IQR=42-71) godina, TOSV medijan 54 (IQR=37-54) godine, TAHV 67 (IQR=63-71) godina te BHAV medijan 66 (IQR=63-69) godina.
5. U kliničkoj slici dominirao je meningitis (57,8%) i meningoencefalitis (34,5%). Meningoencefalomijelitis je dokazan u 9,7% bolesnika s WNV infekcijom.
6. Smrtni ishod je zabilježen u 9,7% oboljelih od neuroinvazivne WNV infekcije te u jednog imunokompromitiranog bolesnika s neuroinvazivnom USUV infekcijom.
7. Uočena je karakteristična sezonska pojavnost arbovirusnih infekcija (travanj-listopad). KME je pokazao bimodalnu pojavnost s većim proljetno-ljetnim (svibanj-srpanj) te manjim jesenskim vrškom (listopad). WNV infekcije su bile najučestalije u kolovozu (67,7%). Ostali su se arbovirusi pojavljivali od lipnja do studenog.
8. Dokazana je umjerena pozitivna korelacija između prosječne apsolutne temperature zraka ($^{\circ}\text{C}$) te niska do umjerena negativna korelacija između mjesečne količine oborina (mm) i broja WNV infekcija.
9. Većina arbovirusa (KMEV, WNV, USUV, TAHV, BHAV) je dokazana na području kontinentalnih županija dok su TOSV infekcije dokazane na području priobalja. Najveći broj KMEV infekcija je zabilježen u sjeverozapadnim (Koprivničko-križevačka, Međimurska i Varaždinska županija) te istočnim županijama (Osječko-baranjska županija). WNV infekcije su dokazane na području 10 županija, od kojih u tri (Karlovačka, Koprivničko-križevačka, Virovitičko-podravska) prvi put. Novo mikro-žarište uzrokovano alimentarnom infekcijom (6 oboljelih) otkriveno je na području Lokvi (Gorski kotar) krajem lipnja 2019. godine.

10. Filogenetska analiza dokazanih sojeva arbovirusa pokazala je prisutnost europskog podtipa KMEV (1 soj, 2017. godine), WNV linije 2 (11 sojeva, 2017. i 2018. godine) te USUV europske linije 2 (1 soj, 2018. godine).

11. U bolesnika s nedokazanom etiologijom neuroinvazivne bolesti (N=194), TAHV NT protutijela dokazana su u njih 10,3%, a BHAV protutijela u njih 20,6%.

12. Uočen je porast seroprevalencije na TAHV s dobi od 2,0% u bolesnika mlađih od 30 godina do 27,8% u bolesnika starijih od 70 godina. Većina seropozitivnih osoba su bili stanovnici poplavnih područja uz Savu, Dravu, Muru, Dunav, Bednju i Dobru prosječne nadmorske visine od 128 m.

13. Seroprevalencija na BHAV se nije razlikovala između dobnih skupina (19,6%-22,2%). Također nije dokazana povezanost seropozitiviteta sa spolom, mjestom prebivališta te kliničkom prezentacijom bolesti. BHAV seropozitivne osobe bile su s područja 11 kontinentalnih i dvije primorske županije. Iako su protutijela češće dokazana u stanovnika zapadnih kontinentalnih regija (24,6%) u odnosu na one iz primorskih (18,2%) te istočnih kontinentalnih regija (12,3%), ove razlike nisu dosegle statističku značajnost ($p=9,962$).

8. SAŽETAK

Iako većinom prolaze asimptomatski, u nekih se bolesnika arbovirusne infekcije očituju teškom kliničkom slikom neuroinvazivne bolesti. Ovo istraživanje uključilo je 492 bolesnika s neuroinvazivnom infekcijom oboljelih tijekom četiri uzastopne sezone prijenosa arbovirusa (2017.-2020. godine). Istražena je učestalost virusa krpeljnog encefalitisa (KMEV), West Nile (WNV), Usutu (USUV), Toscana (TOSV), Tahyna orthobunyavirusa (TAHV) i Bhanja bandavirusa (BHAV) određivanjem virusne RNK/specifičnih protutijela. Arbovirusna etiologija dokazana je u 118 (23,9%) bolesnika. U ukupnom broju bolesnika s dokazanom etiologijom, najučestaliji uzročnik je bio WNV (52,5%), zatim KMEV (38,9%), a sporadično su dokazani USUV (2,6%), TOSV (2,6%), TAHV (1,7%) te BHAV (1,7%). Nadalje, NT protutijela na TAHV i BHAV dokazana su u serumu 10,3% te 20,6% bolesnika s nedokazanom etiologijom. Neuroinvazivne arbovirusne infekcije bile su češće u muškarca u odnosu na žene (62,7% naspram 37,3%). Više od polovice oboljelih (55,9%) bilo je u dobi iznad 60 godina. U kliničkoj slici dominirao je meningitis (57,8%) i meningoencefalitis (34,5%). Uočena je karakteristična sezonska pojavnost arbovirusnih infekcija (travanj-listopad). Dokazani arbovirusi bili su geografski rasprostranjeni u kontinentalnim županijama, osim TOSV-a dokazanog na području priobalja. Filogenetska analiza pokazala je prisutnost europskog podtipa KMEV, WNV linije 2 te USUV europske linije 2. Definiranje prevalencije i molekularno-epidemioloških značajki dokazanih arbovirusa predstavlja izvorni znanstveni doprinos epidemiologiji arbovirusnih infekcija.

9. SUMMARY

Prevalence and molecular epidemiology of neuroinvasive arboviral infections in Croatia

Maja Bogdanić, 2023

Although mostly asymptomatic, arboviral infections are presented with a severe clinical presentation of a neuroinvasive illness in some patients. A total of 492 patients with neuroinvasive infections were tested for the presence of arboviruses during four consecutive seasons (2017-2020). The prevalence of tick-borne encephalitis (TBEV), West Nile (WNV), Usutu (USUV), Toscana (TOSV), Tahyna orthobunyavirus (TAHV), and Bhanja bandavirus (BHAV) was analyzed by detection of viral RNA/antibodies. Neuroinvasive arboviral infections were confirmed in 118 (23.9%) patients. WNV and TBEV were the most common arboviruses detected in 52.5% and 38.9% of patients, whereas USUV (2.6%), TOSV (2.6%), TAHV (1.7%) and BHAV (1.7%) were detected sporadically. In addition, TAHV and BHAV NT antibodies were documented in serum samples of 10.3% and 20.6% of patients with unknown etiology. Males were infected more commonly (62.7%) than females (37.3%). Patients in the age group >60 years were most commonly affected (55.9%). The majority of patients presented with meningitis (57.7%) and meningoencephalitis (34.5%). Arboviruses showed seasonal distribution (April-October). Infections were detected in continental counties, whereas TOSV was detected at the Croatian littoral. Sequenced strains showed the circulation of the TBEV European subtype, WNV lineage 2, and USUV Europe 2 lineage. Defining the prevalence and molecular epidemiology represents an original scientific contribution to the epidemiology of arboviral infections.

10. LITERATURA

1. Salimi H, Cain MD, Klein RS. Encephalitic arboviruses: Emergence, clinical presentation, and neuropathogenesis. *Neurotherapeutics* 2016;13:514-34.
2. Gundamraj V, Hasbun R. Viral meningitis and encephalitis: an update. *Curr Opin Infect Dis* 2023; doi: 10.1097/QCO.0000000000000922.
3. Papa A. Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J Clin Virol* 2019;115:5-10.
4. Huang YS, Higgs S, Vanlandingham DL. Emergence and re-emergence of mosquito-borne arboviruses. *Curr Opin Virol* 2019;34:104-9.
5. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Pandak N, Pem-Novosel I, Stevanović V, Kaić B i sur. Virus krpeljnog encefalitisa: Epidemiološka i klinička slika, dijagnostika i prevencija. *Acta med Croatica* 2014 68:393-404.
6. Magill AJ, Ryan ET, Solomon T, Hill DR. *Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. 9. izd. Saunders-Elsevier, 2012.
7. Barbić L, Vilibić-Čavlek T, Stevanović V, Savić V, Klobučar A, Pem-Novosel I i sur. Pristup "Jedno zdravlje" - primjer pojave, praćenja i nadzora emergentnih i re-emergentnih arbovirusa u Republici Hrvatskoj. *Infektol glasnik* 2015;35:53-60.
8. Liang G, Gao X, Gould EA. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 2015;4:e18.
9. Bricaire F. Emergent and reemerging infectious diseases. *Rev Prat* 2018;68:721-6.
10. Golubić D, Dobler G. Flavivirusi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. *Infektol glasnik* 2012;32:153-7.
11. Dželalija B, Medić A, Pem-Novosel I, Sablić S. Zoonoze u Republici Hrvatskoj. *Infektol glasnik* 2015;35:45-51.
12. Markotić A, Krajinović LC, Margaletić J, Turk N, Miletić-Medved M, Zmak L i sur. Zoonoses and vector-borne diseases in Croatia - a multidisciplinary approach. *Vet Ital* 2009; 45:55-66.
13. Riccardi N, Antonello RM, Luzzati R, Zajkowska J, Di Bella S, Giacobbe DR. Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Eur J Intern Med* 2019;62:1-6.

14. Veater J, Mehedi F, Cheung CK, Nabarro L, Osborne J, Wong N i sur. Toscana virus meningo-encephalitis: an important differential diagnosis for elderly travellers returning from Mediterranean countries. *BMC Geriatr* 2017;17:193.
15. Zannoli S, Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* 2019;7.pii: E184.
16. Roesch F, Fajardo A, Moratorio G, Vignuzzi M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* 2019 12;11.pii: E640.
17. Sonnleitner ST, Lundström J, Baumgartner R, Simeoni J, Schennach H, Zelger R i sur. Investigations on California serogroup orthobunyaviruses in the Tyrols: first description of Tahyna virus in the Alps. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:272-7.
18. Hubalek Z, Bárdos V, Kuhn J. Detection of human Bhanja virus-specific antibodies Czechoslovakia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1982;26:181-6.
19. Valarcher JF, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S i sur. Tick-borne encephalitis. *Rev Sci Tech* 2015;34:453-66.
20. Vilibić-Cavlek T, Savić V, Sabadić D, Perić L, Barbić L, Klobučar A i sur. Prevalence and molecular epidemiology of West Nile and Usutu virus infections in Croatia in the "One health" context, 2018. *Transbound Emerg Dis* 2019;66:1946-57.
21. Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the Mediterranean area. *World J Virol* 2012;12:135-41.
22. Veje M, Studahl M, Norberg P, Roth A, Möbius U, Brink M i sur. Detection of tick-borne encephalitis virus RNA in urine. *J Clin Microbiol* 2014;52:4111-2.
23. Ergunay K, Kaplan B, Okar S, Akkutay-Yoldar Z, Kurne A, Arsava EM i sur. Urinary detection of Toscana virus nucleic acids in neuroinvasive infections *Clin Virol* 2015;70:89-92.
24. Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, Palú G. Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13:327-42.
25. Leonova GN, Ternovoi VA, Pavlenko EV, Maistrovskaya OS, Protopopova EV, Loktev VB. Evaluation of vaccine Encepur Adult for induction of human neutralizing antibodies against recent Far Eastern subtype strains of tick-borne encephalitis virus. *Vaccine* 2007;25: 895-901.
26. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Ljubin-Sternak S, Pem-Novosel I, Stevanović V, Gjenero-Margan I i sur. Infekcija virusom Zapadnog Nila: re-emergentna bolest u Hrvatskoj. *Liječ vjesn* 2013;135:156-61.

27. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The viruses nad their replication. U: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields Virology*. 5. izd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 1101-51.
28. Kentaro Y. Epidemiology and pathological mechanisms of tick borne encephalitis. *J Vet Med Sci* 2019;81:343-7.
29. Markovinović L, Kosanović Ličina ML, Tešić V, Vojvodić D, Vladušić Lucić I, Kniewald T i sur. An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015. *Infection* 2016;44:661-5.
30. Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G i sur. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res* 2019;164:23-51.
31. Bogovic P, Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases* 2015;16;3:430-41.
32. Achazi K, Nitsche A, Patel P, Radonić A, Donoso Mantke O, Niedrig N. Detection and differentiation of tick-borne encephalitis virus subtypes by a reverse transcription quantitative real-time PCR and pyrosequencing. *J Virol Methods* 2011;171:34-9.
33. Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2003;21:3-40.
34. Vilibic-Cavlek T, Barbic L, Stevanovic V, Petrovic G, Mlinaric- Galinovic G. IgG Avidity: an Important Serologic Marker for the Diagnosis of Tick-Borne Encephalitis Virus Infection. *Pol J Microbiol* 2016;65:119-21.
35. Vesenjaj-Hirjan J. Arboviruses in Yugoslavia. U: Vesenjaj-Hirjan J, ur. *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. ZbL Bakt Suppl 9, Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag; 1980., str. 165-77.
36. Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossmann MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science* 2003;302:248.
37. Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E i sur. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect Genet Evol* 2013;17:46-50.
38. Rizzoli A, Jiménez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P i sur. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill* 2015;20:21135.
39. Zannoli S, Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* 2019;7.pii: E184.

40. Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Santini M, Barbic L, Kosuta I, Savic V i sur. Tabain I, West Nile Virus: An Emerging Threat in Transplant Population. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2020;20:613-8.
41. Salcuni P, Rizzo C. West Nile disease: review of clinical features and risk factors associated with severe disease. *Infez Med* 2011;19:5-15.
42. Sejvar JJ. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses* 2014; 6:606-23.
43. Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, Charrel R, Donoso-Mantke O, Escadafal C i sur. Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses* 2013;5:2329-48.
44. Basset J, Burlaud-Gaillard J, Feher M, Roingard P, Rey FA, Pardigon N. A Molecular Determinant of West Nile Virus Secretion and Morphology as a Target for Viral Attenuation. *J Virol* 2020;94:e00086-20.
45. Barzon L, Pacenti M, Ulbert S, Palú G. Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13:327-42.
46. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med* 2003;198:1853-62.
47. Roehring JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS i sur. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003;9:376-9.
48. Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 2000;38:2232-9.
49. Vilibić Čavlek T, Kristofić B, Savic V, Kolaric B, Barbic L, Tabain I i sur. Diagnostic significance of immunoglobulin G avidity in symptomatic and asymptomatic West Nile virus infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;51:591-5.
50. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). West Nile virus infection. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection>, pristupljeno 24.4.2023.
51. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Stevanović V, Mlinarić-Galinović G. Usutski virus: Novi flavivirus u Hrvatskoj. *Liječ vjesn* 2015;137:46-51.
52. Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. *Microbes Infect* 2017;19:382-7.

53. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V i sur. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* 2020;9:699.
54. Peletto S, Lo Presti A, Modesto P, Cella E, Acutis PL, Farchi F i sur. Genetic diversity of Usutu virus. *New Microbiol* 2012;35:167-74.
55. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R i sur. Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PLoS One* 2013;8:e63978.
56. Busquets N, Alba A, Allepuz A, Aranda C, Ignacio Nuñez J. Usutu virus sequences in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg Infect Dis* 2008;14:861-3.
57. Sanchez-Seco MP, Vazquez A. Emergence of novel viruses (Toscana, Usutu) in population and climate change. U: Singh SK, ur. *Viral infections and global change*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2013, str.535-5.
58. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, De Perre PV i sur. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect* 2019;147:e232.
59. Nikolay B, Diallo M, Boye CS, Sall AA. Usutu virus in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1417-23.
60. Weissenböck H, Bakonyi T, Rossi G, Mani P, Nowotny N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg Infect Dis* 2013;19:274-7.
61. Pecorari M, Longo G, Grottola A, Sabattini A, Tagliazucchi S, Savini G i sur. First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill* 2009;14:19446.
62. Cavrini F, Gaibani P, Longo G, Pierro AM, Rossini G, Bonilauri P i sur. Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August- September, 2009. *Euro Surveill* 2009;14:19448.
63. Allering L, H Jöst, P Emmerich, S Günther, E Lattwein, M Schmidt i sur. Detection of Usutu virus infection in a healthy blood donor from south- west Germany, 2012. *Euro Surveill* 2012;17:20341.
64. Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic L, Savic V, Stevanovic V i sur. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August-September 2013: clinical and laboratory features. *J Neurovirol* 2015;21:92-7.
65. Percivalle E, Sasserà D, Rovida F, Isernia P, Fabbi M, Baldanti F i sur. Usutu virus antibodies in blood donors and healthy forestry workers in the Lombardy region, Northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2017;17:658-61.

66. Cadar D, Maier P, Müller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A. i sur. Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Euro Surveill* 2017;22:30501.
67. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O i sur. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis* 2018;24:875-8.
68. Bakonyi T, Jungbauer C, Aberle SW, Kolodziejek J, Dimmel K, Stiasny K i sur. Usutu virus infections among blood donors, Austria, July and August 2017- raising awareness for diagnostic challenges. *Euro Surveill* 2017;22:17-00644.
69. Pacenti M, Sinigaglia A, Martello T, De Rui ME, Franchin E, Pagni S i sur. Clinical and virological findings with patients with Usutu virus infection, northern Italy, 2018. *Euro Surveill* 2019;24:1900180.
70. Nagy A, Csonka N, Takács M, Mezei E, Barabás É. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill* 2019; 24:1900038.
71. Graninger M, Humber S, Riederer F, Kettner S, Hauk M, Auf T i sur. The first case of Usutu virus neuroinvasive disease in Austria, 2021. *Open forum Infect Dis* 2022;9:ofac255.
72. Ashraf U, Ye J, Ruan X, Wan S, Zhu B, Cao S. Usutu virus: an emerging flavivirus in Europe. *Viruses* 2015;17:219-38.
73. Bakonyi T, Erdélyi K, Brunthaler R, Dán Á, Weissenböck H, Nowotny N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016. *Emerg Microbes Infect* 2017;11:6:e85.
74. Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, Donoso-Mantke O, Sambri V, Niedrig M, i sur. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill* 2011;16:19935.
75. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Tamba M i sur. Usutu virus persistence and West Nile virus inactivity in the Emilia-Romagna region (Italy) in 2011. *PLoS One* 2013;8:e63978.
76. Garigliany MM, Marlier D, Tenner-Racz K, Eiden M, Cassart D, Gandar F, i sur. Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Vet J* 2014;199:191-3.
77. Barbic L, Vilibic-Cavlek T, Listes E, Stevanovic V, Gjenero-Margan I, Ljubin-Sternak S, i sur. Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13:772-4.

78. Vilibic-Cavlek T, Barbic Lj, Mrzljak A, Brnic D, Klobucar A, Ilic M, i sur. Emerging and neglected viruses of zoonotic importance in Croatia. *Pathogens* 2021;10:73.
79. Gori Savellini G, Anichini G, Gandolfo C, Prathyumnan S, Cusi MG. Toscana virus non-structural protein NSs acts as E3 ubiquitin ligase promoting RIG-I degradation. *PLoS Pathog* 2019;15:e1008186.
80. Ayhan N, Alten B, Ivovic V, Martinkovic F, Kasap OE, Ozbel Y i sur. Cocirculation of Two Lineages of Toscana Virus in Croatia. *Front Public Health* 2017;5:336.
81. Alkan C, Bichaud L, de Lamballerie X, Alten B, Gould EA, Charrel RN. Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res* 2013;100:54-74.
82. Ayhan N, Charrel RN. An update on Toscana virus distribution, genetics, medical and diagnostic aspects. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1017-23.
83. Marchi S, Trombetta CM, Kistner O, Montomoli E. Seroprevalence study of Toscana virus and viruses belonging to the Sandfly fever Naples antigenic complex in central and southern Italy. *J Infect Public Health* 2017;10:866-9.
84. Ergünay K, Litzba N, Lo MM, Aydoğan S, Saygan MB, Us D i sur. Performance of various commercial assays for the detection of Toscana virus antibodies. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:781-7.
85. Punda-Polic V, Mohar B, Duh D, Bradaric N, Korva M, Fajs L i sur. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J Clin Virol* 2012;55:4-7.
86. Punda-Polić V, Jerončić A, Mohar B, Šiško-Kraljević K. Prevalence of Toscana virus antibodies in residents of Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:200-3.
87. Bennett RS, Gresko AK, Murphy BR, Whitehead SS. Tahyna virus genetics, infectivity, and immunogenicity in mice and monkeys. *Virol J* 2011;8:135.
88. Hubálek Z. Mosquito-borne viruses in Europe. *Parasitol Res* 2008;103(Suppl 1):S29-43.
89. Lu Z, Lu XJ, Fu SH, Zhang S, Li ZX, Yao XH, i sur. Tahyna virus and human infection, China. *Emerg Infect Dis* 2009;15:306-9.
90. Hubálek Z, Zeman P, Halouzka J, Juricová Z, Stovícková E, Bálková H i sur. Antibodies against mosquito-borne viruses in human population of an area of Central Bohemia affected by the flood of 2002. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2004;53:112-20.
91. Camp JV, Haider R, Porea D, Oslobanu LE, Forgách P, Nowotny N. Serological surveillance for Tahyna virus (California encephalitis orthobunyavirus, Peribunyaviridae)

neutralizing antibodies in wild ungulates in Austria, Hungary and Romania. *Zoonoses Public Health* 2018;65:459-63.

92. Vesenjāk-Hirjan J, Galinović-Weisglass M, Urlić V, Bendiš M, Miović P, Vujošević N i sur. Occurrence of arboviruses in the Middle and the South Adriatic (Yugoslavia) U: Vesenjāk-Hirjan, ur. *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Germany: New York, NY, USA: 1980. str. 303-10.

93. Matsuno K, Weisend C, Travassos da Rosa AP, Anzick SL, Dahlstrom E, Porcella SF i sur. Characterization of the Bhanja serogroup viruses (Bunyaviridae): a novel species of the genus Phlebovirus and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. *J Virol* 2013; 87:3719-28.

94. Hubalek Z. Biogeography of tick-borne Bhanja virus (Bunyaviridae) in Europe. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009;2009:372691.

95. Vesenjāk-Hirjan J, Punda-Polić V, Dobec M. Geographical distribution of arboviruses in Yugoslavia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1991;35:129-40.

96. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). EU case definitions. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-and-disease-data/eu-case-definitions>, pristupljeno 13.4.2023.

97. Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol* 2003;27:136-45.

98. Tang Y, Anne Hapip C, Liu B, Fang CT. Highly sensitive TaqMan RT-PCR assay for detection and quantification of both lineages of West Nile virus RNA. *J Clin Virol* 2006;36:177-82.

99. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M i sur. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J Virol Methods* 2014;197:51-4.

100. Weidmann M, Sanchez-Seco MP, Sall AA, Ly PO, Thiongane Y, Lô MM i sur. Rapid detection of important human pathogenic Phleboviruses. *J Clin Virol* 2008;41:138-42.

101. Li H, Cao YX, He XX, Fu SH, Lyu Z, He Y i sur. Real-time RT-PCR Assay for the detection of Tahyna Virus. *Biomed Environ Sci* 2015;28:374-7.

102. Tamura K, Stecher G, Kumar S. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 2021;38:3022-7.

103. Državni hidrometeorološki zavod (DHMZ). Praćenje klime. Ocjena mjeseca, sezone, godine. Dostupno na: <https://meteo.hr/>, pristupljeno 10.01.2023.
104. Ilic M, Barbic L, Bogdanic M, Tabain I, Savic V, Kosanovic Licina ML i sur. Tick-borne encephalitis outbreak following raw goat milk consumption in a new micro-location, Croatia, June 2019. *Ticks Tick-Borne Dis* 2020;11:101513.
105. Ličková M, Fumačová Havlíková S, Sláviková M, Klempa B. Alimentary Infections by Tick-Borne Encephalitis Virus. *Viruses* 2021;14:56.
106. Saegerman C, Humblet MF, Leandri M, Gonzalez G, Heyman P, Sprong H i sur. First Expert Elicitation of Knowledge on Possible Drivers of Observed Increasing Human Cases of Tick-Borne Encephalitis in Europe. *Viruses* 2023;15:791.
107. Heuverswyn JV, Hallmaier-Wacker LK, Beauté J, Gomes Dias J, Haussig JM, Busch K i sur. Spatiotemporal spread of tick-borne encephalitis in the EU/EEA, 2012 to 2020. *Euro Surveill* 2023;28:2200543.
108. de Graaf JA, Reimerink JH, Voorn GP, Bij de Vaate EA, de Vries A, Rockx B i sur. First human case of tick-borne encephalitis virus infection acquired in the Netherlands, July 2016. *Euro Surveill* 2016;21:30318.
109. Stoefs A, Heyndrickx L, De Winter J, Coeckelbergh E, Willekens B, Alonso-Jiménez A i sur. Autochthonous Cases of Tick-Borne Encephalitis, Belgium, 2020. *Emerg Infect Dis* 2021;27:2179-82.
110. Mansbridge CT, Osborne J, Holding M, Dryden M, Aram M, Brown K i sur. Autochthonous tick-borne encephalitis in the United Kingdom: A second probable human case and local eco-epidemiological findings. *Ticks Tick Borne Dis* 2022;13:101853.
111. Jaenson TG, Hjertqvist M, Bergström T, Lundkvist A. Why is tick-borne encephalitis increasing? A review of the key factors causing the increasing incidence of human TBE in Sweden. *Parasit Vector* 2012;5:184.
112. Mohareb E, Christova I, Soliman A, Younan R, Kantardjiev T. Tick-borne encephalitis in Bulgaria, 2009 to 2012. *Euro Surveill* 2013;18:20635.
113. Waldeck M, Winqvist N, Henriksson G, Dyrdak R, Settergren B, Lindgren PE. Surveillance of tick-borne encephalitis in emerging risk areas in southern Sweden: a retrospective case finding study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2023;42:13-22.

114. Nygren TM, Pilic A, Böhmer MM, Wagner-Wiening C, Wichmann O, Harder T i sur.. Tick-borne encephalitis risk increases with dog ownership, frequent walks, and gardening: a case-control study in Germany 2018-2020. *Microorganisms* 2022;10:690.
115. Zavadska D, Odzelevica Z, Karelis G, Liepina L, Litauniece ZA, Bormane A i sur. Tick-borne encephalitis: A 43-year summary of epidemiological and clinical data from Latvia (1973 to 2016). *PLoS One* 2018;13:e0204844.
116. Radzišauskienė D, Žagminas K, Ašoklienė L, Jasionis A, Mameniškienė R, Ambrozaitis A i sur. Epidemiological patterns of tick-borne encephalitis in Lithuania and clinical features in adults in the light of the high incidence in recent years: a retrospective study. *Eur J Neurol* 2018;25:268-74.
117. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res* 2003;57:129-46.
118. Grygorczuk S, Mierzynska D, Zdrodowska A, Zajkowska J, Pancewicz S, Kondrusik M i sur. Tick-borne encephalitis in north-eastern Poland in 1997-2001: a retrospective study. *Scand J Infect Dis* 2002;34:904-9.
119. Poluga J, Barač A, Katanic N, Rubino S, Milosevic B, Urosevic A i sur. Tick-borne encephalitis in Serbia: A case series. *J Infect Dev Ctries* 2019;13:510-5.
120. Bogovič P, Kastrin A, Lotrič-Furlan S, Ogrinc K, Avšič Županc T, Korva M i sur. Clinical and Laboratory Characteristics and Outcome of Illness Caused by Tick-Borne Encephalitis Virus without Central Nervous System Involvement. *Emerg Infect Dis* 2022;28:291-301.
121. Jemersić L, Deždek D, Brnić D, Prpić J, Janicki Z, Keros T i sur. Detection and genetic characterization of tick-borne encephalitis virus (TBEV) derived from ticks removed from red foxes (*Vulpes vulpes*) and isolated from spleen samples of red deer (*Cervus elaphus*) in Croatia. *Ticks Tick Borne Dis* 2014;5:7-13.
122. Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Pandak N, Peric L, Barbic L i sur. First Outbreak of West Nile Virus Neuroinvasive Disease in Humans, Croatia, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:82-4.
123. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, Pem-Novosel I, Slavic-Vrzic V, Lesnikar V i sur. First Evidence of Simultaneous Occurrence of West Nile Virus and Usutu Virus Neuroinvasive Disease in Humans in Croatia during the 2013 Outbreak. *Infection* 2014;42:689-95.

124. Young JJ, Haussig JM, Aberle SW, Pervanidou D, Riccardo F, Sekulić N i sur. Epidemiology of human West Nile virus infections in the European Union and European Union enlargement countries, 2010 to 2018. *Euro Surveill* 2021;26:2001095.
125. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A i sur. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveill* 2018;23:1800545.
126. Haussig JM, Young JJ, Gossner CM, Mezei E, Bella A, Sirbu A i sur. Early start of the West Nile fever transmission season 2018 in Europe. *Euro Surveill* 2018;23:1800428.
127. Moirano G, Gasparini A, Acquotta F, Fratianni S, Merletti F, Maule M. West Nile Virus infection in Northern Italy: Case-crossover study on the short-term effect of climatic parameters. *Environ Res* 2018;167:544-9.
128. Conte A, Candeloro L, Ippoliti C, Monaco F, De Massis F, Bruno R i sur. Spatio-temporal identification of areas suitable for West Nile disease in the Mediterranean Basin and central Europe. *PLoS One* 2015;10:e0146024.
129. D'Amore C, Grimaldi P, Ascione T, Conti V, Sellitto C, Franci G i sur. West Nile Virus diffusion in temperate regions and climate change. A systematic review. *Infez Med* 2023;31:20-30.
130. Wang G, Minnis RB, Belant JL, Wax CL. Dry weather induces outbreaks of human West Nile virus infections. *BMC Infect Dis* 2010; 10:38.
131. McDonald E, Mathis S, Martin SW, Staples JE, Fischer M, Lindsey NP. Surveillance for West Nile Virus Disease-United States, 2009-2018. *MMWR Surveill Summ* 2021;70(No. SS-1):1-15.
132. Yao Y, Montgomery RR. Role of Immune Aging in Susceptibility to West Nile Virus. *Methods Mol Biol* 2016;1435:235-47.
133. Sabadi D, Peric L, Savic V, Rubil I, Baraban V, Tabain I i sur. Fatal Case of West Nile Encephalitis Associated with Acute Anteroseptal ST Elevation Myocardial Infarction (STEMI): A Case Report. *New Microbiol* 2020;43:51-3.
134. Sejvar JJ, Lindsey NP, Campbell GL. Primary causes of death in reported cases of fatal West Nile Fever, United States, 2002-2006. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:161-4.
135. Konjevoda S, Dzelalija B, Canovic S, Pastar Z, Savic V, Tabain I i sur. West Nile Virus Retinitis in a Patient with Neuroinvasive Disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2019;52:e20190065.

136. Sabadi D, Perić L, Duvnjak M, Rubil I, Grubišić B, Radočaj V i sur. Cerebellitis: A rare clinical manifestation of West Nile infection; Proceedings of the Symposium with International Participation-Diagnosis and Surveillance of West Nile Virus Infections in the “One Health” Context; Zagreb, Croatia. Zagreb, Croatia: Croatian Institute of Public Health; 2019. str. 14-15.
137. Kanagarajan K, Ganesh S, Alakhras M, Go ES, Recco RA, Zaman MM. West Nile virus infection presenting as cerebellar ataxia and fever: case report. *South Med J* 2003;96:600-1.
138. Kooli I, Loussaif C, Ben Brahim H, Aouam A, Toumi A, Chakroun M. West Nile virus (WNV) presenting as acute cerebellar ataxia in an immunocompetent patient. *Rev Neurol* 2017;173:238-40.
139. Natarajan N, Varman M. West Nile virus cerebellitis in a healthy 10-year-old child. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:767.
140. Santini M, Zupetic I, Viskovic K, Krznaric J, Kutlesa M, Krajinovic V i sur. Cauda equina arachnoiditis - a rare manifestation of West Nile virus neuroinvasive disease: A case report. *World J Clin Cases* 2020;8:3797-803.
141. Kurolt IC, Krajinović V, Topić A, Kuzman I, Baršić B, Markotić A. First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Res* 2014;189:63-6.
142. Cadar D, Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses* 2022;15:77.
143. Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A i sur. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveill* 2018;23:1800545
144. Klobucar A, Savic V, Curman Posavec M, Petrinic S, Kuhar U, Toplak I i sur. Screening of Mosquitoes for West Nile Virus and Usutu Virus in Croatia, 2015-2020. *Trop Med Infect Dis* 2021;6:45.
145. Charrel RN, Gallian P, Navarro-Mari JM, Nicoletti L, Papa A, Sanchez-Seco MP i sur. Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1657-63.
146. Pierro A, Ficarelli S, Ayhann N, Morini S, Raumer L, Bartoletti M i sur. Characterization of antibody response in neuroinvasive infection caused by Toscana virus. *Clin. Microbiol Infect* 2017;23:868-73.
147. ECDC. Toscana virus infection. Dostupno na: <https://www.ecdc.europa.eu/en/toscana-virus-infection>, pristupljeno 20.4.2023.

148. Riccò M, Peruzzi S. Epidemiology of Toscana Virus in Italy (2018-2020), a summary of available evidences. *Acta Biomed* 2021;92:e2021230.
149. Miller JD, Pruitt S, McDonald TJ. Acute brachial plexus neuritis: An uncommon cause of shoulder pain. *Am Fam Physician* 2000;62:2067-72.
150. Torres MO, Gudlavalleti A, Mesfin FB. Brachial Plexitis (Parsonage Turner Syndrome, Brachial Neuropathy, Brachial Radiculitis) [ažurirano 19.07.2020.; pristupljeno 12.08.2020]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448114/>
151. Bartels S, de Boni L, Kretzschmar HA, Heckmann JG. Lethal encephalitis caused by the Toscana virus in an elderly patient. *J Neurol* 2012;259:175-7.
152. Turković B, Brudnjak Z. Arboviruses in Croatia. *Acta Med Croatica* 1998;52:87-9.
153. Vilibić-Cavlek T, Stevanović V, Savić V, Markelić D, Sabadić D, Bogdanović M i sur. Detection of Tahyna Orthobunyavirus-Neutralizing Antibodies in Patients with Neuroinvasive Disease in Croatia. *Microorganisms* 2022;10:1443.
154. Glinskikh NP, Fedotova TT, Pereskokova IG, Mel'nikov VG, Volkova LI. The potentials for the comprehensive diagnosis of viral encephalitis in Sverdlovsk Province. *Vopr Virusol* 1994;39:190-1.
155. Bardos V, Sefcovicova L. The presence of antibodies neutralizing Tahyna virus in the sera of inhabitants of some European, Asian, African and Australian countries. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1961;5:501-4.
156. Kolman JM, Kopecký K, Rác O. Serologic examination of human population in South Moravia (Czechoslovakia) on the presence of antibodies to arboviruses of the Alfavirus, Flavivirus, Turlock groups and Bunyamwera supergroup. *Folia Parasitol* 1979;26:55-60.
157. Avšič-Županc T. Medically important arboviruses in Slovenia. *Zdrav Vest* 1995;64:15-9.
158. Lu Z, Fu SH, Wang F, Kosoy O, Nasci RS, Liang GD. Investigation of Tahyna virus infection among unknown fever cases in Xinjiang, China. *Bing Du Xue Bao* 2011;27:71-4.
159. Li W, Cao Y, Fu S, Wang J, Li M, Jiang S i sur. Tahyna virus infection, a neglected arboviral disease in the Qinghai-Tibet Plateau of China. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2014;14:353-7.
160. Arbovirus Surveillance Project Institut Pasteur du Laos. [ažurirano 5.5.2022.]. Dostupno na: <https://www.pasteur.la/project-carried-on-in-the-lab-2016-2017-lao-fr1/research-and-development/> [pristupljeno 12.08.2020.].

161. Vilibic-Cavlek T, Savic V, Petrovic T, Toplak I, Barbic L, Petric D i sur. Emerging Trends in the Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Southern Europe. *Front Vet Sci* 2019;6:437.
162. Stevanovic V, Vilibic-Cavlek T, Savic V, Klobucar A, Kovac S, Curman Posavec M, i sur. Surveillance of Tahyna Orthobunyavirus in Urban Areas in Croatia-The "One Health" Approach. *Trop Med Infect Dis* 2022;7:320.023.
163. Vesenjajk-Hirjan J, Calisher CH, Brudnjak Z, Tovornik D, Škrtić N, Lazuić JS. Isolation of Bhanja virus from ticks in Yugoslavia. *Am J Trop Med Hyg* 1977;26:1003-8.
164. Punda V, Beus I, Calisher CH. Laboratory infections with Bhanja virus; Proceedings of the 6th FEMS Symposium Arboviruses in the Mediteranean Countries; Supetar, Brač, Croatia. 1978; str. 273.
165. Piantadosi A, Kanjilal S. Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01926-19.
166. Punda V, Ropac D, Vesenjajk-Hirjan J. Incidence of hemagglutination-inhibiting antibodies for Bhanja virus in humans along the north-west border of Yugoslavia. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1987;265:227-34.
167. Punda V, Ropac D. Prokuženost pasa virusom Bhanja. *Vet Arh* 1985;55:157-64.
168. Vesenjajk-Hirjan J, Galinović-Weisglass M, Brudnjak Z, Calisher CH, Tovornik D, Lazuić JS i sur. Island od Brač – Focus of Arbovirus Infections. U: Vesenjajk-Hirjan, ur. *Arboviruses in the Mediterranean Countries*. Gustav Fischer Verlag; Stuttgart, Germany: New York, NY, USA: 1980. str. 310-7.
169. Hubálek Z, Juricová Z. A serological survey for Bhanja virus in Czechoslovakia. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* 1984;258:540-3.
170. Mittermayer T, Hubálek Z. Antibodies against the Bhanja virus in agricultural workers in Eastern Slovakia. *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1986;35:355-9.
171. Krčmar S. Hard ticks (Acari, Ixodidae) of Croatia. *Zookeys* 2012;234:19-57.

11. BIOGRAFIJA

Maja Bogdanić rođena je 11. svibnja 1985. godine u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu (X. gimnazija) završila je u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2004. godine, a diplomirala 2010. godine. Obvezni pripravnički staž odradila je u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od 2010.-2011. godine. Na Odjelu za citologiju i citogenetiku u KB Merkur radila je od 2012.-2015. godine. Specijalizaciju iz kliničke mikrobiologije započela je 2016. godine u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo. Specijalistički poslijediplomski studij iz kliničke mikrobiologije završila je 2018. godine. Sveučilišni poslijediplomski doktorski studij „Biomedicina i zdravstvo“ upisala je 2018. godine te uspješno položila ispite. Sudjelovala je na domaćim i međunarodnim kongresima i simpozijima. Autor je i koautor 20-ak radova indeksiranih u Current Contents, Web of Science i Pubmed/Medline/Scopus/ bazama i 30-ak kongresnih sažetaka. Od 2017.-2021. godine suradnica je na projektu Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ): „Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske“; CRONEUROARBO (voditeljica izv.prof.dr.sc. Tatjana Vilibić Čavlek, prim.dr.med.). Od 2021. godine suradnica je na projektu HRZZ: „Emergentni i zapostavljeni hepatotropni virusi u bolesnika nakon transplantacije solidnih organa i hematopoetskih matičnih stanica“; HepViroTransplant (voditeljica izv.prof.dr.sc. Anna Mrzljak, dr.med.). Nakon položenog specijalističkog ispita 2022. godine radi kao specijalist kliničke mikrobiologije na Odjelu za virološku serologiju u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo.