



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivana Gorski

**GENETIČKA OBILJEŽJA  
EMERGENTNIH VIRUSA HEPATITISA E  
I VIRUSA ZAPADNOG NILA U ZDRAVOJ  
POPULACIJI U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivana Gorski

**GENETIČKA OBILJEŽJA  
EMERGENTNIH VIRUSA HEPATITISA E  
I VIRUSA ZAPADNOG NILA U ZDRAVOJ  
POPULACIJI U HRVATSKOJ**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc.dr.sc. Irena Jukić

Dr.sc. Jasna Bingulac-Popović

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Ivana Gorski

**GENETIC PROPERTIES OF EMERGING  
VIRUSES HEPATITIS E AND WEST NILE  
VIRUS IN HEALTHY POPULATION IN  
CROATIA**

DOCTORAL THESIS

Mentors:

Ass. Prof. Irena Jukić, PhD

Jasna Bingulac-Popović, PhD

Zagreb, 2026.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Odjelu za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu, pod vodstvom doc.prim.dr.sc. Irene Jukić i dr.sc. Jasne Bingulac-Popović, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORICI

Doc.prim.dr.sc. Irena Jukić, dr.med. je specijalistica transfuzijske medicine, dugogodišnja zaposlenica u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu kojem je na čelu skoro 25 godina. Diplomirala je na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1986. godine, specijalistički ispit iz transfuzijske medicine položila je 1998. Priznavanje naziva primarijus stekla je 2010. godine, a doktorski rad pod naslovom: „Učestalost genotipova ABO sustava krvnih grupa u oboljelih od tromboembolija u Hrvatskoj“ obranila početkom 2013. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i stekla naziv doktora znanosti iz područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana interna medicina. Od 2002. predsjednica je Povjerenstva za transfuzijsku medicinu Ministarstva zdravstva, te sukreator stručnih prijedloga, poglavito legislative koja pokriva djelatnost transfuzijske medicine, te reorganizacije transfuzijske službe i uvođenja nacionalnog informatičkog programa koji povezuje sve transfuzijske centre u Republici Hrvatskoj. Od 1994. godine jedna je od urednica *Transfuziološkog vjesnika*, službenog glasila transfuzijske medicine u RH, a od 2013. članica je uređivačkog odbora *Blood Transfusion*, stručnog glasila hematološko-transfuzioloških društava. Godine 2015. izabrana je u znanstveno zvanje znanstvene suradnice, a 2016. bira se u naslovno znanstveno-nastavno zvanje docenta u znanstvenom području Biomedicina i zdravstvo, znanstvenog polja Kliničke medicinske znanosti, znanstvena grana interne medicine u Katedri za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta u Osijeku, a od 2025. na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Autor je i suautor brojnih znanstvenih i stručnih radova objavljenih u zemlji i inozemstvu, kongresnih priopćenja, poglavlja u knjigama. Održala je brojna predavanja i aktivni je sudionik niza međunarodnih i domaćih kongresa, simpozija i stručnih sastanaka. Aktivno sudjeluje u edukaciji specijalizanata iz transfuzijske medicine, specijalizanata drugih medicinskih grana koji se educiraju u HZTM kao i studenata na Medicinskom fakultetu. Recenzirala je brojne znanstvene radove u renomiranim stručnim časopisima. Mentorica je specijalizantima iz transfuzijske medicine, te doktorandima na MF u Zagrebu i Osijeku, PMF-u, FBF-u. Do sada su obranjena četiri doktorska rada pod njenim mentorstvom. Dobitnica je «Zlatne uljanice» za promicanje etičkih načela u TV spotu (1998.) i «Zlatne uljanice» za najbolji humanitarni spot (2002). Suautorica je najboljeg rada na ISBT kongresu u Istanbulu (2002.). Članica je HLZ, HLK, HLTM, HKLD, ISBT-a (*International Society of Blood Transfusion*), IHN-a (*International Haemovigilance Network*), EBA-e (*European Blood Alliance*), Nacionalnog odbora darivatelja krvi, Nacionalnog Povjerenstva za suzbijanje HIV/AIDS-a.

## INFORMACIJE O MENTORICI

Dr.sc. Jasna Bingulac-Popović, specijalistica medicinske biokemije voditeljica je Odjela za molekularnu dijagnostiku Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u Zagrebu. znanstvena savjetnica Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu iz znanstvenog područja biomedicine i zdravstva-polje farmacija. Diplomirala je 1986. godine diplomski studij medicinska biokemija na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu (FBF) Sveučilišta u Zagrebu. Od 1987. do 1989. godine radila je kao asistentica na Zavodu za medicinsku biokemiju FBF u Zagrebu. Nakon završenog poslijediplomskog studija i magistarskog rada 1990. stekla je akademski stupanj magistricice znanosti. Od 1989. do 1993. godine obavljala je specijalistički staž u Zavodu za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb kao specijalizant Sveučilišne bolnice Zagreb te postala specijalistica medicinske biokemije. Tri godine (1993-1995.) boravila je na Institutu za biologiju "Max-Planck" u Tübingenu, Njemačka, u odjelu za imunogenetiku, kao gost istraživač evolucije sustava tkivne podudarnosti (MHC) radeći na dva samostalna znanstvena projekta vezana za proučavanje gena MHC na modelu riblje vrste zebrića, *Brachydanio rerio*. Doktorsku disertaciju: "Organizacija gena glavnoga sustava tkivne podudarnosti u vrste *Brachydanio rerio* (*Buchanan*)" obranila je 2000. godine na Biološkom Odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Od 1996. do 2013. godine zaposlena je na mjestu specijalistice medicinske biokemije u Odjelu za molekularnu imunogenetiku poslije nazvanog Odjel za molekularnu dijagnostiku, Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (HZTM) u Zagrebu. Od 2013. do danas radi kao voditeljica Odjela za molekularnu dijagnostiku HZTM-a. Područje interesa Bingulac-Popović je molekularna dijagnostika u transfuzijskoj medicini: krvlju prenosive bolesti, genetički čimbenici trombofilije, povezanost HLA sustava s autoimunim bolestima, genotipizacije *ABO* i *RHD* sustava i ostalih sustava eritrocitnih krvnih grupa, sustav humanih trombocitnih antigena, sustav neutrofilnih granulocitnih antigena, NAT probir dobrovoljnih davatelja krvi, davatelja organa, tkiva, matičnih stanica i autolognih donacija. Godine 2006. izabrana je u znanstveno zvanje znanstvene suradnice, 2010. u zvanje više znanstvene suradnice te 2017. u zvanje znanstvene savjetnice. Objavila je brojne stručne, znanstvene članke i kongresne sažetke (54 znanstvenih radova: 30 CC, 11 SCI; >160 kongresnih sažetaka) u domaćim i stranim časopisima. Mentorica je za izradu doktorskih disertacija i komentorica za izradu diplomskih radova. Sudjeluje u dodiplomskoj nastavi na diplomskom studiju medicinska biokemija i laboratorijska medicina na predmetu „Molekularna dijagnostika“. Članica je Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM) i Hrvatske komore medicinskih biokemičara. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.

## ZAHVALA

Zahvaljujem svojim mentoricama doc.prim.dr.sc. Ireni Jukić i dr.sc. Jasni Bingulac-Popović na bezgraničnoj podršci, poticajima i savjetima koje su mi pružile tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Posebno zahvaljujem dr.sc. Ivani Babić za svu pomoć, savjete i konstruktivne diskusije pri izradi ove disertacije.

Želim zahvaliti svim kolegama i kolegicama u Odjelu molekularne dijagnostike HZTM-a, osobito Višnji Kirin, lab.teh. na pomoći u probiru i pripremi uzoraka, te uvijek veseloj i poticajnoj atmosferi.

Također zahvaljujem kolegicama iz Odjela za Serološku dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti i Odjela za osiguranje kvalitete HZTM-a na pomoći u testiranju uzoraka analiziranih u ovom doktorskome radu.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Oliveru Vugreku na pomoći i savjetima kod dizajna metode i početnica za umnažanje nukleinskih kiselina iz uzoraka, te pomoći pri filogenetskoj analizi koja je provedena u ovoj disertaciji.

Zahvaljujem dr.sc. Jeleni Prpić na pomoći i savjetima pri filogenetskoj analizi koja je napravljena u ovom radu.

Veliko hvala mojoj mami koja je uvijek vjerovala u mene i bezgranično me podržavala. Hvala mojem Blažu koji me pokušao razumjeti i strpljivo vjerovao u moj rad. Hvala ostaloj obitelji i svim mojim prijateljima, čija su mi potpora i razumijevanje pomogli pri izradi doktorskog rada.

**GENETIČKA OBILJEŽJA EMERGENTNIH VIRUSA HEPATITISA E I VIRUSA  
ZAPADNOG NILA U ZDRAVOJ POPULACIJI U HRVATSKOJ**

IVANA GORSKI

Virus hepatitisa E (HEV) pripada porodici *Hepeviridae* čiji se genom sastoji od jednolančane RNA. Na osnovi varijabilnosti sekvencija pojedinih gena HEV se klasificira u osam genotipove i brojne podtipove. Virus Zapadnog Nila (WNV) pripada porodici *Flaviviridae*, čiji se genom sastoji od jednolančane RNA. WNV se svrstava u devet genotipova. Ciljevi ovog istraživanja bili su odrediti varijabilnost *metiltransferazne* regije genoma virusa HEV, te gensku varijabilnost *NS5* regije genoma virusa WNV u zdravoj populaciji u Hrvatskoj, tj. u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi te filogenetskom analizom proučiti strukturu virusne populacije. Analizirana je prevalencija infekcije virusima HCV, HBV, HIV-1/-2, HEV i WNV, uz određivanje kinetike replikacije virusa HEV i WNV. Prevalencija infekcije virusom HEV iznosila je 0,046%, dok je prevalencija infekcije virusom WNV bila 0,0026%. U zdravih osoba iz Hrvatske dokazan je genotip virusa HEV 3c i genotip virusa WNV L2. Prevalencija infekcije virusom HBV iznosila je 0,012%. Prevalencija infekcije virusima HEV i WNV u zdravih osoba iz Hrvatske je niska, pri čemu je analiza genskih odlika i molekularne raznolikost *metiltransferazne regije* ORF1 virusa HEV i gena *prM/M* virusa WNV u Hrvatskoj pokazala njihovu srodnost s virusima koji su prisutni u Europi

(115 stranica / 29 slika / 26 tablica / 191 literaturni navod / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: Virus hepatitisa E, virus Zapadnog Nila, darivatelji krvi, prevalencija, filogenija

Mentori: doc.dr.sc. Irena Jukić i dr.sc. Jasna Bingulac-Popović, viša znanstvena savjetnica

Ocjenjivači: nasl.izv.prof.dr.sc. Snježana Židovec Lepej, prof.dr.sc. Petra Korać, prof.dr.sc.

Slavko Gašparov

Zamjena: izv.prof.dr.sc. Silvija Černi

**GENETIC PROPERTIES OF EMERGING VIRUSES HEPATITIS E AND WEST  
NILE VIRUS IN HEALTHY POPULATION IN CROATIA**

IVANA GORSKI

The hepatitis E virus (HEV) belongs to the *Hepeviridae* family, whose genome consists of single-stranded RNA. Based on the sequence variability of genes, HEV is classified into eight genotypes and numerous subtypes. West Nile virus (WNV) belongs to the *Flaviviridae* family, whose genome consists of single-stranded RNA. WNV is classified into nine genotypes. The objectives of this study were to determine the variability of the *methyltransferase region* of the HEV genome and the genetic variability of the *NS5 region* of the WNV genome in a healthy population in Croatia - a population of voluntary blood donors, and to analyse the architecture of the viral population by phylogenetic analysis. The prevalence of infection with HCV, HBV, HIV-1/-2, HEV and WNV viruses was analysed, with the determination of the kinetics of HEV and WNV virus replication. The prevalence of HEV infection was 0,046%, while the prevalence of WNV infection was 0,0026%. In healthy subjects from Croatia, genotypes 3c of the HEV virus and L2 genotype of the WNV virus have been proven. The prevalence of HBV infection was 0,012%. The prevalence of HEV and WNV infection in healthy persons in Croatia is low, while the analysis of genetic features and molecular diversity of the *ORF1 methyltransferase region* of the HEV virus and the *prM/M* gene of the WNV virus in Croatia showed their relationship with viruses present in Europe

(115 pages / 29 figures / 26 tables / 191 references / original in Croatian)

Keywords: Hepatitis E virus, West Nile virus, blood donors, prevalence, phylogeny

Supervisors: ass. prof. Irena Jukić, PhD and Jasna Bingulac-Popović, PhD, higher scientific advisor

Reviewers: prof. Snježana Židovec Lepej, PhD, prof. Petra Korać, PhD, prof. Slavko Gašparov, PhD

Replacement: prof. Silvija Černi, PhD

# Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Pregled literature.....	4
2.1. Virus hepatitisa E - HEV .....	4
2.1.1. Epidemiologija infekcije virusom HEV .....	4
2.1.2. Taksonomija virusa HEV .....	5
2.1.3. Morfologija virusa i organizacija HEV-genoma.....	6
2.1.4. Genotipovi virusa HEV .....	9
2.1.5. Replikacijski ciklus virusa HEV .....	10
2.1.6. Patogeneza infekcije virusom HEV-a .....	12
2.1.7. Dijagnostika bolesti uzrokovane infekcijom virusom HEV .....	15
2.1.8. Terapija bolesti uzrokovane infekcijom virusom HEV .....	18
2.1.9. Virus HEV u transfuziji krvi.....	19
2.2. Virus Zapadnog Nila - WNV.....	20
2.2.1. Epidemiologija infekcije virusom Zapadnog Nila .....	21
2.2.2. Taksonomija virusa Zapadnog Nila .....	23
2.2.3. Morfologija virusa i organizacija WNV-genoma .....	24
2.2.4. Genotipovi virusa Zapadnog Nila .....	28
2.2.5. Replikacijski ciklus virusa Zapadnog Nila .....	29
2.2.6. Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila .....	30
2.2.7. Dijagnostika infekcije virusom WNV .....	32

2.2.8. Terapija bolesti uzrokovane infekcijom virusa WNV .....	33
2.2.9. Virus WNV u transfuziji krvi .....	35
2.2.10. Virus WNV i Usutu virus .....	36
3. Materijali i metode.....	37
3.1. Ispitanici .....	37
3.1.1. HEV .....	37
3.1.2. WNV .....	38
3.2. Metode .....	38
3.2.1. HEV .....	38
3.2.1.1. Probir virusa HEV– metoda TMA .....	38
3.2.1.2. Potvrda ID-NAT HEV-RNA reaktivnih uzoraka.....	43
3.2.1.3. Određivanje genotipa virusa HEV – sekvenciranje po Sangeru .....	45
3.2.1.4. Serološka analiza imunskog odgovora na antigene virusa HEV.....	49
3.2.1.5. Analiza aktivnosti enzima AST i ALT u perifernoj krvi .....	52
3.2.1.6. Statistička analiza .....	53
3.2.2. WNV .....	53
3.2.2.1. Probir virusa WNV – metoda TMA.....	53
3.2.2.2. Potvrda ID-NAT WNV RNA reaktivnih uzoraka.....	55
3.2.2.3. Određivanje genotipa virusa WNV – sekvenciranje po Sangeru.....	56
3.2.2.4. Statistička analiza .....	65
4. Rezultati .....	66
4.1. Rezultati HEV.....	66

4.1.1. Probir DDK na viruse HEV, HBV, HCV i HIV-1/-2 .....	66
4.1.2. Potvrda infekcije virusom HEV i određivanje titra virusa.....	67
4.1.3. Imunosni odgovor ispitanika na infekciju virusom HEV .....	67
4.1.4. Aktivnosti enzima AST i ALT u perifernoj krvi DDK.....	67
4.1.5. Analiza imunosnog odgovora i koncentracija virusa u naknadnom uzorku periferne krvi DDK .....	68
4.1.6. Genotip virusa HEV .....	70
4.2. Rezultati WNV .....	72
4.2.1. Probir DDK na virus WNV.....	72
4.2.2. Potvrda infekcije virusom WNV .....	73
4.2.3. Genotip virusa WNV .....	76
5. Rasprava .....	79
5.1. HEV .....	79
5.2. WNV.....	83
6. Zaključak.....	91
7. Popis literature.....	92
8. ŽIVOTOPIS .....	115

## 1. Uvod

Virus hepatitisa E (HEV) vodeći je uzročnik akutnih hepatitisa u svijetu. Procjenjuje se da je 939 milijuna ljudi u svijetu bilo zaraženo HEV-om (Nan i sur., 2017). Virusom HEV-a godišnje se u svijetu zarazi oko 20 milijuna ljudi, više od tri milijuna ima simptome zaraze, a 60.000 – 70.000 osoba umre (Jelicic i sur., 2022). Do danas je opisano osam genotipova virusa HEV (HEV1 do HEV8) od kojih pet uzrokuje zarazu u ljudi (Muñoz-Chimeno i sur., 2022). Virusni genotipovi HEV1 i HEV2 izazivaju zarazu jedino u ljudi, uglavnom u zemljama u razvoju i prenose se fekalno-oralnim putem, te kontaminiranom vodom. Virusni genotipovi HEV3 i HEV4 pronađeni su u ljudi, domaćoj i divljoj svinji, kozi, govedu, jelenu i devi. Uzrokuju zoonoze u ljudi, prvenstveno konzumacijom sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa svinja ili divljači, te rjeđe kontaktom sa zaraženim životinjama ili njihovim izlučevinama. Virus se može prenijeti i transfuzijom krvi, transplantacijom organa te preko posteljice. Virusni genotipovi HEV3 i HEV4 mogu uzrokovati kronični hepatitis u transplantiranih bolesnika (Li i sur., 2020). Infekcija genotipom HEV3 u ljudi uglavnom prolazi bez znakova bolesti s klinički tihom serokonverzijom, ili kao benigna, ograničena infekcija s potpunim oporavkom unutar šest tjedana. Međutim, bolesnici koji imaju neku bolest jetre ili primaju imunosupresivnu terapiju mogu razviti simptomatsku akutnu ili kroničnu bolest. Kronični hepatitis E može dovesti do ciroze jetre što može završiti zatajenjem jetre i smrću. Osim toga HEV3 može uzrokovati i ekstrahepatičke manifestacije bolesti, osobito u neurološkom, hematološkom, gastrointestinalnom i bubrežnom sustavu. Osobito osjetljiva skupina na infekciju HEV-om su trudnice, naročito u drugom i trećem tromjesečju, a podložne su brzom progresiji bolesti i komplikacijama s visokom smrtnošću (15%-25%) (Jelicic i sur., 2022). U drugom desetljeću 21. stoljeća literaturni podatci pokazuju značajan porast lokalno stečene infekcije HEV-om u razvijenim zemljama, koje najčešće uzrokuje HEV3 (Grabarczyk i sur., 2018). Ne postoji odobrena antivirusna terapija za kronični hepatitis uzrokovan virusom HEV, iako su u nekim slučajevima bili uspješni učinci ribavirina i redukcija imunosupresije (Harvala i sur., 2019). Prijenos HEV-a transfuzijom krvi prvi je puta otkriven u Japanu 2004. godine (Matsubayashi i sur., 2004), a zatim u Francuskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu, Njemačkoj i Španjolskoj (Bi i sur., 2020). Od početka 2017., Europska farmakopeja nalaže obavezan molekularni probir plazme tretirane otapalima ili deterdžentom, a Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC, eng. *European Centre for Disease Prevention and Control*) od 2017. preporuča molekularni probir krvi na virus HEV-a, kako bi se smanjila opasnost od prijenosa HEV-a supstancama

ljudskog porijekla (SOHO, eng. *Substances Of Human Origin*). Europsko udruženje za istraživanje jetre (EASL, eng. *European Association for the Study of the Liver*) preporuča molekularni probir svih donacija krvi na virus HEV-a, ovisno o lokalnoj procjeni rizika i studijama isplativosti (Dalton i sur., 2018).

Virus Zapadnog Nila, WNV (eng. *West Nile Virus*) izrazito je rašireni arbovirus, prisutan u svim dijelovima svijeta. WNV je neurotropni ljudski patogen, koji može uzrokovati groznicu Zapadnog Nila (WNF, eng. *West Nile Fever*) i neuroinvasivnu bolest Zapadnog Nila (WNND, eng. *West Nile Neuroinvasive Disease*). WNV cirkulira u prirodi u enzootskom ciklusu između ornitofilnih komaraca, uglavnom *Culex sp.*, koji služe kao vektori te ptica u kojima se virus umnožava i koje su primarni rezervoar virusa WNV. Prilikom hranjenja komaraca na pticama i nekim sisavcima, virus WNV se može prenijeti na druge ptice, konje ili ljude (Frank i sur., 2022). Prijenos virusa u ljudi može se dogoditi transfuzijom krvi, transplantacijom solidnih organa, dojenjem, te preko posteljice. Od dosad opisanih devet genotipova virusa WNV, dvije najznačajnije genetske varijante L1 i L2 (L, eng. *lineage*), su najvirulentnije i uzrokovale su nekoliko globalnih epidemija (Lu i sur., 2024, Rizzoli i sur., 2015, Frank i sur., 2022). U ljudi, oko 80% zaraženih ne razvije simptome bolesti, dok 20% dobije blagu febrilnu bolest (WNF). U manje od 1% zaraženih, uglavnom starijih i osoba s nekom drugom, postojećom bolesti, razvije se WNND s mogućim smrtnim posljedicama (Dreier i sur., 2016). Liječenje bolesnika zaraženih virusom WNV je samo suportivno, a cjepivo protiv virusa WNV ne postoji. Prijenos virusa WNV transfuzijom krvi prvi put je zabilježen 2002. godine u SAD-u. Od tada, virus WNV predstavlja opasnost za sigurnost krvi s obzirom da asimptomatski dobrovoljni darivatelji krvi (DDK) mogu dati krv, kojom se ako je virus prisutan, može prenijeti infekcija primatelju i uzrokovati ozbiljnu bolest. Od 2004. Europska komisija (EK) uvela je 28-dnevno odgađanje darivanja krvi za DDK koji dolaze iz područja s dokazanim postojanjem infekcije virusom WNV, ako nije dostupno NAT (eng. *Nucleic Acid Test*) testiranje krvi na WNV RNA u formatu pojedinačnog NAT probira tj. ID-NAT (ID-NAT, eng. *Individual Donation-NAT*) testiranje u individualnoj donaciji.

Cilj ove doktorske disertacije je odrediti gensku varijabilnost na razini genotipova HEV-a i WNV-a u populaciji DDK, te odrediti prevalenciju virusa kod DDK.

Specifični ciljevi su:

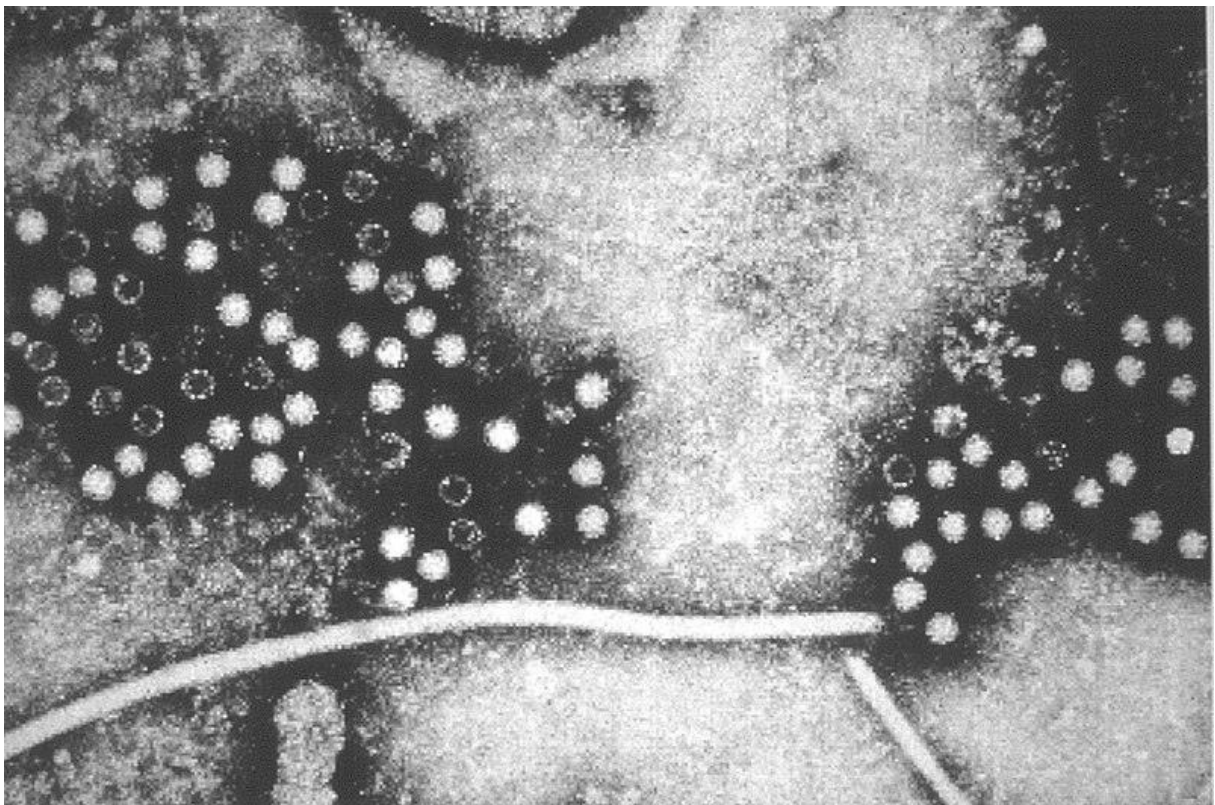
1. Odrediti prevalenciju infekcije virusima HCV, HBV, HIV-1/-2, HEV i WNV detekcijom nukleinskih kiselina virusa, u dobrovoljnih darivatelja krvi metodom TMA (TMA, eng. *Transcription Mediated Amplification*).
2. Metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR, eng. *quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction*) odrediti kinetiku replikacije virusa HEV i WNV.
3. Metodom populacijskog sekvenciranja i filogenetske analize odrediti genotipove virusa HEV i WNV, te molekularnu raznolikost *metiltransferazne* regije ORF1 (ORF, eng. *Open Reading Frame*) virusa HEV i *NS5* gena virusa WNV.

Hipoteza ovog istraživanja jest da su virusi uzročnici hepatitisa E (HEV) i groznice Zapadnog Nila (WNV) u Hrvatskoj po genskim odlikama i molekularnoj raznolikosti *metiltransferazne regije* ORF1 virusa HEV i *NS5* gena virusa WNV, srodni virusima prisutnim u Europi.

## 2. Pregled literature

### 2.1. Virus hepatitisa E - HEV

Virus hepatitisa E otkriven je 1981. godine za vrijeme epidemije hepatitisa među ruskim vojnicima u Afganistanu oboljelim od enteralno prenesenog ne-A, ne-B (ET-NANB) hepatitisom (Lemon i sur., 2019).

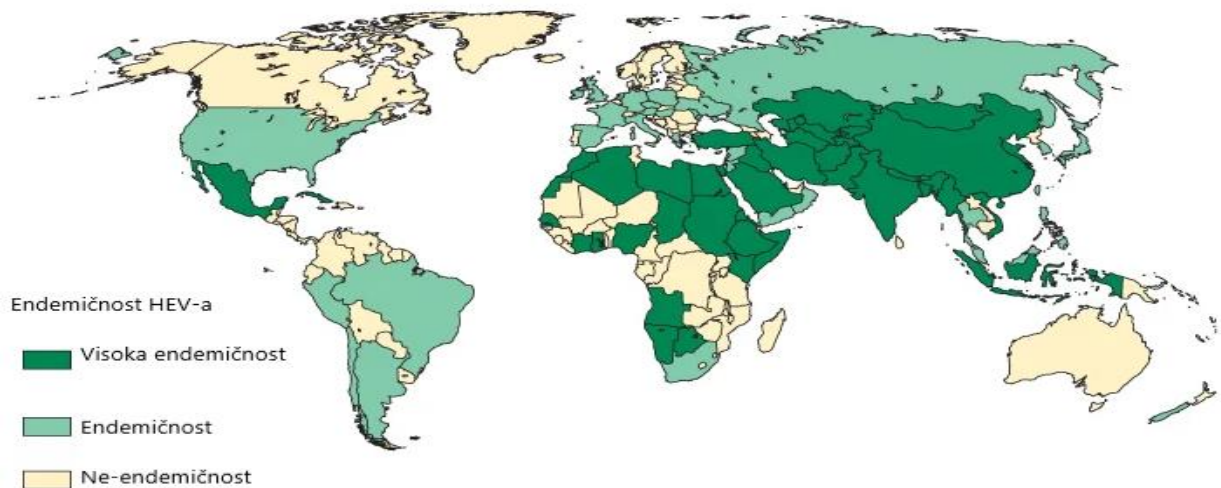


**Slika 1.** Elektronskomikroskopska slika virusa HEV (preuzeto s: [https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis\\_E](https://en.wikipedia.org/wiki/Hepatitis_E))

#### 2.1.1. Epidemiologija infekcije virusom HEV

Virus hepatitisa E prepoznat je kao glavni globalni uzročnik akutnog hepatitisa. Visoko je endemičan u zemljama u razvoju - Africi, Meksiku, južnoj, središnjoj i istočnoj Aziji. U ovim su područjima najčešći genotipovi HEV1 i HEV2, a zaraza se uglavnom širi fekalno-oralnim putem, tj. kontaminacijom pitke vode fecesom (Wang i Meng, 2021). Ljudi su glavni rezervoar genotipova HEV1 i HEV2 genotipova, a prijenos ovih genotipova sa životinja na ljude, do sada

nije zabilježen. Epidemije uzrokovane virusom HEV često se javljaju u izbjegličkim kampovima, dok se sporadične epidemije bilježe u ostalim područjima u razvoju (dijelovi istočne Azije, Bliski Istok) i razvijenim zemljama (Sjeverna i Južna Amerika, Europa). Epidemije najviše pogađaju ljude u dobi između 15 i 49 godina. U SAD i EU ne postoji sistematično praćenje infekcija virusom HEV stoga je uglavnom nepoznata incidencija i karakteristike slučajeva hepatitisa E. U Europi postoji specifična mrežna stranica HEVnet, koju je kreiralo nizozemsko ministarstvo zdravstva uz potporu ECDC-a. Stranica je osmišljena kao globalna mreža laboratorija i znanstvenika koji istražuju virus HEV-a, te izmjenjuju molekularne i epidemiološke podatke o virusu (<https://www.rivm.nl/en/hevnet>).



**Slika 2.** Endemičnost virusa hepatitisa E (HEV) (preuzeto i prilagođeno s: <https://microbenotes.com/hepatitis-e-virus/>)

### 2.1.2. Taksonomija virusa HEV

Prema taksonomiji iz 2022. godine, ratificiranoj 2023. godine, virus HEV/Orthohepepevirus A dobio je naziv *Paslahepevirus balayani*, a pripada porodici *Hepeviridae* i koljenu *Paslahepevirus* (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*; <https://ictv.global/taxonomy>). Pojedine vrste virusa unutar istog koljena filogenetski se razlikuju na temelju analize ORF1 regije genoma i kodona 1-450 (metiltransferaza), kodona

971-1692 (RNA-ovisna RNA polimeraza), regije ORF2 i kodona 121-473 (kapsidni protein, koji ne uključuje preklapajuću

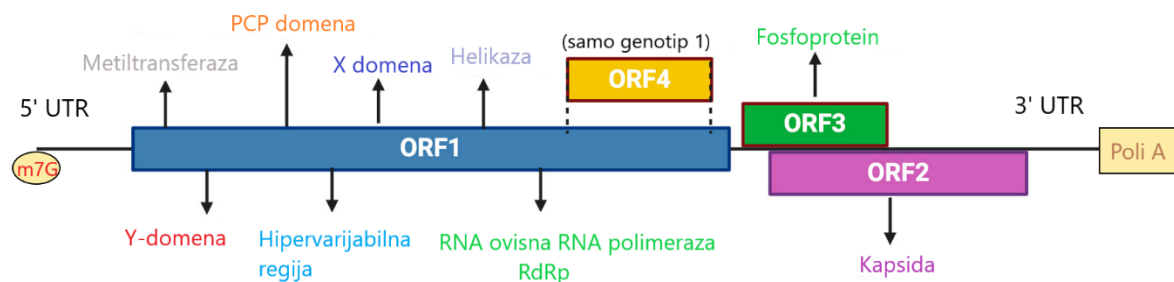
ORF3 regiju)

<https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae/orthohepevirinae/paslahepevirus>).

### 2.1.3. Morfologija virusa i organizacija HEV-genoma

Virus HEV-a ikosaedarskog je oblika, veličine 32–34 nm, obavijen je kvaziovojnicom (eHEV) kad je prisutan u krvi ili staničnoj kulturi, ili je bez ovojnice kad je prisutan u stolici (Purdy i sur., 2022). Kapsida virusa eHEV izgrađena je od 180 kopija kapsidnog proteina, a kapsida neovijenog virusa HEV sadrži 60 kopija kapsidnog proteina (Cancela i sur., 2022; Guu i sur., 2009). Kapsidni protein izgrađen je od tri domene koje izgrađuju tri strukturna elementa: S – kontinuirana kapsida, P1 – trostruki izbojci i P2 – dvostruki šiljci. Svaka domena sadrži polisaharidna vezna mjesta za koja se pretpostavlja da ostvaruju interakcije sa staničnim receptorima (Purdy i sur., 2022).

Genom virusa HEV-a (slika 3) čini jednolančana RNA pozitivnog smisla, koja na 5' regiji ima 7-metil-gvanozinsku kapu (m7G) i kratku 5' nekodirajuću regiju, UTR (UTR, eng. *Untranslated Region*) od 28 nukleotida, na koju se nastavljaju tri otvorena okvira čitanja, ORF1, ORF2 i ORF3 (ORF, eng. *Open Reading Frame*) i 3' UTR s poli-A repom (Shahini i sur., 2024).



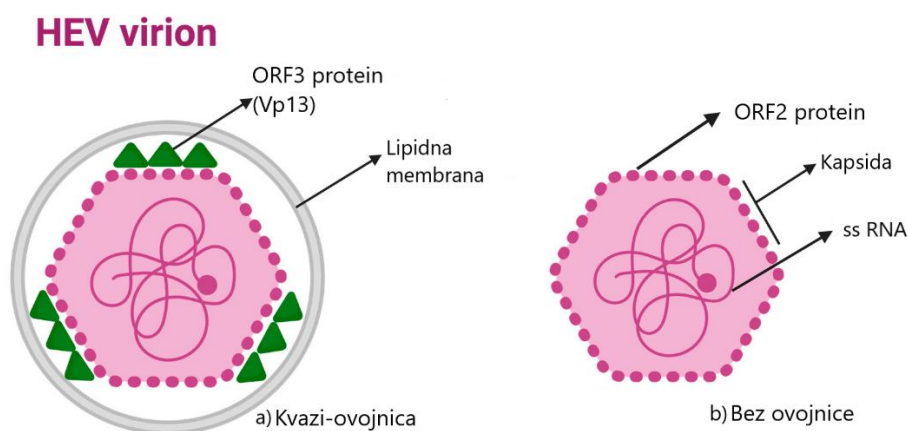
**Slika 3.** Prikaz genoma virusa HEV; 5' i 3' UTR, ORF1 – kodira nestrukturane proteine, ORF2 – kodira kapsidni protein, ORF3 – kodira fosfoprotein, ORF4 – kodira p-ORF4, m7G (metil gvanozinska kapa), poli-A rep (preuzeto i modificirano iz: Shahini i sur., 2024)

Najveći otvoreni okvir čitanja je ORF1, duljina mu varira ovisno o genotipu HEV, a kodira poliprotein s nestrukturnim proteinima – metiltransferazu (MT), Y-domenu, PCP (PCP, eng.

*Papain-like Cysteine Protease*), HVR (HVR, eng. *Hypervariable Region*), Prolin bogatu domenu (Pro), X domenu, helikazu (Hel) i RNA-ovisnu RNA polimerazu (RdRp) (Cao i sur., 2012., Nan i sur., 2016). Metiltransferazna domena (MT) nalazi se na N-kraju ORF-1 kodiranog poliproteina, posjeduje gvanin-7-metiltansferaznu i gvanililtransferaznu aktivnosti i sudjeluje u sintezi 7mG 5' kape na virusnoj RNA, koja je neophodna za infektivnost virusa (Emerson i sur., 2004). Y-domena sadrži potencijalno palmitoilacijsko mjesto i konzerviranu strukturu  $\beta$ -heliksa, te HEV-univerzalno konzervirane aminokiseline Cys-336, Cys-337 i Trp-413 koje su ključne za replikaciju virusa (Parvez i sur., 2017). Za PCP domenu se pretpostavlja kako sudjeluje u virusnoj strategiji izbjegavanja imunološkog odgovora domaćina. HEV PCP vjerojatno djeluje kao antagonist ISIG15, interferon stimuliranog gena 15 (ISIG15, eng. *Interferon (IFN)-stimulated gene 15*) kada se nalazi u obliku fuzijskog proteina MT i PCP domene, a PCP domena antagonist je interferona- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Kenney i sur., 2019). Prema literaturnim podacima, nomenklatura i funkcija HVR i Pro regija još nije jasna. Pretpostavlja se kako su važne za replikaciju virusa i kao ciljne regije u razvoju antivirusnih lijekova (Cancela i sur., 2022). X domena ili makrodomena važna je za replikaciju virusa u post-translacijskoj fazi, inhibira indukciju tip I IFN, fosforilacijom IRF-3 (eng. *Interferon Regulatory Factor 3*) ključnog transkripcijskog faktora za IFN- $\beta$  (Nan i sur., 2014). Domena RNA helikaze esencijalna je za replikaciju virusa, jer odmotava lance nukleinskih kiselina korištenjem energije koja nastaje hidrolizom ATP-a (eng. *Adenosine TriPhosphate*) (Haenni i sur., 1997). RdRp je enzim koji kodiraju svi + RNA virusi, a neophodan je za replikaciju virusa (O'Reilly i Kao., 1998). HEV RdRp se veže za 3' kraj HEV RNA za što su joj potrebne dvije strukture matične petlje na 3' kraju poli-A repa RNA. RdRp nalazi se na membrani endoplazmatskog retikuluma (ER) iz čega se može pretpostaviti da je ER mjesto replikacije virusa HEV (Rehman i sur., 2008).

Okvir čitanja ORF2 sastoji se od 1983 nukleotida (N), preklapa se s ORF3 osim u 14 N, a završava 65 N uzvodno od poli-A repa. ORF2 kodira kapsidni protein, HEV-CP (CP, eng. *Capsid Protein*) koji se sastoji od 660 aminokiselina i sadrži tri strukturalne domene – ljuska, *shell* (S), srednja, *middle* (M) i ispupčena, *protruding* (P) (Shahini i sur., 2024). Yin i suradnici utvrdili su kako se velike količine ORF2 kapsidnog proteina otpuštaju u staničnim kulturama stanica zaraženih virusom HEV ali i u serumu bolesnika s HEV infekcijom. Također su utvrdili kako postoje dva različita translacijska produkta virusnog ORF2 gena, tj. sekretorni oblik ORF2 proteina – ORF2<sup>S</sup> i kapsidni oblik ORF2<sup>C</sup>. Pretpostavlja se kako ORF2<sup>S</sup> nije neophodan za infekciju već vjerojatno ima ulogu u modulaciji imunološkog odgovora domaćina (Yin i sur., 2018). Virus HEV ima dualni životni ciklus; u stolici se nalazi u obliku neovijenih viriona, a u

krvi cirkulira kao forma s ovojnicom koja potječe od domaćinove stanice. Takva forma s kvazi-ovojnicom (eHEV) na površini nema virusnih antigena jer su oni potpuno maskirani domaćinskom membranom, te je neosjetljiva na neutralizirajuća antitijela u serumu. Ovijanjem u domaćinovu membranu, HEV može izaći iz stanice bez citolitičkog efekta, odnosno ne uzrokuje otpuštanja imunostimulatornih signalnih čimbenika iz domaćinove stanice. Domaćinska membrana eHEV vjerojatno potječe od trans-Golgi aparata (TGN, eng. *Trans-Golgi Network*) jer sadrži TGOLN2 (TGOLN2 eng. *Trans-Golgi Network Protein-2*) (Yin i sur., 2016).



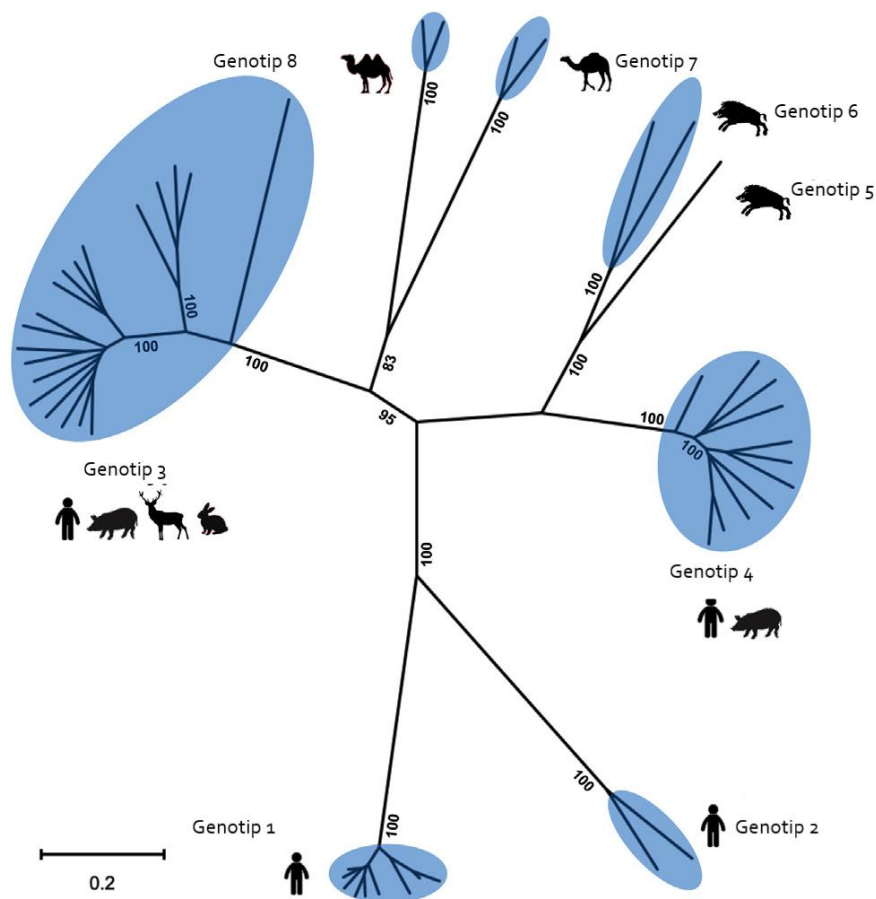
**Slika 4:** Organizacija HEV viriona: a) Virion s kvazi-ovojnicom koji ima vanjsku membranu, nalazi ga se u krvi i staničnoj kulturi, b) neovijeni virion, nalazi ga se u fecesu (kratice: ssRNA – jednolančana RNA, (eng. *single stranded RNA*), ORF2 protein – protein otvorenog okvira čitanja 2, ORF3 protein – protein otvorenog okvira čitanja 3, Vp13 – fosfoprotein Vp13) (preuzeto i modificirano iz: Shahini i sur., 2024)

Najmanji ORF HEV genoma je ORF3. Translatira se iz subgenomske RNA, preklapa se s ORF2 u 300 N, koji čine najkonzerviraniju regiju virusa HEV, te kodira fosfoprotein Vp13, veličine od 113 do 115 aminokiselina (Nan i Zhang, 2016). Vp13 ima funkciju ionskog kanala, gradi multimerne komplekse s membranama endoplazmatskog retikuluma (ER) i sudjeluje u otpuštanju infektivnih čestica (Ding i sur., 2017).

Poznato je da se ORF4 nalazi unutar ORF1, specifičan je samo za HEV1, kodira protein p-ORF4, koji pojačava aktivnost RdRp i neophodan je za životni ciklus HEV1 (Yadav i sur., 2021).

#### **2.1.4. Genotipovi virusa HEV**

Genom virusa HEV izrazito je raznolik. Na temelju filogenetskog odnosa, geografskog porijekla, vrste domaćina i kliničkog ishoda opisano je osam genotipova i 36 podtipova virusa HEV (Wang i Meng, 2021). Genotipovi HEV1 i HEV2 zarazni su samo za čovjeka, prenose se fekalno-oralnim putem i uzrokuju velike epidemije uzrokovane vodom, uglavnom u endemičnim područjima južne i jugoistočne Azije, Afrike i Meksika (Wang i Meng, 2021). Iako HEV1 i HEV2 uglavnom uzrokuju samo-ograničavajuće akutne virusne hepatitis, predstavljaju veliki problem javnog zdravstva u zemljama u razvoju, uzrokujući oko 20,1 milijun infekcija godišnje, 3,5 milijuna simptomatskih slučajeva hepatitisa E, 70.000 smrti kao posljedica zatajenja jetre i 3.000 mrtvorodenih. Također, genotipovi HEV1 i HEV2 uzrokuju visoku stopu mortaliteta u trudnica, novorođenčadi i djece (Rein i sur., 2012). HEV1 ima podtipove 1a do 1e, a HEV2 podtipove 2a i 2b (Smith i sur., 2016). Genotipovi HEV3 i HEV4 uzrokuju zoonoze u ljudi, unosom sirovog ili nedovoljno termički obrađenog mesa svinja, divljih svinja i jelena, ili kao posljedica kontakta sa zaraženim životinjama i njihovim izlučevinama. Genotip HEV3 pronađen je i u štakora (De Sabato i sur., 2024). HEV3 genotip je podijeljen u podtipove 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f, 3g, 3h, 3i, 3j, 3k, 3L, 3m, 3ra (Garbuglia i sur., 2025). HEV4 čine podtipovi 4a–4 g (Smith i sur., 2016). Genotipovi HEV5 i HEV6 izolirani su u divljim svinjama u Japanu, genotip HEV7 nađen je u jednogrbih deva u zemljama Bliskog Istoka, dok je genotip HEV8 izoliran u dvogrbih deva u Kini (Wang i sur., 2021). Utvrđeno je da se virus HEV može inaktivirati zagrijavanjem na 71°C najmanje 20 min, što je izuzetno važno za sigurnost hrane s obzirom na virus HEV (Barnaud i sur., 2012).

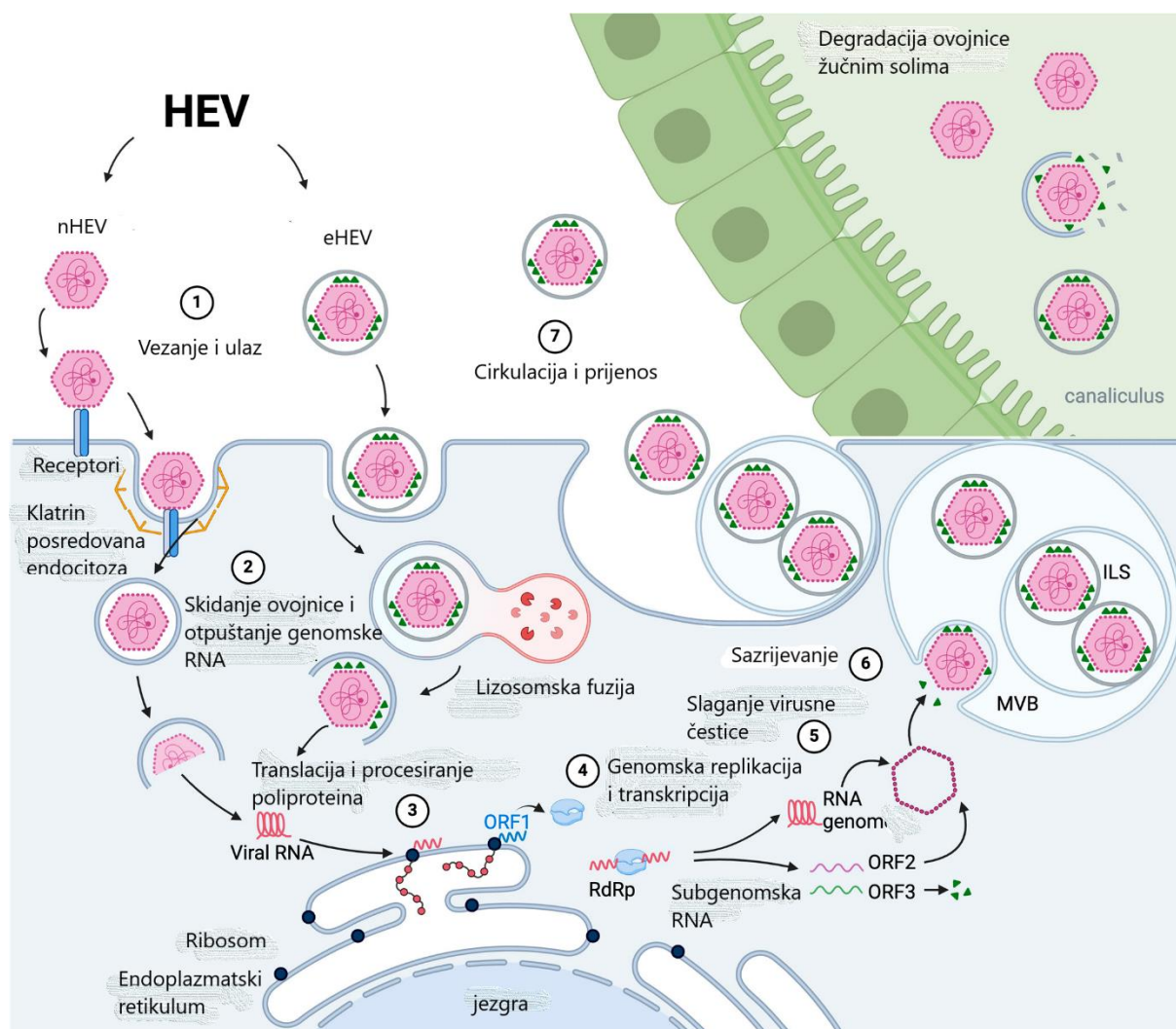


**Slika 5.** Filogenetsko stablo virusa HEV dobiveno metodom *Maximum likelihood* na osnovi cjelokupnog genoma. 8 genotipova prikazano je prema ICTV konsenzusu. Tropizam genotipova prema domaćinu prikazan je ikonom životinja (preuzeto i prilagođeno iz: Wang i sur., 2021).

### 2.1.5. Replikacijski ciklus virusa HEV

Dugogodišnje nepostojanje uspješnih metoda uzgoja virusa HEV u staničnoj kulturi otežalo je istraživanje staničnog ciklusa HEV-a. Tek nedavnim razvojem infektivnih klonova virusa, permissivnih stanica i optimizacije rasta HEV-a doprinijelo je djelomičnom razumijevanju životnog ciklusa virusa HEV (Fu i sur., 2019). Virus HEV može prijeći intestinalni vaskularni endotel i portalnim krvotokom doći do jetre, gdje uzrokuje infekciju hepatocita (Okamoto, 2013). Replikacija HEV-a događa se već u stanicama crijeva iz kojih se otpušta u krvotok u obliku viriona s kvazi-ovojnicom, eHEV. Virioni bez ovojnice nHEV mogu se naći u krvotoku u udjelu manjem od 20% osobito u kasnoj infekciji, kod oštećenja jetre (Das i sur., 2023). Iako su utvrđeni neki čimbenici i mehanizmi ulaska HEV-a u stanicu, ključni parametri su još uvijek neodređeni. Sposobnost HEV-a u uzrokovanju infekcija različitih tjelesnih stanica, poznatim

kao ekstrahepatičke manifestacije hepatitisa E, vjerojatno uključuju nepoznate čimbenike ulaza virusa u stanice (Kamar i sur., 2012, Debing i sur., 2016). Utvrđeno je kako se nHEV i eHEV vežu za heparan sulfat proteoglikane, osobito sindekane, koji se nalaze na vanjskom dijelu različitih stanica, a posreduju vezanje različitih tipova virusa (Kalia i sur., 2009). Poznato je da se nHEV veže za specifične receptore na površini stanica domaćina koje su osjetljive na virus, uključujući hepatocite u jetri. Interakcija nHEV i receptora posredovana je molekulama klatrina, heparan sulfata, integrina  $\alpha$ -3 i dinamina-2. Vezanje nHEV-a za receptore pokreće endocitozu i ulazak viriona u stanicu domaćina. U ovojnici eHEV-a nalazi se fosfatidilserin koji se može vezati za receptore na ciljnim stanicama, ali radi nedovoljne jakosti vezanja sa staničnim receptorom, ulaz viriona eHEV u stanicu nije učinkovit kao kod nHEV (Das i sur., 2019). Virion eHEV ulazi u stanicu endocitozom nakon koje dolazi do degradacije ovojnice unutar endolizosoma. Nakon ulaska u stanicu, u endosomu dolazi do degradacije kapside, zasad još nepoznatim mehanizmom. Zatim se u citoplazmi genom HEV-a translacija u veliki poliprotein, a nestrukturani proteini kodirani ORF1 regijom, imaju ključnu ulogu u replikaciji virusa. RdRp katalizira replikaciju i transkripciju te nastaju novi virusni genomi i subgenomske RNA. Translacijom subgenomske RNA nastaju ORF2 i ORF3 proteini. Novosintetizirane virusne RNA omataju se strukturnim kapsidnim proteinom kojeg kodira ORF2 te nastaju cjelovite virusne čestice unutar citoplazme. One se dalje strukturalno modificiraju, nastaju sferični virioni s kvazi-ovojnicom (eHEV) koja potječe od egzosoma i izlaze iz stanice uz pomoć ESCRT mehanizma, staničnog endosomalnog izlaznog kompleksa potrebnog za prijenos (ESCRT, eng. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). ESCRT sudjeluje u pupanju novonastalih HEV viriona u multivezikularnim tjelešcima - MVB (eng. *Multi Vesicular Bodies*), koji po fuziji sa staničnom membranom izlaze iz stanice. Virusni ORF3 protein potreban je za sekreciju HEV viriona, te vjerojatno povezuje kapsidu i domaćinove faktore izlučivanja (Zafrullah i sur., 1997), (slika 6). Nakon fuzije MVB s plazma membranom, virusne čestice otpuštaju se iz stanice egzosomalnim putem tako da samo eHEV ulazi u krvotok. Žučne soli u kanalikulima uzrokuju raspadanje ovojnice i nastanak golih virusnih čestica, nHEV, koje sa žuči ulaze u crijevo, te se izlučuju u okoliš i postaju glavni izvor kontaminacije i prijenosa infekcije.



**Slika 6.** Životni ciklus virusa HEV1. Vezanje i ulaz – nHEV veže se za specifične receptore na stanici za virus osjetljivih domaćinskih stanica (hepatociti), uz posredovanje klatrina. To vezanje pokreće endocitozu i ulazak viriona u stanicu. eHEV ulazi u stanicu endocitozom nakon čega dolazi do degradacije ovojnice u endolizosomu (preuzeto i modificirano iz: Shahini i sur., 2024)

### 2.1.6. Patogeneza infekcije virusom HEV-a

Infekcija virusom HEV-a najčešći je uzrok akutnog virusnog hepatitisa. Unatoč činjenici kako se radi o globalnom zdravstvenom problemu, infekcija virusom HEV-a klinički je uglavnom nedijagnosticirana bolest. Genotipovi HEV1 i HEV2 uzrokuju ograničenu, enteralnu infekciju u sporadičnim ili velikim epidemijama uzrokovanim vodom, te mogu izazvati fulminantnu bolest jetre visokog mortaliteta, osobito kod trudnica. HEV3 i HEV4 genotipovi primarno su virusi svinja, koji inficiraju ljude kao slučajne domaćine. Više od dvije trećine bolesnika

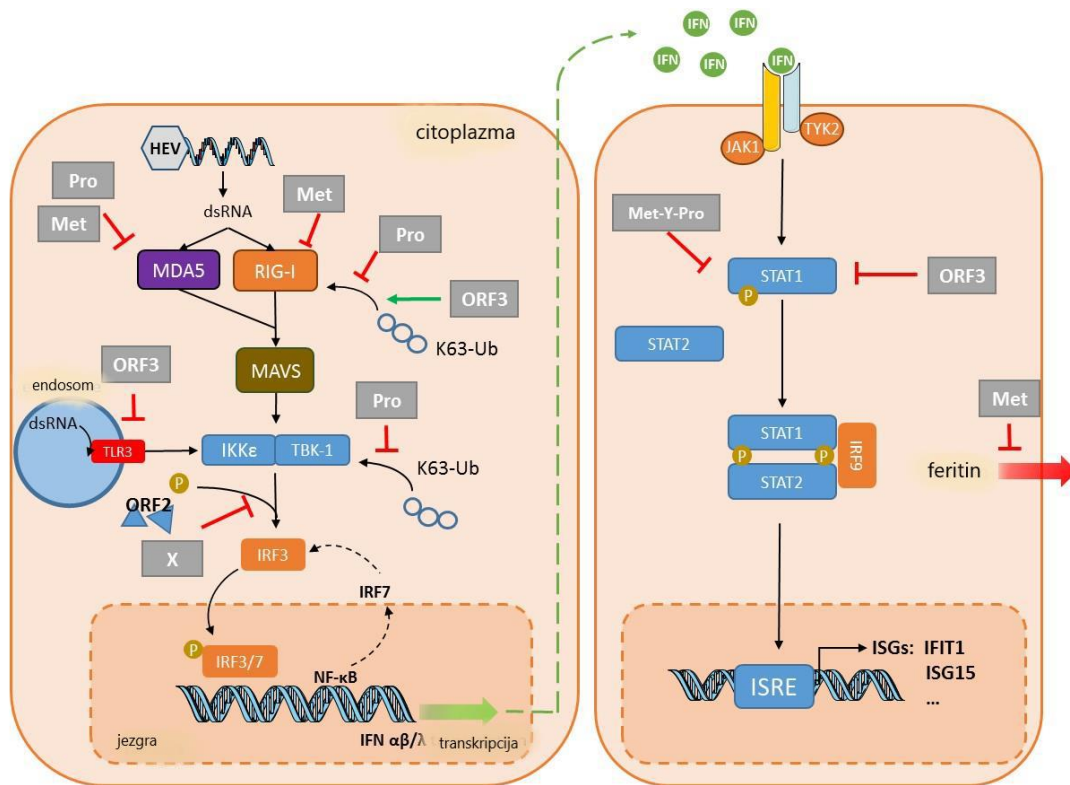
zaraženih s HEV3 i HEV4 u razvijenim zemljama nema simptoma bolesti, dok samo manji dio razvija akutnu ograničenu infekciju koja je često neprepoznata ili pogrešno dijagnosticirana. U bolesnika s postojećom kroničnom bolešću jetre ili alkoholizmom, može se razviti težak oblik hepatitisa i otkazivanje jetre (Narayanan i sur., 2019).

Akutni hepatitis E po kliničkoj manifestaciji ne razlikuje se od ostalih virusnih hepatitisa. U kliničkoj praksi rijetko se prepoznaje jer većina bolesnika nema simptome bolesti (>90%) ili su simptomi nespecifični i blagi, poput umora, groznice, boli u abdomenu, mučnine. Liječenje akutnog hepatitisa E temelji se na potpunoj terapiji, dok se nespecifična antivirusna terapija može primijeniti u teškim oblicima akutnog hepatitisa E ili kod prijelaza u kroničnu infekciju i zatajenja jetre. Dijagnoza kroničnog hepatitisa pretpostavlja se kod perzistentne HEV replikacije, dokumentirane detekcijom HEV RNA u serumu ili stolici, tri do šest mjeseci nakon početne infekcije (Kamar i sur., 2008). Kronični hepatitis E uglavnom je uzrokovan s genotipom HEV3. Gotovo se uvijek javlja kod imunosuprimiranih bolesnika, kao što su transplantirani bolesnici i bolesnici na kemoterapiji, bolesnici zaraženi virusom HIV-a te reumatski bolesnici na imunomodulatornoj terapiji (Narayanan i sur., 2019). Kronična HEV infekcija u imunosuprimiranih bolesnika često je bila krivo dijagnosticirana kao bolest presadka protiv domaćina, GVHD (eng. *Graft Versus Host Disease*), kronično odbacivanje presadka ili lijekovima uzrokovano oštećenje jetre (Dalton i Seghatchian, 2016).

Urođena imunost kod HEV infekcije ima ulogu uklanjanja infekcije, ubijanjem stanica koje su zaražene virusom. Stanična imunost uzrokuje infiltraciju hepatocita citotoksičnim T stanicama i inhibiciju replikacije virusa citokinima i vjerojatno je odgovorna za nastanak kliničke akutne infekcije. Humoralna imunost stečena prijašnjom infekcijom ili cijepljenjem vjerojatno štiti od kliničke bolesti uzrokovane sljedećom infekcijom (Narayanan i sur., 2019). Virus hepatitisa E nije citopatski virus. Posljedica akutne infekcije određena je jačinom imunološkog odgovora. Urođena imunost kontrolira i ograničava širenje infekcije odmah nakon kontakta s patogenom. Infekciju otkriva prepoznavanjem biljega zaraze: PAMPa (PAMP, eng. *Pathogen-Associated Molecular Patterns*), uz pomoć receptora PRR (PRR, eng. *Pattern-Recognition Receptors*) (Li i sur., 2019). Virusna infekcija uobičajeno pokreće urođeni imunološki odgovor koji dovodi do produkcije interferona (IFN) tip I i III. Postoje tri klase receptora PRR-a: TL-receptori (TLR, eng. *Toll-Like Receptors*) koji detektiraju virus na staničnoj membrani ili u endosomu, RLR (RLR, eng. *Retinoic Acid-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors*) i NLR (NLR, eng. *Nucleotide oligomerization domain (NOD)-like Receptors*). Kada PRR-i prepoznaju virus, stvara se multiproteinski kompleks i dolazi do produkcije kemokina i antivirusnih citokina, uključujući IFN. IFN pokreće transkripciju interferon stimulirajućih gena, ISG-a (ISG, eng.

*Interferon Stimulated Genes*) koji ometaju replikaciju virusa u različitim fazama (Wang i sur., 2017). Singnalizacija putem TLR-a uključuje dva različita smjera ovisno o adapterskim molekulama. Svi TLR-ovi koriste protein MyD88 (eng. *Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88*), a TLR3 i TLR4 koriste TRIF (TRIF, eng. *Toll/IL-1R domain-containing adaptor Inducing IFN*) (Takeuchi i sur., 2010). TLR3 prepoznaje dlRNA koja je prijelazni replikacijski produkt, što aktivira IRF3 (IRF3, eng. *IFN Regulatory protein 3*) i NF- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, eng. *Nuclear Factor- $\kappa$ B*). IRF3 prelazi u jezgru što rezultira transkripcijom IFN-a, koji se izlučuju iz stanice i veže za specifične receptore na površini stanice. Tip I IFN receptori (IFNAR) nalazi se na svim stanicama, a tip III IFN receptori uglavnom se nalaze na epitelnim stanicama. Vezanjem IFN za receptore aktiviraju se ISG-a, koji pomažu u inhibiciji replikacije i širenja virusa (Lhomme i sur., 2020). RLR-i su smješteni u citoplazmi, prepoznaju dlRNA i 5'-trifosfat RNA, te nakon vezanja s ligandima pokreću MAVS (MAVS, eng. *Mitochondria-Associated Antiviral Protein*) koji aktivira transkripcijske čimbenike IRF3/IRF7 i NF- $\kappa$ B, što rezultira produkcijom IFN-a i drugih citokina. Virus HEV razvio je brojne strategije ometanja urođene imunosti. ORF1 inhibira ekspresiju IFN- $\beta$  (Nan i sur., 2014), ORF2 inhibira NF- $\kappa$ B aktivnost te slabi domaćinov apoptotični odgovor u korist infekcije HEV-a (John i sur., 2011). ORF3 se veže za STAT1 (STAT1, eng. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) čime inhibira IFN- $\alpha$  i upalni stanični odgovor (Lei i sur., 2018). Wilson i suradnici utvrdili su istraživanjem na staničnim linijama kako je polimorfizam na poziciji 308 promotorske regije čimbenika nekroze tumora, TNF- $\alpha$  (TNF, eng. *Tumour Necrosis Factor*) povezan s osjetljivošću na infekciju virusom HEV. Alel 308A pokazuje znatno veću produkciju TNF- $\alpha$  *in vitro* i teže oblike bolesti (Wilson i sur., 1997). Polimorfizam nukletoda T/C u promotorskoj regiji TNF- $\alpha$  (1031 C) i nukleotida T/A u promotoru IFN- $\gamma$  (874 T) povezani su sa simptomatskom infekcijom uzrokovanom virusom HEV (Mishra i sur., 2011). Majumdar i suradnici navode kako u bolesnika s visokim vrijednostima TLR3-a i IFN- $\gamma$  akutna HEV infekcija prolazi bez simptoma i završava brzim oporavkom, dok kod bolesnika s nižom ekspresijom TLR3 i IFN- $\gamma$  dolazi do progresije bolesti uz akutno zatajenje jetre (Majumdar i sur., 2015).

Virusna infekcija ubrzo aktivira NK stanice (NK, eng. *Natural Killer*) i NKT stanice (NKT, eng. *Natural Killer T*) urođenog imunskog odgovora na mjestu infekcije. Nakon prepoznavanja patogena, NK stanice izlučuju citokine uključujući IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  kako bi pojačali imunološki antivirusni odgovor. Oštećenje jetre uzrokovano infekcijom virusom HEV vjerojatno je posredovano citotoksičnim T limfocitima i NK stanicama (Lhomme i sur., 2016).

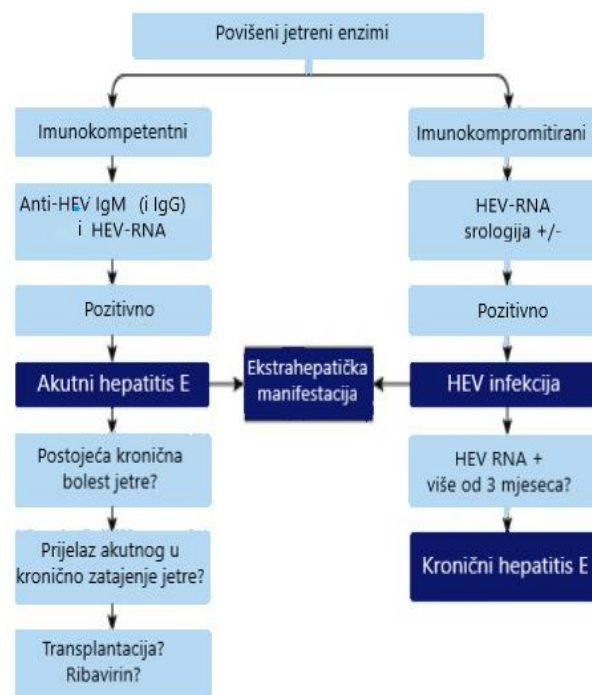


**Slika 7.** Interakcija urođene imunosti i virusa HEV (crvene linije – inhibicija, zelene strelice – poticanje) (preuzeto i modificirano iz Lhomme i sur., 2020)

### 2.1.7. Dijagnostika bolesti uzrokovane infekcijom virusom HEV

Akutna HEV infekcija uglavnom je klinički neprepoznata bolest, jer se akutni ikterični hepatitis manifestira u 5-30% bolesnika. Inkubacija bolesti traje dva do šest tjedana, a bolest započinje uz nespecifične simptome poput mučnine, povraćanja, mialgije, artralgije i slabosti, a zatim se javlja tamni urin i žutica. Biokemijski biljezi (jetrene transaminaze, bilirubin i alkalna fosfataza) postaju povišeni i pojavljuju se anti-HEV antitijela. Prvo se javljaju IgM antitijela koja su kratkotrajna i traju tri do četiri mjeseca, iako mogu perzistirati i do jedne godine, a zatim i IgG antitijela koja su dugotrajna. Bolest može trajati nekoliko tjedana i uglavnom završava spontanom i potpunim oporavkom (Nan i sur., 2016). Genotipovi HEV1 i HEV2 uzrokuju teže oblike akutnog hepatitisa nego genotipovi HEV3 i HEV4. U trudnica, osobito u trećem tromjesečju, infekcija s HEV1 povezuje se s mortalitetom do 20%. Većina infekcija virusom HEV-a protječe uz samoizlječenje i ne uzrokuje kronični hepatitis, no kod imunokompromitiranih bolesnika kao što su primatelji transplantiranih organa, primatelji kemoterapije, HIV pozitivne osobe, razvija se kronični oblik bolesti. Moguće su i ekstrahepatične manifestacije infekcije virusom HEV, u obliku neuroloških poremećaja, kao što su poliradikulopatija, Guillain-Barré sindrom, encefalitis, miopatija, bilateralni brahijalni

neuritis, koji su zabilježeni u bolesnika s akutnim i kroničnim infekcijama (Dalton i sur., 2016). Ekstrahepatična replikacija virusa HEV događa se i u posteljici zaraženih trudnica, što se može povezati s povećanom fetalnom smrtnošću ploda (Bose i sur., 2014). Infekcija virusom HEV dijagnosticira se serološki određivanjem anti-HEV antitijela ili izravno detekcijom HEV RNA ili kapsidnog antigena u krvi, stolici ili drugim tjelesnim tekućinama (Nan i sur., 2016).



**Slika 8.** Dijagnostički protokol za kronični hepatitis E prema preporukama EASL-a (eng. *European Association for the Study of Liver*) (preuzeto i modificirano iz: Dalton i sur., 2018).

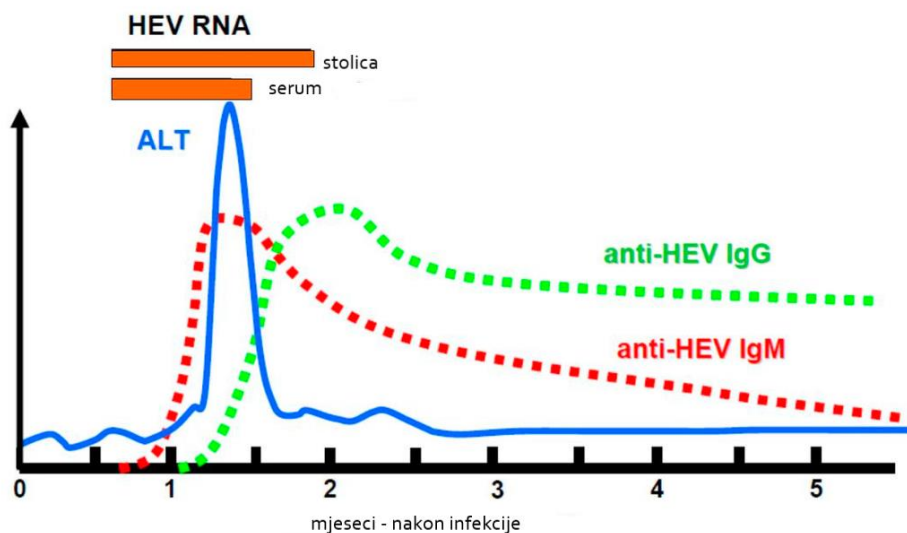
- Serološko dokazivanje antitijela anti-HEV

Antitijela anti-HEV otkrivaju se serološkom metodom EIA (EIA, eng. *Enzyme Immunoassay*) i brzim kromatografskim testovima. Detekcija anti-HEV IgM i rastućeg titra anti-HEV IgG antitijela nije dovoljna za dijagnozu infekcije virusom HEV-a s obzirom na nedovoljnu specifičnost testova za određivanje ovih antitijela, ali i s obzirom kako anti-HEV IgM mogu nestati ili se još ne mogu detektirati u vrijeme uzimanja uzorka. EIA testovi imaju značajan nedostatak jer im je vrijeme prozora - WP (WP, eng. *Window Period*) tj. period od početka infekcije do pojavljivanja specifičnih anti-HEV antitijela koja su neophodna za reakciju testova

dugo i iznosi dva do šest tjedana. Prisutnost antitijela IgM u serumu, biljeg je akutne infekcije virusom HEV, no ta antitijela mogu biti pozitivna u kratkom periodu od tri do četiri mjeseca, a rijetko i do godinu dana (Huang i sur., 2010). Koncentracija IgG antitijela postaje mjerljiva i raste već kod pojave prvih simptoma bolesti, a najviše vrijednosti dostiže u četvrtom tjednu od pojave simptoma, uz održanu visoku detektabilnost više od godinu dana. Zasad nije utvrđeno točno trajanje antitijela IgG u bolesnika s infekcijom virusom HEV (Kamar i sur., 2014). Nedavna istraživanja ukazuju na lažno pozitivne rezultate anti-HEV IgM testova radi križne reakcije s virusom EBV (Epstein Barr virus) i CMV (Citomegalo-virus). Istraživanja ukazuju da je samo 13,3% IgM pozitivnih rezultata usporedivo s rezultatima dobivenim PCR-om, što ukazuje na sniženu pouzdanost serološke dijagnostike akutnog hepatitisa uzrokovanog virusom HEV (Hyams i sur., 2014). Antitijela anti-HEV IgG ne pružaju doživotnu imunost i njihova koncentracija u serumu tijekom vremena pada, te je moguća reinfekcija, ali uz smanjeni rizik pojave simptomatskog hepatitisa E (Songtanin i sur., 2023). Metodom EIA može se određivati i HEV kapsidni antigen, koji perzistira u bolesnika s kroničnom infekcijom i nakon terapije ribavirinom i nestanka HEV RNA, To znači da detekcija HEV kapsidnog antigena ne ukazuje nužno na aktivnu infekciju te njegovo značenje u dijagnostici bolesti ostaje nejasno (Behrendt i sur., 2016).

- Molekularno dokazivanje HEV RNA

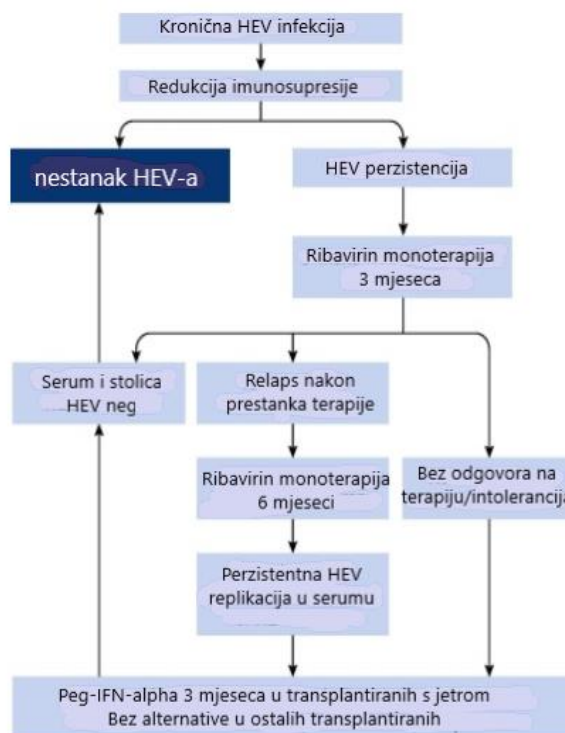
U krvi se HEV RNA može se odrediti tri tjedna nakon infekcije (Dalton i sur., 2018). Određivanje i kvantifikacija HEV RNA u krvi i drugim tjelesnim tekućinama je zlatni standard utvrđivanja aktivne HEV infekcije (akutne ili kronične). Kronični hepatitis E je HEV infekcija kod koje virusna RNA perzistira u krvi ili stolici najmanje 3 mjeseca (N. Kamar i sur., 2013). HEV RNA određuje se reakcijom PCR-a ili reakcijom TMA. Limit detekcije tj. 95% LOD (LOD, eng. *Limit Of Detection*) komercijalnom HEV RNA TMA metodom iznosi 3,1 – 4,5 IU/mL (Procleix UltrioPlex E Assay, Grifols), metodom RT-PCR 18,6 IU/mL (Cobas HEV PCR assay, Roche Molecular Systems Inc.) i 4,7 IU/mL (RealStar HEV RT-PCR kit, Altona Diagnostics).



**Slika 9.** Tijek akutne infekcije virusom HEV i vremenski tijek pojave biljega (preuzeto i modificirano iz: Lhomme i sur., 2016).

### 2.1.8. Terapija bolesti uzrokovane infekcijom virusom HEV

Ne postoji specifična terapija za infekciju virusom HEV. Kod većine zaraženih dolazi do spontanog izlječenja infekcije, bez pojave simptoma, ali akutna HEV infekcija kod trudnica, imunokompromitiranih bolesnika i bolesnika s postojećom kroničnom bolesti jetre može dovesti do teškog hepatitisa i zatajenja jetre. Redukcija imunosupresije uspješan je način liječenja kroničnog hepatitisa E kod jedne trećine bolesnika koji su na imunosupresivnoj terapiji kod transplantacije organa (Ma i sur., 2022). U slučaju nemogućnosti redukcije imunosupresiva radi opasnosti od odbacivanja transplantata ili perzistentne infekcije, primjenjuje se ribavirin. Terapija ribavirinom kod 90% bolesnika rezultira održanim virusnim odgovorom, SVL (SVL, eng. *Sustained Viral Response*) (Kamar i sur., 2020). U bolesnika koji ne reagiraju na terapiju ribavirinom, trenutno jedina alternativna terapija je pegilirani interferon alfa (Peg-IFN- $\alpha$ ), koji se može primijeniti samo u transplantiranih s jetrom i netransplantiranih bolesnika s kroničnom infekcijom virusom HEV, s obzirom da Peg-IFN- $\alpha$  povećava rizik akutnog odbacivanja presadka (Ma i sur., 2022).



**Slika 10.** Terapijski protokol za kronični hepatitis E prema preporukama EASL-a (preuzeto i modificirano iz: Dalton i sur., 2018).

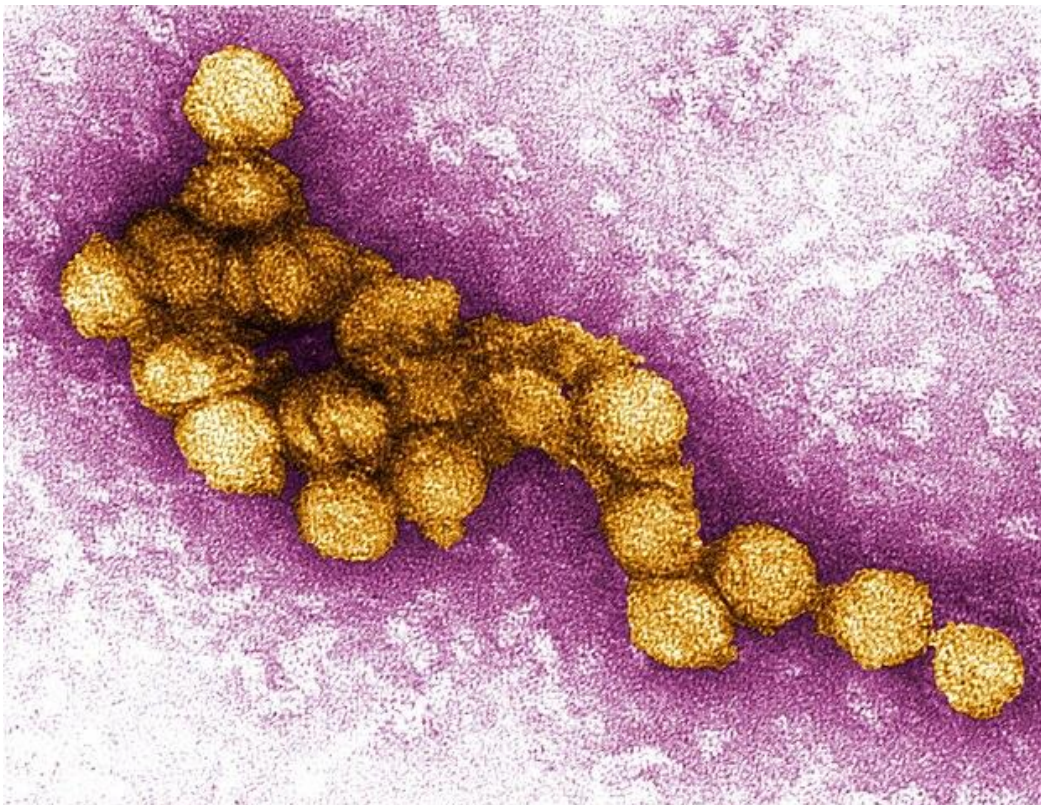
### 2.1.9. Virus HEV u transfuziji krvi

Prvi prijenos virusa HEV transfuzijom krvi zabilježen je 2004. godine u Japanu (Matsubayashi i sur., 2004), a zatim i u Francuskoj, Velikoj Britaniji, Njemačkoj i Španjolskoj (Bi i sur., 2020). Od 2017. godine europska farmakopeja nalaže obvezan NAT probir plazme tretirane deterdžentom. Prema podacima ECDC iz 2017. godine, najveći broj infekcija virusom HEV u desetogodišnjem periodu prijavili su Velika Britanija, Francuska, Nizozemska i Njemačka. Iste godine na stručnom sastanku ECDC donesena je preporuka kako bi uz NAT probir donacija krvi, kliničari trebali bolesnicima davati preporuke o ispravnoj prehrani. EASL preporuča NAT probir svih donacija krvi na virus HEV-a, koji je utemeljen na lokalnoj procjeni rizika i isplativosti, što ovisno o zemljopisnoj lokaciji može značajno varirati (Dalton i sur., 2018). Brojni transfuzijski centri u svijetu uveli su probirno testiranje krvi na HEV RNA ili su procijenili potrebu probira krvi, kako bi se smanjio rizik prijenosa virusa HEV transfuzijom krvi (Boland i sur., 2019). Od 27 zemalja članica EU, sedam je implementiralo NAT probir na HEV RNA. Univerzalni probir donacija krvi provodi se u Irskoj, Nizozemskoj, Švicarskoj i

Ujedinjenom Kraljevstvu. Selektivni probir kojim se postiže zaliha HEV-negativne krvi za visokorizične bolesnike provodi se u Francuskoj, Austriji i Luksemburgu. Neke zemlje provode univerzalni probir donacija krvi prikupljenih u regijama s visokom prevalencijom virusa, npr. – Katalonija i Asturias u Španjolskoj, te North Rhine-Westphalia i Hamburg u Njemačkoj (Boland i sur., 2019).

## 2.2. Virus Zapadnog Nila - WNV

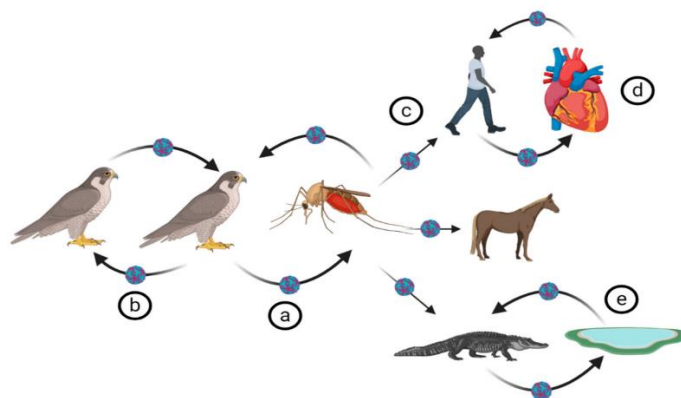
Virus Zapadnog Nila (WNV, eng. *West Nile Virus*) prvi put je izoliran u provinciji Zapadnog Nila u Ugandi 1937. godine, iz krvi bolesnice s groznicom. Neutralizacijskim testovima u pokusnih miševa uočena je imunološka srodnost virusa WNV i virusa japanskog encefalitisa B (JEV), dok je histološka analiza pokazala da je ovaj virus izričito neurotropan (Smithburn i sur., 1940). WNV može uzrokovati groznicu Zapadnog Nila, WNF i neuroinvazivnu bolest Zapadnog Nila, WNND.



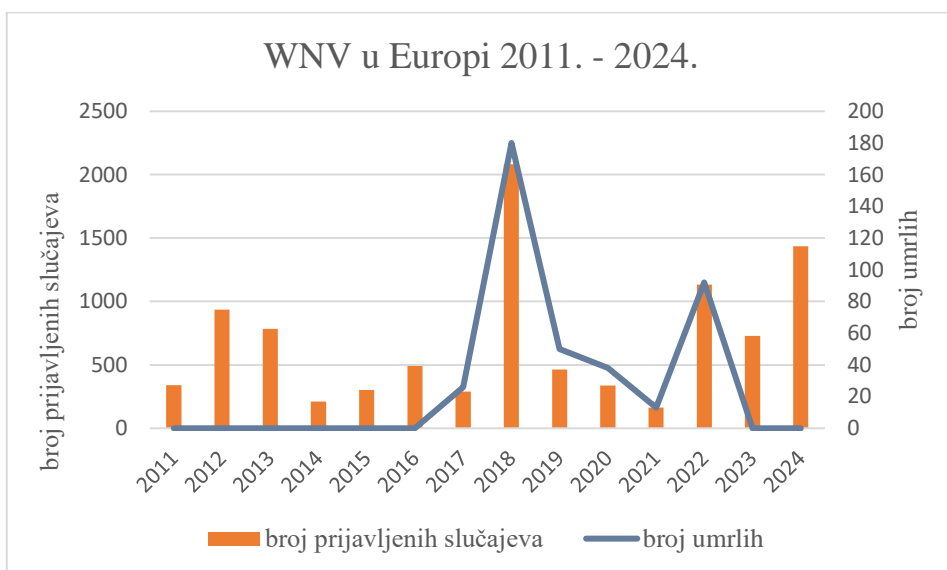
**Slika 11.** Elektronskomikroskopska slika virusa Zapadnog Nila, prikazan žuto. (*A micrograph of the West Nile Virus, appearing in yellow. Cynthia Goldsmith, P.E. Rollin, USDCDC; preuzeto s: [https://en.wikipedia.org/wiki/West\\_Nile\\_virus](https://en.wikipedia.org/wiki/West_Nile_virus)*)

### 2.2.1. Epidemiologija infekcije virusom Zapadnog Nila

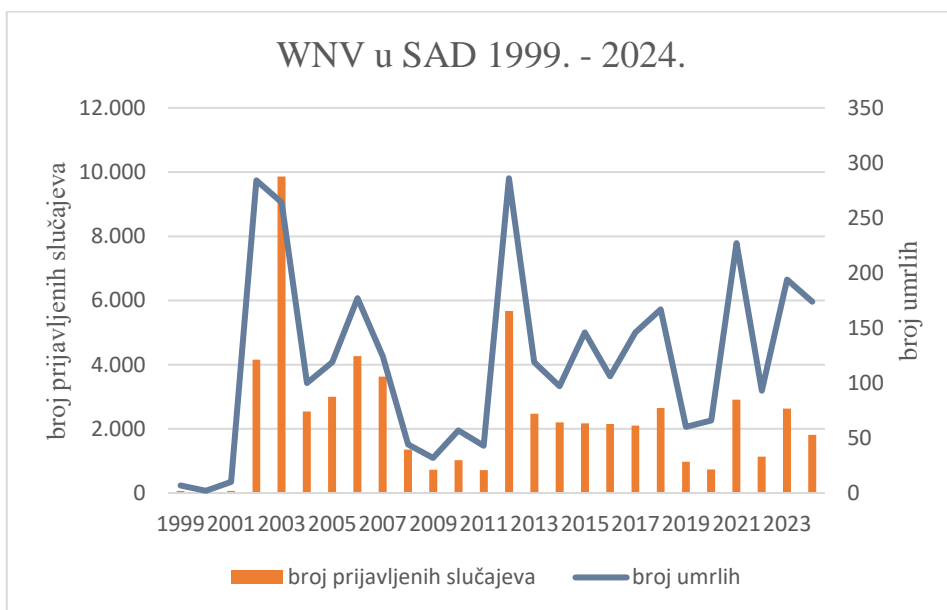
Virus Zapadnog Nila globalno je raširen arbovirus (arbo-, eng. *arthropod-borne*). WNV cirkulira u enzootičkom ciklusu između ornitofilnih komaraca koji služe kao vektori, osobito *Culex sp.* i ptica u kojima se virus umnožava i koje su primarni rezervoar virusa. Kada se komarci hrane krvnim obrokom na pticama i nekim sisavcima, WNV ulazi u komarce i naknadno se ubodom komarca može prenijeti na druge ptice, konje i ljude (Frank i sur., 2022). Osim komarcima, virus se kod ljudi može prenijeti transfuzijom krvi i transplantacijom organa, te s majke na dijete preko posteljice i dojenjem. Profesionalno povezani prijenos aerosolom zabilježen je kod radnika na farmi purana (D'amore i sur., 2023). U ljudi, oko 80% zaraženih ne razvije simptome, dok ih 20% ima simptome blage groznice, WNF, a manje od 1% zaraženih, uglavnom starijih osoba i bolesnika s postojećim drugim bolestima, razvija WNND, što može završiti letalno (Dreier i sur., 2016). Međutim u epidemiji 2018. u Europi, udio WNND među simptomatskim bolesnicima bio je 68% (Zannoli i Sambri, 2019). Virus cirkulira u Africi, Sjevernoj i Južnoj Americi, Aziji, Europi i Australiji, te uzrokuje povremene, manje ili veće epidemije. Najveća epidemija infekcije virusom Zapadnog Nila u Europi bila je 2018. godine, s ukupno 2.083 zaražene osobe i 180 umrlih od posljedica zaraze virusom WNV (Vilibić-Cavlek i sur., 2021), (Slika 13). Prema podacima CDC-a (CDC, eng. *Center for Disease Control*) u SAD-u je 2003. godine bilo najviše prijavljenih slučajeva zaraze virusom Zapadnog Nila, 9.862 zaraženih i 264 umrlih, a zatim 2012. godine 5.674 zaraženih i 286 umrlih (Slika 14).



**Slika 12.** Kruženje virusa WNV u prirodi, (a) prijenos virusa WNV između ptica koje su prirodni rezervoar virusa i kompetentnih komaraca koji su vektori, (b) prijenos virusa WNV između ptica, (c) prijenos virusa WNV ubodom komaraca u različite domaćine (ljude, konji, krokodili), (d) prijenos virusa WNV transfuzijom krvi i transplantacijom organa u ljudi, (e) WNV infekcija u krokodila (preuzeto i prilagođeno iz Habarugira i sur., 2020).

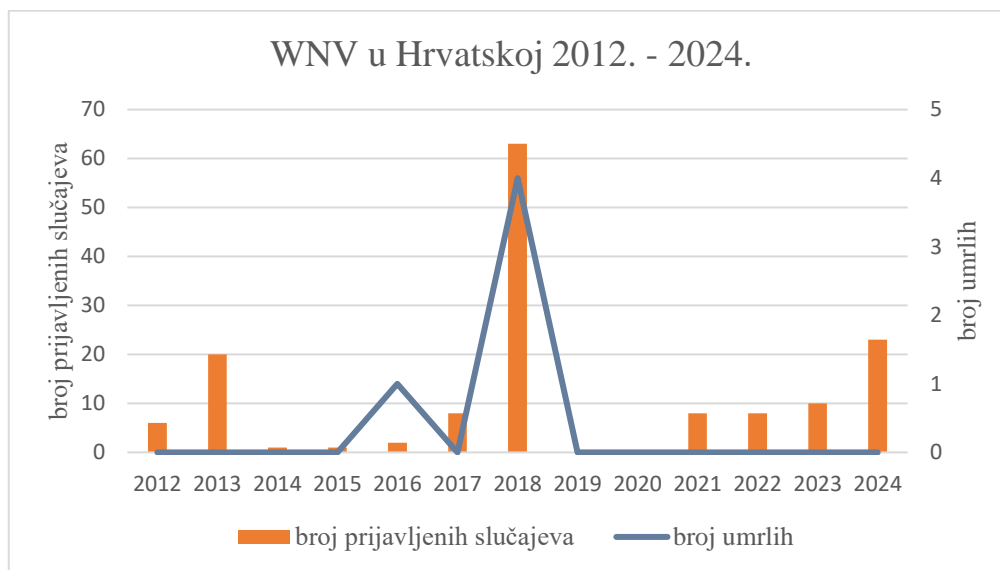


**Slika 13.** Broj prijavljenih slučajeva osoba zaraženih i umrlih od infekcije virusom Zapadnog Nila (WNV) u Europi u periodu od 2011. do 2024. godine (podatci preuzeti s: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/historical>).



**Slika 14.** Broj prijavljenih slučajeva osoba zaraženih i umrlih od infekcije virusom Zapadnog Nila (WNV) u SAD od 1999.-2024. godine (preuzeto s: [https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/historic-data.html?CDC\\_AAref\\_Val=https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/historic-data.html#cdc\\_data\\_surveillance\\_section\\_2-explore-human-data-for-1999-2024](https://www.cdc.gov/west-nile-virus/data-maps/historic-data.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/historic-data.html#cdc_data_surveillance_section_2-explore-human-data-for-1999-2024)).

U Hrvatskoj se infekcije virusom Zapadnog Nila bilježe kontinuirano od 2012. godine, uz povremeno veći broj zaraženih, kao npr. 2013. godine kada je bilo 20, a 2018. godine 64 zaražene osobe, od kojih je 54 imalo potvrđeni WNND, sedam slučajeva WNF, a četiri bolesnika su preminula (Santini i sur., 2022). (Slika 15).



**Slika 15.** Broj prijavljenih slučajeva osoba zaraženih i umrlih od infekcije virusom Zapadnog Nila (WNV) u Hrvatskoj od 2012. do 2024. godine (podatci preuzeti s: [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2025/10/06\\_ZARAZ\\_2024.xlsx](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2025/10/06_ZARAZ_2024.xlsx)).

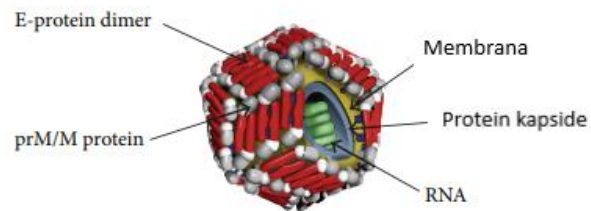
Unatoč navedenom, vjerojatno je stvarna prevalencija infekcije virusom Zapadnog Nila veća s obzirom da većina infekcija protječe bez znakova bolesti, te infekcije ostaju neprepoznate.

### 2.2.2. Taksonomija virusa Zapadnog Nila

Prema novoj ICTV taksonomiji iz 2022. godine, ratificiranoj 2023. godine, virus Zapadnog Nila naziva se *Orthoflavivirus nilense*, te pripada koljenu *Orthoflavivirus* (prije *Flavivirus*) i porodici *Flaviviridae* (ICTV, *International Committee on Taxonomy of Viruses*; 6.1.2024. <https://ictv.global/taxonomy>).

### 2.2.3. Morfologija virusa i organizacija WNV-genoma

Virusna čestica WNV je ikozaedarskog oblika, promjera 45 do 50 nm. Nukleokapsida je unutarnja ovojnica izgrađena od kapsidnog proteina C, koja okružuje virusnu RNA, a dodatno ju okružuje vanjska lipidna ovojnica u koju su ugrađeni transmembranski glikoproteini M i E. (Mukhopadhyay i sur., 2003).



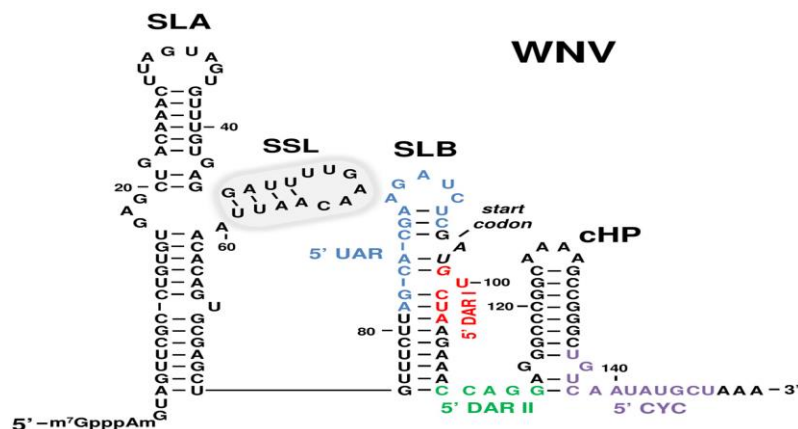
**Slika 16.** Prikaz morfologije virusa Zapadnog Nila; transmembranski proteini E i M, membrana (ovojnica), protein kapside i jednolančana virusna RNA (preuzeto i modificirano iz: Chancey i sur., 2014).

Genom WNV je jednolančana RNA molekula pozitivnog smisla, veličine oko 11 kb (Slika 17). Genom se sastoji od 5' i 3' UTR te jednog ORF koji kodira poliprotein. Djelovanjem virusnih i staničnih proteaza dolazi do cijepanja poliproteina i nastaju strukturni protein kapside (C), pre-membranski protein (prM) i protein ovojnice (E), te sedam ne-strukturnih (NS) proteina - NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5 (Habarugira i sur., 2020).



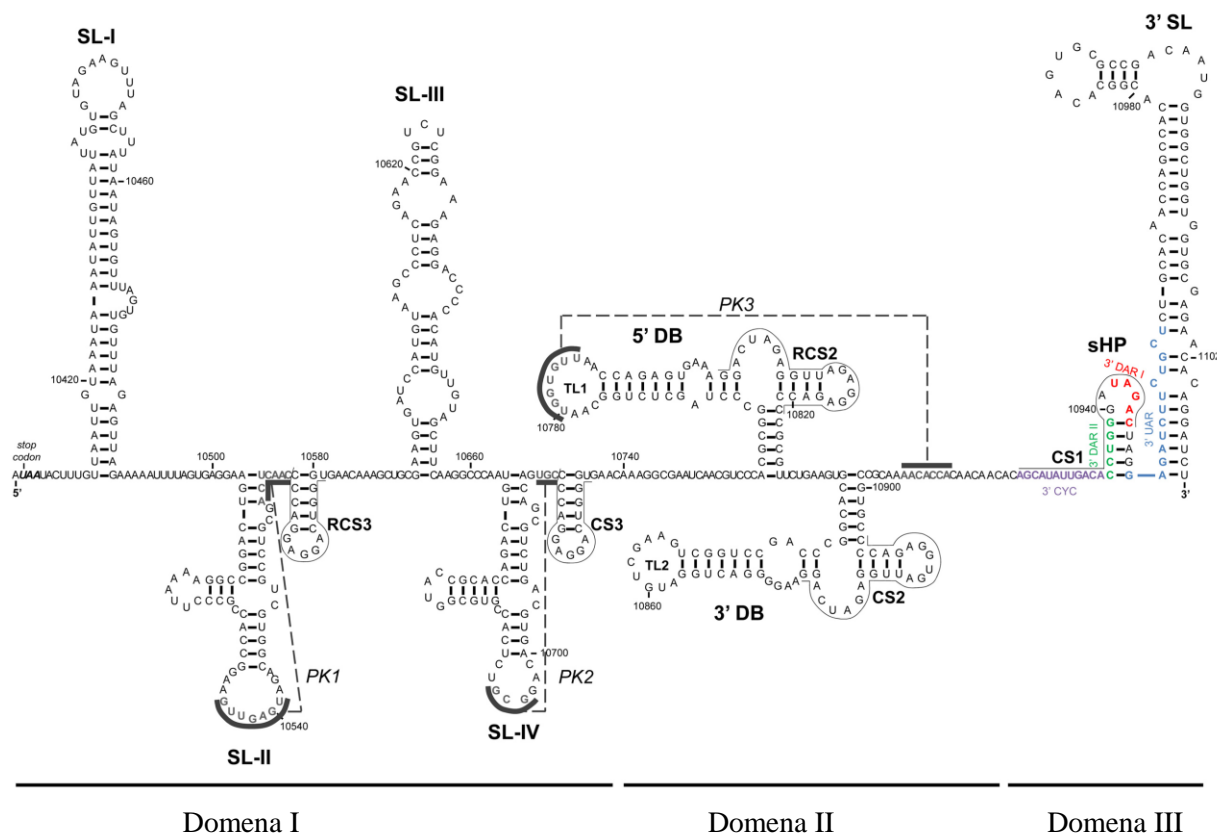
**Slika 17.** Prikaz genoma virusa Zapadnog Nila; 5' i 3' UTR, ORF – strukturni i nestrukturni proteini (preuzeto i modificirano iz: Habarugira i sur., 2020)

Nekodirajuća regija 5' UTR WNV-a sastoji se od 96 N i izrazito je konzervirana regija odgovorna za replikaciju i translaciju virusne RNA. Na 5' kraju regije nalazi se SLA (SLA, eng. *Stem Loop A*) element sastavljen iz glavne matične petlje i manje, bočne matične petlje SSL (SSL, eng. *Small Stem Loop*) (Slika 18). Arhitekturu SLA matične petlje prepoznaju enzimi virusna RNA polimeraza i RNA-ovisna RNA polimeraza (RdRp) koji su uključeni u replikaciju virusnog genoma. SLA element odgovoran je i za dodavanje strukture kape na 5' kraju virusnog genoma za vrijeme replikacije. Nizvodno se nalazi slijedeća, manja matična petlja SLB (SLB, eng. *Stem Loop B*), u kojoj se nalazi AUG startni kodon translacije, te dvije oligo-U sekvencije UAR i DAR-I koje su važne za postizanje kružnog oblika genoma. Nizvodno od SLB petlje slijedi visoko konzervirana regija ukosnice cHP, koja inicira početak translacije smještanjem ribosomskog kompleksa uz AUG startni kodon u SLB matičnoj petlji i važna je za replikaciju RNA (Fernández-Sanlés i sur., 2017).



**Slika 18.** Struktura 5' UTR regije genoma WNV (preuzeto i modificirano iz: Fernández-Sanlés i sur., 2017).

Nekodirajuća regija 3' UTR virusa WNV, odgovorna je za replikaciju virusnog genoma. Sastoji se od približno 632 N, organizirana je u tri domene, (I, II i III) i nalazi se odmah iza translacijskog Stop kodona. Domena I visoko je varijabilna sekvencija koja sadrži četiri matične petlje SL-I, SL-II, SL-III i SL-IV (Slika 19). Vršni dijelovi petlji stvaraju pseudo-čvorove (PK1 i PK2) koji su važni za infektivnost WNV virusa i RNA-RNA interakcije. U domeni II nalaze se specifične DB strukture - „bučice“ (DB, eng. *DummBell*) koje su funkcionalno važne za replikaciju, translaciju i infektivnost WNV virusa. Domena III sadrži visoko konzervirani element kratke ukosnice sHP (sHP eng. *short HairPin*) i 3' SL, a odgovorna je za virusnu replikaciju i završetak virusnog ciklusa (Fernández-Sanlés i sur., 2017).



**Slika 19.** Struktura 3' UTR regije genoma WNV (preuzeto i modificirano iz: Fernández-Sanlés i sur., 2017)

- Strukturni proteini

Kapsidni (C) protein izgrađen je od 105 aminokiselina uz određene varijacije ovisno o soju virusa WNV, a važan je za virusnu replikaciju u interakciji s E3 ligazama te izgradnju nukleokapside. C protein sudjeluje u patogenezi bolesti uzrokujući citotoksične učinke zaustavljanjem staničnog ciklusa u G2 fazi te aktivacijom kaspaze-9 i apoptoze, što uzrokuje staničnu smrt (Driouich i sur., 2019; Samuel i sur., 2006).

Glikoproteinski prekursor proteina M je prM, nalazi se u endoplazmatskom retikulumu stanice. N-terminalna regija proteina prM sadrži jedno glikozilirajuće mjesto na aminokiselinama 15-17, koje je važno za replikaciju i sastavljanje novih virusnih čestica u interakciji s E proteinom (Hanna i sur., 2005).

Virusnu ovojnicu gradi E protein, nalazi se na površini virusne čestice, te je odgovoran za prepoznavanje staničnih receptora na stanicama sisavaca i fuziju s membranom endocita (Fiacre i sur., 2020). Sastoji se od tri domene DI-DIII, od kojih DII na vršnom dijelu sadrži fuzijski peptid koji pokreće spajanje s membranom ciljne stanice, a DIII poprima oblik imunoglobulinske domene i omogućava vezanje sa staničnim receptorom (Nybakken i sur., 2006). Potvrđeno je da su razlike u infektivnosti pojedinih sojeva WNV utemeljene na različitostima u sadržaju aminokiselina E proteina na poziciji 154 (Beasley i sur., 2005). Glikozilacija E proteina na pozicijama 154 do 156 važna je i za neurovirulentnost i neuroinvazivnost virusa WNV (Alsaleh i sur., 2016).

- Nestrukturni proteini

Vrlo konzerviran glikoprotein je NS1, koji sadrži tri N-glikozilirajuća mjesta, te postoji u obliku monomera, dimera (membranski vezan, mNS1) i heksamera (izlučeni protein, sNS1), koji predstavlja zreli oblik proteina. U tom obliku dolazi na površinu stanice gdje djeluje imunomodulatorno umanjivanjem aktivnosti sustava komplementa. Važan je i za replikaciju virusa WNV, a također je ciljna molekula u dizajniranju atenuiranih cjepiva i dijagnostički biološki biljeg (Fiacre et al., 2020).

Multifunkcionalni hidrofobni protein NS2A, je uključen u RNA replikaciju i tvorbu viriona. Utječe na permeabilnost stanične membrane domaćina i na regulaciju antivirusnog odgovora domaćina (Chang i sur., 1999, Leung i sur., 2008). NS2 se veže za komponente replikacijskog kompleksa, za 3' UTR regiju virusne RNA te proteine NS3 i NS5. NS2A sudjeluje u modulaciji domaćinskog IFN tip I odgovora te je kofaktor NS3 proteaze (Liu i sur., 2004; Nestorowicz i sur., 1994, Melian i sur., 2013).

Protein NS2B je kofaktor za proteazu NS3 i sudjeluje u premještanju proteina NS3 iz citoplazme na membranu endoplazmatskog retikuluma (ER), gdje NS3 postaje enzimski aktivan. Interakcija između NS2B i NS3 otvara mogućnost razvoja antivirusne terapije kojom bi se onemogućila lokalizacija NS3 na ER, a time i funkcionalnost NS3 proteina (Tseng i sur., 2021).

Topivi multidomenski protein, NS3, sastoji se od proteazne domene za procesuiranje poliproteina, koja se nalazi na N-terminalnom kraju, te helikazne i trifosfatne domene važne za sintezu virusne RNA, koje se nalaze na C-terminalnom kraju NS3 proteina. Proteaza NS3 je aktivna jedino kada je vezana s NS2B proteinom i taj je kompleks NS2B/NS3 neophodan za cijepanje NS2A-NS2B, NS2B-NS3, NS3-NS4A i NS4B-NS5 veza, te za selektivno odmatanje virusne RNA. Proteaza NS3 ne sadrži transmembransku domenu, te se nakon cijepanja iz

poliproteina otpušta u citoplazmu ili se zadržava na ER-u (Bollati i sur., 2010, Tseng i sur., 2021).

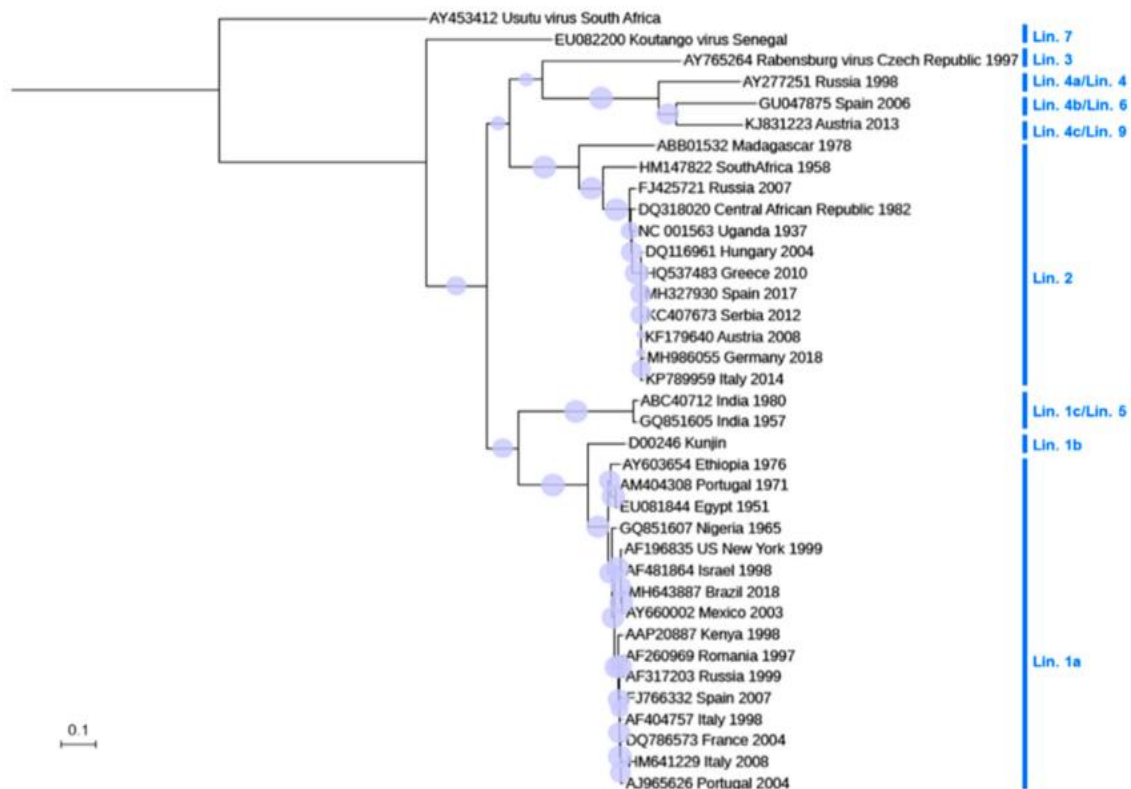
Poznata su i dva mala hidrofobna proteina NS4A i NS4B, od kojih NS4A sudjeluje u virusnoj replikaciji i djeluje kao kofaktor u regulaciji ATP-azne aktivnosti helikaze NS3, a NS4B ima ulogu u izbjegavanju imunološkog odgovora domaćina, inhibicijom IFN signalizacije, te vjerojatno sudjeluje u replikaciji virusa (Evans i sur., 2007; Shiryayev i sur., 2009; Wicker i sur., 2012).

Protein NS5 je najveći NS protein, na N-terminalnom kraju je metiltransferaza, a na C-terminalnom kraju RdRp, što ga čini ključnim proteinom virusne replikacije. Ovaj protein katalizira metilaciju gvanina N-7 i riboze 2'O čime nastaje tip 1 kapa na 5' kraju WNV RNA (Klema i sur., 2016; Zhou i sur., 2007).

#### **2.2.4. Genotipovi virusa Zapadnog Nila**

Budući da ICTV ograničava svoje upute i odgovornost do razine svrstavanja virusa u rodove i vrste, ne postoje prihvaćeni kriteriji za određivanje hijerarhijskih podgrupa (klada, klastera, podtipova i genotipova). Stoga postoje određene nesigurnosti u određivanju genotipa i filogenetske pripadnosti virusa WNV, te je s obzirom na sve veći broj sekvenciranih cijelih genoma virusa WNV, klasifikacija virusa nekonzistentna i nesigurna (Santos i sur., 2023). Do danas je opisano devet genotipova virusa WNV, (WNV L1 do L9) (Lu i sur., 2024), iako u literaturi postoje i drugi načinin označavanja genotipova. Rizzoli i sur (2015) opisuju jedanaest genskih varijanti virusa Zapadnog Nila - L1a, L1b, L1c, L2, L3, L4a, L4b, L4c, L5, L6 i L7 (Rizzoli i sur., 2015, Koch i sur., 2024). Genotipovi WNV L1 i WNV L2 su najrasprostranjeniji i najvirulentniji, te su uzrokovali nekoliko globalnih epidemija s teškim neurološkim manifestacijama bolesti. WNV L1 pronalazimo u mnogim područjima, uključujući Ameriku, Afriku, Europu, Indiju, Bliski Istok, Rusiju i Australiju. Genotip WNV L1 podijeljena je u tri podlinije – WNV L1a koji je rasprostranjen u Africi, Europi i Bliskom Istoku, WNV L1b uključuje WNV<sub>KUN</sub>, (Kunjin virus, KUN) koji se može naći u Australaziji, dok je L1c, poznat i kao WNV L5, najučestaliji u Indiji. Genotip WNV L2 je izoliran u području Subsaharske Afrike i Madagaskara, a iz Mađarske gdje je izoliran 2004., proširio se u Srednju i Južnu Europu. Postao je dominantan genotip u Europi i uzrokovao je nekoliko epidemija u ljudi, konja i ptica. Genotip WNV L2 je podijeljen u klade A, B, C i F, a F je dodatno podijeljen u podklade D i E (Ciccozzi i sur., 2013). Sojevi klade D cirkuliraju uglavnom u Srednjoj i Južnoj Europi te Zapadnom Balkanu, dok se sojevi klade E nalaze u Zapadnoj i Srednjoj Europi (Ciccozzi i sur.,

2013). WNV L3 poznat i kao Rabensburg virus, izoliran je u Češkoj, WNV L6 izoliran je u Španjolskoj, a WNV L8 (ili L7) u Kedougou, Senegal (Habarugira i sur., 2020, Jiménez De Oya i sur., 2019).



**Slika 20.** Filogenetsko stablo pojedinih genotipova/linija WNV-a (preuzeto iz: Jiménez de Oya i sur., 2019)

### 2.2.5. Replikacijski ciklus virusa Zapadnog Nila

Replikacijski ciklus virusa WNV vrlo je složen proces koji započinje ulaskom virusa u stanice, endocitozom posredovanom receptorima, prvenstveno adhezijskom molekulom specifičnom za dendritične stanice, DC-SIGNR receptorom (DC-SIGNR, eng. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non-integrin Receptor*). Nakon ulaska virusa u endosomalnu vezikulu domaćina, virusni E protein mijenja konformaciju i dolazi do povezivanja virusne i stanične membrane, otpuštanja nukleokapside i virusne RNA u citoplazmu stanice domaćina i replikacije virusa. Translacijom virusnog genoma sintetiziraju se nestrukturani proteini potrebni za replikaciju virusne RNA. U početnoj fazi virusnog ciklusa virusna RNA služi kao mRNA ali i kao kalup za sintezu minus (-) lanca RNA. Za vrijeme rane

infekcije (nakon šest do osam sati) nivo sinteze virusne RNA je nizak, s podjednakim udjelom plus (+) i minus (-) lanaca RNA. Sastavljanje i oslobađanje novih virusnih čestica odvija se na membrani ER-a i Golgijevog aparata (GA). Nove virusne čestice prenose se putem egzocitoznog vezikula do površine stanice gdje se nakon cijepanja prM proteina oslobađaju kao zreli virusi (Colpitts i sur., 2012; Habarugira i sur., 2020).

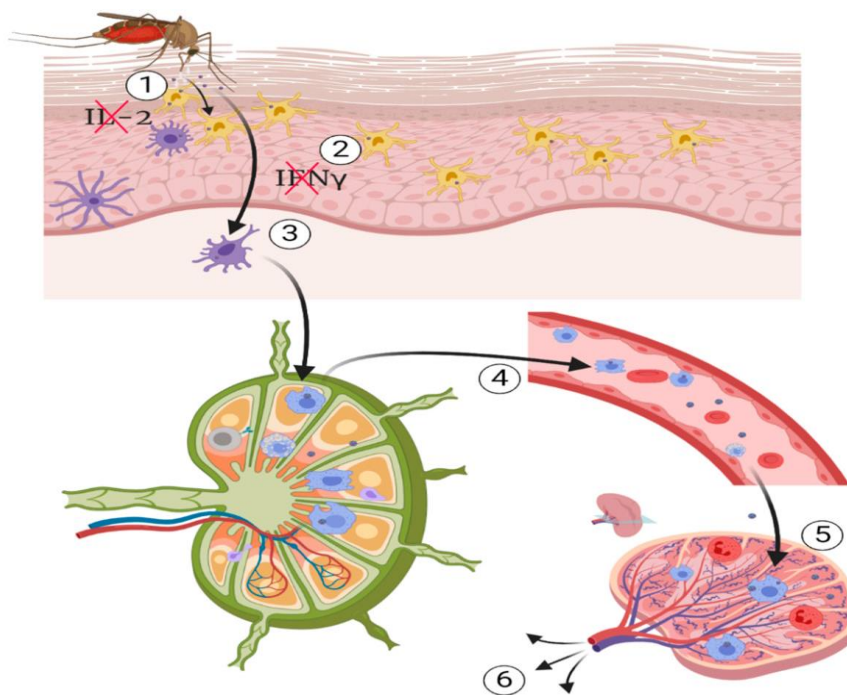
### **2.2.6. Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila**

Virus WNV umnožava se u transmisijskom ciklusu između ptica-komaraca-ptica. U mnogim ptičjim vrstama nivo viremije dovoljan je za infekciju komaraca koji se hrane krvnim obrokom na pticama. Ptice nisu samo rezervoari virusa, već se virus u njima umnožava te postaju izvor zaraze za ostale organizme, primarno ljude i konje. Kod ptica virus uzrokuje akutnu infekciju koja traje do tjedan dana, a u nekih divljih vrsta i nekoliko tjedana. Virus ulazi u središnji živčani sustav, srce, jetru, slezenu i bubrege. Osjetljivost ptica na infekciju virusom WNV ovisi o vrsti, pa bolest može biti asimptomatska, ali i sa teškim neurološkim simptomima i iznenadnim uginućem. Virus WNV otkriven je u 65 različitih vrsta komaraca i 326 ptičjih vrsta. U Europi, komarci *Culex pipiens*, *Culex modestus* i *Culex perexiguus* dominantni su prijenosnici virusa na čovjeka (Fiacre i sur., 2020). Nakon ulaza virusa u komarca putem krvi zaražene ptice, virus inficira crijeva komarca, te prelazi u hemolimfu i druge organe, a time i žlijezde slinovnice, iz kojih se ubodom komarca virus prenosi u druge domaćine. Inokulacija virusa u kožu ključni je korak u patogenezi virusa WNV. Virus prvo ulazi u keratinocite, a zatim u dendritičke stanice, koje omogućuju prijenos virusa WNV do limfnih čvorova i ostalih organa. Patogeneza virusa WNV u ljudi odvija se u tri faze: 1. Rana faza u kojoj nakon uboda zaraženog komarca dolazi do infekcije kože i širenja virusa u lokalne limfne čvorove, 2. Diseminacija virusa u periferne organe i 3. Invazija središnjeg živčanog sustava, CNS (CNS, eng. *Central Nervous System*). U obrani od virusa WNV organizam mobilizira tri linije obrane: kožu i urođenu imunost u ranoj fazi infekcije, te stečenu, humoralnu i staničnu imunost u kasnijim fazama infekcije (Suthar i sur., 2013). U keratinocitima i dendritičkim stanicama epidermisa (Langerhansove stanice, LC) odvija se replikacija virusa ali i pokreće antivirusni imunološki odgovor. Na keratinocitima se nalaze brojni receptori za prepoznavanje patogena PRR, koji sudjeluju u prepoznavanju konzerviranih molekularnih obrazaca patogena PAMP. Nakon aktivacije PAMP-om, TLR i RIG-I receptori pokreću signalni put aktivacije imunološkog odgovora. Virus WNV prenosi se krvotokom i limfom do perifernih organa – slezene, jetre i bubrega, dok inficirane LC dolaze do limfnih čvorova i slezene, te se aktiviraju T-limfociti. Dendritičke stanice nakon infekcije izlučuju velike količine interferona tip I (IFN-

I) koji može suprimirati širenje virusa u ranoj fazi infekcije (Karim i sur., 2023). Aktivacija PRR pokreće sintezu upalnih čimbenika kako bi se suzbio virus, no kronična aktivacija ovih receptora može dovesti do upalnog oštećenja. Povećana sinteza proupalnih citokina dovodi do veće permeabilnosti moždano krvne barijere, BBB (BBB, eng. *Brain Blood Barrier*), te virus lakše ulazi u CNS (Wongchitrat i sur., 2024). Ulaz virusa WNV u CNS odvija se izravnom infekcijom endotelnih stanica moždano krvne barijere i mehanizmom „Trojanskog konja“ gdje virus u zaraženim leukocitima prolazi BBB i inficira neurone (Singh i sur., 2025).

Infekcija virusom WNV uzrokuje upalnu reakciju u keratinocitima, indukciju IFN-a tip I ili tip III, tj. IFN $\beta$ , IFN $\lambda$ 1, IL-29 i IFN $\lambda$ 2 (IL-28A) i sekreciju proinflammatoryh citokina TNF $\alpha$ , IL-6 i kemokina CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10 i CCL20 (Garcia i sur., 2018). Imunološki odgovor domaćina, kojim upravljaju citokini, ima ključnu ulogu u patogenezi virusa WNV i ishodu bolesti. Različiti citokinski profili koji ovise o spolu, zdravstvenom stanju i imunološkom genskom polimorfizmu, koreliraju s različitim ishodima infekcije. Korištenjem određenih biomarkera može se predvidjeti težina bolesti uzrokovane virusom WNV, a ishod infekcije virusom WNV ovisi ne samo o eliminaciji virusa, već i rasponu upalnog odgovora reguliranog citokinima (Hoffman i sur., 2019, R. Das i sur., 2016). Proupalni citokini uzrokuju upalu živčanog tkiva i time patološke promjene, kao što su stanična infiltracija, perivaskularno oticanje, skraćivanje neurona i nastajanje plakova na moždanom tkivu. Dolazi do narušavanja stanične funkcije neurona, promjena u metabolizmu i sintezi neurotransmitera, a posljedično do disfunkcije neurona i mozga (Wongchitrat i sur., 2024). Razine proupalnih citokina IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, CXCL10 i IL-6 mogu biti kronično povišene nakon preboljenja bolesti uzrokovane virusom WNV. To upućuje na mogućnost učinkovite terapije protiv WNV koja bi uključila protuupalne lijekove za liječenje pogoršanog upalnog odgovora za vrijeme akutne faze i sprječavanje dugotrajnih neuroloških posljedica, jer su nastali proupalni citokini povezani s neurološkim oštećenjima u nekolicini neurodegenerativnih bolesti (Benzarti i sur., 2023). Međutim, još nije poznato kako regulacija ovih proupalnih citokina može utjecati na tijek bolesti (Guzman-Martinez i sur., 2019).

Slina komaraca koja ulazi u kožu prilikom uboda, sadrži brojne proteine koji moduliraju hemostazu i imunološki odgovor domaćina, te olakšavaju hranjenje krvlju i prijenos virusa. Svi hematofagni kukci slinom unose u domaćina najmanje jedan vazodilatator, jedan inhibitor koagulacije i bar jedan inhibitor trombocita.



**Slika 21.** Patogeneza infekcije virusom WNV. (1) Prijenos virusa WNV slinom, tijekom hranjenja komarca *Culex sp.* krvlju domaćina, (2) imunomodulacija slinom komarca nakon infekcije keratinocita i Langerhansovih stanica, (3) migracija zaraženih stanica u okolne limfne čvorove, (4) viremija i migracija zaraženih makrofaga iz limfnih čvorova i (5) slezene iz koje se virus proširuje u druge organe, (preuzeto i modificirano iz: Habarugira i sur., 2020)

### 2.2.7. Dijagnostika infekcije virusom WNV

Sumnja na infekciju virusom WNV-a postavlja se kliničkim pregledom, temeljem simptoma koji uključuju akutnu vrućicu, mučninu, povraćanje, glavobolju, mišićnu bol, osip, oteklinu limfnih čvorova i bol u zglobovima. Bolest se potvrđuje laboratorijskim testovima.

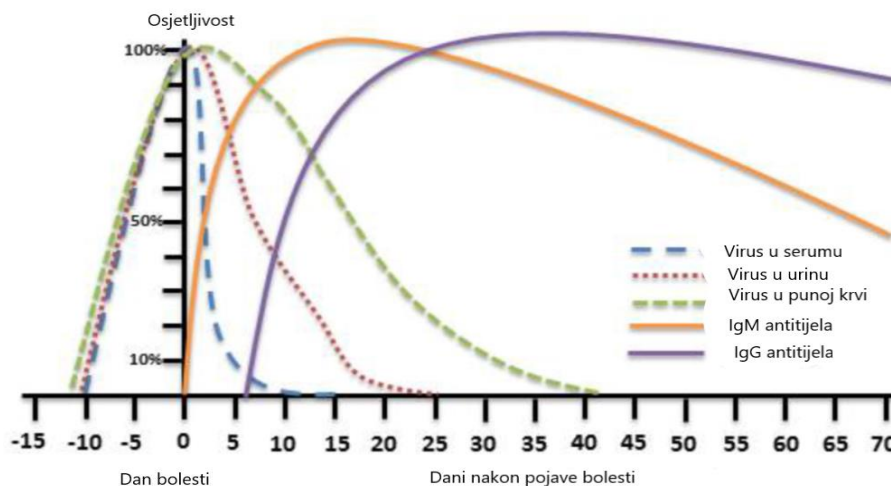
- Serološko dokazivanje antitijela anti-WNV

Određivanje antitijela IgM i IgG protiv virusa WNV serološkom metodom EIA najčešće je korištena dijagnostička metoda ove infekcije. Antitijela IgM javljaju se četiri dana, a antitijela IgG osam dana od pojave simptoma. No, s obzirom da se antitijela IgM mogu nalaziti u serumu bolesnika i do dvije godine od infekcije, te postojanje visoke razine križne reaktivnosti sa

ostalim flavivirusima, za dijagnostiku akutne infekcije potrebno je provesti i neutralizacijske testove (Tardei i sur., 2000; Lustig i sur., 2018).

- Molekularno dokazivanje virusne RNA

Prisustvo virusne RNA u uzorcima dobrovoljnih darivatelja krvi određuje se metodom TMA ili RT-PCR umnožavanjem određenog dijela virusnog genoma (najčešće konzervirane regije E gena). S obzirom da se u plazmi zdravih osoba virus WNV može naći u vrlo niskim koncentracijama kroz kratki period, ovi testovi imaju izrazito visoku osjetljivost i specifičnost. Virusna RNA može se otkriti u plazmi ili likvoru već dva do osam dana nakon infekcije, a postaje nedetektabilna 13 dana od infekcije. Klinički slučajevi infekcije virusom potvrđuju se RT-PCR metodom iz urina ili pune krvi, gdje virus može biti prisutan tjednima u visokoj koncentraciji. Utvrđeno je da se virus WNV zadržava u bubrežima i da se veže na eritrocite, pa se u urinu i punoj krvi može utvrditi mjesecima nakon infekcije (Lustig i sur., 2018).



**Slika 22.** Prikaz prisustva virusa WNV u tjelesnim tekućinama i imunološkog odgovora na virus WNV. Faze detekcije WNV RNA u serumu, urinu i punoj krvi, te IgM i IgG anti-WNV, prikazani su u odnosu na dan pojave simptoma (preuzeto i modificirano iz: Lustig i sur., 2018).

### 2.2.8. Terapija bolesti uzrokovane infekcijom virusa WNV

Većina infekcija virusom WNV su subkliničke ili uzrokuju blagu simptomatsku bolest bez neuroloških manifestacija. Kod malog broja bolesnika javljaju se različiti neurološki sindromi uz uobičajene prezentacije, koje su povezane s encefalitisom i aseptičkim meningitisom. Bolesnici mogu razviti klonulost mišića, često i onih potrebnih za disanje, kao posljedicu mijelitisa i infekcije motoričkih neurona leđne moždine. Može se razviti optički neuritis i

različiti poremećaji kretanja, cerebelarni sindromi i drugi neurološki problemi povezani s infekcijom virusom WNV (Jackson, 2004). Terapija infekcije virusom WNV uglavnom je potporna jer ne postoje specifični antivirusni lijekovi potvrđene učinkovitosti. Za ribavirin kao potencijalni nespecifični lijek literaturni podatci navode kako inhibira replikaciju virusa WNV u neuronskim staničnim kulturama, međutim navedeno je i neuspjelo liječenje skupine bolesnika ribavirinom kojima se bolest pogoršala nakon terapije (Chowers i sur., 2001). Za imunoterapiju postoje izvješća o slučajevima terapije imunoglobulinima i poboljšanju neuroloških simptoma liječenih bolesnika koji su preživjeli. Terapija neutralizirajućim antitijelima pokazala se učinkovitom, no potrebno je dalje istražiti do koje su mjere monoklonska antitijela s visokom neutralizirajućom aktivnošću pogodna za terapiju WNV infekcije (Seitz, 2013). Novija istraživanja navode kako bi nukleozidni analog favipiravir, koji je u Japanu licenciran kao lijek protiv gripe i u kliničkim je istraživanjima protiv Ebola virusa, mogao biti obećavajući antivirusni lijek protiv flavivirusnih infekcija. Istraživanja su pokazala kako favipiravir ima mutageno djelovanje na virus WNV, iako mehanizam nije objašnjen, te kako akumulirane mutacije rezultiraju nevjabilnim virusnim česticama, što ga čini potencijalnim antivirusnim kandidatom protiv virusa WNV (Escribano-Romero i sur., 2017). Značajan dio istraživanja učinkovitog pan-flavivirusnog lijeka trenutno je usmjeren ka identifikaciji i razvoju inhibitora NS3 proteaze flavivirusa (Teramoto i sur., 2023).

Trenutno postoji više licenciranih cjepiva protiv infekcije virusom WNV, koje uspješno kontroliraju virus WNV u populaciji konja, no ne postoji licencirano cjepivo za primjenu kod ljudi. Ulbert u svojem istraživanju iz 2019. godine zaključuje kako postoji nekoliko kandidata za učinkovito cjepivo, u kojih su glavne komponente kojima se postiže zaštitni imunološki odgovor, antitijela protiv proteina E virusa WNV i koja su učinkovita protiv L1 i L2 genotipa virusa WNV. Do sada su provedena istraživanja s DNA cjepivom, kimeričnim flavivirusima s osnovom cjepiva protiv virusa žute groznice, oslabljenim Dengue virusom (DENV), rekombinantnim E-proteinom razvijenim u stanicama kukaca i cjelovitim inaktiviranim virusom (Ulbert, 2019). Ni za jedno od ispitivanih WNV cjepiva nije zabilježena štetna pojava ili sigurnosne poteškoće koje bi utjecale na daljnja klinička ispitivanja. Kako se najteži oblici bolesti uzrokovani virusom WNV javljaju u imuno kompromitiranih i starijih osoba, ciljna populacija za cjepivo su osobe s narušenim ili starijim imunološkim sustavom, što je s obzirom na imunogenost i sigurnost, izazov za istraživače cjepiva. U ovih osoba možda bi trebala biti primjenjena veća doza antigena kako bi se postigao imunološki odgovor, ali s druge strane u imunološkom sustavu sa smanjenom funkcionalnošću T-staničnog odgovora upitna je sposobnost restrikcije replikacije vektora ili oslabljenog virusa. Istraživanjima na starijim

životinjama i kliničkim ispitivanjem skupina ljudi starijih od 50 godina utvrđena je visoka imunogenost i dobro podnošenje cjepiva (Pierce i sur., 2017). Zasadu nijedna studija cjepiva nije napredovala dalje od II faze kliničkog ispitivanja i ne postoji kandidatsko cjepivo koje bi bilo blizu licenciranja. Razlozi su vjerojatno višestruki, a uključuju znanstvene izazove u postizanju zaštitne imunosti, sigurnosne razloge, poteškoće u dizajnu kliničkih studija i ekonomske zahtjeve (Ulbert, 2019).

### **2.2.9. Virus WNV u transfuziji krvi**

Prvi prijenos virusa WNV transfuzijom krvi zabilježen je 2002. godine u SAD, kada su prijavljene 23 infekcije prenesene transfuzijom krvi, od 16 dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) (Lyle R. Petersen, 2019). Od tada virus WNV predstavlja rizik za sigurnost transfuzijskog liječenja jer WNV-om zaraženi DDK, koji nemaju simptome infekcije mogu darovati krv i prenijeti virus, koji kod primatelja transfuzije može dovesti do teške bolesti (Domanović i sur., 2019). Kako bi se umanjila opasnost prijenosa virusa WNV-a transfuzijom krvi, Europska komisija je 2004. godine implementirala 28-dnevnu odgodu darivanja krvi za darivatelje koji dolaze iz regija u kojima je registrirana infekcija virusom WNV, osim ako ne postoji ID-NAT probir - Direktiva 2004/33/EC (The European Parliament and the Council of the European Union, 2004). Zemlje članice EU svake godine odlučuju o stupanju na snagu 28-dnevnog odgađanja darivanja krvi za davatelje krvi koji dolaze iz područja s aktivnim slučajevima infekcije virusom WNV ili pokretanju probira krvi WNV NAT testiranjem, kako bi se izbjegla nestašica krvi (Pisani i sur., 2016). Od 2007. godine infekcija virusom WNV u ljudi, obavezno se prijavljuje nadležnim tijelima (*Decision 2007/875/EC*), dok se podatci o WNV infekciji u životinja, što uključuje epidemije u konja i ptica, prijavljuju i obrađuju kroz sustav ADIS (ADIS, eng. *Animal Disease Information System*) pri Europskoj komisiji. Trenutno, direktiva 2004/33/EC definira zahvaćenu regiju jedino na osnovi humanih infekcija virusom WNV (Frank i sur., 2022). Redovno praćenje WNV infekcija u ljudi, započelo je u EU 2011. godine, a od 2014. godine ECDC objavljuje tjedna izvješća o praćenju infekcije virusom WNV. Nacionalne organizacije za javno zdravstvo zemalja članica EU/EEA prijavljuju slučajeve infekcije u sustav TESSy (TESSy eng. *The European Surveillance System*) na temelju kojih ECDC kreira tjedna izvješća.

### 2.2.10. Virus WNV i Usutu virus

Virus WNV i Usutu virus, USUV, genski i antigenski su vrlo slični. Imaju isti životni ciklus – cirkuliraju između ptica-komaraca-ptica, umnožavaju se u pticama, a komarci roda *Culex sp.* glavni su vektori koji virus mogu prenijeti na ljude i konje, ali i druge sisavce (Scaramozzino i sur., 2021). Virus WNV i USUV često dijele istu okolinu i često zajedno cirkuliraju u istim zemljopisnim područjima. Izravan prijenos USUV s čovjeka na čovjeka može se dogoditi transfuzijom krvi ili transplantacijom organa (Angeloni i sur., 2023).

Prema ICTV taksonomiji, USUV se naziva *Orthoflavivirus Usutuense*, pripada koljenu *Orthoflavivirus* i porodici *Flaviviridae* (ICTV, <https://ictv.global/taxonomy>, 6.8.2025.). Utvrđeno je da je USUV re-emergentni, neurotropni arbovirus, sferičnog je oblika, ima ovojnicu, a genom je jednolančanom +RNA, veličine oko 12 kb. U prirodi USUV je izoliran 1959. godine u području rijeke Usutu u Esvatiniju (prije Svazi). Retrospektivnom analizom ptičjeg tkiva utvrđeno je da se USUV u Europi prvi puta pojavio u Italiji 1996. godine, iako se 2001. godina smatra početkom prisustva i širenja USUV u Europi, kada je u Austriji uzrokovao ugibanje ptica. Od tada se stalno bilježi zemljopisna ekspanzija virusa USUV u Europi, a virus je do sada utvrđen ili su utvrđena antivirusna antitijela u većini europskih zemalja (Vilibić-Cavlek i sur., 2020). Filogenetskom analizom određeno je osam genotipova USUV: genotipovi Afrika 1, 2 i 3, te genotipovi Europa 1, 2, 3, 4 i 5, od kojih je Europa 2 najčešći genotip u Europi (Zecchin i sur., 2021). Patogeneza infekcije USUV kod ljudi još je nejasna i uglavnom prolazi bez simptoma ili uz blage simptome, koji uključuju blagu groznicu i osip. U manjem broju slučajeva, osobito u imuno kompromitiranih osoba, mogu se javiti neurološke komplikacije bolesti – meningitis, encefalitis, meningoencefalitis (Simonin, 2024). Većina asimptomatskih infekcija virusom USUV zabilježena je slučajno prilikom NAT probira DDK na virus WNV, s obzirom kako svi dostupni WNV-RNA NAT testovi pokazuju križnu reakciju s virusom USUV. Dokazano je da se USUV RNA nalazi u krvi, urinu i likvoru bolesnika s akutnom infekcijom. Dijagnoza i potvrda infekcije USUV postavlja se neutralizacijskim testovima s obzirom da postoji križna reaktivnost anti-USUV antitijela s ostalim srodnim flavivirusima, kao što je virus WNV (Angeloni i sur., 2023).

### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

##### **3.1.1. HEV**

U ovo istraživanje uključen je 8.631 dobrovoljni darivatelj krvi (DDK) oba spola, koji su darivali krv u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u periodu od prosinca 2021. do ožujka 2022. Svi DDK obuhvaćeni istraživanjem dali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Testiranje uzoraka periferne krvi DDK provedeno je u formatu ID-NAT, testom UltrioPlexE koji istovremeno otkriva virus HBV, HCV, HIV-1/-2 i HEV. HEV RNA inicijalno reaktivni (IR) uzorci u NAT testiranju, ponovno su testirani u duplikatu i ako je rezultat bio reaktivan, DDK je proglašen HEV NAT pozitivnim. Potvrda infekcije virusom HEV-a učinjena je metodom RT-PCR i određivanjem antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG metodom EIA. Napravljena je analiza serumskih jetrenih enzima aspartat-aminotransferaze (AST) i alanin-aminotransferaze (ALT).

Darivatelji krvi s utvrđenom infekcijom HEV RNA odgođeni su za daljnje darivanje krvi na period od šest mjeseci te su pozvani na ponovljeno testiranje nakon dva mjeseca. Tada im je ponovno određen titar HEV RNA metodom qRT-PCR i uzorci su testirani metodom ELISA (ELISA, eng. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) na prisustvo antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG.

Svi uzorci koji su uključeni u istraživanje kodirani su crtičnim kodom. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. U istraživanju je korištena periferna krv ispitanika, uzorkovana prilikom darivanja krvi, kao dodatni uzorak za laboratorijsko ispitivanje i probir darivatelja na krvlju prenosive bolesti. Za potrebe TMA testiranja uzeto je 10 ml periferne krvi u epruvetu s EDTA (EDTA Plasma Preparation Tubes, Becton Dickinson, SAD), u kojoj je centrifugiranjem tijekom 10 minuta na 2.500 okretaja/min odvojena plazma za testiranje. Svi uzorci ispitivani su unutar 24 sata od uzorkovanja. Svaka je epruveta označena crtičnim kodom koji odgovara pojedinom darivatelju krvi. Testiranje metodom RT-PCR, metodom ELISA, određivanje jetrenih enzima AST i ALT, te sekvenciranje po Sangeru provedeno je iz istih uzoraka prikupljenih za TMA metodu.

Svim sudionicima istraživanje uzeti su anamnestički podatci uključujući moguće probavne tegobe i prehrambene navike.

### **3.1.2. WNV**

U ovo istraživanje uključeno je 581.376 uzoraka periferne krvi DDK u periodu od kolovoza 2018. do listopada 2024. godine. Sve donacije krvi koje se prikupe u Republici Hrvatskoj u periodu od svibnja ili lipnja do listopada ili studenog, ovisno o odluci epidemiološke službe, testiraju se na prisutnost WNV RNA, u formatu pojedinačne donacije, tj. ID-NAT metodom. Svi inicijalno reaktivni NAT rezultati (IR) testirani su u duplikatu, a IR-NAT donacije krvi su odbačene. Ako je donacija u ponovljenom testiranju bila reaktivna (RR, eng. *Repeated Reactive*) darivatelj krvi je informiran, pozvan u savjetovalište HZTM-a, te su uzeti dodatni anamnestički podatci. Darivatelj krvi je odbijen za buduće darivanje krvi na period od 120 dana, a sve njegove/njezine prijašnje donacije unazad 120 dana, povučene su iz *pool*-a donacija primjenjivih za transfuziju.

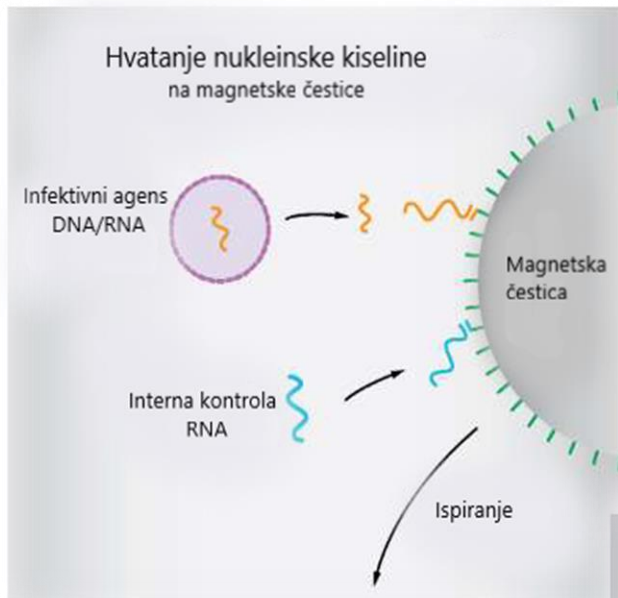
Periferna krv za potrebe TMA metode uzorkovana je u epruvetu s EDTA, u kojoj je odvojena plazma za testiranje. Svi uzorci analizirani su unutar 24 sata od uzorkovanja. Svaka je epruveta označena crtičnim kodom koji odgovara pojedinom darivatelju krvi i sadržavala je 10 mL periferne krvi. Uzorci za potrebe testiranja RT-PCR metodom i sekvenciranje po Sangeru dobiveni su iz istih uzoraka prikupljenih za TMA metodu.

## **3.2. Metode**

### **3.2.1. HEV**

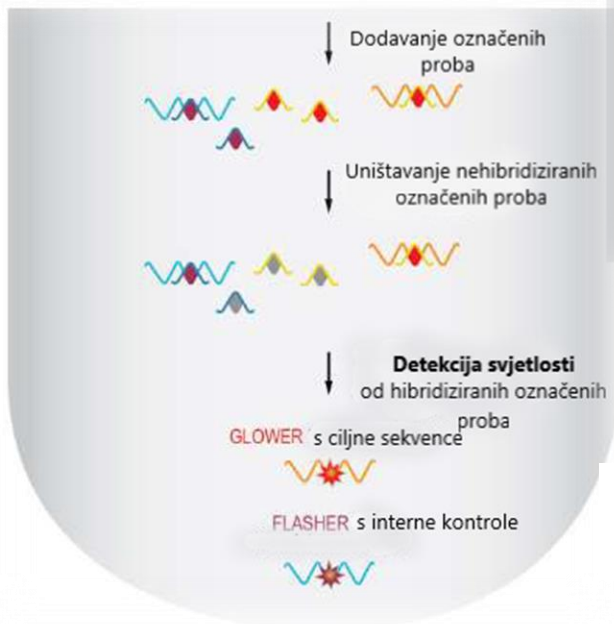
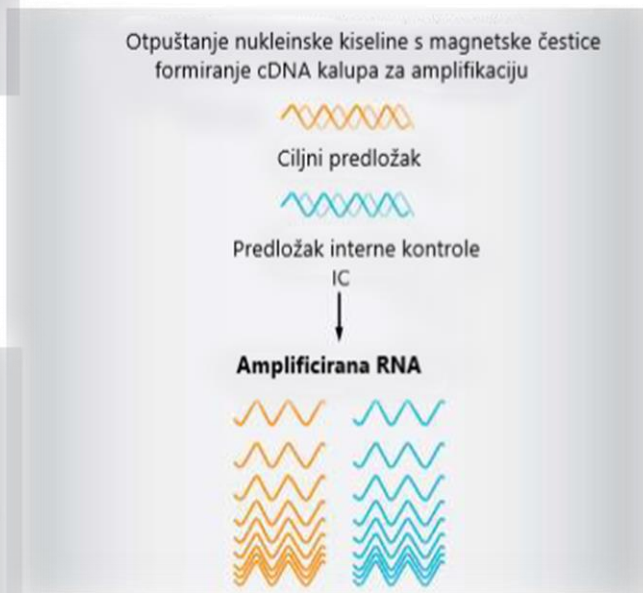
#### **3.2.1.1. Probir virusa HEV– metoda TMA**

Uzorci periferne krvi testirani su ID-NAT-om, probirnim TMA testnim paketom Procleix UltrioPlex E Assay (Diagnostic Grifols, Španjolska), za istovremenu detekciju virusa HBV, HCV, HIV-1, -2 i HEV. Osjetljivost testa, 95% LOD iznosi za HEV RNA 3,6 IU/mL, za HIV-1 RNA 38,2 IU/mL, za HIV-2 RNA 9,5 IU/mL, za HCV RNA 9,6 IU/mL i za HBV DNA 3,1 IU/mL. Testiranje je provedeno na uređajima Procleix Panther System (Diagnostic Grifols, Španjolska).



Hvatanje ciljne sekvencije

Umnožavanje ciljne sekvencije



Detekcija ciljne sekvencije

**Slika 23.** Metoda TMA (preuzeto i prilagođeno iz *Procleix Ultrio Elite Assay Course*, Diagnostic Grifols)

Virusna RNA/DNA izolirana je iz uzoraka metodom hvatanja ciljne sekvencije na magnetske čestice, dodatkom reagensa TCR (TCR, eng. *Target Capture Reagent*). Zatim je dodan deterdžent za denaturaciju proteina i otpuštanje virusne RNA/DNA. Oligonukleotidi za hvatanje (eng. *Capture oligonucleotides*) koji su homologni visoko konzerviranim regijama genoma virusa HIV, HCV, HBV i HEV hibridizirale su s ciljnim molekulama RNA ili DNA, ako su bile prisutne u uzorku. U svaki uzorak dodan je reagens za poboljšanje postizanja cilja, TER (TER eng. *Target Enhancer Reagent*) koji je uzrokovao prolazni alkalni šok, čime je poboljšano razaranje virusne čestice i denaturacija nukleinskih kiselina. Hibridizirane ciljne sekvencije uhvaćene su na magnetske mikročestice, koje su zatim izdvojene u magnetskom polju, a nepotrebne komponente iz uzorka uklonjene su ispiranjem. Ciljne sekvencije umnožene su amplifikacijom posredovanom transkripcijom (TMA), pri čemu su korišteni enzimi MMLV reverzna transkriptaza i T7 RNA polimeraza. Reverzna transkriptaza napravila je DNA kopiju ciljne sekvencije, koja je sadržavala promotorsku sekvenciju za T7 RNA polimerazu, koja je zatim producirala mnogostruke kopije RNA amplikona iz DNA predloška. Prisutnost ciljnih nukleinskih kiselina određena je metodom HPA (HPA, eng. *Hybridisation Protection Assay*) u kojoj su se komplementarne kemiluminiscentno obilježene jednolančane probe vezale za amplikone. Seleksijski reagens razlikovao je hibridizirane i nehibridizirane probe, koje su inaktivirane. U detekcijskom koraku kemiluminiscentni signal koji je potjecao od hibridiziranih proba izmjereno je luminometrom i iskazan u relativnim jedinicama svjetla, RLU (RLU, eng. *Relative Light Units*). Interna kontrola, IC (IC, eng. *Internal Control*) koja je bila sadržana u TCR reagensu, dodana je u svaki uzorak, u svrhu kontrole procesiranja uzorka, amplifikacije i detekcije. Signal IC i HEV-reakcijski signal razlikovan je u svakom uzorku od signala za HIV, HCV i HBV, na temelju diferencijalne kinetike emisijskog svjetla s proba koje su bile označene različitim kemiluminiscentnim oznakama. IC i HEV-specifični amplikoni detektirani su kao probe s brzom emisijom svjetla (eng. *flasher signal*). Amplikoni specifični za HIV, HCV i HBV detektirani su kao probe s relativno sporijom kinetikom emisije svjetla (eng. *glower signal*). Signal HEV amplikona razlikovan je od IC signala mjerenjem magnitude *flasher* signala. Prisustvo HEV amplikona karakterizirao je signal značajno veće vrijednosti. Procleix UltrioPlex E set reagens ne razlikuje pojedine signale za virus HIV, HCV i HBV. U tu se svrhu korišteni su diskriminatorni reagensi UltrioPlex E seta koji su specifični za pojedini genom virusa, kojima je utvrđeno je li uzorak reaktivan na HIV, HCV, HBV, ili bilo koju kombinaciju ova tri virusa.

Za procesnu kontrolu testa Procleix UltrioPlex E Assay korišten je komplet kalibratora koji se sastoji od negativnog kalibratora, koji su testirani u triplikatu, te pozitivnih kalibratora za HIV,

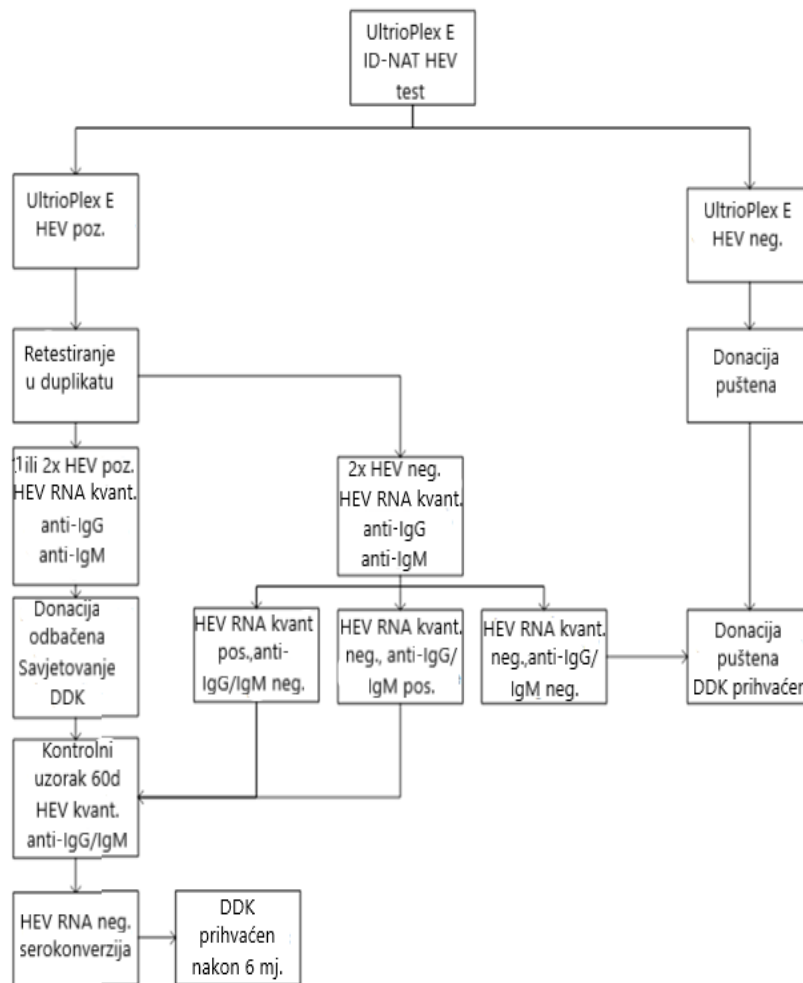
HCV, HBV i HEV koji su testirani u duplikatu. Analiza je prihvaćena kada je minimalan broj kalibratora bio valjan tj. kada su najmanje dva replikata negativnog kalibratora i najmanje jedan replikat od svakog pozitivnog kalibratora bili valjan, odnosno kada je najmanje sedam od jedanaest replikata kalibratora bilo valjano. Diskriminatorno testiranje virusa HIV, HCV i HBV prihvaćeno je kao valjano kada su najmanje dva replikata negativnog kalibratora i najmanje dva od tri replikata pozitivnih kalibratora bila valjana. Korišten je softver sustava Procleix Panther System kojim je automatski određena vrijednosti RLU kao kriterije prihvatljivosti kalibratora. U valjanom testu softverom su određene granične vrijednosti za IC (bljesak), HEV analit (bljesak) i HIV/HCV/HBV analite (sjaj). Rezultat uzorka bio je valjan ako je kemiluminiscentni signal bljeska bio jednak ili iznad granične vrijednosti za IC.

Određene su granične vrijednosti, tj. *cutoff* za svaki test, na osnovi dobivenih vrijednosti RLU za kalibratore - jedna za HIV/HCV/HBV signal (signal sjaja, HIV/HCV/HBV *cutoff*), jedna za HEV Signal (signal bljeska, HEV *cutoff*) i jedna za IC (signal bljeska, IC *cutoff*). Za svaki uzorak određena je vrijednost RLU za signal sjaja i vrijednost RLU za signal bljeska. Rezultat testa izražen je kao omjer RLU signala analita i granične vrijednosti:  $Signal/Cutoff$  (S/CO).

**Tablica 1.** Interpretacija rezultata kod primjene testa Procleix UltrioPlex E Assay i Procleix Panther sustava

Interpretacija testa	Kriteriji interpretacije testa za virus HEV	Kriteriji interpretacije testa za viruse HIV, HCV i HBV
<b>Nereaktivno</b>	Vrijednosti RLU nalazile su se unutar softverskih granica i HEV S/CO < 1,00 i RLU bljeska $\geq$ granična vrijednost interne kontrole	Vrijednosti RLU nalazile su se unutar softverskih granica i HIV/HCV/HBV S/CO < 1,00 i RLU bljeska $\geq$ granična vrijednost interne kontrole
<b>Reaktivno</b>	Vrijednosti RLU nalazile su se unutar softverskih granica i HEV S/CO $\geq$ 1,00	Vrijednosti RLU nalazile su se unutar softverskih granica i HIV/HCV/HBV S/CO $\geq$ 1,00
<b>Invalidno</b>	Vrijednosti RLU nalazile su se izvan softverskih granica ili HEV S/CO < 1,00 i RLU bljeska < granične vrijednosti interne kontrole	Vrijednosti RLU nalazile su se izvan softverskih granica ili HIV/HCV/HBV S/CO < 1,00 i RLU bljeska < granične vrijednosti interne kontrole

Uzorci koji su primjenom testa Procleix UltrioPlex E bili ID-NAT bili inicijalno reaktivni (IR), ponovno su testirani u duplikatu i ako su bili ponovljeno reaktivni (RR), uzorak je deklariran kao NAT pozitivan. U slučaju kada je uzorak bio HEV NAT bio pozitivan, infekcija virusom HEV potvrđena je upotrebom kvantitativnog RT-PCR testa RealStar HEV RT-PCR Kit 2.0 osjetljivosti 200 IU/mL (Altona Diagnostics, Njemačka). Serološkim testiranjem određena su antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG (Dia.Pro Diagnostic Bioprobes, Italija) i određene su vrijednosti serumske AST i ALT (Vitros Ortho, SAD). HEV RNA-pozitivne donacije su odbačene, a DDK su obaviješteni o postojanju infekcije virusom HEV. Prikupljeni su anamnestički podatci o eventualnim zdravstvenim poteškoćama, osobito probavnog sustava, te je zabilježena vrsta hrane koju su DDK konzumirali prije darivanja krvi. Naknadni uzorak periferne krvi, HEV pozitivnih DDK, uzet je dva mjeseca nakon inicijalnog, pozitivnog HEV RNA uzorka. Uzorci su ponovno testirani na HEV RNA, za što je korišten set RealStar HEV RT-PCR Kit 2.0. Određena su antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG primjenom testa Dia.Pro. Postavljenim algoritmom testiranja na virus HEV, odobrene su donacije krvi koje su u prvom NAT testiranju bile reaktivne – IR, a zatim su u ponovljenom testiranju bile nereaktivne NRR (NRR, eng. *Non-Repeated Reactive*), a rezultati serološkog testiranja i potvrdnog molekularnog testiranja (HEV RT-PCR) su bili negativni. DDK s infekcijom virusom HEV-a odgođeni su za darivanje krvi na šest mjeseci, nakon čega je provjerena negativnost na ispitivane viruse.



**Slika 24.** Algoritam testiranja uzoraka krvi DDK na virus HEV u HZTM-u (DDK – dobrovoljni darivatelj krvi)

U slučaju kada je uzorak bio HIV, HCV, HBV reaktivan, provedeno je diskriminatorno testiranje pomoću TMA metode. Korištene su HIV-specifične, HCV-specifične i HBV-specifične probe. Upotrebom proba specifičnih za HIV nije bilo moguće razlučiti eventualno pozitivne uzorke na HIV-1 i HIV-2.

### 3.2.1.2. Potvrda ID-NAT HEV-RNA reaktivnih uzoraka

Za određivanje titra virusa HEV-a u ID-NAT HEV RNA reaktivnim uzorcima korištena je kvantitativna metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, qRT-PCR. Za određivanje koncentracije virusa korišten je RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 testni paket analitičke osjetljivosti za HEV specifičnu RNA od 200 IU/mL (95% interval pouzdanosti (CI): 120 – 450 IU/mL). RealStar® HEV testni paket ne pokazuje križnu reaktivnost s nijednim

srodnim virusom ili drugim patogenom koji uzrokuje slične simptome HEV-u. Set sadrži internu kontrolu i kvantitativne standarde određenih koncentracija, kalibrirane prema 1. WHO Međunarodnom standardu za NAT testove za HEV RNA (PEI kod 6329/10). Uz pomoć standarda generirana je standardna krivulja na temelju koje je određena koncentracija virusa u uzorku nepoznatog titra. Titar virusa (eng. *viral load*) u originalnom uzorku određen je korištenjem formule:

$$\text{Titar virusa (IU/mL)} = \frac{\text{Volumen eluata (mL)} \times \text{koncentracija virusa u eluatu (IU/mL)}}{\text{Volumen uzorka (mL)}}$$

Linearni raspon RealStar® HEV testa iznosi 200 – 1x10<sup>10</sup> IU/mL. Reakcija je napravljena u tri faze: reverzna transkripcija RNA ciljne sekvencije i interne kontrole (IC) u cDNA, zatim je PCR metodom umnožena cDNA ciljne sekvencije i IC-a te su istovremeno detektirani PCR amplikoni obilježeni fluorescencijskim probama FAM i JOE. Set se sastojao od dva Master reagensa (Master A i Master B – koji sadrže PCR pufer, reverznu transkriptazu, DNA polimerazu, magnezijeve soli, početnice i probe), interne kontrole (IC), četiri kvantitativna standarda (QS1 - QS4) i vode čistoće za PCR.

**Tablica 2.** Prikaz sadržaja PCR smjese za test RealStar HEV

Reagens	Dodani volumen reagensa po reakciji
Master A	N x 5,0 µL
Master B	N x 20,0 µL
Ukupni volumen	N x 25,0 µL

Kratice: N – broj uzoraka

Korištena je „IC“ kao kontrola pripreme uzorka i kao inhibicijska kontrola, te je dodana u smjesu već u fazi ekstrakcije RNA. Dodano je 6 µL IC, tj. 10% volumena elucijskog pufera ili vode u kojem je eluirana RNA. Ukupni volumen reakcijske smjese po uzorku bio je 50 µL, a sastojao se od 25 µL PCR smjese i 25 µL uzorka ili standarda ili pozitivne/negativne kontrole.

**Tablica 3.** Kvantitativni standardi test paketa RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona Diagnostics, Njemačka)

Kvantitativni standard	Koncentracija [IU/ $\mu$ L]
QS1	1,00 x 10 <sup>4</sup>
QS2	1,00 x 10 <sup>3</sup>
QS3	1,00 x 10 <sup>2</sup>
QS4	1,00 x 10 <sup>1</sup>

Iz uzoraka periferne krvi izolirana je RNA na uređaju QIASymphony (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača. Smjesa za qRT-PCR reakciju pripremljena je prema uputama proizvođača, a za testiranje je korišten uređaj ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, SAD).

**Tablica 4.** Program RT-PCR umnožavanja na uređaju ABI Prism 7500

Reverzna transkripcija	55 °C / 20 min
Denaturacija	95 °C / 2 min
PCR amplifikacija (45 ciklusa)	95 °C / 15 sek
	55 °C / 45 sek
	72 °C / 15 sek

### 3.2.1.3. Određivanje genotipa virusa HEV – sekvenciranje po Sangeru

Određivanje genotipa provedeno je u tri uzorka krvi DDK. Ukupna virusna RNA izolirana je upotrebom uređaja EZ1 Advanced XL (Qiagen, Njemačka) i EZ1 Virus Mini Kit v2.0 (Qiagen, Njemačka) prema uputama proizvođača. Postupak izolacije i pročišćavanja RNA upotrebom EZ1 Virus mini testnog paketa zasniva se na tehnologiji magnetske filtracije u kombinaciji s „ChargeSwitch“ tehnologijom. Magnetskom filtracijom omogućeno je ispiranje magnetskih kuglica bez gubitaka, jer prijanjaju za stranice nastavaka za pipetiranje, dok se „ChargeSwitch“ tehnologija zasniva na promjeni površinskog naboja kuglice koji ovisi o pH pufera. Pri niskom pH pufera kuglice su bile pozitivno nabijene i vezale su negativno nabijene nukleinske kiseline. Nukleinske kiseline isprane su (eluirane) s magnetskih kuglica, što je postignuto neutralizacijom naboja magnetskih kuglice povišenjem pH na 8,5, upotrebom pufera za eluciju,

koji sadrži malu koncentraciju soli. Eluati 50  $\mu\text{L}$  izolirane RNA pohranjeni su na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do amplifikacije.

Za umnažanje konzerviranog ulomka unutar regije genoma ORF3 korišten je testni paket 1Step RT-qPCR Probe ROX L Kit (highQu, Njemačka) prema uputama proizvođača. Dodano je  $3\mu\text{L}$  RNA u ukupni volumen reakcijske smjese od  $20\text{ }\mu\text{L}$  (Tablica 5), (Jemeršić i sur., 2019). Korištena je TaqMan® proba JHEV-P koja je na 5'-kraju označena signalnom molekulom 6-karboksifluorescein (FAM) i na 3'-kraju prigušivačem, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (BioTez Berlin-Buch GmbH, Njemačka) (Tablica 6), (Jothikumar i sur., 2006). Programi umnožavanja na uređaju CFX96 Real-Time System (Bio Rad, SAD) opisani su u tablici 7.

**Tablica 5.** Priprema smjese PCR za umnažanje konzerviranog ulomka unutar regije genoma ORF3

Reagens	Dodani volumen reagensa po reakciji
Voda bez nukleaza	N x 3,0 $\mu\text{L}$
Mješavina početnice/proba	N x 2,0 $\mu\text{L}$
RT3 mješavina, 20x	N x 2,0 $\mu\text{L}$
1Step RT-PCR Mix 2x	N x 10,0 $\mu\text{L}$
Ukupni volumen	N x 17,0 $\mu\text{L}$

**Tablica 6.** Nazivi početnica i proba te njihov nukleotidni slijed, korištenih za umnažanje konzerviranog ulomka unutar genoma ORF3

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

**Tablica 7.** Program umnožavanja na uređaju CFX96 Real-Time System

Reverzna transkripcija	50 $^{\circ}\text{C}$ / 10 min
AktivacijaTaq inhibitora	95 $^{\circ}\text{C}$ / 2 min
PCR amplifikacija (45 ciklusa)	95 $^{\circ}\text{C}$ / 5 sek 60 $^{\circ}\text{C}$ / 1 min*

\*Prikupljanje fluorescencije (FAM) na kraju svakog ciklusa pri 60  $^{\circ}\text{C}$

Analizirane su Ct vrijednost za svaki uzorak posebno. Analiza je bila valjana ukoliko su pozitivne kontrole dale pozitivan rezultat u očekivanom rasponu, a negativne kontrole negativan rezultat. Uzorci koji su imali Ct vrijednost manju od 40 određeni su kao pozitivni na odsječak unutar ORF3 regije HEV. Uzorci koji su imali Ct vrijednost veću od 40 i linearnu amplifikacijsku krivulju, kao i uzorci koji nisu imali prikazanu Ct vrijednost, određeni su kao negativni na ulomak unutar ORF3 regije HEV.

Postojane metiltransferazne regije unutar ORF1 ulomka genoma (HEV-MeT) umnožene su nizom lančanih reakcija polimeraze uz prethodnu reverznu transkripciju. ORF1-početnice smještene su unutar metiltransferazne regije, koje pokrivaju 56. do 79. i 473. do 451., te 104. do 124. i 389. do 367. nukleotida (Van Der Poel i sur., 2001). Za ugniježdenu lančanu reakciju polimerazom (eng. *nested PCR*) korištena su dva para početnica: vanjski par početnica ORF1-S1 (homologna) i ORF1-A1 (komplementarna), te unutarnji par početnica ORF1-S2 (homologna) i ORF1-A2 (komplementarna). Izravnim PCR-om uz prethodnu reverznu transkripciju (RT-PCR) te korištenjem para početnica ORF1-S1/ORF1-A1, umnožen je ulomak veličine 418 parova baza (pb), upotrebom komercijalnog test paketa 1Step Rt PCR Kit. Reakcijskoj smjesi volumena 44  $\mu$ L (Tablica 1.) dodano je po 6  $\mu$ L RNA. Amplifikacije su provedene tijekom 40 ciklusa u uređaju *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD) prema optimiziranom protokolu: reverzne transkripcije na 45 °C tijekom 20 minuta; početne denaturacije na 95 °C u trajanju od 2 minute; denaturacije kalupa na 95 °C u trajanju od 10 sekundi; vezanja početnica na 50 °C u trajanju od 10 sekundi i produljivanja lanca na 72 °C u trajanju od 30 sekundi. Umnoženi ulomci od 488 pb analizirani su u 1,5% agaroznom gelu (40 minuta na 100 V) u puferu TAE (Tris-Acetat-EDTA), obojeni etidij-bromidom i vizualizirani pod UV-svjetlom. Ulomci nisu bili vidljivi pa su korišteni kao kalup za ugniježđeni PCR uz par početnica ORF1-S2/ORF1-A2 (Van Der Poel i sur., 2001), kojim je umnožen ulomak veličine 287 pb upotrebom komercijalnog testnog paketa ALLin Red Taq Mastermix, 2x (highQu, Njemačka). Reakcijskoj smjesi volumena 44  $\mu$ L dodano je po 6  $\mu$ L produkta izravnog RT-PCR-a, provedena je početna denaturacija na 95 °C u trajanju od 1 minute; a reakcija umnožavanja provedena je kroz 40 ciklusa prema sljedećem protokolu: denaturacija kalupa na 95 °C tijekom 15 sekundi; vezanje početnica na 50 °C u trajanju od 15 sekundi i produljivanja lanca na 72 °C u trajanju od 30 sekundi. Umnoženi fragmenti od 287 pb analizirani su u 1,5% agaroznom gelu (60 minuta na 70 V) napravljenom u puferu TAE (Tris-Acetat-EDTA) i obojeni etidij-bromidom. Nakon izlaska uzoraka iz jažica, napon je povećan na 90 V. Kao standard za određivanje veličine u parovima baza (bp) korišteno je 5  $\mu$ L

molekularnog biljega (*Take5 100bp DNA Ladder*, highQu, Njemačka). Rezultati su očitani pomoću UV-transiluminatora (Vilber Lourmat, Francuska).

Ekstrakcija i pročišćavanje ciljne DNA iz agaroznog gela provedeno je kod uzoraka u kojih se nakon ugniježđenog PCR-a pojavilo nespecifično umnožavanje, odnosno u kojih su nakon elektroforeze na agaroznom gelu osim ulomaka očekivane veličine, uočeni i nespecifični ulomci. Ciljna linija na gelu izrezana je i komadić gela stavljen je u prethodno izvagane epruvete volumena 1,5 mL, nakon čega je epruveta s gelom izvagana. Masa izrezanog komadića gela jednaka je razlici mase epruvete koja sadrži komadić gela i mase prazne epruvete. Prema masi izrezanog komadića gela određen je volumen otopine za vezivanje za membranu koji je potreban za otapanje (za 10 mg gela potrebno je 10  $\mu$ L otopine za vezivanje za membranu). Smjesa komadića gela i otopine za vezivanje za membranu izmiješana je na miješalici i inkubirana tijekom 10 minuta pri temperaturi od 50 °C do 65 °C. Otopljeni komadić gela nanesen je na silikatnu membranu kolone, s koje su nakon vezivanja kontaminanti isprani puferom za ispiranje, a umnoženi ciljni ulomak odstranjen je vodom. Postupak je proveden korištenjem testnog paketa reagensa *Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System* (Promega, SAD) u skladu s uputama proizvođača.

Za vezivanje umnoženog ulomka DNA za silikatnu membranu korištene su kolone koje su umetnute u sabirne epruvete za centrifugiranje od 2,0 mL. Otopina komadića gela nanesa je na kolonu, inkubirana jednu minutu pri sobnoj temperaturi, te centrifugirana jednu minutu na 17.063 g. Kolona za vrijeme centrifugiranja propušta tekući sadržaj u sabirnu epruvetu, a DNA se veže za membranu. Sabirna epruveta i filtrat odbačeni su, a kolona je uložena u novu sabirnu epruvetu. Silikatna membrana kolone isprana je sa 700  $\mu$ L otopine za ispiranje, zatim centrifugirana jednu minutu na 17.063 g, sabirna epruveta i filtrat su odbačeni, a kolona umetnuta u novu sabirnu epruvetu. Zatim je kolona isprana s 500  $\mu$ L otopine za ispiranje membrane, centrifugirana pet minuta na 17.063 g, sabirna epruveta i filtrat su odbačeni, a kolona umetnuta u novu sabirnu epruvetu. Silikatna membrana je posušena i pročišćena od ostataka tekućine centrifugiranjem jednu minutu na 17.063 g. DNA je eluirana premještanjem kolone u čistu 1,5 mL epruvetu uz dodatak 50  $\mu$ L sterilne, deionizirane vode izravno na silikatnu membranu. Sadržaj je inkubiran tijekom jedne minute na sobnoj temperaturi, zatim centrifugiran jednu minutu na 17.063 g. Kolona je bačena, a u filtratu je umnoženi ulomak DNA koji je pohranjen na -20°C. Izdvojena i pročišćena DNA ponovno je analizirana elektroforezom kako bi se utvrdila uspješnost postupka.

Pročišćeni PCR-produkti poslani su na sekvenciranje u servis za sekvenciranje (MacroGen, Seoul, Korea). Kako bi se utvrdio slijed nukleotida, dobiveni kromatogrami analizirani su

pomoću programa Sequencher 5.4.6 (<https://www.genecodes.com/>, Genes Codes Corporation, SAD).

Pri računalnim analizama dobivenih sekvencija korišteni su sljedeći programi i programski paketi:

- ClustalX, verzija 1.83 (Thompson i sur., 1997), za višestruko poravnavanje sekvencija (eng. *sequence alignment*) u svrhu pronalaska mjesta promjena/mutacija u istraživanim nukleotidnim sljedovima, te pripremu podataka za filogenetsku analizu.
- BioEdit, verzija 7.0.5.3 (Hall, 1999), za uređivanje poravnatih sekvencija.
- MEGA, verzija 5. (Tamura i sur., 2011), za filogenetske i molekularnoevolucijske analize primjenom različitih metoda i postupaka.
- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur., 1990), za pretraživanje baza podataka.

#### **3.2.1.4. Serološka analiza imunskog odgovora na antigene virusa HEV**

Analiza imunskog odgovora na antigene virusa HEV u perifernoj krvi darivatelja koji su utvrđeni reaktivni ID-NAT metodom i potvrđeni qRT-PCR metodom, učinjena je ELISA metoda, kojom su određena anti-HEV IgM i anti-HEV IgG antitijela. Korišten je testni paket HEV IgM i HEV IgG (Dia.Pro Srl, Italija) upotrebom uređaja Evolis (BioRad, SAD), prema uputama proizvođača. Mikrotitarske pločice s 96 jažica, obilježene od A1 do H12, obložene su specifičnim rekombinantnim antigenima koji predstavljaju konzervirane i imunodominantne epitope četiri dominantna HEV genotipa, HEV1 - HEV4.

Test HEV IgG izveden je na način da je jažica na poziciji A1 mikrotitarske pločice ostavljena prazna, kako bi se dobila vrijednost pozadinskog očitavanja. Negativna kontrola (NC) analizirana je u triplikatu, zatim je dodan kalibrator (ljudska antitijela na HEV čiji je sadržaj kalibriran prema 1. referentnom standardu Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) za HEV antitijela) te pozitivna kontrola (PC) koja je stavljena u jednu jažicu. U slijedeće jažice su dodani uzorci seruma DDK, koji su prethodno razrijeđeni otopinom za razrjeđivanje uzoraka, tako da je na 10  $\mu$ L uzorka dodano 200  $\mu$ L otopine za razrjeđivanje. Mikrotitarska pločica inkubirana je na 37°C, 45 minuta, a jažice su nakon toga isprane s otopinom za ispiranje. Zatim je u sve jažice, osim u praznu na poziciji A1, dodano kozje poliklonsko antitijelo na humani IgG, konjugirano enzimom peroksidaza iz hrena i pločica je inkubirana 45 minuta na 37°C. Jažice su nakon toga isprane s otopinom za ispiranje, dodana je otopina kromogen supstrata, koja sadrži TMB (tetra-

metil-benzidin) i  $H_2O_2$  (vodikov-peroksid) i provedena je inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta.

U testu HEV IgM je jažica A1 također ostavljena prazna, a zatim je dodan reagens za neutralizaciju (kozje antitijelo na humani IgG) u sve jažice u koje će se dodati uzorci seruma DDK. NC je dodana u dvije, PC u jednu jažicu, a razrijeđeni uzorci seruma DDK u ostale jažice (uzorci seruma DDK su razrijeđeni otopinom za razrjeđivanje, tako da je na 10  $\mu$ L uzorka dodano 1000  $\mu$ L otopine za razrjeđivanje). Mikrotitarska pločica inkubirana je na 37°C, 60 minuta, jažice su nakon toga isprane s otopinom za ispiranje. Zatim je u sve jažice, osim u praznu na poziciji A1, dodan enzim peroksidaza iz hrena koji je konjugiran sa sekundarnim antitijelom – kozjim poliklonskim antitijelom na humani IgM i pločica je inkubirana na 37°C, 60 minuta. Jažice su nakon toga isprane s otopinom za ispiranje, u sve jažice (uključujući i A1) je dodana otopina kromogen supstrata, koja sadrži boju TMB (tetra-metil-benzidin) i  $H_2O_2$  (vodikov-peroksid) i provedena je inkubacija na sobnoj temperaturi, 20 minuta. TMB djeluje kao donor vodika u redukciji  $H_2O_2$  u  $H_2O$  u prisustvu peroksidaze iz hrena, pri čemu nastaje plavo obojenje. Zatim je dodana sumporna kiselina kojom je zaustavljena daljnja enzimska reakcija, a jažice s PC i pozitivnim uzrocima poprimile su žutu boju. Intenzitet boje svake jažice je očitao integriranim spektrofotometrom pri valnoj duljini od 450 nm i izražen je kao optička gustoća (OD, eng. *Optical Density*) te je proporcionalna količini HEV IgG ili HEV IgM antitijela u uzorku. Kako bi se otklonile pozadinske smetnje, OD u svakoj jažici je izmjeren i pri valnoj duljini od 620 nm čija je vrijednost oduzeta od vrijednosti OD dobivene čitanjem s filterom od 450 nm. Kako bi se rezultati mogli prihvatiti bilo je potrebno zadovoljiti kriterije kontrole navedene u Tablici 8.

**Tablica 8.** Zahtjevi procesne kontrole za prihvaćanje rezultata testiranja s DiaPro ELISA testovima HEV IgG i HEV IgM

Parametar	Očitavanje OD450* nm	
	HEV IgG	HEV IgM
Prazna jažica	< 0,100	< 0,100
NC	< 0,050 (srednja vrijednost OD450 nm NC, nakon oduzimanja vrijednosti prazne jažice)	< 0,100 (srednja vrijednost OD450 nm NC, nakon oduzimanja vrijednosti prazne jažice)
PC	> 1,000	> 0,500

Kratice: NC–negativna kontrola, PC–pozitivna kontrola

\*OD450 – OD vrijednost pri valnoj duljini od 450 nm

Kako bi se mogli interpretirati rezultati određivanja anti-HEV IgG i IgM antitijela, određena je granična vrijednost testa (eng. *cut-off*), prema formuli:

$$\text{HEV IgG test, cutoff} = \text{NC}_{\text{srednja vrijednost OD450nm}} + 0,350$$

$$\text{HEV IgM test, cutoff} = \text{NC}_{\text{srednja vrijednost OD450nm}} + 0,250$$

Rezultati ispitivanih uzoraka određeni su kao S/CO tj. omjer vrijednosti optičke gustoće uzorka očitane pri 450 nm (OD450 nm) i *cut-off* vrijednosti testa, prema kriterijima prikazanim u Tablici 9.

**Tablica 9.** Interpretacija rezultata testa DiaPro ELISA, prema omjeru intenziteta svjetlosti uzorka i *cut-off* vrijednosti

Interpretacija rezultata	S/CO	
	HEV IgG	HEV IgM
Negativan	< 0,9	< 1,0
Indeterminantan (neodređen)	0,9 – 1,1	1,0 – 1,2
Pozitivan	> 1,1	> 1,2

Negativan rezultat ukazuje da ispitanik nije bio zaražen virusom HEV ili se nalazi u periodu dijagnostičkog prozora (WP, eng. *Window Period*), kada antitijela još nije moguće detektirati. Ispitanici koji pokazuju indeterminantan rezultat, moraju se ponovno testirati za jedan do dva tjedna, dok pozitivni rezultati ukazuju na trenutnu ili preboljenu infekciju virusom HEV. Analitička osjetljivost testova HEV IgG i HEV IgM određena je prema 1. SZO standardu (NIBSC 95/584) i za IgG iznosi oko 0,1 IU/mL, a za IgM iznosi oko 1 IU/mL.

### **3.2.1.5. Analiza aktivnosti enzima AST i ALT u perifernoj krvi**

Aktivnost jetrenih enzima pokazatelj je stanja i funkcije jetre. Provedena je analiza funkcije jetre kao posljedice prisustva virusa HEV određivanjem aktivnosti AST i ALT u perifernoj krvi. Korištena je Vitros AST i Vitros ALT Slide kolorimetrijska metoda upotrebom uređaja Vitros 250 (Ortho-Clinical Diagnostics, SAD), prema uputama proizvođača. Povišene vrijednosti AST i ALT u serumu povezane su s oštećenjem jetre, koje može biti uzrokovano virusnim hepatitisom.

Vitros AST Slide je višeslojni analitički element koji u gornjem sloju sadrži L-aspartat i  $\alpha$ -ketoglutarat, gdje AST iz uzorka uz prisustvo piridoksal-5-fosfata prenosi amino grupu s aspartata na  $\alpha$ -ketoglutarat pri čemu nastaje glutamat i oksaloacetat. Djelovanjem oksaloacetat dekarboksilaze u sljedećem sloju, iz oksaloacetata nastaje piruvat i CO<sub>2</sub>, a djelovanjem piruvat oksidaze, piruvat se oksidira u acetilfosfat i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. U završnoj reakciji djelovanjem peroksidaze oksidira se leuko boja i nastaje obojenje, čiji je intenzitet izmjeren refleksijskom spektrofotometrijom. Stopa promjene refleksijske gustoće proporcionalna je enzimskoj aktivnosti uzorka.

Vitros ALT Slide je višeslojni analitički element koji u gornjem sloju sadrži ALT supstrate L-alanin i  $\alpha$ -ketoglutarat. ALT katalizira prijenos amino grupe s L-alanina na  $\alpha$ -ketoglutarat u prisustvu piridoksal-5-fosfata te nastaje piruvat i glutamat. Djelovanjem piruvat oksidaze piruvat se oksidira u acetilfosfat i vodikov peroksid. U završnoj reakciji djelovanjem peroksidaze oksidira se leuko boja uz nastajanje obojenja, čiji se intenzitet mjeri refleksijskom spektrofotometrijom. Uzorci plazme iz periferne krvi, centrifugirani su na 1000 x g, 10 minuta, te su postavljeni u uređaj Vitros 250, koji u reakciju uzima 7  $\mu$ L uzorka.

U korištenim setovima Vitros AST Slide set i Vitros ALT Slide set navedene su normalne vrijednosti AST za muškarce od 17-59 U/L i za žene od 14-36 U/L (preuzeto s: <https://techdocs.quidelortho.com/117e1586-8cc4-4619-8f5d-010301270ae2> te ALT za

muškarce <50 U/L i za žene <35 U/L (preuzeto s: <https://techdocs.guidelortho.com/16cb16c8-4954-4c76-adda-7f1dd63ae4e2>).

### 3.2.1.6. Statistička analiza

Prevalencija virusa HEV u populaciji DDK izražena je u obliku postotnog iznosa s 95% intervalom pouzdanosti (CI, eng. *Confidence Interval*) na osnovi binomne distribucije.

## 3.2.2. WNV

### 3.2.2.1. Probir virusa WNV – metoda TMA

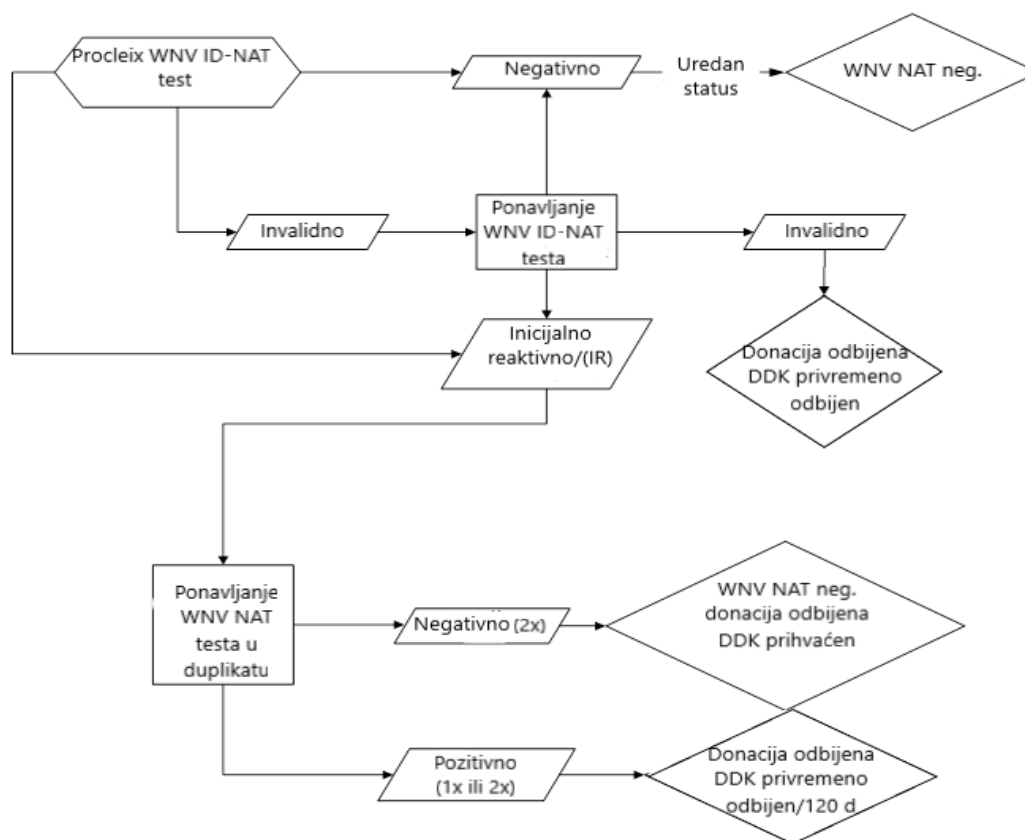
Uzorci periferne krvi testirani su u pojedinačnoj donaciji, ID-NAT, probirnim TMA testnim paketom Procleix WNV Assay (Diagnostic Grifols, Španjolska). Osjetljivost testa je 12,0 kopija/mL WNV RNA (95% LOD). Testiranje je provedeno na uređaju Procleix Panther (Diagnostic Grifols, Španjolska). Procleix WNV Assay detektira i USUV i ovim testom nije moguće razlikovati virus WNV od virusa USUV. Interna kontrola (IC) dodana je u svaki uzorak s TCR reagensom kao i za testiranje HEV-a TMA metodom što je opisano u odjeljku 3.2.1.1.. Signal IC razlučen je od WNV signala diferencijalnom kinetikom emisije svjetla s proba obilježenih različitim kemiluminiscentnim oznakama. Amplikon specifičan za IC detektiran je kao proba s brzom emisijom svjetla (eng. *“flasher signal”*), a amplikon specifičan za WNV detektiran je kao proba s relativno sporijom kinetikom emisije svjetla (eng. *“glower signal”*). Za procesnu kontrolu Procleix WNV Assay testa korišten je komplet kalibratora koji se sastojao od negativnog i pozitivnog WNV kalibratora, koji su testirani u triplikatu. Kako bi testiranje bilo valjano potrebno je da četiri od šest replikata kalibratora budu valjani, odnosno barem dva od tri replikata negativnog kalibratora i dva od tri replikata pozitivnog kalibratora. Korišten je softver sustava Procleix Panther System koji automatski potvrđuje kriterije prihvatljivosti kalibratora, a granične vrijednosti automatski su izračunate za IC (bljesak) i analit (sjaj). Negativni kalibrator (NC) testiran je u triplikatu i svaki pojedinačni replikat negativnog kalibratora morao je imati vrijednost IC veću ili jednaku 75.000 RLU i manju ili jednaku 400.000 RLU. Svaki pojedinačni replikat negativnog kalibratora morao je imati vrijednost analita manju ili jednaku 40.000 RLU i veću ili jednaku 0 RLU. Pozitivni kalibrator analiziran je u triplikatu u testu Procleix WNV Assay. Vrijednosti analita pozitivnog kalibratora (PC) moraju biti manje od ili jednake 2.700.000 RLU i veće ili jednake 400.000 RLU. Vrijednosti IC ne smiju biti veće od 750.000 RLU. Sve izračune vrijednosti RLU signala provedene su

pomoću softvera sustava Procleix Panther. Za svaki test utvrđene su dvije granične vrijednosti: jedna za signal analita (signal sjaja) koja se naziva granična vrijednost analita i jedna za signal interne kontrole (signal bljeska) koja se naziva granična vrijednost interne kontrole. Za svaki uzorak određena je vrijednost RLU signala analita i vrijednost RLU signala IC. RLU signala analita podijeljen s graničnom vrijednošću analita izražen je kao omjer signala analita i granične vrijednosti S/CO. Uzorak je određen kao nereaktivan ako je signal analita bio manji od granične vrijednosti analita (tj. S/CO analita < 1,00) i signal IC veći ili jednak graničnoj vrijednosti interne kontrole (IC *cutoff*), ali manji ili jednak 750 000 RLU. Uzorak je određen kao reaktivan ako je signal analita bio veći ili jednak graničnoj vrijednosti analita (tj., S/CO analita ≥ 1,00) i signal IC manji ili jednak 750.000 RLU. Reaktivni rezultati utvrđeni su primjenom softvera. Uzorak je određen kao invalidan (nevažeci) ako je signal analita bio manji od granične vrijednosti analita (tj. S/CO analita < 1,00) i signal IC manji od granične vrijednosti interne kontrole. Svaki uzorak s vrijednostima interne kontrole većim od 750.000 RLU smatran je invalidnim i reaktivni status nije se mogao procijeniti.

**Tablica 10.** Interpretacija rezultata kod primjene testa WNV Procleix Assay i Procleix Panther sustava

Interpretacija rezultata	Kriteriji
Nereaktivno	S/CO analita < 1,00 i IC ≥ granične vrijednosti IC i IC ≤ 750.000 RLU
Reaktivno	S/CO analita ≥ 1,00 i IC ≤ 750.000 RLU
Nevažeci/Invalidno	IC >750.000 RLU ili S/CO analita < 1,00 i IC < granične vrijednosti

Uzorci koji su primjenom testa Procleix WNV ID-NAT bili inicijalno reaktivni (IR), ponovno su testirani u duplikatu i ako su opet bili reaktivni (RR), uzorak je proglašen WNV NAT pozitivnim, donacija je odbačena, a darivatelj krvi u narednih 120 dana nije mogao darivati krv. U slučaju kada ponovljeno testiranje IR uzorka u duplikatu nije dalo reaktivni rezultata (NRR) donacija krvi je uništena, uzorak je deklariran kao WNV negativan, a dobrovoljni darivatelj krvi mogao je nadalje darivati krv. Za potvrdu infekcije virusom WNV-a korišten je test RT-PCR RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 set (Altona Diagnostics, Njemačka). Algoritam testiranje uzoraka periferne krvi na virus WNV prikazan je na slici 25.



**Slika 25.** Algoritam testiranja uzoraka krvi DDK na virus WNV u HZTM-u (DDK – dobrovoljni darivatelj krvi), autor Ivana Babić, iz radne upute RU-OMD-051-NAT testiranje DDK Procleix WNV testom na uređaju Panther.

### 3.2.2.2. Potvrda ID-NAT WNV RNA reaktivnih uzoraka

Za potvrdu prisutnosti WNV RNA u ID-NAT WNV reaktivnim uzorcima korištena je metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu, RT-PCR, približne osjetljivosti. Korišten je testni paket reagensa RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0 set (Altona Diagnostics, Njemačka) kvalitativni test analitičke osjetljivosti za WNV specifičnu RNA od 258 kopija/mL (95% CI: 150 - 599 kopija/mL). Test detektira L1 i L2 WNV i nema križne reakcije sa USUV. Iz uzoraka periferne krvi DDK izolirana je RNA na uređaju QIASymphony, prema uputama proizvođača. Smjesa za RT-PCR reakciju pripremljena je prema uputama proizvođača, a za testiranje je

korišten uređaj ABI Prism 7500. Rezultati su interpretirani kao WNV RNA pozitivni ili negativni uz valjane rezultate umnožavanja interne kontrole i navedenu analitičku osjetljivost.

### 3.2.2.3. Određivanje genotipa virusa WNV – sekvenciranje po Sangeru

- Umnožavanje odsječka unutar genske sekvencije NS5

Virusna RNA izolirana je iz uzoraka plazme koji su korišteni za ID-NAT probir, primjenom uređaja EZ1 Advanced XL i EZ1 Virus Mini Kit v2.0 seta prema uputama proizvođača. Umnožena je visoko konzervirana regija WNV genoma unutar NS5 genske sekvencije, korištenjem univerzalnog para početnica WNV-449-F i WNV-449-R čime je dobiven amplikon od 449 pb (Weissenböck i sur., 2002). Za RT-PCR i PCR korišten je uređaj Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD) uz upotrebu 1-Step RT-PCR seta (highQu, Njemačka). Amplikoni od 449 pb nisu bili vidljivi u 1,5% agaroznom gelu, pa su korišteni kao kalupi za reamplifikaciju s identičnim početnicama WNV-449-F/WNV-449-R, uz set ALLin Red Taq Mastermix, 2x (highQu). Na ponovljenoj elektroforezi u 1,5% agaroznom gelu, PCR produkti su izrezani i pročišćeni korištenjem Wizard® SV Gel i PCR Clean-Up System (Promega, USA), a nespecifični amplikoni su uklonjeni. Pročišćena cDNA eluirana je u 50 µL sterilne, deionizirane vode i sekvencirana je metodom po Sangeru u servisu za sekvenciranje MacroGen. Kako bi se utvrdio slijed nukleotida, dobiveni kromatogrami analizirani su pomoću programa Sequencher 5.4.6 (<http://www.genecodes.com>, Genes Codes Corporation, SAD). Analizom rezultata sekvenciranja utvrđeno je kako se postupkom reamplifikacije nije umnožila ciljna sekvencija virusa WNV, te nisu dobivene upotrebljive sekvencije genoma.

- Odabir početnica za umnožavanje odsječka unutar genske sekvencije prM/M

S obzirom kako nije uspjelo umnažanje odsječka unutar NS5 genske regije, primijenjene su specifične početnice za WNV L2. Početnice su odabrane prema objavljenim podacima u radu Diagne i sur. (2023). Kako bi se utvrdilo s kojim se početnicama mogu dobiti najbolji PCR produkti koji su u najvećem postotku podudarni s referentnim sekvencijama WNV L2, umnožen je molekularni standarda *WHO IRR for West Nile Virus Lineage-2 (WNV-L2) RNA, NIBSC code 18/208 WNV*. Korišteno je 35 parova početnica specifičnih za WNV L2 genom (Diagne i sur., 2023) (Tablica 11). Otopljeni WHO standard razrijeđen je s NHP (NHP, eng. *Non Human Primate*) plazmom (BioQC, Nizozemska) na koncentraciju 10<sup>5</sup> IU/mL. Za izolaciju RNA iz razrijeđenog WHO standarda, početnog volumena 400 µL, korišten je QIAamp MinElute virus Spin Kit, (Qiagen, Njemačka), a RNA je eluirana u 50 µL AWE pufera iz seta za izolaciju. Priređena je PCR smjesa za 35 parova početnica koncentracije 10 µM, s

izolatom standarda ( $10^5$  IU/mL) uz primjenu seta OneStep PCR (Canvax, Španjolska). PCR je proveden primjenom uređaja Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

**Tablica 11.** Uzvodne i nizvodne početnice korištene za umnažanje standarda *WHO IRR for West Nile Virus Lineage-2 (WNV-L2) RNA*, NIBSC code 18/208 WNV. Početnice obilježene s L označavaju nizvodnu, a početnice obilježene s R označavaju uzvodnu početnicu, te su obje napisane u smjeru 5'-3'. Parovi početnica označeni su brojevima od 1 do 35.

Naziv početnice	Početnice korištene za 1. PCR
WNV-L2_1_L	GCCTGTGTGAGCTGACAAACTT
WNV-L2_1_R	TTCTTTTGTTTTGTGCTCCGGC
WNV-L2_2_L	ACAGCGATGAAGCATCTCTTGA
WNV-L2_2_R	GBCGDGTYTTDGTGCATCTYCC
WNV-L2_3_L	GTSYTRGCTGCTGGAAATGAYC
WNV-L2_3_R	CMACCCATGTAGCTCCAGAYAC
WNV-L2_4_L	ATNCTATTGCTCCTGGTRGCA
WNV-L2_4_R	TCCADCCAGTTGCTTTGGTKGW
WNV-L2_5_L	GTRGACAGRGGATGGGGAAAYG
WNV-L2_5_R	GRTTCCTCCAHHGYGGTGCTT
WNV-L2_6_L	CCTTCCTGGTYCACCGAGARTG
WNV-L2_6_R	KGAVGAAATGGGCACYTTRCAR
WNV-L2_7_L	GCDTTYAAATTCGCYGGGACTC
WNV-L2_7_R	GTGTATRGCTTTCCCYACYGAG
WNV-L2_8_L	ACTCAGAGGAGCTCAACGACTC
WNV-L2_8_R	ATTYTTGCTAGGCCTTGTGGHG
WNV-L2_9_L	CGGTGYGGAAGTGGAGTGTTYA
WNV-L2_9_R	TRYTRTTCCATGCTCGGTTSR
WNV-L2_10_L	YGCDCAGARCTAGCTAACAAAYA
WNV-L2_10_R	CCCTGGYCTCCTGTTRTGRTTGC
WNV-L2_11_L	CACHYTGTGGGGTGATGGAGTT
WNV-L2_11_R	CAGAAGGCCCAACTGAAAAGGA
WNV-L2_12_L	GAYGAAAAGACCCTCGTGCA
WNV-L2_12_R	CCATTTGRAAGAAAGCAGCTGCR

WNV-L2_13_L	CAGTCTTTCTGGTGGCTTCBTT
WNV-L2_13_R	YCCAGCKGCAAGTATCATBGGA
WNV-L2_14_L	MRGTTGGAAGCYTCATCAARGARA
WNV-L2_14_R	TGAAAATTTCCATCRTCATCCARCC
WNV-L2_15_L	GGACRGCTGAYATYACYTGGGA
WNV-L2_15_R	RCTCATGAGAGCRGCTCCCTTR
WNV-L2_16_L	ATHATGACTCGAGGTCTGCTYG
WNV-L2_16_R	MRCCATTDGGCATGATGACKCC
WNV-L2_17_L	RGACTATCCCACYGGAACRTCA
WNV-L2_17_R	TGGCACATGACATCAACGATYT
WNV-L2_18_L	TKAGAGGACTTCCCATYCGGTA
WNV-L2_18_R	TTBCCCATTTTCACACTTGGAAACR
WNV-L2_19_L	ACMGAGCCTGGAACACTGGVTA
WNV-L2_19_R	CCTCCATAGCAATACTCATCACCA
WNV-L2_20_L	TGATGGAAGAGTCATCCTGGGV
WNV-L2_20_R	GTGTTGGTTCGAGGTCCATCAA
WNV-L2_21_L	CWGTCTGGCTCGCTTACAAAGT
WNV-L2_21_R	ARGCTATTGTCTGAAGGGCRTC
WNV-L2_22_L	TTKGACACGATGTATGTGGTKG
WNV-L2_22_R	CAYTCTGGTCTTGTCCAGCCA
WNV-L2_23_L	YCAGCTYGCCGTGTTTTTGATY
WNV-L2_23_R	CYGCAGTCACAGTCACAGTCAG
WNV-L2_24_L	YTTTGTVGACGTTGGTGTGTCA
WNV-L2_24_R	TYGTTGCRTTCCCACTGARCT
WNV-L2_25_L	ARRACTGTCAGAGAGGCYGGAA
WNV-L2_25_R	GCCTTTCCACTAACCACCGYAR
WNV-L2_26_L	RHGCCAGGAGAGAGGGAAAYRT
WNV-L2_26_R	CCARTCTTCCACCATCTCCARR
WNV-L2_27_L	CACACTGCTCTGTGACATTGGA
WNV-L2_27_R	AGAATTGAGGAGAGGCTTCCCY
WNV-L2_28_L	AAGAAAACVTGGAAGGGACCCY
WNV-L2_28_R	TBGTGGTCTCATTGAGGACGTR
WNV-L2_29_L	CTCCTTTTCGGHCAACAACGRGT

WNV-L2_29_R	CYCCBAGCCACATGAACCADAT
WNV-L2_30_L	ACYTGCATCTACAACATGATGGG
WNV-L2_30_R	GGBCTCATCACTTTCACGACYT
WNV-L2_31_L	CDAAGGTBCTTGARCTGCTDGR
WNV-L2_31_R	GGACCTTTGACATGGCATTBAGR
WNV-L2_32_L	GGHGATGACTGYGTGGTDAA
WNV-L2_32_R	GRACCCAGTTVACAGGCACA
WNV-L2_33_L	GCAGATGTGGCTGYTGCTTTAT
WNV-L2_33_R	YRTCCTTCATACCTCCTCARDGA
WNV-L2_34_L	GCGCHACTTGGGCTGAAAAYAT
WNV-L2_34_R	MYCTTCCGAGACGGTTCTGA
WNV-L2_35_L	GGAAGTTGAGTAGACGGTGCTG
WNV-L2_35_R	TCCCAGGTGTCAATATGCTGTT

Kratice baza prema IUPAC-u (eng. *International Union of Pure and Applied Chemistry*):

R - A ili G; Y – C ili T; S – C ili G; W – A ili T; K – G ili T; M – A ili C; B – C, G ili T;

D – A, G ili T; H – A, C ili T; V – A, C ili G; N – A, T, C ili G

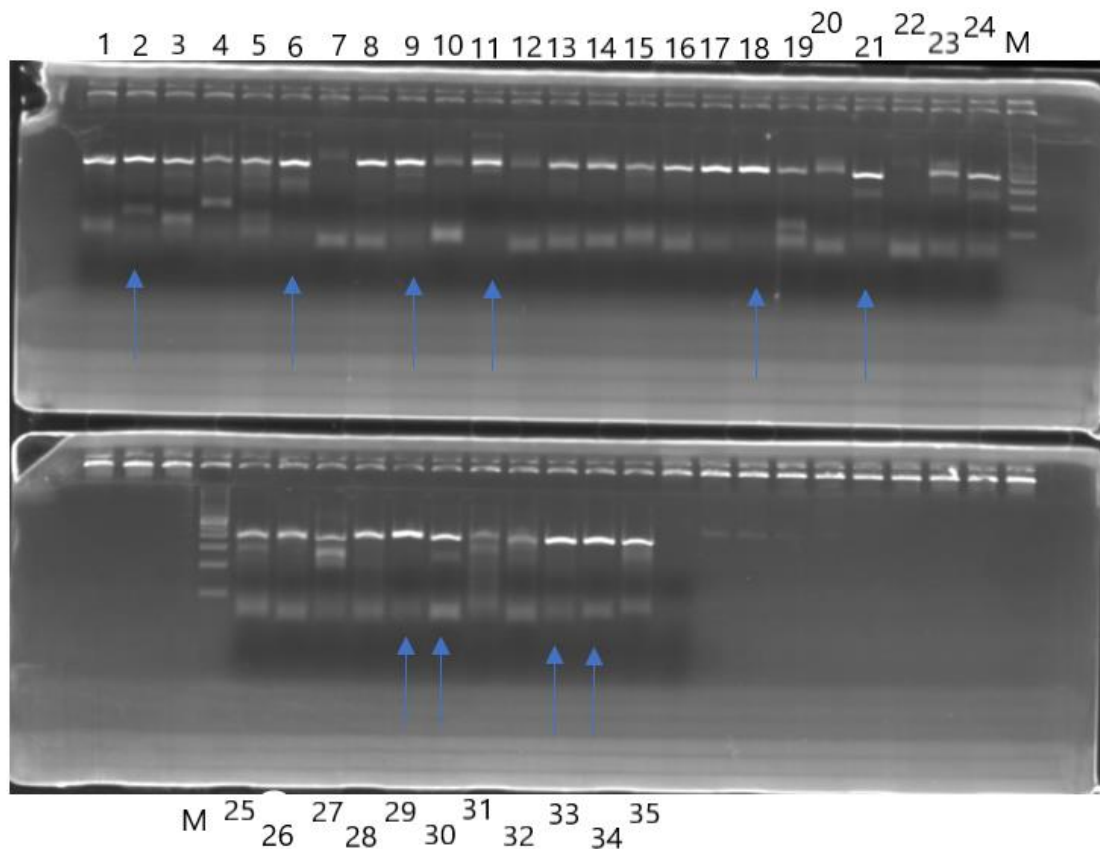
**Tablica 12.** Priprema smjese PCR za umnažanje standarda *WHO IRR for West Nile Virus Lineage-2 (WNV-L2) RNA, NIBSC code 18/208 WNV* primjenom seta reagensa One Step PCR (Canvax, Španjolska)

Smjesa za One Step PCR	Ukupni volumen smjese 50 µL
One-Step PCR Mix (2x)	25 µL
RT mix	2,5 µL
Nizvodna početnica (10 µM)	2 µL
Uzvodna početnica (10 µM)	2 µL
RNA izolat	18,5 µL

**Tablica 13.** Uvjeti PCR-a za umnažanje standarda *WHO IRR for West Nile Virus Lineage-2 (WNV-L2) RNA, NIBSC code 18/208 WNV* i prvog PCR-a

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Reverzna transkripcija	42°C	30 min	1
Inicijalna aktivacija	95°C	3 min	1
Denaturacija	95°C	15 s	40
Vežanje početnica	55°C	30 s	
Elongacija	72°C	30 s	
Završna elongacija	72°C	7 min	1

Prije Sangerovog sekvenciranja amplicona dobivenih umnažanjem standarda WNV-L2 s 35 parova početnica specifičnih za WNV L2, provedena je gel elektroforeza. PCR produkti prikazani su na gelu u koji je dodan molekularni biljeg veličine podjele 100 pb (Slika 26). Za pripremu gela korištena je agarozna i sterilan TE pufer. Kod nanošenja uzoraka korišteno je 8 µL biljega odnosno 8 µL PCR produkata, s 2 µL boje za nanošenje. Elektroforeza je provedena na 60 V u trajanju od 60 minuta. Za sekvenciranje su odabrani PCR produkti koji su na gelu dali vidljive fragmente, a to su bili PCR produkti za koje su korištene kombinacije početnica WNV-L2\_2\_L/R, WNV-L2\_6\_L/R, WNV-L2\_9\_L/R, WNV-L2\_11\_L/R, WNV-L2\_18\_L/R, WNV-L2\_21\_L/R, WNV-L2\_29\_L/R, WNV-L2\_30\_L/R, WNV-L2\_33\_L/R i WNV-L2\_34\_L/R. Kako su bendovi PCR produkata na gelu bili jasni, priprema PCR produkata za sekvenciranje provedena je primjenom seta reagensa Canvax-Clean-Easy PCR&Gel Purification Kit (Canvax, Španjolska), prema uputama proizvođača. Pročišćeni uzorci cDNA eluirani su u 50 µL sterilne, deionizirane vode i sekvencirani su Sangerovim sekvenciranjem u servisu za sekvenciranje MacroGen. Analizom dobivenih sekvencija primjenom BLAST algoritma, na mrežnoj stranici *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, utvrđeno je kako je par početnica WNV-L2\_2\_L i WNV-L2\_2\_R imao najveću podudarnost s referentnom sekvencijom genoma WNV L2, te su te početnice odabrane za umnažanje uzoraka DDK (Tablica 14).



**Slika 26.** Prikaz gela s PCR produktima WNV-L2 standarda umnoženih s 35 para početnica specifičnih za WNV L2 genotip. Plavim strelicama označeni su PCR produkti koji su odabrani za Sangerovo sekvenciranje

- Umnožavanje i Sangerovo sekvenciranje dijela genske sekvencije prM/M uzoraka DDK

Korištenjem para početnica WNV-L2\_2\_L i WNV-L2\_2\_R umnožen je dio genoma WNV unutar genske sekvencije prM/M čime je dobiven amplikon od 400 pb. Od 15 WNV pozitivnih DDK, za jednog DDK nije bila raspoloživa dovoljna količina uzorka za analizu, te je iz uzoraka plazme 14 WNV pozitivnih DDK izolirana RNA primjenom seta QIAmp MinElute virus Spin kit. Početni volumen plazme bio je 400  $\mu$ L, a RNA je eluirana u 50  $\mu$ L AWE pufera iz seta za izolaciju. Pripremljena je PCR smjesa za primjenu uz set MIX One Step PCR (Tablica 15). Uvjeti PCR-a za umnažanje specifičnih sekvencija WNV L2 korištenjem para početnica WNV-L2\_2\_L i WNV-L2\_2\_R bili su istovjetni uvjetima PCR-a pri umnažanju standarda *WHO WNV-L2* (Tablica 13). Za PCR je korišten uređaj Applied Biosystems 2720. Nakon provedene elektroforeze nije utvrđeno postojanje PCR produkata, te se pristupilo izvođenju ugniježđenog PCR-a.

**Tablica 14.** Početnice korištene za umnažanje sekvencije genoma WNV iz uzoraka plazme 14 DDK pozitivnih na virus WNV

Naziv početnice	Početnice korištene za prvi PCR
WNV-L2_2_L	5'- ACAGCGATGAAGCATCTCTTGA-3'
WNV-L2_2_R	5'- GBCGDGTYTTDGTGCATCTYCC-3'

**Tablica 15.** Priprema PCR smjese za umnažanje uzoraka DDK pozitivnih na WNV, primjenom para početnica WNV-L2\_2\_L i WNV-L2\_2\_R primjenom seta reagensa One Step PCR (Canvax).

Smjesa za One Step PCR	Ukupni volumen smjese 50 $\mu$ L
One-Step PCR Mix (2x)	25 $\mu$ L
RT mix	2,5 $\mu$ L
Početnica WNV-L2_2_L (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Početnica WNV-L2_2_R (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
RNA izolat	18,5 $\mu$ L

Za potrebe ugnježdjenog PCR-a pripremljene su početnice WNV-L2\_2L\_N i WNV-L2\_2R\_N (Tablica 16) i pripremljena je PCR smjesa za ugnježdenu PCR reakciju primjenom DNA Taq polimeraze (5 U/ $\mu$ L), dNTP-a i PCR Mix-a (Invitrogen, SAD) (Tablica 17.). Uvjeti ugnježdjenog PCR-a prikazani su u Tablici 18. a korišten je uređaj Applied Biosystems 2720.

**Tablica 16.** Početnice korištene pri ugnježđenom PCR-u za umnažanje sekvencije dobivene u 1. PCR-u korištenjem specifičnih početnica WNV-L2\_2\_L i WNV-L2\_2\_R.

Naziv početnice	Početnice korištene za 1. PCR	Koordinate početnica
WNV-L2_2R_N	5'- ACAGCGGGCTTTACTATCTTGC-3'	321-345
WNV-L2_2L_N	5'- ATTTCCAGCAGCTAGGACCGGA-3'	700-721

**Tablica 17.** Priprema PCR smjese za ugnježđeni PCR, primjenom para početnica WNV-L2\_2L\_N i WNV-L2\_2R\_N primjenom reagensa DNA Taq polimeraze, dNTP i PCR Mix (Invitrogen, SAD)

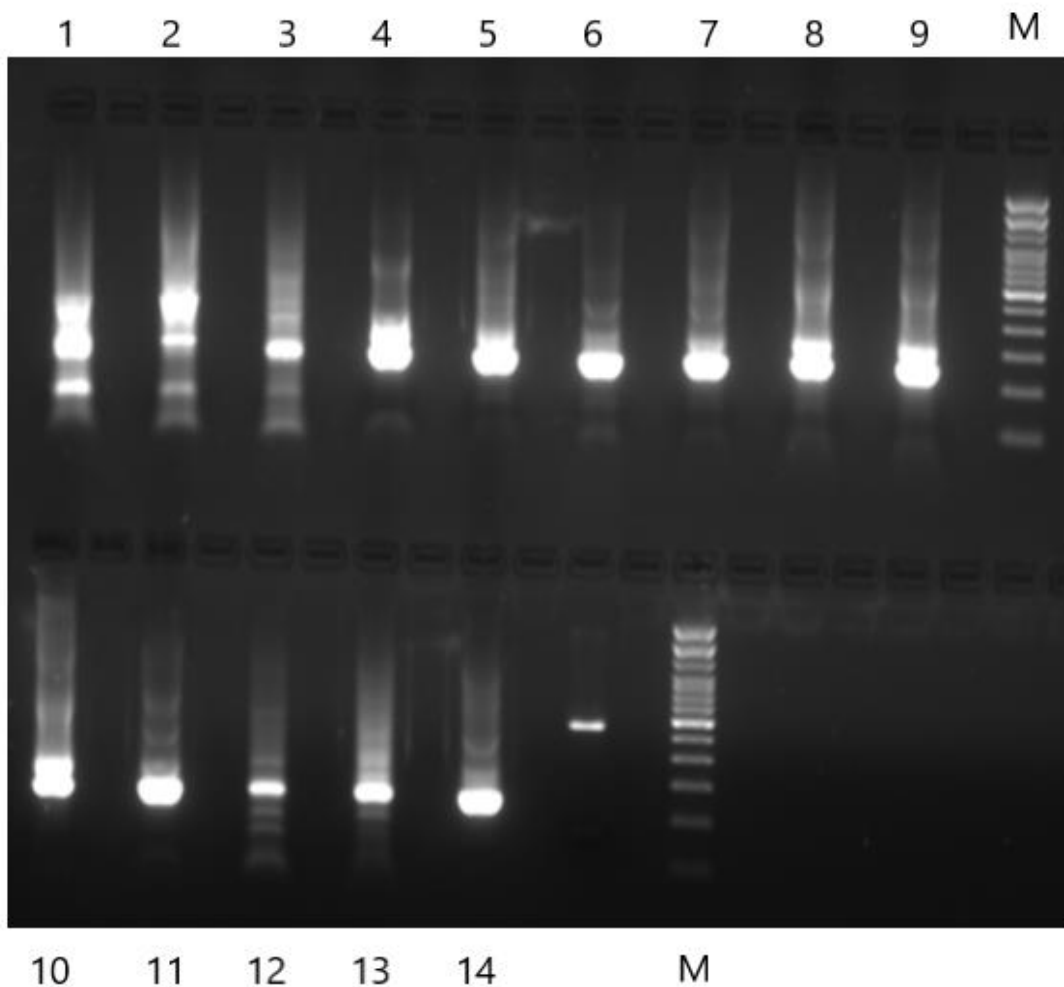
Smjesa za ugnježđenu PCR reakciju	Ukupni volumen reakcijske smjese 50 $\mu$ L
10 x PCR Mix (+Mg <sup>2+</sup> )	5 $\mu$ L
dNTP (10 mM)	4 $\mu$ L
Nizvodna početnica (WNV-L2_2L-N) (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
Uzvodna početnica (WNV-L2_2R_N) (10 $\mu$ M)	2 $\mu$ L
DNA Taq polimeraza	0,2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	26,8 $\mu$ L
Prvi PCR produkt	10 $\mu$ L

**Tablica 18.** Uvjeti ugnježđenog PCR-a za umnažanje produkata prvog PCR-a uzoraka plazme WNV pozitivnih DDK

Korak	Temperatura	Vrijeme	Broj ciklusa
Preddenaturacija	95°C	3 min	1
Denaturacija	95°C	15 s	40
Vežanje početnica	55°C	30 s	
Elongacija	72°C	30 s	
Završna elongacija	72°C	5 min	1

Provedena je gel elektroforeza. Produkti ugnježđenog PCR-a uzoraka plazme 14 DDK pozitivnih na virus WNV prikazani su na gelu u koji je dodan biljeg veličine podjela 100 pb (Slika 27). Za pripremu gela korištena je agarozna i sterilan TE pufer. Kod nanošenja uzoraka korišteno je 8  $\mu$ L biljega ili 8  $\mu$ L produkata PCR, s 2  $\mu$ L boje za nanošenje. Elektroforeza je provedena na 60 V u trajanju od 60 minuta. Uzorci koji su bili vidljivi na gelu korišteni su za sekvenciranje. Za pripremu produkata ugnježđenog PCR-a za Sangerovo sekvenciranje, korišten je set reagensa CANVAX-Clean-Easy PCR&Gel Purification Kit (Canvax Reagents, Španjolska), prema uputama proizvođača. Sekvenciranje je provedeno u servisu za sekvenciranje MacroGen. Kako bi se utvrdio slijed nukleotida, dobiveni kromatogrami analizirani su pomoću programa UGene 53.0 (<https://ugene.net/>, Unipro, Rusija). Za računalnu analizu dobivenih sekvencija korišteni su sljedeći programi:

- ClustalX, verzija 1.83 (Thompson i sur., 1997), za višestruko poravnavanje sekvencija u svrhu pronalaska mjesta promjena/mutacija u istraživanim nukleotidnim sljedovima, te pripremu podataka za filogenetsku analizu.
- BioEdit, verzija 7.0.5.3, za uređivanje poravnatih sekvencija.
- MEGA, verzija 5., za filogenetske i molekularnoevolucijske analize primjenom različitih metoda i postupaka.
- BLAST, za pretraživanje baza podataka.



**Slika 27.** Prikaz gela s produktima ugnježđenog PCR-a za 14 uzoraka plazme WNV pozitivnih DDK, primjenom para početnica WNV-L2\_2L\_N i WNV-L2\_2R\_N. Korišten je biljeg veličine podjele 100 pb, koji je označen s M.

#### **3.2.2.4. Statistička analiza**

Prevalencija virusa WNV u populaciji DDK izražena je u obliku postotnog iznosa s 95% intervalom pouzdanosti na osnovi binomne distribucije.

## 4. Rezultati

### 4.1. Rezultati HEV

#### 4.1.1. Probir DDK na viruse HEV, HBV, HCV i HIV-1/-2

U periodu od prosinca 2021. do ožujka 2022., testiran je 8.631 uzorak periferne krvi DDK, koji su sakupljeni kao redovni uzorci za testiranje krvlju prenosivih bolesti ID-NAT metodom, na viruse HBV, HCV i HIV.

Testiranjem pomoću testa UltrioPlex E utvrđena su četiri HEV RNA pozitivna uzorka, tj. 0,046% (95% CI 0,018%-0,191%) donacija je bilo pozitivno, što odgovara prevalenciji od jedne HEV-RNA pozitivne donacije na 2.158 donacija. Također je utvrđen jedan HBV DNA pozitivan uzorak, odnosno 0,012% (95% CI 0,0065-0,00205) donacija je bilo HBV DNA pozitivno, što odgovara prevalenciji od jedne HBV DNA pozitivne donacije na 8.631 donaciju. Nije utvrđen nijedan DDK pozitivan na HCV RNA i HIV-1/-2 RNA.

**Tablica 19.** Rezultati testiranja virusa HEV testom UltrioPlex E – četiri inicijalno reaktivna (IR) uzorka DDK, koji su u ponovljenom testiranju potvrđeni pozitivni na virus HEV (kratice: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; IR – inicijalno reaktivno; S/CO – signal/granična vrijednost (eng. *cutoff*))

DDK	UltrioPlex E HEV IR (S/CO)	UltrioPlex E HEV testiranje u duplikatu (S/CO)
1	3,97	3,58 3,53
2	3,75	3,58 3,45
3	2,68	2,47 0,25
4	3,46	3,59 3,35

**Tablica 20.** Rezultati testiranja testom UltrioPlex E – jedan inicijalno reaktivni (IR) uzorka DDK na signal virusa HBV, HCV i HIV, koji je u ponovljenom testiranju i diskriminacijskom testiranju UltrioPlex E testom potvrđen pozitivan na virus HBV (kratice: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; IR – inicijalno reaktivno; S/CO – signal/granična vrijednost (eng. *cutoff*)).

DDK	UltrioPlex E HBV, HCV, HIV IR (S/CO)	UltrioPlex E HBV, HCV, HIV u triplikatu (S/CO)	UltrioPlex E diskriminacijsko testiranje
11	6,91	7,12	HBV poz.
		6,62	HCV neg.
		7,00	HIV neg.

#### 4.1.2. Potvrda infekcije virusom HEV i određivanje titra virusa

Potvrda infekcije virusom HEV provedena je testiranjem četiri uzorka koja su u ponovljenom probirnom testu bila reaktivna. Za potvrdu HEV RNA korišten je kvantitativni qRT-PCR testni paket RealStar HEV RT-PCR Kit 2.0. Rezultati testiranja pokazali su prisustvo HEV RNA u tri uzorka, kojima je određen titar, tj. koncentracija virusa, koja se kretala od 32 IU/mL do više od  $4 \times 10^3$  IU/mL. Jedan uzorak bio je negativan u qRT-PCR testu. Rezultati su prikazani u Tablici 21.

#### 4.1.3. Imunosni odgovor ispitanika na infekciju virusom HEV

Imunosni odgovor ispitanika s infekcijom virusom HEV procijenjen je analizom prisustva antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG u perifernoj krvi. Rezultati su pokazali kako kod tri ispitanika nije utvrđena prisutnost antitijela, dok je kod jednog ispitanika utvrđeno postojanje i antitijela anti-HEV IgG i antitijela anti-HEV IgM. Rezultati su prikazani u Tablici 21.

#### 4.1.4. Aktivnosti enzima AST i ALT u perifernoj krvi DDK

Analiza koncentracije jetrenih enzima učinjena je primjenom kolorimetrijske „*micro-slide*“ metode. U jednom uzorku periferne krvi dobrovoljnog darivatelja krvi utvrđena je blago povišena vrijednost ALT koja je iznosila 43 U/L (U/L, eng. *unit/litre*).

**Tablica 21.** Rezultati testiranja koncentracije HEV RNA izraženi u IU/mL, anti-IgM i anti-IgG antitijela, te enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u U/L. (kratice: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; M – muški spol; Ž – ženski spol; S/CO – signal/granična vrijednost; IU/mL – internacionalna jedinica po mililitru, U/L – jedinica po litri)

DDK	Spol	UltrioPlex E HEV IR (S/CO)	HEV IgG	HEV IgM	HEV RNA (IU/mL)	AST <sup>†</sup> (U/L)	ALT <sup>‡</sup> (U/L)
1	Ž	3,97	neg	neg	1,15 x 10 <sup>3</sup>	28	43 ↑
2	M	3,75	neg	neg	4,73 x 10 <sup>3</sup>	26	23
3	M	2,68	poz	poz	neg	25	20
4	M	3,46	neg	neg	32	34	31

<sup>†</sup> Vitros AST Slide set; referentne vrijednosti: M 17-59 U/L; Ž 14-36 U/L (preuzeto s: <https://techdocs.guidelortho.com/117e1586-8cc4-4619-8f5d-010301270ae2>)

<sup>‡</sup> Vitros ALT Slide set; referentne vrijednosti: M < 50 U/L; Ž <35 U/L (preuzeto s: <https://techdocs.guidelortho.com/16cb16c8-4954-4c76-adda-7f1dd63ae4e2>)

#### 4.1.5. Analiza imunosnog odgovora i koncentracija virusa u naknadnom uzorku periferne krvi DDK

Naknadni uzorak periferne krvi, DDK koji su bili pozitivni na virus HEV, sakupljen je 60 dana nakon početnog testiranja UltrioPlex E testom. Provedeno je određivanje HEV RNA, antitijela anti- HEV IgM i antitijela anti-HEV IgG upotrebom testova RealStar HEV RT-PCR Kit 2.0 i HEV IgM i HEV-IgG Dia.Pro. Sva četiri uzorka dala su negativan rezultat kvantitativnog HEV RNA testa, a serološkim testiranjem utvrđena je serokonverzija i postojanje antitijela IgG u svim uzorcima. U jednom uzorku utvrđeno je kako antitijela anti-HEV IgM i dalje postoje u plazmi (Tablica 22). Kod tog darivatelja krvi, antitijela anti-HEV IgG utvrđena su već u inicijalnom uzorku, što upućuje na zaključak kako je serokonverzija bila prisutna već u probiru DDK. Nijedan darivatelj krvi nije razvio simptome infekcije nakon 60 dana od detekcije virusa HEV.

**Tablica 22.** Rezultati testiranja koncentracije HEV RNA izraženi u IU/mL te antitijela anti-IgM i antitijela anti-IgG, u naknadnom uzorku periferne krvi, uzetom 60 dana nakon detekcije virusa HEV metodom probira (kratice: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; IU/ml – internacionalna jedinica po mililitru)

DDK	HEV RNA (IU/mL)	Anti-HEV IgG	Anti-HEV IgM
1	Nije utvrđena	Pozitivno	Negativno
2	Nije utvrđena	Pozitivno	Negativno
3	Nije utvrđena	Pozitivno	Pozitivno
4	Nije utvrđena	Pozitivno	Negativno

Od četiri HEV pozitivna DDK, tri su bila muškog i jedna ženskog spola. Medijan starosti je bio 39 godina, a raspon dobi se kretao od 20 do 42 godine. Darivatelji krvi prilikom darivanja krvi nisu prijavili nikakve zdravstvene poteškoće i njihova prehrana uključivala je svinjetinu ili uglavnom svinjetinu. Tri DDK imala su prebivalište u Zapadnoj Europi – Belgija i Slovenija, Irska i Njemačka, a dali su krv za vrijeme posjete Hrvatskoj. Dvoje DDK prijavilo je prolazne probavne probleme, koje su povezali s konzumacijom vode iz vodovoda.

**Tablica 23.** Osobni podatci davatelja krvi pozitivnih na HEV (kratica: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; M – muški spol; Ž – ženski spol)

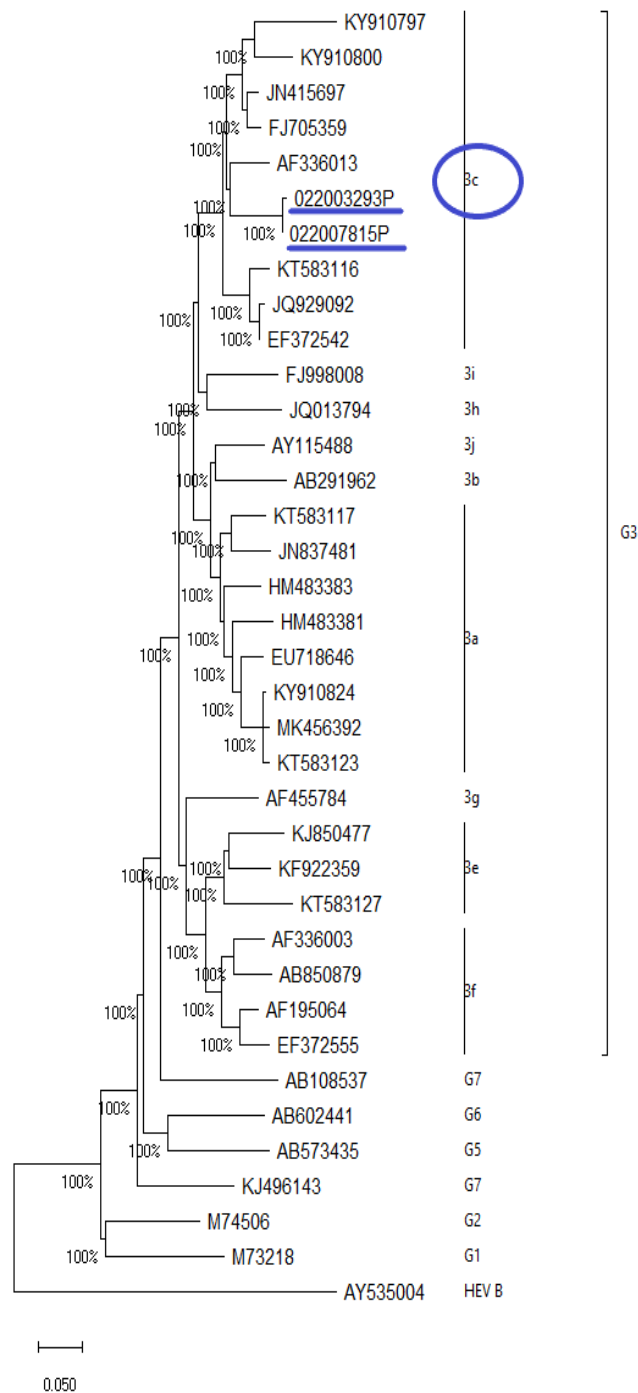
DDK	Spol	Dob (godina)	Adresa	Prebivalište	Prehrana	Osobitosti
1	Ž	20	Zagreb	Njemačka	i svinjetina	„čudan okus vode“, proljev
2	M	38	Čazma	Slovenija i Belgija	pretežito svinjetina	Još uvijek IgM poz (5/2022)
3	M	40	Zagreb	Irska	i svinjetina	„loša voda“
4	M	42	Karlovac	Karlovac	pretežito svinjetina	0

#### 4.1.6. Genotip virusa HEV

Genotip virusa HEV utvrđen je u dva uzorka, koji su označeni kao izolati 022003293P i 022007815P. Filogenetsko stablo izrađeno je metodom povezivanja susjeda (eng. *neighbour-joining*) uz primjenu modela Kimura-2-parameter. U analizu su bile uključene sekvencije referentnih izolata opisanih u literaturi (Smith i sur., 2016), te srodne sekvencije iz Republike Hrvatske i susjednih zemalja, koje su pronađene pomoću algoritma BLAST. Usporedbom pretraženog ulomka genoma virusa HEV s referentnima sekvencijama, utvrđeno je kako analizirani uzorci pripadaju filogenetskoj skupini 3c (slika 28).

Izolati 022003293P i 022007815P pokazali su najveću sličnost s izolatom iz humanog seruma, KY910800, koji je opisan u literaturi (Jemeršić i sur., 2019), od kojeg se razlikuju u 32, odnosno 31 nukleotidu unutar 245 pb nukleotidne regije. Usporedbom s izolatima domaćih svinja iz Republike Hrvatske, za izolate 022003293P i 022007815P utvrđena je sličnost s izolatom domaće svinje, KT583116, koji je opisan u literaturi 2013. godine (Jemeršić i sur., 2019), od kojeg se razlikuju u 24, odnosno 23 nukleotida unutar 245 nukleotidne regije.

Usporedbom s izolatima iz susjednih zemalja, izolati 022003293P i 022007815P pokazali su sličnost s izolatima domaćih svinja podrijetlom iz Nizozemske (Acc. No. EF372542 i AF336013) od kojih se razlikuju u 24, odnosno 23 nukleotida unutar 245 pb nukleotidne regije, te s izolatom domaće svinje podrijetlom iz Njemačke (Acc. No. JN415697) od kojeg se razlikuju u 21, odnosno 20 nukleotida unutar 245 pb nukleotidne regije. Izolati domaćih svinja iz Nizozemske i Njemačke upisani su bazu GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF372542](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EF372542), [www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF336013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF336013) i [www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415697](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN415697)).



**Slika 28.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom odsječka gena HEV-Met. Analiza je provedena metodom povezivanja susjeda (eng. *neighbour joining*) uz primjenu modela Kimura-2 Parameter. Sekvencije analiziranih uzoraka prikazane su podebljanim oznakama. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja (*bootstrap*) u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetsku udaljenost ( $d=0,05$ ). Filogenetske skupine definirane su prema literaturnim podacima (Smith i sur., 2016), korištenjem BLAST algoritma, a navedene su desno od Acc. No.

## 4.2. Rezultati WNV

### 4.2.1. Probir DDK na virus WNV

U periodu od kolovoza 2018. do listopada 2024., testirano je 581.376 uzoraka periferne krvi DDK iz cijele Hrvatske. Upotrebom testa Procleix WNV Assay, u ID-NAT formatu utvrđeno je 15 WNV pozitivnih uzoraka, tj. 0,0026% (95% CI – 0,0016% – 0,0043) što ukazuje na prevalenciju WNV RNA od 1: 38.758 donacija.

**Tablica 24.** Period ID-NAT probira donacija krvi od 2018. do 2024. godine na prisutnost WNV RNA i rezultati testiranja

Godina	Period probira WNV RNA	Broj testiranih donacija krvi	Broj WNV pozitivnih donacija krvi
2018	29.8. - 30.11.	32.749	3
2019	15.5. - 30.11.	105.313	0
2020	1.6. - 7.11.	78.985	0
2021	1.6. - 31.10.	79.515	0
2022	1.6. - 31.10.	94.835	3
2023	1.6. – 31.10.	89.655	3
2024	1.6. – 31.10.	100.324	6
Ukupno		581.376	15

#### 4.2.2. Potvrda infekcije virusom WNV

Potvrda infekcije virusom WNV-a provedena je testiranjem 15 uzoraka periferne krvi koji su u ponovljenom ID-NAT testiranju bili reaktivni. Za potvrdu prisustva WNV RNA u uzorku korišten je testni kit RealStar® WNV RT-PCR Kit 2.0. Rezultati testiranja pokazali su prisustvo WNV RNA u 14 uzoraka, dok je jedan uzorak bio negativan. Pragovni ciklusi Ct (eng. *Cycle threshold*) uzoraka u RT-PCR testiranju kretali su se u rasponu od 22,5 do 32,61, a uzorak koji je u RT-PCR testiranju bio negativan, vjerojatno nije sadržavao dovoljnu koncentraciju virusa za pozitivnu reakciju RT-PCR metodom, koja je manje osjetljiva od probirnog testa.

**Tablica 25.** Vrijednosti signala S/CO dobivene u probirnom ID-NAT testu i Ct vrijednosti pragovnog ciklusa dobivene RT-PCR testom za WNV pozitivne uzorke (kratica: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; Ct – pragovni ciklus (eng. *Cycle threshold*))

DDK	Procleix WNV (S/CO)	RealStar® WNV PCR - Ct vrijednosti
1	12,11	31,07
2	13,20	29,20
3	9,36	NEG
4	15,48	28,00
5	13,25	30,50
6	14,62	29,00
7	13,77	28,62
8	14,16	22,5
9	12,94	26,05
10	15,06	25,53
11	16,79	32,61
12	15,68	28,45
13	13,77	24
14	12,88	28,35
15	14,74	32

Svi ID-NAT IR uzorci ponovno su testirani u duplikatu, a IR donacije krvi su odbijene za transfuzijsko liječenje. U slučaju ID-NAT RR rezultata, DDK su odgođeni za darivanje krvi na period od 120 dana, a sve eventualne prethodne donacije u periodu od 120 dana, od istog darivatelja krvi, povučene su iz baze donacija i proglašene nesukladnima.

Medijan starosti WNV pozitivnih DDK bio je 45 godine, a raspon se kretao od 20 do 61 godine. Niti jedan DDK prilikom darivanja krvi nije prijavio nikakve zdravstvene poteškoće. Međutim, nakon obavijesti darivateljima o pozitivnom rezultatu testiranja na virus WNV, 10 od 15 DDK prijavilo je simptome. Najučestaliji simptomi bili su glavobolja i umor, zatim groznica i bol u mišićima te osip, a kod jednog DDK pojavilo se peckanje kože.

Većina WNV-om zaraženih DDK su bili muškarci, osim jedan žene iz Zagrebačke županije. Najviše DDK pozitivnih na virus WNV, 66,7% (10/15) bilo je iz istočnog dijela Hrvatske – Osječko-baranjske, Vukovarsko-srijemske i Brodsko-posavske županije, dok je 33,3% pozitivnih DDK bilo iz kontinentalnih županija, Križevačko-koprivničke 13,33% ili 2/15, Zagrebačke, Grada Zagreba i Međimurske, u svakoj po jedan pozitivan DDK. Najveći broj WNV pozitivnih rezultati zabilježen je u prvoj polovini rujna (53,33%; 8/15) te u drugoj polovini kolovoza (26,67%; 4/15), zatim u drugoj polovini rujna (13,33%; 2/15) i u drugoj polovini srpnja (6,67%; 1/15) (Tablica 26).

**Tablica 26.** Osobni podatci DDK pozitivnih na virus WNV (kratica: DDK – dobrovoljni darivatelj krvi; M – muški spol; Ž – ženski spol)

DDK	Dob	Spol	Županija	Datum detekcije WNV	Simptomi nakon donacije krvi
1	53	Ž	Zagrebačka	10.9.2018.	osip, groznica, slabost
2	50	M	Međimurska	11.9.2018.	groznica
3	20	M	Osječko-baranjska	18.9.2018.	glavobolja
4	36	M	Osječko-baranjska	19.8.2022.	glavobolja, bol u mišićima, groznica
5	25	M	Vukovarsko-srijemska	19.8.2022.	bez simptoma
6	24	M	Vukovarsko-srijemska	2.9.2022.	bez simptoma
7	45	M	Vukovarsko-srijemska	24.8.2023.	bez simptoma
8	43	M	Grad Zagreb	1.9.2023.	umor, glavobolja, bol u mišićima, proljev
9	61	M	Osječko-baranjska	8.9.2023.	pospanost
10	45	M	Osječko-baranjska	22.7.2024.	umor
11	39	M	Osječko-baranjska	26.8.2024.	osip
12	45	M	Brodsko-posavska	2.9.2024.	bez simptoma
13	55	M	Koprivničko-križevačka	11.9.2024.	peckanje kože
14	47	M	Koprivničko-križevačka	13.9.2024.	bez simptoma
15	51	M	Osječko-baranjska	2.10.2024.	osip

Savjetovanište DDK u HZTM-u pozivalo je virusom WNV zaražene DDK te ih obavještavalo o njihovom zdravstvenom statusu. Nakon 120 dana DDK su ponovo testirani te su u slučaju negativnog nalaza na sve viruse koji se probiru prije darivanja krvi, kao i na WNV RNA, mogli ponovno pristupiti darivanju krvi.

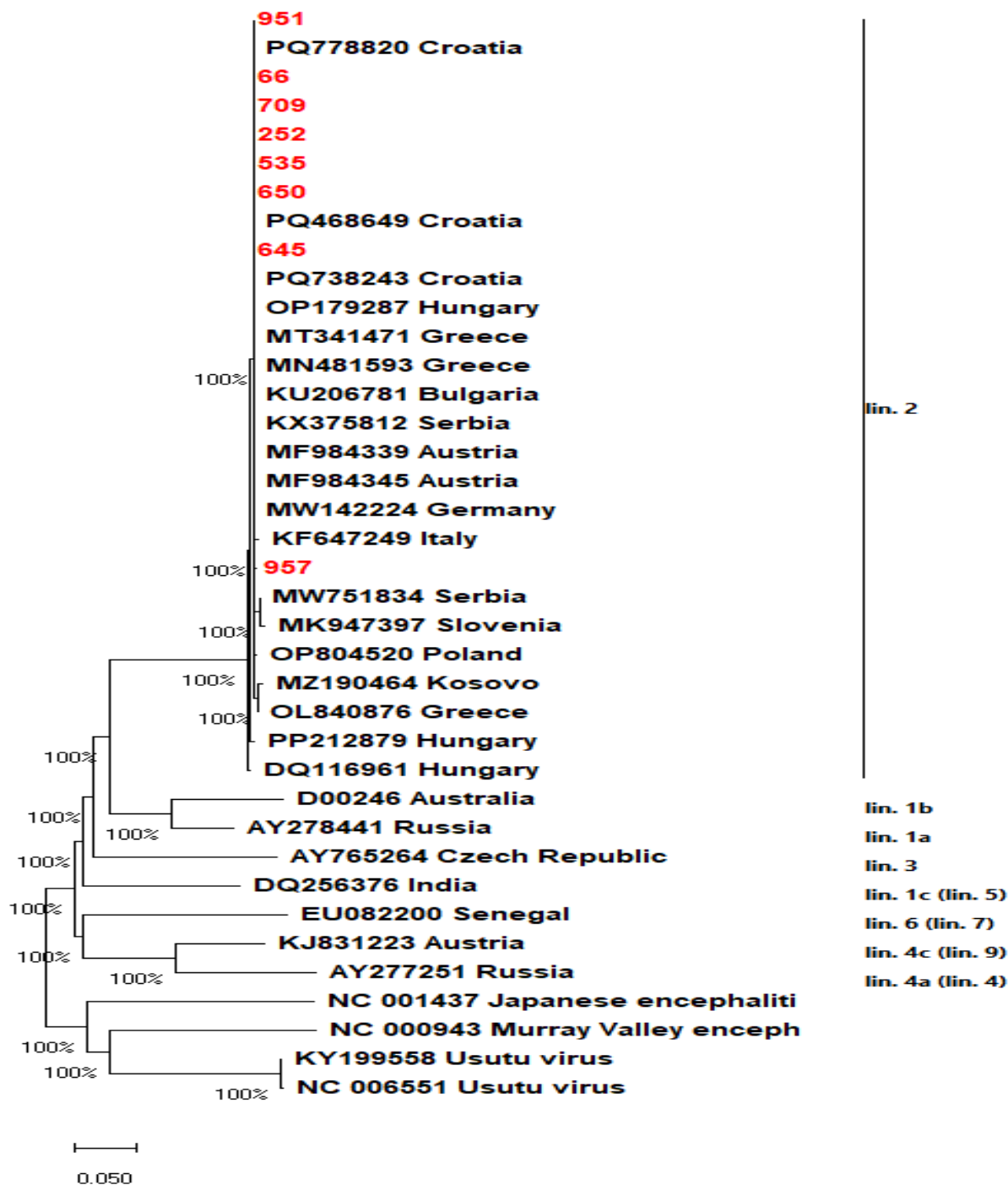
### 4.2.3. Genotip virusa WNV

Umnažanjem visoko konzervirane regije WNV genoma unutar NS5 genske sekvencije, korištenjem univerzalnog para početnica WNV-449-F i WNV-449-R (Weissenböck i sur., 2002), nije dobivena umnožena ciljna sekvencija virusa WNV. Nekoliko je mogućih razloga zašto ciljna sekvencija nije umnožena:

- Nespecifična amplifikacija: nespecifično vezanje početnica moglo je rezultirati pojačavanjem sekvenci koje nisu ciljne, osobito ako su prisutni kontaminanti ili genomski ulomci s homolognim regijama.
- Kontaminacija uzorka: uzorci plazme mogli su sadržavati genetski materijal drugih virusa ili mikroorganizama, što je moglo uzrokovati umnožavanje ne-WNV sekvenci.
- Niska koncentracija ciljne RNA: ako je koncentracija ciljne RNA u uzorku bila vrlo niska, nespecifične sekvencije mogle su dominirati amplifikacijom.
- Degradacija ciljne RNA: ciljna RNA mogla je biti djelomično degradirana tijekom izolacije ili pohrane, što je moglo utjecati na uspješnost umnožavanja ciljnog ulomka.
- Gubitak amplikona pri ekstrakciji PCR produkata iz gela: tijekom pročišćavanja PCR produkata, specifični amplikoni su možda bili lošije umnoženi pa su izgubljeni, dok su nespecifični ostali u dovoljnoj koncentraciji za sekvenciranje.

Kako nije uspjelo umnažanje odsječka unutar NS5 genske sekvencije, umnožen je odsječak genoma WNV u dijelu genske sekvencije prM/M korištenjem WNV L2 specifičnih početnica. Genotip virusa WNV L2 utvrđen je u osam uzoraka DDK, koji su označeni kao izolati 66, 252, 535, 645, 650, 709, 951 i 957. Filogenetsko stablo izrađeno je metodom povezivanja susjeda (eng. *neighbour-joining*) i modela *p-distance*. U analizu su bile uključene sekvencije referentnih izolata opisanih u literaturi i srodnih sekvencija iz Hrvatske i susjednih zemalja, koje su pronađene korištenjem algoritma BLAST (Anđelić Dmitrović i sur., 2025, Rizzoli i sur., 2015, Vignjević i sur., 2024). Usporedbom pretraženog sravnjenog ulomka genoma virusa WNV od 231 pb, utvrđeno je da izolati 66, 252, 535, 645, 650, 709 i 951 imaju identičnu sekvenciju, dok se izolat 957 razlikuje u jednom pb (Slika 29). Izolati 66-951 pokazali su identičnost s izolatima PQ778820 i PQ738243 koji su izolirani iz bolesnika s infekcijom virusom WNV u Hrvatskoj i s izolatom OP179287 iz Mađarske, dok se izolat 957 razlikuje u 1 pb (Anđelić Dmitrović i sur., 2025). Usporedbom s izolatom iz Slovenije (Acc. No. MK947397) i Kosova (Acc. No. MZ190464) utvrđeno je da se izolati 66-951 razlikuju u 2 pb, a izolat 957 u 3 pb. Usporedbom s izolatom iz Italije (Acc. No. KF647249) i Srbije (Acc. No. MW751834) pokazalo se kako se izolati 66-951 razlikuju u 1 pb, a izolat 957 u 2 pb (Anđelić

Dmitrović i sur., 2025). Izolati 66-951 identični su izolatu iz komarca podrijetlom iz Hrvatske (Acc. No. PQ468649) koji je opisan u literaturi (Vignjević i sur., 2024).



**Slika 29.** Filogenetsko stablo dobiveno analizom odsječka gena *prM/M*. Analiza je provedena metodom povezivanja susjeda (eng. *neighbour joining*) uz primjenu modela p-distance. Sekvencije analiziranih uzoraka prikazane su u crvenom. Brojevi u čvorištu grana predstavljaju vrijednosti dobivene statističkom metodom samoučitavanja (*bootstrap*) u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetsku udaljenost ( $d=0,05$ ). Filogenetske skupine definirane su prema literaturnim podacima (Rizzoli i sur., 2015, Anđelić Dmitrović i sur., 2025, Vignjević i sur., 2024) korištenjem BLAST algoritma, a navedene su desno od Acc. No.

## 5. Rasprava

U ovom istraživanju analizirani su uzorci DDK koji predstavljaju zdravu populaciju u Hrvatskoj, na prisutnost virusa HEV i virusa WNV, kako bi se utvrdila njihova prevalencija i odredila koncentracija virusa u krvi, te njihov genotip i filogenetska pripadnost.

### 5.1. HEV

Ovo je prvo istraživanje prevalencije virusa HEV u zdravoj populaciji u Hrvatskoj, korištenjem visoko osjetljive molekularne metode. Analizom su utvrđene četiri HEV pozitivne donacije krvi u testiranom uzorku od 8.631 donacije krvi, čime je utvrđena visoka prevalencija virusa HEV-a u zdravoj populaciji, koja iznosi 1 na 2.158 donacija. Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu prisutnost virusa HEV u analiziranom uzorku, koji pripada genotipu 3c, a filogenetski je srodan virusima izoliranim iz domaće svinje u Hrvatskoj, Nizozemskoj i Njemačkoj.

Takav rezultat bio je donekle očekivan s obzirom kako je studija seroprevalencije napravljena u proteklom desetljeću pokazala visoku seroprevalenciju anti-HEV antitijela od 21,5% u populaciji dobrovoljnih darivatelja krvi (Miletić i sur., 2019). Visoka stopa prethodne izloženosti virusu HEV povezana sa značajnim brojem infekcija virusom HEV-a u Hrvatskoj, zabilježena je u skupini od 394 bolesnika na hemodijalizi, od kojih je 27,9% bilo pozitivno na antitijela anti-HEV IgG (Mrzljak i sur., 2021). U usporedbi s literaturnim podacima, rezultati prevalencije virusa HEV-a dobiveni ovim istraživanjem, slični su utvrđenoj prevalenciji virusa HEV-a u Ujedinjenom Kraljevstvu gdje su dobivene vrijednosti 1 na 1.365 donacija (Domanović i sur., 2017), 1 na 2.848 (Hewitt i sur., 2014) i 1 na 3.830 donacija (Harvala i sur., 2019), u Danskoj 1 na 2.330 donacija (Harritshøj i sur., 2016) i u Poljskoj 1 na 2.109 donacija (Grabarczyk im sur., 2018). U literaturi se navode rezultati niže prevalencije virusa HEV-a u odnosu na dobivene ovom analizom, pa ona iznosi u Kataloniji, Španjolska 1 na 4.341 donaciju (Bes i sur., 2022), Irskoj 1 na 4.745 (Boland i sur., 2019) i 1 na 4.997 donacija (O’Riordan i sur., 2016), te Austriji 1 na 8.416 donacija (Fischer i sur., 2015). U literaturi se nalaze i podatci o višoj prevalenciji virusa HEV-a u odnosu na ovo istraživanje. Prema istraživanju provedenom u prošlom desetljeću prevalencija virusa HEV u Njemačkoj je 1 na 597 donacija (Vollmer i sur., 2019), u Nizozemskoj 1 na 611 (Zaaijer, 2015) i 1 na 726 donacija (Hogema i sur., 2016) i u Francuskoj 1 na 1.317 (Gallian i sur., 2017). Navedene literaturne podatke nije bilo moguće u potpunosti usporediti s rezultatima ovog istraživanja, jer se razlikuju po godinama uzorkovanja, metodi i veličini uzorka, odnosno je li provedeno testiranje uzoraka pojedinačnih

donacija – ID NAT, ili *pooliranih* uzoraka koji su sadržavali više donacija – MP NAT (MP, eng. *Mini Pool*).

Ovim istraživanjem utvrđeno je kako je većina HEV-RNA pozitivnih DDK (75%) prilikom darivanja krvi bilo seronegativno, te kako je samo jedan HEV-RNA pozitivan DDK (25%) bio pozitivan na antitijela anti-HEV IgM i anti-HEV IgG. Utvrđeno je kako svi HEV RNA-pozitivni darivatelji krvi, u trenutku donacije, nisu imali nikakve zdravstvene poteškoće ni simptome. Istraživanjem prevalencije virusa HEV u zdravoj populaciji, provedenim u Engleskoj utvrđeno je također da je većina viremičnih davatelja (66%) bila seronegativna u trenutku donacije (Harvala i sur., 2019). U Kataloniji je testirano 655,523 donacija krvi i utvrđeno je kako je 58% HEV RNA-pozitivnih darivatelja krvi bilo seronegativno za vrijeme donacije (Bes i sur., 2022).

Ovim je istraživanjem utvrđeno kako u naknadnom uzorku krvi, koji je uzet 60 dana nakon potvrde HEV infekcije, u nijednog od četiri DDK više nije bila prisutna HEV RNA. Serološkim testiranjem u sva četiri DDK utvrđeno je prisustvo antitijela anti-HEV IgG, a samo u jednog darivatelja i dalje su bila prisutna antitijela anti-HEV IgM. Nijedan HEV pozitivan darivatelj nije razvio simptome kronične infekcije virusom HEV, niti je bio re-inficiran, što je u skladu sa EASL smjernicama za kliničku praksu, prema kojima u imuno kompetentnih osoba zaraženih virusom HEV-a, unutar tri mjeseca od zaraze dolazi do spontanog uklanjanja virusa (Dalton i sur., 2018).

Od četiri HEV RNA ID-NAT RR uzorka, tri su potvrđena HEV RNA pozitivna i određena im je koncentracija virusa, a dva su uzorka genotipizirana i uključena u filogenetsku analizu. Rezultati su pokazali kako virus utvrđen u DDK krvi pripada genotipu HEV 3c. Prema literaturnim podacima iz prošlog desetljeća, u Hrvatskoj je utvrđeno kako je kod 504 bolesnika s hepatitisom koji su bili negativni na hepatitis A, B i C i kod 88 HIV bolesnika, anti-HEV IgM prevalencija bila 3,2% odnosno 1,1%. Navedeno je kako je HEV RNA utvrđena u pet od četrnaest anti-HEV IgM bolesnika i filogenetski je tada utvrđen genotip HEV 3. Također nijedan bolesnik uključen u istraživanje nije boravio u zemljama endemičnim za virus HEV-a (Mrzljak i sur., 2021). Prema nedavnim literaturnim podacima utvrđeno je kako je virus HEV-a izoliran iz anti-HEV pozitivnih bolesnika, te iz uzoraka domaćih i divljih svinja pripadao genotipu 3, uglavnom podtipovima 3a (65,4%) i 3c (23,1%) čime je potvrđena bliska srodnost podtipova virusa HEV neovisno o domaćinu (Jemeršić i sur., 2019). Istraživanjem koje su proveli Garbuglia i sur. (2025) utvrđeno je kako je u središnjoj Italiji (Abruzzo i Lazio) najučestaliji genotip virusa HEV 3f, a distribucija genotipova virusa najviše je povezana s prisutnim genotipovima virusa kod svinja, a ne divljih svinja. Iz navedenog se može zaključiti

da su svinjsko meso i mesne prerađevine najčešći uzrok infekcije virusom HEV-a kod ljudi (Garbuglia i sur., 2025).

Prema dosadašnjim istraživanjima, u Engleskoj populaciji DDK dominantan je genotip virusa HEV 3c (75%), uz HEV 3e (14%) i HEV 3f (8%) (Harvala i sur., 2019), u poljskoj populaciji DDK prisutan je genotip HEV 3i (67%) i HEV 3c (33%) (Grabarczyk i sur., 2018), u populaciji DDK u Španjolskoj (Kataloniji), genotip HEV 3f (80,2%) i HEV 3c (19,8%) (Bes i sur., 2022). Podatci za Austriji pokazuju da je najučestaliji genotip HEV 3f (Fischer i sur., 2015). U Francuskoj je najučestaliji genotip HEV 3f (73%), pa HEV 3c (18%) (Gallian i sur., 2019), dok je u Nizozemskoj najučestaliji genotip HEV 3c (80%) i HEV 3f (13%) (Hogema i sur., 2021). U Njemačkoj je slično kao i u Nizozemskoj najučestaliji genotip HEV 3c (67,3) i HEV 3f (14,3%) (Schemmerer i sur., 2022). U Hrvatskoj još nije prijavljen prijenos infekcije virusom HEV putem transfuzije krvi. Mogući razlog tome je eventualna neprepoznata infekcija i nedovoljno testiranje na HEV RNA u bolesnika. Na temelju dobivenih rezultata ovog istraživanja, postoji značajan rizik prijenosa infekcije virusom HEV transfuzijom krvi, u slučaju netestiranja DDK na HEV RNA. Prema literaturnim podacima u Francuskoj je u periodu od 2006. do 2016. godine zabilježeno 23 prijenosa virusa HEV transfuzijom krvi. Primatelji zaražene krvi bili su najčešće primatelji transplantata solidnih organa i bolesnici s hematološkim malignim bolestima (34,8%; 18/23). Infekcija HEV uzrokovala je kronični hepatitis E u 14 (60,9%) imuno kompromitiranih bolesnika, od kojih je kod dvoje došlo do fibroze jetre. Jedan primatelj transplantata solidnog organa preminuo je s komorbiditetima s aktivnom infekcijom HEV i zatajenjem većeg broja organa, dok su se ostali bolesnici oporavili spontano od infekcije virusom HEV (Gallian i sur., 2019).

U literaturnim podacima postoji dilema oko opcije molekularnog testiranja dobrovoljnih davatelja krvi, odnosno je li treba primijeniti ID-NAT ili MP-NAT, s obzirom kako ne postoje zadani protokoli probira, koji bi se temeljili na točnim podacima minimalnog titra virusa HEV, koja može izazvati infekciju u primatelja transfuzije. U određivanju minimalne koncentracije potrebne za prijenos virusa HEV transfuzijom, važno je koristiti visoko osjetljive metode (Bi i sur., 2020). Rezultati istraživanja provedenog u Irskoj na populaciji darivatelja krvi pokazali su kako je u 95% ID NAT-RR donacija moguće odrediti koncentraciju virusa HEV i 37,5% donacija imalo je koncentraciju virusa <math><100\text{ IU/mL}</math>.

Rezultati određivanja koncentracije virusa HEV-a u ovom istraživanju pokazali su kako su dva DDK imali umjerenu koncentraciju virusa u krvi od  $1,15 \times 10^3$  i  $4,73 \times 10^3$  IU/mL, jedan DDK je imao nisku koncentraciju virusa od 32 IU/mL, a u jednom uzorku krvi DDK nije određena koncentraciju virusa, vjerojatno jer je koncentracije virusa u uzorku bila niža od detekcijskog

limita tj. donje granice osjetljivosti testa (LOD), koji za korišteni qRT-PCR set iznosi 200 IU/mL. Istraživanjima je utvrđeno kako najmanja infektivna doza koja uzrokuje prijenos HEV infekcije transfuzijom krvi iznosi  $7,05 \times 10^3$  IU kad se transfundiraju koncentracije trombocita. Kada se uzmu u obzir drugi tipovi krvnih proizvoda, infektivna doza za eritrocite iznosi  $3,16 \times 10^4$  IU, a za svježe smrznutu plazmu  $3,60 \times 10^4$  IU. Općenito svi krvni pripravci s infektivnom dozom  $>5,00 \times 10^4$  IU uzrokuju transfuzijom prenesenu infekciju virusom HEV-a (Vollmer i sur., 2019).

Konzumacija nedovoljno termički obrađenog mesa predstavlja puno veći rizik infekcije virusom HEV-a u odnosu na prijenos transfuzijom krvi. Radi nedovoljnih kvantitativnih podataka o sastojcima hrane, parametrima u procesu proizvodnje hrane i infektivnosti virusa ne postoje procjene mogućnosti prijenosa virusa HEV hranom. U literaturi postoje podatci istraživanja u kojem je 31% uzoraka iz gotovih mesnih proizvoda (eng. *ready to eat*) od svinjskog mesa i 65% uzoraka svinjske jetrene paštete u Belgiji bilo HEV RNA pozitivno (Locus i sur., 2023). Prema literaturnim podacima u Španjolskoj, koja je najveći proizvođač svinja u Europi, preporuča se uvođenje sustava praćenja HEV infekcije u svinja te uvođenje testiranja na virus HEV u rutinskoj dijagnostici akutnog i kroničnog hepatitisa u ljudi. Uspostavljanjem sustava praćenja infekcije virusom HEV dobile bi se informacije o prevalenciji bolesti i genotipovima virusa u različitim geografskim područjima te njihov moguć utjecaj na javno zdravlje (Santos i sur., 2023).

S obzirom kako imuno kompromitirani bolesnici imaju potrebu za učestalim transfuzijama krvnim pripravcima, povećava se i opasnost prijenosa virusa HEV-a tim bolesnicima (Denner i sur., 2019). Probir svih donacija krvi na prisutnost HEV RNA može znatno smanjiti mogućnost prijenosa infekcija primateljima krvi, koji su često imuno suprimirani ili boluju od težih kroničnih bolesti. S obzirom na prevalenciju virusa HEV u populaciji DDK u razvijenim zemljama, ne postoji konsenzus o probiru davatelja krvi. Literaturni podatci iz prošlog desetljeća ukazuju kako protivnici probira DDK na virus HEV smatraju kako je probirno testiranje neisplativo, s obzirom da virus HEV uglavnom uzrokuje asimptomatsku ili samoograničenu infekciju u primatelja transfuzije. Osim toga prijenos virusa HEV transfuzijom krvi predstavlja samo 1% svih infekcija virusom HEV-3, te bi probir imao mali efekt u smanjenju sveukupnog broja zaraženih, kojih se 99% zarazi konzumacijom zaraženog mesa i utjecajem okoline. Zagovaratelji probira smatraju kako se primatelje transfuzije nesvjesno inficira virusom HEV i to vjerojatno već dugi niz godina te treba li se tako nastaviti dalje s obzirom da je poznavanje epidemiologije i kliničkih učinaka virusa HEV u ljudi i dalje nepotpuno (Dalton i Seghatchian, 2016). Procjenom financijske analize isplativosti smatra se u

zapadnim zemljama kako uvođenje NAT probira donacija krvi na virus HEV, ne predstavlja financijski značajniji trošak u odnosu na ostale metode probira krvi na krvlju prenosive bolesti (de Vos i sur., 2017).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su značajnu prevalenciju HEV RNA u zdravoj populaciji u Hrvatskoj te pridonose znanstvenoj i stručnoj zajednici u sagledavanju i planiranju mogućih mjera zaštite zdravlja u Hrvatskoj.

## 5.2. WNV

Rezultati ovog istraživanja provedenog u sedam sezonskih testiranja svih donacija krvi u Hrvatskoj, potvrđuju prisutnost virusa WNV u zdravoj populaciji u Hrvatskoj. Ovo je prvo istraživanje prevalencije virusa WNV u zdravoj populaciji u Hrvatskoj. U ukupnom uzorku od 581.376 uzoraka periferne krvi DDK iz cijele Hrvatske, utvrđeno je 15 WNV RNA pozitivnih uzoraka, tj. 0,0026%, što odgovara prevalenciji od jedne WNV RNA pozitivne donacije na 38.758 donacija. Sekvenciranjem po Sangeru u osam uzoraka periferne krvi DDK potvrđen je genotip WNV L2.

Sporadične infekcije virusom WNV u Hrvatskoj bilježe se od 2012., kada je prijavljeno sedam WNND slučajeva na istoku Hrvatske. Incidencija zaraze virusom WNV dosezala je do 1,49/100.000, a 2018. godine zabilježen je dosad najveći broj slučajeva zaraze - sedam slučajeva WNVF, 54 slučaja WNND i četiri slučaja s letalnim ishodom. Godine 2019., 2020. i 2021. nije zabilježen nijedan klinički slučaj infekcije, niti pozitivni DDK na virus WNV-a.

Neutralizirajuća antitijela na virus WNV prvi su puta u Hrvatskoj potvrđena 2001. godine, u nasumično testiranim, asimptomatskim konjima (Madić i sur., 2007). U Hrvatskoj je 2011. godine uveden sustav pasivnog nadzora flavivirusa u konja i peradi te se od tada kontinuirano bilježi visoka seropozitivnost konja na virus WNV-a. U 2018. godini prvi anti-HEV IgM pozitivni rezultati u konja zabilježeni su već u ožujku i prijavljivani su do kraja studenog. Te su godine akutno zaraženi konji utvrđeni u sedam županija, dok su anti-HEV IgG pozitivni, zabilježeni u svim kontinentalnim županijama (raspon anti-HEV IgG bio je od 3,2% do 26,0%). Monitoring divljih ptica na prisutnost virusa WNV u Hrvatskoj započeo je 2013. godine, a prva potvrda prisustva virusa, tj. WNV RNA, prijavljena je 2018. godine. Pozitivne su bile tri ptice – dva jastreba, *Accipiter gentilis* i jedan kos, *Turdus merula*, dok je jedna ptica – škanjac, *Buteo buteo*, bila seropozitivna. Od 2017. do 2021. u Hrvatskoj je trajao projekt određivanja prevalencije i molekularne epidemiologije novih i reemergentnih neuroinvazivnih infekcija uzrokovanih arbovirusima (CRONEUROARBO). Projektom su bili obuhvaćeni ljudi, konji,

ptice, perad i vektori virusa (komarci, krpelji), a infekcija virusom WNV bila je potvrđena u ljudi, konja, ptica i peradi (Vilibic-Cavlek i sur., 2021). Praćenje infekcije virusom WNV kod komaraca u Hrvatskoj započelo je 2012. godine (Klobucar i sur., 2021), a prvi pozitivan uzorak potvrđen je 2023. godine kod komaraca *Culex pipiens*, u Vukovarsko-srijemskoj županiji. Sekvenciranjem po Sangeru potvrđen je genotip L2, koji je pokazao 98% sličnost izolatu virusa WNV izoliranog iz humanog uzorka 2021. godine u Mađarskoj (Vignjević i sur., 2024).

Od 2018. godine u Hrvatskoj se primjenjuje direktiva Europske Komisije 2014/110/EC (European Parliament, 2014) koja se odnosi na osiguranje sigurnosti transfuzijskog liječenja u smislu uklanjanja opasnosti prijenosa virusa WNV transfuzijom krvi. Zahvaćena područja definiraju se na osnovi izvještaja o infekcijama u ljudi, te se u koordinaciji s Ministarstvom zdravstva, Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo i Hrvatskim zavodom za transfuzijsku medicinu (HZTM) donose odluke o početku sezonskog testiranja svih donacija krvi u Hrvatskoj na virus WNV. Slijedom direktive i upute Ministarstva zdravstva, 2018. godine privremeno je prekinuto dobrovoljno darivanje krvi u infekcijom zahvaćenim područjima i uvedena je 28-dnevna odgoda uzimanja krvi u svih DDK koji su putovali ili proveli najmanje dva dana u zahvaćenom području. Kako bi se osiguralo dovoljne količine krvi za normalno funkcioniranje zdravstvenog sustava, umjesto odgode darivanja krvi, iste je godine uvedeno WNV ID-NAT testiranje. Sve donacije krvi uzete od DDK koji su boravili ili putovali u zahvaćeno područje, testirane su u HZTM-u, od 28. kolovoza do 31. listopada 2018. godine. Od 2019. godine uveden je univerzalni probir na WNV RNA, ID-NAT metodom za sve donacije koje su prikupljene u Hrvatskoj, u sezonskom periodu, kojeg svake godine određuju stručne službe.

U ovom istraživanju šest pozitivnih WNV RNA ID-NAT donacija zabilježeno je 2024. godine, što odgovara prevalenciji od 5,98 pozitivne donacije na 100.000 donacija. Po tri pozitivne WNV RNA ID-NAT donacije zabilježene su 2018., 2022 i 2023 godine, što je prevalencija od 9,16; 3,16 i 3,35 pozitivne donacije na 100.000 donacija. Najviše pozitivnih donacija zabilježeno je u rujnu (60%), zatim u kolovozu (26,7%), te u srpnju i listopadu (13,3%) što se prema dostupnim podacima podudara s periodom kada su dijagnosticirani slučajevi infekcije virusom WNV u bolesnika u Hrvatskoj (Vilibic-Cavlek, Savic, i sur., 2021). U razdoblju 2019. godine do 2021. godine nije bilo nijednog WNV RNA pozitivnog DDK u Hrvatskoj.

Prema literaturnim podacima u Njemačkoj je virus WNV prvi puta potvrđen 2018. godine kod ptica i konja, a prve autohtone infekcije u ljudi potvrđene su 2019. godine. Od tada se određuju geografska zahvaćena područja i sukladno tome određuje odgađanje darivanja krvi ili se uvodi sezonsko WNV NAT testiranje, koje se ograničava na period od 1. lipnja do 30. studenog. Prevalencija WNV RNA kod DDK u Njemačkoj 2020. godine bila je 0,8/100.000 donacija. U

istraživanju je testirano 2.138.008 donacija, a potvrđeno pozitivnih na WNV RNA bilo je 17. Svi pozitivni DDK živjeli su u područjima u kojima je u periodu od 2018. do 2020. godine virus WNV otkriven u životinjama (Frank i sur., 2022). U 2020. godini, 114 od 141 (81%) transfuzijskih centara u Njemačkoj testiralo je DDK na WNV RNA. Prema smjernicama Paul Ehrlich Instituta (PEI) iz 2020. godine, granica osjetljivosti, LOD za WNV NAT test mora biti  $\leq 250$  kopija/mL za individualne donacije, a 2023. LOD je povećan na 120 kopija/mL. U slučaju povećanog prijenosa virusa WNV u populaciji, nadležne njemačke službe razmatraju uvođenje WNV ID-NAT testiranja, s obzirom na mogućnost utvrđivanja donacija s niskom koncentracijom virusa. U Njemačkoj se provodi nadzor divljih ptica i komaraca na virus WNV i te se aktivnosti provode u koordinaciji s nadležnim institucijama humane i veterinarske medicine. Nadzor divljih ptica pokazao se iznimno učinkovitim mehanizmom praćenja geografskog prisustva virusa WNV i kao rano upozorenje mogućeg rizika prijenosa virusa na ljude (Frank i sur., 2022). Praćenje virusa WNV u Austriji uključuje djelovanje u humanoj i veterinarskoj medicini te entomološke aktivnosti. Organizirano je sezonsko testiranje DDK u endemičnim regijama, testiranje bolesnika i konja s određenim neurološkim simptomima, aktivno i pasivno praćenje ptica i nacionalni nadzor komaraca (Kolodziejek i sur., 2018). Prvi slučaj WNND u Austriji zabilježen je 2009. godine, a autohtoni slučajevi u ljudi registriraju se neprestano, izuzev 2011. i 2013. godine, kada su zabilježeni jedino uneseni slučajevi. Godine 2018. prijavljen je 21 autohtoni slučaj, od ukupno 27, od kojih je šest bilo zabilježeno u DDK (Aberle i sur., 2018).

U Italiji je 2002. godine pokrenut nacionalni veterinarski plan nadzora virusa WNV, potaknut WNV infekcijom u konja. WNV NAT testiranje DDK započelo je 2008. godine, u formatu minipoola - MP6-NAT ili ID-NAT. Od 2010. godine transfuzijski centri koji su koristili MP6-NAT format testiranja, prešli su na ID-NAT format testiranja, ako je njihovo područje prikupljanja krvi proglašeno WNV zahvaćenim područjem, te od tada koriste ID-NAT format do kraja sezone testiranja na WNV RNA (Pupella i sur., 2013). U Italiji se nadzor virusa WNV provodi cijelu godinu, a intenzivira se za vrijeme transmisijske sezone. Prema nacionalnom integriranom planu nadzora, prva utvrđena infekcija virusom WNV u komaraca, ptica, konja ili ljudi pokreće aktivaciju preventivnih mjera kako bi se osigurala sigurna krv, te organi, tkiva i stanice za transplantaciju (Pupella i sur., 2013). Primjenom preventivnih mjera u svrhu sprječavanja prijenosa virusa WNV-a, koje su provedene u Italiji u periodu od 2009. do 2015. testirano je više od 1.000.000 donacija krvi na WNV RNA, ID-NAT metodom. Zabilježeno je 65 WNV pozitivnih donacija, što je prevalencija od 6,5/100.000 ili 1/15.385 donacija, a prijenos virusa WNV transfuzijom krvnih pripravaka nije zabilježen (Pisani i sur., 2016).

U Mađarskoj se WNND i WNF redovito registriraju, a najveći godišnji broj zabilježen je 2018. godine kada je prijavljeno čak 225 slučajeva. U literaturi se navodi prosječna incidencija od 4,88/100.000 stanovnika u periodu od 2004. do 2022. Analizom 2.016 uzoraka plazme DDK provedene 2016. godine, metodom MP6-NAT nije pronađen pozitivan uzorak (Nagy i sur., 2023), a rezultati istraživanja WNV seroprevalencije u skupini od 3.005 mađarskih DDK provedenog 2019. godine, pokazali su WNV IgG seroprevalenciju od 4,32% (Nagy i sur., 2022).

Prvi slučaj WNND u Sloveniji zabilježen je u retrospektivnoj analizi bolesnika s meningitisom u 2013. godini, a 2018. godine registrirana su tri bolesnika s WNND, koji su potvrđeni detekcijom antitijela anti-WNV IgM. U Sloveniji se od 2017. do 2019. godine provodilo testiranje komaraca na virus WNV i virus je potvrđen u skupini komaraca *Culex sp.* sakupljenoj 2018. godine (Knap i sur., 2020). Godine 2024. u Sloveniji je uvedeno sezonsko testiranje svih DDK na WNV RNA, probirom ID-NAT.

Program integriranog nadzora virusa WNV u Srbiji započeo je 2014. i svake godine se prilagođava ovisno o podacima proteklih nadzora, rezultata istraživanja i dostupnosti fondova (Petrović i sur., 2021). U Srbiji još nije uvedeno probirno testiranje DDK na WNV.

U Grčkoj postoji nacionalni program pojačanog praćenja i prevencije infekcije virusom WNV koji se provodi svake godine od svibnja do studenog. Ove mjere uključuje 28-dnevnu odgodu davanja krvi za DDK koji su proveli jednu noć u području gdje je prijavljen prijenos virusa WNV na ljude, te ID-NAT probir uzorak krvi DDK na WNV-RNA. U Grčkoj je provedeno i istraživanje prevalencije WNV na populaciji DDK u periodu od 2010. do 2021. godine prema kojem se jedna WNV pozitivna donacija pojavljuje na 9.708 testiranih donacija krvi (Politis i sur., 2022).

U Ujedinjenom kraljevstvu (UK) provodi se WNV MP-6 NAT testiranje umjesto 28-dnevnog odgađanja davanja krvi. Lokalno stečena infekcija virusom WNV zasad još nije prijavljena u UK i rijetko se prijavljuje u putnika. Za sada su prijavljena dva slučaja uvezene infekcije virusom WNV, i to kod putnika koji su 2017. godine doputovali iz Južnoafričke Republike (<https://travelhealthpro.org.uk/factsheet/47/west-nile-virus>).

Irska provodi WNV ID-NAT testiranje DDK i do sada su zabilježena tri slučaja WNF (2013., 2023. i 2024. godine) (<https://www.hpsc.ie/a-z/vectorborne/westnilevirus/epidemiologicaldata/>).

U SAD je virus WNV prvi put utvrđen 1999. godine, u New Yorku, kao uzročnik WNND. Nacionalni sustav nadzora kruženja virusa WNV u komaraca, konja i ostalih životinja, te praćenje pojave WNF i WNND u ljudi, uspostavljen je 2000. godine. Prvi slučajevi prijenosa

virusa WNV transfuzijom krvi, dojenjem, te intrauterino s majke na plod, zabilježeni su 2002. godine (Hayes i sur., 2020). Te je godine zabilježeno 23 prijenosa virusa WNV transfuzijom, od kojih je sedam bilo sa smrtnim posljedicama (Pealer i sur., 2003). Sljedeće godine uveden je nacionalni probir svih DDK na virus WNV, uglavnom u MP-NAT formatu, ali i u ID-NAT obliku u područjima s epidemijom virusa WNV (Busch i sur., 2006). U prve dvije godine od početka probira na WNV RNA, jedna trećina pozitivnih donacija nije otkrivena probirom u MP formatu, a 8% do 15% svih pozitivnih donacija u individualnom formatu i s potvrđenom viremijom, nije imalo IgM antitijela i vjerojatno su bile infektivne (Petersen i sur., 2010). Utvrđeno je kako testiranje u MP-NAT formatu ne otkriva čak 62% WNV RNA potvrđeno pozitivnih donacija u odnosu na ID-NAT probir (Hayes i sur., 2020). Kako bi smanjili mogućnost prijenosa virusa WNV transfuzijom, u SAD se WNV RNA testira cijelu godinu za sve DDK u MP-NAT formatu, a u slučaju pozitivne donacije ili drugih dokaza povećanog prijenosa WNV u određenom geografskom području, prelazi se na ID-NAT testiranje populacije DDK (Petersen i sur., 2010). U literaturi se navodi kako je većina slučajeva prijenosa virusa WNV transfuzijom krvi uslijedila nakon transfuzije MP-NAT ne-reaktivnih (NR) doza, koje nisu bile testirane ID-NAT probirom. Literaturni podatci ukazuju kako je u SAD-u 2016. godine došlo do prijenosa virusa WNV transfuzijom krvi testirane MP-NAT probirom, upotrebom ne reaktivne donacije sakupljene i testirane neposredno prije prelaska na ID-NAT probir. No ovaj događaj smatrao se rijetkim slučajem s učestalošću  $1:84 \times 10^6$  donacija ([JPAC Position Statement on West Nile Virus - September 2024](#)). U literaturi je opisan jedan slučaj prijenosa virusa WNV transfuzijom ID-NAT NR koncentrata trombocita, dobivenih trombaferozom, koji su bili pozitivni na anti-WNV IgM i neutralizirajuća antitijela, te još jedan mogući prijenos transfuzijom ID-NAT NR trombocita dobivenih trombaferozom (Hayes i sur., 2020). Unatoč probira DDK WNV NAT metodom, moguće je da asimptomatski darivatelji krvi s niskom koncentracijom virusa u krvi, neće biti otkriveni molekularnim testiranjem. Osjetljivost NAT metode smanjuje se u slučaju testiranja uzoraka u MP, a povećava se ako se uzorci testiraju pojedinačno. Uzorci s niskom koncentracijom virusa koji se testiraju pozitivnima jedino primjenom ID-NAT testiranja, pozitivni su u kratkom periodu početne faze viremije kada su te donacije visoko zarazne i mogu uzrokovati infekciju u primatelja transfuzije. No, DDK mogu biti WNV ID-NAT pozitivni i na duži period nakon vršne faze viremije, kada su prisutna antitijela anti-WNV IgM i tada su donacije krvi rijetko zarazne (Petersen i sur., 2010). WNV ID-NAT testiranje važno je za otkrivanje zaraznih donacija s niskom koncentracijom virusa i u ranoj fazi infekcije kada antitijela IgM još nisu prisutna u cirkulaciji (Frank i sur., 2022).

WNV RNA može se otkriti u plazmi ili likvoru dva do osam dana nakon infekcije, što je u prosjeku četiri dana prije pojave specifičnih antitijela IgM. Klinički slučajevi mogu se dijagnosticirati utvrđivanjem specifičnih antitijela ili NAT analizom iz uzorka urina ili pune krvi, gdje je virus prisutan u visokoj koncentraciji. Antitijela anti-WNV IgM u serumu mogu perzistirati godinama nakon akutne infekcije. U nedavnoj studiji antitijela anti-WNV IgM nađena su u serumu 20% ispitanika osam godina nakon infekcije (Ronca i sur., 2021), dok se WNV RNA uglavnom ne može otkriti 13,2 dana nakon infekcije (Kolodziejek i sur., 2015).

Izazov u otkrivanju i potvrđivanju infekcije virusom WNV-a predstavlja križna reaktivnost sa srodnim virusima, osobito s USUV. Trenutni NAT testovi za probir DDK na WNV RNA su križno reaktivni na USUV, stoga se sve WNV RNA NAT reaktivne donacije dodatno testiraju potvrdnim testom specifičnim za WNV virusni genom, kako bi se potvrdio virus koji se nalazi u reaktivnoj donaciji (Domanović i sur., 2019).

U ovom je istraživanju od 15 WNV RNA ID-NAT RR uzoraka, 14 potvrđeno WNV pozitivnima RT-PCR metodom, dok jedan uzorak nije potvrđen pozitivnim, vjerojatno radi koncentracije virusa niže od granice detekcije RT-PCR testa, ili moguće infekcije s USUV. Radi nerasplošivosti potrebnih početnica i metode, u ovom radu nije bilo moguće dokazati radi li se o USUV. Genotip je određen u osam od 14 uzoraka, i svi su uzorci pripadali WNV L2 genotipu. Genotip L2 pojavio se u središnjoj Europi 2004. godine i proširio se iz Mađarske u istočnu Austriju i južnu Europu (Rizzoli i sur., 2015). U Hrvatskoj je iz urina 11 bolesnika s WNVND u 2017. i 2018. godine te iz jednog uginulog jastreba u 2018. izoliran virus WNV L2 (Vilibić-Cavlek, Barbic, i sur., 2021). U istraživanju Anđelić Dmitrović i sur. (2025) kod tri bolesnika u Hrvatskoj, zaražena virusom WNV 2016., 2023. i 2024. godine, sekvenciranjem cijelog genoma WNV potvrđen je genotip WNV L2. Sekvencirani genomi virusa iz 2023. i 2024. godine pokazali su 99% sličnost sekvencije s mađarskom genskom sekvencijom, dok je genom virusa iz 2016. godine imao 99% sličnost sekvenciji izolata iz Austrije i Češke (Anđelić Dmitrović i sur., 2025). U Italiji je 1998. genotip WNV L1 uzrokovao nekoliko neuroloških oboljenja i uginuća konja, kao i slučajeve WNND u 2008. na sjeveru zemlje. Genotip WNV L1 je postao endemičan i proširio se po cijeloj Italiji (Mencattelli i sur., 2023). Prvi slučajevi genotipa WNV L2 prijavljeni su 2011. godine od kada se ovaj genotip brzo proširio i potpuno zamijenio genotip WNV L1, koji se tek sporadično pojavljivao, sve do 2020. godine kada se ponovo javlja i nadalje cirkulira zajedno s genotipom WNV L2 u Italiji (Mencattelli i sur., 2023, Veo i sur., 2019). U Mađarskoj je prema radu Bakonyi i sur. (2013) genotip WNV L2 prvi puta izoliran 2004. godine od kada je uzrokovao sporadične slučajeve WNND kod jastrebovki, no već 2008. godine je izazvao eksploziju WNND kod divljih ptica (25), konja (12) i ljudi (22). U

svim je uzorcima utvrđen genotip WNV L2 koji je filogenetski bio najbliži izolatu virusa iz 2004. godine (Bakonyi i sur., 2013). Istraživanjem Nagy i sur. (2019) u 34 bolesnika s infekcijom WNV napravljeno je parcijalno sekvenciranje NS3 protein-kodirajuće regije genoma WNV i u svim uzorcima potvrđen je WNV L2 (GenBank Acc. No.: MK224611–MK224644) (Nagy i sur., 2019). Ista grupa znanstvenika sekvenciranjem je u 10 uzoraka bolesnika s infekcijom virusom WNV, koji su sakupljeni u periodu od 2015. do 2022. godine, potvrdila genotip WNV L2 (Nagy i sur., 2023). Prema literaturnim podacima Srbija je među europskim zemljama koje su u 2018. godini prijavile najveći broj slučajeva infekcija virusom WNV. Istraživanjem koje je provedeno unazad dvije godine, analizirane su sekvencije NS5 gena u 50 uzoraka i u svim je uzorcima potvrđen genotip L2 (Suka i sur., 2024). Virus WNV L2 u Austriji prvi je puta zabilježen 2008. godine, u istočnom dijelu zemlje kod divljih ptica, uglavnom jastrebovki, te komaraca, dok su tri autohtone infekcije kod ljudi potvrđene 2009.-dvije i 2010. - jedna (de Heus i sur., 2020). Prema istraživanju provedenom u Austriji od 2009. do 2024. Florian i sur. (2025) utvrdili su 66 slučajeva infekcije virusom WNV, od kojih je 63 bilo autohtonih, a dva uvezena slučaja te su svi bili genotipa WNV L2, dok je jedan uvezeni, kod putnika koji je doputovao iz Indije, bio genotip WNV L1 (Florian i sur., 2026). U nedavnom istraživanju provedenom 2023. i 2024. u Njemačkoj, kod 86 uzoraka uginulih i živih ptica u okviru nacionalnog programa prevencije zaraze arbovirusima, utvrđen je virus WNV L2 (Schwarzer i sur., 2025). Schneider i sur. (2022) dokazali su kod bolesnika transplantiranog s bubregom, autohtonu infekciju virusom WNV L2 u Njemačkoj (Schneider i sur., 2022). U istraživanju koje su proveli Knap i sur. (2020) na poolovima komaraca i uzorku urina bolesnika s WNND utvrđena je prisutnost genotipa WNV L2 koji je nakon filogenetske analize sekvencije iz uzorka bolesnika bio najbliži virusu iz Mađarske, dok je sekvencija iz poola komaraca bila najbliža sekvenciji iz Austrije (Knap i sur., 2020). Prema podacima istraživanja koje su u Grčkoj proveli Athanasakopoulou i sur. (2025), prvi serološki pozitivni uzorci na antitijela protiv WNV zabilježena su 2009. godine kod ptica, a 2010. je prvi puta molekularno određen genotip WNV L2, također kod ptica i komaraca (Athanasakopoulou i sur., 2023). U istraživanju koju su proveli Tsioka i sur. (2025) na uzorku od 45.988 jedinki komaraca *Culex pipiens*, sakupljenih u Grčkoj na više lokacija, raspoređenih u 1.316 *poolova*, u 41 *poolu* je utvrđena WNV RNA. Sekvenciranjem cijelog genoma metodom sekvenciranja nove generacije, NGS (NGS, eng. *New Generation Sequencing*), u devet WNV RNA pozitivnih *poolova* komaraca, koji su uzeti za analizu, utvrđen je genotip WNV L2. Detekcija WNV RNA u komarcima prethodila je pojavi simptoma kod ljudi, koji su uslijedili za 15–30 dana (Tsioka i sur., 2025).

Na cirkulaciju virusa WNV u prirodi utječu sezonske, klimatske i okolišne promjene. Blage zime i sve dulji topli periodi potiču aktivnost komaraca i produljuju periode mogućeg prijenosa infekcije komarcima (Singh i sur., 2025). U istraživanju koje su proveli Marini i sur., dokazano je kako je temperatura zraka u proljeće ključna za epidemiologiju virusa WNV i kako topliji uvjeti mogu imati za posljedicu povećanu stopu prijenos infekcije virusom (Marini i sur., 2024). Općenito je temperatura jedan od najznačajnijih klimatskih čimbenika koji utječu na cirkulaciju virusa i postoji pozitivna korelacija temperature te WNV-pozitivnih komaraca i broja slučajeva infekcije virusom WNV u ljudi. Globalnim zagrijavanjem i porastom temperature okoliša, očekuje se povećanje cirkulacije virusa WNV u prirodi, a onda i broja zaraza virusom WNV u ljudi (Calzolari i sur., 2020).

Entomološki nadzor i praćenje mortaliteta ptica dobri su rani indikatori prisustva virusa WNV u prirodi određenog zemljopisnog područja. U srednjoj Europi, neke su ptičje vrste, kao npr. jastreb i ostale ptice grabljivice izrazito osjetljive na infekciju virusom genotipa WNV L2. Kao posljedica infekcije virusom WNV, u ptica se najčešće razvije neuroinvazivna bolest s fatalnim ishodom (Kolodziejek i sur., 2018). Kako još uvijek ne postoji odobreno cjepivo protiv virusa WNV, kontrola vektora – prvenstveno suzbijanje populacija komaraca, najvažniji je način prevencije infekcije virusom WNV. U novije vrijeme primjenjuju se metode genske modifikacije komaraca i novi insekticidi. Kako bi sprječavanje infekcije virusom WNV bilo uspješno potrebna je primjena strategije „jednog zdravlja“ (eng. *One Health*), koja integrira humane, animalne i okolišne zdravstvene koncepte (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2024, Singh i sur., 2025). Suradnja javno-zdravstvenih i veterinarskih službi, te nadležnih institucija za praćenje i kontrolu virusnih vektora, neophodna je za sveobuhvatno razumijevanje epidemiološke situacije i donošenje odgovarajućih mjera u cilju zaštite zdravlja (Gossner i sur., 2017).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na stalnu prisutnost virusa WNV-a u Hrvatskoj. Utvrđeno je kako u hrvatskoj zdravoj populaciji cirkulira virus genotipa WNV L2. Ovaj genotip prisutan je u ostalim europskim i Hrvatskoj susjednim zemljama. Sezonsko ID-NAT testiranje DDK na virus WNV koje je započelo 2018. godine dodatno je doprinjelo sigurnosti krvi i transfuzijskog liječenja u Hrvatskoj.

## 6. Zaključak

1. Analiza sekvencija *metiltransferazne regije* unutar *ORF1* virusa HEV i *prM/M* gena virusa WNV pokazala je srodnost s virusima prisutnim u Europi.
2. Ovim istraživanjem dokazano je kako virus HEV pripada genotipu HEV 3c koji je uz genotip HEV 3a najčešći u Hrvatskoj. Virusni genotip HEV 3c najčešći je u Engleskoj, Njemačkoj i Nizozemskoj, dok je vrlo čest u Poljskoj, Španjolskoj/Kataloniji i Francuskoj.
3. Utvrđena je srodnost virusa HEV sa životinjskim sojevima u svinja podrijetlom iz Hrvatske, Njemačke i Nizozemske.
4. Ovim istraživanjem prvi je puta određena prevalencija virusa HEV u zdravoj populaciji u Hrvatskoj. Stopa prevalencije virusa HEV u Hrvatskoj podjednaka je prevalenciji virusa u pojedinim zemljama Europe, a manja je u odnosu na Njemačku, Nizozemsku i Francusku. Usporedba sa susjednim zemljama Jugoistočne Europe nije moguća jer ne postoje literaturni podatci.
5. Dokazano je kako virus WNV pripada genotipu WNV L2 koji je najčešći genotip u Europi.
6. Analizom odsječka WNV gena *prM/M*, utvrđena je identičnost s izolatima bolesnika s infekcijom virusom WNV u Hrvatskoj i s izolatima iz Mađarske, te izolatima iz komaraca u Hrvatskoj. Utvrđena je velika sličnost s izolatima iz Italije i Srbije od kojih se uzorci DDK razlikuju u jednom, odnosno dva nukleotida.

## 7. Popis literature

- Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J. H., Zoufaly, A., Hourfar, M. K., Weidner, L., & Nowotny, N. (2018). Increase in human West Nile and Usutu virus infections in Austria, 2018. *Eurosurveillance*, *23*, 3–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Alsaleh, K., Khou, C., Frenkiel, M. P., Lecollinet, S., Vázquez, A., de Arellano, E. R., Després, P., & Pardigon, N. (2016). The E glycoprotein plays an essential role in the high pathogenicity of European-Mediterranean IS98 strain of West Nile virus. *Virology*, *492*, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.009>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andelić Dmitrović, B., Bodulić, K., & Kurolt, I. C. (2025). Phylogenomic insights into West Nile virus lineage 2 circulating in Croatia. *Virology Journal*, *22*. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-02756-0>
- Angeloni, G., Bertola, M., Lazzaro, E., Morini, M., Masi, G., Sinigaglia, A., Trevisan, M., Gossner, C. M., Haussig, J. M., Bakonyi, T., Capelli, G., & Barzon, L. (2023). Epidemiology, surveillance and diagnosis of Usutu virus infection in the EU/EEA, 2012 to 2021. *Eurosurveillance*, *28*, 1–9. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.33.2200929>
- Athanasakopoulou, Z., Sofia, M., Skampardonis, V., Giannakopoulos, A., Birtsas, P., Tsolakos, K., Spyrou, V., Chatzopoulos, D. C., Satra, M., Diamantopoulos, V., Mpellou, S., Galamatis, D., G. Papatsiros, V., & Billinis, C. (2023). Indication of West Nile Virus (WNV) Lineage 2 Overwintering among Wild Birds in the Regions of Peloponnese and Western Greece. *Veterinary Sciences*, *10*. <https://doi.org/10.3390/vetsci10110661>
- Bakonyi, T., Ferenczi, E., Erdélyi, K., Kutasi, O., Csörgő, T., Seidel, B., Weissenböck, H., Brugger, K., Bán, E., & Nowotny, N. (2013). Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Veterinary Microbiology*, *165*, 61–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.03.005>
- Barnaud, E., Rogée, S., Garry, P., Rose, N., & Pavio, N. (2012). Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 78, 5153–5159. <https://doi.org/10.1128/AEM.00436-12>

- Beasley, D. W. C., Whiteman, M. C., Zhang, S., Huang, C. Y.-H., Schneider, B. S., Smith, D. R., Gromowski, G. D., Higgs, S., Kinney, R. M., & Barrett, A. D. T. (2005). Envelope Protein Glycosylation Status Influences Mouse Neuroinvasion Phenotype of Genetic Lineage 1 West Nile Virus Strains. *Journal of Virology*, 79, 8339–8347. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.13.8339-8347.2005>
- Behrendt, P., Bremer, B., Todt, D., Brown, R. J. P., Heim, A., Manns, M. P., Steinmann, E., & Wedemeyer, H. (2016). Hepatitis E Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate between Acute and Chronic HEV Infection. *Journal of Infectious Diseases*, 214, 361–368. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw161>
- Benzarti, E., Murray, K. O., & Ronca, S. E. (2023). Interleukins, Chemokines, and Tumor Necrosis Factor Superfamily Ligands in the Pathogenesis of West Nile Virus Infection. *Viruses*, 15. <https://doi.org/10.3390/v15030806>
- Bes, M., Costafreda, M. I., Riveiro-Barciela, M., Piron, M., Rico, A., Quer, J., Puig, L., & Sauleda, S. (2022). Effect of Hepatitis E Virus RNA Universal Blood Donor Screening, Catalonia, Spain, 2017-2020. *Emerging Infectious Diseases*, 28, 157–165. <https://doi.org/10.3201/eid2801.211466>
- Bi, H., Yang, R., Wu, C., & Xia, J. (2020). Hepatitis E Virus and Blood Transfusion Safety. *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0950268820001429>
- Boland, F., Martinez, A., Pomeroy, L., & O’Flaherty, N. (2019). Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46, 95–103. <https://doi.org/10.1159/000499121>
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., ... Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: Perspectives for drug design. *Antiviral Research*, 87, 125–148. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.11.009>
- Bose, P. D., Das, B. C., Hazam, R. K., Kumar, A., Medhi, S., & Kar, P. (2014). Evidence of extrahepatic replication of hepatitis E virus in human placenta. *The Journal of General Virology*, 95, 1266–1271. <https://doi.org/10.1099/vir.0.063602-0>

- Busch, M. P., Wright, D. J., Custer, B., Tobler, L. H., Stramer, S. L., Kleinman, S. H., Prince, H. E., Bianco, C., Foster, G., Petersen, L. R., Nemo, G., & Glynn, S. A. (2006). West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerging Infectious Diseases*, *12*, 395–402. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051287>
- Calzolari, M., Angelini, P., Bolzoni, L., Bonilauri, P., Cagarelli, R., Canziani, S., Cereda, D., Cerioli, M. P., Chiari, M., Galletti, G., Moirano, G., Tamba, M., Torri, D., Trogu, T., Albieri, A., Bellini, R., & Lelli, D. (2020). Enhanced West Nile Virus Circulation in the Emilia-Romagna and Lombardy Regions (Northern Italy) in 2018 Detected by Entomological Surveillance. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00243>
- Cancela, F., Noceti, O., Arbiza, J., & Mirazo, S. (2022). Structural aspects of hepatitis E virus. *Archives of Virology*, *167*, 2457–2481. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05575-8>
- Cao, D., & Meng, X. J. (2012). Molecular biology and replication of hepatitis E virus. *Emerging Microbes and Infections*, *1*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/emi.2012.7>
- Chang, Y.-S., Liao, C.-L., Tsao, C.-H., Chen, M.-C., Liu, C.-I., Chen, L.-K., & Lin, Y.-L. (1999). Membrane Permeabilization by Small Hydrophobic Nonstructural Proteins of Japanese Encephalitis Virus. *Journal of Virology*, *73*, 6257–6264. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.8.6257-6264.1999>
- Chowers, M. Y., Lang, R., Nassar, F., Ben-David, D., Giladi, M., Rubinshtein, E., Itzhaki, A., Mishal, J., Siegman-Igra, Y., Kitzes, R., Pick, N., Landau, Z., Wolf, D., Bin, H., Mendelson, E., Pitlik, S. D., & Weinberger, M. (2001). Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerging Infectious Diseases*, *7*, 675–678. <https://doi.org/10.3201/eid0704.017414>
- Ciccozzi, M., Peletto, S., Cella, E., Giovanetti, M., Lai, A., Gabanelli, E., Acutis, P. L., Modesto, P., Rezza, G., Platonov, A. E., Lo Presti, A., & Zehender, G. (2013). Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infection, Genetics and Evolution*, *17*, 46–50. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.034>
- Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R., & Fikrig, E. (2012). West Nile virus: Biology, transmission, and human infection. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*, 635–648. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-12>
- D'amore, C., Grimaldi, P., Ascione, T., Conti, V., Sellitto, C., Franci, G., Kafil, S. H., &

- Pagliano, P. (2023). West Nile Virus diffusion in temperate regions and climate change. A systematic review. *Infezioni in Medicina*, 31, 20–30. <https://doi.org/10.53854/liim-3101-4>
- Dalton, H. R., Kamar, N., Baylis, S. A., Moradpour, D., Wedemeyer, H., Negro, F., & Association, E. (2018). Clinical Practice Guidelines OF HEPATOLOGY EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *Journal of Hepatology*, 68, 1256–1271. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
- Dalton, H. R., Kamar, N., van Eijk, J. J. J., Mclean, B. N., Cintas, P., Bendall, R. P., & Jacobs, B. C. (2016). Hepatitis E virus and neurological injury. *Nature Reviews. Neurology*, 12, 77–85. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.234>
- Dalton, H. R., & Seghatchian, J. (2016). Hepatitis E virus: Emerging from the shadows in developed countries. *Transfusion and Apheresis Science*, 55, 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2016.10.016>
- Das, A., Maury, W., & Lemon, M. (2019). TIM1 (HAVCR1): an Essential "Receptor" or an "Accessory Attachment Factor" for Hepatitis A Virus? *Journal of Virology*, 93, 10-12. <https://doi.org/10.1128/JVI.01793-18>
- Das, A., Rivera-Serrano, E. E., Yin, X., Walker, C. M., Feng, Z., & Lemon, S. M. (2023). Cell entry and release of quasi-enveloped human hepatitis viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 21, 573–589. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00889-z>
- Das, R., Loughran, K., Murchison, C., Qian, F., Leng, L., Song, Y., Montgomery, R. R., Loeb, M., & Bucala, R. (2016). Association between high expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) alleles and West Nile virus encephalitis. *Cytokine*, 78, 51–54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.11.021>
- de Heus, P., Kolodziejek, J., Camp, J. V., Dimmel, K., Bagó, Z., Hubálek, Z., van den Hoven, R., Cavalleri, J. M. V., & Nowotny, N. (2020). Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67, 1189–1197. <https://doi.org/10.1111/tbed.13452>
- De Sabato, L., Monini, M., Galuppi, R., Dini, F. M., Ianiro, G., Vaccari, G., Ostanello, F., & Di Bartolo, I. (2024). Investigating the Hepatitis E Virus (HEV) Diversity in Rat Reservoirs from Northern Italy. *Pathogens*, 13.

<https://doi.org/10.3390/pathogens13080633>

- de Vos, A. S., Janssen, M. P., Zaaier, H. L., & Hogema, B. M. (2017). Cost-effectiveness of the screening of blood donations for hepatitis E virus in the Netherlands. *Transfusion*, *57*, 258–266. <https://doi.org/10.1111/trf.13978>
- Debing, Y., Moradpour, D., Neyts, J., & Gouttenoire, J. (2016). Update on hepatitis E virology: Implications for clinical practice. *Journal of Hepatology*, *65*, 200–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.045>
- Denner, J., Pischke, S., Steinmann, E., Blümel, J., & Glebe, D. (2019). Why all blood donations should be tested for hepatitis E virus (HEV). *BMC Infectious Diseases*, *19*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4190-1>
- Diagne, M. M., Henriette, M., Ndione, D., Mencattelli, G., Diallo, A., Ndiaye, E., Domenico, M. Di, Diallo, D., Kane, M., Curini, V., Top, N. M., Marcacci, M., Mbanne, M., Ancora, M., Secondini, B., Lollo, V. Di, Teodori, L., Leone, A., Puglia, I., ... Faye, O. (2023). *Viruses*, *15*, 1261. <https://doi.org/10.3390/v15061261>
- Ding, Q., Heller, B., Capuccino, J. M. V., Song, B., Nimgaonkar, I., Hrebikova, G., Contreras, J. E., & Ploss, A. (2017). Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(5), 1147–1152. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614955114>
- Domanović, D., Gossner, C. M., Lieshout-Krikke, R., Mayr, W., Baroti-Toth, K., Dobrota, A. M., Escoval, M. A., Henseler, O., Jungbauer, C., Liumbruno, G., Oyonarte, S., Politis, C., Sandid, I., Vidović, M. S., Young, J. J., Ushiro-Lumb, I., & Nowotny, N. (2019). West Nile and Usutu virus infections and challenges to blood safety in the European Union. *Emerging Infectious Diseases*, *25*, 1050–1057. <https://doi.org/10.3201/eid2506.181755>
- Domanović, D., Tedder, R., Blumel, J., Zaaier, H., Gallian, P., Niederhauser, C., Sauleda Oliveras, S., O’Riordan, J., Boland, F., Harritshoj, L., Nascimento, M. S. J., Ciccaglione, A. R., Politis, C., Adlhoch, C., Flan, B., Oualikene-Gonin, W., Rautmann, G., Strengers, P., & Hewitt, P. (2017). Hepatitis E and blood donation safety in selected European countries: A shift to screening? *Eurosurveillance*, *22*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.16.30514>
- Dreier, J., Vollmer, T., Hinse, D., Heuser, E. J., Pisani, G., & Knabbe, C. (2016). Implementation of NAT Screening for West Nile Virus and Experience with Seasonal

- Testing in Germany. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43, 28–36. <https://doi.org/10.1159/000440833>
- Driouich, J. S., Moureau, G., De Lamballerie, X., & Nougairède, A. (2019). Reverse Genetics of RNA viruses: ISA-based approach to control viral population diversity without modifying virus phenotype. *Viruses*, 11, 666–677. <https://doi.org/10.3390/v11070666>
- Emerson, S. U., Nguyen, H., Graff, J., Stephany, D. A., Brockington, A., & Purcell, R. H. (2004). In Vitro Replication of Hepatitis E Virus (HEV) Genomes and of an HEV Replicon Expressing Green Fluorescent Protein. *Journal of Virology*, 78, 4838–4846. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4838-4846.2004>
- Escribano-Romero, E., De Oya, N. J., Domingo, E., & Saiza, J. C. (2017). Extinction of West Nile virus by favipiravir through lethal mutagenesis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01400-17>
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2024). *ECDC One Health Framework*. May, 1–17. <https://doi.org/10.2900/634973>
- European Parliament. (2014). COMMISSION DIRECTIVE 2014/110/EU of 17 December 2014 amending Directive 2004/33/EC as regards temporary deferral criteria for donors of allogeneic blood donations Text with EEA relevance. *Official Journal of the European Union*, L(366), 81–82. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/commission-directive-2004/33/ec-22-march-2004-implementing-directive-2002/98/ec-european-parliament-council-regards-certain-technical-requirements-blood-blood-components\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/commission-directive-2004/33/ec-22-march-2004-implementing-directive-2002/98/ec-european-parliament-council-regards-certain-technical-requirements-blood-blood-components_en.pdf)
- Evans, J. D., & Seeger, C. (2007). Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *Journal of Virology*, 81, 11809–11816. <https://doi.org/10.1128/jvi.00791-07>
- Fernández-Sanlés, A., Ríos-Marco, P., Romero-López, C., & Berzal-Herranz, A. (2017). Functional information stored in the conserved structural RNA domains of flavivirus genomes. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00546>
- Fiacre, L., Pagès, N., Albina, E., Richardson, J., Lecollinet, S., & Gonzalez, G. (2020). Molecular determinants of West Nile virus virulence and pathogenesis in vertebrate and invertebrate hosts. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–35. <https://doi.org/10.3390/ijms21239117>

- Fischer, C., Hofmann, M., Danzer, M., Hofer, K., Kaar, J., & Gabriel, C. (2015). Seroprevalence and incidence of hepatitis E in blood donors in Upper Austria. *PLoS ONE*, *10*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119576>
- Florian, D. M., Camp, J. V., Jungbauer, C., Werber, D., Reich, A., Stiasny, K., Aberle, S. W., & Aberle, J. H. (2026). Increased incidence of human West Nile and Usutu infections in Austria, 2024: analysis of data from 2009 to 2024. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, *31*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2026.31.1.2500260>
- Frank, C., Schmidt-Chanasit, J., Ziegler, U., Lachmann, R., Preußel, K., & Offergeld, R. (2022). West Nile Virus in Germany: An Emerging Infection and Its Relevance for Transfusion Safety. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *49*, 192–203. <https://doi.org/10.1159/000525167>
- Fu, R. M., Decker, C. C., & Dao Thi, V. L. (2019). Cell culture models for hepatitis E virus. *Viruses*, *11*, 1–22. <https://doi.org/10.3390/v11070608>
- Gallian, P., Couchouron, A., Dupont, I., Fabra, C., Piquet, Y., Djoudi, R., Assal, A., & Tiberghien, P. (2017). Comparison of hepatitis E virus nucleic acid test screening platforms and RNA prevalence in French blood donors. *Transfusion*, *57*, 223–224. <https://doi.org/10.1111/TRF.13889>
- Gallian, P., Pouchol, E., Djoudi, R., Lhomme, S., Mouna, L., Gross, S., Bierling, P., Assal, A., Kamar, N., Mallet, V., Roque-Afonso, A. M., Izopet, J., & Tiberghien, P. (2019). Transfusion-Transmitted Hepatitis E Virus Infection in France. In *Transfusion Medicine Reviews*, *33*, 146–153. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.06.001>
- Garbuglia, A. R., Koja, G., Villano, U., Minosse, C., Equestre, M., Pauciullo, S., Coppola, A., Madonna, E., Picchi, G., Di Biase, J., Dalessandro, M., Rughetti, A., Casinelli, K., Camilloni, B., Mariani, R., Grimaldi, A., Ciccaglione, A. R., & Bruni, R. (2025). HEV-3 subtypes and strains detected in cases of HEV infection in central Italy from 2015 to 2023. *Infection*, *53*, 523–534. <https://doi.org/10.1007/s15010-024-02348-0>
- Garcia, M., Alout, H., Diop, F., Damour, A., Bengue, M., Weill, M., Missé, D., Lévêque, N., & Bodet, C. (2018). Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00387>

- Gossner, C., Marrama, L., Carson, M., Allerberger, F., Calistri, P., Dilaveris, D., Lecollinet, S., Morgan, D., Nowotny, N., Paty, M., Pervanidou, D., Rizzo, C., Roberts, H., Schmoll, F., Van Bortel, W., & Gervelmeyer, A. (2017). West Nile virus surveillance in Europe: moving towards an integrated animal-human-vector approach. *Euro Surveill*, *22*, 30526. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.18.30526>
- Grabarczyk, P., Sulkowska, E., Gdowska, J., Kopacz, A., Liszewski, G., Kubicka-Russel, D., Baylis, S. A., Corman, V. M., Noceń, E., Piotrowski, D., Antoniewicz-Papis, J., & Letowska, M. (2018). Molecular and serological infection marker screening in blood donors indicates high endemicity of hepatitis E virus in Poland. *Transfusion*, *58*, 1245-1253. <https://doi.org/10.1111/trf.14531>
- Guu, T. S. Y., Liu, Z., Ye, Q., Mata, D. A., Li, K., Yin, C., Zhang, J., & Tao, Y. J. (2009). Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*, 12992–12997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106>
- Guzman-Martinez, L., Maccioni, R. B., Andrade, V., Navarrete, L. P., Pastor, M. G., & Ramos-Escobar, N. (2019). Neuroinflammation as a common feature of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology*, *10*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01008>
- Habarugira, G., Suen, W. W., Hobson-Peters, J., Hall, R. A., & Bielefeldt-Ohmann, H. (2020). West Nile virus: An update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and “One health” implications. *Pathogens*, *9*, 1–51. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>
- Haenni, A., Monod, I. J., & Cedex, P. (1997). Virus-Encoded RNA Helicases. *Journal of Virology*, *71*, 2583–2590. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.4.2583-2590.1997>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95-98. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:82421255>
- Hanna, S. L., Pierson, T. C., Sanchez, M. D., Ahmed, A. A., Murtadha, M. M., & Doms, R. W. (2005). N-Linked Glycosylation of West Nile Virus Envelope Proteins Influences Particle Assembly and Infectivity. *Journal of Virology*, *79*, 13262–13274. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.21.13262-13274.2005>
- Harritshøj, L. H., Holm, D. K., Sækmose, S. G., Jensen, B. A., Hogema, B. M., Fischer, T. K.,

- Midgley, S. E., Krog, J. S., Erikstrup, C., & Ullum, H. (2016). Low transfusion transmission of hepatitis E among 25,637 single-donation, nucleic acid-tested blood donors. *Transfusion*, *56*, 2225–2232. <https://doi.org/10.1111/trf.13700>
- Harvala, H., Hewitt, P. E., Reynolds, C., Pearson, C., Haywood, B., Tettmar, K. I., Ushiro-Lumb, I., Brailsford, S. R., Tedder, R., & Ijaz, S. (2019). Hepatitis E virus in blood donors in England, 2016 to 2017: From selective to universal screening. *Eurosurveillance*, *24*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.10.1800386>
- Hayes, C., Stephens, L., Fridey, J. L., Snyder, R. E., Groves, J. A., Stramer, S. L., & Klapper, E. (2020). Probable transfusion transmission of West Nile virus from an apheresis platelet that screened non-reactive by individual donor-nucleic acid testing. *Transfusion*, *60*, 424–429. <https://doi.org/10.1111/trf.15568>
- Hewitt, P. E., Ijaz, S., Brailsford, S. R., Brett, R., Dicks, S., Haywood, B., Kennedy, I. T. R., Kitchen, A., Patel, P., Poh, J., Russell, K., Tettmar, K. I., Tossell, J., Ushiro-Lumb, I., & Tedder, R. S. (2014). Hepatitis E virus in blood components: A prevalence and transmission study in southeast England. *The Lancet*, *384*, 1766–1773. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61034-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61034-5)
- Hoffman, K. W., Lee, J. J., Foster, G. A., Kryzstof, D., Stramer, S. L., & Lim, J. K. (2019). Sex differences in cytokine production following West Nile virus infection: Implications for symptom manifestation. *Pathogens and Disease*, *77*, 1–6. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftz016>
- Hogema, B. M., Hakze-Van der Honing, R. W., Molier, M., Zaaijer, H. L., & van der Poel, W. H. M. (2021). Comparison of hepatitis E virus sequences from humans and swine, the Netherlands, 1998–2015. *Viruses*, *13*, 1–9. <https://doi.org/10.3390/v13071265>
- Hogema, B. M., Molier, M., Sjerps, M., De Waal, M., Van Swieten, P., Van De Laar, T., Molenaar-De Backer, M., & Zaaijer, H. L. (2016). Incidence and duration of hepatitis E virus infection in Dutch blood donors. *Transfusion*, *5*, 722–728. <https://doi.org/10.1111/trf.13402>
- Huang, S., Zhang, X., Jiang, H., Yan, Q., Ai, X., Wang, Y., Cai, J., Jiang, L., Wu, T., Wang, Z., Guan, L., Wai Kuo Shih, J., Ng, M. H., Zhu, F., Zhang, J., & Xia, N. (2010). Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS ONE*, *5*, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013560>

- Hyams, C., Mabayoje, D. A., Copping, R., Maranao, D., Patel, M., Labbett, W., Haque, T., & Webster, D. P. (2014). Serological cross-reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *Journal of Medical Virology*, *86*, 478–483. <https://doi.org/10.1002/jmv.23827>
- Jackson, A. C. (2004). Therapy of West Nile virus infection. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, *31*, 131–134. <https://doi.org/10.1017/S0317167100053749>
- Jelicic, P., Ferenc, T., Mrzljak, A., Jemersic, L., Janev-Holcer, N., Milosevic, M., Bogdanic, M., Barbic, L., Kolaric, B., Stevanovic, V., Vujica, M., Jurekovic, Z., Saric, J. P., Vilibic, M., & Vilibic-Cavlek, T. (2022). Insights into hepatitis E virus epidemiology in Croatia. *World Journal of Gastroenterology*, *28*, 5494–5505. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i37.5494>
- Jemeršić, L., Prpić, J., Brnić, D., Keros, T., Pandak, N., & Đaković Rode, O. (2019). Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017. *BMC Infectious Diseases*, *19*, 269. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3906-6>
- Jiménez De Oya, N., Escribano-Romero, E., Blázquez, A.-B., Martín-Acebes, M. A., & Saiz, J.-C. (2019). Current Progress of Avian Vaccines Against West Nile Virus. *Vaccines*, *7*, 126. <https://doi.org/10.3390/vaccines7040126>
- John, L., Thomas, S., Herchenröder, O., Pützer, B. M., & Schaefer, S. (2011). Hepatitis E virus ORF2 protein activates the pro-apoptotic gene CHOP and anti-apoptotic heat shock proteins. *PLoS ONE*, *6*, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025378>
- Jothikumar, N., Cromeans, T. L., Robertson, B. H., Meng, X. J., & Hill, V. R. (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods*, *131*, 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., & Jameel, S. (2009). Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *Journal of Virology*, *83*, 12714–12724. <https://doi.org/10.1128/jvi.00717-09>
- Kamar, N., Rostaing, L., Legrand-Abravanel, F., & Izopet, J. (2013). How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *American Journal of*

*Transplantation*, 13, 1935–1936. <https://doi.org/10.1111/ajt.12253>

- Kamar, N., Abravanel, F., Behrendt, P., Hofmann, J., Pageaux, G. P., Barbet, C., Moal, V., Couzi, L., Horvatits, T., de Man, R. A., Cassuto, E., Elsharkawy, A. M., Riezebos-Brilman, A., Scemla, A., Hillaire, S., Donnelly, M. C., Radenne, S., Sayegh, J., Garrouste, C., ... Izopet, J. (2020). Ribavirin for hepatitis E virus infection after organ transplantation: A large European retrospective multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*, 71, 1204–1211. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz953>
- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N. S., Ijaz, S., Izopet, J., & Dalton, H. R. (2012). Hepatitis E. *The Lancet*, 379, 2477–2488. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7)
- Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F., & Izopet, J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 27, 116–138. <https://doi.org/10.1128/CMR.00057-13>
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J.-M., Ouezzani, L., Péron, J.-M., Guitard, J., Cointault, O., Esposito, L., Abravanel, F., Danjoux, M., Durand, D., Vinel, J.-P., Izopet, J., & Rostaing, L. (2008). Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *New England Journal of Medicine*, 358, 811–817. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0706992>
- Karim, S. U., & Bai, F. (2023). Introduction to West Nile Virus. *Methods in Molecular Biology*, 2585, 1–7. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2760-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2760-0_1)
- Kenney, S. P., & Meng, X. J. (2019). Hepatitis E virus genome structure and replication strategy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031724>
- Klema, V. J., Ye, M., Hindupur, A., Teramoto, T., Gottipati, K., Padmanabhan, R., & Choi, K. H. (2016). Dengue Virus Nonstructural Protein 5 (NS5) Assembles into a Dimer with a Unique Methyltransferase and Polymerase Interface. *PLoS Pathogens*, 12, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005451>
- Klobucar, A., Savic, V., Posavec, M. C., Petrinic, S., Kuhar, U., Toplak, I., Madic, J., & Vilibic-Cavlek, T. (2021). Screening of mosquitoes for West Nile virus and Usutu virus in Croatia, 2015–2020. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6, 2015–2020. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6020045>
- Knap, N., Korva, M., Ivočić, V., Kalan, K., Jelovšek, M., Sagadin, M., Zakotnik, S., Smrdel,

- K. S., Slunečko, J., & Avšič-Županc, T. (2020). West Nile Virus in Slovenia. *Viruses*, *12*, 1–11. <https://doi.org/10.3390/v12070720>
- Koch, R. T., Erazo, D., Folly, A. J., Johnson, N., Dellicour, S., Grubaugh, D., Vogels, C. B. F., & Epidemiology, S. (2024). Genomic epidemiology of West Nile virus in Europe. *One Health*, *18*, 100664. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100664>
- Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Aberle, S. W., Allerberger, F., Bagó, Z., Camp, J. V., Dimmel, K., De Heus, P., Kolodziejek, M., Schiefer, P., Seidel, B., Stiasny, K., & Nowotny, N. (2018). Integrated analysis of human-animal-vector surveillance: West Nile virus infections in Austria, 2015-2016. *Emerging Microbes and Infections*, *7*. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0021-5>
- Kolodziejek, J., Seidel, B., Jungbauer, C., Dimmel, K., Kolodziejek, M., Rudolf, I., Hubálek, Z., Allerberger, F., & Nowotny, N. (2015). West Nile virus positive blood donation and subsequent entomological investigation, Austria, 2014. *PLoS ONE*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126381>
- Lei, Q., Li, L., Zhang, S., Li, T., Zhang, X., Ding, X., & Qin, B. (2018). HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways. *Scientific Reports*, *8*, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26975-4>
- Lemon, S. M., & Walker, C. M. (2019). Enterically Transmitted Non-A, Non-B Hepatitis and the Discovery of Hepatitis E Virus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *9*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033449>
- Leung, J. Y., Pijlman, G. P., Kondratieva, N., Hyde, J., Mackenzie, J. M., & Khromykh, A. A. (2008). Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology*, *82*(10), 4731–4741. <https://doi.org/10.1128/jvi.00002-08>
- Lhomme, S., Miguères, M., Abravanel, F., Marion, O., Kamar, N., & Izopet, J. (2020). Hepatitis E Virus: How It Escapes Host Innate Immunity. *Vaccines*, *8*, 422. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030422>
- Lhomme, S., Marion, O., Abravanel, F., Chapuy-Regaud, S., Kamar, N., & Izopet, J. (2016). Hepatitis E pathogenesis. *Viruses*, *8*, 1–18. <https://doi.org/10.3390/v8080212>
- Li, P., Liu, J., Li, Y., Su, J., Ma, Z., Bramer, W. M., Cao, W., de Man, R. A., Peppelenbosch,

- M. P., & Pan, Q. (2020). The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver International*, 40, 1516–1528. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
- Li, Y., Qu, C., Yu, P., Ou, X., Pan, Q., & Wang, W. (2019). The interplay between host innate immunity and hepatitis E virus. *Viruses*, 11, 1–12. <https://doi.org/10.3390/v11060541>
- Liu, W. J., Chen, H. B., Wang, X. J., Huang, H., & Khromykh, A. A. (2004). Analysis of Adaptive Mutations in Kunjin Virus Replicon RNA Reveals a Novel Role for the Flavivirus Nonstructural Protein NS2A in Inhibition of Beta Interferon Promoter-Driven Transcription. *Journal of Virology*, 78, 12225–12235. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.22.12225-12235.2004>
- Locus, T., Lambrecht, E., Peeters, M., Suin, V., Verhaegen, B., Van Hoorde, K., Lamoral, S., Vanwolleghe, T., & Van Gucht, S. (2023). Hepatitis E virus in pork meat products and exposure assessment in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 397, 110198. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110198>
- Lu, L., Zhang, F., Munnink, B. B. O., Munger, E., Sikkema, R. S., Pappa, S., Tsioka, K., Sinigaglia, A., Dal Molin, E., Shih, B. B., Günther, A., Pohlmann, A., Ziegler, U., Beer, M., Taylor, R. A., Bartumeus, F., Woolhouse, M., Aarestrup, F. M., Barzon, L., ... Koopmans, M. P. G. (2024). West Nile virus spread in Europe: Phylogeographic pattern analysis and key drivers. *PLoS Pathogens*, 20, 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011880>
- Lustig, Y., Sofer, D., Bucris, E. D., & Mendelson, E. (2018). Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02421>
- Ma, Z., de Man, R. A., Kamar, N., & Pan, Q. (2022). Chronic hepatitis E: Advancing research and patient care. *Journal of Hepatology*, 77, 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.05.006>
- Madić, J., Savini, G., Di Gennaro, A., Monaco, F., Jukić, B., Kovač, S., Rudan, N., & Listeš, E. (2007). Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Veterinary Record*, 160(22), 772–773. <https://doi.org/10.1136/VR.160.22.772>
- Majumdar, M., Ratho, R. K., Chawla, Y., & Singh, M. P. (2015). Role of TLR gene expression and cytokine profiling in the immunopathogenesis of viral hepatitis E. *Journal of Clinical*

*Virology : The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 73, 8–13. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2015.09.011>

- Marini, G., Drakulovic, M. B., Jovanovic, V., Dagostin, F., Wint, W., Tagliapietra, V., Vasic, M., & Rizzoli, A. (2024). Drivers and epidemiological patterns of West Nile virus in Serbia. *Frontiers in Public Health*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2024.1429583>
- Matsubayashi, K., Nagaoka, Y., Sakata, H., Sato, S., Fukai, K., Kato, T., Takahashi, K., Mishiro, S., Imai, M., Takeda, N., & Ikeda, H. (2004). Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion*, 44, 934–940. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2004.03300.x>
- Melian, E. B., Edmonds, J. H., Nagasaki, T. K., Hinzman, E., Floden, N., & Khromykh, A. A. (2013). West Nile virus NS2A protein facilitates virus-induced apoptosis independently of interferon response. *Journal of General Virology*, 94, 308–313. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047076-0>
- Mencattelli, G., Silverj, A., Iapaolo, F., Ippoliti, C., Teodori, L., Gennaro, A. Di, Curini, V., Candeloro, L., Conte, A., Polci, A., Morelli, D., Perrotta, M. G., Marini, G., Ros, R., Segata, N., Rizzoli, A., Rota-Stabelli, O., & Savini, G. (2022). Epidemiological and Evolutionary Analysis of West Nile Virus Lineage 2 in Italy. *Viruses*, 15, 35. <https://doi.org/10.3390/v15010035>
- Miletić, M., Vuk, T., Hećimović, A., Stojić Vidović, M., Jemersić, L., & Jukić, I. (2019). Estimation of the hepatitis E assay-dependent seroprevalence among Croatian blood donors. *Transfusion Clinique et Biologique*, 26, 229–233. <https://doi.org/10.1016/J.TRACLI.2019.06.234>
- Mishra, N., & Arankalle, V. A. (2011). Association of polymorphisms in the promoter regions of TNF- $\alpha$  (-308) with susceptibility to hepatitis E virus and TNF- $\alpha$  (-1031) and IFN- $\gamma$  (+874) genes with clinical outcome of hepatitis E infection in India. *Journal of Hepatology*, 55, 1227–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.03.023>
- Mrzljak, A., Jemersic, L., Savic, V., Balen, I., Ilic, M., Jurekovic, Z., Pavicic-Saric, J., Mikulic, D., & Vilibic-Cavlek, T. (2021). Hepatitis E virus in Croatia in the “one-health” context. *Pathogens*, 10, 1–11. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060699>
- Mukhopadhyay, S., Kim, B.-S., Chipman, P. R., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2003). Structure of West Nile Virus. *Science*, 302, 248. <https://doi.org/10.1126/science.1089316>

- Muñoz-Chimeno, M., Bartúren, S., García-Lugo, M. A., Morago, L., Rodríguez, Á., Galán, J. C., Pérez-Rivilla, A., Rodríguez, M., Millán, R., del Álamo, M., Alonso, R., Molina, L., Aguinaga, A., & Avellón, A. (2022). Hepatitis E virus genotype 3 microbiological surveillance by the Spanish Reference Laboratory: geographic distribution and phylogenetic analysis of subtypes from 2009 to 2019. *Eurosurveillance*, *27*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.23.2100542>
- Nagy, A., Horvath, A., Mezei, E., Henczko, J., Magyar, N., Nagy, O., Koroknai, A., Csonka, N., & Takacs, M. (2023). West Nile virus infections in Hungary: Epidemiological update and phylogenetic analysis of the Hungarian virus strains between 2015 and 2022. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, *70*, 111–118. <https://doi.org/10.1556/030.2023.02040>
- Nagy, A. I., Csonka, N., Takács, M., Mezei, E., & Barabás, V. (2022). West Nile and Usutu virus seroprevalence in Hungary: A nationwide serosurvey among blood donors in 2019. *PLoS ONE*, *17*, e0266840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266840>
- Nagy, A., Mezei, E., Nagy, O., Bakonyi, T., Csonka, N., Kaposi, M., Koroknai, A., Szomor, K., Rigó, Z., Molnár, Z., Dánielisz, Á., & Takács, M. (2019). Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance*, *24*, 1. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038>
- Nan, Y., Wu, C., Zhao, Q., & Zhou, E. M. (2017). Zoonotic hepatitis E virus: An ignored risk for public health. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02396>
- Nan, Y., Yu, Y., Ma, Z., Khattar, S. K., Fredericksen, B., & Zhang, Y.-J. (2014). Hepatitis E Virus Inhibits Type I Interferon Induction by ORF1 Products. *Journal of Virology*, *88*, 11924–11932. <https://doi.org/10.1128/jvi.01935-14>
- Nan, Y., & Zhang, Y. (2016). Molecular Biology and Infection of Hepatitis E Virus. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419>
- Narayanan, S., Abutaleb, A., Sherman, K. E., & Kottilil, S. (2019). Clinical features and determinants of chronicity in hepatitis E virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, *26*, 414–421. <https://doi.org/10.1111/jvh.13059>
- Nestorowicz, A., Chambers, T. J., & Rice, C. M. (1994). Mutagenesis of the Yellow Fever virus NS2A/2B cleavage site: Effects on proteolytic processing, viral replication, and evidence

- for alternative processing of the NS2A protein. *Virology*, 199, 114–123. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1103>
- Nybakken, G. E., Nelson, C. A., Chen, B. R., Diamond, M. S., & Fremont, D. H. (2006). Crystal Structure of the West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology*, 80, 11467–11474. <https://doi.org/10.1128/jvi.01125-06>
- O'Reilly, E. K., & Kao, C. C. (1998). Analysis of RNA-dependent RNA polymerase structure and function as guided by known polymerase structures and computer predictions of secondary structure. *Virology*, 252, 287–303. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9463>
- O'Riordan, J., Boland, F., Williams, P., Donnellan, J., Hogema, B. M., Ijaz, S., & Murphy, W. G. (2016). Hepatitis E virus infection in the Irish blood donor population. *Transfusion*, 56, 2868–2876. <https://doi.org/10.1111/TRF.13757>
- Okamoto, H. (2013). Culture systems for hepatitis E virus. *Journal of Gastroenterology*, 48, 147–158. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0682-0>
- Parvez, M. K. (2017). Mutational analysis of hepatitis E virus ORF1 “y-domain”: Effects on RNA replication and virion infectivity. *World Journal of Gastroenterology*, 23, 590–602. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i4.590>
- Pealer, L. N., Marfin, A. A., Petersen, L. R., Lanciotti, R. S., Page, P. L., Stramer, S. L., Stobierski, M. G., Signs, K., Newman, B., Kapoor, H., Goodman, J. L., & Chamberland, M. E. (2003). Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *New England Journal of Medicine*, 349, 1236–1245. <https://doi.org/10.1056/nejmoa030969>
- Petersen, L. R., & Busch, M. P. (2010). Transfusion-transmitted arboviruses. *Vox Sanguinis*, 98, 495–503. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2009.01286.x>
- Petersen, Lyle R. (2019). Epidemiology of West Nile Virus in the United States: Implications for Arbovirology and Public Health. *Journal of Medical Entomology*, 56, 1456–1462. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz085>
- Petrović, T., Šekler, M., Petrić, D., Vidanović, D., Debeljak, Z., Lazić, G., Lupulović, D., Kavran, M., Samojlović, M., Ignjatović Čupina, A., Tešović, B., Lazić, S., Kolarević, M., Labus, T., & Djurić, B. (2021). Intensive West Nile virus circulation in Serbia in 2018—Results of integrated surveillance program. *Pathogens*, 10.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10101294>

- Pierce, K. K., Whitehead, S. S., Kirkpatrick, B. D., Grier, P. L., Jarvis, A., Kenney, H., Carmolli, M. P., Reynolds, C., Tibery, C. M., Lovchik, J., Janiak, A., Luke, C. J., Durbin, A. P., & Pletnev, A. G. (2017). A Live Attenuated Chimeric West Nile Virus Vaccine, rWN/DEN4Δ30, Is Well Tolerated and Immunogenic in Flavivirus-Naive Older Adult Volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, 215, 52–55. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/JIW501>
- Pisani, G., Cristiano, K., Pupella, S., & Liunbruno, G. M. (2016). West Nile Virus in Europe and Safety of Blood Transfusion. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43, 158–167. <https://doi.org/10.1159/000446219>
- Politis C, Stamoulis K, Hassapopoulou E, Bakaloudi V, Richardson C, Hatzitaki M, Halkia P, Nikitidis I, Zisaki K, Pervanidou D, Pappa A, Netskos D, Asariotou M, Paraskevis D, Z. T. (2022). West Nile virus (WNV) infection in blood donors and transfusion transmitted WNV (TT-WNV) in Greece: eleven years' surveillance (2010–2021) ISBT 2022 - Abstract Book. *Vox Sanguinis*, 117, 6–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/vox.13285>
- Pupella, S., Pisani, G., Cristiano, K., Catalano, L., & Grazzini, G. (2013). West Nile virus in the transfusion setting with a special focus on Italian preventive measures adopted in 2008–2012 and their impact on blood safety. *Blood Transfusion*, 11, 563–574. <https://doi.org/10.2450/2013.0077-13>
- Purdy, M. A., Drexler, J. F., Meng, X. J., Norder, H., Okamoto, H., Van der Poel, W. H. M., Reuter, G., de Souza, W. M., Ulrich, R. G., & Smith, D. B. (2022). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *Journal of General Virology*, 103, 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778>
- Rehman, S., Kapur, N., Durgapal, H., & Panda, S. K. (2008). Subcellular localization of hepatitis E virus (HEV) replicase. *Virology*, 370, 77–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.036>
- Rein, D. B., Stevens, G. A., Theaker, J., Wittenborn, J. S., & Wiersma, S. T. (2012). The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, 55, 988–997. <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
- Rizzoli, A., Jiménez-Clavero, M. A., Barzon, L., Cordioli, P., Figuerola, J., Koraka, P., Martina,

- B., Moreno, A., Nowotny, N., Pardigon, N., Sanders, N., Ulbert, S., & Tenorio, A. (2015). The challenge of West Nile virus in Europe: Knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance*, *20*, 21135. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.20.21135>
- Ronca, S. E., Ruff, J. C., & Murray, K. O. (2021). A 20-year historical review of West Nile virus since its initial emergence in North America: Has West Nile virus become a neglected tropical disease? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*, 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009190>
- Samuel, M. A., Whitby, K., Keller, B. C., Marri, A., Barchet, W., Williams, B. R. G., Silverman, R. H., Gale, M., & Diamond, M. S. (2006). PKR and RNase L Contribute to Protection against Lethal West Nile Virus Infection by Controlling Early Viral Spread in the Periphery and Replication in Neurons. *Journal of Virology*, *80*, 7009–7019. <https://doi.org/10.1128/jvi.00489-06>
- Santini, M., Haberle, S., Židovec-Lepej, S., Savić, V., Kusulja, M., Papić, N., Višković, K., Župetić, I., Savini, G., Barbić, L., Tabain, I., Kutleša, M., Krajinović, V., Potočnik-Hunjadi, T., Dvorski, E., Butigan, T., Kolaric-Sviben, G., Stevanović, V., Gorenc, L., ... Vilibić-Čavlek, T. (2022). Severe West Nile Virus Neuroinvasive Disease: Clinical Characteristics, Short-and Long-Term Outcomes. *Pathogens*, *11*, 52. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010052>
- Santos, P. D., Günther, A., Keller, M., Homeier-Bachmann, T., Groschup, M. H., Beer, M., Höper, D., & Ziegler, U. (2023). An advanced sequence clustering and designation workflow reveals the enzootic maintenance of a dominant West Nile virus subclade in Germany. *Virus Evolution*, *9*. <https://doi.org/10.1093/ve/vead013>
- Santos, S., Danny, S., Dias, S., Pedro, M., López, L., Juárez, A. R., Mesquita, J. R., São, M., & Nascimento, J. (2023). Hepatitis E Virus in the Iberian Peninsula : A Systematic Review. *Food and Environmental Virology*, *15*, 193–211. <https://doi.org/10.1007/s12560-023-09560-5>
- Scaramozzino, P., Carvelli, A., Bruni, G., Cappiello, G., Censi, F., Magliano, A., Manna, G., Ricci, I., Rombolà, P., Romiti, F., Rosone, F., Sala, M. G., Scicluna, M. T., Vaglio, S., & De Liberato, C. (2021). West Nile and Usutu viruses co-circulation in central Italy: outcomes of the 2018 integrated surveillance. *Parasites and Vectors*, *14*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04736-z>

- Schemmerer, M., Wenzel, J. J., Stark, K., & Faber, M. (2022). Molecular epidemiology and genotype-specific disease severity of hepatitis E virus infections in Germany, 2010–2019. *Emerging Microbes and Infections*, *11*, 1754–1763. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2091479>
- Schneider, J., Bachmann, F., Choi, M., Kurvits, L., Schmidt, M. L., Bergfeld, L., Meier, I., Zuchowski, M., Werber, D., Hofmann, J., Ruprecht, K., Eckardt, K. U., Jones, T. C., Drosten, C., & Corman, V. M. (2022). Autochthonous West Nile virus infection in Germany: Increasing numbers and a rare encephalitis case in a kidney transplant recipient. *Transboundary and Emerging Diseases*, *69*, 221–226. <https://doi.org/10.1111/tbed.14406>
- Schwarzer, A., Schopf, F., Groschup, M. H., Bock, S., Heenemann, K., Herms, L., Himmelreich, A., Kenklies, S., Kilwinski, J., Konrath, A., Michel, F., Müller, K., Priemer, G., Rahner, R., Sauerwald, C., Scuda, N., Siempelkamp, T., Skuballa, J., Wonnemann, H., ... Sadeghi, B. (2025). Circulation dynamics of West Nile virus in Germany, 2023 and 2024. *Virology Journal*, *23*, 58. <https://doi.org/10.1186/s12985-025-03043-8>
- Seitz, R. (2013). West Nile virus. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *40*, 265–284. <https://doi.org/10.1159/000353698>
- Shahini, E., Argentiero, A., Andriano, A., Losito, F., Maida, M., Facciorusso, A., Cozzolongo, R., & Villa, E. (2024). Hepatitis E Virus: What More Do We Need to Know? *Medicina (Lithuania)*, *60*, 1–20. <https://doi.org/10.3390/medicina60060998>
- Shiryayev, S. A., Chernov, A. V., Aleshin, A. E., Shiryayeva, T. N., & Strongin, A. Y. (2009). NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: A novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus. *Journal of General Virology*, *90*, 2081–2085. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012864-0>
- Simonin, Y. (2024). Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges. *Viruses*, *16*, 599. <https://doi.org/10.3390/v16040599>
- Singh, P., Khatib, M. N., Ballal, S., Kaur, M., Nathiya, D., Sharma, S., Prasad, G. V. S., Sinha, A., Gaidhane, A. M., Mohapatra, P., Varma, A., Lakhanpal, S., Shabil, M., Bushi, G., Sah, S., & Abu Serhan, H. (2025). West Nile Virus in a changing climate: epidemiology, pathology, advances in diagnosis and treatment, vaccine designing and control strategies, emerging public health challenges—a comprehensive review. *Emerging Microbes and Infections*, *14*, 1–11. <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2437244>

- Smith, D. B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E. F., Ulrich, R. G., Johne, R., Koenig, M., Jameel, S., Harrison, T. J., Meng, X. J., Okamoto, H., Van Der Poel, W. H. M., & Purdy, M. A. (2016). Proposed reference sequences for hepatitis E Virus subtypes. *Journal of General Virology*, *97*, 537–542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- Smithburn, K. C., Hughes, T. P., Burke, A. W., & Paul, J. H. (1940). A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *American Journal of Tropical Medicine*, *20*, 471–492. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471>
- Songtanin, B., Molehin, A. J., Brittan, K., Manatsathit, W., & Nugent, K. (2023). Hepatitis E Virus Infections: Epidemiology, Genetic Diversity, and Clinical Considerations. *Viruses*, *15*, 1389. <https://doi.org/10.3390/V15061389>
- Suka, M., Cirkovic, V., Siljic, M., Jankovic, M., Loncar, A., Rajkovic, M., Stamenkovic, G., Vukicevic-Radic, O., & Stanojevic, M. (2024). Dynamics of West Nile Virus Lineage 2 Spread in the Balkans in the Context of Global Spatio-Temporal Dispersal. *Journal of Medical Virology*, *96*, e70092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.70092>
- Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale Jr, M. (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 115–128. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2950>
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, *140*, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731–2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Tardei, G., Ruta, S., Chitu, V., Rossi, C., Tsai, T. F., & Cernescu, C. (2000). Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*, 2232–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.6.2232-2239.2000>
- Teramoto, T., Choi, K. H., & Padmanabhan, R. (2023). Flavivirus proteases: The viral Achilles heel to prevent future pandemics. *Antiviral Research*, *210*, 105516. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105516>
- The European Parliament and the Council of the European Union. (2004). COMMISSION

DIRECTIVE 2004/33/EC of 22 March 2004 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards certain technical requirements for blood and blood components. *Official Journal of the European Union*, 2, 25–39.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>

Tseng, A. C., Nerurkar, V. R., Neupane, K. R., Kae, H., & Kaufusi, P. H. (2021). Potential dual role of West Nile virus NS2B in orchestrating NS3 enzymatic activity in viral replication. *Viruses*, 13, 1–17. <https://doi.org/10.3390/v13020216>

Tsioka, K., Stoikou, K., Antalis, V., Charizani, E., Pappa, S., Gewehr, S., Kalaitzopoulou, S., Mourelatos, S., & Papa, A. (2025). Detection of West Nile Virus, Usutu Virus and Insect-Specific Bunyaviruses in *Culex* spp. Mosquitoes, Greece, 2024. *Viruses*, 17, 1–16. <https://doi.org/10.3390/v17111414>

Ulbert, S. (2019). West Nile virus vaccines—current situation and future directions. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 15, 2337–2342. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1621149>

Van Der Poel, W. H. M., Verschoor, F., Van Der Heide, R., Herrera, M. I., Vivo, A., Kooreman, M., & De Roda Husman, A. M. (2001). Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 970–976. <https://doi.org/10.3201/eid0706.010608>

Veo, C., Della Ventura, C., Moreno, A., Rovida, F., Percivalle, E., Canziani, S., Torri, D., Calzolari, M., Baldanti, F., Galli, M., & Zehender, G. (2019). Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011–2018. *Viruses*, 11, 1–15. <https://doi.org/10.3390/v11090814>

Vignjević, G., Bušić, N., Turić, N., Varga, Z., Zana, B., Ábrahám, Á., Kurucz, K., Vručina, I., & Merdić, E. (2024). First Detection of West Nile Virus Lineage 2 in *Culex pipiens* Vectors in Croatia. *Pathogens*, 13, 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens13121131>

Vilibic-Cavlek, T., Barbic, L., Mrzljak, A., Brnic, D., Klobucar, A., Ilic, M., Janev-Holcer, N., Bogdanic, M., Jemersic, L., Stevanovic, V., Tabain, I., Krcmar, S., Vucelja, M., Prpic, J., Boljfecic, M., Jelacic, P., Madic, J., Ferencak, I., & Savic, V. (2021). Emerging and

- neglected viruses of zoonotic importance in Croatia. *Pathogens*, *10*, 1–24. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010073>
- Vilibic-Cavlek, T., Petrovic, T., Savic, V., Barbic, L., Tabain, I., Stevanovic, V., Klobucar, A., Mrzljak, A., Ilic, M., Bogdanic, M., Benveniste, I., Santini, M., Capak, K., Monaco, F., Listes, E., & Savini, G. (2020). Epidemiology of Usutu virus: The European scenario. *Pathogens*, *9*, 1–19. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090699>
- Vilibic-Cavlek, T., Savic, V., Klobucar, A., Ferenc, T., Ilic, M., Bogdanic, M., Tabain, I., Stevanovic, V., Santini, M., Posavec, M. C., Petrinic, S., Benveniste, I., Ferencak, I., Rozac, V., & Barbic, L. (2021). Emerging Trends in the West Nile Virus Epidemiology in Croatia in the “One Health” Context, 2011-2020. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *6*, 140. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed>
- Vollmer, T., Diekmann, J., Knabbe, C., & Dreier, J. (2019). Hepatitis E virus blood donor NAT screening: as much as possible or as much as needed? *Transfusion*, *59*, 612–622. <https://doi.org/10.1111/trf.15058>
- Wang, B., & Meng, X. J. (2021). Structural and molecular biology of hepatitis E virus. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1907–1916. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.038>
- Wang, W., Xu, L., Su, J., Peppelenbosch, M. P., & Pan, Q. (2017). Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. *Trends in Microbiology*, *25*, 573–584. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.01.001>
- Weissenböck, H., Kolodziejek, J., Url, A., Lussy, H., Rebel-Bauder, B., & Nowotny, N. (2002). Emergence of Usutu virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases*, *8*, 652. <https://doi.org/10.3201/EID0807.020094>
- Wicker, J. A., Whiteman, M. C., Beasley, D. W. C., Davis, C. T., McGee, C. E., Lee, J. C., Higgs, S., Kinney, R. M., Huang, C. Y. H., & Barrett, A. D. T. (2012). Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein. *Virology*, *426*, 22–33. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.022>
- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., & Duff, G. W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor  $\alpha$  promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 94, 3195–3199. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.3195>
- Wongchitrat, P., Chanmee, T., & Govitrapong, P. (2024). Molecular Mechanisms Associated with Neurodegeneration of Neurotropic Viral Infection. *Molecular Neurobiology*, 61, 2881–2903. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03761-6>
- Yadav, K. K., Boley, P. A., Fritts, Z., & Kenney, S. P. (2021). Ectopic expression of genotype 1 hepatitis E virus ORF4 increases genotype 3 HEV viral replication in cell culture. *Viruses*, 13, 1–19. <https://doi.org/10.3390/v13010075>
- Yin, X., Li, X., & Feng, Z. (2016). Role of envelopment in the HEV life cycle. *Viruses*, 8, 1–8. <https://doi.org/10.3390/v8080229>
- Yin, X., Ying, D., Lhomme, S., Tang, Z., Walker, C. M., Xia, N., Zheng, Z., & Feng, Z. (2018). Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115, 4773–4778. <https://doi.org/10.1073/pnas.1721345115>
- Zaaijer, H. L. (2015). No artifact, hepatitis E is emerging. *Hepatology*, 62, 654–654. <https://doi.org/10.1002/HEP.27611>
- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Panda, S. K., & Jameel, S. (1997). The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *Journal of Virology*, 71, 9045–9053. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9045-9053.1997>
- Zannoli, S., & Sambri, V. (2019). West Nile virus and Usutu virus co-circulation in Europe: Epidemiology and implications. *Microorganisms*, 7, 184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070184>
- Zecchin, B., Fusaro, A., Milani, A., Schivo, A., Ravagnan, S., Ormelli, S., Mavian, C., Michelutti, A., Toniolo, F., Barzon, L., Monne, I., & Capelli, G. (2021). The central role of Italy in the spatial spread of USUTU virus in Europe. *Virus Evolution*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.1093/ve/veab048>
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K. A., Shi, P.-Y., & Li, H. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology*, 81, 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/jvi.02704-06>

## 8. ŽIVOTOPIS

Ivana Gorski rođena je 3. srpnja, 1969. godine u Zagrebu, Hrvatska. Završila je diplomski studij molekularne biologije 1995. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski studij Biologije završila je 2005. godine na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu te stekla naziv magistra znanosti. Tijekom studija radila je u UNHCR-u od 1992. do 1998., na KBC Zagreb od 1998. do 2001., te u tvrtki Jasika d.o.o. od 2001. do danas. Doktorski studij Biologije upisala je 2018. godine na Biološkom odsjeku PMF-a u Zagrebu. Zaposlena je kao voditelj projekata u tvrtki Jasika d.o.o. na poslovima distribucije medicinskih proizvoda. Tijekom dokorskog studija objavila je 1 znanstveni rad, sudjelovala je na više nacionalnih i međunarodnih znanstvenih konferencija, te je bila autora ili ko-autor posterskih prezentacija. Najvažnije područje njenog znanstvenog interesa je genetika u području transfuzije i onkologije.