

uz potporu Svjetske zdravstvene organizacije
with support of World Health Organization

SIMPOZIJ S MEĐUNARODNIM SUDJELOVANJEM
SYMPOSIUM with International Participation

**DIJAGNOSTIKA I PRAĆENJE WEST NILE VIRUSNIH INFEKCIJA
U KONTEKSTU "JEDNOG ZDRAVLJA"**

*Diagnosis and Surveillance of West Nile Virus Infections
in the "One Health" Context*



PROGRAM I ZBORNIK SAŽETAKA
PROGRAM AND ABSTRACT BOOK

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Zagreb, 7. lipnja 2019.
7th June 2019

SIMPOZIJ s međunarodnim sudjelovanjem

SYMPOSIUM with International Participation

**Dijagnostika i praćenje West Nile virusnih infekcija u kontekstu
"Jednog zdravlja"**

**Diagnosis and Surveillance of West Nile Virus Infections
in the "One Health" Context**

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 7. lipnja 2019.

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, 7th June 2019

Organizatori: Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health

Referentni centar Ministarstva zdravstva za dijagnostiku i praćenje virusnih zoonoza/Reference Centre for Diagnosis and Surveillance of Viral Zoonoses Croatian Ministry of Health

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb

Hrvatski veterinarski institut/Croatian Veterinary Institute

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/School of Medicine University of Zagreb

Hrvatsko mikrobiološko društvo - Virološka sekcija/Croatian Microbiological Society - Virology Section

Projekt/Project HRZZ IP 2016-06-7456: CRONEUROARBO

uz potporu Svjetske zdravstvene organizacije/with support of World Health Organization

Voditelji i urednici zbornika: Tatjana Vilibić Čavlek, Ljubo Barbić, Vladimir Savić, Bernard Kaić

Programski odbor: Tatjana Avšić-Županc, Jerko Barbić, Ljubo Barbić, Golubinka Bosevska, Mitra Drakulović, Elkhan Gasimov, Nataša Janev-Holcer, Bernard Kaić, Antoinette Kaić-Rak, Ana Klobučar, Miša Korva, Nataša Knap-Gašper, Josip Madić, Tamaš Petrović, Marija Santini, Vladimir Savić, Ivan Toplak, Nenad Turk, Tatjana Vilibić-Čavlek

Izdavač: Hrvatski zavod za javno zdravstvo
Rockefellerova 7
10000 Zagreb

ISBN: 978-953-7031-87-9

PROGRAM

Petak 07. lipnja 2019./Friday, 7th June 2019

- 08.00 - 08.30 Registracija sudionika/Registration of participants**
08.30 - 08.45 Otvaranje simpozija/Opening ceremony

WEST NILE VIRUSNA INFKECIJA - (RE-)EMERGENTNA VIRUSNA ZOOZOZA U EUROPI

WEST NILE VIRUS INFECTION - A (RE-)EMERGING VIRAL ZOONOSIS IN EUROPE

Moderatori/Chairs: Ljubo Barbić, Vladimir Savić

- 08.45 - 09.05 Report on the West Nile virus - Interim Risk Assessment in the WHO European Region**
Elkhan Gasimov, Malaria and Other Vector-Borne and Parasitic Diseases, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark
- 09.05 - 09.25 West Nile virus infections in Slovenia**
Nataša Knap-Gašper/Miša Korva, WHO Reference Center for Arboviruses and Viral Hemorrhagic Fevers, Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia
- 09.25 - 09.45 West Nile virus infections in humans, Serbia, 2018**
Mitra Drakulović, National Public Health Institute "Dr Milan Jovanović-Batut", Belgrade, Serbia
- 09.45 - 10.05 Results of the integrated monitoring of West Nile virus in Serbia, 2018**
Tamaš Petrović, Scientific Veterinary Institute, Novi Sad, Serbia
- 10.05 - 10.25 Low West Nile virus prevalence or a need for improved surveillance in Macedonia?**
Golubinka Bosevska, Institute of Public Health, Skopje, Macedonia
- 10.25 - 10.45 Virome analysis of Culex pipiens mosquitoes West Nile and Usutu virus positive sample from Croatia**
Ivan Toplak, Veterinary Faculty University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia
- 10.45 - 11.00 Rasprava/Discussion**
- 11.00 - 11.30 Stanka za kavu/Coffee-break**

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE**LABORATORY DIAGNOSIS OF WEST NILE VIRUS INFECTION****Moderator/Chair: Tatjana Vilibić Čavlek**

- 11.30 - 11.50** *Reliable serological diagnosis of WNV infections: helping to combat WNF epidemics*
Konstanze Stiba, Lübeck, Germany
- 11.50 - 12.05** *Dijagnostika West Nile virusa u Nacionalnom referentnom laboratoriju za arboviruse, HZJZ/Diagnosis of West Nile virus, NRL for Arboviruses, CNIPH*
Tatjana Vilibić Čavlek, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
- 12.05 - 12.20** *Molekularna dijagnostika emergentnih arbovirusa u Klinici za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević"/Molecular diagnosis of emerging arboviruses - University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević"*
Ivan Christian Kurolt, Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska
- 12.20 - 12.30** **Rasprava/Discussion**
- 12.30 - 13.15** **Stanka za ručak/Lunch**

KLINIČKI ASPEKTI WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE**CLINICAL ASPECTS OF WEST NILE VIRUS INFECTION****Moderator/Chair: Marija Santini**

- 13.15 - 13.30** *Neuroinvazivne West Nile virusne infekcije u JIL-u/Neuroinvasive West Nile virus infections in the Intensive Care Unit*
Marija Santini, Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska
- 13.30 - 13.45** *Cerebelitis: rijetka klinička manifestacija West Nile infekcije/Cerebellitis: a rare clinical manifestation of West Nile infection*
Dario Sabadi/Ljiljana Perić, Klinički bolnički centar Osijek, Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska
- 13.45 - 14.00** *Opsoklonus-mioklonus sindrom uzrokovani West Nile virusom: prikaz slučaja/Opsoclonus-myoclonus syndrome caused by West Nile virus: a case report*
Sanja Zember/Dalibor Vukelić, Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska
- 14.00 - 14.15** *Fatalni slučaj West Nile meningoencefalitisa nakon transplantacije jetre/Fatal case of West Nile meningoencephalitis after liver transplantation*
Iva Košuta, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

14.15 - 14.30	<i>Retinitis uzrokovana West Nile virusom/West Nile virus retinitis</i> Suzana Konjevoda, Opća bolnica Zadar, Zadar, Hrvatska
14.30 - 14.40	Rasprava/Discussion
14.40 - 15.00	Stanka za kavu/Coffee-break

OKRUGLI STOL: WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE U KONTEKSTU "JEDNOG ZDRAVLJA"

ROUND TABLE: WEST NILE VIRUS INFECTIONS IN THE "ONE HEALTH" CONTEXT

Moderator/Chair: Josip Madić

15.00 - 15.15	<i>Epidemiologija West Nile virusne infekcije/Epidemiology of West Nile virus infection</i> Iva Pem Novosel, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska
15.15 - 15.30	<i>West Nile virus u transfuzijskoj medicini/West Nile virus in transfusion medicine</i> Ivana Babić, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicine, Zagreb, Hrvatska
15.30 - 15.45	<i>West Nile virus u bolesnika na hemodializici i nakon transplantacije bubrega/West Nile virus in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients</i> Jerko Barbić, Klinički bolnički centar Osijek, Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska
15.45 - 16.00	<i>West Nile virus u ptica u Hrvatskoj/West Nile virus in birds in Croatia</i> Vladimir Savić, Centar za peradarstvo, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska
16.00 - 16.15	<i>Praćenje West Nile virusnih infekcija u konja u Hrvatskoj/Surveillance of West Nile virus infections in horses in Croatia</i> Ljubo Barbić, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska
16.15 - 16.30	<i>Komarci - vektori West Nile virusa/Mosquitoes - vectors of West Nile virus</i> Ana Klobučar, Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar", Zagreb, Hrvatska
16.30 - 16.45	<i>Nacionalni monitoring invazivnih vrsta komaraca/National monitoring of invasive mosquito species</i> Nataša Janev-Holcer/Pavle Jeličić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska
16.45 - 17.00	<i>Cijepljenje protiv emergentnih arbovirusa/Vaccination against emerging arboviruses</i> Bernard Kaić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska
17.00 - 17.30	Rasprava/Discussion
17.30 - 18.00	Zaključci, zatvaranje simpozija/Conclusions, closing of symposium

*SIMPOZIJ s međunarodnim sudjelovanjem
SYMPOSIUM with International Participation*

*Dijagnostika i praćenje West Nile virusnih infekcija u kontekstu
"Jednog zdravlja"*

*Diagnosis and Surveillance of West Nile Virus Infections
in the "One Health" Context*

SAŽECI USMENIH IZLAGANJA

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 7. lipnja 2019.

Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, 7th June 2019

WEST NILE VIRUS INFECTIONS IN SLOVENIA

Nataša Knap, Miša Korva, Vladimir Ivović, Katja Kalan, Mateja Jelovšek, Samo Zakotnik, Martin Sagadin,
Tatjana Avšič-Županc

Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

e-mail: natas.a.knap@mf.uni-lj.si

West Nile virus (WNV) is a flavivirus transmitted by mosquitoes. Birds are reservoir for the virus, humans, horses and other mammals are dead-end hosts and do not contribute to circulation and further spread of the virus in nature. The main vectors of WNV in Europe are the *Culex pipiens* mosquitoes. Infections caused by WNV in humans can vary in the presentation, from asymptomatic infections, West Nile fever (WNF) or West Nile neuroinvasive disease (WNND). First outbreak, caused by WNV in Europe was reported in Romania in 1996, and since then cases have been reported in several European countries: Albania, Bosnia, Bulgaria, Croatia, North Macedonia, Greece, Hungary, Italy, Kosovo, Montenegro, Portugal, Romania, Russia, Serbia, Spain, Turkey, Ukraine. Slovenia is a very heterogeneous country located on the transient area between the Balkans and Central Europe. The influence of the Mediterranean and the Alps is seen in the country and affects both fauna and flora. Slovenia is a stopover for migratory birds and therefore we see significant biodiversity in bird population. In 1995 serosurvey study of various arboviruses was performed on sera samples obtained from forest workers in Slovenia in order to estimate the extent of exposure of these viruses in population at risk. WNV specific IgG antibodies were confirmed in 6.8 % of the screened samples indicating, that WNV is circulating in Slovenia. No human disease cases were detected in Slovenia until 2013, when the first human case of WNV infection in Slovenia was confirmed in a retrospective study in a 79-year old man, who was hospitalised with meningitis. In 2018 three patients with WNND were confirmed by laboratory tests, with detection of IgM antibodies in the CSF of the patients. In one of the patients, WNV RNA was detected in the urine sample and in another one, we confirmed the viral RNA in the serum of the patient. During the same period WNV infection was confirmed in a horse and a bird in Slovenia. Additionally in 2017 and 2018 mosquito study was performed in Slovenia. Mosquitoes were sampled on 4 control locations and 10 additional locations in Slovenia. No WNV was detected in mosquitoes in 2017, but we were able to confirm the virus in a pool of *Culex* sp. mosquitoes in 2018. The virus was successfully isolated and complete genome sequence was acquired by deep sequencing. The whole genome of the WNV detected in the urine sample of a patient was also sequenced. The whole genome sequences confirmed that the Slovenian virus from both the mosquitoes and the patients belongs to WNV lineage 2 and is most similar to the sequences from Austrian isolates. Though Slovenia is not a highly endemic country for WNV, we have established that the virus circulates in Slovenia and in years of the more pronounced WNV outbreaks we can detect cases of the disease in humans.

WEST NILE VIRUS INFECTION IN HUMANS IN SERBIA, 2018

Mitra B. Drakulovic¹, Verica Jovanovic¹, Jelena Protic², Dragana Plavsa¹, Uros Rakic¹, Jovanka Cosic¹,
Vedran Martinovic¹

¹National Public Health Institute "Dr Milan Jovanovic Batut", Belgrade, Republic of Serbia

²Institute of Virology, Vaccines and Sera "Torlak", Belgrade, Republic of Serbia

e-mail: mitra_drakulovic@batut.org.rs

Background:

Four surveys carried out between 2007 and 2012 in Serbia revealed presence of West Nile virus (WNV) circulation in humans, mosquitoes, birds and horses and induced implementation of enhanced WNV infection surveillance in human population 2012. Ongoing enhanced surveillance is carried out during WNV transmission season (June 1st-November 15th) and passive one, out of that time. We investigated the 2018 WNV infection onset with the aim to assess its extent and to identify risk factors associated with West Nile neuroinvasive disease (WNND) and fatal outcome.

Methods:

Information on demographic characteristics, clinical manifestations, underlying chronic medical conditions and laboratory results, were collected on standardized Case investigation form by an epidemiologist of the district Center for disease control. European Union case definition for WNV infection was used. Sera and cerebrospinal fluid specimens were tested for immunoglobulin (Ig) M and IgG against WNV by using an ELISA (anti-West Nile virus ELISA IgG and IgM Euroimmun, Luebeck, Germany). Incidence rates and crude and adjusted relative risks (RRs) with 95% Confidence intervals (CIs) were calculated.

Results:

Total of 415 cases reported, accounted for 31 (7.5%) WNV fever cases and 384 (92.5%) WNND ones. WNND cases [median age (IQR), 66 (18), years] were recorded from 16 out of 25 Serbian districts with overall incidence and mortality rates and case fatality ratio of 5.46/100,000, 0.5/100.000 and 8.8%, respectively. WNND cases occurred within 15-week time interval reaching peak between week 29 and week 34. North and Central Serbian districts were affected with incidence rates ranging between 0.22/100,000 (Raska district) and 18.84/100,000 (South Banat district). Male sex [RR 1.37, 95% CI (1.12-1.69), p<0.001], advanced age (\geq 70 years) [24.88 (14.19-42.61), p<0.0001], urban place of residence [1.66, (1.33-2.07), p<0.0001] and living in Belgrade [36.63 (5.13-261.28), p<0.01] and South Banat districts [57.65 (7.91-416.90), p<0.001], respectively, markedly augmented the risk for WNND development. Presence of diabetes mellitus [2.79 (1.13-6.87), p<0.01], congestive heart failure [6.06

(1.54-23.88), p<0.05] and ages 80 years and above [14.92 (3.75-58.82), p<0.0001] were found to independently predict the risk for WNND related fatal outcome.

Conclusions:

Our findings emphasize need for ongoing health education campaigns targeting specific susceptible populations (urban living, elderly and male) and close monitoring of hospitalized WNND patients with an underlying chronic medical condition (advanced age, congestive heart failure and diabetes mellitus). Nonetheless, integrated human, entomological and animal WNV surveillance and mosquito control programs, including source reduction and larviciding of *Culex* spp. mosquitoes in previously and newly affected districts remain cornerstones of WNV disease prevention and control in Serbia.

REZULTATI INTEGRISANOG MONITORINGA WNV U SRBIJI U 2018. GODINI

Tamaš Petrović¹, Milanko Šekler², Dušan Petrić³, Tatjana Labus⁴, Zoran Debeljak², Dejan Vidanović², Gospava Lazić¹, Milena Samojlović¹, Diana Lupulović¹, Mišo Kolarević², Sava Lazić¹, Boban Đurić⁴, Budimir Plavšić⁴

¹*Naučni institut za veterinarstvo "Novi Sad", Novi Sad, Srbija*

²*Veterinarski specijalistički institut "Kraljevo", Srbija*

³*Univerzitet Novi Sad, Poljoprivredni fakultet, Laboratorija za medicinsku i veterinarsku entomologiju, Novi Sad, Srbija*

⁴*Uprava za veterinu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede R. Srbije, Beograd, Srbija*

e-mail: tomy@niv.ns.ac.rs

Cirkulacija virusa Zapadnog Nila (West Nile virus - WNV) je konstantno prisutna u Srbiji poslednjih desetak godina. U humanoj populaciji su zabeležene veće ili manje epidemije počev od 2012. godine pa sve do danas. U populaciji životinja, prisustvo WNV je potvrđeno kod konja počev od 2009. i 2010. godine, na osnovu seroloških nalaza, a kod divljih ptica 2011. i 2012. godine WNV je izolovan i u potpunosti genetski tipiziran. U komarcima vektorima WNV je prvi put detektovan u Srbiji 2010. godine. Od juna 2018. godine Veterinarska služba u Srbiji je pokrenula nacionalni program monitoringa WNV, koji je predstavljao nastavak programa monitoringa iz 2014., 2015. i 2017 godine. Program je finansiran od strane Uprave za veterinu, a sprovodila ga je terenska veterinarska služba i naučni i specijalistički veterinarski Institut u saradnji sa entomolozima i ornitologozima. Cilj programa monitoringa je bila rana detekcija prisustva WNV na nekom području i pravovremeno alarmiranje humane zdravstvene službe i lokalnih samouprava radi sprovođenja mera kontrole (suzbijanja komaraca) i informisanja stanovništva.

Program monitoringa WNV se zasnivao na indirektnom i direktnom praćenju prisustva WNV u prirodi. Indirektno praćenje virusa se vršilo serološkim testiranjem konja na prisustvo IgM antitela protiv WNV kao potvrda akutne infekcije i cirkulacije WNV. Direktno praćenje se vršilo ispitivanjima uzoraka briseva i tkiva divljih ptica, kao i zbirnih uzoraka komaraca (isključivo vrste *Culex pipiens*) na prisustvo WNV molekularnim dijagnostičkim metodama u aktivnom i uzoraka na bolest suspektnih konja u pasivnom nadzoru. Broj uzoraka za ispitivanje je određen po okruzima na osnovu visine rizika od pojave infekcije WNV, a u odnosu na pojave bolesti i cirkulaciju virusa u prethodnim godinama.

U periodu jun-septembar 2018. na području R. Srbije je po programu ispitano 2511 krvnih serumu konja od čega je kod 44 (1,75%) utvrđeno prisustvo IgM antitela protiv WNV. Seroprevalenca je bila u uzlaznoj liniji sa povećanjem aktivnosti vektora. Pozitivan serološki odgovor kod konja je utvrđen u junu kod 1,19% (7/587), u julu kod 2,77% (18/648), u avgustu kod 2,16% (14/646) i u septembru kod 0,79% (5/630) testiranih konja. Broj okruga u kojima je detektovan pozitivni serološki odgovor je bio 4 u junu, 8 u julu, 7 u avgustu i 3 u septembru. U direktnom praćenju prisustva virusa WNV je ispitano 802 zbirnih uzoraka (pulova) komaraca i WNV je potvrđen u 98 (12,21%) uzorka. Virus je vrlo rano detektovan i to u visokom procentu testiranih uzoraka komaraca. Prevalenca nalaza WNV u komarcima je iznosila

8,82% u junu (15/170; što je ujedno bilo i prvo testiranje); zatim 15,05% (59/392) na WNV pozitivnih uzoraka je utvrđeno u julu, 11,42% (24/210) u avgustu i 0% (0/30) je detektovano u septembru 2018. godine. Pozitivni uzorci komaraca na WNV su detektovani u 13 od 25 okruga, pri čemu je 17,91% pozitivnih od ispitanih uzoraka utvrđeno u Južnobačkom, 19,05% u Severnobanatskom, 21,33% u Zapadnobačkom, 21,82% u Severnobačkom, 22,72% u Južnobačkom, 25% u Mačvanskom i 26,42% u Srednjebanatskom okrugu, 24,39% VNV pozitivnih pulova je detektovano na području Beograda i ≤ 10% pozitivnih u odnosu na ispitani broj uzoraka je utvrđen u Sremskom, Podunavskom, Pomoravskom, Raškom i Moravičkom okrugu. Od 155 uzorka uginulih divljih ptica, WNV je utvrđen kod 18 (11,61%) jedinki sa područja 8 okruga. WNV je takođe detektovan u 13 (6,56%) od 198 ispitanih uzoraka ždrelnih briseva živih divljih ptica na području 5 okruga, dok ispitivanjem 12 uzorka odstreljenih divljih ptica sa područja 1 okruga WNV nije utvrđen. Divlje ptice kod kojih je utvrđeno prisustvo WNV su bile: sive vrane, vetroške, svrake, senica, kos, kreja i sova ušara.

Program monitoringa WNV se tokom 2018. godine pokazao kao uspešan i svrshodan i neophodno ga je nastaviti i unaprediti u narednom periodu u cilju pravovremene zaštite zdravlja ljudi i životinja. Veterinarska struka je zajedno sa kolegama entomolozima i ornitolozima uspela da integrisanim pristupom uspešno sprovede program praćenja infekcije WNV i da o rezultatima monitoringa konstantno i u realnom vremenu obaveštava epidemiološku službu. S obzirom na dosadašnje podatke može se realno pretpostaviti da će, sada već endemska prisutna infekcija virusom WNV na području Srbije, predstavljati i dalje značajan problem veterinarskog i javnog zdravlja. Jedino integrisani pristup praćenja WNV koji je sprovodila veterinarska služba može dati sve potrebne odgovore za mere preventive i kontrole ove virusne zoonoze.

Zahvalnica: Ispitivanja su finansirana od strane Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, a delom su realizovana i kroz projekat TR31084 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

VIROME ANALYSIS OF *CULEX PIPiens* MOSQUITOES WEST NILE AND USUTU VIRUS POSITIVE SAMPLE FROM CROATIA

Ivan Toplak¹, Urška Kuhar¹, Urška Jamnikar Ciglenečki², Vladimir Savić³, Ana Klobučar⁴, Sandra Vrtarić³, Ljubo Barbić⁵, Tatjana Vilibić-Čavlek⁶

¹University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Institute of Microbiology and Parasitology, Ljubljana, Slovenia

²University of Ljubljana, Veterinary Faculty, Institute for Food Safety, Feed and Environment, Ljubljana, Slovenia

³Croatian Veterinary Institute Zagreb, Croatia

⁴Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

⁵University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb, Croatia

⁶Croatian Institute of Public Health; School of Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

e-mail: ivan.toplak@vf.uni-lj.si

Abstract: Surveillance of animal and human viruses to determine the composition and proportion of circulating viruses in specific mosquitoes in a selected region is a necessary challenge for formulating strategies on prediction, preparedness, prevention, and eventual control of emerging viral diseases. Ion Torrent high-throughput next-generation sequencing (NGS) technology was used to determine virome in one selected pool mosquitoes (*Culex pipiens*) sample. Our results showed that mosquito sample contains 15,526 reads (1.9 % of total reads) belonging to viruses. Virus sequences from six different virus families and two unclassified viruses were identified. The NGS technology was able to detect Usutu virus (USUV) reads, with 99.26 to 100 % nucleotide identity with USUV strains detected in Austria (MF063042), Hungary (MF063043) and Italy (KU573074), while West Nile virus (WNV) was not detected in the tested sample of mosquitoes. This is the first attempt to determine the virome in mosquito sample by NGS in our territory.

Introduction: Blood-feeding arthropods are known vectors of viruses that are a source of unprecedented global health concern. Specifically, the mosquito is a blood-feeding arthropod, known to feed on different hosts, and is an efficient vector for a multitude of virulent pathogens. Advancements in next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics have expanded our knowledge on the richness of viruses harbored by arthropods. A pooled sample of 40 mosquitoes (*Culex pipiens*) collected in the summer 2018 on location of Zagreb (Jarun), Croatia (with the name 102) was tested first with the real-time RT-PCR method for the presence of West Nile virus (WNV) and gave a cycle threshold (Ct) value of 29. Since this method provides cross reactions with Usutu virus (USUV), the same sample was tested by the specific real-time RT-PCR method for USUV and gave a Ct value of 20. Therefore, our objective was to determine the virome in mosquito WNV and USUV positive sample by Ion Torrent NGS method.

Materials and Methods: The RNA was extracted from sample suspensions with Trizol reagent. The cDNA was synthesized from the extracted nucleic acids and fragmented with Covaris M220. The library was prepared and sequenced on the Ion PGM platform. Sequenced reads were quality checked and trimmed using the Ion Torrent Suite. Additionally, low quality bases were trimmed with Geneious

software suite (Biomatters Ltd., New Zealand). Clean reads were assembled into contigs by *de novo* assembly, using the SPAdes v3.1.0. Clean reads and contigs were subjected to BlastX and BlastN search. The BlastX and BlastN results were analyzed with MEGAN6 for the taxonomic assignment of the reads using the Lowest Common Ancestor (LCA) algorithm.

Results and Discussion: A total of 817,573 (mean length of 184 nucleotides) clean reads were obtained from the sample. The BlastX and BlastN search identified 15,526 reads (1.9 % of total reads) belonging to viruses. Other reads belonged to cellular organisms, to other sequences and to unassigned sequences. Most of the virus sequences were assigned to viruses infecting mosquitoes. Virus sequences belonging to six different virus families and also to unclassified viruses were identified, including dsDNA and ssRNA viruses of insect, bacterial and mammalian origin. Bacteriophages belonging to family *Myoviridae* (39 reads) and insect viruses belonging to *Nudiviridae* (64 reads), which are dsDNA viruses, were detected in the sample. The ssRNA (+) virus sequences were predominantly from mosquitoes viruses within *Picornaviridae* family (12,067 reads). Other ssRNA (+) virus sequences belonged to mosquitoes viruses from *Mesoniviridae* (2,409 reads) and *Nodaviridae* (1,171 reads) families and also to mammalian virus from *Flaviviridae* family, namely to the USUV (31 reads). Determined reads of USUV have from 99.26 to 100 % nucleotide identity with USUV strains detected in Austria (MF063042), Hungary (MF063043) and Italy (KU573074). Virus sequences with most homology to an unclassified ssRNA (-) virus (916 reads) and to an unclassified RNA virus (191 reads), both of mosquito origin, were also detected in the sample. Although, using NGS technology with metagenomic approach, WNV was not detected in the sample, probably because of low copy numbers (Ct 29) or cross reactivity of real-time RT PCR method with USUV, this technology was able to detect USUV and several viruses infecting mosquitoes.

Acknowledgements: This study was supported by Slovenian Research Agency, project J4-8224 and Croatian Science Foundation, project IP-2016-06-7456; CRONEUROARBO.

RELIABLE SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF WNV INFECTIONS: HELPING TO COMBAT WNF EPIDEMICS

Konstanze Stiba

Euroimmun, Lübeck, Germany

e-mail: k.stiba@euroimmun.de

According to a publication from the European Centre for Prevention and Control of Diseases (ECDC), the total number of West Nile fever (WNF) cases in Europe in 2018 far exceeded the total number of cases for the past five years.

West Nile virus (WNV) belongs to the most widely distributed flaviviruses. WNF, caused by WNV, is a zoonosis endemic on all continents. The virus is distributed in Africa, Israel, West Turkey, the Middle East, India, parts of Southeast Asia and now also in North America and parts of Central America. In Europe, there have been seasonal outbreaks or isolated transmissions.

WNV is mainly transmitted to birds living in the wild by a number of mosquitoes (mainly species of the genus *Culex*, but also *Aedes* and *Mansonia*). Infected mosquitoes may also pass the virus on to mammals (mostly horses) or humans. WNF outbreaks are closely related to favorable conditions for the vectors. Frequently, an increased number of cases in horses or birds raises awareness and leads to closer monitoring of possible transmissions to humans.

In 2018, more than 2000 cases of WNF in humans were registered in Europe, e.g. in Italy, Greece, Rumania, Hungary, Croatia, France, Austria, Bulgaria, Slovenia and Czech Republic (ECDC, as of 13 December 2018). In 2017, in contrast, only 260 cases of WNF were reported in Europe. Of the human WNF cases in 2018, around 180 were fatal. There has also been an increase in WNV infections in horses in Europe compared to the previous year.

WNV infections are diagnosed by direct virus detection or the detection of specific antibodies. Since IgM antibodies may persist over a longer period of time, the additional determination of low-avidity IgG antibodies is recommended for the differentiation of acute and past infections.

EUROIMMUN offers different human and veterinary diagnostic products based on ELISA and indirect immunofluorescence technology for the detection of anti-WNV antibodies of classes IgG and IgM.

DIJAGNOSTIKA WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE U NACIONALNOM REFERENTNOM LABORATORIJU ZA ARBOVIRUSE, HRVATSKI ZAVOD ZA JAVNO ZDRAVSTVO

Tatjana Vilibić Čavlek^{1,2}, Vladimir Savić³, Irena Tabain¹, Maja Bogdanić¹, Ljiljana Milašinčić¹, Snježana Artl¹,
Ljiljana Antolašić¹, Nataša Bauk¹, Ljubo Barbić⁴, Vladimir Stevanović⁴, Eddy Listeš⁵, Giovanni Savini⁶

¹*Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

²*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

³*Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska*

⁴*Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

⁵*Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Split, Split, Hrvatska*

⁶*OIE Reference Center for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale",
Teramo, Italija*

e-mail: tatjana.vilibic-cavlek@hzjz.hr

Dijagnostika WNV infekcije provodi se izravnim (izolacija, molekularna dijagnostika) i neizravnim metodama (serološka dijagnostika) (tablica).

WNV se može izolirati iz krvi/seruma, cerebrospinalnog likvora (CSL) i postmortalno dobivenih uzoraka tkiva. Za izolaciju su najpogodnije stanične kulture majmunskog bubrega (Vero) i bubrega kunića (RK-13) u kojima virus stvara citopatski učinak. Prisustvo WNV u kulturi stanica dokazuje se metodom imunofluorescencije (IF) i lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse-transcriptase polymerase-chain reaction*; RT-PCR).

WNV RNA može se dokazati u uzorcima krvi/plazme/seruma, CSL, urina i uzorcima tkiva. Dvije su inačice ove metode: klasični RT-PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu. U usporedbi s klasičnom RT-PCR metodom, metoda RT-PCR u stvarnom vremenu ima veću osjetljivost, kvantitativna je te je manja mogućnost kontaminacije uzorka. Najveću osjetljivost pokazuje "nested" RT-PCR metoda, no i najveći rizik od križne kontaminacije.

Dijagnostika infekcije WNV većinom se provodi serološkim metodama (detekcija protutijela u serumu i CSL). Budući da ne prolaze hematoencefalnu barijeru, nalaz IgM protutijela u CSL smatra se dijagnostički značajnim. Metodom neizravne IF također je moguće razlikovati IgM i IgG protutijela, no ovaj je test nešto manje osjetljivosti od ELISA testa. Zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima, pozitivan nalaz ELISA testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testovima (virus neutralizacijski test; VNT, neutralizacijski test redukcije plakova; PRNT). U serološkoj se dijagnostici koristi i određivanje aviditeta IgG protutijela. Budući da IgM protutijela mogu u oko 36% oboljelih perzistirati duže od godine dana, a opisana je i perzistencija IgM u likvoru, određivanjem IgG aviditeta moguće je razlikovati nedavnu WNV infekciju (nizak aviditet) u bolesnika s dugom perzistencijom IgM protutijela (visok aviditet).

Testovi koji se koriste u dijagnostici WNV infekcije u Nacionalnom referentnom laboratoriju za arboviruse, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo prikazani su u tablici (*). U suradnji s Hrvatskim

veterinarskim institutom (Centar za peradarstvo), uzorci s dokazanom WNV RNA testiraju se "nested" RT-PCR metodom te sekvenciraju. Uzorci s dokazanim križno-reaktivnim protutijelima šalju se na potvrdu neutralizacijskim testom u OIE Reference Center for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italija.

Metode koje se koriste u dijagnostici WNV infekcije (ECDC)

	Uzorci: serum, plazma, CSL, tkiva
NEIZRAVNA DETEKCIJA	ELISA (IgM, IgG, IgG aviditet)* IFA* Neutralizacijski testovi (VNT, PRNT)
IZRAVNA DETEKCIJA	RT-PCR* Izolacija virusa Imunohistokemijske metode

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA EMERGENTNIH ARBOVIRUSA U KLINICI ZA INFЕKTIVNE BOLESTI "DR FRAN MIHALJEVIĆ"

Ivan-Christian Kurolt, Mihaela Kordun, Alemka Markotić

Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska

e-mail: ikurolt@bfm.hr

Svjetska zdravstvena organizacija je definirala emergentne ili re-emergentne infektivne bolesti kao novootkrivene infektivne bolesti ili one u kojih se nedavno znatno povećala incidencija ili proširio geografski, vektorski ili domaćinski raspon. U prošlim 70 godina prepoznato je više od 400 emergentnih ili re-emergentnih infektivnih bolesti i velika većina su zoonoze koje prenose razni vektori, prvenstveno člankonošci (komarci i krpelji) te sitni glodavci. Arbovirusi, ne-sistematska klasifikacija prema prijenosnicima, člankonošcima, su značajni uzročnici i javnozdrastveni problem i znaju povremeno uzrokovati epidemije u raznim europskim zemljama. U prošlim 20 godina virus Zapadnog Nila se proširio južnom Europom i broj oboljelih raste iz godinu u godinu.

Endemska područja, vektori i kliničke slike pojedinačnih bolesti mogu se preklapati što otežava diferencijalnu dijagnostiku. Uz to srodnost flavivirusa čini serološku dijagnostiku iznimno zahtjevnu zbog čega je molekularna dijagnostika metoda izbora tijekom viremije koja omogućava točnu identifikaciju uzročnika. Kao kod nekih drugih flavivirusa se osim serum-a urin pokazao kao iznimno cijenjen dijagnostički materijal, pogotovo u kasniji fazi bolesti kod infekcije virusom Zapadnog Nila.

Od 2010. godine u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" postepeno se uvodila molekularna dijagnostika za različite uzročnike emergentnih ili re-emergentnih infektivnih bolesti prema potrebama struke i epidemiološkim događanjima. Najveći broj pretraga u Hrvatskoj otpada na endemski virus Zapadnog Nila i uzročnike hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom, dok se većina ostalih pretraga vrši kod gostujućih turista ili hrvatskih državnjana nakon povratka iz inozemstva.

Zbog procijenjenog velikog broja asymptomatskih infekcija virusom Zapadnog Nila pod posebnim pritiskom su Zavodi za transfuzijsku medicinu i transplantacijski centri, zato što unos zaraženih organa ili krvnih pripravka ima poražavajući učinak na pacijenta pod imunosupresivnom terapijom.

NEUROINVAZIVNE WEST NILE VIRUSNE INFEKCIJE U JIL-U

Marija Santini^{1,2}, Sara Haberle, Klaudija Višković¹, Tatjana Vilibić Čavlek^{2,3}

¹*Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska*

²*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

³*Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

e-mail: msantini@bfm.hr

Neuroinvazivna West Nile virusna (NI WNV) bolest predstavlja rijetko, ali teško očitovanje WNV infekcije. Na ovaj način oboli manje od 1% bolesnika. Rizični čimbenici za pojavu NI WNV infekcije su starija životna dob, kronične bolesti (šećerna bolest, hipertenzija) te imunosupresija (najčešće zbog transplantacije solidnih organa). NI WNV infekcija najčešće se očituje sindromom meningoencefalitisa, mijelitisa ili flakcidne pareze. Kako je u Hrvatskoj 2018. godine zabilježena do sada najveća epidemija WNV bolesti, u ovom radu želimo prezentirati ključne značajke bolesnika s teškim oblikom NI WNV infekcije koji su liječeni u Zavodu za intenzivno liječenje i neuroinfektologiju Klinike za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević" u Zagrebu tijekom navedenog epidemiskog razdoblja. Liječeno je 12 bolesnika, od toga 8 muškaraca, medijan dobi iznosio je 73 (minimum 59, maksimum 84) godine. Pet bolesnika su bili iz Grada Zagreba, 2 iz Zagrebačke, te po jedan bolesnik iz Karlovačke, Međimurske, Koprivničko-Križevačke, Varaždinske i Virovitičke Županije. Polovica bolesnika su stanovnici prigradskih naselja, dok su polovica bili stanovnici gradova. Za dvojicu bolesnika je bilo poznato da su 4 tjedna ranije putovali (iz Ohio, SAD i u Bosansku Gradišku, BIH). Niti jedan bolesnik nije imao podatak o prethodnom cijepljenju protiv krpelnog meningoencefalitisa i/ili žute groznice. Većina bolesnika su naveli komorbiditete, od kojih su najčešći bili arterijska hipertenzija (11/12), šećerna bolest (4/12) i hiperlipidemija (3/12). Dvojica bolesnika su imali transplantiran bubreg (4 tjedna ranije i 5 godina ranije) te su primali imunosupresiju. Vrijeme od pojave prvih simptoma do hospitalizacije iznosilo je medijan 5 (minimum 1, maksimum 13) dana. Najčešći klinički simptomi bili su vrućica (12/12), kvantitativni poremećaj svijesti (6/12), gastrointestinalni simptomi (6/12), glavobolja (4/12) te opća slabost (4/12). Svi bolesnici su se prezentirali kliničkom slikom meningoencefalitisa. Tijekom liječenja u intenzivnoj jedinici 8 bolesnika su intubirani i mehanički ventilirani, medijan trajanja mehaničke ventilacije bio je 14.5 dana (minimum 5, maksimum 73 dana). Medijan trajanja hospitalizacije u JIL-u iznosio je 24.5 dana (minimum 4, maksimum 73 dana), dok je medijan trajanja ukupne hospitalizacije iznosio 51.5 dan (minimum 19, maksimum 97 dana). Dva bolesnika su preminula tijekom liječenja u JIL-u. Medijan Glasgow outcome score (GOS) kod otpusta iz JIL-a izosio 3 (minimum 3, maksimum 4). Karnofsky performance score iznosio je median je 40% (minimum 30% do 70%).

Zaključno se može reći da je u RH, NI WNV bolest rijetka, uglavnom pogađa bolesnike starije životne dobi sa značajnim komorbiditetima (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, stanje nakon transplantacije bubrega). Ovi bolesnici često imaju potrebu za intenzivnim liječenjem, intubacijom, produženom mehaničkom ventilacijom, dugim boravkom u JIL-u i dugotrajnom hospitalizacijom te

kasnijom medicinskom rehabilitacijom. Dakle, radi se o bolesti koja bolesnike može teško pogoditi, životno ugroziti te koja predstavlja veliki izazov za liječenje.

CEREBELITIS: RIJETKA KLINIČKA MANIFESTACIJA WEST NILE INFEKCIJE

Dario Sabadi^{1,2}, Ljiljana Perić^{1,2}, Mario Duvnjak^{1,2}, Ilija Rubil^{1,2}, Barbara Grubišić^{1,2}, Vedrana Radočaj², Ivana Jovanovac³, Zdravka Adamović³, Tatjana Vilibić Čavlek^{4,5}, Vladimir Savić⁶, Ljubo Barbić⁷, Irena Tabain⁴, Vladimir Stevanović⁷, Eddy Listeš⁸, Giovanni Savini⁹

¹*Medicinski fakultet Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska*

²*Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska*

³*Odjel za infektologiju, Opća županijska bolnica Vinkovci, Vinkovci, Hrvatska*

⁴*Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

⁵*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

⁶*Hrvatski veterinarski institute, Zagreb, Hrvatska*

⁷*Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

⁸*Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Split, Split, Hrvatska*

⁹*OIE Reference Center for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italy*

e-mail: dariocroatia@gmail.com

Prema dostupnim literaturnim podatcima, do sada su opisana samo dva slučaja cerebelitisa u dječjoj dobi uzrokovanih West Nile virusom (WNV) u Sjedinjenim Američkim Državama.

U ovom radu prikazan je slučaj cerebelitisa uzrokovanih WNV u prethodno zdrave, šestogodišnje djevojčice iz istočne Slavonije. Djevojčica je hospitalizirana u četvrtom danu bolesti manifestirane svakodevnim febrilitetom do 39°C, uz opću slabost, malaskalost te razvojem difuzne glavobolje, fotofobije, nistagmusa, diplopije i ataktičnog hoda dan prije hospitalizacije. Prethodno je boravila u prirodi i bila izložena višekratnim ubodima komaraca.

Pri pregledu bila je febrilna, dehidrirana, bistre svijesti, urednog kontakta, ataktičnog hoda na širokoj osnovi uz javljanje dvoslika te vidljivog nistagmusa. Po koži potkoljenica je bilo vidljivo nekoliko makulopapula (ubodi komaraca). Meningitički znaci su bili terminalno pozitivni uz uredan fizikalni nalaz usne šupljine, srca, pluća i trbuha. Hematološke i biokemijske pretrage krvi bile su u referentnim vrijednostima: Lkc 7.1[x10⁹/L], Erc 4.19[x10¹²/L], Trc 211[x10⁹/L], SE 4[mm/3.6 KS], CRP(s) 0.3[mg/L], AST(GOT) 26[U/L], ALT(GPT) 16[U/L], GGT 6[U/L], UREA 5,6[mmol/L], CRE(s) 46[umol/L].

Magnetskom rezonancijom (MRI) mozga verificirana je nespecifična punktiformna zona hiperintenziteta signala u TIRM-u cerebelarno lijevo veličine oko 3mm.

Učinjena je lumbalna puncija te se makroskopski dobio bistar likvor. Biokemijskom analizom likvora utvrđeno je 82[x10⁶/L] leukocita (30% limfocita, 15% monocita i 55% nesegmentiranih granulocita) uz blažu proteinorahiju.

Oduzeti su uzorci seruma, likvora i urina za virološku dijagnostiku. Analiza likvora na HSV i enterovirusu pokazala je negativan rezultat. U parnim uzorcima seruma dokazana je dinamika titra protutijela na WNV u ELISA testu i virus neutralizacijskom testu kao i prisustvo WNV IgM i IgG protutijela u likvoru čime je potvrđena dijagnoza WNV infekcije (tablica).

Rezultati viroloških pretraga na WNV

Uzorak	Dan bolesti	Pretraga	Rezultat	Referentne vrijednosti
Serum	13	ELISA IgM/IgG	3,64/66,79	ELISA - Omjer; >1.1 pozitivan/RU/ml >22 pozitivan AI -<40% nizak
	13	IgG aviditet (AI)	13%	
	13	VNT (titar)	5	
	21	ELISA IgM/IgG	3,26/150,01	
	21	VNT (titar)	20	
Likvor	13	ELISA IgM/IgG	1,47/29,94	ELISA - Omjer; >1.1 pozitivan/RU/ml >22 pozitivan
Likvor	13	RT-PCR	Negativan	
Urin	13	RT-PCR	Negativan	

Započeta je inicijalna antimikrobna terapija ceftriaksonom i aciklovirom i.v. uz antiedematoznu i drugu suportivnu terapiju do prispjeća mikrobiološke obrade uzorka seruma, likvora i urina te se nastavila simptomatska terapija do otpusta kući.

Djevojčica je hospitalno liječena 14 dana. Tijekom boravka, prvih 5 dana febrilna do subfebrilna, a u dalnjem tijeku afebrilna. Postupno je došlo do regresije kliničkih pokazatelja infekcije te je otpuštena kući. Period rekonvalescencije protekao uredno (klinički kontrolirana kroz 4 mjeseca, MRI mozga 4 mjeseca od otpusta iz bolnice je bio uredan).

Zahvala: Ovaj rad finansirala je Hrvatska zaklada za znanost, projekt IP 2016-06-7456: Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske; CRONEUROARBO (voditeljica: doc.dr.sc. Tatjana Vilibić Čavlek).

PRKAZ SLUČAJA OPSOKLONUS-MIOKLONUS SINDROMA UZROKOVANOG WEST NILE VIRUSOM

Sanja Zember, Dalibor Vukelić

Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Hrvatska

e-mail: zember.sanja@gmail.com

Opsoklonus-mioklonus sindrom (OMS) rijedak je klinički entitet koji se prezentira opsoklonusom, mioklonusom i ataksijom. Opsoklonus je karakteriziran visokofrekventnim oscilacijama očiju, od 10 do 25 Hz, u horizontalnom ili vertikalnom smjeru uz amplitude od 18° do 58°. Ti nevoljni i brzi trzaji očnih jabučica pojačavaju se pri pokušaju gledanja nekog predmeta, a mogu biti praćeni nevoljnim, brzim, kratkotrajnim trzajima udova ili trupa koje nazivamo mioklonusom. U kliničkoj prezentaciji ovog sindroma može biti prisutna i cerebelarna ataksija, tremor i encefalopatija, a bolesnici mogu imati poremećaj spavanja, kognitivna oštećenja i poremećaje u ponašanju. Etiologija OMS-a u odraslih varira i uključuje parainfektivne, paraneoplastične, toksično-metaboličke i idiopatske uzroke. Sindrom se može pojaviti u kombinaciji sa širokim spektrom infekcija uzrokovanih različitim uzročnicima poput virusa (gripa, varičela-zoster, humani herpes virus 6, HIV, enterovirusi, Epstein-Barr, Citomegalovirus, Coxsackievirusi, virus zapadnog Nila - WNV) ili bakterija (Borrelia, Salmonella, Mycoplasma pneumoniae) te kao poststreptokokni sindrom.

Prema našem saznanju prikazana bolesnica je 15. slučaj OMS-a povezanog s WNV-encefalitisom koji je do sada zabilježen u literaturi.

Prikaz slučaja

Sedamdesetogodišnja žena primljena je na naš odjel desetog dana aktualne bolesti koja se je prezentirala povišenom tjelesnom temperaturom bez pridružene zimice i tresavice te je kašljala prva četiri dana bolesti. Nakon afebrilnog perioda od dva dana, postala je ponovno febrilna te je imala pridruženu glavobolju, mučninu, povraćanje i proljev. Obzirom na inicialno prisutne respiratorne simptome, ordiniran je azitromicin po obiteljskom liječniku uz preporuku antipireze. Iz anamneze izdvaja se podatak da je bolesnica bolovala od arterijske hipertenzije te je 2014. godine histerekтомirana zbog adenokarcinoma endometrija, a prema patohistološkoj dijagnozi tumor nije infiltrirao miometrij niti je bilo limfovaskularne infiltracije. Postoperativno učinjena magnetska rezonanca (MR) abdomena i zdjelice bila je uredna i nije bilo potrebe za dodatnom terapijom. Iz epidemiološke anamneze izdvaja se podatak da je bolesnica zadobila nekoliko uboda insekata, najvjerojatnije ujeda komaraca, tijekom boravka u jednom od zagrebačkih parkova, u blizini mjesta stanovanja.

Drugi dan hospitalizacije, bolesnica se je žalila na intenzivnu glavobolju te je imala nevoljne trzaje mišića gornjih ekstremiteta, tremor, vrtoglavicu i ataksiju. Također su uočeni nevoljni i brzi trzaji očnih jabučica koji su se pojačavali pri pokušaju gledanja nekog predmeta. Bolesnica je bila subfebrilna, pri svijesti i orijentirana, ali se nije mogla održati u sjedećem položaju.

Učinjenom laboratorijskom obradom verificirane su niske vrijednosti upalnih parametara uz blaže povišen bilirubin, aminotransferaze, gama-glutamiltransferazu, laktat-dehidrogenazu i kreatinin-kinazu. Kompjuteriziranom tomografijom (CT) mozga dokazana je samo umjerena atrofija mozga. Analizom cerebrospinalnog likvora, utvrđena je pleocitoza od 65 leukocita / mm³, blaža proteinorahija (0,48 g/L) i normalna razina glukoze. Elektroencefalogram (EEG) bio je difuzno usporene aktivnosti. Liječenje je empirijski započeto aciklovirom, ampicilinom i ceftriaksonom. Antimikrobna terapija je prekinuta nakon dobivenog negativnog rezultata reverzne transkriptaze/lančane reakcije polimeraze (RT-PCR / PCR) likvora na herpes simplex virus 1/2, varicella-zoster virus, enterovirus, *L. monocytogenes*, kao i negativnog serološkog nalaza na *B. burgdorferi* i virus krpeljnog meningoencefalitisa te sterilnog nalaza bakteriološke obrade likvora.

U svrhu isključenja paraneoplastične etiologije OMS-a, učinjena je radiološka obrada pluća, ultrazvuk abdomena, CT snimke prsnog koša, trbuha i zdjelice, kao i nalazi tumorskih i imunoloških markera, a rezultat kojih je bio negativan. Etiološki je dokazan pozitivan nalaz IgM i IgG protutijela na WNV. Protutijela IgM i IgG na WNV su dokazana u parnim uzorcima seruma korištenjem komercijalnog ELISA testa (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA; Euroimmun, Lübeck, Njemačka). U prvom uzorku seruma, uzetog 14. dana bolesti, dokazana su oba protutijela IgM (omjer 3,37; pozitivan > 1,1) i IgG (31,59 RU/ml; pozitivan >22) s niskom avidnošću (indeks avidnosti 7%; nizak <40%), a što je bio dokaz akutne WNV infekcije. Također je, 13. dan bolesti, dokazana WNV RNA u urinu. U parnom uzorku seruma, uzetom 22. dana bolesti, dokazana je visoka razina IgM protutijela (odnos 4,25) kao i povećanje razine IgG protutijela (138,37 RU/ml).

Nakon pet tjedna od početka bolesti, pratimo regresiju opsoklonusa, mioklonusa, vrtoglavice i ataksije. Drugi nalaz EEG-a pokazao je usporen moždanu aktivnost. Bolesnica je otpuštena sedam tjedana nakon prijema u bolnicu te je bila pokretna uz pridržavanje. Na kontrolnom pregledu, učinjenom dva mjeseca nakon otpusta, neurološki status bio je uredan uz potpuni oporavak neuroloških simptoma.

OMS koji je uzrokovan WNV rijedak je klinički entitet WNV infekcije. Kako bi se razvile preventivne strategije i optimalni pristup liječenju OMS-a, nužno je razjasniti mehanizme koji iniciraju i održavaju autoimune odgovore. OMS povezan s WNV-om ima benigni klinički tijek i većina bolesnika se gotovo potpuno oporavi nakon nekoliko mjeseci od početka bolesti.

FATALNI SLUČAJ WEST NILE MENINGOENCEFALITISA NAKON TRANSPLANTACIJE JETRE

Iva Košuta

Klinika za unutarnje bolesti, Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

e-mail: ivakosuta@gmail.com

Uvod: Infekcija West Nile virusom u 70-80% postoji slučajeva subkliničkog je tijeka, dok preostalih 20-30% oboljelih razvijaju simptome nalik gripi uz povišenu tjelesnu temperaturu, glavobolju, slabost te bolove u mišićima i zglobovima. U tek manje od 1% oboljelih razvija se neuroinvazivni oblik bolesti uz znakove meningitisa ili encefalitisa. Rizik razvoja najtežeg neuroinvazivnog oblika povišen je kod osoba starijih od 70 godina kao i imunokompromitiranih pacijenata. Slijedi prikaz bolesnice koja je u ranom postoperativnom razdoblju nakon transplantacije jetre i splenektomije razvila neuroinvazivnu infekciju West Nile virusom.

Prikaz slučaja: 61-godišnja pacijentica transplantiрана je zbog dekompenzirane ciroze jetre nastale na podlozi primarnog bilijarnog kolangitisa. Zbog od ranije poznate imunotrombocitopenije u istome aktu učinjena je i splenektomija. Neposredni postoperativni tijek protekao je uredno te je pacijentica otpuštena kući deset dana nakon transplantacije uz standardni imunosupresivni režim koji je uključivao glukokortikoid, mofetil mikofenolat i kalcineurinski inhibitor-ciklosporin. Četiri dana po otpustu pacijentica se javila u hitnu službu zbog pojave povišene tjelesne temperature. Nije navodila druge simptome koji bi upućivali na izvoriste infekcije, fizikalni nalaz bio je neupadan, a u laboratorijskim nalazima evidentirani su minimalno povišeni upalni parametri. Radiološki je postavljena sumnja na desnostranu upalu pluća te je propisana terapija moksifloksacinom, usprkos čemu je narednih dana perzistirala povišena tjelesna temperatura uz pojavu glavobolje i slabosti. Bolesnica je hospitalizirana, eskalirana je antibiotska terapija u piperacilin s tazobaktamom, a daljinjom obradom (UZV jetrenog presatka/abdomena, PCR na CMV DNA, ponavljanje hemokulture i urinokultura) nije pronađen izvor infekcije. Usprkos antibiotskoj terapiji širokog spektra, redukciji imunosupresije i suportivnim mjerama liječenja kliničko stanje pacijentice se pogoršavalo uz pojavu intenzivnih glavobolja i somnolencije. MSCT-om glave isključeno je akutno intrakranijalno zbivanje te je zbog sumnje na meningoencefalitis uključena je specifična antiviralna i antibiotska terapija (vankomicin+meropenem+aciklovir). U datome trenutku nije učinjena lumbalna punkcija zbog pacijentičinog pismenog protivljenja. Četvrtog dana hospitalizacije došlo je do dalnjeg kliničkog pogoršanja uz razvoj sopora te je pacijentica preseljena u u Jedinicu intenzivne nege (JIL). Daljnji tijek liječenja komplikiran je razvojem pneumonije i akutne respiratorne insuficijencije zbog čega je pacijentica intubirana i pripojena na mehaničku ventilaciju. Lumbalna punkcija učinjena je po prijemu u JIL, s neupadnim biokemijskim i citološkim karakteristikama likvora, isključen je bakterijski meningoencefalitis. U virusološkoj obradi dokazan je IgM na krpeljni meningoencefalitis, a s obzirom da pacijentica nije bila izložena ugrizu krpelja u dogovoru sa virusologom i infektologom proširena je obrada na West Nile groznicu. qRT-PCR testom u

mononuklearnim stanicama periferne krvi i u urinu dokazana je WNV RNA čime je potvrđena infekcija West Nile virusom.

Usprkos poduzetim potpornim mjerama liječenja-značajnoj redukciji imunosupresije, liječenju nozokomijalnih infekcija kao komplikacija prolongiranog boravka u jedinici intenzivne njage, nije došlo do oporavka stanja svijesti pacijentice koja je nakon 63 dana hospitalizacije preminula pod kliničkom slikom septičkog šoka i pneumonije.

Zaključak: Dok u imunokompetentnoj populaciji menje od 1% oboljelih razvija neuroinvazivni oblik bolesti, imunokompromitirani pacijenti pod značajno su povišenim rizikom gdje se i u do 40% slučajeva očekuje najteži neuroinvazivni oblik. Osim mogućnosti zaraze putem uboda komarca, na umu treba imati i mogućnost interhumane transmisije putem transplantacije solidnog organa ili primjenom transfuzijskih pripravaka. S obzirom na navedeno, infekciju West Nile virusom treba razmotriti u svih transplantiranih pacijenata s neurološkim simptomima i povišenom tjelesnom temperaturom, posebice za vrijeme trajanja sezone arbovirusnih infekcija, u kasno ljeto i ranu jesen. Na žalost ne postoji specifično liječenje te se u imunokompromitiranih pacijenata uz potporne mjere liječenja savjetuje redukcija ili potpuno ukidanje imunosupresije.

WEST NILE VIRUS RETINITIS IN A PATIENT WITH NEUROINVASIVE DISEASE

Suzana Konjevoda^{1,2}, Boris Dželalija^{2,3}, Samir Čanović¹, Zrinjka Paštar², Vladimir Savić⁴, Irena Tabain⁵, Ljubo Barbić⁶, Ljiljana Perić^{7,8}, Dario Sabadi^{7,8}, Vladimir Stevanović⁶, Tatjana Vilibić-Čavlek^{5,9}

¹*Department of Ophthalmology, General Hospital Zadar, Zadar, Croatia*

²*Department of Health, University of Zadar, Zadar, Croatia*

³*Department of Infectious Diseases, General Hospital Zadar, Zadar, Croatia*

⁴*Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia*

⁵*Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia*

⁶*Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

⁷*Clinical Hospital Center Osijek, Osijek, Croatia*

⁸*Medical Faculty, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia*

⁹*School of Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

e-mail: suzana.konjevoda@gmail.com

West Nile virus (WNV) is a widely distributed emerging mosquito-borne arbovirus. Although majority of WNV infections are asymptomatic (~80%), some infected individuals (~20%) present with non-specific febrile disease (WNV fever) and less than 1% develop neuroinvasive disease (meningitis, encephalitis, myelitis). Although rare, ocular manifestations, including monofocal and multifocal WNV chorioretinitis are the most commonly reported clinical manifestations of WNV infection after fever and neuroinvasive disease.

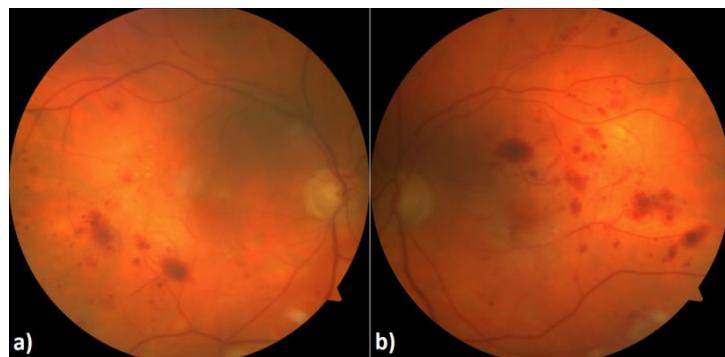
We present a first case of WNV retinitis detected in a patient with neuroinvasive disease in Croatia. In August 2018, a 68-year-old patient with type II diabetes mellitus was admitted to the Infectious Disease Department, Zadar General Hospital, with a six-day history of fever (up to 38,9°C), shivering, chills, vertigo, frontal headache and fatigue. The patient came on holiday in Zadar from Osijek-Baranja County where autochthonous WNV infections have already been registered in 2018 transmission season. According to the epidemiological history (arbovirus transmission season, living in the area with documented arbovirus circulation and reported mosquito bites), an arboviral etiology was suspected.

On physical examination, the patient was confused, restless with slight tremor of hands and conjunctival hyperemia. On the lower extremities, there were multiple mosquito bites. Routine blood laboratory parameters were normal. Cerebrospinal fluid analysis showed pleocytosis ($437 \times 10^6 / L$) with lymphocyte predominance (67%), elevated protein level (1.40 g/L; reference range 0.17-0.37) and elevated glucose level (5.7 mmol/L, reference range 2.5-3.3). Electroencephalogram (EEG) has shown nonspecific changes while computed tomography of the brain was normal.

On 9th day after disease onset he developed sudden decreased visual acuity in both eyes. Ophthalmologic examination showed conjunctival injection, while other parts of anterior segment of the eye were unremarkable. The visual acuity was classified using the semiquantitative scale "hand

"motion" on both eyes. Intraocular pressure was normal. On the posterior segment of the eye, vasculitis, edema and hemorrhage of the whole retina were found (figure 1).

Figure 1. Fundus photograph of right (a) and left (b) eye shows retinitis with preretinal and intraretinal hemorrhages



Serological tests were performed using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Euroimmun, Lübeck, Germany). The diagnosis of WNV neuroinvasive disease was confirmed by seroconversion in acute and convalescent serum samples. In the first sample (day 8), positive IgM antibodies (ratio 1.25; >1.1 positive) were detected while IgG antibodies were negative (10.58 RU/ml; >22 positive). In second sample (day 27), both IgM (ratio 1.48) and IgG (142.10 RU/ml) antibodies were found. IgG antibodies showed low avidity (24%; <40% low avidity index) indicating acute WNV infection. WNV infection was additionally confirmed by detection of WNV RNA in the first serum sample using a real-time RT-PCR.

On the basis of clinical symptoms and virological results, acute WNV meningoencephalitis and retinitis was diagnosed. The patient was initially treated with acyclovir, ampicillin and ceftriaxone with supportive therapy (antiedematous and antiaggregation therapy). On control examination after one month he still reported blurred vision with complete resolution of meningitic symptoms. Control EEG was normal.

The case presented in this report highlights the need of awareness of the possibility of a WNV-related retinitis during the arbovirus transmission season.

Acknowledgment: This study was supported by the project, Croatian Science Foundation, no. IP 2016-06-7456: Prevalence and molecular epidemiology of emerging and re-emerging neuroinvasive arboviral infections in Croatia; CRONEUROARBO (to TVC).

WEST NILE VIRUS U TRANSFUZIJSKOJ MEDICINI

Ivana Babić, Jasna Bingulac-Popović, Irena Jukić

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: ivana.babic@hztm.hr

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) nalaže testiranje na HIV, hepatitis B, C i sifilis kao obvezne testove probira na zarazne bolesti prije otpuštanja doze krvi i krvnih pripravaka za terapijsku primjenu. Povećanje osjetljivosti i specifičnosti seroloških metoda probira, a posebice razvoj molekularnih metoda detekcije nukleinskih kiselina uzročnika krvlju prenosivih infekcija, omogućuje vrlo visoku sigurnost krvi i krvnih pripravaka u razvijenom svijetu. Molekularni testovi probira za HBV, HCV i HIV, tzv. NAT (engl. *nucleic acid testing*) uvedeni su krajem devedesetih godina prošlog stoljeća u rutinski probir donacija krvi. Danas se izvode kao multipleks test za istovremenu detekciju virusa hepatitisa B i C te HIV-a u pojedinačnoj donaciji ili pool-u. Proizvođači testova spremni su u kratkom roku odgovoriti na zahtjev za uvođenjem probirnog testa za detekciju novog patogena koji se pokaže kao prijetnja sigurnosti transfuzijskog liječenja. Epidemija virusa zapadnog Nila (WNV) u SAD-u 2002. godine prvi je primjer takve reakcije. Te su godine potvrđena čak 23 prijenosa infekcije virusom zapadnog Nila putem krvnih pripravaka od kojih je čak 7 imalo fatalan ishod za primatelja krvi. Za populaciju zdravih asimptomatskih davatelja krvi test izbora je NAT probir. Suradnjom organizacija za prikupljanje krvi, dijagnostičke industrije, regulatornih tijela i javno-zdravstvenih agencija, za manje od godinu dana NAT probirni test na WNV je postao obvezni test za sve donacije prikupljene u SAD. Podaci prikupljeni testiranjem populacije davatelja krvi dali su informacije o značaju i pojavnosti asimptomatske infekcije i minimalnom infektivnom titru virusa. SAD rutinski testira donacije krvi na WNV tijekom cijele godine, izvan sezone komaraca u mini-pool-u, a s prvom dokazanom infekcijom u davatelja krvi ili nakon potvrđenog prvog kliničkog slučaja WNV infekcije u ljudi, prelazi se na osjetljivije testiranje u pojedinačnoj donaciji. Procjenjuje se da je window period ID-NAT testiranja za virus zapadnog Nila oko 2 dana. Preporuka je, zbog niskih razina minimalnog infektivnog titra virusa, u sezoni komaraca testiranje provoditi u pojedinačnoj donaciji. Analitička osjetljivost testova za WNV liniju 1 i liniju 2 iznosi oko 12 kopija/mL. U Europi se nakon prve epidemije WNV većih razmjera u Rumunjskoj 1996. godine s 352 prijavljena slučaja bolesti i 17 smrtnih ishoda bilježe lokalni autohtonii slučajevi u Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Italiji, Grčkoj, Mađarskoj, Češkoj, Rumunjskoj, Sloveniji, Srbiji i Hrvatskoj. Europska direktiva 2014/110/EU propisuje odbijanje davatelja krvi na 28 dana nakon boravka u području s potvrđenim kliničkim slučajevima infekcije u ljudi, ili uvođenje NAT WNV probira. U WNV RNA pozitivnih davatelja krvi nastupa period odbijanja od 120 dana zbog iznimno rijetkih slučaja WNV RNA pozitivnog nalaza i nakon 104 dana od početka infekcije. Većina zemalja s lokalnim autohtonim slučajevima infekcije u ljudi uvela je regionalno NAT WNV testiranje donacija krvi. Neke zemlje započinju NAT WNV probir kada rezultati nadzora ukažu na pojavu infekcije u vektora (komarci, ptice) ili životinja krajnjih domaćina (konji), druge s prvim kliničkim slučajem u ljudi. Uobičajeno sezona testiranja traje do kraja listopada, u formatu testiranja na pojedinačnoj donaciji (ID-NAT). U 2018. u

Europi i Hrvatskoj se bilježi izrazito velik broj slučajeva infekcije WNV u ljudi, te je Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske izdalo žurnu uputu o postupanju s ciljem prevencije prijenosa virusa Zapadnog Nila, 21. kolovoza 2018. U preporukama se naložilo odbijanje davatelja krvi na period od 28 dana ako žive u zahvaćenim područjima ili su u njima boravili barem dvije noći. U slučajevima kada bi odbijanje davatelja prema navedenim kriterijima uzrokovalo značajni poremećaj u opskrbi zdravstvenih ustanova krvnim pripravcima bilo je potrebno učiniti ID-NAT testiranje darivatelja na virus Zapadnog Nila. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (HZTM) započinje 6 dana kasnije, krajem 8. mjeseca 2018. s rutinskim NAT WNV probirom u pojedinačnoj donaciji za davatelje krvi iz zahvaćenih područja te za davatelje organa, tkiva i matičnih stanica. Probirno NAT WNV testiranje davatelja krvi i davatelja organa, tkiva i matičnih stanica provodilo se u periodu 29.8.-30.11.2018. za zahvaćena područja (grad Zagreb, Zagrebačka, Karlovačka, Osječko-baranjska, Vukovarsko-srijemska, Varaždinska, Požeško-slavonska, Koprivničko-križevačka, Međimurska, Brodsko-posavska te Virovitičko-podravska županija). Testirano je ukupno 32 749 donacija krvi te su utvrđene tri WNV RNA pozitivne donacije. Od tri davatelja krvi dva su nedugo nakon donacije razvili simptome groznice, dok je treći bio asimptomatski. Među 471 testiranih davatelja organa, tkiva i matičnih stanica nije bilo utvrđenih infekcija virusom Zapadnog Nila. Testiranje se provodilo do 30.11.2018. U 2019. HZTM je 15.5.2019. temeljem dopisa Ministarstva zdravstva započeo rutinski ID-NAT WNV probir svih prikupljenih donacija krvi s područja Republike Hrvatske, kao i probir svih davatelja organa, tkiva i matičnih stanica.

WEST NILE VIRUS U BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI I NAKON TRANSPLANTACIJE BUBREGA

Jerko Barbić

Zavod za nefrologiju, KBC Osijek; Katedra za patofiziologiju Medicinski fakultet Osijek, Osijek, Hrvatska

e-mail: jbarbic@mefos.hr

West Nile virus (WNV) virus pripada skupini *arbovirusa* koje karakterizira prijenos putem komaraca. Smatra se da je oko 30% populacije svijeta je izloženo ovom virusu i to u svim područjima gdje postoje navedeni vektori prijenosa virusa. Osim putem uboda komaraca virus se može prenijeti i putem transfuzija krvi i krvnih pripravaka. Od 2002. godine poznato je da se WNV može prenijeti i transplantacijom organa. Usprkos detaljnem pregledu medicinske dokumentacije, serološkom i molekularnom (testovi amplifikacije nukleinskih kiselina) probiru na značajne infektivne uzročnike, prijenos infekcije putem darivatelja organa dobro je poznata komplikacija transplantacije organa. Infekcije povezane s darivateljem organa mogu se podijeliti u dvije skupine: skupinu očekivanih i neočekivanih infekcija. Očekivane infekcije su one koje se mogu očekivati na temelju činjenice da darivatelj ima pozitivnu serologiju primjerice na CMV ili EBV, a primatelj organa je pri tome imao negativnu serologiju. Trenutne preporuke zahtijevaju serološko testiranje i testove amplifikacije nukleinskih kiselina (NAT; engl. *Nucleic acid amplification test*) za uobičajene uzročnike kao što su HIV, hepatitis B i C virus. Neočekivane infekcije su one kod kojih ne postoji prijetransplantacijski probir ili kod kojih je probirni test bio lažno negativan. Neočekivan prijenos infektivnih uzročnika u transplantacijskoj medicini ima značajno veći morbiditet i mortalitet jer ne postoji odgovarajuća profilaktička terapija. Prema podatcima Američke organizacije za razmjenu organa (OPTN; engl. *the Organ Procurement and Transplantation Network*), najčešći uzrok ovakvih neočekivanih prijenosa s darivatelja organa su bile različite virusne infekcije. Tako je primjerice u razdoblju od 2005. do 2011. godine bilo 145 potvrđenih neočekivanih infekcija prenesenih od strane darivatelja organa, od toga više od 1/3 su bile virusne infekcije. Najčešće se radilo o prijenosu HIV i HTLV (9,7% slučajeva) te WNV (6,3% slučajeva).

WNV infekcija u gotovo 80% slučajeva prolazi asimptomatski, a u 20% slučajeva nastaju blagi simptomi bolesti kao što su vrućica, bolovi u mišićima, mučnina, proljev i kožni osip. U rijetkim slučajevima simptomatske bolesti (1 od 140 simptomatskih bolesnika) nastaje neuroinvazivni oblik bolesti koji se očituje kao meningitis, encefalitis ili meningoencefalitis. Populacija koja je osjetljiva za razvitak teškog oblika WNV infekcije su imunokompromitirani bolesnici kao što su bolesnici s transplantiranim organima. Prema tome i WNV infekcija stečena ubodom komaraca može kod ovih bolesnika imati daleko teži klinički tijek.

U imunološkom odgovoru na WNV glavnu ulogu ima humoralna imunost, odnosno imunost posredovana protutijelima. U imunodostatnih osoba većina virusnih infekcija je samo ograničavajuća zbog aktivacije imunosnog sustava (proizvodnja IFN-razreda I), aktivacija citotoksičnih CD8 limfocita T i CD4 pomagačkih limfocita T koji mogu ukloniti virus iz organizma. Miševi s nedostatkom limfocita B

razvijaju smrtonosnu infekciju s teškim zahvaćanjem SŽS. Osim toga prirođena imunost odnosno proizvodnja IFN tipa I ima ulogu u nadzoru replikacije virusa. Populacija bolesnika s transplantiranim bubregom liječi se snažnim imunosupresijskim lijekovima. Imunosupresijski lijekovi se daju prije i stalno nakon transplantacije bubrega kako bi se spriječilo odbacivanje transplantiranog organa. Meta analiza je pokazala kako 15% bolesnika razvija tešku hipogamaglobulinemiju u prvi godinu dana nakon transplantacije organa. Bolesnici na kroničnom programu hemodialize također imaju česte infekcije; smatra se kako se smanjenjem bubrežne funkcije remeti normalno funkcioniranje imunosnog sustava i stavlja ih u svojevrsno stanje imune nedostatnosti.

U ovom istraživanju ispitivali smo prisutnost IgM i IgG protutijela na WNV i WNV RNA u populaciji bolesnika koji se liječe hemodializom u KBC Osijek ili imaju u funkciji transplantirani bubreg. Ove analize su učinjene u 2018. godini, u sezoni kada je u Osječko-baranjskoj županiji bilo registrirano 18 slučajeva neuroinvazivnog oblika WNV infekcije. U istraživanje je bilo uključeno 105 bolesnika na programu hemodialize (46,7% bilo iz prigradskih ili seoskih područja) te u75 bolesnika s transplantiranim bubregom (35,7% je bilo iz prigradskih ili seoskih područja). IgG protutijela specifična za WNV nađena su u 7 (4,0%) bolesnika; 3/105 (2,8%) bolesnika na hemodializi i 4/75 (5,7%) s transplantiranim bubregom. U jednog bolesnika nađena su IgM protutijela uz nizak IgG aviditet što ukazuje na nedavnu WNV infekciju. WNV RNA nije utvrđena niti u jednom uzorku krvi.

Rezultati istraživanja u SAD-u u područjima gdje postoje WNV infekcije pokazali su da manje od 10% opće populacije ima pozitivna protutijela protiv WNV. Bolesnici na hemodializi i transplantirani su imunonedostatni i njihov humorálni odgovor imunosnog sustava može biti slab tako da to može objasniti niži udio populacije s pozitivnim protutijelima.

Zaključno možemo reći kako trenutni algoritmi laboratorijskog i kliničkog pregleda ne mogu potpuno ukloniti rizik prijenosa zaraznih bolesti s darivatelja organa. Banke krvi u SAD-u testiraju pulove krvi NAT-om na WNV, tek ako postoji pozitivan test testiraju se pojedinačni uzorci, što je značajno smanjilo mogućnost prijenosa putem krvi. Od 2013. godine OPTN obavezuje sve transplantacijske centre na probir živih darivatelja organa u područjima i godišnjim dobima kada postoji WNV infekcija, ne postoji cjelogodišnja obveza probira. Ministarstvo zdravstva Republike Hrvatske prepoznalo je važnost navedene problematike te je u skladu sa svjetskim preporukama dalo naputak o NAT testiranju na WNV svih uzoraka krvi i darivatelja organa u sezoni od 15.05.2019. godine. Osim toga, transplantirane bolesnike i bolesnike na hemodializi treba upozoriti na mogućnost prijenosa virusnih infekcija putem uboda komaraca kao što je WNV i upoznatih ih s preventivnim mjerama i simptomima bolesti posebice u godišnjim dobima kada postoji veliki broj komaraca.

WEST NILE VIRUS U PTICA U HRVATSKOJ

Vladimir Savić¹, Tatjana Vilibić Čavlek^{2,3}, Ljubo Barbić⁴, Mirta Balenović¹, Sandra Vrtarić¹

¹*Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska*

²*Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

³*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

⁴*Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

e-mail: v_savic@veinst.hr

U proteklom desetljeću je u Hrvatskoj u više navrata serološki dokazana infekcija West Nile virusom (WNV) u ljudi, konja i domaće peradi. Virusna RNA je detektirana u više humanih slučajeva na području Hrvatske tijekom 2017. i 2018. godine. Iako su divlje ptice prirodni rezervoari ovog virusa, infekcija je prvi put dokazana u rujnu 2018. godine u dva oboljela jastreba u Međimurju i u uginulom kosu iz okoline Splita. Jastrebovi su pokazivali izrazite neurološke simptome, a potom su i uginuli. Virus Zapadnog Nila je, osim u serumu, dokazan i u mozgovima uginulih jastrebova, a potvrđena je i serokonverzija. Preliminarna analiza virusne RNA detektirane u jastrebovima i u kosu je pokazala da se u oba slučaja radi o WNV genske linije 2, u velikoj mjeri sličnima virusima iz humanih uzoraka u Hrvatskoj iz 2017. i 2018. godine. Infekcija je ponovno dokazana dva mjeseca kasnije u istom mjestu u Međimurju, ovaj put serološki u škanjcu, no virusna RNA nije dokazana. U jastrebova je zahvaljujući velikoj količini virusa i svježim uzorcima bilo moguće sekvencirati približno cijeli genom WNV. Dobivena nukleotidna sekvence je u usporedbi s dostupnim sekvencama najsličnija WNV dokazanim iste godine u kosovima na dvije lokacije također u Njemačkoj (99,79%). Velika sličnost je nađena i s WNV iz komarca u Češkoj iz 2013. godine (99,74%) i dobrovoljnog davaoca krvi u Austriji iz 2014. godine (99,64%) te jastreba u Slovačkoj iz 2013. godine (99,63%). Unatoč velikoj sličnosti, u WNV iz jastrebova iz Međimurja je nađena delecija od 8 nukleotida u 3' nekodirajućoj regiji genoma koja nije nađena niti u jednoj od dostupnih sekvenci WNV-a. Ova delecija ne bi trebala imati utjecaj na antigenost, patogenezu i epidemiologiju detektiranog virusa, ali može uzrokovati lažno negativne rezultate molekularne dijagnostike ukoliko se 3' nekodirajuća regija WNV koristi kao ciljna regija za RT-PCR. WNV se u inficiranim pticama mogu naći u izrazito visokoj koncentraciji, što omogućava njihovu detaljniju tipizaciju i bolji uvid u molekularnu epidemiologiju pa samim tim i moguće mutacije koje mogu rezultirati lažno negativnim rezultatima. Ovo dodatno ukazuje na nužnost monitoringa WNV-a u divljim pticama što podrazumijeva i senzibiliziranje relevantne javnosti o značaju takvog monitoringa kako bi se mogli prikupiti odgovarajući uzorci za laboratorijsko pretraživanje.

PRAĆENJE WEST NILE VIRUSNIH INFEKCIJA U KONJA U HRVATSKOJ

Ljubo Barbić, Vladimir Stevanović, Luka Radmanić, Snježana Kovač, Josip Madić

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: Ljubo.barbic@vef.hr

Virus Zapadnog Nila (VZN) se u posljednja dva desetljeća proširio diljem svijeta, a uz infekcije u ljudi ovaj uzročnik najznačajniji je za konje u kojih može uzrokovati oboljenja od blagih febrilnih oblika do neuroloških oblika bolesti sa smrtnim ishodom. Osim značaja u veterinarskoj medicini, sustavno praćenje infekcija konja VZN izrazito je vrijedan pokazatelj koji omogućuje pouzdano ustanovljavanje područja s pojačanom virusnom aktivnošću. Ovo se postiže kroz kontinuirani sustav praćenja seroprevalencije u konja, određivanjem IgG protutijela, što nam daje jasnu smjernicu za usmjeravanje protuepidemijskih mjera na rizična područja. Uz navedena određivanja područja, praćenje infekcija u konja omogućuje i precizno određivanje početka sezone prijenosa uzročnika što je istovremeno pokazatelj očekivanog vremena pojačanog rizika za oboljenja ljudi. U tu svrhu određuje se prisustvo IgM protutijela koja pouzdano predstavljaju nedavne infekcije s obzirom da je ova klasa protutijela u konja detektibilna samo dva mjeseca od infekcije. Znajući da se akutne infekcije i oboljenja konja pojavljuju nekoliko tjedana prije oboljenja ljudi, sustav praćenja infekcija u konja neprocijenjivi je alat u određivanju i usmjeravanju protuepidemijskih mjera sa svrhom zaštite zdravlja i života ljudi.

U Republici Hrvatskoj širenje virusa Zapadnog Nila je i potvrđeno prije prvih oboljenja ljudi upravo praćenjem infekcija u konja. Tijekom 2010. i 2011. godine prvim opsežnijim sustavnim istraživanjem potvrđeno je prisustvo virusa i porast njegove aktivnosti koji je bio najizraženiji u najistočnijim županijama. Ovo je bila najava prvih oboljenja ljudi zabilježenih 2012. godine kojima su nekoliko tjedana ranije prethodile potvrde akutnih infekcija konja na istom području. Dobri početni rezultati uz blisku interdisciplinarnu suradnju te kontinuirana potpora Ministarstva poljoprivrede omogućili su uspostavu ovakvog sustava nadzora infekcija VZN koji se uz manje modifikacije provodi i danas. Provođenjem ovakvog sustava nadzora potvrđena je i mogućnost praćenje nekih drugih emergentnih zoonotskih uzročnika sa istovjetnom epidemiologijom. Tako je primjerice provođenjem opisanog sustava nadzora VZN u konja potvrđena i infekcija konja Usutu virusom na području Hrvatske 2011. godine, kao najava dvije godine kasnije potvrđenih infekcija i oboljenja u ljudi.

Primjerice samo prošle godine kroz provođenje ovog sustava, uz potvrđivanje područja visokog rizika na razini županija kao i mikrolokacija s pojačanom virusnom aktivnošću, dokazom IgM pozitivnih konja u travnju jasno je predviđen i raniji početak prijenosa i rizika od oboljenja u odnosu na prethodne godine. Ovakve informacije i usmjerene protuepidemijske mjere zasigurno su smanjile broj oboljelih ljudi i u prošloj, epidemiskoj godini kada je zabilježen najveći broj oboljenja ljudi na području Hrvatske do sada. Nastavak provođenja sustava nadzora uz stalni i blisku multidisciplinarnu suradnju i zajedničko djelovanje u kontekstu „Jednog zdravlja“ jedini je način nadzora ovakvih emergentnih zoonoz i u budućnosti sa zajedničkim ciljem očuvanja zdravlja ljudi.

KOMARCI - VEKTORI WEST NILE VIRUSA

Ana Klobučar¹, Vladimir Savić², Josip Madić³, Sunčica Petrinić¹, Tomislav Pismarović¹, Danijel Poje¹, Antun Singer¹, Želimir Fabić¹, Mirjana Lana Kosanović Ličina¹, Vanja Tešić^{1,4}, Tatjana Vilibić-Čavlek^{5,6}

¹Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar", Zagreb, Hrvatska

²Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

³Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

⁴Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

⁵Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

⁶Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: ana.klobucar@stampar.hr

Rezervoari West Nile virusa (WNV) u prirodi su različite vrste divljih ptica, a cirkulacija virusa među pticama te prijenos virusa na druge domaćine se odvija uz pomoć komaraca kao vektora. Pojava infekcija uzrokovanih WNV-om u ljudi i životinja na području Europe posljednjih godina te porast njihova broja iz godine u godinu ukazuje na Europu kao prirodno žarište WNV te naglašava sve veću potrebu istraživanja i nadzora nad komarcima. Više je vrsta komaraca koje mogu prenijeti WNV s ptica na ljude (virus je izoliran iz komaraca uhvaćenih u prirodi ili je sposobnost prijenosa virusa dokazana u laboratorijskim uvjetima). Radi svoje sklonosti hranjenja na pticama, komarci *Culex pipiens* i *Culex modestus* su glavni vektori WNV na području Europe. Vrsta *Cx. pipiens* je kompleks vrsta čije jedinke je teško morfološki razlikovati. Biotipovi kompleksa *Cx. pipiens pipiens* i *Cx. pipiens molestus* su različitih sklonosti prema domaćinima: biotip *Cx. pipiens pipiens* se uglavnom hrani na pticama i ima važnu ulogu u enzootskom ciklusu prijenosa virusa, a biotip *Cx. pipiens molestus* ima sklonost hranjenja na sisavcima i stoga manje značajnu ulogu u prijenosu virusa. Novija istraživanja su pokazala da navedeni biotipovi mogu stvarati hibride (osobito u prigradskim područjima) koji se hrane na obje skupine domaćina - na pticama i sisavcima te vjerojatno imaju važnu ulogu kao vektori virusa na ljude i životinje.

Na području sjeverozapadne Hrvatske u razdoblju od 2015. do 2018. godine obavljena su uzorkovanja odraslih jedinki komaraca radi testiranja na prisustvo arbovirusa. Komarci su prikupljeni CDC klopkama, BG Sentinel klopkama i aspiratorom. Na prisustvo WNV testirane su sljedeće vrste komaraca: *Aedes albopictus*, *Cx. pipiens*, *Aedes vexans*, *Ochlerotatus sticticus*, *Oc. rusticus* i *Ae. cinereus*. Ukupno je testirano 7,313 jedinki komaraca.

Na prisustvo WNV RNA testirano je ukupno 86 skupnih uzorka komaraca (2,137 jedinki) vrste *Cx. pipiens* kompleks s područja Grada Zagreba (84 skupna uzorka) i Međimurske županije (2 skupna uzorka). U jednom skupnom uzorku iz Zagreba (naselje Jarun, 2018. godina) dokazana je RT-PCR metodom WNV RNA (Ct 29) te USUV RNA (Ct 20), a zatim je filogenetskom analizom istog uzorka dokazana europska linija 2 USUV. WNV nije nađen niti u jednom testiranom skupnom uzorku komaraca.

Zahvala: Testiranje komaraca na prisustvo WNV i USUV RNA učinjeno je u okviru projekta HRZZ IP 2016-06-7456: Prevalencija i molekularna epidemiologija emergentnih i re-emergentnih neuroinvazivnih arbovirusnih infekcija na području Hrvatske; CRONEUROARBO (voditeljica: doc.dr.sc. Tatjana Vilibić Čavlek).

NACIONALNI MONITORING INVAZIVNIH VRSTA KOMARACA U HRVATSKOJ

Nataša Janev-Holcer^{1,2}, Pavle Jeličić¹

¹*Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

²*Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska*

e-mail: natasja.janev@hzjz.hr

Temeljem inicijative Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, u 2016. godini je započeta, a tijekom 2017. i 2018. godine nastavljena na području cijele Hrvatske provedba nacionalnog monitoringa invazivnih vrsta komaraca kroz mrežu županijskih zavoda za javno zdravstvo i u suradnji s Odjelom za biologiju Sveučilišta u Osijeku. Determinacija komaraca je provedena u Zagrebu, Puli, Splitu, Rijeci i Osijeku. Ovipozicijskim klopkama su od svibnja do studenog 2018. dva puta mjesečno prikupljeni podaci o nalazima invazivnih komaraca roda *Aedes*, osobito u područjima za koje nisu postojali podaci. Ovipozicijske klopke su relativno jednostavna i jeftina metoda za nadzor i rano otkrivanje invazivnih vrsta komaraca na mjestima ulaska. Podaci o zastupljenosti komaraca na području Hrvatske služe za izradu karte rasprostranjenosti žarišta, izradu jedinstvene nacionalne baze podataka te procjenu rizika za vektorske zarazne bolesti.

Provđeni nacionalni monitoring u 2018. godini potvrdio je prisutnost azijskog tigrastog komarca - *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) u svim županijama, osim u Varaždinskoj županiji koja nije sudjelovala u monitoringu. Također potvrđen je nalaz komarca *Aedes (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald) u županijama gdje tijekom 2017. godine nije bio zabilježen.

Postojeći uvjeti potrebni za razvoj i razmnožavanje te prisutni vektorski potencijal determiniranih komaraca uz eventualnu pojavnost uzročnika mogu imati značajan utjecaj na širenje zaraznih bolesti. Prekomjerna brojnost jedinki komaraca zbog povoljnih životnih uvjeta, kao i zbog povećanih migracija ljudi te transporta roba, postaje sve izraženiji problem za ljudsko zdravlje te je potrebno osvijestiti javnost o važnosti i načinima sprječavanja razmnožavanja i širenja komaraca. Provedba nacionalnog monitoringa je odličan primjer suradnje gotovo svih uključenih institucija u Hrvatskoj.

CIJEPLJENJE PROTIV EMERGENTNIH I RE-EMERGENTNIH ZOONOZA

Bernard Kaić, Vesna Višekruna-Vučina, Vedrana Marić, Maja Ilić, Iva Pem-Novosel

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvaska

e-mail: bernard.kaic@hzjz.hr

Već su desetljećima u primjeni u humanoj medicini cjepiva protiv nekih zoonoza poput bjesnoče, tetanusa, krpeljnog meningoencefalitisa, žute groznice i japanskog encefalitisa.

Cjepivo protiv Lyme borelioze je prije dvadeset godina bilo u upotrebi, ali je povućeno iz upotrebe zbog percepcije neprihvatljivog odnosa koristi i rizika.

Zadnjih godina postala su dostupna cjepiva protiv ebole, malarije (koje je zanimljivo prikazati iako cjepivo nije protiv zoonotske malarije) i dengue groznice, o kojima će biti nešto više riječi ovdje. Također, osvrnut ćemo se na predpandemijsko cjepivo protiv gripe, s obzirom da je temeljeno na postojećim virusima ptičje gripe i očekuje se da, kao i u ranijim pandemijama gripe, pandemijski virus bude u većoj mjeri porijeklom od ptičjeg virusa gripe.

Cjepivo protiv ebole: Za sada jedino dostupno cjepivo protiv ebole je terenski testirano tijekom epidemije ebole u Liberiji, Sierra Leone i Gvineji 2015. i 2016. godine. U tim ispitivanjima cjepivo se pokazalo vrlo djelotvorno u sprečavanju ebole kako u preekspozicijskoj, tako i u postekspozicijskoj primjeni. Iako ni jedna cijepljena osoba nije oboljela od ebole, zbog dizajna studije nije se mogla procijeniti djelotvornost, a oko 50% cijepljenih je razvilo blage do umjerene nuspojave – glavobolju, umor i mijalgije. Prema dizajnu, to je živo, atenuirano, rekombinantno cjepivo temeljeno na virusu vezikularnog stomatitisa koji je genetski modificiran na način da na površini prikazuje površinski glikoprotein Zaire Ebola virusa (zato se označava rVSV-ZEBOV ili VSV-EBOV). Cjepivo se, iako još nije prošlo formalni postupak registracije, prvi put koristilo u protu epidemiske svrhe u svibnju i lipnju 2018. godine u epidemiji ebole u Kongu, po sistemu prstenastog cijepljenja, tj. za cijepljenje primarnih kontakata oboljelih, kontaka primarnih kontakata, zdravstvenih djelatnika i terenskih ekipa koje rade na suzbijanju epidemije. Također, u najnovijoj epidemiji ebole u Kongu, koja je počela u kolovozu 2018. godine, koristi se cjepivo za prstenasto cijepljenje kontakata. Još je nekoliko kandidata za cjepivo u različitim fazama pretkliničkih i kliničkih ispitivanja.

Cjepivo protiv malarije: Prvo cjepivo protiv malarije je registrirano 2015. godine, a djeluje na *P. falciparum* malariju (koja nije zoonoza). Po dizajnu, cjepivo se sastoji od neinfektivnih čestica (virus-like particles) koje sadrže protein cirkumsporozoita *P. falciparum*, vezan na HBsAg i adjuvantiran. Protein sporozoita i HBsAg su uzgojeni na kvasnicama genskom rekombinacijom. Europska agencija za lijekove je registrirala cjepivo za primjenu izvan Europske unije, u visokoendemskim zemljama, u djece u dobi od 6 tjedana do 17 mjeseci. Djelotvornost cjepiva je relativno niska (u dojenčadi koja započinju cijepljenje između 6 i 12 tjedana života, djelotvornost u sprečavanju malarije tijekom 12 mjeseci praćenja je oko 30%, a djelotvornost u djece koja započinju cijepljenje u dobi od 5-17 mjeseci tijekom 12 mjeseci praćenja je oko 50%) i progresivno se smanjuje tijekom prve tri godine nakon cijepljenja.

Zbog niske djelotvornosti u najranijoj dobi, Svjetska zdravstvena organizacija ne preporučuje primjenu ovog cjepiva prije petog mjeseca starosti i zahtijeva opsežna dodatna ispitivanja u Gani, Keniji i Malaviju prije davanja preporuke o masovnoj primjeni. Reaktogenost cjepiva je na razini reaktogenosti uobičajenih cjepiva koja se primjenjuju u dječjoj dobi. Cjepivo se ne preporučuje osobama neendemskih zemalja za putovanje u endemske zemlje. Brojni drugi kandidati za cjepivo protiv malarije su u raznim kliničkim stadijima ispitivanja.

Cjepivo protiv dengue groznice: Cjepivo protiv dengue groznice je prvo registrirano u Meksiku krajem 2015. godine, a kasnije u još dvadesetak zemalja. Po dizajnu, radi se o četverovalentnom životinjskom, atenuiranom cjepivu koje se bazira na cjepnom virusu žute groznice, 17D, koji je genetski modificiran na način da na površini prikazuje premembranozni protein (prM) i protein omotača (E protein) dengue virusa. Cjepivo je u širokoj upotrebi od 2016. godine u Brazilu i Filipinima. Cijepljenje ne izaziva jednak imunološki odgovor na sva četiri tipa dengue virusa. U kliničkim ispitivanjima cjepivo je pokazalo umjerenu djelotvornost u sprečavanju dengue bolesti kod djece (oko 55%) te nešto višu u sprečavanju hemoragičnih oblika bolesti (oko 80%). Međutim, već u kliničkim istraživanjima postojala je bojazan da će cijepljenje u pojedinim seronegativnim pojedinaca, zbog serokonverzije na pojedine tipove virusa uz izostanak serokonverzije na druge tipove virusa i gubitak protutijela, izazvati pri kasnijoj prirodnoj infekciji efekt pojačanja bolesti uzrokovane protutijelima (antibody-dependent enhancement) čime se inače tumači razvoj teških oblika bolesti kod reinfekcije u prirodnim uvjetima. Klinička ispitivanja nisu pružila potvrdu za tu bojazan te je cjepivo uz umjerenu djelotvornost registrirano u dvadesetak zemalja. Tijekom 2017. godine, nakon uvođenja masovnog cijepljenja djece se u Filipinima, uočeno je da se kod mlađe cijepljene djece povećava rizik od hospitalizacije zbog teških oblika dengue groznice i program cijepljenja protiv dengue groznice je privremeno zaustavljen u Filipinima. Detaljnijim analiziranjem dostupnih podataka uočilo se da je rizik od teških oblika bolesti povećan kod osoba koje su u vrijeme cijepljenja bile seronegativne, tj. nisu ranije bile inficirane niti jednim tipom dengue virusa, dok kod osoba koje su prije cijepljenja bile inficirane nekim od četiri tipa dengue virusa, nema povećanog rizika od teških oblika bolesti tijekom praćenja. Posljedično, Svjetska zdravstvena organizacija je preporučila screening – serološko testiranje na prethodnu dengue infekciju prije cijepljenja i cijepljenje samo seropozitivnih osoba, što značajno otežava rutinsku primjenu cjepiva. Cjepivo se ne preporučuje osobama neendemskih zemalja za putovanje u endemske zemlje.

Predpandemijsko cjepivo protiv gripe: U Europi i drugdje u svijetu je registrirano nekoliko predpandemijskih cjepiva protiv gripe, koja se po dizajnu mogu podijeliti na podjedinična ili fragmentirana adjuvantirana cjepiva, mrtva cijelovirusna cjepiva i živa atenuirana cjepiva. Zajednička im je osobina što su monovalentna (za razliku od sezonskih cjepiva protiv gripe) i što su proizvedena na temelju virusa gripe A/H5N1. Nije poznato koji će podtip virusa gripe razviti pandemijski pandemijski potencijal. U vrijeme razvoja predpandemijskih cjepiva A/H5N1 je bio najizgledniji kandidat, tj. kao najveća prijetnja, a zadnjih godina to je bio virus A/H7N9 koji je od svih zoonotskih virusa gripe izazivao najviše bolesti kod ljudi u Kini. Registriranje predpandemijskih cjepiva na temelju studija imunogenosti i reaktogenosti virusa ptičje gripe A/H5N1 služi potvrdi prihvatljivog imunogenog i sigurnosnog profila zadanog dizajna cjepiva s idejom da se pri identificiranju pandemijskog virusa samo zamijeni antigen uz jednak proces proizvodnje za predpandemijsko cjepivo, čime se ubrzava registracija i dostupnost cjepiva u predstojećoj pandemiji.

