

# Mačke kao sentinel životinje za hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom

---

Cetušić Jakopović, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:045851>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI STUDIJ  
*VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Ema Cetušić Jakopović

Mačke kao sentinel životinje za hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom

Zagreb, 2024.

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane

Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom

Predstojnik: prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: prof. dr. sc. Ljubo Barbić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Vladimir Stevanović
2. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. prof. dr. sc. Ljubo Barbić
4. doc. dr. sc. Matko Perharić (zamjena)

Rad sadržava 41 stranicu, 11 slika, 1 tablicu, 30 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

*Želim se zahvaliti svojim roditeljima, sestri i ostaloj obitelji na mentalnoj i financijskoj podršci te razumijevanju i pomoći tijekom ovih 6 godina studija.*

*Također se želim zahvaliti svojim kolegama i svim bliskim prijateljima, na kolegijalnosti i potpori kroz teške trenutke, ali i kroz lijepe trenutke tijekom godina.*

*Na kraju, zahvaljujem se djelatnicima Virusološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, ponajviše svom mentoru prof. dr. sc. Ljubi Barbiću te djelatnicima Laboratorija klinike za unutarnje bolesti, bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć, na pomoći, prenošenju svog znanja te strpljenju i savjetima pri izradi ovog rada.*

## **POPIS PRILOGA**

### **Popis tablica:**

Tablica 1. Prikaz cirkulirajućih vrsta orthohantavirusa u Europi

### **Popis slika:**

Slika 1. Geografska proširenost glodavaca rezervoara patogenih hantavirusa u Europi

Slika 2. Shematski prikaz viriona Orthohantavirusa

Slika 3. Filogenetsko stablo hantavirusa

Slika 4. Sadržaj komercijalnog dijagnostičkog kompleta NovaLisa® Hantavirus IgG ELISA testa

Slika 5. Uređaj za automatsko ispiranje mikrotitracijskih ploča

Slika 6. Shema ispunjavanja mikrotitracijske plitice

Slika 7. Mikrotitracijska ploča nakon dodatka Stop-otopine

Slika 8. Broj uzoraka koji su temeljem anamnestičkih podataka zadovoljavali kriterij za uvrštavanje u istraživanje i pretraživanje na protutijela za uzročnike HVBS

Slika 9. Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema načinu držanja

Slika 10. Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema županijama

Slika 11. Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema području boravka

## **POPIS KRATICA**

HVBS – hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom

HFRS – haemorrhagic fever with kidney syndrome

HVBV – virus hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom

PUUV – Puumala virus

DOBV – Dobrava virus

SEOV – Seoul virus

HNTV – Hantaan virus

SAAV – Saaremaa virus

TULV – Tula virus

SAD – Sjedinjene Američke Države

IUCN – Međunarodna unija za zaštitu prirode i prirodnih resursa (eng. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*)

IgG – imunoglobulini G

ELISA – imunoenzimni test (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

DIL G – pufer za razrjeđivanje uzorka (eng. *IgG sample dilution buffer*)

HRP – peroksidaza hrena (eng. *horseradish peroxidase*)

TMB – Tetrametilbenzidin

NTU – NovaTec Units

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>3</b>
2.1. Etiologija hantavirusa.....	3
2.1.1. Struktura i genom orthohantavirusa .....	6
2.1.2. Umnažanje.....	9
2.1.3. Virulencija .....	9
2.1.4. Tenacitet .....	9
2.2. Epidemiologija orthohantavirusnih infekcija u Europi .....	10
2.2.1. Okolišni čimbenici epidemija HVBS.....	11
2.3. Patogeni učinak orthohantavirusnih infekcija .....	11
2.3.1. Klinička slika hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom .....	12
2.4. Dijagnostika orthohantavirusnih infekcija .....	14
2.5. Liječenje hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom.....	15
2.6. Profilaksa.....	16
2.7. Orthohantavirusne infekcije u Hrvatskoj .....	16
2.8. Dosadašnje spoznaje o mačkama i ostalim domaćim i divljim životinjama kao sentinel životinjama za HVBS.....	17
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>19</b>
3.1. Odabir i priprema uzoraka.....	19
3.2. ELISA pretraga.....	20
3.2.1. Princip pretrage .....	20
3.2.2. NovaLisa® Hantavirus IgG ELISA test.....	21
3.2.3. Izvedba dijagnostičke pretrage.....	23
3.3. Statistička analiza .....	26

4.	<b>REZULTATI</b> .....	27
5.	<b>RASPRAVA</b> .....	30
6.	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	34
7.	<b>POPIS LITERATURE</b> .....	35
8.	<b>SAŽETAK</b> .....	39
9.	<b>SUMMARY</b> .....	40
10.	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	41



## 1. UVOD

Orthohantavirusi uzrokuju dvije bolesti, hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom (HVBS) koja je endemska u Europi i Aziji, te hantavirusni plućni sindrom u Sjevernoj i Južnoj Americi. Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom, koja se naziva i mišja groznica, je akutna febrilna virusna zoonoza uzrokovana virusima iz reda *Bunyaviridae*, porodice *Hantaviridae*, roda *Orthohantavirus*. HVBS se očituje naglim nastupom vrućice, boli u donjem dijelu leđa, hemoragičnim simptomima i simptomima od strane bubrega (LOVRIĆ i sur., 2018.). Prvi podaci o oboljenjima, koji odgovaraju bolesti za koju danas znamo da je HVBS, opisuju se još u staroj kineskoj medicinskoj knjizi iz 960. godine nove ere. Početak istraživanja bolesti povezujemo s prvim slučajem HVBS spomenutim u spisima jedne bolnice u Vladivostoku (Rusija), 1913. godine, te poglavito opsežnijom epidemijom opisanom tijekom drugog svjetskog rata u Japanu, kada je oboljelo preko 10000 vojnika. Iz tog razloga tijekom 30-ih i 40-ih godina 20. stoljeća Rusija i Japan su oformili istraživačke timove koji su trebali povezati simptome, razjasniti epidemiologiju bolesti te naći uzročnika. Uzimali su uzorke krvi i urina, no nisu uspjeli izdvojiti uzročnika. Pedesetih godina u Južnoj Koreji formiran je epidemiološki centar za HVBS. Prvi put uzročnik je dokazan u tkivima bubrega i pluća oboljelih u Koreji indirektnom imunofluorescencijom 1976. godine, a 1978. je uspješno izdvojen iz krvi bolesnika. Uzročnik je nazvan Hantaan virusom, po rijeci Hantaan u Koreji 1980-ih. Taj je virus, te njemu slični virusi, bio povezan uz hemoragijsku vrućicu u Koreji, Kini i Japanu, nefrosonefritis u Rusiji te epidemijsku nefropatiju u Skandinaviji. Napokon, 1984. određen je novi rod virusa, nazvan Hantavirus, koji obuhvaća sve patogene koji uzrokuju HVBS (JI i sur., 2019.), a danas je preimenovan u Orthohantavirus.

Čovjek se inficira orthohantavirusima izravnim dodiranjem s glodavcima, koji su rezervoari za virus, te indirektno aerosolom nastalim od sline, mokraće i fecesa glodavaca, kao i preko kontaminiranih površina, hrane ili vode (NIKLASSON, 1992.). Najčešće se inficiraju radnici pojedinih profesija kao što su farmeri, vojnici, šumari te ljudi koji puno vremena provode u prirodi, poput planinara (BLAŽEVIĆ I MARUŠIĆ, 2023.). Ne postoje dokazi o infekciji orthohantavirusom direktnim prijenosom s čovjeka na čovjeka (VAHERI i sur., 2012.). HVBS u Europi uzrokuje tri orthohantavirusa: *Orthohantavirus puumalaense* (Puumala virus, PUUV), čiji je rezervoar šumska voluharica (lat. *Myodes glareolus*, prije *Clethrionomys glareolus*), *Orthohantavirus dobravaense* (Dobrava virus, DOBV) čiji su rezervoari poljski miš (lat.

*Apodemus agrarius*) i žutogrli šumski miš (lat. *Apodemus flavicollis*) te DOBV vrlo srodan *Orthohantavirus dobravaense* (Saaremaa virus, SAAV) čiji je rezervoar također šumski miš (VAPALAHTI i sur., 2003.). Ovi virusi se značajno razlikuju u patogenosti te teške oblike bolesti s mogućim smrtnim ishodima ponajprije uzrokuje DOBV, nešto rjeđe PUUV dok SAAV iznimno uzrokuje oboljenja i to s blagim kliničkim oblikom.

U Republici Hrvatskoj (RH) bolest je prvi put opisana 1954. godine (RADOSEVIC i MOHACEK, 1954.) od kada se kontinuirano bilježe slučajevi oboljenja u ljudi na različitim područjima kontinentalne Hrvatske. U epidemijama, različitog opsega i na različitim lokacijama RH, dokazane su infekcije ljudi s PUUV i DOBV virusima dok je pretraživanjem glodavaca dokazana cirkulacija i druga dva pripadnika orthohantavirusa, SAAV (PLYUSNINA i sur., 2011.) te *Orthohantavirus tulaense* (Tula virus, TULA) za kojeg je također dokazano da može inficirati ljude, ali se generalno smatra nepatogenim (SCHARNINGHAUSEN i sur., 2002.). Nedavno je po prvi put u RH dokazano i prisustvo još jednog nepatogenog orthohantavirusa, *Orthohantavirus seewisense* (Seewis virus, SWSV) (SVOBODA i sur., 2023.).

Bez obzira na zabrinjavajuću epidemiološku situaciju sustavan nadzor proširenosti orthohantavirusa, uključivši i ove s izrazitim zoonotskim značajem, u svrhu procijene rizika za oboljevanje ljudi na području RH se ne provode.

Oboljenja životinja uslijed infekcije hantavirusima nisu opisivana. Tako nisu opisivana niti u mačaka, no postoje dokazi da one mogu biti inficirane i serološki pozitivne. Kako je nadzor proširenosti uzročnika ove bolesti zahtjevan ukoliko se pretražuju rezervoari, zbog bliskog suživota ljudi i mačaka kućnih ljubimaca te mogućeg dokaza infekcija ovih životinja koje mogu biti pokazatelj prisustva uzročnika na nekom ograničenom prostoru i posljedično služiti procijeni rizik od oboljenja u ljudi, u ovom radu je po prvi put u RH istražena mogućnost korištenja mačaka kao sentinel životinja.

## 2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Etiologija hantavirusa

Hantavirusi su zoonotski RNK virusi s ovojnicom, koji pripadaju rodu *Orthohantavirus*, porodici *Hantaviridae* i redu *Bunyavirales* (BRÜGGER i CHUARD, 2022.). Primarni nositelji hantavirusa su različite vrste glodavaca, a različite vrste orthohantavirusa proširene su na različitim geografskim područjima među različitim rezervoarima, najviše iz potporodica *Murinae*, *Sigmodontinae* i *Arvicolinae*. Generalno, vrste hantavirusa koje uzrokuju HVBS povezane su s potporodicom glodavaca *Murinae*, dok hantavirusi uzročnici kardiopulmonalnog sindroma povezani su uz potporodicu *Sigmodontidae* kao primarne rezervoare. Većina hantavirusa čiji su domaćini glodavci iz potporodice *Arvicolinae* smatraju se nepatogenima za ljude, osim primjerice PUUV, čiji je rezervoar šumska voluharica. Također se smatra da svaka vrsta virusa ima afinitet prema specifičnom rezervoaru, primjerice rezervoar prije spomenutog PUUV je šumska voluharica, a rezervoar DOBV je u pravilu žutogrli šumski miš (MUYANGWA i sur., 2015., BEDI i sur., 2022.).

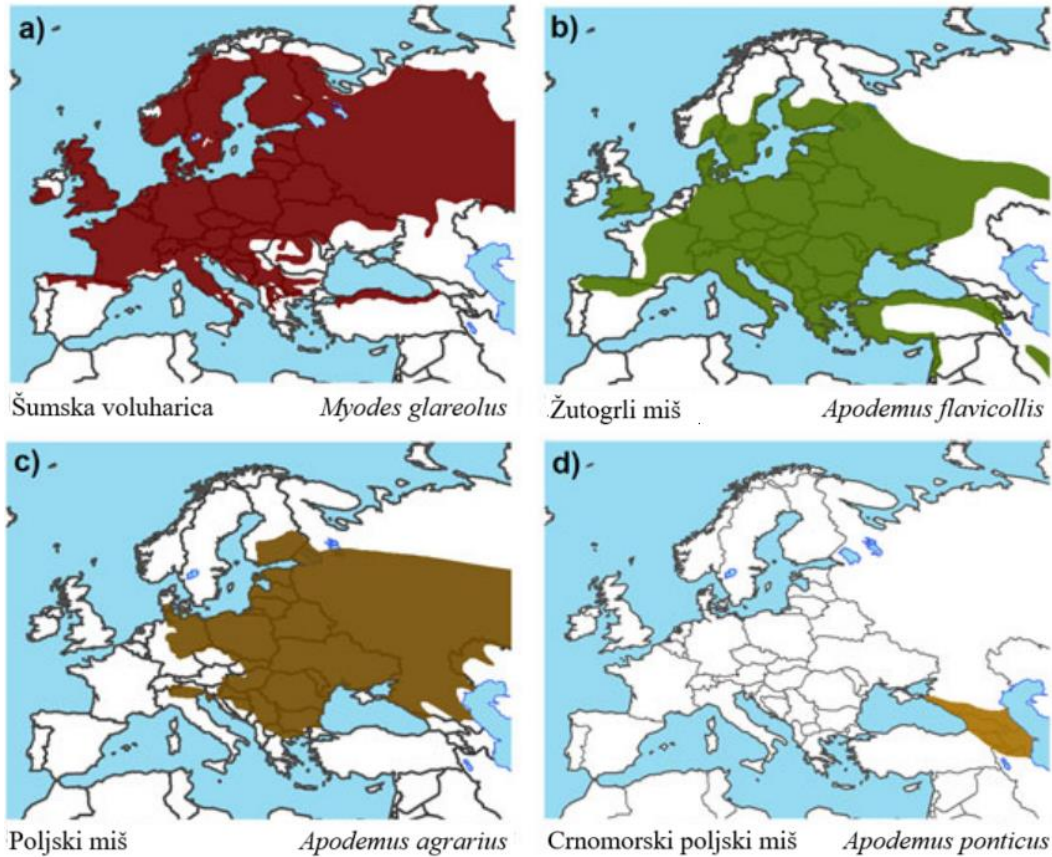
U Europi cirkulira najmanje pet vrsta orthohantavirusa, od kojih su i na području RH dokazani PUUV, DOBV, SAAV, TULA i SWSW. Oni se značajno razlikuju prema rezervoarima kao i patogenosti te posljedično značaju za javno zdravstvo (Tablica 1.).

Koji virusi će biti prisutni na kojem području primarno ovisi o prisustvu glodavaca koji su im specifični primarni rezervoari. Kako se rasprostranjenost rezervoara na većem dijelu Europe preklapa (Slika 1.) tako postoji i mogućnost kocirkulacije različitih orthohantavirusa na istom geografskom području što je zabilježeno i na području RH (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2017.).

**Tablica 1.** Prikaz cirkulirajućih vrsta orthohantavirusa u Europi (prilagođeno iz VAHERI i sur., 2012.)

<b>Virus</b>	<b>Rezervoari</b>	<b>Bolest</b>
<b>Virusi čiji su nositelji</b>		
<b>voluharice</b>		
Puumala*	<i>Myodes glareolus</i> (šumska voluharica)	Srednje teška HVBS
Tula*	<i>Microtus arvalis</i> (poljska voluharica), <i>M. levis</i> (istočnoeuropska voluharica) Ostali pripadnici roda <i>Microtus</i>	Ljudi se mogu inficirati, ali samo jedan prijavljeni slučaj HVBS
<b>Virusi čiji su nositelji miševi ili štakori</b>		
Dobrava-Belgrade* (or DOBV-Af) (or DOBV- Ap)	<i>Apodemus flavicollis</i> (žutogrli miš) <i>Apodemus ponticus</i> (crnomorski poljski miš)	Teška HVBS Srednje teška HVBS
Saaremaa* (or DOBV-Aa)	<i>Apodemus agrarius</i> (šumski miš)	Blaga HVBS
Seoul*	<i>Rattus norvegicus</i> (smeđi štakor), <i>R. rattus</i> (crni štakor)	Umjerena HVBS
<b>Virusi čiji su nositelji insektivori</b>		
Seewis, Nova	Do danas nema poznatih slučajeva infekcija ljudi	

\*Službeno priznate vrste virusa od strane Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa. O nomenklaturi orthohantavirusa koje prenose vrste *Apodemus* još se raspravlja. HVBS, hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom; DOBV, virus Dobrava-Belgrade

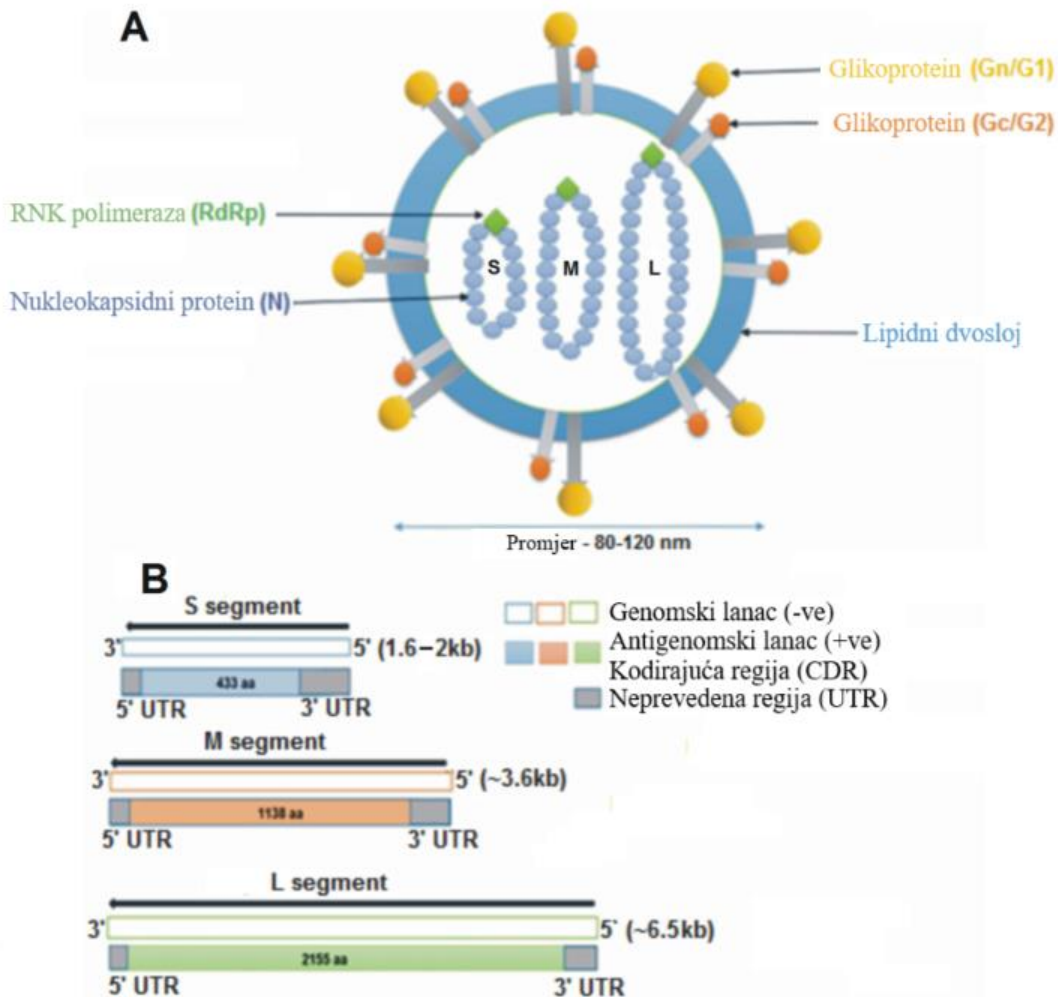


**Slika 1.** Geografska proširenost glodavaca rezervoara patogenih hantavirusa u Europi: (a) *Myodes glareolus*, rezervoar Puumala virusa. (b) *Apodemus flavicollis*, rezervoar Dobrava-Belgrade virusa (DOBV-Af). (c) *Apodemus agrarius*, rezervoar Saaremaa virusa (i DOBV-Aa). (d) *Apodemus ponticus*, rezervoar DOBV-Ap. Proširenost se temelji na IUCN Crvenoj listi ugroženih vrsta (ažuriranje iz 2010. godine) (prilagođeno iz VAHERI i sur., 2012.)

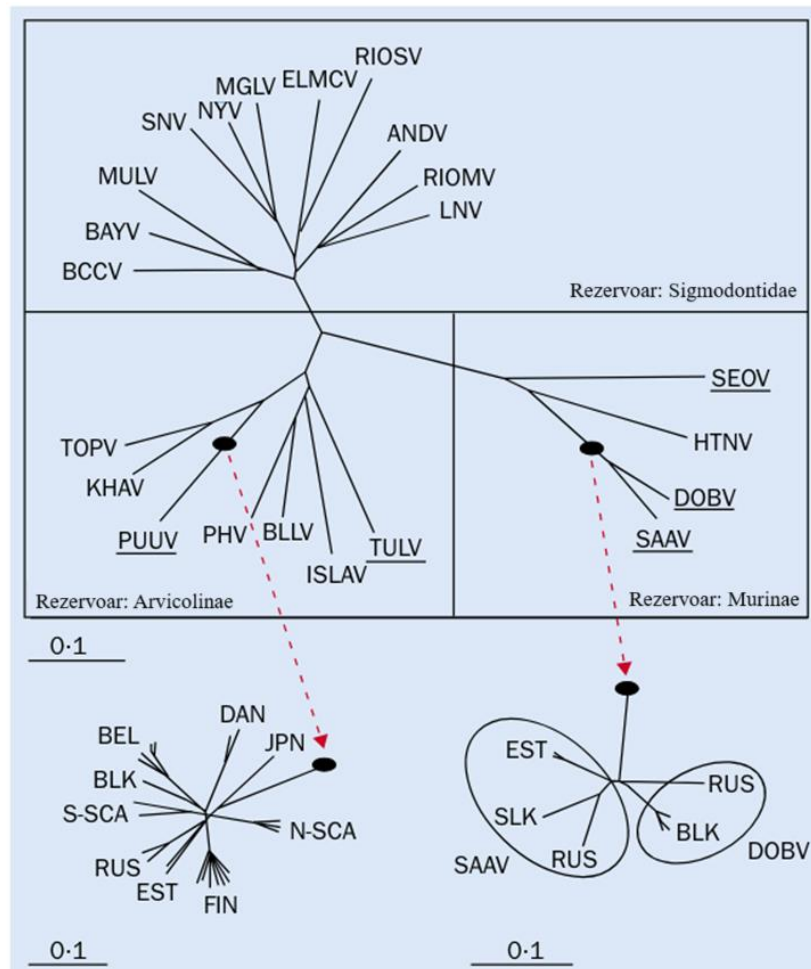
### 2.1.1. Struktura i genom orthohantavirusa

Virusi iz roda *Orthohantavirus*, iako uzrokuju različite kliničke simptome, imaju sličnu organizaciju genoma i morfološki su slični (HARDESTAM i sur., 2007.; MUYANGWA i sur., 2015.). To su virusi s negativno nabijenom RNK s trosegmentalnim genomom (Slika 2.). Veliki (L), srednje veliki (M) i kratki (S) segmenti kodiraju RNK-ovisnu RNK-polimerazu, prekursor za dva površinska glikoproteina, Gn i Gc (koji se također nazivaju i G1 i G2) te nukleokapsidni protein (N). Nekim orthohantavirusima, kratki segment kodira i nestrukturirani protein (NS), koji ima funkciju antagonista interferona. Genetska raznolikost rezultat je genetskog skretanja (točkaste mutacije u genomu i male insercije ili delecije u nekodirajućim regijama) ili rekombinacije, odnosno genetske izmjene RNK segmenata. Genetske izmjene RNK segmenata se pojavljuju češće od skretanja (KRAUTKRÄMER i sur., 2013.). Svi segmenti RNK su obavijeni molekulama N-proteina, i tako tvore ribonukleoproteine (RNP). Genetski materijal nalazi se u dvoslojnoj lipidnoj ovojnici s G1 i G2 površinskim glikoproteinima (MUYANGWA i sur., 2015.).

Genetsku i serološku povezanost orthohantavirusa prati povezanost s glodavcima i čini se da su orthohantavirusi koevoluirali s glodavcima tijekom više milijuna godina. Filogenetskom analizom, pokazano je da virusi čiji su nositelji glodavci iz podporodica *Arvicolinae* (voluharice i leminzi), *Sigmodontidae* (štakori i miševi Novog svijeta) i *Murinae* (štakori i miševi Starog svijeta), formiraju odvojene grane te da je genetska udaljenost između prve dvije spomenute grane manja (Slika 3.). Trenutno su poznate 22 vrste hantavirusa, no proučavanjem sve više vrsta glodavaca, taj broj će se vjerojatno povećavati. Genetska varijacija između vrsti virusa je povezana s geografskom udaljenošću koja prati migracije predaka svakog pojedinog glodavca nositelja (VAHERI i sur., 2012.).



**Slika 2.** Shematski prikaz viriona Ortohantavirusa. (A) Struktura virusa je sferična, promjera 80-120 nm, obložena lipidnim dvoslojem u kojem su ugrađeni glikoproteini (Gn i Gc). Unutar viriona nalaze se tri segmenta RNK: kratki (S), srednji (M) i dugi (L). (B) S, M i L lanci, koji kodiraju nukleokapsidni protein (433 aa), prekursor glikoproteina (1138 aa) i RNK-ovisnu RNK polimerazu (2155 aa). (prilagođeno iz SENHGAL i sur., 2023.)



**Slika 3.** Filogenetsko stablo orthohantavirusa. S lijeve strane su sojevi virusa Puumala, a s desne sojevi virusa Dobrava i Saaremaa. *Arvicolinae*, *Sigmodontidae* i *Murinae* su rodovi glodvaca rezervoara za pojedine viruse. Virusi prisutni u Europi su podcrtani. (prilagođeno iz: VAPALAHTI i sur., 2003.)



### 2.1.2. Umnažanje

Orthohantavirusi se vežu za receptore na stanici domaćina i ulaze u stanicu endocitozom. Umnažaju se u citoplazmi (transkripcija, translacija), a glikoproteini ovojnice se većinom vežu za Golgijev aparat te se tamo i sastavljaju od umnoženih dijelova (orthohantavirusi Starog svijeta), a neki se (orthohantavirusi Novog svijeta) sastavljaju na citoplazmatskoj membrani. Novosastavljeni virioni posjeduju svoju ovojnicu, sa šiljastim glikoproteinskim izdancima, koji igraju ulogu i u ulasku u stanice i u samom sastavljanju virusa nakon replikacije. Novonastali virusi izlaze iz stanice egzocitozom (VAHERI i sur., 2012.; MUYANGWA i sur., 2015.).

### 2.1.3. Virulencija

Glikoproteini ovojnice potiču prirodni imunosni odgovor usmjeren prema sprječavanju umnažanja virusa. Glavnu ulogu u obrani od infekcije orthohantavirusima imaju interferoni tipa 1 te aktivacija prirodno ubilačkih (NK) stanica. No, kako bi prezivjeli, ovi virusi su razvili mehanizme za inhibiciju puteva aktivacije transkripcije interferona tipa 1. Patogeni hantavirusi ekspresijom G1 proteina inhibiraju indukciju IFN-*beta*, što ih i razlikuje od nepatogenih (MUYANGWA i sur., 2015.).

### 2.1.4. Tenacitet

Različiti rodovi unutar reda *Bunyaviridae* imaju različit tenacitet, većinom zbog različitih načina prenošenja, tako da primjerice neki rodovi virusa koji se prenose vektorima (artropodima), slabo preživljavaju u vanjskom okolišu, jer ne postoji velika vjerojatnost da će uopće biti izloženi vanjskom okolišu. S druge strane, većina virusa iz roda *Orthohantaviridae* bit će razmjerno otporni u okolišu, jer se prenose glodavcima i njihovim sekretima i ekskretima (HARDESTAM i sur., 2007.). Virus je općenito osjetljiv na toplinu (inaktivacija pri 60°C kroz 30 minuta) te na etanol i detergente. Na sobnoj temperaturi, sasušeni orthohantavirusi uzgojeni na staničnim kulturama

moгу preživjeti nekoliko dana, a virusi iz ekskreta glodavaca preživljavaju i više od dva tjedna (KALLIO i sur., 2006.).

Virusi iz ekskreta glodavaca (mokraća, izmet) preživljavaju u okolišu i više od dva tjedna što omogućuje indirektno prenošenje, no širenje slinom zahtijeva direktni kontakt, jer je količina sline izlučene u okoliš vrlo mala, tako da je širenje slinom povezano uz agresivnost jedinki glodavaca i njihove borbe. Istraživanja su pokazala da virus uzgojen na staničnim kulturama inaktivira toplina (56°C kroz 15 minuta), no ukoliko su se virusi prije inkubacije na kulturi isušili, na 56°C je dio ostao infektivan i nakon jednog sata. (KALLIO i sur., 2006.). Glodavci, inaparentni kronični nositelji, mogu širiti virus svojim ekskretima (mokraća, slina, izmet) mjesecima (VAHERI i sur., 2012.).

## 2.2. Epidemiologija orthohantavirusnih infekcija u Europi

U Europi, orthohantavirusi imaju značajan utjecaj na javno zdravstvo. Infekcije su česte u Finskoj, na sjeveru Švedske, Belgiji, Francuskoj, dijelovima Njemačke, Balkanu i u europskom dijelu Rusije. Također, u nekim dijelovima Europe, poput Estonije, Latvije, Mađarske i Grčke, visoka je seroprevalencija u populaciji, no relativno je malo prijavljenih slučajeva HVBS. Nadalje, u nekim državama, poput Ujedinjenog Kraljevstva, Poljske i Ukrajine, nema dovoljno epidemioloških podataka o bolesti. To sve ukazuje na teško poddijagnosticiranje orthohantavirusnih infekcija u Europi (VAHERI i sur., 2012.). Na Balkanu, najčešći uzrok HVBS je soj Puumala (75%), no soj Dobrava je glavni uzrok teškog oblika bolesti. Tijekom godina izbijanja (1986., 1989., 1995., 2002.) dolazi do opsežnih epidemija i sa stotinama slučajeva oboljenja, najviše tijekom ljeta. Seroprevalencija na Balkanu iznosi 5% za BiH, 4% u Grčkoj, 1-6% u Hrvatskoj i 1-7% u Sloveniji (VAPALAHTI i sur., 2003.).

U RH broj kliničkih slučajeva varira ovisno o godinama tako da se bilježi od desetak do čak 400 slučajeva oboljenja ljudi (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.), što je u izravnoj vezi s okolišnim čimbenicima.

### 2.2.1. Okolišni čimbenici epidemija HVBS

Epidemiološki, izbijanja “mišje groznice” mogu se predvidjeti, jer su epidemije usko povezane s njenim rezervoarima, glodavcima, te njihovim staništem i veličinom populacije, te se tako ciklično pojavljuju u razmacima od 3 do 4 godine. Stanište voluharica i miševa, koji su rezervoari uzročnika, su šumska vlažna područja te poljoprivredne površine (za poljskog miša), što znači da blizina šume ili poljoprivredne površine naseljenom području i količina biomase, povećavaju rizik infekcije.

Pojavnost epidemija u ljudi prati dinamiku lokalnih populacija glodavaca, tako da broj slučajeva oboljenja ljudi se povećava i smanjuje istim ritmom kao i veličina populacija glodavaca. Isto tako, populacije glodavaca se povećavaju ovisno o tome koliko su plodne neke biljne populacije, za što u Europi najveću ulogu imaju bukva i hrast. Vrhunci epidemija pojavljuju se najčešće ljeti (tijekom godišnjih odmora i pojačane aktivnosti u prirodi, ponajprije u srpnju) te ponekad zimi (kada glodavci ulaze u ljudske nastambe) (VAHERI i sur., 2012.).

### 2.3. Patogeni učinak orthohantavirusnih infekcija

Tipično za orthohantavirusne infekcije, je povećanje mikrovaskularne permeabilnosti, no budući da orthohantavirusi ne stvaraju citopatogeni učinak, pretpostavlja se da je povećana propusnost endotela rezultat odgovora stanica na infekciju, a ne sam učinak virusne replikacije. Inficirane stanice izlučuju citokine, koji privlače leukocite, pretežito mononukleare, a što se vidi i na histološkim preparatima inficiranog tkiva (MUYANGWA i sur., 2015.). Stoga se smatra da, osim navedenoga, ulogu u patogenezi imaju endotelne stanice, epitelne stanice različitih organa, monociti, makrofagi i dendritičke stanice. Upalna reakcija dovodi do aktivacije sustava komplementa i dodatnog izlučivanja proupalnih citokina, kao što su čimbenik tumorske nekroze (TNF), interleukini, interferoni, čimbenici stimulacije kolonija i transformirajućih čimbenika rasta, no i dalje nije u potpunosti razjašnjeno koji citokini imaju glavnu ulogu u povećavanju propusnosti kapilara kod orthohantavirusnih bolesti.

Još jedan čimbenik važan za održavanje infekcije su regulatorni T-limfociti, koje orthohantavirusi suprimiraju pri infekciji ljudi, tako smanjujući imunosni odgovor na virus, okrećući imunosnu reakciju protiv vlastitih tkiva i time dovode do imunosnog oštećenja, dok se funkcija istih u glodavaca potiče, kako bi se održala perzistentna infekcija i kako bi se što dulje virusi izlučivali iz organizma.

Općenito je prihvaćeno da infekcije orthohantavirusima u prirodnih domaćina (glodavaca) ne izazivaju bolest i smatraju se inaparentnim infekcijama. No, postoje istraživanja koja su pokazala da i u prirodnih domaćina mogu uzrokovati kraći životni vijek, sporiji rast i razvoj te patohistološke promjene u inficiranim tkivima (KRAUTKRÄMER i sur., 2013.).

### 2.3.1. Klinička slika hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom

Infekcije orthohantavirusima u ljudi uzrokuju dvije bolesti: hemoragijsku vrućicu s bubrežnim sindromom, koja je primarno uzrokovana orthohantavirusima Starog svijeta i endemska je u Europi i Aziji, te hantavirusni plućni sindrom, primarno uzrokovan orthohantavirusima Novog svijeta u Sjevernoj i Južnoj Americi (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.). Ljudi se inficiraju orthohantavirusom u pravilu inhalacijskim putem iz aerosola urina, fecesa i sline inficiranih glodavaca (SEHGAL i sur., 2023.). Klinička manifestacija je uglavnom uzrokovana povećanom propusnošću krvnih žila, akutnim oštećenjem bubrega i koagulopatijama, no patofiziologija HVBS i dalje nije u potpunosti razjašnjena.

Bolest u ljudi se očituje akutnom vrućicom, glavoboljom i boli u abdomenu kao najčešćim ranim znakovima, te akutnim oštećenjem bubrega te hemoragijama. Mogući su i gastrointestinalni simptomi poput akutnog proljeva te postoji i povezanost infekcije s upalama slijepog crijeva. Bolest se može očitovati kao blaga, srednje teška ili teška, ovisno o virusu koji ju uzrokuje. Primjerice DOBV i HNTV uzrokuju teški oblik, PUUV srednje teški, a SEOV uzrokuje blagi oblik. Inkubacija traje jedan do pet tjedana, a kliničko očitovanje započinje groznicom i simptomima sličnim influenci, a može progredirati prema hemoragijama, hipotenziji i akutnom zatajenju bubrega. Bolest ima pet kliničkih faza: febrilnu (3-5 dana), hipotenzivna (nekoliko sati do nekoliko dana), oligurična faza (3-7 dana), diuretična faza (1-2 tjedna), koje sve na kraju s preboljenjem

dovode do rekonvalescentne faze (može potrajati 3-6 mjeseci). Kod teških slučajeva faze se mogu preklapati. Na krvnoj slici može se vidjeti anemija, leukocitoza, trombocitopenija, povećana aktivnost jetrenih enzima, povišen kreatinin zbog smanjene funkcije bubrega te proteinurija i hematurija. U većini slučajeva dolazi do potpunog oporavka, osim kod teških slučajeva (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.).

Febrilna faza očituje se nespecifičnim simptomima, kao što su povišena temperatura, drhtavica, glavobolja, bol u leđima i trbuhu, mučnina i povraćanje. Tri do četiri dana od početka bolesti, pojavljuju se hemoragične manifestacije u obliku petehija po konjunktivama i nepcu. Do sedmog dana bolesti, pojavljuju se i simptomi akutnog oštećenja bubrega u obliku hematurije i proteinurije.

Hipotenzija se pojavljuje u 11-40% febrilnih pacijenata, a do šoka, koji je tipičan za teški oblik bolesti, dolazi u 30% hipotenzivnih pacijenata. Neke od tipičnih značajki hipotenzivne faze su trombocitopenija i leukocitoza, te znakovi oboljenja bubrega kao akutni tubulointersticijski nefritis, nekrotizirajući glomerulonefritis i IgA nefropatija.

U oliguričnoj fazi, oboljeli su u riziku od hipotenzije, teškog edema pluća i akutnog zatajenja bubrega s oligurijom, anurijom, proteiurijom, hematurijom i azotemijom. Ukoliko dođe do ove faze, postoji mogućnost potrebe za hemodijalizom. Ova faza je kritična, jer 50% ukupnih smrti uslijed HVBS se događa u ovoj fazi. Laboratorijskim pretragama tipično se ustanove povišeni serumski urea i kreatinin.

Diuretična faza slijedi nakon oligurične i očituje se poliurijom koja je znak oporavka bubrežne funkcije, a pritom se simptomi zatajenja bubrega povlače.

Rekonvalescentna faza traje mjesecima, a u njoj uglavnom dolazi do potpunog oporavka, iako su opisani i slučajevi kroničnog zatajenja bubrega i hipertenzije u rekonvalescenciji (SEHGAL i sur., 2015.).

Osim bolesti bubrega i općeg infekcijskog sindroma, mogu se pojavljivati i simptomi vezani uz živčani, endokrini i kardiopulmonalni sustav, poput centralnog dijabetesa insipidusa, hipopituitarizma, meningoencefalitisa, generaliziranih živčanih napadaja, Guillan-Barre sindroma i paralize mokraćnog mjehura. Moguć je plućni edem, šok i perimiokarditis, a u vrlo teškim

slučajevima moguće je i multiorgansko zatajenje, pankreatitis i diseminirana intravaskularna koagulopatija (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.).

Mortalitet pri infekcijama HNTV ili DOBV je 5-15 % i vjerojatno je povezan uz komplikacije kao što su insuficijencija bubrega, edemi, hemoragije, encefalopatije i šok. Pri infekciji SEOV mortalitet je oko 1%, a u slučaju PUUV infekcija mortalitet je i niži od 1% (SEHGAL i sur., 2015.). Iako PUUV ima niski mortalitet, česte su komplikacije i dugoročne posljedice na endokrinom i kardiovaskularnom sustavu te bubrezima (VAHERI i sur., 2012.).

Za mnoge slučajeve, ishod bolesti uveliko ovisi o što ranijem postavljanju sumnje na bolest, pristupu brzim dijagnostičkim testovima ili algoritmima za pretpostavljenu dijagnozu te brzim premještanjem bolesnika u ustanove koje imaju jedinice intenzivne skrbi. Liječenje se zasniva na potpornoj i simptomatskoj terapiji, odnosno, ne postoji specifična antivirusna terapija (VIAL i sur., 2023.). Također, u Europi ne postoji cjepivo protiv HVBS (VAHERI i sur., 2012.).

#### 2.4. Dijagnostika orthohantavirusnih infekcija

Sumnja na mišju groznicu, postavlja se u slučaju povišene temperature s glavoboljom ili boli u leđima, trombocitopenijom i akutnim zatajenjem bubrega, no budući da simptomi variraju, treba se potvrditi serološkom dijagnostikom. Zbog duge i nepredvidive inkubacije od dva do šest tjedana, nekada je teško pretpostaviti gdje i kada je čovjek bio inficiran. IgM i IgG protutijela mogu se dokazati u više od 95 % zaprimljenih pacijenta i to do šestog dana poslije prvih simptoma bolesti. Akutna bolest može se dijagnosticirati dokazom IgM protutijela, najčešće imunoenzimnim testom na bazi rekombinantnog nukleokapsidnog proteina kao antigena. Također postoje i testovi imunofluorescencije na inficiranim stanicama koje su fiksirane acetonom, za dokaz ranih IgG protutijela, koja su također specifična za nukleokapsidni protein, a za dijagnostiku u rekonvalescenciji dokazuju se antitijela specifična za G1 i G2 proteine (Gn/Gc). Nadalje, postoje i brzi imunokromatografski testovi koji detektiraju IgM protutijela unutar 15 minuta. Moguće su križne reakcije između virusa, tako da bi za dijagnostiku bilo dobro testirati serume na antitijela protiv većeg broja virusa, što se u praksi i provodi, kako bi po mogućnosti i ustanovili koji je

infektivni virus. Ovo je značajno jer je infektivni virus izravno povezan s prognozom ishoda oboljenja.

Budući da se najčešće koristi serološka dijagnostika, i to u početku bolesti, molekularna dijagnostika često nije niti potrebna, no postoji PCR i RT-PCR metode detektiranja virusne RNK iz pune krvi, seruma, mokraće, cerebrospinalne tekućine i sline, koja detektira sam virus čak i prije detekcije IgM protutijela (VAHERI i sur., 2012.).

Diferencijalna dijagnoza uključuju u prvom redu leptospirozu, za koju se najčešće i zamijeni HVBS, pogotovo u područjima koja nisu endemska. Osim leptospiroze, diferencijalne dijagnoze uključuju i rikecijozu, zatajenje srca, a u nekih pacijenata i sistemski lupus eritematosus (SEHGAL i sur., 2023.).

## 2.5. Liječenje hemoragijske vrućice s bubrežnim sindromom

Liječenje HVBS primarno se zasniva na potpornoj terapiji. Koristi se tekućinska terapija za održavanje normalnog krvnog tlaka, a kortikosteroidi se mogu koristiti zbog protuupalnog djelovanja. Kod jake trombocitopenije može se davati transfuzija trombocita, a redovno se u težim slučajevima koristi i dijaliza, koja je učinkovita u pacijenata s multiplim zatajenjem organa.

Nešto specifičniji pristup liječenju je korištenje lijekova koji ciljano djeluju na umnažanje virusa, kao što su ribavirin i favipiravir, no ti su lijekovi učinkoviti samo primjenjeni u ranijim stadijima infekcije.

Icatibant je blokator bradikinina, koji sprječava vezanje bradikinina za svoje receptore. Dokazano je da bradikinin sudjeluje u povećavanju permeabilnosti krvnih žila, tako da se inhibicijom bradikinina ovim lijekom u nekoliko slučajeva, uspjelo stabilizirati pacijente i dovesti ih do potpunog oporavka.

Specifična terapija, koja bi ciljano djelovala sprječavajući vezanje virusa za integrinske receptore na stanicama, koji su prvi korak u samoj replikaciji virusa, još je u stadiju razvoja (SEHGAL i sur., 2023.).

## 2.6. Profilaksa

U većini svijeta, glavna prevencija je izbjegavanje endemskih područja i smanjivanje izloženosti glodavcima i njihovim ekskretima. Osim toga učinkovita je i deratizacija uz mjere smanjivanja ili uništavanja staništa glodavaca i izvora hrane u blizini ljudskih nastambi (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.). Zbog značaja bolesti te visoke incidencije u endemskim područjima, istraživanje i proizvodnja cjepiva je visoko na listi prioriteta u suzbijanju ove bolesti (NIKLASSON, 1992.). Do sada nema cjepiva odobrenih za upotrebu u Europi ili SAD-u. U Aziji, u Koreji, godinama se koristi cjepivo Hantavax®, dobiveno od mozga dojenčadi miševa, koji su inficirani hantavirusom te je virus inaktivirani formalinom, no potrebna su česta docijepljivanja kako bi imunost bila zadovoljavajuća. Kako je ovo cjepivo načinjeno za infekcije Hantaan orthohantavirusom (HTNV) ono u našoj epidemiološkoj situaciji ne bi imalo nikakvog učinka. U Kini postoji više cjepiva, također inaktiviranih, no ona iz istih razloga također nisu odobrena za upotrebu u europskim zemljama (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.).

## 2.7. Orthohantavirusne infekcije u Hrvatskoj

Balkanski poluotok je općenito endemsko područje za HVBS. Još 1952. godine, u bivšoj Jugoslaviji, prijavljen je vjerojatno prvi slučaj HVBS na ovom području, prikazan kao slučaj akutnog zatajenja bubrega oboljelog u Bosni. Zatim su se pojavila četiri sporadična slučaja u Hrvatskoj, opisana 1954. godine (RADOŠEVIĆ i MOHAČEK, 1954.). U to vrijeme, autori opisa slučaja već su primijetili sličnost kliničke slike tih pacijenata, sa kliničkom slikom bolesti koja se pojavljuje u Skandinaviji – Nephropathia Epidemica.

Nakon tih prvih opisa kontinuirano se pojavljuju epidemije i sporadični slučajevi diljem jugoistočne Europe (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2014.).

Hrvatska je zemlja s raznolikim ekosustavima, tako da pruža povoljna staništa za razne glodavce (BLAŽEVIĆ i MARUŠIĆ, 2023.). Prirodnim žarištima HVBS u Hrvatskoj se smatraju u prvom redu Lika i Gorski kotar, a zatim i Slavonija, Međimurje i Moslavina, no u stvarnosti



prirodna žarišta nisu niti toliko malobrojna, niti ograničena, tako da se zapravo cijela Hrvatska, osim uskog priobalja i otoka, smatra prirodnim žarištem ove bolesti (MOLNAR i sur., 2017.).

Nekolicina radova opisuje epidemiologiju i slučajeve HVBS u Hrvatskoj. Do 1995. godine, zabilježene su samo dvije, manje epidemije bolesti: 1967. na Plitvičkim jezerima i 1989. blizu zračne luke Pleso. Prva veća epidemija pojavila se upravo 1995. na više područja u isto vrijeme (Mala Kapela, Dinara, Slavonija) sa 125 slučajeva bolesti. Najveća epidemija zabilježena je 2002. godine, s preko 300 oboljelih, na gotovo cijelom teritoriju Hrvatske. Zadnje veće epidemije bile su 2012. na Sljemenu sa 152 slučaja (BLAŽEVIĆ i MARUŠIĆ, 2023.), 2014. s 207 slučajeva na području cijele Hrvatske (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2017.) te 2017. u Zagrebu sa 104 slučaja (LOVRIĆ i sur., 2018.) Posljednja opsežnija epidemija zabilježena je na području RH 2021. godine kada je od HVBS oboljelo čak 332 ljudi (BLAŽEVIĆ i MARUŠIĆ, 2023.). U interepidemijskom razdoblju, godišnje se zabilježi 10-20 sporadičnih slučajeva HVBS (BLAŽEVIĆ i MARUŠIĆ, 2023.). Aktivnost koja najviše povećava rizik od zaraze jest planinarenje, sa 99,6% slučajeva u Zagrebu koji su bili povezani s istim, što je rezultat činjenice da je i područje Medvednice prirodno žarište bolesti. Osim toga, u ostalim područjima Hrvatske, 48% slučajeva bili su povezani s poljoprivredom, a 26% s poslovima oko kuće i kućanskim poslovima (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.).

## 2.8. Dosadašnje spoznaje o mačkama i ostalim domaćim i divljim životinjama kao sentinel životinjama za HVBS

Poboljšanjem uvjeta života i higijene, prevalencija bolesti prenošenih glodavcima se smanjila, no postoje i neki dokazi o mačkama kao indirektnim prenositeljima tih bolesti. Glavnim načinom prijenosa HVBS smatraju se ekskreti i sekreti perzistentno inficiranih glodavaca, to jest aerosola koji od njih nastaje, no jedno istraživanje u Aziji pokazalo je da su vlasnici mačaka u povećanom riziku od oboljenja (NOWOTNY, 1994.a). Potaknuti time, autori su pretražili 200 mačaka, odnosno njihovih seruma, imunofluorescencijom i dobili seroprevalenciju od 5%, što je pokazalo da su mačke podložne infekciji. U istraživanju su pretraživane mačke koje su imale omogućen izlazak iz kuće i slobodno su lovile glodavce i ostale životinje. Nadalje, uočeni su viši titrovi za

infekciju PUUV, nego za patogeniji HTNV. Ovi su rezultati upućivali na evidentan rizik od infekcije mačaka što otvara i pitanje postojanja višeg rizika u vlasnika mačaka (XU i sur., 1987.).

Još jedno istraživanje u Sjevernoj Americi, pokazalo je još višu prevalenciju u mačaka, čak do 23% u nekim regijama (BENNET i sur., 1990.). Imunofluorescencijom je dokazivan antigen u histološkim preparatima pluća i bubrega uginulih mačaka, koje su imale priliku biti u kontaktu s glodavcima i koje nisu uginule od neke već poznate mačje bolesti. Pretražili su 100 mačaka u razdoblju od 1991. do 1994. godine, koristeći 3 različita poliklonalna anti-Puumala seruma, a kao pozitivnu kontrolu uzeli su preparate pluća inficiranih miševa. Dokazali su antigene hantavirusnog plućnog sindroma u dvije od 100 mačaka, a od bubrega niti jedan nije bio pozitivan. Te dvije mačke nisu pokazivale nikakve respiratorne simptome. Zaključak je bio da je u mačaka infekcija asimptomatska te nisu našli dokaz perzistentnih infekcija. Ovo istraživanje nije prikazalo epidemiološku vezu držanja mačaka kućnih ljubimaca i infekcije ljudi orthohantavirusom (NOWOTNY, 1994.b). U jednom istraživanju u Arizoni i Novom Meksiku pretražili su se serumi mačaka, pasa, konja, domaćih preživaca i kojota Western-blott metodom te su dokazali prevalenciju u mačaka od 3,5% te u pasa od 2,8% (MALECKI i sur., 1998.). Osim toga, također u Sjevernoj Americi, ovoga puta u Kanadi, provelo se istraživanje seroprevalencije zoonotskih bolesti u pasa i mačaka, na uzorku od 240 psećih i 242 mačja seruma u razdoblju od 1994. do 1995. godine. Seroprevalencija za Sin Nombre orthohantavirus (SNV) u mačaka bila je 5,8%, dok u pasa nisu našli protutijela (LEIGHTON i sur., 2001.)

U Europi je prema dostupnim podacima provedeno samo jedno istraživanje infekcija mačaka i pasa orthohantavirusima. Ovo istraživanje je provedeno u Belgiji kada su retrospektivno testirani serumi 410 pasa i 124 mačke, iz sjeverozapadne i jugoistočne Belgije. Pretraga je provedena ELISA testom, a pozitivni serumi dodatno su pretraženi imunofluorescencijom. Seroprevalencija u mačaka bila je 16,9%, a u pasa 4,9% (DOBLY i sur., 2012.).

### 3. MATERIJAL I METODE

U ovom istraživanju su se koristili ostatni serumi mačaka zaprimljenih na Klinikama Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, preostali nakon provođenja drugih dijagnostičkih pretraga, tako da se krv nije uzorkovala isključivo za potrebe istraživanja. Istraživanjem je sveukupno obuhvaćeno 120 mačaka primarno s područja Grada Zagreba i okolice te manji broj životinja s područja Sjeverne i Središnje Hrvatske.

Temeljem podataka u karticama pacijenata, odredili su se epizootiološki čimbenici koji mogu utjeati na infekciju (mjesto boravka, dob, spol, način držanja mačke – kućno-vanjski ili vanjski). Svi podaci obrađeni su na način koji isključuje povezivanje postignutih rezultata s osobnim podacima vlasnika. Serumi su bili pretraženi komercijalnim ELISA testom, a postignuti rezultati obrađeni su standardnim statističkim metodama.

#### 3.1. Odabir i priprema uzoraka

Uzorci su prikupljeni u razdoblju od rujna 2023. godine do svibnja 2024. godine, na Klinikama Veterinarskog fakulteta. Nasumičnim odabirom uzimali su se ostatni serumi mačaka, koji su se do konačnog odabira i pretraživanja zamrzivali na  $-18^{\circ}\text{C}$ . Kriteriji koje su uzorci morali zadovoljavati provjeravali su se naknadno u karticama pacijenata. Najbitniji kriteriji bili su način držanja životinje (vanjski, kućno-vanjski ili kućni), a kriterij uključivanja u istraživanje su zadovoljile isključivo mačke koje imaju pristup vanjskom prostoru i koje su mogle doći u kontakt s glodavcima. Kriterij za zemljopisno područje gdje obitavaju mačke bio je da su primarno s područja Grada Zagreba (koje je podijeljeno na zagrebačke četvrti) i Zagrebačke županije, a u istraživanje su uvrštene i pojedine životinje koje su udovoljavale kriteriju načina držanja iz Varaždinske, Sisačko-moslavačke i Krapinsko-zagorske županije koje su također endemska područja za HVBS. Uzorci mačaka koje su bile u vlasništvu azila ili udruga (pretežito iz azila Dumovec) s područja Zagreba, uvršteni su u istraživanje jer su nađene slobodno lutajuće, tako da se pretpostavlja da su bile u kontaktu s potencijalnim rezervoarima bolesti na području predviđenim istraživanjem. Osim tih kriterija, zabilježena je za odabrane životinje i dobno-spolna

struktura. Od sakupljenih 352 uzorka, 120 uzoraka je zadovoljilo navedene kriterije uključivanja u istraživanje i oni su pretraženi na prisustvo protutijela za uzročnike HVBS.

### 3.2. ELISA pretraga

Uzorci su pretraživani komercijalnim NovaLisa® Hantavirus IgG ELISA testom, prema uputama proizvođača uz modifikaciju u korištenju konjugata. Kako je test namijenjen za kvalitativnu determinaciju humanih IgG protutijela u serumu ili plazmi, modifikacija se odnosila na korištenje sekundarnih protutijela označenih peroksidazom hrena za IgG protutijela mačaka Goat anti-Feline IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države). Ova protutijela su korištena u razrijeđenju od 1:10000, u skladu s uputom proizvođača, te su dodavana umjesto konjugata koji je sadržan u komercijalnom kompletu u sve jažice sa serumima mačaka, a pretraga je osim ove modifikacije izvođena u cijelosti sukladno uputi proizvođača.

#### 3.2.1. Princip pretrage

Na mikrotitracijskoj plitici s 96 jažica, u svaku su jažicu u postupku proizvodnje vezani specifični rekombinantni antigeni orthohantavirusa kako bi se u izvođenju pretrage za njih vezala protutijela iz pretraživanog seruma. Nakon inkubacije ispiranjem su se uklanjaju nevezana protutijela te su se u jažice dodavali konjugati. Konjugat se tijekom inkubacije veže za protutijela koja su se vezala u prethodnoj fazi, a u drugom ispiranju sav nevezani konjugat se uklanja. Imuni kompleks koji se stvorio vezanjem konjugata za vezana protutijela iz uzorka se vizualizirao dodatkom tetrametilbenzidin (TMB) supstrata, koji stvara produkt reakcije plave boje. Intenzitet boje je proporcionalan količini vezanih specifičnih protutijela iz uzorka. Na kraju se dodavala sumporna kiselina koja zaustavlja reakciju i daje krajnju žutu boju. Apsorbancija se očitavala na 450/620 nm u ELISA čitaču.

### 3.2.2. NovaLisa® Hantavirus IgG ELISA test

U izvedbi dijagnostičke metode korišten je navedeni komplet koji sadržava:

1. Mikrotitracijsku pliticu s 96 jažica u koje je tijekom proizvodnje vezan rekombinantni hantavirus antigen koja je podijeljena u 12 odvojivih stupaca s po 8 jažica.
2. Prijanjajuća folija za prekrivanje ploče tijekom inkubacije
3. IgG pufer za razrjeđivanje uzorka (DIL G)
4. Stop otopina
5. Koncentrirana otopina za ispiranje
6. Konjugat peroksidaze hrena (HRP)
7. Otopina TMB substrata
8. Pozitivna kontrola
9. Cut-off kontrola
10. Negativna kontrola



**Slika 4.** Sadržaj komercijalnog dijagnostičkog kompleta NovaLisa® Hantavirus IgG ELISA testa

Osim navedenog kompleta, za izvedbu pretrage korišten je i sljedeći pribor i oprema:

1. Jednokanalne automatske mikropipete zapremnine 10-1000 $\mu$ L (Eppendorf)
2. Višekanalna automatska mikropipeta zapremnine 10-100 $\mu$ L (Eppendorf)

3. Nastavci za pipete
4. Termostat na 37° (Biolab 190, Angelantoni, Milano, Italija)
5. Ispirač mikrotitracijskih plitica (Hydroflex, Tecan, Männedorf, Švicarska)
6. Čitač mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska)
7. Plastične epruvetice s čepom zapremine 2 ml
8. Tresilica (Vortex)
9. Lateks rukavice
10. Destilirana voda



**Slika 5.** Uređaj za automatsko ispiranje mikrotitracijskih ploča

Kao modifikaciju metode uz navedeno koristili smo za pretraživanje mačjih seruma sekundarna protutijela označena peroksidazom hrena za IgG protutijela mačaka Goat anti-Feline IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države) u razrijeđenju 1:1000.

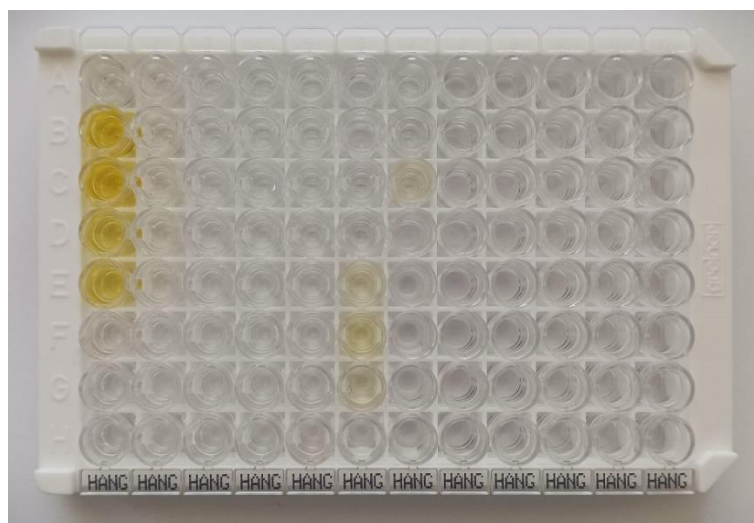
### 3.2.3. Izvedba dijagnostičke pretrage

Prije pretrage, uzorci i sve komponente komercijalnog dijagnostičkog kompleta su se postupno temperirale, bez dodatnog zagrijavanja, na sobnu temperaturu (20-25°C). Također, razrijeđena je koncentrirana otopina za ispiranje u omjeru 1:20, tako da se 10 mL koncentrirane otopine razrijedilo sa 190 mL destilirane vode, čime se ukupno dobje 200 mL otopine za ispiranje, što je bilo dovoljno za ispiranje jedne mikrotitracijske plitice. Na kraju, prije samog početka testa, razrijeđeni su uzorci u omjeru 1:100 s IgG puferom za razrjeđivanje uzoraka, tako da je 10 µL svakog uzorka pomiješno s 1 mL IgG pufera u plastične epruvetice i zatim su homogenizirane na tresilici.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	/	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
B	+	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
C	+	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
D	CO	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
E	CO	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
F	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
G	-	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
H	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T

**Slika 6.** Shema ispunjavanja mikrotitracijske plitice: / - prazna jažica (A1); + - pozitivna kontrola; CO - cut-off kontrola; - - negativna kontrola; T - uzorak

Prvi korak u izvođenju pretraživanja bio je dodavanje po 100  $\mu\text{L}$  kontrola i uzoraka u svaku jažicu, osim prve jažice prvog stupca (A1). Pozitivne kontrole dodane su u jažice B1 i C1, cut-off kontrole u D1 i E1, a negativne kontrole u F1 i G1. Uzorci su po redu dalje dodavani u preostale jažice, kao što je prikazano na slici 8. Ploča se zatim prekrila prijanjajućom folijom te stavila na inkubaciju u termostat tijekom  $1 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$  pri  $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, mikrotitracijska pločica je postavljena u uređaj za automatsko ispiranje postavljen na aspiraciju i ispiranje svake jažice po tri puta s po 300  $\mu\text{L}$  ranije pripremljene radne otopine za ispiranje. Sljedeći korak bio je dodavanje po 100  $\mu\text{L}$  konjugata HRP u svaku jažicu osim jažice A1, po određenom redoslijedu kako bi sve jažice imale jednako vrijeme inkubacije. U jažice od B1 do G1 smo dodali konjugat iz komercijalnog kompleta, a u sve jažice u kojima su se pretraživali serumi mačaka ranije pripremljenu otopinu konjugata za mačja protutijela. Inkubacija nakon ovog koraka bila je 30 min pri sobnoj temperaturi, zaštićeno od direktne sunčeve svjetlosti i pokriveno zaštitnom folijom, nakon koje se ponovno cijela ploča ispirala u uređaju, na isti način kao i u prethodnom ispiranju. Prije zadnje inkubacije, u svaku jažicu osim jažice A1, trebalo je dodati po 100  $\mu\text{L}$  TMB otopine istim redoslijedom kao u prethodnom koraku. Zadnja inkubacija bila je 15 min pri sobnoj temperaturi u mraku. Zbog enzimske reakcije, nakon ovog koraka pojavljuje se plava boja u jažicama. Istim redoslijedom kao u prošla dva dodavanja, nakon isteka inkubacije, dodna je se stop otopina, kojom se zaustavlja reakcija te se plava boja zamjenjuje žutom.



**Slika 7.** Mikrotitracijska ploča nakon dodatka Stop-otopine



Unutar 30 min od dodatka stop otopine morala se očitati apsorbanciju na 450/620 nm. Čitač se pomoću prazne jažice kalibrirao na nulu, nakon čega se mogla očitati apsorbancija svake jažice. Rezultati kontrola su bili kriterij po kojemu se određivalo je li valjana načinjena pretraga. Za valjanost načinjene pretrage, apsorbancija prazne jažice morala je biti ispod 0,100, negativne kontrole morale su imati apsorbanciju <0,200, cut-off kontrole su trebale biti od 0,150 do 1,300, a pozitivne kontrole su trebale imati vrijednosti iznad cut-off kontrole.

Rezultati za pojedini pretraživani uzorak su se izračunavali po formulama iz uputa. Prvo se izračunala aritmetička sredina očitane dvije cut-off kontrole i koristila u jednadžbi kao vrijednost cut-off.

Račun za određivanje rezultata uzoraka je bila očitna apsorbancija u jažici s uzorkom pomnožena s 10, a zatim sve podijeljeno s cut-off vrijednosti. Rezultat se izražavao u NovaTec jedinicama (NTU).

$$(\text{apsorbancija uzorka} \times 10) / (\text{cut-off}) = (A \times 10) / CO = \text{NTU}$$

Uzorak se smatrao pozitivnim ukoliko je  $\text{NTU} > 11$ , sumnjivim ako je  $\text{NTU} 9-11$ , a negativnim ako je  $\text{NTU} < 9$ .

$$\text{npr.: } CO1 = 0.742; CO2 = 0.753; \text{ srednja vrijednost } CO = 0,7475$$

$$\text{Očitana vrijednost uzorka } A = 0,343$$

$$(0,343 \times 10) / 0,7475 = 4,588 \text{ NTU} = \text{negativan rezultat}$$

Pozitivan rezultat implicirao je da su protutijela za rekombinantni hantavirusni protein prisutna u uzorku što potvrđuje prethodnu infekciju pretraživane životinje. Za uzorke sa sumnjivim rezultatom proizvođač propisuje potrebno ponavljanje pretrage novog uzorka uzetog za 2-4 tjedna,

te ukoliko je uzorak i dalje sumnjiv, proglašavanja rezultata negativnim. Negativni rezultat znači da u uzorku nema protutijela protiv patogena i da životinja nije bila inficirana.

Prema navodima u uputi proizvođača ovaj test ima specifičnost od 96,59 % i osjetljivost od 99,16 %.

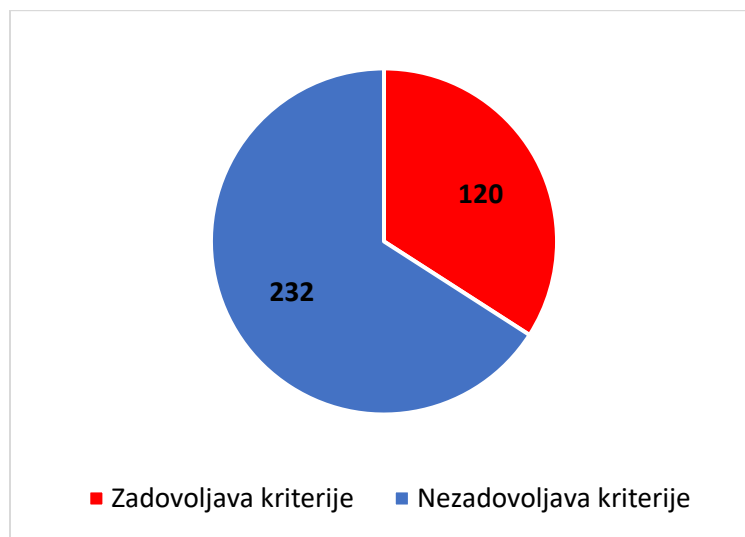
### 3.3. Statistička analiza

Dobiveni podaci obrađeni su korištenjem standardnih statističkih metoda pomoću Microsoft Excell programa.

#### 4. REZULTATI

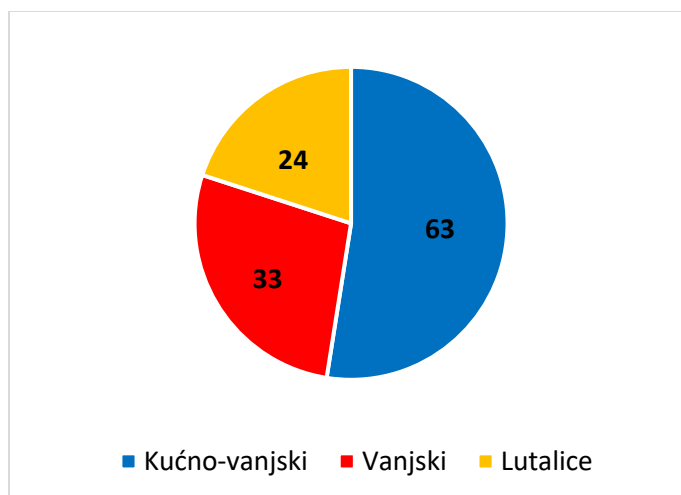
U razdoblju od rujna 2023. godine, do svibnja 2024. godine na Klinikama Veterinarskog fakulteta ukupno je nasumično odabrano 352 uzorka seruma mačaka koji su pohranjeni pri  $-18^{\circ}\text{C}$  do odabira seruma za istraživanje temeljem zadovoljavanja postavljenih kriterija i njihovog serološkog pretraživanja.

Vodeći se temeljnim kriterijem, način držanja i posljedično mogućnosti izloženosti orthohantavirusima te području boravka mačaka, navedenim u poglavlju Materijal i metode, od prikupljenih uzoraka 120 uzoraka (34,09%) je prema dostupnim podacima bilo držano kao vanjske ili kućno vanjske životinje te su bile s prepoznatih endemskih područja čime su ispunjavale kriterij za daljnje pretraživanje (Slika 8.).



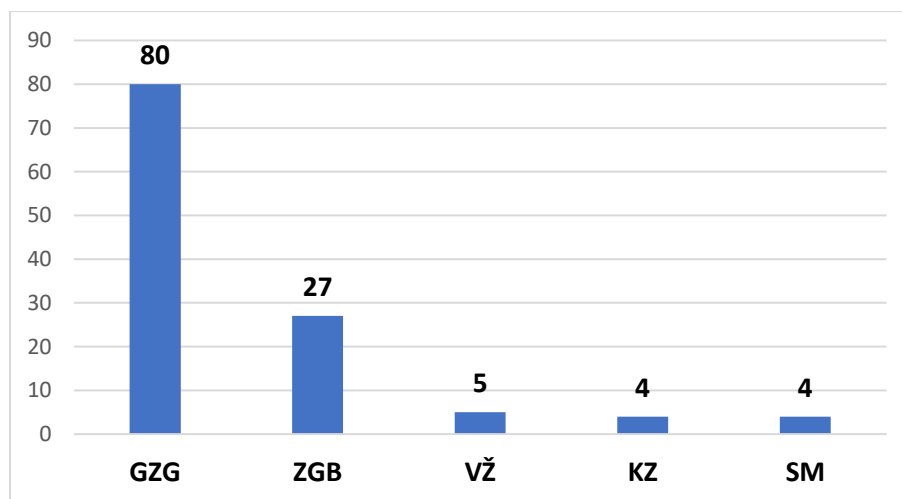
**Slika 8.** Broj uzoraka koji su temeljem anamnestičkih podataka zadovoljavali kriterij za uvrštavanje u istraživanje i pretraživanje na protutijela za uzročnike HVBS

Među životinjama uključenim u istraživanje, prema načinu držanja 33 (27,50%) ih je bilo držanih kao vanjskih mačaka, 63 (52,50%) kao kućno vanjskih mačaka dok su 24 (20,00%) životinje bile lualice na skrbi udruga zbog čega su epizootiološki smatrane vanjskim mačkama (Slika 9.).



**Slika 9.** Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema načinu držanja

Prema zemljopisnim područjima boravka životinja najveći broj životinja je bio s područja županije Grad Zagreb (66,67%), nakon kojih slijede mačke s područja Zagrebačke županije (22,50%). Uz navedeno istraživanjem je obuhvaćeno i pet mačaka iz Varaždinske županije (4,17%) te po četiri životinje iz Krapinsko-zagorske (3,33%) i sisačko-moslavačke županije (3,33%) (Slika 10.).

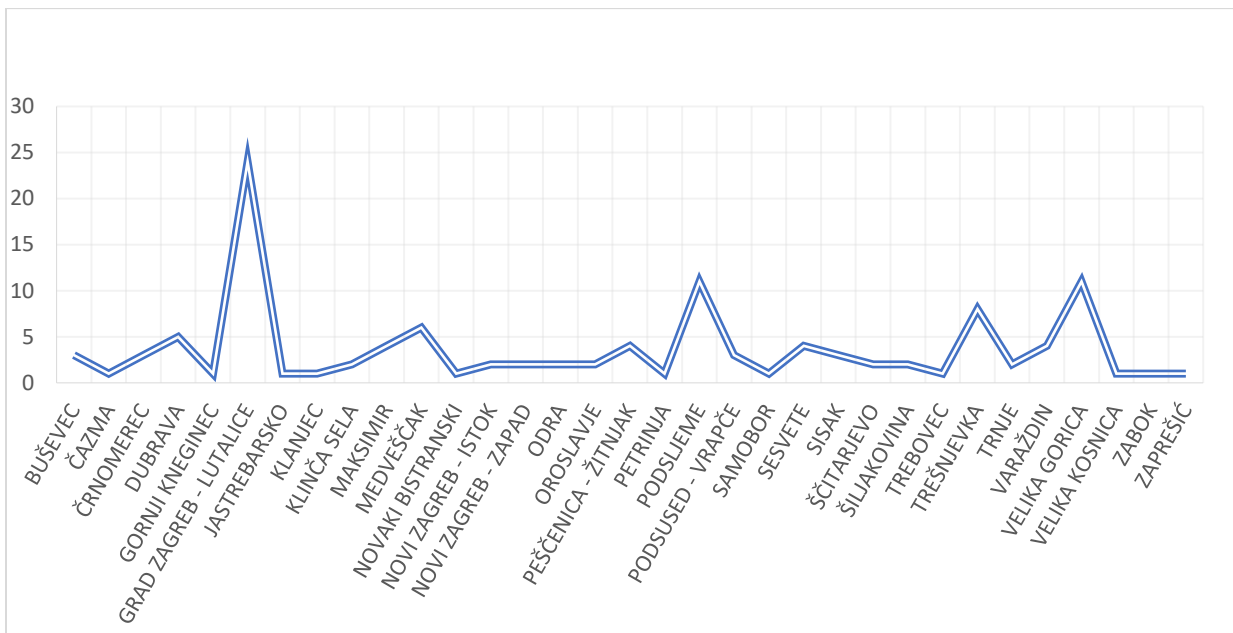


**Slika 10.** Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema županijama

(GZG – Grad Zagreb, ZGB – Zagrebačka, VŽ – Varaždinska, KZ – Krapinsko-zagorska,

SM – Sisačko-moslavačka)

Prema području boravka najveći broj životinja, njih 24 (20,00%), bile su mačke lualice s područja Zagreba. Od zagrebačkih gradskih četvrti najveći broj životinja bio je iz Podsljemena (9,17%), a od mjesta u Zagrebačkoj županiji najviše životinja je pretraženo iz Velike Gorice (9,17%) (Slika 11.).



**Slika 11.** Broj životinja obuhvaćenih istraživanjem prema području boravka.

Pri provođenju pretraživanja uzoraka seruma sve očitane vrijednosti pretraživanja za negativnu i pozitivnu kontrolu te cut-off kontrolu bile su u rasponu definiranom od strane proizvođača što jamči valjanost komercijalnog dijagnostičkog kompleta i vjerodostojnost postignutih rezultata.

Pretraživanjem uzoraka seruma mačaka sve očitane vrijednosti za uzorke životinja obuhvaćenih istraživanjem su nakon izračunavanja iznosile manje od 9 NTU te su uzorci smatrani nedvojbeno negativnim.

## 5. RASPRAVA

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom je značajna zoonotska bolest, koja se prenosi uglavnom glodavcima i njihovim sekretima i ekskretima. To je bolest prirodnih žarišta, što znači da postoje određena područja, u kojima uzročnik konstantno cirkulira i ne može se eradicirati. Osim toga, jedna od značajki ove bolesti, kao i većine bolesti prirodnih žarišta koje se prenose glodavcima, su epidemijska (koja se nazivaju i “mišjim godinama”) i interepidemijska razdoblja. Kod takvih se bolesti pojavljuju epidemijske godine, koje su karakterizirane povećanim brojem oboljelih, zbog većeg kontakta s glodavcima i njihovim izlučevinama. Veći kontakt je uzrokovan povećanjem populacije glodavaca u toj godini, koja je posljedica preklapanja raznih klimatskih i ekoloških čimbenika koji povećavaju plodnost mišica (VAHERI i sur., 2012.). Glavni put infekcije za čovjeka je kontakt s površinama kontaminiranim urinom i fecesom glodavaca te preko aerosola istih posušenih ekskreta (HARDESTAM i sur., 2007.).

U Republici Hrvatskoj, bolest se pojavljuje u prvom redu u Lici i Gorskom kotaru, zatim i u Slavoniji, Međimurju i Moslavini, no u stvarnosti prirodna žarišta nisu niti toliko malobrojna, niti ograničena, tako da se zapravo cijela Hrvatska, osim uskog priobalja i otoka, smatra prirodnim žarištem ove bolesti (MOLNAR i sur., 2017.). S druge strane i na endemskim područjima postoje uže mikrolokacije kao područja najvišeg rizika zbog nužnog prisustva glodavaca rezervoara za održavanje uzročnika na nekom prostoru, a istovremeno ograničenog područja kretanja zaraženih jedinki.

Praćenje bolesti u ljudi bilježenjem oboljenja je nedostatno zbog nespecifičnih početnih simptoma bolesti te često blažeg i kratkog tijeka, tako da se često bolest ne dijagnosticira, posebice u interepidemijskom razdoblju. Također, kako inkubacija bolesti traje od jedan do pet tjedana (AVŠIČ-ŽUPANC i sur., 2015.), teško je povezati oboljenje čovjeka s lokacijom zaražavanja što je neophodno za procijenu rizičnih područja.

Praćenje preko glodavaca nudi se kao bolja alternativa određivanja rizičnih područja, međutim ni ovaj sustav nadzora nije idealan budući da bi se trebali hvatati i pojedinačno testirati glodavci kako bi imali dovoljno velik uzorak populacije i što točnije procijenili prevalenciju uzročnika. Zato bi bilo idealno naći moguće sentinel životinje, po mogućnosti domaće životinje koje su u kontaktu s glodavcima, žive u neposrednoj blizini ljudi te imaju poznato područje

kretanja. Upravo prema navedenim kriterijima mačke se nameću kao najbolji kandidati za sentinel životinje za HVBS.

Mačke se kao kućni ljubimci mogu držati u različitim uvjetima, tako da mogu biti kućno držane, bez pristupa vanjskom okolišu, vanjsko držane, tako da obitavaju vani, bez ili s vrlo malo pristupa ljudskim nastambama te kućno-vanjsko držane, sa slobodnim pristupom kući, kao i vanjskom okolišu. Budući da u kućama rijetko obitavaju glodavci, jer se većinom provodi nekakva vrsta deratizacije, isključivo kućno držane mačke imaju izrazito malu šansu ući u kontakt s glodavcem, pogotovo zaraženim. Stoga za početno istraživanje mačaka kao mogućih sentinel životinja za HVBS, nema smisla koristiti kućno držane mačke, zbog izrazito male mogućnosti kontakta s uzročnikom. S druge strane, vanjske mačke, slobodnoživuće ili lualice te kućno-vanjsko držane mačke, su gotovo sigurno u kontaktu s glodavcima i njihovim izlučevinama, tako da imaju i veliku vjerojatnost kontakta s uzročnikom HVBS. Zato smo u našem istraživanju koristili serume kućno-vanjsko i vanjsko držanih mačaka, a način držanja provjerili smo u karticama pacijenata svake pojedine mačke.

U ovom istraživanju smo od rujna 2023. godine do svibnja 2024. godine na Klinikama Veterinarskog fakulteta ukupno prikupili nasumičnim odabirom 352 uzorka seruma mačaka. Od prikupljenih uzoraka 120 uzoraka (34,09%) je prema dostupnim podacima odgovaralo kriteriju uključivanja u istraživanje jer su bile držane kao vanjske ili kućno-vanjske životinje. Među životinjama uključenim u istraživanje, prema načinu držanja 33 (27,50%) ih je bilo držanih kao vanjske mačke, 63 (52,50%) kao kućno vanjskih mačaka dok su 24 (20,00%) životinje bile lualice na skrbi udruga zbog čega su epizootiološki smatrane vanjskim mačkama.

U karticama smo provjerili i mjesto boravka životinja, birajući samo mačke iz Grada Zagreba, okolice i pojedinih područja Sjeverne i Središnje Hrvatske, kao poznatih područja sa zabilježenim oboljenjima ljudi od HVBS.

Prema zemljopisnim područjima boravka životinja obuhvaćenih istraživanjem najveći broj je bio s područja županije Grad Zagreb (66,67%), nakon kojih slijede mačke s područja Zagrebačke županije (22,50%). Uz navedeno istraživanjem je obuhvaćeno i pet mačaka iz Varaždinske županije (4,17%) te po četiri životinje iz Krapinsko-zagorske (3,33%) i Sisačko-moslavačke županije (3,33%). Prema užem području boravka najveći broj životinja, njih 24 (20,00%), bile su mačke lualice s područja Zagreba, a od zagrebačkih gradskih četvrti najveći broj životinja bio je

iz Podsljemena (9,17%). Od mjesta u Zagrebačkoj županiji najviše životinja je pretraženo iz Velike Gorice (9,17%).

Kako bi i spolno uvjetovan način ponašanja, mogao utjecati na seroprevalenciju bolesti, provjerili smo i spolnu strukturu pretraživane populacije. Mužjaka je bilo više (57%) nego ženki (42%), a jednoj životinji nismo našli nikakve podatke o spolu. Ovi su podatci bitni zbog mogućeg utjecaja spola na učestaliji kontakt s uzročnikom, budući da mušjaci imaju veću tendenciju lutanja od ženki.

Postoji već nekolicina radova koji su istraživali upravo mačke kao sentinel životinje za HVBS. Jednim istraživanjem u Aziji, u uzorku od 200 seruma slobodnoživućih mačaka pretraživanih imunofluorescencijom, dokazala se seroprevalencija od 5% (XU i sur., 1987.). Istraživanje u Velikoj Britaniji, pokazalo je još višu prevalenciju u mačaka, čak do 23 % u nekim regijama (BENNET i sur., 1990.), a u Sjevernoj Americi uzročnik je dokazan u plućima 2 % asimptomatskih životinja (NOWOTNY, 1994.b). U jednom istraživanju u Arizoni i Novom Meksiku pretražili su se serumi mačaka, pasa, konja, domaćih preživača i kojota Western-blott metodom te su dokazali seroprevalenciju u mačaka od 3,5% te u pasa od 2,8% (MALECKI i sur., 1998.). Nadalje, u Kanadi se provelo istraživanje seroprevalencije zoonotskih bolesti u pasa i mačaka, kojim je ustanovljena seroprevalencija za Sin Nombre orthohantavirus (SNV) u mačaka od 5,8%, dok u pasa nisu našli protutijela (LEIGHTON i sur., 2001.)

U Europi je prema dostupnim podacima provedeno samo jedno istraživanje infekcija mačaka i pasa orthohantavirusima, također korištenjem ELISA testa, a pozitivni serumi dodatno su pretraženi imunofluorescencijom te je dokazana seroprevalencija u mačaka od 16,9%, a u pasa 4,9% (DOBLY i sur., 2012.).

Temeljem navedenih rezultata istraživanja donekle iznenađuje da u našem istraživanju, korištenjem također ELISA metode, nije bilo niti jedan pozitivan uzorak. Ovo je posebno iznenađujuće s obzirom da je struktura pretraživane populacije kao i epizootiološki podaci o načinu držanja i lokacijama boravka odabranih bila optimizirana za našu epidemiološku situaciju.

Ovakav negativni rezultat mogao bi biti uzrokovan relativno malim brojem pretraženih uzoraka čime možda nisu obuhvaćene pozitivne životinje. Drugi značajan utjecaj može biti da nasumično odabrane životinje nisu obitavale na mikrolokacijama s prisutnim uzročnikom ili da su



anamnestički podaci bili nepouzdana. Također, zbog cikličnosti pojavljivanja ove bolesti, moguće je da smo životinje pretraživali upravo u godini interepidemijskog razdoblja, tako da uzročnik možda ove godine nije toliko proširen. Za kraj, za serološko pretraživanje mačaka na orthohantavirusne infekcije ne postoji validirana i standardizirana komercijalna metoda, što je uslijed nužne modifikacije metode za ovo istraživanje eventualno moglo rezultirati lažno negativnim rezultatima.

Zaključno, prema ovom istraživanju, mačke nisu potvrđene kao moguće sentinel životinje za praćenje prisustva i proširenosti orthohantavirusa na istraživanim područjima RH. Međutim, s obzirom na sva istaknuta ograničenja istraživanja, a temeljem rezultata drugih autora, istraživanje je potrebno nastaviti kroz duže razdoblje i s većim brojem uzoraka. Također u slijedeća istraživanja potrebno je uključiti i korištenje drugih seroloških metoda, poput primjerice imunofluorescencije, kako bi pouzdano definirali mogućnost korištenja mačaka u određivanje prisustva i proširenosti uzročnika HVBS te u procjenu rizika za zdravlje ljudi.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Pretraživanjem mačaka modificiranom ELISA metodom nisu dokazane infekcije orthohantavirusima na području Grada Zagreb kao niti u manjeg broja pretraženih životinja iz drugih županija središnje i sjeverne Hrvatske.
2. Negativni rezultati moguća su posljedica trenutne niske prevalencije bolesti među glodavcima, ograničenog broja uzoraka, nedovoljno optimizirane metode ili nepouzdanih anamnestičkih podataka o pretraživanim životinjama.
3. Temeljem rezultata drugih istraživanja i epidemiološke situacije u RH, te uslijed navedenih ograničenja, potrebno je nastaviti istraživanje kako bi pouzdano odredili mogućnost korištenja mačaka kao sentinel životinja za HVBS.
4. U slijedećim istraživanjima potrebno je pretražiti veći broj uzoraka, kroz dulje razdoblje te istražiti mogućnost primjene drugih dijagnostičkih metoda, kao i eventualno uključiti pretraživanje drugih vrsta domaćih životinja poput primjerice pasa.

## 7. POPIS LITERATURE

1. AVŠIČ-ŽUPANC, T., M. KORVA, A. MARKOTIĆ (2014): HFRS and hantaviruses in the Balkans/South-East Europe. *Virus Res.* 187, 27–33. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.042
2. AVŠIČ-ŽUPANC, T., A. SAKSIDA, M. KORVA (2015): Hantavirus infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 21S, e6-e16 doi:10.1111/1469-0691.12291
3. BRÜGGER, B., C. CHUARD (2022): Infections à hantavirus. *Rev. Med. Suisse.* 18, 1900-1903. doi: 10.53738/REVMED.2022.18.799.1900
4. BEDI J.S., D. VIJAY, P. DHAKA (2022): Hantavirus. U: *Textbook of Zoonoses*. John Wiley & Sons Ltd., Hoboken, New Jersey, Sjedinjene Američke Države, 141-146. doi: 10.1002/9781119809548.ch15
5. BENNETT, M., G. LLOYD, N. JONES.,A. BROWN, A.J. TREES, C. MCCRACKEN, N.R. SMYTH, C.J. GASKELL, R.M. GASKELL (1990): Prevalence of antibody to hantavirus in some cat populations in Britain. *Vet. Rec.* 127, 548-549. PMID: 2177930
6. BLAŽEVIĆ, L., S. MARUŠIĆ (2023): Hantavirus infection - epidemiological characteristics in the area of the Republic of Croatia during the covid-19 pandemic. *Zdravstveni glasnik* 9, 125-134.
7. DOBLY, A., C. COCHEZ, E. GOOSSENS, H. DE BOSSCHERE, P. HANSEN, S. ROELS, P. HEYMAN (2012): Sero-epidemiological study of the presence of hantaviruses in domestic dogs and cats from Belgium. *Res. Vet. Sci.* 92, 221-224. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.02.003
8. HARDESTAM, J., M. SIMON, K.O. HEDLUND, A. VAHERI, J. KLINGSTROM, A. LUNDKVIST (2007): Ex Vivo Stability of the Rodent-Borne Hantaan Virus in Comparison to That of Arthropod-Borne Members of the Bunyaviridae Family. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 2547–2551. doi:10.1128/aem.02869-06
9. NOH J.Y., J. JUNG, J.W. SONG (2019): Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *J. Infect. Chemother.* 51, 405-413.
10. KALLIO, E. R. (2006): Prolonged survival of Puumala hantavirus outside the host: evidence for indirect transmission via the environment. *J. Gen. Virol.* 87, 2127–2134. doi:10.1099/vir.0.81643-0

11. KRAUTKRÄMER, E., M. ZEIER, A. PLYUSNIN (2013): Hantavirus infection: an emerging infectious disease causing acute renal failure. *Kidney Int.* 83, 23–27. doi:10.1038/ki.2012.360
12. LEIGHTON, F.A., H.A. ARTSOB, M.C. CHU, J.G. OLSON (2001): A serological survey of rural dogs and cats on the southwestern Canadian prairie for zoonotic pathogens. *Can. J. Public Health* 92, 67-71. doi: 10.1007/BF03404848
13. LOVRIĆ, Z., B. KOLARIĆ, M.L. KOSANOVIĆ LIČINA, M. TOMLJENIĆ, O. ĐAKOVIĆ RODE, K. DANIS, B. KAIĆ, V. TEŠIĆ (2018): An outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome linked with mountain recreational activities in Zagreb, Croatia, 2017. *Epidemiol. Infect.* 146, 1236–1239. doi: 10.1017/S0950268818001231
14. MALECKI, T.M., G.P. JILLSON, J.P. THILSTED, J. ELROD, N. TORREZ-MARTINEZ, B. HJELLE (1998): Serologic survey for hantavirus infection in domestic animals and coyotes from New Mexico and northeastern Arizona. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 970-973. PMID: 9540866
15. MOLNAR, M., G. PETRIČEK, LJ. JURKOVIĆ (2017): „Mišja groznica“–hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom – prikaz slučaja. *Med. Fam. Croat.* 25, 69-73.
16. MUYANGWA, M., E.V. MARTYNOVA, S.F. KHAIBOULLINA, S.P. MORZUNOV, A.A. RIZVANOV (2015): Hantaviral Proteins: Structure, Functions, and Role in Hantavirus Infection. *Front. Microbiol.* 6:1326. doi:10.3389/fmicb.2015.01326
17. NIKLASSON, B. S. (1992): Haemorrhagic fever with renal syndrome, virological and epidemiological aspects. *Pediatr. Nephrol.* 6, 201–204. doi:10.1007/bf00866318
18. NOWOTNY, N. (1994.a): The domestic cat: a possible transmitter of viruses from rodents to man. *Lancet* 343, 921. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90043-4
19. NOWOTNY, N. (1994.b): Hantavirus Infection in the Domestic Cat. *JAMA* 272, 1100-1101. doi:10.1001/jama.1994.03520140030020
20. PLYUSNINA, A., L.C. KRAJINOVIĆ, J. MARGALETIĆ, J. NIEMIMAA, K. NEMIROV, Å. LUNDKVIST, A. MARKOTIĆ, M. MILETIĆ-MEDVED, T. AVŠIČ-ŽUPANC, H. HENTTONEN, A. PLYUSIN (2011): Genetic evidence for the presence of two distinct hantaviruses associated with *Apodemus* mice in Croatia and analysis of local strains. *J. Med. Virol.* 83, 108–114. doi: 10.1002/jmv.21929

21. RADOSEVIC, Z., I. MOHACEK (1954): The problem of nephropathia epidemica Myhrman-Zetterholm in relation to acute interstitial nephritis. *Acta. Med. Scand.* 149, 221-228.
22. SCHARNINGHAUSEN J.J., M. PFEFFER, H. MEYER., D.S. DAVIS, R.L. HONEYCUTT, M. FAULDE (2002): Genetic evidence for Tula virus in *Microtus arvalis* and *Microtus agrestis* populations in Croatia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2, 19—27. doi:10.1089/153036602760260742
23. SEHGAL, A., S. MEHTA, K. SAHAY, E. MARTYNOVA, A. RIZVANOV, M. BARANWAL, S. CHANDY, S. KHAIBOULLINA, E. KABWE, Y. DAVIDYUK (2023): Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome in Asia: History, Pathogenesis, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Viruses* 15:561. doi: 10.3390/v15020561
24. SVOBODA KARIĆ, P., B. ANĐELIĆ DMITROVIĆ, S. MRMIĆ, A. PAIĆ, L. BJEDOV, Z. ŠTRITOF, J. MARGALETIĆ, I.C. KUROLT (2023): First Molecular Evidence of Seewis Virus in Croatia. *Life (Basel)* 13:2359. doi: 10.3390/life13122359
25. VAHERI, A., H. HENTTONEN, L. VOUTILAINEN, J. MUSTONEN, T. SIRONEN, O. VAPALAHTI (2012): Hantavirus infections in Europe and their impact on public health. *Rev. Med. Virol.* 23, 35–49. doi:10.1002/rmv.1722
26. VAPALAHTI, O., J. MUSTONEN, Å. LUNDKVIST, H. HENTTONEN, A. PLYUSNIN, A. VAHERI (2003): Hantavirus Infections in Europe. *Lancet Infect. Dis.* 3, 653–661. doi:10.1016/s1473-3099(03)00774-6
27. VIAL, P.A., M. FERRÉS, C. VIAL, J. KLINGSTRÖM, C. AHLM, R. LÓPEZ, N. LE CORRE, G.J. MERTZ (2023): Hantavirus in humans: a review of clinical aspects and management. *Lancet Infect. Dis.* 23:e371-e382. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00128-7
28. VILIBIC-CAVLEK, T., A. FURIC, LJ. BARBIC, I. TABAIN, V. STEVANOVIC, G. MLINARIC-GALINOVIC (2017): Clinical and virological characteristics of hantavirus infections in a 2014 Croatian outbreak. *J. Infect. Dev. Ctries.* 11, 73-80. doi: 10.3855/jidc.7987
29. VILIBIC-CAVLEK, T., LJ. BARBIC, A. MRZLJAK, D. BRNIC, A. KLOBUCAR, M. ILIC, N. JANEV-HOLCER, M. BOGDANIC, L. JEMERSIC, V. STEVANOVIC, I. TABAIN, S. KRČMAR, M. VUCELJA, J. PRPIC, M. BOLJFETIC, P. JELICIC, J.

- MADIC, I. FERENCAK, V. SAVIC (2021): Emerging and Neglected Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. *Pathogens* 10:73. doi: 10.3390/pathogens10010073
30. XU, Z.Y., Y.W. TANG, L.Y. KAN, T.F. TSAI (1987): Cats--source of protection or infection? A case-control study of hemorrhagic fever with renal syndrome. *Am. J. Epidemiol.* 126, 942-948. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114732

## 8. SAŽETAK

### EMA CETUŠIĆ JAKOPOVIĆ – MAČKE KAO SENTINEL ŽIVOTINJE ZA HEMORAGIJSKU GROZNICU S BUBREŽNIM SINDROMOM

Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom (HVBS) je virusna zarazna bolest ljudi proširena diljem svijeta, a koja se kontinuirano pojavljuje na području Republike Hrvatske (RH). Ova bolest može uzrokovati teške kliničke oblike, ponekad i sa smrtnim ishodima, a po epidemiološkim značajkama je bolest prirodnog žarišta koja se održava na određenom području pomoću mišolikih glodavaca kao rezervoara. Praćenje HVBS se sustavno ne provodi na području RH osim bilježenjem oboljenja u ljudi. Zbog javno-zdravstvenog značaja, u svijetu su istraživani sustavi praćenja proširenosti uzročnika preko glodavaca te u vrlo ograničenom broju preko različitih sentinel životinja.

U ovom istraživanju pretraženo je 120 mačaka koje su držane kao vanjske ili kućno-vanjske, odnosno mačaka lutalica, koje borave na endemskim područjima HVBS u RH. Uzorci seruma životinja su pretraženi komercijalnim imunoenzimnim testom (ELISA) radi dokaza prisustva protutijela za orthohantaviruse. U izvođenju ELISA metode načinjena je modifikacija korištenjem sekundarnih protutijela označenih peroksidazom hrena za IgG protutijela mačaka kako bi metodu prilagodili pretraživanju mačjih seruma. Sve pretražene životinje su bile serološki negativne što iznenađuje s obzirom na epidemiološke prilike HVBS u ovom dijelu RH, a može biti posljedica ograničenja istraživanja uslijed relativno malog broja pretraženih uzoraka i kratkog razdoblja provođenja istraživanja, nepotpunih anamnestičkih podatke te nepostojanja službeno validirane metode.

Iako ovim, prvim ovakvim istraživanjem na području RH, nije potvrđena mogućnost korištenja mačaka kao sentinel životinja za HVBS, potrebno je nastaviti i proširiti započeto istraživanje, uklanjajući uočene nedostatke, kao bi pouzdano istražili mogućnost uvođenja sustava nadzora ove opasne zoonoze pretraživanjem mačaka, ili drugih domaćih životinja, u skladu s principom Jednoga zdravlja.

**Ključne riječi:** Hemoragijska vrućica s bubrežnim sindromom, mačke, sustav nadzora, sentinel životinje, ELISA, Hrvatska

## 9. SUMMARY

### Emma Cetušić Jakopović – CATS AS SENTINELS FOR HAEMORRHAGIC FEVER WITH RENAL SYNDROME

Haemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is a viral infectious disease of humans that is widespread worldwide and also occurs repeatedly in Croatia. This disease can cause severe clinical forms, sometimes with a fatal outcome, and according to its epidemiological characteristics, it is a natural focal disease that is maintained in a specific area, with rodents serving as a reservoir. Surveillance of HVBS is not carried out systematically in Croatia, except by confirming the disease in humans. Due to the public health importance of the disease, different surveillance systems for monitoring the spread of the pathogen by rodents and, to a very limited extent, by various sentinel animals have been researched worldwide.

In this study, 120 cats from free-range, semi-free-range or stray cats from endemic HVBS areas in Croatia were tested for the presence of orthohantaviruses antibodies using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). When performing the ELISA method, a modification was made using secondary antibodies labelled with horseradish peroxidase for cat IgG antibodies to adapt the method for cat sera. All tested animals were serologically negative, which is surprising considering the epidemiological situation for HVBS in this part of Croatia. This could be a consequence of research limitations due to a relatively small number of samples tested and a short study period, incomplete anamnestic data and the lack of an officially validated method.

Although this first study on cats as potential sentinel animals in Croatia has not confirmed the possibility of using these animals as sentinel animals for HVBS, it is necessary to continue and expand the investigation that has been started. Elimination of the identified shortcomings is necessary to reliably investigate the possibility of introducing a surveillance system for this important zoonosis by testing cats or other domestic animals in accordance with the One Health approach.

**Key words:** Haemorrhagic fever with renal syndrome, cats, surveillance system, sentinel animals, ELISA, Croatia



## 10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29.10.1999. u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Josipa Račića i Športsku gimnaziju. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 2018. godine. Od 2022. godine članica sam volonterskog tima Klinike za unutrašnje bolesti Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, od 2023. volontiram na Zavodu za sudsko veterinarstvo, a od 2024. krenula sam volontirati i na Klinici za ptice i egzotične životinje, također na Veterinarskom fakultetu. Kroz ljeto 2024. godine volontiram u Veterinarskoj stanici Velika Gorica. 2023. godine prisustvovala sam trećem Simpoziju studenata biotehnologije "PosteRi" u Rijeci, a 2024. sam prisustvovala na 9. Hrvatskom kongresu veterinarara male prakse u Zagrebu. U osnovnoj školi počela sam se baviti atletikom, koju treniram kroz cijelo osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje, a nastavila sam trenirati i nakon upisa na Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 2018. godine, sve do danas, osvajajući brojna državna, ali i međunarodna odličja, u disciplini skoka s motkom.