

**VIRTUALNI SIMPOZIJ S MEĐUNARODNIM SUDJELOVANJEM**  
*Virtual Symposium with International Participation*

**(RE-)EMERGENTNI ARBOVIRUSI U SJENI PANDEMIJE COVID-19**

***(Re-)Emerging Arboviruses in the Shadow of COVID-19 pandemic***

***uz potporu Svjetske zdravstvene organizacije, Regionalni ured za Europu***  
*with support of World Health Organization, Regional Office for Europe*



**PROGRAM I ZBORNIK SAŽETAKA**  
**PROGRAM AND ABSTRACT BOOK**

**Zagreb, 10.-11. lipnja 2021.**  
**10-11 June 2021**

## **VIRTUALNI SIMPOZIJ S MEĐUNARODNIM SUDJELOVANJEM**

*Virtual Symposium with International Participation*

### **(RE-)EMERGENTNI ARBOVIRUSI U SJENI PANDEMIJE COVID-19**

*(Re-)Emerging Arboviruses in the Shadow of COVID-19 pandemic*

**Zagreb, 10.-11. lipnja 2021.**

**10-11 June 2021**

**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  
Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar"/Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/School of Medicine University of Zagreb  
Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju/Croatian Society for Clinical Microbiology*

**uz potporu Svjetske zdravstvene organizacije, Regionalni ured za Europu/  
with support of World Health Organization, Regional Office for Europe**

**Voditelji i urednici zbornika:** *Tatjana Vilibić-Čavlek, Ljubo Barbić, Vladimir Savić,  
Irena Tabain, Bernard Kaić*

**Organizacijski odbor:** *Ljubo Barbić, Maja Bogdanić, Ivana Ferenčak, Maja Ilić, Nataša Janev-Holcer, Pavle Jeličić, Bernard Kaić, Vladimir Savić, Vladimir Stevanović, Irena Tabain, Tatjana Vilibić-Čavlek*

**Znanstveni odbor:** *Elkhan Gasimov, Krunoslav Capak, Kirk Osmond Douglas, Gaëlle Gonzalez, Ana Klobučar, Branko Kolarić, Mladen Kučinić, Jasna Leniček Krleža, Josip Madić, Alemka Markotić, Anna Mrzljak, Nenad Pandak, Tamaš Petrović, Marija Santini, Giovanni Savini, Ivan Toplak, Nenad Turk, Kludija Višković, Jasmina Vraneš, Snježana Židovec-Lepej*

**Izdavač:** *Hrvatski zavod za javno zdravstvo  
  
Rockefellerova 7  
10000 Zagreb*

**ISBN:** *978-953-8362-10-1*

## PROGRAM

*Četvrtak, 10. lipnja 2021./Thursday, 10 June 2021*

08.30 - 08.45 Otvaranje simpozija/Opening

### (RE-)EMERGENTNI ARBOVIRUSI NA PODRUČJU EUROPE (RE-)EMERGING ARBOVIRUSES IN EUROPE

Moderator/Chair: Vladimir Savić

08.45 - 09.05 **INVITED LECTURE:**  
***Report on vector-borne diseases - 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 **INVITED LECTURE:**  
***Overview of West Nile virus and Usutu virus circulation in Europe from 2016 to 2020***

Gaëlle Gonzalez, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail, Maisons-Alfort, France

09.25 - 09.45 **INVITED LECTURE:**  
***Emerging flaviviruses in Italy***

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

09.45 - 10.05 **INVITED LECTURE:**  
***Viral and vector-borne viral zoonoses in Serbia - activities of the veterinary profession***

Tamaš Petrović, Scientific Veterinary Institute, Novi Sad, Serbia

10.05 - 10.15 Rasprava/Discussion

### (RE-)EMERGENTNI ARBOVIRUSI NA PODRUČJU HRVATSKE U KONTEKSTU JEDNOG ZDRAVLJA (RE-)EMERGING ARBOVIRUSES IN CROATIA IN THE 'ONE HEALTH' CONTEXT

Moderator/Chair: Ljubo Barbić

10.15 - 10.30 ***Prevalencija i molekularna epidemiologija arbovirusnih infekcija na području Hrvatske/Prevalence and molecular epidemiology of arboviral infections in Croatia***

Tatjana Vilibić Čavlek, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

- 10-30 - 10.45**      ***Seroprevalencija West Nile virusa u peradi u Hrvatskoj u 2020. i 2021. godini/Seroprevalence of West Nile virus in poultry in Croatia, 2020-2021***  
Vladimir Savić, Hrvatski veterinarski institut/Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia
- 10.45 - 11.00**      ***Rezultati praćenja proširenosti West Nile virusa u konja u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2010. do 2020. godine/Results of West Nile virus surveillance in horses in Croatia from 2010 to 2020***  
Iva Benvin, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia
- 11.00 - 11.15**      ***Flavivirusi u komaraca na području Hrvatske/Flaviviruses in mosquitoes in Croatia***  
Ana Klobučar, Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar"/Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 11.15 - 11.30**      ***Epidemija krpeljnog encefalitisa nakon konzumacije sirovog kozjeg mlijeka/Outbreak of tick-borne encephalitis after consumption of raw goat milk***  
Maja Ilić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 11.30 - 11.45**      **Rasprava/Discussion**
- 11.45 - 12.15**      **Stanka/Break**

**KLINIČKA SLIKA I DIJAGNOSTIKA ARBOVIRUSNIH INFEKCIJA  
CLINICAL MANIFESTATIONS AND DIAGNOSIS OF ARBOVIRAL INFECTIONS**

**Moderator/Chair: Snježana Židovec-Lepej**

- 12.15 - 12.35**      ***INVITED LECTURE:***  
***The envelope protein of Usutu virus attenuates West Nile virus virulence in immunocompetent mice***  
Lucija Jurišić, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italy
- 12.35 - 12.50**      ***Klinička slika krpeljnog encefalitisa/Clinical manifestations of tick-borne encephalitis***  
Dario Sabadi/Ljiljana Perić, Klinički bolnički centar Osijek/Clinical Hospital Center Osijek, Croatia
- 12.50 - 13.05**      ***Teški oblici West Nile neuroinvazivnih infekcija/Severe cases of West Nile neuroinvasive infection***  
Marija Santini, Klinika za infektivne bolesti/University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia

- 13.05 – 13.20** *Encefalitis uzrokovan West Nile virusom - radiološki nalazi s kliničkom korelacijom/West Nile encephalitis - radiologic findings with clinical correlation*  
Klaudija Višković, Klinika za infektivne bolesti/University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia
- 13.20 - 13.35** *Imunološki biljezi u neuroinvazivnim arbovirusnim infekcijama/ Immunological markers in neuroinvasive arboviral infections*  
Snježana Židovec-Lepej, Klinika za infektivne bolesti/University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia
- 13.35 - 13.45** **Rasprava/Discussion**

**(RE-)EMERGENTNI ARBOVIRUSI U TROPSKIM PODRUČJIMA**  
**(RE-)EMERGING ARBOVIRUSES IN THE TROPICS**

**Moderator/Chair: Tatjana Vilibić-Čavlek**

- 13.45 - 14.05** **INVITED LECTURE:**  
*Emerging arboviruses in the tropics*  
Kirk Osmond Douglas, Centre for Biosecurity Studies at The University of the West Indies, Cave Hill Campus, Barbados
- 14.05 - 14.20** *Meningoencefalitis nakon cijepljenja protiv žute groznice - prikaz slučaja/Meningoencephalitis after yellow fever vaccination - a case report*  
Neven Papić, Klinika za infektivne bolesti/University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia
- 14.20 - 14.35** *Epidemiološke karakteristike putnika u Ambulanti za cijepljenje i prevenciju putničkih bolesti NZZJZ "Dr. Andrija Štampar"/Travel related disease prevention in Centre for immunization and prevention of traveller's diseases in Andrija Štampar Public Health Institute*  
Mirjana Lana Kosanović Ličina, Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar"/Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 14.35 - 14.45** *Emergentne arbovirusne infekcije u putnika/Emerging arboviral infections in Croatian travelers*  
Maja Bogdanić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 14.45 - 15.00** **Rasprava/Discussion**
- 15.00 - 15.15** **Stanka/Break**

**PRAĆENJE I PREVENCIJA ARBOVIRUSNIH INFEKCIJA NA PODRUČJU HRVATSKE  
SURVEILLANCE AND PREVENTION OF ARBOVIRAL INFECTIONS IN CROATIA**

**Moderator/Chair: Josip Madić**

- 15.15 – 15.30** *Domaće životinje kao sentinel za praćenje arbovirusnih infekcija/Domestic animals as sentinels for arboviral diseases surveillance*  
Ljubo Barbić, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia
- 15.30 - 15.45** *Monitoring invazivnih vrsta komaraca u Hrvatskoj/Monitoring of invasive mosquito species in Croatia*  
Nataša Janev Holcer, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 15.45 - 16.00** *DNA barkodiranje i bioraznolikost krpelja (Acari: Ixodidae) Hrvatske/Tick (Acari: Ixodidae) DNA barcoding and biodiversity in Croatia*  
Mladen Kučinić, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu/ Faculty of Science University of Zagreb, Croatia
- 16.00 - 16.15** *Prevenција emergentnih zoonoza cijepljenjem/Vaccination against emerging zoonoses*  
Bernard Kaić, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, C
- 16.15 - 16.30** **Rasprava/Discussion**
- 16.30 – 17.00** **Prikaz kratkih priopćenja i postera/Short report and poster presentations**
- Gorup L, Knežević S.** Neuobičajena prezentacija infekcije virusom krpeljnog meningoencefalitisa bolovima u trbuhu i povišenjem enzima gušterače – prikaz slučaja/Unusual presentation of tick-borne meningoencephalitis virus infection with abdominal pain and elevated pancreatic enzymes – a case report
- Vilibić-Čavlek T i sur.** Dijagnostika krpeljnog encefalitisa u bolesnika s ranijom flavivirusnom infekcijom/Diagnosis of tick-borne encephalitis in patient with previous flavivirus infection

*Petak, 11. lipnja 2021./Friday, 11 June 2021*

**COVID-19: EMERGENA GLOBALNA JAVNOZDRAVSTVENA PRIJETNJA  
COVID-19: AN EMERGING GLOBAL PUBLIC HEALTH THREAT**

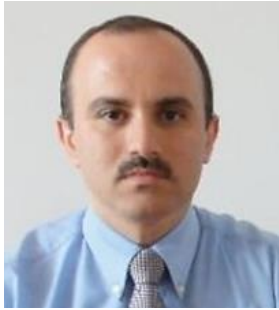
**Moderatori/Chairs: Irena Tabain, Vladimir Stevanović**

- 09.00 – 09.20** **INVITED LECTURE:**  
***COVID-19: Experiences from the Middle East***  
Nenad Pandak, The Royal Hospital, Muscat, Oman
- 09.20 – 09.35** ***Klinička slika COVID-19/Clinical characteristics of COVID-19***  
Alemka Markotić, Klinika za infektivne bolesti/University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia
- 09.35 – 09.50** ***Epidemiološke značajke COVID-19 na području Hrvatske/Epidemiological characteristics of COVID-19 in Croatia***  
Goranka Petrović, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 09.50 – 10.05** ***Epidemiološko i kliničko značenje određivanja Ct vrijednosti RT-PCR testa na SARS-CoV-2/Epidemiological and clinical significance of SARS-CoV-2 RT-PCR Ct value***  
Jasmina Vraneš, Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar"/Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 10.05 – 10.20** ***Genska raznolikost SARS-CoV-2 na području Hrvatske/Genetic diversity of SARS-CoV-2 in Croatia***  
Ivana Ferenčak, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 10.20 – 10.30** **Rasprava/Discussion**
- 10.30 – 10.45** **Stanka/Break**
- 10.45 – 11.05** **INVITED LECTURE:**  
***Three human coronaviruses (HKU1, OC43, 229E) from patients and bovine coronavirus (BCoV) from cattle with respiratory disease in Slovenia: genetic characterization of field strains***  
Ivan Toplak, Institute of Microbiology and Parasitology, Veterinary Faculty University of Ljubljana, Slovenia
- 11.05 – 11.25** ***Seroprevalencija SARS-CoV-2 na području Hrvatske/ Seroprevalence of SARS-CoV-2 in Croatia***  
(Irena Tabain, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia)

- 11.25 – 11.40** *Seroprevalencija SARS-CoV-2 u djece od inicijalnog do trećeg vala COVID-19 epidemije: Rezultati Klinike za dječje bolesti Zagreb/Seroprevalence of SARS-CoV-2 in children from the initial to the peak of the third wave of the COVID-19 epidemic: Results of Children's Hospital Zagreb*  
Jasna Leniček Krleža, Klinika za dječje bolesti Zagreb/Children's Hospital Zagreb, Croatia
- 11.40 – 11.55** *Prevalencija SARS-CoV-2 antitijela u hrvatskih primatelja solidnih organa/Prevalence of SARS-CoV-2 antibodies in Croatian solid organ transplant recipients*  
Anna Mrzljak, Klinički bolnički centar Zagreb/Clinical Hospital Center Zagreb, Croatia
- 11.55 – 12.10** *COVID-19 u osoba starije životne dobi – epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe na području Grada Zagreba/COVID-19 in older age – COVID-19 epidemics in nursing homes for elderly in the City of Zagreb*  
Tanja Ćorić/Branko Kolarić, Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr Andrija Štampar"/Andrija Štampar Teaching Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 12.10 – 12.25** *Značaj kućnih ljubimaca u epidemiologiji COVID-19 - Što danas znamo?/The role of pet animals in the epidemiology of COVID-19 - What do we know today?*  
Vladimir Stevanović, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu/Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia
- 12.25 – 12.40** *Cijepljenje protiv COVID-19/Vaccination against COVID-19*  
Iva Pem Novosel, Hrvatski zavod za javno zdravstvo/Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia
- 12.40 – 12.50** **Stanka/Break**
- 12.50 – 13.30** **Prikaz kratkih priopćenja i postera/Short report and poster presentations**
- Mislav Glibo i sur.:** SARS-CoV-2 antigenski test – manje pouzdan u starijih bolesnika?/SARS-CoV-2 rapid antigen tests – less reliable among the elderly patients?
- Thomas Ferenc i sur.:** Zanimamo li subakutni tireoiditis kao posljedicu bolesti COVID-19?/Is subacute thyroiditis an underestimated clinical feature of COVID-19?
- Ljiljana Milašinčić i sur.:** Prisutnost protutijela na NP/RBD antigen u bolesnika nakon preboljele SARS-CoV-2 infekcije i cijepljenih osoba/NP/RBD antibody response in patients with SARS-CoV-2 infection and vaccinated persons
- Ljiljana Antolašić i sur.:** Seroprevalencija na SARS-CoV-2 u profesionalno izloženih osoba nakon prvog i drugog vala COVID-19 pandemije/SARS-CoV-2 seroprevalence in professionally exposed persons after the first and second COVID-19 pandemic wave
- 13.30 – 14.00** **Rasprava. Zaključci. Zatvaranje simpozija/Discussion. Conclusions. Closing.**



## **POZVANI PREDAVAČI / INVITED LECTURERS:**



**Dr.sc. Elkhhan Gasimov**  
WHO, Regional Office for  
Europe



**Dr.sc. Gaëlle Gonzalez**  
Maisons-Alfort, France



**Dr.sc. Giovanni Savini**  
Teramo, Italy



**Dr.sc. Tamaš Petrović**  
Novi Sad, Serbia



**Dr.sc. Kirk O. Douglas**  
Cave Hill, Barbados



**Dr.med.vet. Lucija Jurišić**  
Teramo, Italy



**Dr.sc. Nenad Pandak**  
Muscat, Oman



**Izv.prof.dr.sc. Ivan Toplak**  
Ljubljana, Slovenia

# ***SAŽECI POZVANIH PREDAVANJA***

## VECTOR-BORNE DISEASES IN THE WHO EUROPEAN REGION

**Elkhan Gasimov**

*Malaria, neglected tropical diseases and other vector-borne diseases, World Health Organization Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark*

e-mail: [gasimove@who.int](mailto:gasimove@who.int)

Vector-borne diseases (VBDs) pose a major threat to the health of societies around the world. They are caused by parasites, viruses and bacteria transmitted to human beings by mosquitoes, sandflies, triatomine bugs, blackflies, ticks, fleas, tsetse flies, mites, snails and lice. Major global VBDs affecting humans include malaria, dengue, lymphatic filariasis, Chagas disease, onchocerciasis, leishmaniasis, chikungunya, Zika virus disease, yellow fever, Japanese encephalitis and schistosomiasis. In the WHO European Region, VBDs such as leishmaniasis, West Nile fever, Crimean-Congo haemorrhagic fever, Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis continue to cause a public health burden in a number of countries.

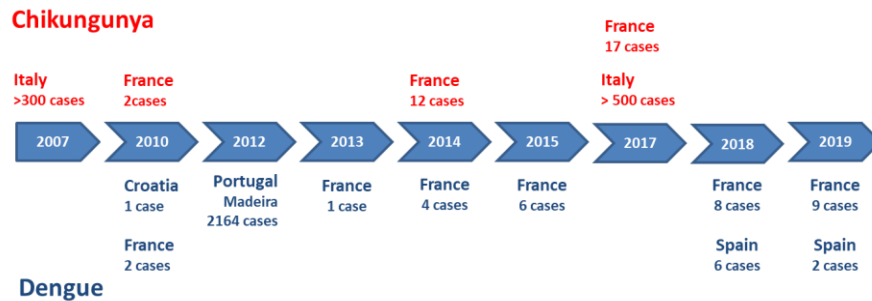
The WHO European Region, consisting of 53 Member States and stretching from Greenland to the Russian Federation and from the Mediterranean to the Baltic Sea, is endemic for many VBDs. The wide variety in climate and topography, typical for such a vast and highly varied geographical region, provides rich biological niches for many different arthropod vectors as well as associated parasites and pathogens. Historically, these conditions led to a widespread distribution of VBDs in the Region, often with high prevalence.

After the disappearance of plague and yellow fever in past centuries, most VBDs were eliminated from western parts of the WHO European Region soon after the Second World War; in many eastern and southern parts of the Region, VBD elimination was achieved more recently or is still in progress. In 2016 the Region was declared free of indigenous malaria transmission.

Introduction of invasive vector mosquitoes, together with the geographical expansion of some native vector mosquitoes, has substantially increased the threat of re-emerging VBDs in the European Region. Of most concern is the rapid expansion of the geographical range of *Aedes albopictus*, as well as reports of establishment of *Ae. aegypti* along coastal areas of the Black Sea region and on Madeira (Portugal).

The growing number of travellers moving between countries of the European Region and countries outside the Region that are endemic for various VBDs enhances the risk of disease importation. One example of this is an outbreak of chikungunya in Italy in 2007, when a traveller from India arrived with the virus and infected the local population of *Ae. albopictus*; this was the start of an outbreak of chikungunya with approximately 500 cases. Subsequently, autochthonous chikungunya cases in Europe were reported in 2010 and 2014, with the latest outbreaks in Italy and France in 2017. In the past decade, few countries have also experienced several cases of autochthonous dengue (Fig. 1.).

Fig. 1. Autochthonous chikungunya and dengue cases in the WHO European Region



Along with dengue and chikungunya, other vector-borne diseases such as West Nile fever, Zika and Lyme borreliosis are also causes for concern.

These examples and recent evidence of the arrival and establishment of other invasive vectors and/or pathogens in the WHO European Region serve as a stern reminder of the potential burden these developments may cause and have caused public health concerns that need to be addressed.

Over the past years the WHO Regional Office has made efforts to strengthen the capacities of countries to deal with invasive mosquitoes and (re-)emerging vector-borne diseases and has provided technical assistance to countries in need despite limited resources.

To achieve the regional goal, which is to prevent, carry out surveillance of and control (re-)emerging vector-borne diseases of public health importance action is needed in the areas described below:

- (a) Strengthening intersectoral and intrasectoral action and collaboration: reduction of the disease burden through vector control is a shared responsibility of all members of society. Effective coordination of vector control activities is required between the health and non-health sectors, as well as within the health sector.
- (b) Communities play a major role in, and are key to the success and sustainability of, vector control. Community engagement and mobilization requires working with local residents to improve vector control and build resilience against future disease outbreaks.
- (c) Enhancing vector surveillance and monitoring and evaluating interventions.
- (d) Strong political commitment supported by appropriate human and financial resources is needed to enable an integrated approach to vector control to be undertaken at national and subnational levels, including within local governments and municipalities.

## **OVERVIEW OF WNV AND USUV CIRCULATION IN EUROPE FROM 2016 TO 2020**

**Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, Marine Dumarest, Steeve Lowenski, Rayane Amaral-Moraes, Cécile Beck**

*Anses animal health laboratory, UMR1161 virologie, INRAe, ANSES, École nationale vétérinaire d'Alfort (ENVA),  
Maisons-Alfort, France*

e-mail: [gaelle.gonzalez@anses.fr](mailto:gaelle.gonzalez@anses.fr)

West Nile virus and Usutu virus (WNV and USUV) are closely related neurotropic mosquito-borne flaviviruses both amplified in an enzootic cycle involving *Culex* mosquitoes as vectors and wild birds as amplifying reservoirs. Humans, horses (only for WNV) and other mammals may be infected by mosquito bites but are considered as dead-end hosts. In association with important anthropogenic factors (climate changes, biodiversity loss), increased frequency and severity of WNV and USUV outbreaks have been reported over the last decade in Europe. From 2016 to 2020, we noticed, in Europe, an important increase of WNV outbreaks among birds and equids. In 2018, Hungary faced a dramatic increase of WNV positive cases among birds and equines. Moreover, Germany reported its first WNV outbreaks in birds and equines in 2018 followed by a huge increase in 2019 and a plateau in 2020. Introduction of WNV lineage 2 was identified and we hypothesize an endemic seasonal circulation of WNV lineage 2 through resident birds in Germany. The same year, France detected an acute WNV infection in 13 horses (WNV lineage 1) and reported its first WNV lineage 2 outbreak in birds in Southern France. In 2020, Southern Spanish provinces of Seville faced a dramatic increase of WNV lineage 1 positive cases among equids (139) and birds (9). The same year, WNV lineage 2 was identified in 3 birds in Catalonia (as in 2017). Regarding WNV human cases, Europe faced its largest outbreak in 2018 (> 7,2 higher than 2017 WNV infections) with a drop by 70% in 2019. In 2020, more severe manifestations of WNV infections with neurological signs were reported. Over the four years period, a 30% increase of WNV outbreaks among equids was reported in 2018 compared to 2017. There was an expansion of WNV lineage 2 circulation in the North (Germany and Netherlands) and further West in the Mediterranean regions (South of France and North of Spain).

Regarding, USUV circulation in Europe, there is a genetic diversity of USUV strains. In humans, birds and mosquitoes the USUV strains belong mostly to the European lineage. There was an incursion of African lineage in several countries such as France, Germany, Austria and Belgium. We observed an important increase of USUV positive birds in 2018 (1468 cases) compared to 2017 (205 cases) and 2019-2020. USUV Europa 2 was first detected in several countries such as Germany, Austria, and Hungary. In 2020, the United Kingdom reported for the first time the emergence of USUV Africa 3.

In France, in 2018, Usutu virus RNA was detected in 104 birds. Most of them were blackbirds (68/104) and great grey owls (23/104) distributed in 46 departments. Sequences analysis of USUV revealed the circulation of USUV Africa 3 across France. Phylogenetic analysis demonstrated that the 2018 USUV strains closely clustered with viruses that previously circulated in France from 2015 to 2017. Indeed, France faced three independent introduction events since 2015.

In humans, USUV infection is mostly asymptomatic but since 2016, there is an increase of human cases with neurological signs (Europa 2 lineage).

Across Europe, there is the occurrence of numerous and sustained outbreaks in avifauna that constitute a serious warning signal of zoonotic risk for USUV.

These two flaviviruses show a wide spectrum of avian and mammalian hosts but a specific pathogenicity to a limited number of them. The mechanisms involved in such susceptibility/resistance phenotypes are still unknown. Our results highlight the importance of continuous surveillance of these two closely related emerging arboviruses and the need to identify the impact of co-circulation and co-infection both in birds and mosquitoes.

## EMERGING FLAVIVIRUSES IN ITALY

**Giovanni Savini, Federica Iapalo, Federica Monaco**

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

e-mail: [g.savini@izs.it](mailto:g.savini@izs.it)

Usutu (USUV) and West Nile (WNV) viruses are emerging zoonotic agents belonging to the genus *Flavivirus*, family *Flaviviridae*. Their natural transmission cycles are complex and usually involve ornithophilic mosquitoes and avian hosts. Both viruses first appeared in Italy in the second half of the 90s, USUV in 1996, WNV in 1998. Aiming to early detect arbovirus circulation and to reduce the risk of infection in humans, several National surveillance programs have been put in place by the Italian Ministry of Health since 2002. From 2020, WNV and USUV surveillance activities have been included in the National Plan for Prevention, Surveillance and Response to Arbovirus 2020-2025. The one health philosophy has been adopted in designing all these plans in which synergism, collaboration and an increasing degree of integration between human and animal health sectors are clearly evident. This approach was capable of detecting viral circulation days before symptom-onset of the first confirmed human case. This triggered timely blood and transplant safety measures, which enabled to detect and stop nearly 100 infected donors between 2018 and 2020. Most of the Italian WNV 2018-2020 outbreaks were caused by lineage 2 strains (WNV-L2). At the end of the last vector season, WNV strains belonging to lineage 1 (WNV-L1) were also detected in a goshawk (*Accipiter gentilis*) and a kestrel (*Falco tinnunculus*) in Campania region. It was the first WNV-L1 detection in Italy after 3 years of silence. A full genome sequence analyses of WNV strains belonging either to lineage 1 or to lineage 2, which have circulated in Italy between 2008 and 2020, revealed close relationships among them. Either WNV-L1 or WNV-L2 also clustered according to regions. These results confirm the hypothesis that all strains circulating in Italy derived from single introductions of WNV-L1 and WNV-L2. Their further spread in Italy has been probably due to short distance infected migrant birds. The regional clusters of the Italian WNV isolate sequences also suggest the occurrence of local enzootic transmission cycles.

## VIRUSNE I VEKTORSKI PRENOSIVE VIRUSNE ZOONOZE U SRBIJI – AKTIVNOSTI VETERINARSKE STRUKE

**Tamaš Petrović<sup>1</sup>, Dušan Petrić<sup>2</sup>, Dejan Vidanović<sup>3</sup>, Diana Lupulović<sup>1</sup>, Gospava Lazić<sup>1</sup>, Milena Samojlović<sup>1</sup>,  
Ivana Hrnjaković Cvjetković<sup>4,5</sup>, Aleksandra Ignjatović Čupina<sup>2</sup>, Mihaela Kavran<sup>2</sup>, Milanko Šekler<sup>3</sup>,  
Olivera Bjelić Čabrilo<sup>6</sup>, Sava Lazić<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Naučni Institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija

<sup>3</sup> Veterinarski specijalistički institut Kraljevo, Kraljevo, Srbija

<sup>4</sup> Institut za javno zdravlje Vojvodine, Novi Sad, Srbija

<sup>5</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad, Srbija

<sup>6</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija

e-mail: [tomy@niv.ns.ac.rs](mailto:tomy@niv.ns.ac.rs)

Cilj ovoga rada je da prikaže podatke o sprovedenim istraživanjima prisustva i raširenosti nekih zoonotskih emergentnih virusa čija cirkulacija je utvrđena na području Srbije sa akcentom na područje Vojvodine.

Prvi podaci o intenzivnijem prisustvu virusa Zapadnog Nila (VZN) u Srbiji utvrđeni su serološkim ispitivanjima konja u Vojvodini 2009 i 2010. god, kada je prisustvo antitela protiv VZN detektovano kod 12% (46/349) uzoraka. Od tada, prisustvo VZN se konstantno prati serološkim testiranjima konja, kao i utvrđivanjem prisustva virusa kod divljih ptica i komaraca, a od 2012. god se konstantno beleže pojave i epidemije infekcije VZN u humanoj populaciji. Uvažavanjem postulata „Jednog zdravlja“ veterinarska služba na čelu sa Upravom za veterinu ja od 2014. god pokrenula i finansira nacionalni program monitoringa VZN, koji je uspešno otkrivao cirkulaciju VZN pre pojave prvih slučajeva kod ljudi. Program obuhvata testiranja sentinel životinja na prisustvo specifičnih antitela, a divljih ptica i komarca, kao prirodnih domaćina i vektora VZN, na prisustvo virusa. Područje Srbije se danas može smatrati endemskim područjem na kojem se svake godine u manjoj ili većoj meri beleži pojava infekcije VZN. Podaci unazad 3 godine ukazuju na najintenzivnije širenje virusa u 2018. god kada je u Srbiji registrovano 415 slučajeva oboljevanja ljudi sa 36 smrtnih ishoda u 17 od 25 okruga. Po Programu monitoringa u sezoni 2018. god je utvrđeno prisustvo IgM antitela (akutne infekcije) kod konja (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) i to u 4 okruga u junu, 8 u julu, 7 u avgustu i 3 u septembru. Prisustvo virusa VZN je detektovano kod 12,21% (98/802) ispitanih pulova komaraca *Culex pipiens* i to još vrlo rano u junu (8,82%; 15/170), a zatim i u julu (15,05%; 59/392) i avgustu (11,42%; 24/210). VZN nije detektovan kod komaraca uzorkovanih u septembru (0%; 0/30). Pozitivni uzorci komaraca na VZN su detektovani u 13 od 25 okruga, sa najvećom prevalencom u severnim i centralnim delovima zemlje. VZN je utvrđen i kod 18 (11,61%; 18/155) uzorka tkiva uginulih divljih ptica sa područja 8 okruga i u 6,56% (13/198)



uzoraka ždrelnih briseva živih divljih ptica sa područja 5 okruga, dok ispitivanjem odstreljenih divljih ptica VZN nije utvrđen (0/12). U 2019.god je utvrđena manja cirkulacija VZN, a iz programa nadzora je isključeno testiranja komaraca, što je u velikoj meri umanjilo njegovu svrsishodnost. Utvrđeno je 0,4 % (10/2464) IgM pozitivnih uzoraka krvnih seruma sentinel konja, a prisustvo VZN je utvrđeno kod 2,1% (10/480) ždrelnih briseva, 10,1% (6/59) uginulih i kod 0% (0/18) odstreljenih divljih ptica. Manji broj *Cx. pipiens* uzoraka i lokaliteta (66/34; Vojvodina i grad Loznica) je ipak ispitan kroz istraživački rad, no bez pozitivnog nalaza na WNV. U 2020.god nije ni bilo programskog praćenja VZN u Srbiji ali je kroz istraživački rad ispitano 552 uzoraka pulova *Cx. pipiens-a* sa 182 lokaliteta u Vojvodini i gradu Loznica, a VZN je detektovan u 11 (1,99%) uzoraka što je ukazivalo na malu cirkulaciju virusa.

Prisustvo virusa krpeljskog encefalitisa (VKE) je utvrđeno u krpeljima *Ixodes ricinus* prikupljenim tokom 2014/2015. godine, nekoliko dekada nakon prvih nalaza. Ispitivanjem 50 krpelja sa dva lokaliteta sa Fruške Gore i 450 krpelja sa 15 lokaliteta u okolini Beograda utvrđeno je prisustvo VKE kod 2% (1/50) i 6,6% (30/450) ispitanih krpelja i to na 2 od 17 lokaliteta (Andrevlje, Fruška Gora i Manastirska šuma-Rakovica). Jedan od detektovanih VKE je molekularno tipiziran kao zapadnoevropski podtip virusa. Osim toga, niska seroprevalenca na VKE je utvrđena kod 0,37% (1/267) ispitanih krvnih seruma ljudi u istom periodu na području Vojvodine. Ispitivanjem krpelja *Ixodes ricinus* prikupljenih tokom 2018., 2019. i 2020. godine nije detektovan VKE.

Prisustvo Usutu virusa (USUV), trećeg po redu flavivirusa, je detektovano u 2,75% (3/109) i 9,73% (18/185) ispitanih zbirnih uzoraka komaraca *Cx. pipiens* uzorkovanih na 65 lokaliteta na području Vojvodine tokom 2017. i 2018. god. Dva detektovana USUV su sekvencionirana i molekularno tipizirana kao USUV linije 2 evropskog podtipa virusa. Ovim istraživanjima su potvrđeni prethodni prvi nalazi ovoga virusa u komarcima i nalazi antitela protiv USUV kod ljudi sa područja Južnobačkog okruga tokom 2014.godine. Tokom 2019. i 2020. godine je ispitan prisustvo USUV kod komaraca *Cx. pipiens* (20 uzoraka sa 20 lokaliteta; i 79 uzoraka sa 35 lokaliteta) i kod uginulih divljih ptica (38 sa 28 lokaliteta, i 5 uzoraka sa 5 lokaliteta), kao i kod 40 slepih miševa (*Miniopterus schreibersii* i *Rhinolophus hipposideros*) na 2 lokaliteta tokom 2020. god, no prisustvo USUV nije utvrđeno.

Od jeseni 2019. godine pokrenuta su istraživanja prisustva i raširenosti virusa hemoragičnih groznica (Hanta virusa Dobrava) kod prirodnih domaćina - mišolikih glodara kako urbanih tako i šumskih/poljskih sredina u okolini Novog Sada. Ulovljeno je 137 jedinki sedam različitih vrsta. Prisustvo DOBV je potvrđeno kod 10 jedinki i to kod vrsta: *Apodemus agrarius* (kod 3 jedinke sa Kamenjara, Novi Sad, 1 jedinke na području Dunavca Sremski Karlovci i 2 jedinke iz Koviljskog rita); *A. sylvaticus* (1 jedinke sa Kamenjara, Novi Sad, i 1 jedinke sa Iriškog venca), *A. flavicollis* (1 jedinke iz Koviljskog rita) i *Micromys minutus* (1 jedinke iz Koviljskog rita).

Svi prikazani rezultati istraživanja ukazuju na neophodnost mnogo intenzivnijeg i koordinisanog nadzora nad arbovirusnim i drugim virusnim zoonozama baziranog na postulatima „Jednog zdravlja“.

**Zahvalnica:** Istraživanja su realizovana u okviru ugovora o realizaciji i finansiranju naučnoistraživačkog rada (br.: 451-03-9/2021-14/200031; 451-03-9/2021-14/200117 i 451-03-9/2021-14/200114) Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja R. Srbije.

## THE ENVELOPE PROTEIN OF USUTU VIRUS ATTENUATES WEST NILE VIRUS VIRULENCE IN IMMUNOCOMPETENT MICE

Lucija Jurisic<sup>1,2</sup>, Guendalina Zaccaria<sup>1</sup>, Daniela Malatesta<sup>1</sup>, Giovanni Di Teodoro<sup>1</sup>, Annamaria Conte<sup>1</sup>, Giovanni Savini<sup>1</sup>, Alessio Lorusso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise (IZSAM), Teramo, Italy;

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary Medicine, University of Teramo, Italy

e-mail: [l.jurisic@izs.it](mailto:l.jurisic@izs.it)

West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are the two most widespread mosquito-borne flaviviruses in Europe with significant public health impact causing severe neuroinvasive disease in humans. Although USUV is an emerging pathogen, little is known about its pathogenesis, biologic features, virulence factors and host spectrum. Moreover, despite the existence of several reverse genetics studies on flaviviruses, limited number involved USUV.

Here we report for the first time the genomic engineering of USUV by reverse genetics.

In our study we first compared the kinetics of infections of three wild type (wt) WNV and one USUV isolates at different doses in adult immunocompetent mice. While all WNV isolates showed the same severe neurovirulence properties, USUV did not cause clinical signs in mice. Then, we engineered WNV and USUV genome by reverse genetics. While recombinant wild type WNV (r-wt WNV) was successfully rescued, despite several attempts, r-wt USUV was not rescued. In turn, a recombinant virus carrying the 5'-UTR of WNV within the USUV genome backbone (r-USUV<sub>5'UTR WNV</sub>) was rescued and when administered to mice, it did not cause signs or disease as wt USUV, suggesting that 5'UTR of a marked neurotropic parental WNV was not *per se* a virulence factor. Interestingly, a chimeric virus carrying the E protein of USUV in the WNV genome backbone (r-WNV<sub>E USUV</sub>) showed an attenuated profile in mice compared to wt WNV but significantly more virulent than wt USUV. Therefore, we demonstrated that the E protein of USUV was likely responsible for the observed attenuated profile in mice after administering with r-WNV<sub>E USUV</sub>.

## **EMERGING ARBOVIRUSES IN THE TROPICS**

**Kirk Osmond Douglas<sup>1</sup>, Byron Martina<sup>2</sup>, Troy Lorde<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *Centre for Biosecurity Studies, The University of the West Indies, Cave Hill, St. Michael, Barbados*

<sup>2</sup> *Artemis One Health Research Foundation, 2629 JD Delft, The Netherlands*

<sup>3</sup> *Faculty of Social Sciences, The University of the West Indies, Cave Hill, St. Michael, Barbados*

e-mail: [kirk.douglas@cavehill.uwi.edu](mailto:kirk.douglas@cavehill.uwi.edu)

The Caribbean provides ideal conditions enabling the circulation of multiple arboviruses including dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV), West Nile virus (WNV), Zika virus (ZIKV), Yellow fever virus (YFV) and Mayaro virus (MAYV). Dengue has been endemic throughout the Caribbean for over 30 years with all four DENV serotypes in circulation leading to hyperendemicity. However, the circulation of MAYV, WNV and YFV has thus far been limited to a few Caribbean countries particularly those with intact Neotropical forests and fauna which support the sylvatic cycle of virus transmission. Public health planning should consider arboviral epidemic periodicity, the current COVID-19 pandemic and similar clinical symptomology between several arboviral diseases and COVID-19. A green post-COVID-19 economic recovery has been strongly recommended by United National Environment Programme (UNEP) to rebuild economies in Caribbean and Latin America. Tourism is a major economic earner for the Caribbean and the effective management of infectious diseases is pivotal in maintaining a safe environment for international tourists. The merger of biosecurity and the circular bioeconomy, with the derivation of economic value from waste streams in the Caribbean, can aid in reducing waste, public health costs, mosquito proliferation and arbovirus transmission, benefitting international tourists travelling for holidays.

## **COVID-19: EXPERIENCE FROM THE MIDDLE EAST**

**Nenad Pandak**

*The Royal Hospital, Muscat, Oman*

e-mail: [npandak@gmail.com](mailto:npandak@gmail.com)

During December 2019, a clustering of pneumonia cases occurred in Wuhan, China. At the end of the same month, the Wuhan Municipal Health Commission reported this outbreak to the WHO which put this information on social media. Soon the Chinese virologists sequenced the virus that caused the disease and in the first decade of January shared this result. Immediately after this the first case of the new respiratory disease was confirmed outside China and very soon this infection started to disseminate worldwide so WHO declared it to be a public health emergency of international concern. Very soon, the new disease labeled as COVID-19, spread globally significantly influencing and changing human lives. The first COVID-19 cases in Oman were confirmed in late February 2021. Those were imported infections but after a month the first local transmission was confirmed and the infection started to spread all over the country. The biggest number of cases is noted in Muscat Governorate which is the most populated area in Oman. This was one of the reasons why, in the beginning of the outbreak, The Royal Hospital was designated as the focal point for COVID-19 patients treatment. As the number of cases was rising, other hospitals in Oman were involved in the treatment as well. Until the end of May 2021, the total number of adult COVID-19 patients hospitalised the Royal Hospital was 1,634 out of which 829 were treated in the Ambulatory ward and 805 in the ICU. The total number of patients that died so far is 415. The majority of confirmed cases were in the patients group 15-59 years old, but at the same time the majority of patients that died were from the 60+ age group. Comparing Middle Eastern and European countries' epidemic curve, numbers of confirmed cases, and mortality, it could be concluded that there are some differences between these countries, probably with the multifactorial causes like climate conditions, demographic characteristics and epidemiological approach aiming to control the COVID-19 pandemics.

**THREE HUMAN CORONAVIRUSES (HKU1, OC43, 229E) FROM PATIENTS AND BOVINE CORONAVIRUS (BCoV) FROM CATTLE WITH RESPIRATORY DISEASE IN SLOVENIA: GENETIC CHARACTERISATION OF FIELD STRAINS**

**Monika Jevšnik Virant<sup>1</sup>, Danijela Černe<sup>2</sup>, Miroslav Petrovec<sup>1</sup>, Tomislav Paller<sup>3</sup>, Ivan Toplak<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

<sup>2</sup> *Institute of Microbiology and Parasitology, Virology Unit, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

<sup>3</sup> *National Veterinary Institute, Veterinary Faculty, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia*

e-mail: [ivan.toplak@vf.uni-lj.si](mailto:ivan.toplak@vf.uni-lj.si)

Coronaviruses (CoV) are widely distributed pathogens of human and animals and can cause mild or severe respiratory and gastrointestinal disease. Antigenic and genetic similarity of some CoVs within the Betacoronavirus genus is evident. Therefore, for the first time in Slovenia, we investigated the genetic diversity of partial 390-nucleotides of RNA-dependent-RNA polymerase gene (RdRp) for 66 human (HCoV) and 24 bovine CoV (BCoV) positive samples, collected between 2010 and 2016 from human patients and cattle with respiratory disease. The characterized CoV strains belong to four different clusters, in three separate human clusters HCoV-HKU1 (n=34), HCoV-OC43 (n=31) and HCoV 229E (n=1) and bovine grouping only as BCoVs (n=24). BCoVs from cattle and HCoV-OC43 were genetically the most closely related and share 96.4–97.1% nucleotide and 96.9–98.5% amino acid identity. The genetic comparison of HCoV and BCoV from patients with clinical signs of respiratory disease did not provide evidence for zoonotic transmission of BCoV from bovine patients to humans or vice versa in Slovenia. This study is the first genetic comparison of these three HCoVs circulating in Slovenian human and BCoV in cattle populations and their phylogenetic relationship with CoVs available in GenBank database.

# ***SAŽECI USMENIH IZLAGANJA***

## PREVALENCE AND MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ARBOVIRAL INFECTIONS IN CROATIA

Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>1</sup>, Maja Bogdanić<sup>1</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>1</sup>, Dario Sabadi<sup>1</sup>, Ljiljana Perić<sup>1</sup>, Marija Santini<sup>1</sup>, Lorena Jemeršić<sup>1</sup>, Jelena Prpić<sup>1</sup>, Tanja Potočnik-Hunjadi<sup>1</sup>, Božana Miklaušić-Pavić<sup>1</sup>, Elizabeta Dvorski<sup>1</sup>, Tamara Butigan<sup>2</sup>, Ljiljana Milašinčić<sup>2</sup>, Ljiljana Antolašić<sup>2</sup>, Snježana Artl<sup>2</sup>, Željka Hruškar<sup>2</sup>, Gordana Kolaric-Sviben<sup>2</sup>, Sanja Zember<sup>1</sup>, Ivana Ferencak<sup>2</sup>, Eddy Listeš<sup>2</sup>, Giovanni Savini<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Collaborators on the project CRONEUROARBO

<sup>2</sup> Collaborators of the Reference Center for Diagnosis and Surveillance of Viral zoonoses Croatian Ministry of Health, Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> OIE Reference Center for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale „G. Caporale“; Teramo, Italy

e-mail: [tatjana.vilibic-cavlek@hzjz.hr](mailto:tatjana.vilibic-cavlek@hzjz.hr)

Arboviruses represent an emerging public health threat in many European countries. We analyzed the prevalence and molecular epidemiology of arboviral infections detected in Croatia during a four consecutive transmission seasons (2017-2020). A total of 488 patients with neuroinvasive disease ("febrile headache", meningitis, meningoencephalitis) were tested for the presence of neuroinvasive arboviruses: tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), Toscana virus (TOSV), Tahyna virus (TAHV) and Bhanja virus (BHAV). Cerebrospinal fluid (CSF) and urine samples were collected and tested for viral RNA. In addition, CSF and serum samples were tested for the presence of IgM and IgG antibodies.

Arboviral etiology was confirmed in 120 (24.6%) patients. WNV was most commonly detected (62/12.7%), followed by TBEV (49/10.1%). USUV was documented in 3 (0.6%) patients as well as TOSV (3/0.6%). In three patients (0.6%), a TBEV/*Borrelia burgdorferi* coinfection was confirmed. Arboviral infections showed seasonal distribution. TBEV occurred in two peaks, April-August and October-November. WNV infections occurred from July to September. TOSV and USUV were detected in summer and early autumn.

Majority of patients with neuroinvasive disease presented with meningitis (52.4%) and meningoencephalitis (37.1%). However, WNV myelitis as well as some rare presentations such as cerebellitis, cauda equina arachnoiditis, retinitis and opsoclonus-myooclonus syndrome were also reported.

TBEV, WNV and USUV infections were detected in continental counties, while TOSV infections were reported at the Croatian littoral. In 2019, a small outbreak of TBEV after consumption of unpasteurized goat milk was recorded in a new micro-location (Lokve Village, Gorski Kotar) (Figure 1).

WNV RNA was detected in CSF and urine samples. TBEV and USUV RNA were in urine samples of two patients. Eleven WNV strains detected in urine samples as well as TBEV and USUV strains were Sanger sequenced. Phylogenetic analysis showed circulation of TBEV European type, WNV lineage 2 and USUV Europe 2 lineage.

The presented results indicate that (re-)emerging arboviruses are widely distributed in Croatia. Molecular epidemiology of viruses detected in Croatian patients showed a similar pattern as in other European countries.

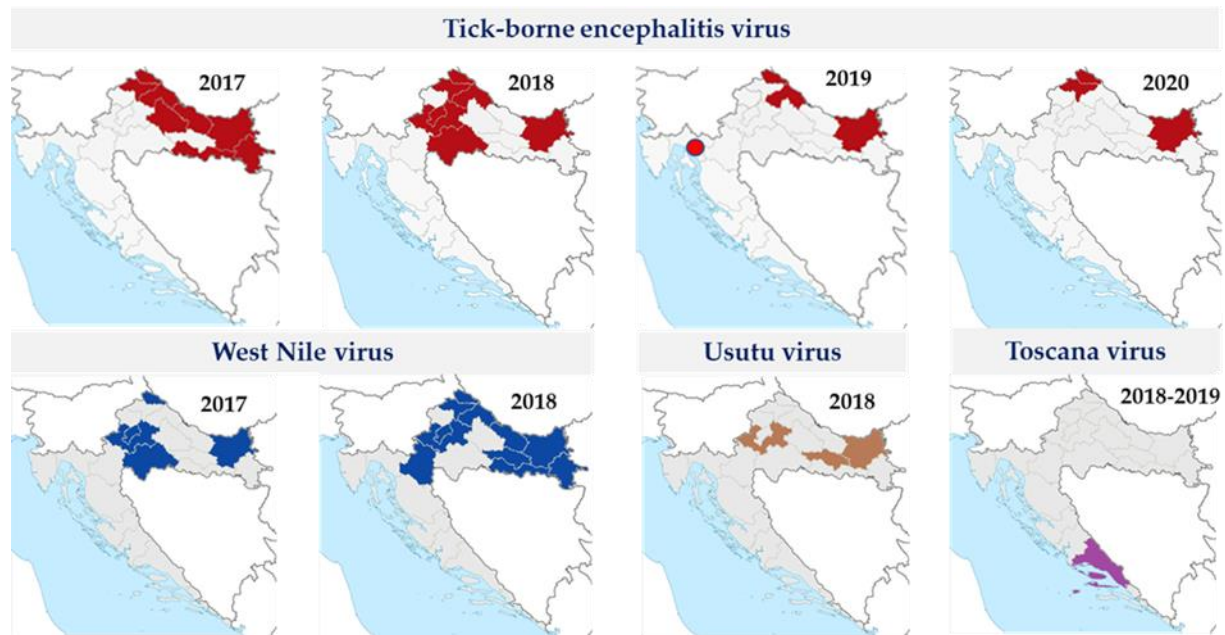


Figure 1. Geographic distribution of arboviral infections in Croatia (2017-2020)

**Acknowledgment:** HRZZ IP-2016-06-7456: Prevalence and molecular epidemiology of emerging and re-emerging neuroinvasive arboviral infections in Croatia; CRONEUROARBO; bilateral project funded by Croatian Ministry of Science and Education and Serbian Ministry of Education, Science and Technological Development: Optimization of diagnosis and surveillance of emerging and re-emerging viral vector-borne zoonoses.



## SEROPREVALENCIJA WEST NILE VIRUSA U PERADI U HRVATSKOJ U 2020. I 2021. GODINI

Vladimir Savić<sup>1</sup>, Tatjana Vilibić Čavlek<sup>2,3</sup>, Ljubo Barbić<sup>4</sup>, Mirta Balenović<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [v\\_savic@veinst.hr](mailto:v_savic@veinst.hr)

West Nile virus (WNV) jedan je od najznačajnijih arbovirusa za javno i veterinarsko javno zdravstvo. U prethodnom desetljeću u Hrvatskoj je u više navrata serološki ili detekcijom virusne RNA dokazana infekcija ovim virusom u ljudi, konja, domaće peradi i divljih ptica. Daleko najveći broj slučajeva zabilježen je u 2018. godini, dok u narednim godinama detekcija ovog virusa izostaje. Ovaj izostanak klinički očitovanih WNV infekcija moguće je posljedica značajno umanjene ili potpuno izostale cirkulacije ovog virusa u Hrvatskoj. Kako bismo dobili uvid u cirkulaciju WNV u Hrvatskoj u 2020. i 2021. godini, serološki smo pretraživali perad. Kopnena perad, naročito kokoš i puran, nakon infekcije ne pokazuju kliničke simptome, ali vrlo brzo razvijaju specifična protutijela u visokim titrovima te vrlo nisku viremiju. Tijekom 2020. godine pretražili smo 823 seruma, od čega 619 kokošnjih, 174 puranskih, 20 pačjih i deset uzoraka seruma prepelica. Ukupna seroprevalencija u domaće peradi iznosila je 5,8% s čak 40% pozitivnih seruma prepelica, 10% pozitivnih seruma pataka, 6,6% pozitivnih seruma kokoši i 0,6% pozitivnih seruma purana. Najveći udio pozitivnih seruma nađen je u Istarskoj županiji (23,5%) nakon koje slijede Virovitičko-podravska (19,4%), Krapinsko-zagorska i Zagrebačka (8,2%), Osječko-baranjska (6,9%), Brodsko-posavska (5,8%) te Požeško-slavonska i Varaždinska županija (2,5%). U Međimurskoj (0/20) i Splitsko-dalmatinskoj županiji (0/8) nisu nađeni pozitivni uzorci dok perad iz ostalih županija nije pretraživana u prošloj godini. U prva tri mjeseca 2021. godini pretražili smo 40 seruma kokoši iz Požeško-slavonske županije i svi su bili negativni što nije neočekivano budući da uzorci potječu iz prva tri mjeseca kada transmisijaska sezona WNV-a još nije počela. Najveći udio pozitivnih seruma u populaciji prepelica i pataka u 2021. godini treba uzeti s oprezom zbog općenito malog broja pretraženih uzoraka ovih vrsta, a uz to pretraživane jedinke koji potječu iz ista dva jata. Jato prepelica potječe iz Istarske županije pa je moguće to razlog daleko najvećeg udjela pozitivnih seruma (4/17) upravo u toj županiji.

Rezultati istraživanja seroprevalencije u domaće peradi nedvojbeno ukazuju na cirkulaciju WNV-a u 2020. godini u većini županija iz kojih potječe testirana perad te ostaju nerazjašnjeni razlozi izostanka klinički očitovanih infekcija WNV-om.

## REZULTATI PRAĆENJA PROŠIRENOSTI VIRUSA ZAPADNOG NILA U KONJA U REPUBLICI HRVATSKOJ U RAZDOBLJU OD 2010. DO 2020. GODINE

Iva Benvin<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>1</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>2,3</sup>, Snježana Kovač<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [ibenvin@vef.unizg.hr](mailto:ibenvin@vef.unizg.hr)

Virus Zapadnog Nila je virus iz roda *Flavivirus* i porodice *Flaviviridae*, a pripada skupini virusa koji se zajedničkim imenom nazivaju arbovirusi. Bolest Zapadnog Nila tipična je emergentna vektorska zoonoza u čijem prirodnom ciklusu različite vrste ptica predstavljaju rezervoare i prirodne domaćine, dok ulogu vektora imaju komarci. Ljudi, konji i drugi sisavci su slučajni domaćini s niskom i kratkotrajnom viremijom te ne predstavljaju izvor infekcije i ne sudjeluju u širenju bolesti. U većine slučajnih domaćina infekcija prolazi asimptomatski ili s blagim kliničkim znakovima, ali moguć je i nastup neuroloških simptoma sa smrtnim ishodom u pojedinim slučajevima.

Značajno je da se infekcije i klinički slučajevi u konja pojavljuju na istom području kao i klinički slučajevi u ljudi te im u pravilu prethode nekoliko tjedana. Stoga se program nadzora proširenosti uzročnika provodi pretraživanjem konja, a može biti pasivni i aktivni. Pasivni sustav nadzora podrazumijeva obavezno isključivanje bolesti Zapadnog Nila pri utvrđivanju neuroloških kliničkih znakova u konja. Ovakav sustav nadzora ima ograničenu učinkovitost s obzirom na učestalo izostajanje prijavljivanja oboljenja konja. Nasuprot tome, aktivni nadzor provodi se praćenjem seroprevalencije u konja dokazom IgG protutijela te potvrdom akutnih infekcija dokazom IgM protutijela imunoenzimnim testom (ELISA). Ovakav program nadzora, iako zahtjevniji, pouzdano omogućuje prikupljanje vrijednih podataka za veterinarsku medicinu i javno zdravstvo.

Na području RH sustavna kontrola bolesti Zapadnog Nila u populaciji konja započela je provedbom aktivnog nadzora tijekom 2010. godine kada je dokazom IgG protutijela ustanovljena seroprevalencija od 3,5%. Sljedeće godine seroprevalencija je iznosila 3,7%. Tijekom 2012. godine ustanovljen je značajan porast seroprevalencije na 8,7% te su po prvi put dokazane akutne infekcije konja u istočnom dijelu RH. Ove akutne infekcije su prethodile nekoliko tjedana potvrdi prvih slučajeva oboljenja ljudi na istom području.

U razdoblju od 2013. do 2018. godine program nadzora provodio se pretraživanjem tri do četiri tisuće konja na IgG protutijela i dodatnim pretraživanjem pozitivnih uzoraka na IgM protutijela radi dokaza akutnih infekcija. U navedenom razdoblju potvrđen je blagi porast seroprevalencije od 6,3% do 10,0%

ustanovljene tijekom 2018. godine. U svakoj sezoni su dokazivane i akutne infekcije konja s najvećim brojem tijekom 2014. te 2018. godine. Najranije zabilježene akutne infekcije konja u prikazanom razdoblju potvrđene su u ožujku 2018. godine, što je bila i najava sezone prijenosa s najvećim brojem oboljenja u ljudi od prve potvrde prisustva uzročnika na području RH.

Zbog porasta seroprevalencije program nadzora je modificiran 2019. i 2020. godine na način da su se četiri puta uzastopno, od lipnja do rujna, pretraživali nasumično odabrani konji s visoko rizičnih područja radi ustanovljavanja akutnih infekcija. Seroprevalencija se dodatno određivala dokazom IgG protutijela u 622, odnosno 855 nasumično odabranih uzoraka. Provedbom ovakvog programa 2019. godine dokazana je seroprevalencija od 21,4% uz potvrdu tri akutno inficirane životinje. Seroprevalencija 2020. godine je bila 18,6% uz potvrdu 14 akutno inficiranih životinja s područja čak šest županija. Navedeno potvrđuje značajan porast virusne aktivnosti na području RH od 2018. godine. Zanimljivo je da je visoki rizik od infekcija virusom Zapadnog Nila zabilježen tijekom sezone prijenosa 2020. godine uz istovremeni izostanak dokazanih oboljenja u ljudi. Ova činjenica najvjerojatnije je posljedica poddijagnosticiranosti bolesti Zapadnog Nila u ljudi u uvjetima usmjerenosti sustava javnog zdravstva na pandemiju bolesti COVID-19.

Prikazani rezultati potvrđuju da je virus Zapadnog Nila trajna i rastuća prijetnja zdravlju životinja i ljudi na području RH najmanje posljednjih deset godina. Provedbom programa sustavnog praćenja proširenosti uzročnika pretraživanjem konja prikupljeni su neprocjenjivi podaci za usmjeravanje protuepidemijskih mjera u svrhu zaštite zdravlja životinja i ljudi. S obzirom na trendove u pojavi emergentnih zaraznih bolesti, ovakva multidisciplinarna suradnja, u skladu s pristupom „Jedno zdravlje“, mora biti smjernica i za neminovne buduće izazove u nadzoru i suzbijanju vektorskih zoonoza.

## FLAVIVIRUSI U KOMARCIMA NA PODRUČJU HRVATSKE

**Ana Klobučar<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>2</sup>, Sunčica Petrinić<sup>1</sup>, Marcela Curman Posavec<sup>1</sup>, Urska Kuhar<sup>3</sup>, Ivan Toplak<sup>3</sup>,  
Josip Madić<sup>4</sup>, Sandra Vrtarić<sup>2</sup>, Tomislav Pismarović<sup>1</sup>, Danijel Poje<sup>1</sup>, Ivan Horvat<sup>1</sup>,  
Mirjana Lana Kosanović-Ličina<sup>1</sup>, Vanja Tešić<sup>1,5</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>6,7</sup>**

<sup>1</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Veterinarski fakultet, Sveučilište u Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

<sup>4</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>5</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

<sup>6</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>7</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [ana.klobucar@stampar.hr](mailto:ana.klobucar@stampar.hr)

Pojava flavivirusnih infekcija tijekom posljednja dva desetljeća sve se češće bilježi na području Europe. Među infekcijama značajno mjesto zauzimaju West Nile (WNV) i Usutu virusna (USUV) infekcija, čiji vektori su komarci.

Na području sjeverozapadne Hrvatske (Grad Zagreb i Međimurska županija) u razdoblju od 2015. do 2020. godine odrasle jedinke komaraca su uzorkovane radi testiranja na prisutnost WNV i USUV virusa. Komarci su uzorkovani CDC klopama, BG Sentinel klopama i aspiratorom. Ukupno je obavljeno 618 uzorkovanja, 613 u Zagrebu (2015.-2020. godine) i 5 u Međimurskoj županiji (2017. godina). Za dokazivanje virusa ukupno su pripremljene 20.363 jedinke komaraca, od čega s područja Zagreba 20.291, a s područja Međimurske županije 72 jedinke. Određeno je 11 vrsta komaraca. Jedinke su razvrstane u 899 skupnih uzoraka komaraca koji su testirani na prisutnost WNV i USUV RNA metodom RT-qPCR u stvarnom vremenu. RNA USUV je dokazana u četiri skupna uzorka komaraca: jednom skupnom uzorku jedinki *Ae. albopictus* iz 2016. godine (Zagreb), dva skupna uzorka jedinki *Cx. pipiens* kompleks iz Zagreba (2018. i 2019. godina) i jednom skupnom uzorku *Cx. pipiens* kompleks iz Preloga (Međimurje). RNA WNV nije dokazana niti u jednom testiranom skupnom uzorku komaraca. Filogenetskom analizom pozitivnih skupnih uzoraka iz 2018. i 2019. godine dokazana je USUV europska linija 2. USUV pozitivni skupni uzorak komaraca *Cx. pipiens* kompleks iz 2018. godine (uzorkovan na području ŠRC Jarun) dodatno je analiziran NGS metodom pri čemu su dokazane virusne sekvence iz različitih porodica virusa od kojih većina pripada virusima koji inficiraju komarce, a od virusa koji inficiraju sisavce i ptice dokazan je USUV.

Dokaz RNA USUV u skupnim uzorcima komaraca uzastopno tijekom četiri godine na području sjeverozapadne Hrvatske pokazuje da je virus kontinuirano prisutan na istraživanom području te da je navedeno područje postalo endemsko područje za USUV.

## EPIDEMIJA KRPELJNOG MENINGOENCEFLITISA NAKON KONZUMACIJE SIROVOG KOZJEG MLIJEKA

Maja Ilić<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Maja Bogdanić<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>3</sup>, Mirjana Lana Kosanović Ličina<sup>4</sup>, Bernard Kaić<sup>1</sup>, Andreja Jungić<sup>3</sup>, Marko Vucelja<sup>5</sup>, Vlado Angelov<sup>6</sup>, Marinka Kovačević<sup>7</sup>, Dobrica Rončević<sup>7</sup>, Samira Knežević<sup>8</sup>, Irena Slavuljica<sup>8,9</sup>, Danijela Lakošeljac<sup>7</sup>, Ninoslava Vicković<sup>10</sup>, Marina Bubonja-Šonje<sup>8,9</sup>, Lisa Hansen<sup>11</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1,12</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar", Zagreb, Hrvatska

<sup>5</sup> Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>6</sup> Veterinarska ambulanta, Delnice, Hrvatska

<sup>7</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka, Hrvatska

<sup>8</sup> Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska

<sup>9</sup> Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka, Hrvatska

<sup>10</sup> Klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia

<sup>11</sup> National Institute for Public Health and Environment (RIVM), Bilthoven, Nizozemska

<sup>12</sup> Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [maja.ilic@hzjz.hr](mailto:maja.ilic@hzjz.hr)

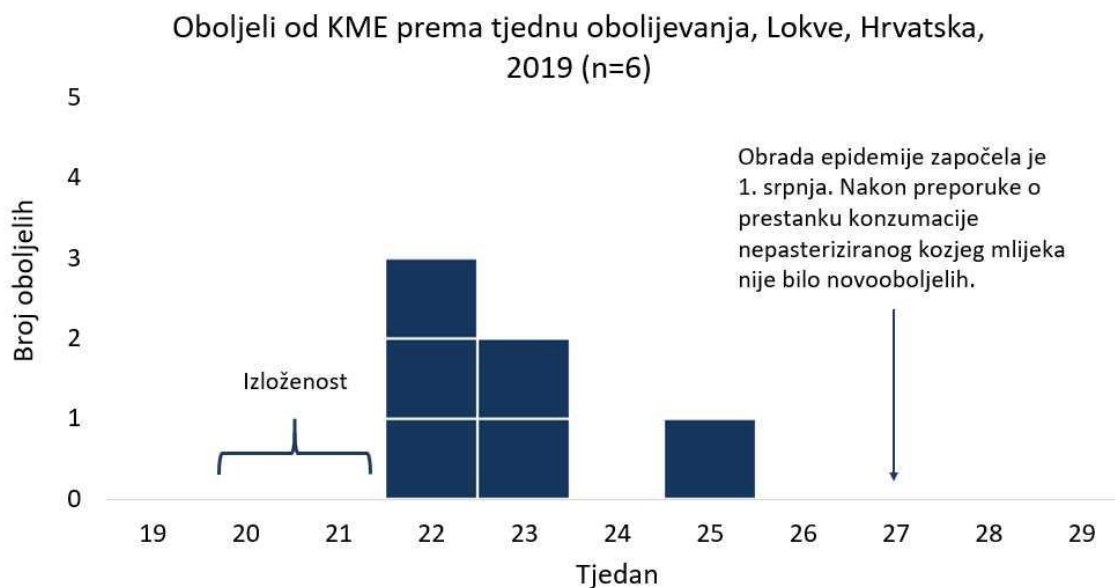
U lipnju 2019. godine, Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo je obaviještena o grupiranju oboljelih od krpeljnog meningoencefalitisa (KME) na području Gorskog kotara. Od šest oboljelih pacijenata, pet ih je konzumiralo nepasterizirano (sirovo) kozje mlijeko s obiteljske farme u razdoblju od dva tjedna prije pojave simptoma, dok je jedna oboljela osoba u anamnezi navela nedavni ugriz krpelja.

Kako bi procijenili rizične faktore za infekciju proveli smo slučaj-kontrola studiju u kojoj je izabrano šest kontrolnih ispitanika među zdravim osobama, članovima obitelji ili stanovnicima sela u kojem je zabilježeno grupiranje oboljelih. Provedeno je epidemiološko anketiranje i virološko testiranje oboljelih osoba i kontrolnih ispitanika. Izračunali smo omjer šansi za pojedine rizične izloženosti. Uzorci seruma koza, konja i psa s obiteljske farme testirani su na prisutnost neutralizacijskih protutijela na virus KME (KMEV). Uzorci kozjeg mlijeka i 65 krpelja vrste *Ixodes ricinus* prikupljenih sa životinja testirani su na prisutnost KMEV RNA metodom RT-PCR.

Oboljele su 4 osobe ženskog i 2 osobe muškog spola, a medijan dobi oboljelih osoba bio je 41 godinu (10-85 godina). Oboljele osobe imale su 25 (95% interval pouzdanosti 0.8-1410.2,  $p = 0.021$ ) puta više šanse da konzumiraju sirovo kozje mlijeko u posljednja dva tjedna u odnosu na zdrave kontrole. Nitko od oboljelih niti kontrola nije bio cijepljen protiv KME. Virus KME nije dokazan u uzorcima mlijeka niti krpeljima, dok je serološko testiranje životinja s farme ukazalo na izloženost virusu: šest koza iz stada imale su neutralizacijska protutijela na KMEV.

Rezultati istraživanja pokazali su da je izvor epidemije bila konzumacija nepasteriziranog kozjeg

mlijeka s obiteljske farme. Nakon preporuke za prestanak konzumacije proizvoda od nepasteriziranog mlijeka, nije bilo novooboljelih osoba. Ova epidemija ukazuje na potrebu provođenja edukacije među proizvođačima i potrošačima o rizicima koje donosi konzumacija nepasteriziranih mliječnih proizvoda. Preporuča se dodatno testiranje ljudi, domaćih životinja i krpelja radi boljeg razumijevanja epidemiologije KME u Gorskom kotaru, te za ciljano donošenje preporuka o cijepljenju protiv KME.



## KLINIČKA SLIKA KRPELJNOG ENCEFALITISA

Dario Sabadi<sup>1,2</sup>, Ljiljana Perić<sup>1,2</sup>, Mario Duvnjak<sup>1,2</sup>, Dubravka Lišnjić<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Klinika za infektologiju, Klinički bolnički centar Osijek, Osijek, Hrvatska

<sup>2</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

e-mail: [dariocroatia@gmail.com](mailto:dariocroatia@gmail.com)

Krpeljni encefalitis (KE) virusna je bolest rasprostranjena u različitim predjelima Azije i Europe. Bolest je uzrokovana virusom krpeljnog encefalitisa koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Postoje tri podvrste virusa: europski tip, sibirski tip i dalekoistočni tip.

Virus se nalazi u slini krpelja (*Ixodes ricinus*/*Ix. persulcatus*) koji ubodom bolest prenosi na ljude. Također, moguća je infekcija konzumiranjem mlijeka zaraženih životinja. Prirodni rezervoari bolesti su mišoliki šumski glodavci, divlje i domaće životinje te ptice. KE je endemska, prirodno žarišna bolest srednje Europe i Skandinavskog poluotoka pa sve do Japana sa sezonskim pojavljivanjem (od proljeća do jeseni). U Hrvatskoj, najveći broj oboljelih je u Koprivničko-križevačkoj, Međimurskoj, Krapinsko-zagorskoj i Bjelovarsko-bilogorskoj županiji. U Zagrebu, potencijalna mogućnost zaraze postoji na obroncima Medvednice, no sam rizik zaraze na tom području je vrlo nizak.

Inkubacija iznosi 4 do 28 dana (medijan 8 dana). Većina infekcija je asimptomatska. Klinički manifestni oblici bolesti mogu biti: kratkotrajno febrilno stanje, a rijetko i infekcija živčanog sustava (meningitis, meningoencefalitis, meningoencefalomijelitis, poliradikuloneuritis). Kronična infekcija virusom KE opisana je samo kod sibirskog podtipa virusa.

Dijagnostika KE obično se provodi serološkim metodama (ELISA, IFA) te molekularnom metodom (RT-PCR). Zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima, za serološku potvrdu infekcije virusom KE koriste se neutralizacijski testovi.

Liječenje je simptomatsko. Najučinkovitija prevencija bolesti je cijepljenje. Cijepljenje se provodi trima dozama cjepiva protiv KE kojima se postiže zaštita tijekom 3 do 4 godine. Nakon 3 godine se treba docijepiti jednom dozom, ako se želi zadržati odgovarajuća razina zaštite.

U radu prikazujemo rezultate kliničkih zapažanja bolesnika oboljelih od KE u periodu od 22 godine, liječenih u Klinici za infektologiju, KBC Osijek. Ukupan broj oboljelih od KE u tom vremenskom periodu, iznosio je 92 bolesnika. Medijan inkubacije je iznosio 13 dana. 32,6% bolesnika je imalo bifazični tijek bolesti, a 67,4% monofazični. Pozitivna epidemiološka anamneza (ubod krpelja) bila je zabilježena u 67,4% bolesnika. Klinički oblici bolesti su bili serozni meningitis (u 9,8%), meningoencefalitis (u 85,9%), meningoencefalomijelitis (u 4,3%), a flacidna pareza ramenog obruča vrficirana je u 10,8% bolesnika. Smrtnost je iznosila 3,3%.

## SEVERE CASES OF WEST NILE NEUROINVASIVE INFECTION

Marija Santini<sup>1,2</sup>, Sara Haberle<sup>2</sup>, Vladimir Savić<sup>3</sup>, Irena Tabain<sup>4</sup>, Klaudija Višković<sup>1</sup>, Marko Kutleša<sup>1,2</sup>,  
Vladimir Krajinović<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>5</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> University Hospital "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

<sup>4</sup> Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>5</sup> Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

e-mail: [marijasantini.ms@gmail.com](mailto:marijasantini.ms@gmail.com)

**Background:** West Nile virus (WNV) neuroinvasive disease is a rare (<1%), but often severe manifestation of WNV infection. The clinical presentation varies and includes meningitis, encephalitis, and poliomyelitis-like syndrome. Risk factors include older age, comorbidities (arterial hypertension, diabetes) and immunosuppression. So far, 92 clinical cases of neuroinvasive WNV infection were reported in Croatia. The aim of this study was to analyze the clinical characteristics, long and short-term outcomes in patients with severe WNV neuroinvasive infection, hospitalized at the Department for Intensive Care Medicine and Neuroinfectology, University Hospital for Infectious Diseases "Dr. Fran Mihaljević", Zagreb, from 2013 to 2019.

**Materials/methods:** Among 23 patients with severe WNV infection, 18 (78.2%) were male. Twenty-one patients were from Croatia, while two cases were imported from Hungary and the USA, respectively. Diagnosis was confirmed by detection of WNV RNA in cerebrospinal fluid (CSF) and/or urine samples using RT-PCR and/or detection of WNV IgM and IgG antibodies of low avidity in serum and CSF samples.

**Results:** The median patient's age was 72 (range 33-84) years. Majority of patients reported underlying diseases, most commonly arterial hypertension (19/82.6%) and diabetes (9/39.1%). Three patients had kidney transplantation. The most common clinical presentations were encephalitis (13/56.5%) and encephalitis with acute flaccid paralysis (9/39.1%). Twelve patients (52.2%) were mechanically ventilated with the median duration of 12 (range 5-73) days. The median ICU stay was 19 days (range 5-73) while the median hospital stay was 34 days (range 7-97). Two patients (8.7%) died during the ICU treatment. Majority of patients (15/65%) had moderate to severe disability at discharge, evaluated by modified Rankin Scale (mRS). The follow-up was performed in July 2019. Nineteen of 21 patients were available. Additional five patients (21.7%) died while five patients (21.7%) had moderate to severe disability. An improvement, according to mRS, was reported in 11 patients (47.8%).

**Conclusions:** WNV neuroinvasive disease affected mainly the elderly with comorbidities. These patients often need a prolonged intensive treatment and have moderate to severe neurological disability. Improvement is noted after several months in one half of the patients.



## **WEST NILE ENCEPHALITIS - RADIOLOGIC FINDINGS WITH CLINICAL CORRELATION**

**Klaudija Višković**

*University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia*

e-mail: [viskovick@gmail.com](mailto:viskovick@gmail.com)

West Nile virus neuroinvasive disease (WNV NID) is the most severe clinical presentation of WNV infection. WNV NID usually presents as meningoencephalitis and myelitis, or as a combination of both. It has become an emerging infection with rapid increases in the incidence and geographic range.

The purpose of this presentation is to report and describe the range of magnetic resonance imaging (MRI) findings of the brain and spine in patients with documented WNV infection treated at the University Hospital for Infectious Diseases (UHID) in Zagreb, Croatia and to increase radiologic and clinical diagnosis of the condition. We investigated a correlation between imaging findings and clinical presentation of patients hospitalized in the period between August and October 2018. MRI findings are reported as abnormal in about one third of cases and generally are nonspecific. In our patients, MRI images in T2 and/or Fluid Attenuation Inversion Recovery (FLAIR) sequences revealed hyperintensity signal lesions in deep brain structures, including the thalami, basal ganglia and cerebral peduncle. These lesions usually have no associated mass effect or abnormal contrast enhancement. One patient had confluent white matter lesion in periventricular region. We also report a patient with cauda equina arachnoiditis which is a rare manifestation of WNV NID.

Generally, the virus can affect any part of the neural axis, but there is a predilection for brainstem, cerebellum, and anterior horn cells of the spinal cord. MRI may also show the thickening and enhancement of leptomeninges. Diffusion Weighted Image (DWI) may detect an inflammation prior to signal intensity changes detected using T2/FLAIR.

Differential diagnosis comprises demyelinating process in the brain including multiple sclerosis (MS), acute disseminated encephalomyelitis, chronic microvascular white matter ischemic disease or other viral encephalitis.

Differential diagnosis of findings in the spinal cord and cauda equina includes transverse myelitis, viral myelitis and leptomeningeal metastatic disease.

## IMMUNOLOGICAL MARKERS IN NEUROINVASIVE ARBOVIRAL INFECTIONS

Snježana Židovec Lepej<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Dario Sabadić<sup>3</sup>, Ljiljana Perić<sup>3</sup>, Maja Ilić<sup>4</sup>, Irena Tabain<sup>4</sup>, Maja Bogdanić<sup>4</sup>, Ivana Grgić<sup>1</sup>, Lana Gorenc<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>5</sup>, Tanja Potočnik-Hunjadi<sup>6</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Elizabeta Dvorski<sup>7</sup>, Tamara Butigan<sup>7</sup>, Gordana Kolaric-Sviben<sup>8</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>4</sup>

<sup>1</sup> University Hospital for Infectious Diseases "Dr Fran Mihaljević", Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> Clinical Hospital Center Osijek, Osijek, Croatia

<sup>4</sup> Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>5</sup> Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia

<sup>6</sup> Čakovec County Hospital, Čakovec, Croatia

<sup>7</sup> General Hospital Varaždin, Varaždin, Croatia

<sup>8</sup> General Hospital "Dr Tomislav Bardek", Koprivnica, Croatia

e-mail: [szidovec@gmail.com](mailto:szidovec@gmail.com)

**Objectives:** Literature data on the immunopathogenesis of neuroinvasive arboviral infections, particularly in the context of complex cytokine immune responses, are limited. The aim of this study was to compare cytokine expression patterns in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum in human neuroinvasive arboviral infections caused by tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV) and Toscana virus (TOSV).

**Methods:** Antiviral cytokine response in the serum and CSF was analysed by using a multiplex bead-based assay for simultaneous quantification of 13 human cytokines (LEGENDplex Human Th cytokine panel, BioLegend, USA) on FACS Canto II flow cytometer (Beckton Dickinson, USA). The panel included cytokines associated with innate and early pro-inflammatory immune responses (TNF- $\alpha$ , IL-6), Th1 type immune response (IL-2, IFN- $\gamma$ ), Th2 immune response (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13), Th17 immune response (IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22) and the key anti-inflammatory cytokine IL-10.

**Results:** Analysis of cytokine expression pattern in the CSF and serum of patients with neuroinvasive infection with TBEV (32 patients), WNV (68 patients) and TOSV (3 patients) revealed partially similar patterns. Significantly higher concentrations of IL-6 in the CSF vs. serum were found in both TBEV (median 780.88 pg/mL, IQR 130.81-3,077.66 vs. median 23.25 pg/mL, IQR 7.79-27.09, respectively;  $p < 0.001$ ) and WNV (median 2,036.71 pg/mL, IQR 213.82-6,190.5 vs. median 24.48 pg/mL, IQR 11.93-49.81, respectively;  $p < 0.001$ ) patient groups. Similarly, higher concentrations of IFN- $\gamma$  in the CSF compared with serum have been shown in both TBEV (median 122.7 pg/mL, IQR 98.09-246.04 vs. 27.28 pg/mL, IQR 14.81-37.75;  $p < 0.001$ ) and WNV patient groups (median 49.59 pg/mL, IQR 23.07-127.37 vs. 27.22 pg/mL, IQR 20.95-41.82;  $p = 0.07$ ). Expression of IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$  and Th1 17 cytokines (IL-17A, IL-17F, IL-21) was detected in the serum but not in the CSF (except one positive CSF sample for IL-17F and IL-4). Th1 cytokine IL-13 was detectable in both serum and CSF of WNV patients but only in the serum of TBEV patients. In contrast, IL-22 and IL-5 were detectable in both serum and CSF of TBEV patients but only in the serum of WNV patients (except one positive CSF sample for IL-5). CSF samples of

patients with Toscana neuroinvasive disease showed higher concentrations of IL-6, IFN- $\gamma$  and IL-10 compared with corresponding serum samples.

**Conclusions:** The results of this study show increased concentrations of the key cytokines associated with innate and early acute phase responses (IL-6) and Th1 type immune responses (IFN- $\gamma$ ) in the CNS of patients with neuroinvasive arbovirus infections. In contrast, expression of the key T-cell growth factor IL-2, Th17 cytokines, a Th2 cytokine IL-4 and the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$  appear to be concentrated mainly in the periphery. These findings suggest a well-defined pattern of cytokine biology in neuroinvasive arboviral infections. Further studies on the possible association between cytokine expression patterns and clinical severity of WNV, TBEV and TOSV neuroinvasive infections as well as on the underlying mechanisms of cellular immunity warrant further investigations.

## A YELLOW FEVER VACCINE-ASSOCIATED MENINGOENCEPHALITIS – A CASE REPORT

Karlo Jeličić, Neven Papić

University Hospital for Infectious Diseases „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb, Croatia  
School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

e-mail: [kjelicic@bfm.hr](mailto:kjelicic@bfm.hr), [npapic@bfm.hr](mailto:npapic@bfm.hr)

Yellow fever is a mosquito-borne disease caused by a virus from the genus *Flavivirus*. It is typically found in sub-Saharan Africa and South America. Clinical presentation ranges from subclinical infection and mild febrile disease to life threatening disease with fever, jaundice, renal failure and hemorrhage with a high case-fatality rate. While there is no treatment for the disease itself, yellow fever vaccine offers lifetime protection from the disease in most people. Nevertheless, due to a possibility of severe adverse reactions, it should be administered according to official guidelines issued by WHO and CDC. Typical life-threatening adverse reactions include vaccine-associated neurological (YEL-AND) and viscerotropic (YEL-AVD) disease, and no treatment exists for either one. Incidence of YEL-AND is 0.4-0.8/100.000 doses, and rarely has a fatal outcome. While incidence of YEL-AVD is lower, 0.3-0.4/100.000 doses, it has a fatal outcome in approximately half of the cases. Here we present the case of 19-year-old female patient who developed vaccine-associated meningoencephalitis one month following vaccination. She was admitted to the University Hospital for Infectious Diseases “Dr. Fran Mihaljević” on the eleventh day of her illness. The symptoms included chills, moderate to severe headache, gait instability and occasional diplopia. Clinical examination verified ataxia, positive meningeal signs and Romberg sign. Lumbar puncture revealed 456 white blood cells per microliter, of which 94% were mononuclear, with normal protein and glucose levels. Microbiological workup resulted in positive RT-PCR test for vaccine strain of yellow fever virus from urine, blood and cerebrospinal fluid. The patient initially received empirical treatment for meningoencephalitis syndrome, which was discontinued upon negative microbiological workup for other causative agents. She received symptomatic treatment until discharge and achieved full recovery in 10 days.

## **EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE PUTNIKA U CENTRU ZA CIJEPLJENJE I PREVENCIJU PUTNIČKIH BOLESTI NASTAVNOG ZAVODA ZA JAVNO ZDRAVSTVO "DR. ANDRIJA ŠTAMPAR"**

**Mirjana Lana Kosanović Ličina**

*Nastavno zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar", Zagreb, Hrvatska*

e-mail: [MirjanaLana.KosanovicLicina@stampar.hr](mailto:MirjanaLana.KosanovicLicina@stampar.hr)

Centar za cijepljenje i putničke bolesti koji djeluje u okviru Službe za epidemiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu najveća je ambulanta u RH koja pruža zdravstvenu zaštitu putnika u međunarodnom prometu, ali i provodi cijepljenja ostalih kategorija pučanstva (npr. medicinski razlozi (prije i poslije transplantacije), profesionalna ekspozicija). Centar za cijepljenje i putničke bolesti sudjeluje u pripremi putnika različitih kategorija (poslovni, turisti, humanitarni rad, usavršavanje, hodočasnici i dr.) kroz: individualnu procjenu rizika zaražavanja putnika, donošenju plana cijepljenja i savjetovanja o smanjenju rizika zaražavanja i provođenju cijepljenja. Također provodi i epidemiološki zdravstveni nadzor nad putnicima povratnicima (nadzor i protuepidemijske mjere) iz zemalja gdje postoji rizik zaražavanja hemoragijskim groznicama, malarijom i kolerom. Sukladno Međunarodnim sanitarnim propisima, provodi se obvezno cijepljenje protiv žute groznice, no uzimajući u obzir aktualne zahtjeve pojedinih zemalja i prateću epidemiološku situaciju provodi se i cijepljenje protiv ostalih „putničkih“ bolesti (hepatitisa A, trbušnog tifusa, hepatitisa B, meningokoka, dječje paralize, krpeljnog meningoencefalitisa i dr.) U periodu od 2012.-2020. godine prosječno se u Centru za cijepljenje i putničke bolesti cijepilo 750 osoba godišnje, većinom odrasle dobi i muškog spola. Zemlje u koje se najviše putovalo su Brazil, Kenija, Tanzanija i Nigerija. U navedenom periodu se prosječno dvije trećine putnika cijepilo protiv žute groznice. Najčešći korisnici usluga Centra za cijepljenje su osobe koje su potražile zdravstveni savjet zbog turističkog putovanja, slijede ih osobe koji putuju zbog poslovnih razloga. U posljednjih nekoliko godina (osim 2020. godine) primjećuje se porast osoba koje odlaze na stručno usavršavanje/obrazovanje ili u humanitarne misije. S obzirom na globalizaciju i kontinuirano značajan broj putnika, kao i promjeni okolišnih uvjeta u zemljama gdje postoji rizik zaražavanja različitim emergentnim i re-emergentnim bolestima, neophodan je individualan pristup u prevenciji putničkih bolesti i nadzor nad pojavom istih u svakog pojedinog putnika.

## EMERGENTNE ARBOVIRUSNE INFEKCIJE U PUTNIKA

**Maja Bogdanić<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>2</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>, Ljiljana Milašinčić<sup>1</sup>, Ljiljana Antolašić<sup>1</sup>, Snježana Artl<sup>1</sup>,  
Ljubo Barbić<sup>3</sup>, Vladimir Stevanović<sup>3</sup>, Tatjana Vilibić Čavlek<sup>1,4</sup>**

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [maja.bogdanic11@gmail.com](mailto:maja.bogdanic11@gmail.com)

(Re-)emergentne arbovirusne infekcije predstavljaju javnozdravstveni problem u endemskim područjima uz tendenciju zemljopisnog širenja. Uz značajan rizik od zaraze ovim virusima, putnici doprinose i njihovom širenju u ne-endemska područja.

Od siječnja 2016. do veljače 2021. godine u Nacionalnom referentnom laboratoriju za arboviruse, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo testirano je ukupno 208 povratnika iz endemskih područja na prisutnost RNA te IgM/IgG protutijela virusa dengue (DENV), chikungunya (CHIKV) i Zika (ZIKV). Serološka je dijagnostika učinjena pomoću komercijalnih imunoenzimnih (ELISA) i indirektnih imunofluorescentnih testova (IFA). Početno reaktivni rezultati dodatno su potvrđeni imunoblot testom (LIA) za istodobnu detekciju navedenih arbovirusa. Molekularna dijagnostika učinjena je metodom lančane reakcije polimeraze nakon reverzne transkripcije (RT-PCR) u stvarnom vremenu. Pozitivni uzorci dodatno su testirani klasičnom RT-PCR metodom te je učinjeno sekvenciranje.

U testiranoj skupini bilo je 117 (56,3%) muškaraca te 91 (43,7%) žena. U skupini žena, 66 (72,5%) je bilo u generativnoj dobi, od kojih su 18 (19,8%) bile trudnice. Najčešća mjesta potencijalne izloženosti bile su Srednja i Južna Amerika (38,9%) te jugoistočna Azija (16,3%).

Prisutnost kliničkih simptoma navelo je 102 (49,0%) testiranih putnika. Od kliničkih simptoma po učestalosti su zabilježeni vrućica (92/90,2%), artralgiya (24/23,5%), osip (22/21,6%), mijalgija (20/19,6%), glavobolja (10/9,8%), konjunktivitis (3/2,9%) te retroorbitalni bolovi (3/2,9%).

Detekcijom IgM/IgG protutijela dokazana je akutna/nedavna unesena arbovirusna infekcija kod 18 bolesnika. ZIKV infekcija zabilježena je u 6 putnika, DENV u 10 te CHIKV infekcija u 2 putnika (tablica).

U samo jednom testiranom uzorku krvi povratnika iz Tajlanda dokazana je prisutnost DENV RNA metodom RT-PCR. Filogenetskom analizom potvrđen je DENV tip 1.

Tablica. Unesene arbovirusne infekcije u putnika (2016-2020. godine)

	Spol	Dob	Područje izloženosti	Klinički simptomi	Dokazana infekcija
1	Ž	29	Brazil	Vrućica, osip, mijalgija, artralgijska	ZIKA
2	Ž	27	Kostarika	Vrućica, osip, artralgijska	CHIKUNGUNYA
3	M	32	Maldivi	Vrućica, retroorbitalni bolovi	DENGUE
4	Ž	56	Nikaragua	Vrućica, osip, artralgijska	ZIKA
5	M	34	Maldivi	Vrućica, osip, konjunktivitis	ZIKA
6	M	25	Meksiko	Vrućica, mijalgija, artralgijska, retroorbitalni bolovi	ZIKA
7	M	27	Indija	Vrućica, osip, mijalgija, artralgijska	DENGUE
8	Ž	26	Vijetnam	Vrućica, glavobolja, osip, mijalgija, artralgijska	ZIKA
9	Ž	25	Brazil	Vrućica, osip, artralgijska	CHIKUNGUNYA
10	Ž	42	Tanzanija, Zanzibar	Vrućica, glavobolja	DENGUE
11	Ž	40	Indonezija	Vrućica	DENGUE
12	Ž	58	Singapur, Filipini	Vrućica, osip, mijalgija	DENGUE
13	M	41	Kuba	Vrućica, osip	DENGUE
14	M	49	Kuba	Vrućica, artralgijska	DENGUE
15	M	40	Somalija	Vrućica, mijalgija, artralgijska	DENGUE
16	Ž	27	Kuba	Vrućica, osip	DENGUE
17	M	44	Tajland	Vrućica, artralgijska, retroorbitalni bolovi	DENGUE
18	Ž	70	Tajland	Vrućica, osip, artralgijska	ZIKA

## **DOMAĆE ŽIVOTINJE KAO SENTINEL ZA PRAĆENJE ARBOVIRUSNIH INFEKCIJA**

**Ljubo Barbić<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>1</sup>, Tatjana Vilibić Čavlek<sup>2,3</sup>, Iva Benvin<sup>1</sup>, Vladimir Savić<sup>4</sup>, Josip Madić<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

<sup>2</sup> *Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

<sup>3</sup> *Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

<sup>4</sup> *Centar za peradarstvo, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska*

e-mail: [ljubo.barbic@vef.hr](mailto:ljubo.barbic@vef.hr)

Zoonoze su bolesti koje se prirodno prenose sa životinja kralježnjaka na čovjeka. Od tisućama godina poznatih zoonoza poput bjesnoće ili bedrenice do trenutne pandemije bolesti COVID-19, ove bolesti predstavljaju trajni i jedan od najvećih izazova javnom zdravstvu. Danas je poznato da su 60% zaraznih bolesti ljudi zoonoze te da ih sveukupno ima preko 200. Posljednjih desetljeća njihov značaj dodatno je naglašen s obzirom na rastući trend pojave emergentnih zaraznih bolesti u ljudi od kojih 75% ima zoonotske značajke. Među njima najveći broj je onih uzrokovanih virusima te prenošenih vektorima. Kako je navedeno posljedica klimatskih promijena i globalnog zatopljenja, nastavak ovakvog trenda izvjestan je i u budućnosti.

Poznavajući temeljne epidemiološke i epizootiološke značajke ovakvih bolesti, jasno je da se njihov nadzor i preventiva može provoditi isključivo u bliskoj multidisciplinarnoj suradnji u skladu s pristupom „Jedno zdravlje“. Ovakav multidisciplinarni pristup nadzoru arbovirusa provodio se i ranije, ali epidemiološke okolnosti posljednjih nekoliko desetljeća dodatno obvezuju na njegovo provođenje i naglašavaju njegov značaj.

Praćenje zoonoza u veterinarskoj medicini moguće je provoditi na dva načina. Jedan je pasivnim nadzorom, odnosno provođenjem objektivne dijagnostike u slučaju oboljenja životinja s kliničkim znakovima koji upućuju na pojedinu zoonozu. Pasivan nadzor zahtjeva razvijenu svijest vlasnika životinja i veterinarara o važnosti prijave svakog slučaja oboljenja te provedbi objektivne dijagnostike u svrhu ne samo zaštite zdravlja životinja nego i prikupljanja podataka za zaštitu zdravlja ljudi. Ovakav primjer među arbovirusnim infekcijama je pojava neuroloških kliničkih znakova u konja koji mogu biti uzrokovani infekcijom virusom Zapadnog Nila. Nedostatak ovakvog sustava praćenja je što je ova bolest u većini slučajeva infekcija konja asimptomatska, a i klinički oblici nerijetko se previde ili ne prijave. Dodatno ograničenje je što su infekcije domaćih životinja nekim drugim arbovirusima, poput primjerice Usutu virusa, praktično u svim slučajevima asimptomatske. Nedostatak pasivnog nadzora posebno se ogleda u činjenica da su infekcije pojedinim arbovirusima asimptomatske čak i u životinja koji zoonotske uzročnike uspješno prenose na ljude poput krpeljnog encefalitisa u preživača.



Za razliku od navedenoga, aktivni nadzor zoonoza u životinja podrazumijeva serološko pretraživanje zdravih životinja na nekom području kako bi dokazom protutijela potvrdili izloženost nekom zoonotskom uzročniku. Životinje koje se pretražuju u ovu svrhu nazivamo sentinel životinje. Prednost ovakvog sustava nadzora je što rezultat ne ovisi o kliničkom očitovanju bolesti te što se on može prostorno i vremenski usmjeravati. Ovo je posebno istaknuto za arbovirusne infekcije gdje dokaz prisustva i širenja virusa želimo istražiti na određenom području u ograničenoj sezoni prijenosa koju određuje razdoblje prisutnosti i aktivnosti vektora. Stoga usmjerenim programom aktivnog nadzora arbovirusnih infekcija korištenjem sentinel životinja pouzdano doznajemo sezonsku epizootiološku i epidemiološku situaciju.

Ovakav sustav nadzora dokazao je učinkovitost u nadzoru i provedbi mjera suzbijanja infekcija virusom Zapadnog Nila, Usutu virusa kao i virusa krpeljnog encefalitisa na području RH. Uz to, u slučaju infekcija virusom krpeljnog encefalitisa poslužio je i kao dokaz alimentarnog prijenosa ovog zoonotskog uzročnika na ljude preko mlijeka i mliječnih proizvoda koza.

Aktivni sustav nadzora arbovirusnih zoonoza korištenjem sentinel životinja omogućuje potvrdu cirkulacije virusa na određenom području i prije zabilježenih oboljenja u ljudi. Stoga je njegovo provođenje osim za nadzor i praćenje proširenosti uzročnika za koje znamo da su prisutni na određenom području, od neprocjenjivog značaja za ustanovljavanje pojave novih u svrhu pripreme zdravstvenog sustava na moguća oboljenja ljudi. Tako je prvim kliničkim oboljenjima ljudi uzrokovanim infekcijom virusom Zapadnog Nila i Usutu virusom na području RH po dvije godine ranije prethodio dokaz prisustva i cirkulacije virusa u životinja na istim područjima.

Emergentne arbovirusne zoonoze predstavljaju i predstavljati će značajne izazove javnom zdravstvu. Dosadašnjim rezultatima provođenja sustava aktivnog nadzora korištenjem sentinel životinja potvrđena je učinkovitost ovakvih programa u vidu ranog otkrivanja, nadzora i suzbijanja zoonotskih arbovirusa u svrhu zaštite zdravlja životinja i ljudi. Stoga osim daljnjeg nadzora arbovirusa prisutnih na području RH potrebno je uspostaviti i programe ranog otkrivanja novih uzročnika od kojih nam vjerojatno prvi prijete virus krimsko-kongoanske hemoragijske groznice zbog proširenosti u našem okruženju. Prvim dokazom infekcija ovim arbovirusom u Mađarskoj više nije pitanje hoće li nego kada će biti potvrđen i na području RH, a zajednički rad u skladu s pristupom „Jedno zdravlje“ jedini je način da i ovaj javno zdravstveni izazov dočekamo spremni.

## MONITORING OF INVASIVE MOSQUITO SPECIES IN CROATIA

Nataša Janev Holcer<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Croatia

e-mail: [natasa.janev@hzjz.hr](mailto:natasa.janev@hzjz.hr)

In the period from 2016 until 2020, national monitoring of invasive mosquito species in Croatia, was implemented. Based on the Croatian Institute of Public Health initiative, monitoring was conducted through a network of county institutes of public health. Determination of mosquitoes was conducted in Zagreb, Pula, Split, Rijeka and Osijek. Collected data on mosquito distribution will be used for creation of distribution maps, national database and vector surveillance and risk assessment of the disease.

Conducted national monitoring confirmed the presence of the Asian tiger mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) in almost all counties. Another invasive mosquito species *Aedes (Finlaya) japonicus japonicus* (Theobald) were sampled in most of the counties.

Excessive number of mosquitoes, enabled by favoring life conditions and increased migrations and merchandise transport can become a problem for human health and it is necessary to educate the public about importance and ways of suppressing breeding of mosquitoes and their expansion.

According to the Amendments of the National Program of Measures to control pathogens, harmful arthropods (*Arthropoda*) and harmful rodents whose planned, organized and systematic control using disinfection, disinsection and deratization is of public health importance for the Republic of Croatia there are legally required monitoring of the vector at the local and national level.

## DNA BARKODIRANJE I BIORAZNOLIKOST KRPELJA (ACARI: IXODIDAE) HRVATSKE

**Mladen Kućinić<sup>1</sup>, Stjepan Krčmar<sup>2</sup>, Branka Bruvo Mađarić<sup>3</sup>, Ana Klobučar<sup>4</sup>,  
Marko Vucelja<sup>5</sup>, Marko Boljfečić<sup>5</sup>, Maja Cvek<sup>6</sup>, Josip Madić<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zoologijski zavod, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Osijek, Hrvatska

<sup>3</sup> Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu biologiju, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, Služba za epidemiologiju, Zagreb, Hrvatska

<sup>5</sup> Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>6</sup> Nastavni zavod za javno zdravstvo Istarske županije, Služba za epidemiologiju, Pula, Hrvatska

<sup>7</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [kucinic@biol.pmf.hr](mailto:kucinic@biol.pmf.hr)

Krpelji, porodica Ixodidae, broje više od 700 vrsta. Važna su skupina člankonožaca radi sposobnosti prijenosa uzročnika bolesti na ljude i životinje te su time zanimljiv segment medicinske entomologije. Kao i u mnogih drugih skupina člankonožaca tako i kod krpelja postoje određeni problemi u određivanju sličnih vrsta na temelju morfoloških značajki te je za pretpostaviti da se i u nekim literaturnim podacima „kriju“ određene pogreške.

Metoda DNA barkodiranja predstavlja univerzalni sistem za determinaciju biološkog materijala u smislu određivanja vrsta te omogućuje otkrivanje novih, još neopisanih vrsta koje se ne mogu međusobno razlikovati na temelju morfoloških obilježja, tzv. kriptičnih vrsta. Temelji se na određivanju slijeda nukleotida standardiziranog fragmenta mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom oksidaze (COI) duljine 658 parova baza.

Studija koju prezentiramo predstavlja sveobuhvatno istraživanje faune krpelja u Hrvatskoj. Krpelji su uzorkovani u tri biogeografske regije: kontinentalnoj, središnje-planinskoj i mediteranskoj. Uz morfološko određivanje vrsta provedena je i DNA barkod analiza za određeni broj uzoraka.

Rezultati ove studije ukazuju da je zbog medicinske važnosti krpelja, u određivanju vrsta značajan „integrativni pristup“ koji uz morfološke uključuje i molekularne analize.

## 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@hziz.hr](mailto:bernard.kaic@hziz.hr)

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

Cjepivo protiv Lyme borelioze je prije dvadeset godina bilo u upotrebi, ali je povučeno 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 protuepidemijske svrhe u svibnju i lipnju 2018. godine u epidemiji ebole u Kongu, po sistemu prstenastog cijepljenja, tj. za cijepljenje primarnih kontakata oboljelih, kontakata 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 cijepjenje između 6 i 12 tjedana života, djelotvornost u sprečavanju malarije tijekom 12 mjeseci praćenja je oko 30%, a djelotvornost u djece koja započinju cijepjenje u dobi od 5-17 mjeseci tijekom 12 mjeseci praćenja je oko 50%) i progresivno se smanjuje tijekom prve tri godine nakon cijepjenja. 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 koncem 2015. godine, a kasnije u još dvadesetak zemalja. Po dizajnu, radi se o četverovalentnom živom, 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. Cijepjenje 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 cijepjenje u pojedinim seronegativnih 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 cijepjenja djece se u Filipinima, uočeno je da se kod mlađe cijepjene djece povećava rizik od hospitalizacije zbog teških oblika dengue groznice i program cijepjenja protiv dengue groznice je privremeno zaustavljen u Filipinima. Detaljnim analiziranjem dostupnih podataka uočilo se da je rizik od teških oblika bolesti povećan kod osoba koje su u vrijeme cijepjenja bile seronegativne, tj. nisu ranije bile inficirane niti jednim tipom dengue virusa, dok kod osoba koje su prije cijepjenja 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 cijepjenja i cijepjenje 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 pojedinična ili fragmentirana adjuvantirana cjepiva, mrtva cjelovirusna 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.

## EPIDEMIOLOŠKE ZNAČAJKE COVID-19 NA PODRUČJU HRVATSKE

Goranka Petrović

Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [goranka.petrovic@hzjz.hr](mailto:goranka.petrovic@hzjz.hr)

**Uvod:** Prvi slučaj COVID-19 u Hrvatskoj importiran je krajem veljače 2020. iz Italije, koja je u to vrijeme bila epicentar pandemije u Europi. Ministarstvo zdravstva RH već je početkom ožujka proglasilo opasnost od epidemije COVID-19, a Nacionalni stožer Civilne zaštite preuzeo je vodeću ulogu u osmišljavanju strategije i donošenju odluka u svrhu suzbijanja i sprječavanja širenja nove koronavirusne bolesti u Hrvatskoj, usko surađujući sa županijskim stožerima.

**Metoda:** U svrhu prikaza epidemioloških značajki COVID-19 na području Hrvatske analizirani su podaci o broju oboljelih, hospitaliziranih i umrlih osoba, kao i o poduzetim protuepidemijskim mjerama u razdoblju od početka epidemije sa zaključno 21. tjednom 2021. Izvori podataka su Hrvatski zavod za javno zdravstvo i Europska agencija za kontrolu bolesti (ECDC).

**Rezultati:** U Hrvatskoj je zaključno sa 30.5.2021. zabilježeno ukupno 356 141 oboljelih, sa rasponom broja oboljelih među županijama od 3 860 (Požeško-slavonska županija) do 69 949 (Grad Zagreb). Kumulativna stopa incidencije za Hrvatsku iznosi 8 760/100 000, sa značajnim razlikama među županijama. Najviše kumulativne stope novozaraženih zabilježene su u Međimurskoj i Varaždinskoj županiji (13 251 odnosno 13 004/100 000 stanovnika), a najniža u Istarskoj županiji (3 428/100 000 stanovnika).

S obzirom na spol, nešto veći udio oboljelih (52,6%) čine žene, sa 187 293 potvrđenih slučajeva i incidencijom 8 942/100 000 (muškarci: 168 848 oboljelih, stopa 8 568/100 000).

Kumulativna dobno specifična incidencija oboljelih najviša je u radno aktivnoj populaciji, u dobi od 25 do 49 godina (11 491/100 000), a najniža u djece predškolske i osnovnoškolske dobi (4 205/100 000).

Zaključno sa tjednom 21/2021. hospitalizirano je 40 622 pacijenata, što je 11,4% ukupno potvrđenih oboljelih od COVID-19. Zabilježeno je 8 014 preminulih s letalitetom 2,3% i medijanom dobi 78 godina.

Epidemija COVID-19 u Hrvatskoj se, kao i u većini drugih država, širi u valovima, od kojih je prvi bio suzbijen odmah u početku ranim uvođenjem strogih "ostani doma" mjera ("lock-down", 19.3.2020.), sa do sredine lipnja ukupno potvrđenih 2 249 oboljelih i 103 preminula (letalitet 4,6%). Oboljele su u početku činili importirani slučajevi, najčešće iz Italije i Austrije, sa ograničenim širenjem infekcije unutar obitelji i radnih kolektiva, a potom domova za starije i nemoćne i zdravstvenih ustanova (bolnice).

Izostanak klasične sezonalnosti SARS-CoV-2 virusa tijekom ljeta, znatno popuštanje restriktivnih mjera, vrijeme godišnjih odmora i ljetovanja, dolazak turista i brojna privatna okupljanja rezultirali su ljetnim valom epidemije koji traje od sredine lipnja do u ranu jesen, a tijekom kojeg je registrirano 13 955 potvrđenih slučajeva COVID-19, 1 733 hospitaliziranih i 165 preminulih (letalitet 1,2%).

Uz započetu školsku godinu u osnovnim i srednjim školama u rujnu, u listopadu se sa intenziviranjem aktivnosti na visokim školama i fakultetima, registrira pojačana transmisija među srednjoškolcima i naročito studentima, sa prelijevanjem infekcije u obitelji, te dalje u radne kolektive i zdravstvene ustanove. Time započinje jesensko-zimski val epidemije, dodatno potenciran dolaskom hladnijeg vremena i boravkom u zatvorenim prostorima. Ubrzo je broj novooboljelih i preko 4500 dnevno, sa udjelom pozitivnih u ukupno testiranima i preko 35% pozitivnih nalaza. Navedeno upućuje na nekontroliranu, široko uspostavljenju cirkulaciju virusa, koja je rezultirala nemogućnošću provođenja obrade kontakata, preopterećenjem kapaciteta RT-PCR testiranja te uvođenjem brzih antigenskih testova. Sredinom prosinca Nacionalni stožer donosi niz mjera kojima se ograničavaju privatna i javna okupljanja, rad ugostiteljskih i sportskih objekata, te se propisuju mjere i uvjeti vezani za prekogranična putovanja, kao oblika "mekanog lock-down"-a. Tijekom ovog razdoblja zabilježeno je 216 028 oboljelih, od kojih je 22 832 (10,6%) hospitalizirano, značajno opterećujući zdravstveni sustav i brojem i duljinom trajanja bolničkog liječenja, velikim brojem bolesnika u jedinicama intenzivnog liječenja koji zahtijevaju određeni oblik respiratorne potpore, uključujući mehaničku ventilaciju ili ECMO. Tijekom ovog vala preminulo je 4 778 osoba (letalitet 2,2%), nerijetko sa brojem smrtnih ishoda većim od 80 dnevno.

Početak veljače 2021. u Hrvatskoj se detektiraju i prvi slučajevi zaraznije varijante SARS-CoV-2, B.1.1.7., čije je brzo širenje rezultiralo proljetnim valom epidemije sa 113 168 potvrđenih zaraženih i 13 742 hospitaliziranih, te 2 483 preminulih (letalitet 2,2%).

U Hrvatskoj je 27. prosinaca 2020. započelo cijepljenje protiv COVID-19, te je zaključno sa 29.5.2021. prvom dozom cijepljeno 1 270 392 osoba, od kojih je 478 334 primilo dvije doze. Cijepljeno je 31,3% ukupnog stanovništva odnosno 37,8% odraslog stanovništva.

**Zaključak:** Uspješno suzbijanje i sprječavanje epidemije COVID-19 zahtijeva snažan epidemiološki sustav praćenja intenziteta i težine COVID-19, ranu detekciju i izolaciju oboljelih te identifikaciju i karantenu njihovih kontakata, kao i genomski nadzor SARS-CoV-2 virusa radi pravovremene detekcije "zabrinjavajućih" varijanti (VOCs, eng. Variants Of Concern). Posebne dodatne napore treba uložiti u unaprjeđenje praćenja teških oblika bolesti, reinfekcija i neuspjeha cijepljenja. U ovoj fazi pandemije ključnu ulogu u konačnoj pobjedi na virusom ima cijepljenje. Procjenjuje se da je u cilju normalizacije života cijepljenjem potrebno obuhvatiti barem 70% stanovništva. Takav cjepni obuhvat bi, uz udio stanovništva koje je razvilo imunost prebolijevanjem prirodne infekcije, značajno usporio daljnje širenje virusa i spriječio ponovnu uspostavu njegove nekontrolirane cirkulacije, štiteći tako i onaj manji dio osjetljivih osoba koje nisu preboljele prirodnu infekciju niti su cijepljene odnosno koje unatoč cijepljenju nisu postigle odgovarajuću razinu imunološke zaštite.



## EPIDEMIOLOŠKO I KLINIČKO ZNAČENJE ODREĐIVANJA Ct VRIJEDNOSTI RT-PCR TESTA NA SARS-CoV-2

Jasmina Vraneš

Nastavni zavod za javno zdravstvo "Dr. Andrija Štampar" i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,  
Zagreb, Hrvatska

e-mail: [jasmina.vranes@stampar.hr](mailto:jasmina.vranes@stampar.hr)

Napretkom tehnologije dijagnostika infektivnih bolesti rapidno se mijenja, te kulturomiku u kliničkoj praksi sve više zamjenjuje ili dopunjuje genomika, proteomika, i metabolomika. Svoju kliničku primjenu pronalaze različiti vrlo osjetljivi i vrlo specifični molekularni testovi koji su značajni kako za detekciju tako i za karakterizaciju patogena, a RT-qPCR (engl. *reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction*) postaje temelj borbe protiv COVID-19 pandemije (engl. *coronavirus infective disease* 2019). Iako se rezultat RT-PCR-a na SARS-CoV-2 (engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus* 2) očitava binarno, tj. ili kao pozitivan ili kao negativan, većina testova omogućuje određivanje Ct vrijednosti (engl. *cycle threshold*). RT-qPCR test omogućuje kvantifikaciju u realnom vremenu, jer nakon reverzne transkripcije virusne RNA u DNA, u slijedećem koraku tijekom izvođenja qPCR-a fluorescentni signal raste proporcionalno količini amplificirane nukleinske kiseline, što omogućuje procjenu količine virusne RNA u uzorku. Broj amplifikacijskih ciklusa neophodnih da fluorescentni signal dosegne prag kad se test očitava kao pozitivan označava se kao Ct vrijednost i inverzno je povezan s količinom virusa u uzorku. Većina od oko 200 trenutačno dostupnih RT-qPCR testova očitava test kao pozitivan do 40. ciklusa amplifikacije. Ta velika osjetljivost je jako dobra kod postavljanja dijagnoze i iznimno je značajna za epidemiološki sustav detekcije, izolacije i praćenja kontakata, ali predstavlja problem kod razlikovanja osoba koje su odista infektivne od osoba koje ne mogu više prenijeti SARS-CoV-2, ali luče virus još neko vrijeme nakon ozdravljenja. Intermitentno pozitivan RT-qPCR test s Ct vrijednostima >34 može se detektirati u oko 10% osoba bez simptoma infekcije i do 90 dana od preboljenja infekcije. Pored toga, visoke Ct vrijednosti testa mogu se utvrditi i kod bolesnika na samom početku infekcije kod kojih će u roku 24 sata Ct vrijednost značajno pasti jer će se virus umnožiti u nazofarinksu, te kod onih koji imaju pneumoniju a uzorak je uzet iz gornjeg a ne iz donjeg dišnog sustava, pa čak i, teorijski, kod onih s infekcijom izazvanom novom varijantom virusa koju upotrijebljeni test lošije detektira. Zato se Ct vrijednost mora interpretirati s oprezom i tumačenje treba biti individualizirano, upotpunjeno anamnestičkim i kliničkim podacima. Dodatno problem predstavlja izostanak standardizacije, uslijed čega Ct vrijednost može jako varirati. Te varijacije mogu biti i do tri ciklusa ako se upotrebljava isti uzorak i isti test pod istim uvjetima, te do 14 ciklusa kod upotrebe različitih testova koji targetiraju različite sekvence, a razlikuju se i po tome je li za njihovo izvođenje potrebna ekstrakcija nukleinske

kiseline ili ne, tj. po tome jesu li uklonjeni potencijalni inhibitori prije amplifikacije postupkom ekstrakcije. Da stvar bude kompliciranija, dijagnostički laboratoriji često upotrebljavaju paralelno različite testove. Uvijek treba imati na umu da Ct vrijednost testa omogućuje aproksimaciju količine virusa u uzorku, ali da nije riječ o pravoj kvantizaciji, što znači da se ne uspoređuje broj kopija tijekom amplifikacije sa standardnom krivuljom kao primjerice kod kvantitativnog PCR testa na virus hepatitisa C. Kad se radi kvantitativni PCR, uzorak je krv ili urin gdje su virusi podjednako distribuirani, što kod uzoraka prikupljenih iz dišnog sustava nije slučaj. Nadalje, Ct vrijednost testa će se jako razlikovati ovisno o vrsti uzorka, pa tako primjerice slina, obrisak nosa, obrisak ždrijela, sputum ili bronhoalveolarni ispirak (BAL) imaju više Ct vrijednosti naspram obriska nazofarinksa koji je optimalni uzorak. Na Ct vrijednost utječe ne samo postupak uzorkovanja i vrsta uzorka, već i količina upotrijebljenog transportnog medija, duljina i način transporta, te vrijeme proteklo do obrade uzorka. Naravno, na Ct vrijednost testa jako utječe i težina kliničke slike, kada je uzorak prikupljen (odnosno koliko je dana od nastupa simptoma do uzorkovanja proteklo), imunološki status i dob pacijenta. Imajući sve navedeno u vidu, ne čudi nedavno zajedničko priopćenje američkih stručnih društava (IDSA, engl. *Infectious Diseases Society of America* i AMP, engl. *Association for Molecular Pathology*) od 12.03.2021. u kojem se upozorava da se Ct vrijednost ne smije upotrebljavati kao prediktor aktivne infekcije odnosno infektivnosti, te da se, premda analiza Ct vrijednost uzoraka ima epidemiološko i javnozdravstveno značenje, bez standardizacije trenutačno ne preporuča upotreba Ct vrijednosti u svrhu kliničke evaluacije bolesnika. Zaključno, upotreba Ct vrijednosti RT-qPCR testa u epidemiološke, odnosno javnozdravstvene svrhe, opravdana je i može značajno doprinijeti razumijevanju transmisije virusa i mogućnosti procjene epidemiološke situacije, dok je za kliničku upotrebu potrebna standardizacija testa.

## GENETSKA RAZNOLIKOST SARS-CoV-2 NA PODRUČJU HRVATSKE

Ivana Ferenčak<sup>1</sup>, Josipa Kuzle<sup>1</sup>, Anita Mišić<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Željka Hruškar<sup>1</sup>, Dora Dragčević<sup>1</sup>, Anamaria Novak<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb; Hrvatska

<sup>2</sup>Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [ivana.ferencak@hzjz.hr](mailto:ivana.ferencak@hzjz.hr)

SARS-CoV-2 kao RNA virus s velikim genomom podložan je učestalim mutacijama tijekom replikacije. Između beznačajnih i pogubnih mutacija nalaze se i one koje virusu donose selektivnu prednost. Krajem 2020. i početkom 2021. godine pojavile su se varijante koje se čine zaraznije nego postojeći sojevi, izbjegavaju imunološki odgovor i izazivaju težu kliničku sliku. Tri varijante koje su na određenim zemljopisnim područjima brzo postale dominantne te nazvane varijantama od značaja (VOC; eng. Variant of Concern) su: B.1.1.7, B.1.351 i P.1. Do današnjeg dana ECDC prati još dvije VOC: B.1.1.7+E484K i B.1.617.2. U svrhu praćenja epidemiološke situacije, sukladno preporukama ECDC provedeno je sekvenciranje cijelog genoma (WGS, eng. Whole Genome Sequencing) na 5-10% SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka u Hrvatskoj. WGS se provodi na tjednoj dinamici od 09.02.2021. godine. Dobivene sekvence se učitavaju u GISAID bazu podataka koja izolate kategorizira u filogenetske grane ovisno o jednostrukim polimorfizmima prisutnima u genomu.

Do kraja svibnja 2021. godine poslana su 5734 uzorka, od čega je uspješno sekvencirano 4745.

Između prva dva vala epidemije dominirali su virusni sojevi G, GR i GV grana, a pojačana prisutnost sojeva iz GRY grane označila je početak trećeg vala epidemije u Hrvatskoj.

Dobiveni rezultati sekvenciranja pokazuju značajan porast u udjelu prisutnosti VOC B.1.1.7 od 21.23% u prvom tjednu WGS ispitivanja, do 98,4% u zadnjem tjednu svibnja 2021. godine.

S druge strane, sljedeća VOC B.1.351 GH grane dokazana je sporadično, u 19 uzoraka koji su većinom povezani s putovanjima izvan Hrvatske te njihovim bliskim kontaktima.

Pri kraju trećeg vala pojavila se varijanta B.1.617.2, koja je dokazana u dva uzorka.

## SEROPREVALENCIJA SARS-CoV-2 NA PODRUČJU HRVATSKE

Irena Tabain<sup>1</sup>, Željka Hruškar<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Maja Ilić<sup>1</sup>, Bernard Kaić<sup>1</sup>, Krunoslav Capak<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Jasna Leniček Krleža<sup>3</sup>, Thomas Ferenc<sup>4</sup>, Renata Zrinski Topić<sup>3</sup>, Vanja Kaliterna<sup>5</sup>, Arlen Antolović-Požgain<sup>6</sup>, Jasmina Kučinar<sup>7</sup>, Iva Koščak<sup>8</sup>, Dijana Mayer<sup>1</sup>, Mario Sviben<sup>1,9</sup>, Ljiljana Antolašić<sup>1</sup>, Ljiljana Milašinčić<sup>1</sup>, Lovro Bucić<sup>1</sup>, Ivana Ferenčak<sup>1</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup> Klinika za dječje bolesti, Zagreb, Hrvatska

<sup>4</sup> Klinička bolnica Merkur, Zagreb, Hrvatska

<sup>5</sup> Zavod za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, Split, Hrvatska

<sup>6</sup> Zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, Osijek, Hrvatska

<sup>7</sup> Zavod za javno zdravstvo Istarske županije, Pula, Hrvatska

<sup>8</sup> Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije, Varaždin, Hrvatska

<sup>9</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [irena.tabain@hzjz.hr](mailto:irena.tabain@hzjz.hr)

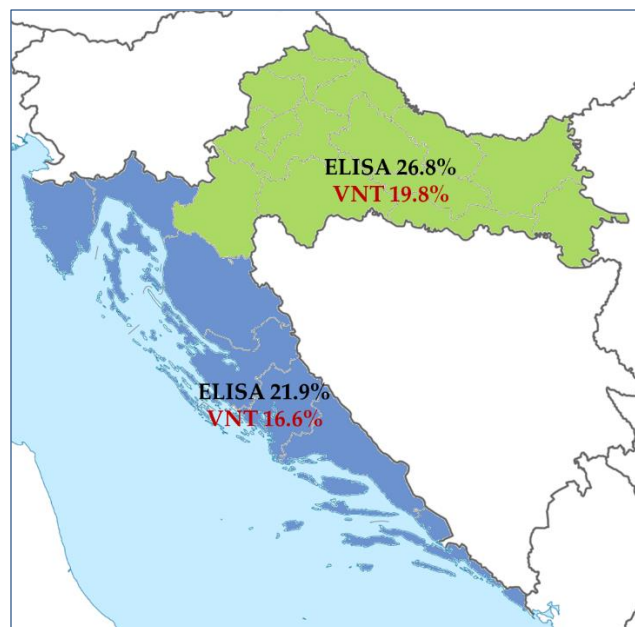
Koronavirusi (CoV) su velika obitelj RNA virusa koja uzrokuje bolesti dišnog sustava, a one se klinički mogu manifestirati u rasponu od obične prehlade do znatno težih oblika bolesti poput pneumonije praćene akutnim respiratornim sindromom (SARS; eng. *Severe Acute Respiratory Syndrome*). COVID-19 je bolest koju uzrokuje novi SARS-CoV-2 koji se lako širi između ljudi, neovisno o prisutnosti simptoma u zaražene osobe. Prvi slučajevi ove bolesti zabilježeni su u Kini u provinciji Hubei sredinom prosinca 2019. godine. Prvi slučaj u Hrvatskoj zabilježen je 25. veljače 2020. godine. Restriktivne epidemiološke mjere uvedene su u ožujku 2020. godine kako bi se spriječilo i kontroliralo širenje bolesti. Postupno popuštanje mjera započelo je u svibnju 2020. godine što je dovelo do postupnog rasta broja zaraženih tijekom ljeta te značajno ubrzanog rasta novozaraženih koje je započelo u rujnu 2020. godine. Do sada je u Hrvatskoj laboratorijski potvrđen 356 181 slučaj zaraze uzrokovane SARS-CoV-2, a 8026 osoba je preminulo.

Kako bismo procijenili stvarnu proširenost COVID-19 analizirali smo seroprevalenciju i prisutnost neutralizacijskih protutijela (NT) u uzorcima seruma opće populacije u Hrvatskoj nakon prvog (veljača - srpanj 2020. godine) odnosno drugog (kolovoz 2020. - veljača 2021. godine) pandemijskog vala. Početno serološko testiranje provedeno je komercijalnim imunoenzimskim (ELISA) testom (Vircell, Microbiologists, Granada, Španjolska), a za reaktivne uzorke kao potvrdni test korišten je test neutralizacije virusa (VNT; eng. *virus neutralization test*).

Zabilježena je statistički značajna razlika u rezultatima ukupne seroprevalencije između prvog (ELISA 2,2%; VNT 0,2%) i drugog pandemijskog vala (ELISA 25,1%; VNT 18,7%). Seropozitivne osobe su zabilježene u svim dobnim skupinama uz statistički značajnu razliku po dobi. Najniža prevalencija NT

protutijela nađena je djece (<10 godina; 16,1%) te u osoba starije životne dobi (60-69, te 70 i više godina; 16,0%, odnosno 12,8%). U ostalim dobnim skupinama seropozitivnost se kretala u rasponu 19,3-21,5%. Nadalje, uočena je razlika u seroprevalenciji između kontinentalnih i primorskih županija (slika 1).

Usporedbom rezultata seroprevalencije nakon prvog i drugog pandemijskog vala COVID-19 uočeno je značajno povećanje seroprevalencije nakon drugog pandemijskog vala. Iako su seropozitivne osobe dokazane u svim dobnim skupinama hrvatskog stanovništva, ipak postoje značajne razlike između dobnih skupina i zemljopisnih područja.



**Slika 1.** Seroprevalencija SARS-CoV-2 na području kontinentalnih i primorskih hrvatskih županija

## **SEROPREVALENCIJA SARS-CoV-2 U DJECE OD INICIJALNOG DO TREĆEG VALA COVID-19 EPIDEMIJE: REZULTATI KLINIKE ZA DJEČJE BOLESTI ZAGREB**

**Jasna Leniček Krleža**

*Zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinika za dječje bolesti Zagreb, Zagreb, Hrvatska*

e-mail: [jlenicek@gmail.com](mailto:jlenicek@gmail.com)

### **Uvod**

Od proglašenja pandemije COVID-19 u ožujku 2020. podaci o incidenciji COVID-19 u dječjoj populaciji uglavnom su dostupni iz epidemioloških izvještaja zemalja s najvećim brojem slučajeva. Izvješća pokazuju mali udio djece (0-19 godina) u ukupnom broju pacijenata. Multicentrična istraživanja pokazala su da je COVID-19 općenito blaga bolest kod djece, uključujući i dojenčad. Udio od 8% pozitivne djece na COVID-19 razvio je tešku bolest koja je zahtijevala podršku intenzivne njege i produljenu mehaničku ventilaciju. Kod njih je utvrđeno nekoliko predisponirajućih čimbenika dok je smrtnost vrlo rijetka.

Studije seroprevalencije važne su za procjenu opsega bolesti u općoj populaciji kao i praćenje promjena u seroprevalenciji radi predviđanja dinamike i planiranja primjerenih mjera javnog zdravstva. Zbog blagih ili asimptomatskih infekcija, djeca nisu uključena u rutinsko molekularno ispitivanje na COVID-19, zbog čega je vjerojatno broj infekcija COVID-19 u djece podcijenjen. Ispitivanje specifičnih antitijela ima daleko veći potencijal od molekularnog za otkrivanje prošlih asimptomatskih bolesnika ili bolesnika s blagim simptomima infekcije. Protutijela se najčešće mogu otkriti 1-3 tjedna nakon pojave simptoma, a tada dokazi upućuju na to da je vjerojatnoća zaraznosti znatno smanjena i da se razvio određeni stupanj imuniteta.

Postojeće komercijalni testovi općenito određuju antitijela SARS-CoV-2 klase A, M i G odvojeno ili kao ukupna antitijela specifična za nukleokapsidu ili spike protein virusa.

### **Materijal i metode**

Klinika za dječje bolesti Zagreb (KDBZ) opća je bolnica za djecu u dobi od 0 do 19 godina čija primarna uloga nije liječenje COVID-19, a cilj ovog istraživanja bio je istražiti prevalenciju i titrove antitijela protiv SARS-CoV-2 u djece liječene u KDBZ od početnog inicijalnog vala do trećeg vala pandemije COVID-19. Statistička značajnost razlike prevalencije anti-SARS-CoV-2 u tri vremenske točke provedena je u suradnji i kao dio projekta Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (HZJZ). Rezultati ove studije predstavljaju doprinos procjeni opsega infekcije COVID-19 u populaciji, ali također pomažu u praćenju promjena seroprevalencije za predviđanje dinamike i planiranje odgovarajućih javnozdravstvenih mjera u hrvatskim pandemijskim uvjetima.

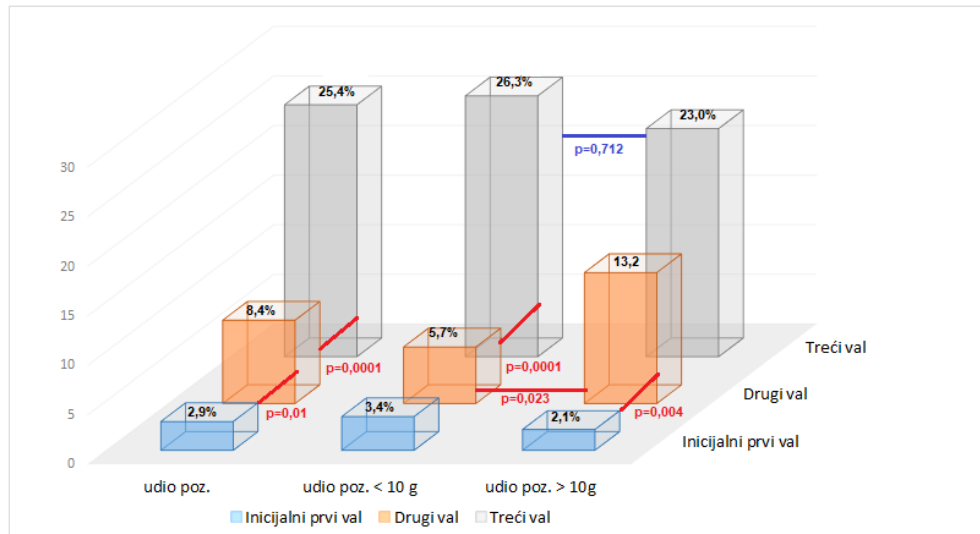
Prva vremenska točka (13. do 29. svibnja 2020.)(N=240) predstavlja prvi inicijalni val pandemije COVID-19, neposredno nakon totalnog „lockdown-a“. Druga vremenska točka (24. listopada do 23. studenog 2020.) predstavlja pik drugog vala neposredno prije novih restriktivnih mjera (N=308) i treća vremenska točka (1. veljače do 1. ožujka 2021.) karakterizirana pojavom novog britanskog soja virusa (N=114). Rezultati su određeni ECLIA metodom (KDBZ), a titar određen pomoću testa neutralizacije (HZJZ). Svi su ispitanici podijeljeni prema spolu i dobi (0-10 godina i 11-19 godina). Značaj razlike rezultata između dobnih skupina i tri vremenske točke učinjen je hi-kvadrat testom i usporedbom proporcija korištenjem MedCalc® Statističkog softvera.

### **Rezultati**

Potvrđena je statistički značajna razlika udjela seropozitivne djece između prvog, drugog i trećeg vala pandemije COVID-19. Razlika udjela seroprevalencije između prve i druge vremenske točke odnosi se na djecu u dobi od 11 do 19 godina, dok treća vremenska točka pokazuje značajno veći udio u obje dobne skupine djece. U prvoj vremenskoj točki sva seropozitivna djeca su asimptomatska, a u drugoj vremenskoj točki pronašli smo 69,2% seropozitivne asimptomatske djece (kumulativno, u prvom i drugom valu 75% djece bilo je asimptomatsko). Neutralizacijskim testom potvrđeno je da djeca s pozitivnim anti-SARS-CoV-2 u prvoj vremenskoj točki imaju titar koji nije zaštićen (<8) za razliku od druge i treće vremenske točke kada sva seropozitivna djeca imaju zaštitni titar (>8). Najvažniji rezultati prikazani su na Slici 1.

### **Zaključak**

Prevalencija antitijela na SARS-CoV-2 od početnog, prvog vala pandemije COVID-19 do trećeg vala u Klinici za dječje bolesti Zagreb značajno se mijenja i pokazuje slijedeću dinamiku: inicijalni val pokazuje vrlo nisku seroprevalenciju kod djece obje dobne skupine i titar koji nije zaštićen, nakon čega popuštanjem epidemioloških mjera i većoj izloženost djece SARS-CoV-2 virusu rezultira i značajno većom seroprevalencijom u drugom valu i to prije svega u tinejđerskoj dobnoj skupini uz zaštitni titar kod sve seropozitivne djece što se značajno mijenja tijekom trećeg vala kada i dobna skupina do 10 godina starosti pokazuje značajni porast seropozitivne djece što rezultira ukupno jednom četvrtinom seropozitivne djece u trećem valu neovisno o dobnim skupinama sa zaštitnim titrom.



Slika 1. Rezultati seroprevalencije u djece u KDBZ od inicijalnog do trećeg vala pandemije COVID-1



## PREVALENCIJA SARS-CoV-2 ANTITIJELA U HRVATSKIH PRIMATELJA SOLIDNIH ORGANA

Anna Mrzljak<sup>1,2</sup>, Željka Jureković<sup>3</sup>, Jadranka Pavičić-Šarić<sup>3</sup>, Vladimir Stevanović<sup>4</sup>, Maja Ilić<sup>5</sup>, Ivan Balen<sup>6</sup>,  
Željka Hruškar<sup>5</sup>, Danko Mikulić<sup>3</sup>, Ljubo Barbić<sup>4</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> *Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska*

<sup>2</sup> *Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

<sup>3</sup> *Transplantacijski centar KB Merkur, Zagreb, Hrvatska*

<sup>4</sup> *Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska*

<sup>5</sup> *Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska*

<sup>6</sup> *Opća bolnica "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod, Hrvatska*

e-mail: [anna.mrzljak@kbc-zagreb.hr](mailto:anna.mrzljak@kbc-zagreb.hr)

Podaci o koronavirusnoj bolesti (COVID-19) u osoba nakon transplantacije solidnih organa (TSO) u Hrvatskoj su nepoznati. Cilj ovog istraživanja bio je analizirati seroprevalenciju SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) u hrvatskih primatelja nakon TSO. Od 7. rujna do 27. studenog 2020. godine (početak drugog vala COVID-19 pandemije) provedena je presječna studija probira na COVID-19 u odrasloj vanbolničkoj populaciji pacijenata nakon transplantacije jetre (TJ; n = 280) i transplantacije bubrega (TB; n = 232). Svi pacijenti su bili asimptomatski u vrijeme uzorkovanja. Svaki je pacijent podvrgnut COVID-19 upitniku u vezi s rizičnom izloženošću (sudjelovanje na velikim sastancima poput vjenčanja/sprovoda/koncerata, putovanja u inozemstvo ili primanje krvnih pripravaka) i simptoma povezanih s COVID-19 (vrućica, kašalj, ageuzija, anosmija, glavobolja i mialgija) od početka 2020. godine. Uzorci seruma početno su testirani na SARS-CoV-2 IgG antitijela pomoću komercijalnog imunoenzimskog testa (ELISA; Vircell Microbiologists, Granada, Španjolska). Svi pozitivni uzorci potvrđeni su testom neutralizacije virusa (VNT). Seroprevalencija ukupne transplantirane kohorte iznosila je 20,1%, a 15,6% anti-SARS-CoV-2 IgG pozitivnih primatelja razvilo je neutralizacijska (NT) antitijela. Razlika u seroprevalenciji između pacijenata nakon TJ i TB nije bila statistički značajna (ELISA 21,1% naspram 19,0%; p = 0,554; VNT 22,7% naspram 10,2%; p = 0,082). Antitijela protiv SARS-CoV-2 IgG dokazana su i kod simptomatskih i kod asimptomatskih bolesnika. Seropozitivni bolesnici imali su statistički značajno veću učestalost vrućice (26,3% naspram 12,8%; p = 0,003) i anosmije (5,3% naspram 0,9%; p = 0,001). Simptomatski VNT pozitivni bolesnici imali su veći titar NT antitijela (medijan 128, IQR = 32-128) u usporedbi s asimptomatskim bolesnicima (medijan 16, IQR = 16-48); međutim, ta razlika nije dosegla statističku značajnost (p = 0,060). Zaključno, rezultati ovog prvog istraživanja seroprevalencije u hrvatskih primatelja solidnih organa pokazali su da je 16,6% bolesnika razvilo SARS-CoV-2 NT antitijela koja ukazuju na zaštitni imunitet (titar  $\geq$  8). Potrebne su daljnje studije kako bi se utvrdila dinamika NT antitijela i trajanje imunosti na COVID-19 u imunokompromitiranim populacijama poput bolesnika nakon transplantacije jetre i bubrega.

## COVID-19 U OSOBA STARIJE ŽIVOTNE DOBI – EPIDEMIJE COVID-19 U DOMOVIMA ZA STARIJE OSOBE NA PODRUČJU GRADA ZAGREBA

Tanja Ćorić, Branko Kolarić, Nada Tomasović Mrčela, Karmen Arnaut, Dalma Sajko, Maja Miloš

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

e-mail: [tanja.coric@stampar.hr](mailto:tanja.coric@stampar.hr)

Hrvatska već duži niz godina bilježi demografsku tranziciju koja se odražava povećanjem broja i udjela osoba starijih od 65 godina u ukupnom stanovništvu. Prema procjeni Državnog zavoda za statistiku sredinom 2019. godine u Hrvatskoj je 844.867 (21%), a u Zagrebu 156.053 (19%) osoba starijih od 65 godina. U domovima za starije osobe u Hrvatskoj je smješteno oko 22.000, a u Gradu Zagrebu oko 5.600 starijih osoba. Kronološka dob je najznačajniji prediktor teške kliničke slike i smrtnog ishoda od COVID-19. Starije osobe u institucijama imaju lošiju prognozu od osoba iste dobi i komorbiditeta izvan institucija. Stoga su i prije pojave prvog slučaja infekcije SARS-CoV-2 u RH započele pripreme za izradu protokola postupanja u slučaju pojave zaraze u domovima za starije osobe na području Grada Zagreba.

Referentni centar Ministarstva zdravstva za zaštitu zdravlja starijih osoba pri Službi za javnozdravstvenu gerontologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ nositelj je prevencije i suzbijanja epidemije COVID-19 bolesti u domovima za starije osobe i ostalim socijalnim ustanovama na području Grada Zagreba. U organizacijske pripreme protokola bili su uključeni svi domovi za starije osobe bez obzira na vrstu osnivača (decentralizirani, privatni i obiteljski), a nešto kasnije i ostale socijalne ustanove koje imaju korisnike na smještaju. Na razini Zavoda osnovan je poseban *Tim za prevenciju i suzbijanje epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe i drugim socijalnim ustanovama* sa 7/24 pripravnosću liječnika specijaliste i medicinske sestre. Voditelj Tima je prof. dr. sc. Branko Kolarić, a članovi su djelatnici Službe za javnozdravstvenu gerontologiju i Službe za javno zdravstvo. Tim aktivno sudjeluje i u pripremi *Uputa za sprječavanje i suzbijanje epidemije COVID-19 za pružatelje socijalne usluge smještaja za starije osobe i osobe s invaliditetom u sustavu socijalne skrbi* koje predlaže Povjerenstvu za sprečavanje i suzbijanje epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe i kod drugih pružatelja usluga u sustavu socijalne skrbi Ministarstva rada, mirovinskoga sustava, obitelji i socijalne politike. Tijekom epidemije u 2020. i 2021. godini objavljeno je 13 verzija uputa s obzirom na dinamiku mijenjanja epidemiološke situacije na području Grada Zagreba.

U 2020. godini zabilježili smo dva vala pojave epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe na području Grada Zagreba. Tijekom prvog proljetnog vala epidemija se pojavila u pet domova za starije osobe, 31 korisnik i 15 djelatnika je oboljelo. Svi domovi su epidemiološki obrađeni i provedene su epidemiološke mjere za suzbijanje širenja epidemije sukladno preporukama Tima. Svi oboljeli korisnici su bolnički liječeni i 30 ih je uspješno izliječeno dok je preminula 1 osoba. Svi oboljeli djelatnici su nakon

liječenja u kući ozdravili. Tijekom drugog, jesenskog vala epidemija COVID-19 zabilježena je u 38 domova. Epidemiološke mjere za suzbijanje širenja epidemije sukladno preporukama Tima provedene su u svim domovima za starije osobe. Ukupno je oboljelo 1.851 korisnik i 490 djelatnika. Preminulo je 309 korisnika. Svi djelatnici su ozdravili. S obzirom na vrstu osnivača epidemiju smo zabilježili u 11 domova čiji je osnivač Grad Zagreb (decentralizirani domovi) te u 27 privatnih domova i obiteljskih domova. Također smo provodili epidemiološku obradu i propisivali mjere suzbijanja širenja epidemije u 9 socijalnih ustanova koje imaju u smještaju korisnike mlađe životne dobi. U navedenim socijalnim ustanovama epidemija COVID-19 zabilježena je u drugom valu epidemije. Ukupno je oboljelo 135 korisnika i 87 djelatnika. Svi korisnici i djelatnici su ozdravili.

Tijekom mjeseca travnja 2021. godine bilježimo treći val epidemije COVID-19 i u domovima za starije osobe na području Grada Zagreba. Ukupno je oboljelo 106 korisnika i 33 djelatnika. S obzirom na vrstu osnivača epidemiju smo zabilježili u 2 decentralizirana i 6 privatnih domova. Tijekom trećeg vala ukupno je umrlo 14 (13%) korisnika od kojih su 4 (3,8%) cijepljena s dvije doze Comirnaty cjepiva. Od ukupno 106 oboljelih korisnika u potpunosti je bilo procijepljeno 64.

Tijekom zadnjeg tjedna 2020. godine započelo je cijepljenje korisnika i djelatnika domova za starije osobe kao prve prioritetne skupine. Tim za prevenciju i suzbijanje epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe i drugim socijalnim ustanovama koordinira i distribuciju cjepiva zajedno sa Službom za epidemiologiju kako bi se osigurao pravilan način distribucije i postupanja s cjepivom. U prvom tjednu distribuirano je 1.250 doza Comirnaty cjepiva u decentralizirane i privatne domove, a do danas 15. 613 doza. Ukupno je procijepljeno oko 70% korisnika i 30% djelatnika domova na području Grada Zagreba.

Na temelju našeg iskustva u suzbijanju i sprječavanju epidemije COVID-19 u svim socijalnim ustanovama, prvenstveno u domovima za starije osobe, možemo utvrditi da je vrlo važna dobra komunikacija s upravama domova, posebno glavnim medicinskim sestrama. Jedna od vrlo učinkovitih mjera je bila i provedba edukacije medicinskih sestara o načinu uzimanja brisa na SARS-CoV-2, pravilnog korištenja osobne zaštite te pravilnog transporta uzoraka do laboratorija. Ukupno je educirano 153 medicinskih sestara iz domova za starije osobe i pojedinih socijalnih ustanova. Pripremljen je i snimljen edukativni video materijal u kojem se prikazuje način uzimanja brisa na SARS-CoV-2, korištenje zaštitne opreme te pravilni način transporta uzoraka. Nastavni zavod za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ osigurao je potreban broj podloga i materijala za uzimanje briseva za sve domove i socijalne ustanove na području Grada Zagreba (neovisno o osnivaču). Time smo osigurali mogućnost uzimanja briseva u domovima za starije osobe i maksimalno skratili vrijeme od uzimanja uzorka do rezultata testa. Posebno se to pokazalo učinkovito kada je započela primjena brzih antigenskih testova koji se koriste u domovima. S obzirom na broj ukupno oboljelih i razvoja težih kliničkih slika COVID-19 te broja umrlih korisnika domova za starije osobe u trećem valu epidemije u RH, možemo sa sigurnošću utvrditi da je cijepljenje najučinkovitija mjera prevencije.

Uspostavljena je vrlo dobra komunikacija i suradnja između svih službi Zavoda. Posebno je važno izdvojiti suradnju Tima sa Službom za epidemiologiju i Službom za kliničku mikrobiologiju u cilju što

bržeg reagiranja na pojavu prve zaražene osobe u domovima za starije osobe i drugim socijalnim ustanovama te promptno određivanje epidemioloških mjera, kontrole provođenja istih u cilju suzbijanja širenja epidemije.

Tim i nadalje radi na prevenciji i suzbijanju epidemije COVID-19 u domovima za starije osobe i drugim socijalnim ustanovama te koordinaciji distribucije cjepiva.

S obzirom na dinamiku epidemiološke situacije i određene nepoznanice o SARS-CoV-2 potrebno je i nadalje nastaviti s provođenjem mjera prevencije epidemije u domovima za starije osobe i drugim socijalnim ustanovama.

## ZNAČAJ KUĆNIH LJUBIMACA U EPIDEMIOLOGIJI COVID-19: ŠTO DANAS ZNAMO?

Vladimir Stevanović<sup>1</sup>, Maja Maurić Maljković<sup>1</sup>, Iva Benvin<sup>1</sup>, Irena Tabain<sup>2</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>2</sup>, Snježana Kovač<sup>1</sup>, Željka Hruškar<sup>2</sup>, Vilim Starešina<sup>1</sup>, Iva Šmit<sup>1</sup>, Lada Radin<sup>1</sup>, Mirna Brkljačić<sup>1</sup>, Suzana Hađina<sup>1</sup>, Zoran Vrbanac<sup>1</sup>, Branimir Škrilin<sup>1</sup>, Valentina Plihta<sup>1</sup>, Marija Cvetnić<sup>1</sup>, Josipa Habuš<sup>1</sup>, Zrinka Štritof<sup>1</sup>, Krešimir Martinković<sup>1</sup>, Matko Perharić<sup>1</sup>, Iva Zečević<sup>1</sup>, Gabrijela Jurkić<sup>1</sup>, Lovro Bucić<sup>2</sup>, Ljubo Barbić<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

e-mail: [vladostevanovic@gmail.com](mailto:vladostevanovic@gmail.com)

Više od godinu dana od početka COVID-19 (*Coronavirus disease 2019*) pandemije sve je više dokaza da je učestalost infekcija SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) u kućnih ljubimaca daleko viša nego se prvotno smatralo.

Ovo istraživanje provedeno je od 1. srpnja do 31. prosinca 2020. godine te je obuhvaćalo 78 pasa koji žive u kućanstvima s potvrđenim slučajem infekcije SARS-CoV-2 u ljudi. Pretraženo je i 1069 ostalih uzoraka seruma pasa zaprimljenih u istom razdoblju na klinike Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a koji su s područja grada Zagreba. Prikupljenih uzorci seruma pretraženi su imunoenzimnim testom (ELISA) koji je za potrebe ovog istraživanja razvijen i validiran. Svi ELISA pozitivni uzorci pretraženi su i mikrotitracijskim neutralizacijskim testom (MNT).

Od ukupnog broja pretraženih seruma pasa iz COVID-19 pozitivnih kućanstava, ELISA testom su IgG protutijela dokazana u 43,59% uzoraka, dok su neutralizirajuća protutijela dokazana u 25,64% seruma. Vjerojatnost infekcije pasa koji borave u domaćinstvu s inficiranom osobom se nije razlikovala od one ranije utvrđene u ljudi. U pasa zaprimljenih na klinike Veterinarskog fakulteta, 14,69% uzoraka je bilo ELISA pozitivno. Ovo je gotovo dvostruko viša seroprevalencija nego što je bila zabilježena krajem prvog vala pandemije, kada je iznosila 7,45%. Značajno je napomenuti da je na kraju istraživanja, u prosincu 2020. godine, gotovo svaki peti uzorak seruma pasa koji su zaprimljeni na klinike Veterinarskog fakulteta bio ELISA pozitivan. Razmjer proširenosti infekcije u populaciji pasa najbolje pokazuje usporedba sa seroprevalencijom SARS-CoV-2 infekcije u ljudi. Tijekom prosinca 2020. godine prikupljeni su ostali uzorci seruma ljudi koji žive na području grada Zagreba. Serološkom pretragom provedenom u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, protutijela za SARS-CoV-2 su dokazana u 20,52% uzoraka. U istom mjesecu seroprevalencija u pasa je bila 18,56% te nije postojala statistički značajna razlika.

Ovo istraživanje je pokazalo da je infekcija SARS-CoV-2 učestala u populaciji pasa. Pokusne infekcije su dokazale značajno veću prijemljivost mačaka na infekciju. U prirodnim uvjetima, vjerojatno zbog razlike u načinu držanja, psi budu podjednako često ili čak češće inficirani. Sa stanovišta javnog zdravstva, ovaj

je podatak izrazito značajan. Visoki postotak infekcija u pasa, uz činjenicu da je COVID-19 u određenog broja ljudi asimptomatska infekcija, otvara mogućnost korištenja pasa kao sentinel životinja što je potrebno dodatno istražiti. Po drugoj strani, za sada nema indicija da psi imaju značajnu ulogu u epidemiologiji COVID-19 u ljudskoj populaciji, međutim zbog nastanka novih varijanti virusa te smanjenom prijenosu SARS-CoV-2 s čovjeka na čovjeka, ulogu pasa, i domaćih životinja uopće, u epidemiologiji SARS-CoV-2 infekcije je potrebno nastaviti pratiti.

# ***SAŽECI KRATKIH PRIOPĆENJA***

## ***POSTERI***

## NEUOBİČAJENA PREZENTACIJA INFEKCIJE VIRUSOM KRPELJNOG MENINGOENCEFALITISA BOLOVIMA U TRBUHU I POVIŠENJEM ENZIMA GUŠTERAČE – PRIKAZ SLUČAJA

Lari Gorup<sup>1</sup>, Samira Knežević<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Klinika za infektivne bolesti, Klinički bolnički centar Rijeka, Rijeka, Hrvatska*

e-mail: [lari.gorup@ri.t-com.hr](mailto:lari.gorup@ri.t-com.hr); [samira.knezevic.rijeka@gmail.com](mailto:samira.knezevic.rijeka@gmail.com)

Krpeljni meningoencefalitis (KME) je transmisivna prirodnožarišna zoonoza. Virusi KME (europski, sibirski i dalekoistočni podtip) pripadnici su flavivirusa. U prirodnim žarištima virus cirkulira između domaćina (vertebrata) i vektora (krpelja). Iako se prvenstveno prenosi krpeljima moguć je i enteralni unos nepasteriziranim mlijekom koza i ovaca. Sezonska pojavnost KME u srednjoj Europi ima dva vrha: lipanj-srpanj i rujan-listopad. Inkubacija iznosi 4 do 28 dana. Većina infekcija prolazi asimptomatski, a kod simptomatkih slučajeva najčešća je febrilna bolest s općim simptomima nakon koje se rjeđe, nakon kratkog perioda afebrilnosti (bifazični tijek), javlja druga faza bolesti u vidu meningoencefalitisa (kod europskog podtipa druga faza se javlja u 20 do 30% slučajeva). Liječenje je simptomatsko, a u svrhu prevencije moguće je cijepljenje.

Prikazujemo slučaj 63-godišnje bolesnice upućene na ambulantnu obradu u srpnju 2018. godine zbog mučnine i osjećaja nelagode epigastrično u trajanju od tri dana te, u nalazima, bicitopenije (leukopenija i trombocitopenija). U epidemiološkoj anamnezi izdvaja se da je dva tjedna prije pregleda imala ugriz tri krpelja u područje vrata i trupa (Gorski kotar). Tjedan dana nakon navedenih ugriza krpelja subfebrilna tijekom jednog dana, potom bez tegoba do pojave ranije navedenih zbog kojih je upućena na obradu.

U nalazima se izdvajala leukopenija ( $L 2,1 \times 10^9/L$ ; ref. interval  $3,4-9,7 \times 10^9/L$ ) i trombocitopenija ( $Trc 58 \times 10^9/L$ , ref; interval  $158-424 \times 10^9/L$ ) uz urednu vrijednost C-reaktivnog proteina te povišene enzime gušterače: serumska alfa-amilaza 133 U/L (ref. interval 23-91 U/L), urinska alfa-amilaza 1109 U/L (ref. interval 0-400 U/L) i lipaza 76 U/L (ref. interval 13-60 U/L). Serološki je dokazana infekcija virusom KME: IgM pozitivan: 3,3 (ref. vrijednosti: indeks > 1,1 pozitivan), IgG pozitivan: 5,0 (ref. vrijednosti: indeks > 1,1 pozitivan). Ultrazvuk abdomena, izuzev nefrolitijaze desno te ciste lijevog bubrega, bio je u granicama urednog nalaza. Anamneza konzumacije alkohola i ranijih bolesti probavnog sustava bila je negativna. Tegobe su spontano regresirale tijekom desetak dana uz normalizaciju laboratorijskih nalaza.

Ističemo važnost epidemiološke anamneze (ugriz krpelja, geografsko područje) u postavljanju dijagnoze kod netipičnih prezentacija KME.



# Diagnosis of tick-borne encephalitis in patient with previous flavivirus infection



Tatjana Vilibić-Čavlek <sup>1,2</sup>, Vladimir Savić <sup>3</sup>, Ljubo Barbić <sup>4</sup>, Snježana Artl <sup>1</sup>, Ljiljana Milašinić <sup>1</sup>, Ljiljana Antolašić <sup>1</sup>, Irena Tabain <sup>1</sup>, Maja Bogdanić <sup>1</sup>, Vladimir Stevanović <sup>4</sup>, Tanja Potočnik-Hunjadi <sup>5</sup>, Dario Sabadi <sup>6,7</sup>, Federica Monaco <sup>8</sup>, Eddy Listeš <sup>9</sup>, and Giovanni Savini <sup>8</sup>

<sup>1</sup> Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia; <sup>2</sup> School of Medicine University of Zagreb, Croatia; <sup>3</sup> Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; <sup>4</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Croatia; <sup>5</sup> General Hospital Varazdin, Croatia; <sup>6</sup> Clinical Hospital Center Osijek, Croatia; <sup>7</sup> Medical Faculty, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Croatia; <sup>8</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale „G. Caporale”, Teramo, Italy; <sup>9</sup> Croatian Veterinary Institute, Veterinary Institute Split, Croatia



## INTRODUCTION

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) serology interpretation is difficult in some patients due to cross-reactivity among flaviviruses. We present a case of TBE detected in a patient with a previous flavivirus infection to point out diagnostic complexity in flavivirus serological diagnosis.

## CASE REPORT

In August 2019, a patient in early twenties was admitted to the Infectious Disease Department with symptoms suggestive of aseptic meningitis. The patient resided in a rural area of North-West Croatia with documented flavivirus circulation (TBEV, West Nile virus; WNV and Usutu virus; USUV). The patient reported no history of recent travel or vaccination against TBE, but reported a tick bite two weeks before the disease onset. Routine laboratory parameters were within normal range. CSF analysis showed pleocytosis (280 leukocytes, 80% mononuclear cells), elevated protein level (0.637 g/L) and normal glucose level (3.0 mmol/L). Serum, blood, cerebrospinal fluid (CSF) and urine samples were collected on day 9 after the disease onset. Serum and CSF samples were tested for the presence of TBEV, WNV and USUV IgM and/or IgG antibodies using commercial ELISA kits (Euroimmun, Lübeck, Germany; Focus Diagnostic, Cypress, CA). Additionally, blood, CSF and urine samples were test-ed for the presence of TBEV, WNV and USUV RNA.

## RESULTS

High titers of TBEV IgM/IgG antibodies were detected in serum and CSF using ELISA indicating acute TBE. However, antibodies to WNV and USUV were also found. In a virus neutralization test (VNT), TBEV titer of 640 and WNV/USUV titers of 80 in serum sample were detected which confirmed TBE. The positive titers to WNV and USUV suggested that the patient probably have contacted WNV and/or USUV in the past and the positive strong serology reactions are likely due to previous flavivirus exposure. IgG avidity was high for both TBEV (82%) and WNV (89%) which further supported a previous flavivirus infection. TBEV, WNV and USUV RNA was not detected in blood, CSF or urine samples.

Table 1. Serology and virology results in patient with TBEV infection

Virus	Serology				RT-PCR		
	Serum ELISA*	IgG avidity**	CSF ELISA	Serum VNT***	Blood	CSF	Urine
TBEV	IgM Pos (3.62) IgG Pos (161.90)	82%	IgM Pos (3.65) IgG Pos (146.50)	640	Negative	Negative	Negative
WNV	IgM Pos (1.24) IgG Pos (193.44)	82%	IgM Neg (0.23) IgG Pos (139.86)	80	Negative	Negative	Negative
USUV	IgM NT IgG Pos (>200)	NT	IgM NT IgG Pos (167.25)	80	Negative	Negative	Negative

\*IgM ratio <0.8 negative, 0.8-1.1 borderline, >1.1 positive; IgG RU/ml <16 negative, 16-22 borderline, >16 positive; \*\*AI <40 low, 40-60 borderline, >60 high; \*\*\*titer ≥10 positive  
NT = not tested

## CONCLUSION

The presented results showed that flavivirus serology should be carefully interpreted, including analysis of a possible cross-reactivity, as well as a need of confirmatory testing by VNT, especially in patients from areas where several flaviviruses co-circulate.

## Acknowledgment

This study was supported by the Croatian Science Foundation, Project No. 2016-06-7456: Prevalence and molecular epidemiology of emerging and re-emerging neuroinvasive arboviral infections in Croatia; CRONEUROARBO.

## SARS-COV-2 RAPID ANTIGEN TESTS - LESS RELIABLE AMONG THE ELDERLY PATIENTS?

Mislav Glibo<sup>1</sup>, Đivo Čučević<sup>2</sup>, Nikola Škreb<sup>3</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Institute of Emergency Medicine of the City of Zagreb, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> "Zagreb Centar" Health Centre, Zagreb, Croatia

e-mail: [mislav.glibo1@gmail.com](mailto:mislav.glibo1@gmail.com)

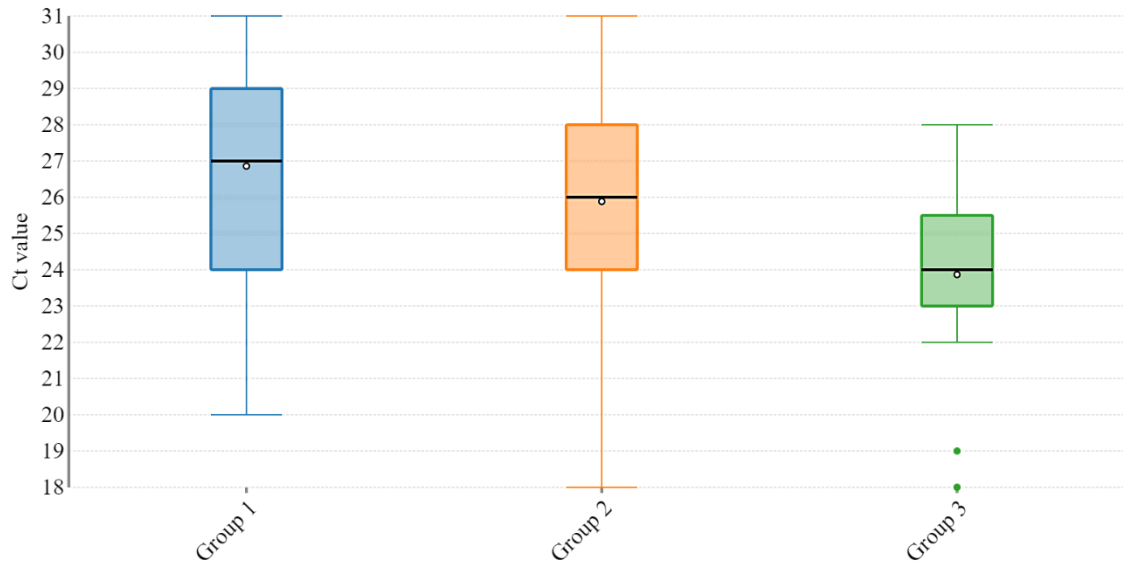
**Background:** Global outbreak of coronavirus disease (COVID-19) lead to development of accessible and cost-effective antigen-detection rapid diagnostic tests (Ag-RDT) as quick and accurate diagnosis is crucial to curb the pandemic. According to the World Health Organization, European Centre for Disease Prevention and Control and Croatian Institute of Public Health guidelines, patients presenting with characteristic COVID-19 symptoms within 5-7 days prior to the testing should first be subjected to an RDT. If positive, they should be considered SARS-CoV-2 positive, whereas if negative, the sample should undergo confirmatory RT-PCR test. The aim of this study was to assess the efficacy of Humasis COVID-19 Ag Test (Humasis Co., Ltd., Gyeonggi-do, Republic of Korea).

**Methods:** This retrospective single center study was performed at Croatian Institute of Public Health (CIPH) and included patients with clinical symptoms of COVID-19 lasting no longer than 5 days prior to the testing, whose nasopharyngeal swabs were subjected to Humasis COVID-19 Ag RDTs. Negative tests underwent verifactory real time RT-PCR test. RT-PCR detection cycle (Ct) value cutoff was set at 31. Diagnostic efficacy was determined in comparison to RT-PCR. For the further analysis the patients were divided into three age groups (0-18, 19-65, 65+ years of age). Statistical tests were performed on the data with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

**Results:** 2490 symptomatic patients were tested. 953 samples were positive on RDT and 1537 were negative and subjected to verifactory RT-PCR. Following RT-PCR analysis 266 samples were positive and marked as false negative results on RDT. Calculated negative predictive value as a measure of RDT efficacy was 82.6%. Sensitivity, specificity and positive predictive value could not be calculated as RDT positive patients were not further tested. Mean Ct value for false negatives was 25.84, and median Ct value 26. Chi square test of independence and Kruskal-Wallis test respectively showed significant difference in occurrence of false negatives ( $p < 0,00001$ ) and RT-PCR cycle (Ct) values for false negative RDTs ( $p = 0,01202$ ) among the age groups. The 0-18 age group was significantly less likely to be false negative, whereas the false negatives from the 65+ group experienced significantly lower Ct values than the other two groups.

**Conclusion:** Evaluated RDT demonstrated satisfactory performance with more reliable results in younger patients. Therefore, and due to increased vulnerability of the elderly towards COVID-19

infection, they should preferably be tested by RT-PCR. Humasis COVID-19 Ag RDT is potentially a very useful tool in places where the access to molecular methods is limited, however RT-PCR remains the gold standard in SARS-CoV-2 detection.



**Figure 1.** Box and whisker plot presenting Ct values among the three age groups, where group 1 represents 0-18, group 2 19-65 and group 3 65+ years of age

## **IS SUBACUTE THYROIDITIS AN UNDERESTIMATED CLINICAL FEATURE OF COVID-19?**

**Thomas Ferenc<sup>1</sup>, Anna Mrzljak<sup>2,3</sup>, Irena Tabain<sup>4</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>2,4</sup>**

<sup>1</sup> *Clinical Department of Diagnostic and Interventional Radiology, Merkur University Hospital, Zagreb, Croatia*

<sup>2</sup> *School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb, Croatia*

<sup>3</sup> *Department of Gastroenterology and Hepatology, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia*

<sup>4</sup> *Department of Virology, Croatian Institute of Public Health, Zagreb, Croatia*

e-mail: [thomas.ferenc95@gmail.com](mailto:thomas.ferenc95@gmail.com)

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is a novel, highly transmissible virus that has led to the ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) global pandemic. It emerged in late 2019 in Wuhan, China and since then virus has been rapidly spreading worldwide. The World Health Organization (WHO) officially declared it a pandemic in March 2020. Clinical features of COVID-19 vary from asymptomatic or mild common cold-like symptoms to more severe multi-organ manifestations.

Emerging evidence suggests that subacute thyroiditis (SAT) is one of the rare and potentially neglected manifestations of COVID-19. SAT is a self-limiting inflammatory thyroid disease thought to be linked to a viral infection or post-viral inflammatory reaction. According to recent reports, SARS-CoV-2, amongst several other familiar viruses, may also precipitate development of SAT. It is often characterized by anterior cervical pain, transient abnormalities in thyroid function and systemic symptoms such as fever, fatigue, myalgia and anorexia. Diagnosis is usually based on clinical presentation, physical examination, thyroid hormones analysis and imaging.

Until 28th November 2020, there are 13 published studies of SAT in 28 patients with COVID-19 (Figure 1). Median age at the time of diagnosis was 41 years and 75% of patients were females. The median between COVID-19 diagnosis and the onset of SAT symptoms is reported to be 29 days. Common clinical symptoms were palpitations (80%), fever (65%), fatigue (50%) and anterior cervical pain radiating to jaw (50%). The median follow-up was 40 days (range 10-70 days) and 71% of patients regained normal thyroid function within that period. However, 11% of patients presented with subclinical hypothyroidism, 11% with hypothyroidism and 7% of them with hyperthyroidism.

Although limited number of SAT cases after SARS-CoV-2 infection are reported, physicians should consider SAT as a differential diagnosis in COVID-19 patients. The routine assessment of thyroid function in patients with clinical suspicion of SAT or with the suspicion of any other thyroid dysfunction is advised.

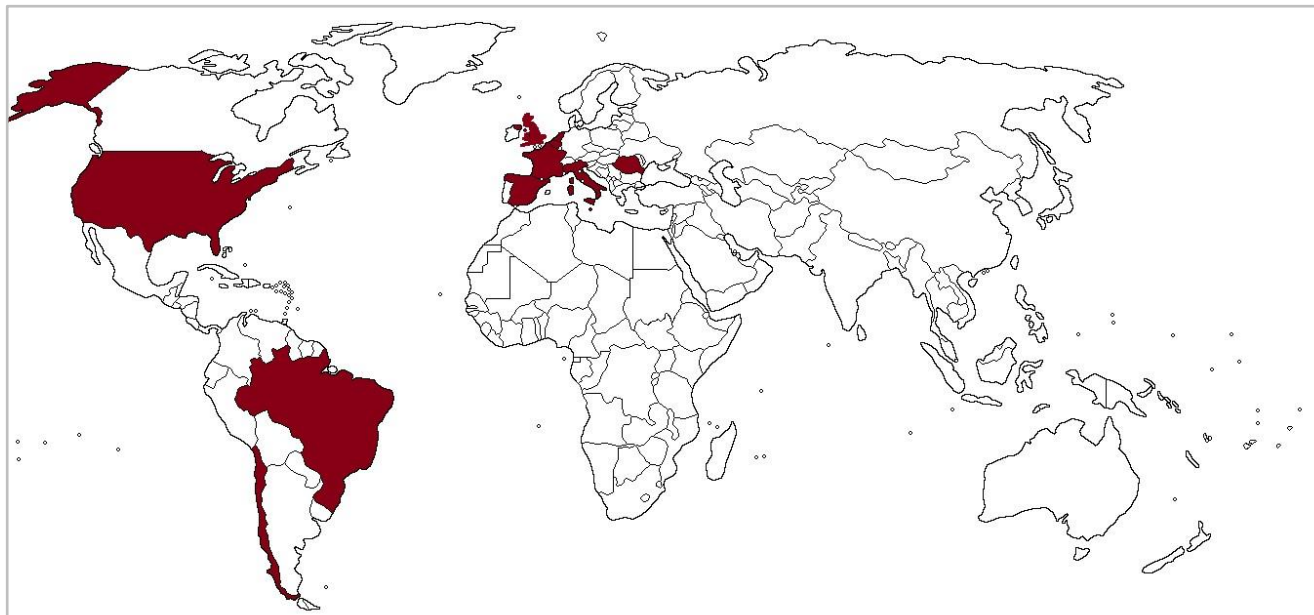


Figure 1. Reported cases of subacute thyroiditis in patients with COVID-19  
(Alaska, Iran, Italy, Mexico, Philippines, Singapore, Spain, Turkey, USA)

## PRISUTNOST PROTUTIJELA NA NP/RBD ANTIGEN U BOLESNIKA NAKON PREBOLJELE SARS-CoV-2 INFEKCIJE I CIJEPLJENIH OSOBA

Ljiljana Milašinčić<sup>1</sup>, Ljiljana Antolašić<sup>1</sup>, Josip Bago<sup>2</sup>, Tatjana Vilibić Čavlek<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup> Zavod za javno zdravstvo Varaždinske županije, Varaždin, Hrvatska

<sup>3</sup> Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

### UVOD

Prisutnost protutijela na SARS-CoV-2, uzročnika pandemije COVID-19 može se u serumu ili plazmi dokazati nakon preboljenja bolesti ili cijepljenja različitim serološkim testovima (ICT, ELISA, ELFA, VNT). Na tržištu postoje različiti tzv. brzi IC serološki testovi kojima se mogu detektirati ukupna IgM i IgG protutijela. Neki noviji IC testovi mogu razlikovati protutijela na nukleokapsidni (NP) antigen te RBD (engl. *receptor binding domain*) antigena šiljka (S) SARS-CoV-2.

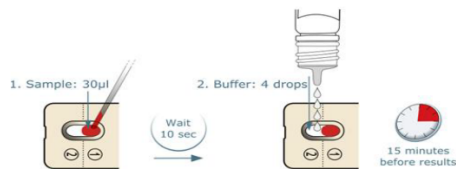
### CIJL RADA

Cilj rada je analizirati serološki odgovor na NP/RBD antigen SARS-CoV-2 kod osoba koje su preboljele COVID-19 te osoba cijepljenih protiv COVID-19 testiranih IC testom.

### MATERIJAL I METODE

Analizirano je ukupno 25 uzoraka seruma (preboljela infekcija, N=11; cijepljenje N=14) s dokazanim neutralizacijskim (NT) protutijelima u titru 4-256. Korišten je *in vitro* IC test za detekciju protutijela specifičnih za NP/RBD antigen SARS-CoV-2 u ljudskom serumu ili plazmi proizvođača CORIS BioConcept.

Izvođenje testa	
1.	30 µL seruma s mikropipetom ukapati u zonu 1 (pričekati 10 sekundi)
2.	4 kapi BL-A pufera ukapati u zonu 2
3.	pričekati 15 minuta te očitati rezultat

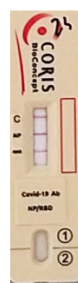


### REZULTATI

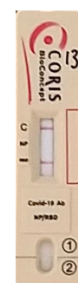
Kod svih 11 uzoraka seruma cijepljenih osoba protutijela na RBD antigen su bila pozitivna, a NP antigen su bila negativna. Od 14 uzoraka seruma osoba koje su preboljele COVID-19, protutijela na RBD antigen su bila pozitivna u 10 uzoraka, 4 uzorka su bila negativna. Protutijela na NP antigen su bila pozitivna u 11 uzoraka, 1 uzorak je bio slabo pozitivan, dok su dva uzorka bila negativna.

Tablica 1 – Rezultati testiranja osoba s COVID-19 i cijepljenih osoba

Uzorak	Prebolio/cijepljen	NT titar	Protutijela na RBD	Protutijela na NP
1	cijepljen	8	pozitivan	negativan
2	prebolio COVID-19	16	pozitivan	pozitivan
3	cijepljen	16	pozitivan	negativan
4	cijepljen	64	pozitivan	negativan
5	cijepljen	256	pozitivan	negativan
6	cijepljen	256	pozitivan	negativan
7	cijepljen	128	pozitivan	negativan
8	cijepljen	128	pozitivan	negativan
9	cijepljen	256	pozitivan	negativan
10	cijepljen	32	pozitivan	negativan
11	prebolio COVID-19	8	pozitivan	pozitivan
12	prebolio COVID-19	128	pozitivan	pozitivan
13	cijepljen	32	pozitivan	negativan
14	prebolio COVID-19	64	pozitivan	slabo pozitivan
15	prebolio COVID-19	4	pozitivan	negativan
16	prebolio COVID-19	8	negativan	pozitivan
17	prebolio COVID-19	8	negativan	pozitivan
18	prebolio COVID-19	16	pozitivan	pozitivan
19	prebolio COVID-19	16	negativan	pozitivan
20	prebolio COVID-19	32	pozitivan	pozitivan
21	prebolio COVID-19	32	pozitivan	negativan
22	prebolio COVID-19	64	negativan	pozitivan
23	prebolio COVID-19	64	pozitivan	pozitivan
24	prebolio COVID-19	128	pozitivan	pozitivan
25	cijepljen	256	pozitivan	negativan



Serološki odgovor u osobe koja je preboljela COVID-19



Serološki odgovor u osobe koja je cijepljena protiv COVID-19

### ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da se serološki odgovor razlikuje u osoba koje su cijepljene protiv SARS-CoV-2 (prisutna protutijela samo na RBD antigen) u odnosu na osobe koje su preboljele COVID-19 (uz protutijela na RBD antigen prisutna su i protutijela na NP antigen).

# Seroprevalencija na SARS-CoV-2 u profesionalno izloženih osoba nakon prvog i drugog vala pandemije COVID-19



Ljiljana Antolašić<sup>1</sup>, Ljiljana Milašinčić<sup>1</sup>, Vladimir Stevanović<sup>2</sup>, Željka Hruškar<sup>1</sup>, Irena Tabain<sup>1</sup>, Ljubo Barbić<sup>2</sup>, Kristina Jakopec<sup>1</sup>, Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1</sup>

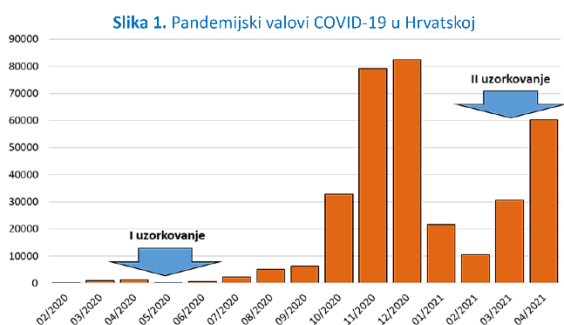
<sup>1</sup>Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

<sup>2</sup>Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu



## UVOD

Prvi slučaj bolesti COVID-19 na području Hrvatske zabilježen je 25. veljače 2020. godine u povratnika iz Italije. Do sada je potvrđeno ukupno 356.397 slučajeva te 8034 smrtnih slučajeva povezanih sa SARS-CoV-2 infekcijom. Oboljele su osobe dokazane na području svih hrvatskih županija. Cilj ovog rada je analizirati seroprevalenciju SARS-CoV-2 u profesionalno izloženih osoba nakon prvog i drugog vala COVID-19 pandemije u Hrvatskoj.

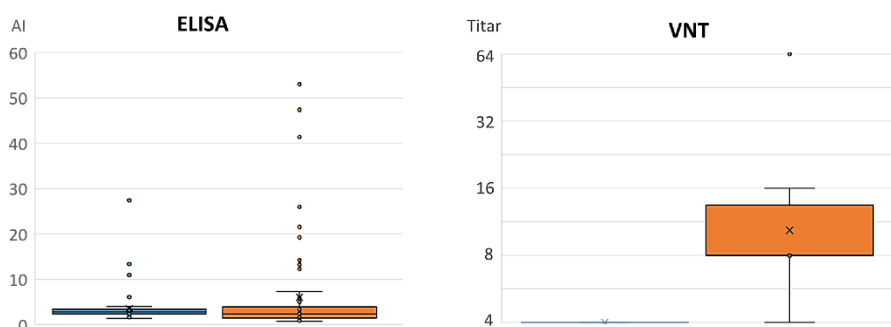


## ISPITANICI I METODE

U istraživanje je uključeno 66 veterinarskih djelatnika testiranih na SARS-CoV-2 IgG protutijela u svibnju 2020. godine (prvo uzorkovanje) te ožujku 2021. godine (drugo uzorkovanje; slika 1). Početno serološko testiranje učinjeno je imunoenzimskim testom (ELISA; Vircell Microbiologists, Granada, Španjolska), a rezultati interpretirani kako slijedi: indeks protutijela (*antibody index*; AI) <4 negativan; 4-6 graničan; >6 pozitivan. Inicijalno reaktivni rezultati dodatno su potvrđeni testom neutralizacije virusa (VNT) u staničnoj kulturi. Pozitivnim je rezultatom smatran titar protutijela  $\geq 8$ .

## REZULTATI

U prvom uzorkovanju, pozitivna SARS-CoV-2 protutijela u ELISA testu imalo je 5 (7,6%) ispitanika, dok neutralizacijska protutijela nisu dokazana niti u jednom uzorku. U drugom uzorkovanju, ELISA testom dokazana su SARS-CoV-2 protutijela u 11 (16,7%) ispitanika, dok je 7 (10,6%) ispitanika imalo neutralizacijska protutijela. Prosječna vrijednosti AI (ELISA) iznosila je 12,84 (raspon 6,13-27,44) u prvom te 24,39 (raspon 7,31-53,05) u drugom valu. Titar neutralizacijskih protutijela iznosio je od 8 do 64 (slika 2).



Slika 2. Vrijednosti AI (ELISA) i titra neutralizacijskih protutijela (VNT) nakon prvog i drugog vala pandemije COVID-19

## ZAKLJUČAK

Dvostruko viša seroprevalencija dokazana je u veterinarskih djelatnika nakon drugog vala u odnosu na prvi val pandemije COVID-19 (16,7% naspram 7,6%). Neutralizacijska protutijela dokazana su nakon drugog vala u 7/11 ELISA pozitivnih ispitanika (63,6%), dok u prvom valu nisu dokazana niti u jednog ispitanika.

