

# Infekcije virusom hepatitisa E u konja i pasa na području Republike Hrvatske

---

Rogić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:178:559292>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

Lucija Rogić

**INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E U KONJA I PASA NA  
PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE**

DIPLOMSKI RAD

ZAGREB, 2021.

Ovaj diplomski rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnik Zavoda: Prof. dr. sc. Zoran Milas

Mentor: Prof. dr. sc. Ljubo Barbić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Zoran Milas
2. Prof. dr. sc. Nenad Turk
3. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić

## POPIS KRATICA

HEV – virus Hepatitisa E

HE – Hepatitis E

HEV- RNA – ribonukleinska kiselina virusa Hepatitisa E

HEV-Ag – antigen virusa Hepatitisa E

ANTI-HEV - antitijela za virus Hepatitisa E

WHO – Svjetska Zdravstvena Organizacija

RNA- ribonukleinska kiselina

G 1-8 – genotipovi 1-8

IgA- imunoglobulini A

IgG- imunoglobulini G

IgM- imunoglobulini M

TMB- tetrametilbenzidin

HRP- peroksidaza hrena

ELISA- imunoenzimni test (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

SAD- Sjedinjene Američke Države

## POPIS SLIKA, TABLICA I GRAFIKONA

Slika 1. Sadržaj komercijalnog kompleta ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test

Slika 2. Uređaju za ispiranje mikrotitracijskih plitica

Slika 3. Mikrotitracijska plitica nakon inkubacije, a prije dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije

Tablica 1. Prikaz rezultata za pretražene uzorke konja po županijama

Tablica 2. Prikaz rezultata za pretražene uzorke pasa po županijama

Tablica 3. Prikaz rezultata za pretražene uzorke mačaka po županijama

Grafikon 1. Pretražena populacija konja po županijama

Grafikon 2. Pretražena populacija konja prema spolu

Grafikon 3. Pretražena populacija konja prema dobi

Grafikon 4. Pretražena populacija pasa prema županiji

Grafikon 5. Pretražena populacija pasa prema spolu

Grafikon 6. Pretražena populacija pasa prema dobi

Grafikon 7. Pretražena populacija mačaka prema županiji

Grafikon 8. Pretražena populacija mačaka prema spolu

Grafikon 9. Pretražena populacija mačaka prema dobi

## ZAHVALA

Veliku zahvalnost dugujem svojim roditeljima koji su mi bili velika potpora tijekom cijelog studija i rodbini u Zagrebu koji su mi u određenim trenucima tijekom studija bili kao drugi roditelji.

Zahvalnost dugujem i svojim prijateljima koji su me podupirali u svim odlukama i koji su ovih šest godina učinili nezaboravnima te svom dečku koji je ušao u moj život pred kraj studiranja, ali svejedno bio velika potpora u završnim trenucima.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr. sc. Ljubi Barbiću i svim djelatnicima Virološkog laboratorija Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom koji su mi omogućili izradu ovog rada i prenijeli svoje znanje i iskustvo.

## SADRŽAJ

1	UVOD .....	1
2	PREGLED LITERATURE .....	3
2.1	Povijesni podaci .....	3
2.2	Etiologija .....	4
2.3	Epizotologija .....	5
2.4	Geografska proširenost.....	5
2.5	Klinička slika.....	6
2.6	Dijagnoza.....	6
2.7	Liječenje .....	8
2.8	Preventiva.....	9
2.9	Hepatitis E u Republici Hrvatskoj.....	10
3	MATERIJALI I METODE .....	12
3.1	Uzorci pretraživanih seruma .....	12
3.2.1.	ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test.....	13
3.2.2.	Izvođenje pretrage.....	15
3.2.3.	Validacija testa.....	17
3.2.4.	Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih uzoraka seruma .....	17
4	REZULTATI.....	19
5	RASPRAVA .....	27
6	ZAKLJUČCI.....	32
7	LITERATURA.....	33

8	SAŽETAK .....	39
9	SUMMARY.....	40
10	ŽIVOTOPIS.....	41



## 1 UVOD

Virus hepatitisa E (HEV) uzročnik je hepatitisa E u ljudi širom svijeta. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) svake godine se bilježi približno 20 milijuna infekcija virusom hepatitisa E (HEV), što rezultira s oko 3,3 milijuna simptomatskih slučajeva, a približno jedna trećina svjetskog stanovništva bila je izložena HEV-u (VON WULFFEN i sur., 2018.). HEV najčešće uzrokuje akutni hepatitis koji se pojavljuje sporadično, a najčešće je samoograničavajuća bolest. Međutim, u imunosuprimiranih pacijenata, infekcija HEV-om može uzrokovati znatno teže oblike uz razvoj brzo progresivne ciroze jetre (KAMAR i sur., 2015.). U općoj populaciji stope smrtnosti od HEV infekcije kreću se od 0,2–1%, a stopa smrtnosti značajno je viša u trudnica te posebno u zemljama u razvoju (JAISWAL i sur., 2001.). Zbog izloženosti velikog dijela stanovništva te posljedično i značajnog broja oboljelih infekcija, HEV je jedna od značajnijih ugroza javnog zdravstva na globalnoj razini (HE i sur., 2018.) Virus hepatitisa E taksonomski pripada porodici *Hepeviridae*, rodu *Orthohepevirus*. Rod obuhvaća četiri vrste: Ortohepevirus A, B, C i D. Ortohepevirus A je izdvojen iz ljudi, svinja (domaćih i divljih svinja), jelena, mungosa, zečeva i deva. Ortohepevirus B izdvojen je iz ptica, a Ortohepevirus C iz štakora, tvora i nerca. Pripadnici genotipa Ortohepevirus D uključuju sojeve virusa izdvojene iz šišmiša (SMITH i sur., 2014.). Najbrojnija skupina, Ortohepevirus A, obuhvaća osam genotipova. Genotipovi 1 do 4 HEV (HEV GT-1 do GT-4) Ortohepevirusa A uzrokuju bolest u ljudi. HEV GT-1 i HEV GT-2 inficiraju samo ljude, uzrokujući epidemije u zemljama u razvoju, dok genotipovi HEV GT-3 i HEV GT-4 imaju zoonotska svojstva i mogu se proširiti sa životinja na ljude (SMITH i sur., 2016.). Zoonotski potencijal ostalih Ortohepevirusa, B, C i D izdvojenih iz različitih životinja i dalje je nedovoljno istražen. HEV GT-3 je proširen u cijeloj Europi, a njegovo prisustvo dokazano je i u Hrvatskoj (PRPIĆ i sur., 2019.). Zbog rizika od zoonotskog prijenosa, hepatitis E (HE) smatra se emergentnom bolešću koja sve više pobuđuje zabrinutost za javno zdravlje u Europi. U razvijenijim zemljama konzumacija nedovoljno kuhanog ili sirovog zaraženog mesa domaćih i divljih svinja, glavni je izvori izloženosti HEV-u (COLSON i sur., 2010). Domaća svinja, divlja svinja i jelen glavne su vrste za prijenos HEV hranom na ljude. Nadalje, izloženost HEV-u potvrđena je i u nekih drugih vrsta, uključujući goveda, mačke, kuniće,

deve i školjke s tim da je epidemiološki značaj ovih vrsta još uvijek nedovoljno jasan (HUANG i sur., 2016.). Također, informacije o mogućnostima infekcija HEV u konja na globalnoj razini su još uvijek vrlo oskudne (GARCIA-BOCANGERA i sur., 2018.). Pojednim istraživanjima je dokazano da i kućni ljubimci, uključujući pse i mačke, također mogu biti slučajni domaćini HEV te da bi mogli predstavljati izvor za prijenos HEV-a na čovjeka (LI i sur., 2020.). Međutim, uloga konja i kućnih ljubimaca još uvijek je nedostavno istražena usprkos intenzivnom i bliskom kontaktu ljudi s ovim životinjskim vrstama. Do sada su na području Republike Hrvatske nedvojbeno potvrđene infekcije domaćih svinja s visokom seroprevalencijom u farmskim uzgojima koja je iznosila i do 92%, a u divljih svinja do 30%, dok je seroprevalencija u ljudi ovisno o istraživanim skupinama bila i do 15% (PRPIĆ i sur., 2015.). Bez obzira na visoke seroprevalencije HEV u navedenih vrsta životinja i ljudi, do sada nisu istraživane mogućnosti infekcija konja i kućnih ljubimaca na području naše domovine. Stoga je cilj ovog rada bio dobiti početne podatke o prisustvu infekcije HEV u konja i kućnih ljubimaca na području Republike Hrvatske.

## **2 PREGLED LITERATURE**

### **2.1 Povijesni podaci**

Prije 60-ak godina kada je akutni hepatitis utvrđen u ljudi u dolini Kašmira u Indiji, potvrđeno je da virus koji uzrokuje bolest ne odgovara do tada poznatima virusu hepatitisa A niti virusu hepatitisa B (KHURO, 1980.). Istovremeno su pretraživani serumi ljudi koji su bolovali od akutnog hepatitisa tijekom prijašnjih pojavljivanja bolesti u Indiji, uključujući veliku epidemiju bolesti u New Delhiju tijekom 1956., te je i u tim uzorcima dokazano da akutni hepatitis nisu bili uzrokovani virusom hepatitisa A niti virusom hepatitisa B. Ista zapažanja su potvrđena 1983. godine kada je virusna čestica potvrđena elektronskim mikroskopom u uzorku stolice prikupljene od čovjeka dobrovoljca koji je progutao prikupljenu fekalnu suspenziju od bolesnika s akutnim hepatitisom u Afganistanu. Tada je utvrđeno da se radi o novoj čestici virusa koja uzrokuje akutni hepatitis te je dobio naziv virus hepatitisa E. Gotovo 15 godina nakon otkrića virusa hepatitisa E smatralo se da se mogu zaraziti samo ljudi i da virus cirkulira isključivo u područjima sa slabim sustavom vodoopskrbe i odvodnje koji olakšavaju fekalno-oralni prijenos (WU i sur., 1998.). Hepatitis E koji se pojavio u nekoliko zemalja u razvoju bio je povezan s putovanjima u zemlje u kojima je bolest bila endemična. Nadalje, smatralo se da je infekcija kratkotrajna, manifestirajući se uglavnom kao samoograničavajući virusni hepatitis sa sporadičnim teškim slučajevima koji su nastajali uslijed zatajenja jetre. Međutim, tijekom kasnih 90-ih zabilježeno je nekoliko slučajeva HEV infekcije među stanovnicima razvijenih zemalja koji nisu putovali u države u kojima je hepatitis E bio endemski prisutan. Otprilike u isto vrijeme HEV-slične genomske sekvence identificirane su u uzorcima životinja, posebno svinja. Daljnji rad potaknut tim rezultatima doveo je do velike promjene u razumijevanju HEV-a i njegove epidemiologije uključujući nove spoznaje o načinu prijenosa i kliničkim značajkama. Danas je poznato da HEV ima izraženu genomsku heterogenost te se razvrstava u najmanje osam genotipova. Također poznato je da ima širok raspon domaćina s čestim prijenosom na različite vrste, kao i da je prisutan gotovo globalno te da može uzrokovati trajnu infekciju kod nekih osoba (KAMAR i sur., 2008.).

Unatoč činjenici da je HEV otkriven tek kasno u 20. stoljeću, čini se da je njegovo podrijetlo prilično drevno. Čak i u geografskim područjima gdje je trenutno hepatitis E rijedak, epidemije akutnog hepatitisa s obilježjima nalik onima svojstvenima HEV infekcijama bile su uobičajene tijekom 18. i 19. stoljeća. Nadalje, molekularnom tipizacijom trenutno dostupnih genomskih sekvenci HEV-a dokazano je podrijetlo od zajedničkog pretka koji je cirkulirao prije 500 ili čak 1300 godina (AGGARWAL, 2013.).

## 2.2 Etiologija

Virusi HEV su male čestice (promjera 27–34 nm), koje se sastoje od ikozaedralne proteinske ovojnice koja ovija jednolančanu pozitivno orijentiranu RNA veličine oko 7,2 kilobaza. U početku se smatralo da virusi nemaju zaštitnu ovojnicu, međutim, danas je poznato da HEV postoji u dva oblika: kao neovijene čestice u stolici zaražene osobe i kao virusi u ovojnici u cirkulaciji u krvi. Prema tome se došlo do zaključka da ovojnica štiti viruse od inaktivacije cirkulirajućim protutijelima (TAKAHASHI i sur., 2010.). Virusi s genomskim sekvencama sličnim HEV-u dokazani su u nekoliko vrsta sisavaca (uključujući svinje, jelene, divlje svinje, mungose, zečeve, štakore, tvorove, i šišmiše), te u ptica i riba. Svi su ti virusi taksonomski svrstani zajedno s ljudskim HEV-om u porodicu Hepeviridae kojoj pripadaju 2 roda, *Piscihepevirus* kojim se mogu zaraziti ribe i *Orthohepevirus* kojim se mogu zaraziti sisavci i ptice. Rod *Orthohepevirus* dalje se dijeli na 4 vrste, i to *Orthohepevirus A*, *B* i *C* kojim se mogu zaraziti sisavci i *Orthohepevirus D* kojim se mogu zaraziti ptice. Svi izolati za koje je poznato da uzrokuju infekciju u ljudi pripadaju vrsti *Orthohepevirus A*. Na temelju filogenetske povezanosti, pripadnici ove vrste su trenutno razvrstani u 8 genotipova (GT1 – GT8) (PURDY i sur., 2017.). Od njih je poznato da se sa GT1 i GT2 mogu zaraziti samo ljudi, sa GT3 do GT6 se može zaraziti nekoliko vrsta sisavaca, a GT7 i GT8 kruže među devama. Većina ljudskih infekcija povezana je sa genotipovima GT1 do GT4, s povremenim slučajevima uzrokovanim sa GT7 (AGGARWAL i GOEL, 2016.). Značajno je istaknuti da su GT3 i GT4 izdvajani i iz ljudi i iz životinja te oni daju zoonotski značaj HEV-u (SMITH i sur., 2016.).

### 2.3 Epizotologija

Podrijetlo HEV-a još uvijek nije poznato. HEV je prvi put utvrđen u ljudi. Najčešći način širenja HEV-a je između oboljelih i prijemljivih ljudi pomoću fekalno – oralnog prijenosa. Međutim, posljednjih je godina HEV otkriven u raznim životinjskim vrstama poput domaćih svinja, divljih svinja, goveda, mačke, zečeva, glodavaca i pasa. Potvrđeno je da konzumacija mesa ili mesnih proizvoda te izravni ili neizravni kontakt sa svinjama može biti važan način zoonotskog prijenosa HEV. U Japanu je HEV soj izdvojen iz smeđeg štakora (*Rattus norvegicus*) koji je bio u blizini farme svinja u kojoj je bio potvrđen HEV. Izdvojeni soj bio je genetski identičan sojevima HEV izdvojenim iz svinje u blizini, što ukazuje da bi i štakori mogli biti rezervoar za HEV (KANAI i sur., 2012.). HEV u štakora prvi je put otkriven u smeđeg štakora u Njemačkoj (JOHNE i sur., 2010.). Od tada su provedena mnoga istraživanja prisustva HEV u štakora međutim, još uvijek nije zaključeno može li HEV sa štakora prijeći na druge vrste. Posljednjih godina HEV je otkriven i u kućnim rovkama (*Suncus murinus*) u Kini s velikom sličnošću sa sojevima HEV u štakora, što ukazuje da bi se HEV mogao prenositi između štakora i kućnih rovki (HE i sur., 2018.).

### 2.4 Geografska proširenost

HEV je visoko proširen prvenstveno u zemljama u razvoju na indijskom potkontinentu, jugoistoku Azije i Srednjoj Aziji, Bliskom Istoku te sjevernim i zapadnim dijelovima Afrike. Na tim područjima hepatitis E pojavljuje se u obliku epidemija akutnog hepatitisa različitog intenziteta, kao i u obliku učestalih sporadičnih slučajeva. Zabilježeno je i kratkotrajno izbijanje bolesti u Meksiku u razdoblju 1986.–1987. godina. Od tada se HEV pojavljuje i u Sjevernoj Americi. Velika izbijanja hepatitisa E često su se pojavljivala u Kini tijekom 1980-ih i početkom 1990-ih godina, ali posljednjih godina nisu zabilježene veće epidemije (AGGARWAL, 2013.). Svaki genotip HEV koji uzrokuje bolest u ljudi ima različitu geografsku rasprostranjenost. GT1 HEV izoliran je od bolesnika s akutnim hepatitisom u nekoliko područja Azije (posebno Južna Azija i Srednja Azija) i Afrike, gdje je bolest hepatitisa E vrlo česta. GT2 HEV izvorno je identificiran u Meksiku početkom 1980-ih i bio je naknadno dokazan u zapadnoj Africi (Nigerija i Čad). Slučajevi zaraze GT3 HEV zabilježeni su uglavnom u razvijenijim državama, pretežno onima u Europi i u Sjevernoj Americi, ali i u azijsko-pacifičkoj regiji (npr. Australija, Japan). GT4 HEV zabilježen je isključivo u zemaljama jugoistočne Azije, uključujući Kinu, Tajvan, Japan i Vijetnam, a povremeno se može

naći i u Europi. GT7 HEV zabilježen je povremeno u ljudi u Europi na području Mediterana (GOEL i AGGARWAL, 2020.).

## **2.5 Klinička slika**

Klinička manifestacija HEV infekcije vrlo je različita. U većini slučajeva infekcija je asimptomatska, ali može se manifestirati i teškim oblicima s mogućim smrtnim ishodima. Trudnice i pacijenti s prepostojecim ozbiljnim bolestima jetre posebno su izloženi riziku od oboljenja od težeg oblika HE (LENGGENHAGER i WEBER, 2019.). U simptomatskih slučajeva, razdoblje inkubacije kreće se od 2 do 8 tjedana, s prosjekom od 40 dana. Početni simptomi akutnog hepatitisa E su nespecifičani i uključuju mijalgiju, artralgiiju, slabost i povraćanje. Neki pacijenti imaju žuticu, svrbež, obojenu stolicu i tamni urin, popraćeno povećanom razinom jetrene transaminaze, bilirubinom, alkalnom fosfatazom i glutamiltransferazom. Infekcija HEV može dovesti do ozbiljnije akutne bolesti jetre u trudnica ili pacijenata s kroničnom bolestima jetre i ponekad napreduju do fulminantnog zatajenja jetre. Također može doći do teškog tijeka u trudnica zbog hormonalnih i imunoloških promjena u trudnoći. Smanjena ekspresija progesteronskog receptora povezana je sa smrtnim ishodima hepatitisa E u trudnica. Opisana je produžena viremija HEV-a u nekih imunokompetentnih osoba, međutim nije zabilježeno da se kod imunokompetentnih pojedinaca razvila ciroza jetre ili hepatocelularni karcinom kao posljedica infekcije HEV (WEDEMEYER i sur., 2012.).

## **2.6 Dijagnoza**

Objektivna laboratorijska dijagnoza HEV infekcije obuhvaća dokaz virusa dokazom njegove nukleinske kiseline (HEV-RNA) i/ili virusnog antigena (HEV-Ag), te dokaz serokonverzije dokazom anti-HEV antitijela različitih razreda (IgA, IgG i IgM). Navedene dijagnostičke metode su osnova ne samo za dijagnozu već i za praćenje liječenja i one omogućavaju određivanje faze infekcije HEV kao akutne, nedavne, rekonvalescentne ili kronične. Glavne značajke akutne HEV infekcije su dokaz HEV-RNA i/ili HEV-Ag, te serološki dokaz Anti-HEV-IgM i –IgA protutijela. Porast titra ili nizak aviditet HEV-IgG protutijela također ukazuje na akutnu HEV infekciju. Međutim, te značajke pojavljuju se u različito vrijeme, zadržavaju kroz različita razdoblja i razlikuju se u svom značenju u kliničkoj dijagnozi. Stoga, pokazatelji kao što su visoki titri i nizak

aviditet HEV-IgG protutijela, ne mogu se smatrati dijagnostičkim kriterijem već samo mogu ukazivati na akutnu HEV infekciju. Slijedom toga, bilo koji dijagnostički algoritam HEV infekcije trebao bi se temeljiti uglavnom na prisutnosti Anti-HEV-IgM antitijela i/ili prisutnosti HEV-Ag, odnosno HEV-RNA.

Dijagnoza kronične HEV infekcije obično se temelji na prisutnosti HEV-RNA u krvi ili drugim tjelesnim tekućinama dulje od 3 mjeseca, dok rekonvalescentnu infekciju odlikuje prisutnost Anti-HEV-IgG antitijela bez dokaza drugih pokazatelja infekcije. Dijagnoza akutne HEV infekcije u imunokompetentnih osoba temelji se na prisutnosti Anti-HEV-IgM i/ili HEV RNA. U laboratorijima koji nemaju odgovarajuću tehnologiju za molekularnu dijagnozu, unatoč nižoj osjetljivosti, preporučuje se dokaz HEV-Ag kao alternativa za dijagnozu HEV infekcije. Iako nema dijagnostički ili klinički značaj, tipizacija HEV-a na razini genotipa i podtipa izravnom ili novom generacijom sekvenciranja i naknadnom filogenetskom analizom od iznimne je važnosti za proučavanje molekularne epidemiologije HEV infekcije (JUAREZ i sur., 2018.).

Pretraživanje na hepatitis E trebalo bi biti dio rutinske dijagnostičke pretrage u svih bolesnika s akutnim ili kroničnim hepatitisom koji se ne mogu objasniti drugim uzrocima. Akutna HEV infekcija se dijagnosticira kod imunokompetentnih osoba na temelju otkrivanja anti-HEV IgM. Povećani titri anti-HEV IgG mogu ukazivati na nedavnu HEV infekciju. Izdvajanje virusa na staničnim kulturama prilično je neučinkovito u rutinskoj dijagnostici jer je virus u malom broju slučajeva uspješno izdvojen u linijskim staničnim kulturama PLC/PRF/5 i A549. Postoje značajne razlike u načinu izvedbe, kao i osjetljivosti, specifičnosti i podudarnosti rezultata među testovima koji otkrivaju antitijela za HEV. Dostupni testovi najčešće se temelje na antigenima eksprimiranim jednim HEV genotipom, što predstavlja ograničenje u otkrivanju svih HEV genotipova zbog antigenskih razlika. Uslijed ovog ograničenja većina komercijalnih testova ima visoku specifičnost, ali osjetljivost im je značajno smanjena. Navedeno bi moglo objasniti neka odstupanja u razini seroprevalencije HEV-a zabilježene u različitim istraživanjima. Također bi u kliničkoj praksi imunokompromitirani pojedinci uvijek trebali biti testirani na HEV RNA ako postoji sumnja da jesu zaraženi jer se serokonverzija i u slučaju podudarnih genotipova kod njih može odgoditi. HEV RNA se može dokazati u krvi i stolici kroz nekoliko tjedana tijekom akutne infekcije HEV-om (WEDEMEYER i sur., 2012.).

## 2.7 Liječenje

Većina bolesnika s akutnim hepatitisom E ima blage kliničke simptome bolesti sa spontanom oporavkom bez ikakvih trajnih posljedica. Stoga im najčešće nije potrebno nikakvo posebno liječenje osim informiranja o značajkama njihove bolesti i povremenog praćenja radi ranog otkrivanja znakova napredovanja u teški oblik bolesti. Inficirane osobe mogu nastaviti svoje svakodnevne rutine, uključujući laganu tjelesnu aktivnost, sve dok simptomi ne nestanu, nakon čega nastavljaju živjeti bez ograničenja. Za ublažavanje simptoma korisni su antipiretici, antiemetici i blagi analgetski lijekovi. Strogi odmor u krevetu, vitaminski pripravci (uključujući vitamin K), stimulatori apetita, antibiotici i hepatoprotektivni agensi nisu indicirani. Ograničenja u prehrani ne donose nikakve koristi nego samo mogu dovesti do smanjenja ukupnog unosa hrane. Promjene ritma spavanja, pretjerana razdražljivost ili produljenje protrombinskog vremena mogu biti predkazatelji za pojavu teškog oblika bolesti. Stupanj povećanja razine jetrenih enzima nije u izravnoj korelaciji s intenzitetom bolesti te je često ponavljanje testova funkcije jetre ograničene vrijednosti.

U osoba s kroničnim hepatitisom E imunosupresivni lijekovi su se pokazali učinkovitim u suzbijanju viremije te se smatraju dobrim u početnoj fazi liječenja. Ako to ne uspije, preporučuje se monoterapija ribavirinom (najmanje 3 mjeseca, a po mogućnosti 6 mjeseci). Ovo liječenje je povezano s trajnim virološkim odgovorom u oko 78% liječenih ispitanika. Opisani su povremeni slučajevi rezistencije na ribavirin, za koje se smatra da su povezane sa specifičnom genetskom varijacijom u virusnom genomu. Kako bi se povećala učinkovitost ribavirina dodan mu je sofosbuvir, inhibitor izravnog djelovanja, koji je posebno učinkovit za replikaciju virusa hepatitisa C. Međutim pozitivan učinak ovakvog liječenja HE još uvijek nije pouzdano dokazan. U nekoliko ograničenih istraživanja utvrđeno je da je pegilirani interferon alfa učinkovit u ljudi koji su imali nuspojave ili nisu reagirali na produljeno liječenje ribavirinom. Međutim, ovakvo liječenje nije prikladno za osobe koje su prošle transplantaciju čvrstih organa, jer je povezano s povećanim rizikom odbacivanja presađenog organa (GOEL i AGGARWAL, 2020.).



## 2.8 Preventiva

Nemogućnost HEV-a da se jednostavno umnaža na staničnim kulturama onemogućava razvoj živog atenuiranog ili inaktiviranog cjepiva. Međutim, pokušaji razvoja rekombinantnih cjepiva bili su vrlo uspješni. Rekombinantno cjepivo se pokazalo visoko imunogeno i dokazalo se da ukoliko sadžava neutralizacijske epitope virusa potiče tvorbu antitijela koja onemogućavaju zaražavanje stanice domaćina. Ova početna istraživanja dovela su do toga da se nekoliko rekombinantnih HEV kapsidnih proteina eksprimiranih u različitim prokariotskim ili eukariotskim sustavima može koristiti kao HEV cjepivo (GOEL i AGGARWAL, 2020.). Tako su danas za HEV razvijena dva cjepiva koja su se pokazala vrlo učinkovitima u sprječavanju infekcije HEV-om u kliničkim istraživanjima. Trenutno je samo jedno od cjepiva licencirano i to samo u Kini. Prije nego što se ta cjepiva mogu upotrijebiti za prevenciju hepatitisa E u općoj populaciji potrebne su dodatne informacije i klinička istraživanja učinkovitosti kao i potvrda je li sigurno za primjenu u visokorizičnim skupinama ljudi (npr. trudnice, pacijenti s prethodnom bolešću jetre), zatim koliko traje zaštita, te kolika je potreba za adjuvansima i imunostimulatorima, kao i omjer troškova i koristi cjepiva. Osim cjepiva moguća je i alternativna prevetiva, pa bi tako trebalo pružiti ljudima dostupnu, higijenski ispravnu, vodu za piće, omogućiti pravilno odlaganje ljudskih fekalija, educirati ljude o osobnoj higijeni, izbjegavati sirovo meso pogotovo divljih i domaćih svinja te jelena (AGGARWAL, 2013.). HEV se inaktivira zagrijavanjem na 70 °C (EMERSON i sur., 2005.) pa bi upotreba prokuhane vode i odgovarajuće kuhanje hrane trebalo pomoći da se značajno smanji ili ukloni rizik za prijenos virusa. U područjima sa zoonotskim prijenosom GT3 i GT4, odgovarajuće kuhanje mesa prije konzumacije trebalo bi biti posebno naglašeno. Brojna izvješća, posebno iz razvijenoga svijeta, tijekom posljednjih 10 do 15 godina, potvrdila su prisutnost HEV viremije u krvi prikupljenoj od zdravih darivatelja. Ovo otkriće dovelo je do prepoznavanja HEV-a kao infekcije koja se prenosi transfuzijom te je iz tog razloga u nekoliko zemalja uvedeno obvezno pretraživanje za HEV RNA donirane krvi. Takvo pretraživanje provodi se dokazom nukleinske kiseline virusa, što je skupo, a potrebna je i specijalizirana oprema i obučeni djelatnici. Stoga su neke zemlje usvojile politiku selektivnog probiranja krvi koja treba za transfuziju određenim skupinama za koje se smatra da imaju visok rizik od HEV infekcije; na primjer, primatelji transplantiranih organa, trudnice ili imunosupresivne osobe (GOEL i AGGARWAL, 2020.).

## 2.9 Hepatitis E u Republici Hrvatskoj

U dosadašnjim istraživanjima u Republici Hrvatskoj pretraživane su domaće svinje na anti-HEV-antitijela te je ustanovljena seroprevalencija 32,94%, s intervalom pouzdanosti od 95% (CI) između 30,55 i 35,42%. Pozitivne životinje su potvrđene u 11 od 14 županija sa seroprevalencijom na županijskoj razini u rasponu od 8,33% do 60,00%. Samo u tri županije nisu pronađeni pozitivni uzorci (Karlovača, Krapinsko-zagorska i Virovitičko-podravska), vjerojatno zbog ograničenog broj pretraženih uzoraka ( $\Sigma 54$ ). Najveća seroprevalencija utvrđena je u Osiječko-baranjskoj županiji (60%; 95% CI od 44,6 do 73,65%) i Vukovarsko-srijemskoj županiji (50,11%; 95% CI od 45,61 do 54,61%). U šest od 16 županija uključenih u istraživanje HEV u divljih svinja utvrđeno je 31,10% pozitivnih uzoraka uz seroprevalenciju na županijskoj razini u rasponu od 7,70% (95% CI 1,37-33,31) do 50,60% (95% CI 45,28-55,88%). Najveća seroprevalencija potvrđena je u Vukovarsko-srijemskoj (50,60%, 95% CI od 45,28-55,88%) i Osiječko-baranjskoj županiji (43,18%, 95% CI od 29,68-57,77%). U istom istraživanju HEV RNA dokazan je u divljih svinja PCR metodom, a sve pozitivne životinje su bile i serološki pozitivne. HEV RNA dokazana je u 17 od 150 testiranih uzoraka iz četiri županije obuhvaćene istraživanjem (Brodsko-posavska, Dubrovačko-neretvanska, Karlovačka i Međimurska). Prevalencija dokaza HEV RNA bila je 11,33% (95% CI 7,19-17,14%). Najveći broj HEV RNA pozitivnih divljih svinja otkriven je u Brodsko-posavskoj županiji ( $\Sigma 13$ ), dvije u Međimurskoj županiji, te po jedna u Dubrovačko-neretvanskoj i Karlovačkoj županiji (JEMERŠIĆ i sur., 2017.)

Drugo istraživanje rađeno je na malim glodavcima. Uzorci su prikupljeni s područja Medvednice, Gerova, Plitvica, Maksimira, Lipovljana, Čazme, Žutice, Draganića, Našica i Požege. Virusna RNA otkrivena je u samo jednom uzorku jetre (0,21%, 1/483) iz žutogrlog miša (*Apodemus flavicollis*) s planine Medvednice. Ct-vrijednost u uzorku pozitivne jetre bio je 31, a ostala tkiva i organi pozitivne životinje bili su negativni na HEV. Filogenetska analiza djelomične 242nt ORF1 dobivene sekvence pokazala je da HEV dokazan u žutogrlog miša pripada genotipu 3 vrste Orthohepevirus A, podtip 3a. Soj dokazan u glodavcu s Medvednice je blisko genetski srodan s HEV dokazanim u ljudi u Hrvatskoj tijekom 2012. (KT583123, Zagrebačka županija, 98,38%), 2014. (KY910801, Zagrebačka županija, 86,58%; KY910803, Zagrebačka županija, 90,65%) i 2017. godine (KY910802, Dubrovačko-neretvanska županija, 98,78%), kao i onima dokazanim u

divlje svinje iz 2016. (KY910824, Vukovarsko-srijemska županija, 98,78%) te domaće svinje iz 2013. godine (KT583117, Međimurska županija, 92,27%). Stoga je zaključak da prevladavajući sojevi u Hrvatskoj pripadaju podtipovima 3a i 3c te se mogu smatrati endemskim (PRPIĆ i sur., 2019.).

U Hrvatskoj je prvi autohtoni slučaj hepatitisa E kod ljudi zabilježen 2012. godine (ČIVLJAK i sur., 2013.). Istraživanja provedena od 2011. do 2013. godine na bolesnicima s kliničkim simptomima hepatitisa i povišenim jetrenim enzimima koji su bili negativni na hepatitis A-C, otkrili su HEV protutijela IgM / IgG u 10,7% bolesnika. Među IgM pozitivnim bolesnicima bilo ih je 35,7% pozitivan na HEV RNA (ĐAKOVIĆ RODE i sur., 2014.) Nekoliko istraživanja istraživalo je seroprevalenciju HEV infekcije u različitim skupine stanovništva u Hrvatskoj. Protutijela na HEV IgG otkrivena su u 24,5% primatelja transplantacije jetre (MRZLJAK i sur., 2017.), 8,9% alkoholičara (VILIBIĆ ČAVLEK i sur., 2016.), 8,6% bolesnika s posttraumatskim stresnim poremećajem uzrokovanim ratom (VILIBIĆ ČAVLEK i sur., 2016.), 8,1% šumskih radnika (JELIČIĆ i sur., 2017.), 6,1% korisnika injekcijskih droga (VILIBIĆ ČAVLEK i sur., 2016.), 4,0% lovaca, 3,4% opće populacije (JELIČIĆ i sur., 2017.), 2,9% trudnica (JELIČIĆ i sur., 2017.) , 2,0% zdravstvenih radnika (JELIČIĆ i sur., 2017.) i 1,1% pacijenata zaraženih HIV-om (ĐAKOVIĆ RODE i sur., 2014.). Istraživanje provedeno među darivateljima krvi 2016. godine pokazalo je visoku stopu seroprevalencije HEV IgG od 20,3% uz 1,7% HEV IgM pozitivnih. Nijedan od IgM pozitivnih uzoraka nije bio pozitivan na HEV RNA (MILETIĆ LOVRIC i sur., 2016.). Seroprevalencija HEV IgG značajno se povećava s dobi ispitanika (VILIBIĆ ČAVLEK i sur., 2016.). Uz to, stope seroprevalencije bile su veće u stanovnika prigradskih i ruralnih područja u usporedbi sa stanovnicima urbanih područja, zatim u osoba koje žive u obiteljima s više članova kućanstva, kod osoba koje koriste bunare kao izvor pitke vode (VILIBIĆ ČAVLEK i sur., 2016.) i kod onih koji koriste kanalizacijski sustav spojen na septičke jame (MRZLJAK i sur., 2018.). 2018. godine, prvi put je zabilježen slučaj kroničnog HEV-a sa zatajenjem jetre i ozbiljnim kliničkim tijekom koji je bio indikacija za transplantaciju jetre. Pacijent je liječen ribavirinom te je nakon toga je ozdravio (DINJAR KUJUDŽIĆ i sur., 2018.).

Sveukupno HEV je najvjerojatnije endemski prisutan u ljudi i pojedinih životinjskih vrsta na području RH, a srodnost sojeva ukazuje na mogući zoonotski ciklus.

### **3 MATERIJALI I METODE**

#### **3.1 Uzorci pretraživanih seruma**

U istraživanju je ukupno pretraženo 264 uzorka seruma konja, 308 uzorka seruma pasa te dodatno, izvan predviđanja osnovnog istraživanja, 88 uzoraka seruma mačaka.

Uzorci seruma konja prikupljali su se po županijama kontinentalne Hrvatske tijekom 2019. godine u svrhu provedbe Programa nadzora groznice Zapadnog Nila, a zatim su ostatni uzorci seruma pohranjeni na temperaturu  $-20^{\circ}\text{C}$  u Virološkom laboratoriju Zavoda za zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, dok su uzorci seruma pasa i mačaka prikupljeni u razdoblju od travnja do studenog 2020. godine na Klinici za zarazne bolesti i Klinici za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta u svrhu dijagnostike infekcija sa SARS-CoV-2 virusom. Nakon primarne obrade ostatni uzorci seruma pohranjeni su na temperaturu  $-20^{\circ}\text{C}$  u Virološkom laboratoriju Zavoda za zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu do provođenja ovog istraživanja. Uzorci seruma pasa i mačaka odabirani su iz ostatnih uzoraka seruma podrijetlom od životinja koje borave u kućanstvima, u bliskom suživotu s ljudima kako bi time primarno odredili zoonotski značaj infekcija HEV u ovih vrsta. Serumi su odvojeni centrifugiranjem krvi pri 2000 okretaja/minuti tijekom 10 minuta prilikom pripreme uzoraka za primarne serološke ili biokemijske laboratorijske pretrage. Nakon provedenih ciljanih pretraga ostatni uzorci seruma pohranjeni su pri  $-20^{\circ}\text{C}$  do izvođenja serološke pretrage radi dokaza antitijela za HEV.

Prilikom obrade podataka za konje su bilježeni podaci o mjestu iz kojeg dolaze, dobi i spolu, a za pse i mačke uz mjesto, dob i spol, bilježio se i razlog dolaska na Klinike Veterinarskoga fakulteta kako bi u pozitivnih životinja mogli istražiti i kliničke značajke infekcije.

#### **3.2. Serološka dijagnostika**

U svrhu dokaza serumskih protutijela za virus Hepatitisa E u pretraživanim uzorcima seruma, korišten je komercijalni komplet, indirektni imunoenzimni test (ELISA) pod nazivom ID Screen

Hepatitis E Indirect Multi-species (ID.vet, Grabels, Francuska). To je indirektni ELISA kit za određivanje anti-Hepatitis E protutijela u serumu i plazmi svinja i ostalih domaćih sisavaca.

ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species kit se sastoji od mikrotitracijske ploče koja sadrži 96 jažica. Ploča je podijeljena u naizmjenične pozitivne i negativne stupace od kojih svaki sadržava po 8 jažica. Pozitivne jažice obložene su rekombinantnim antigenom iz kapside virusa hepatitisa E genotipa 3, dok su negativne jažice prazne. U jažice se u duplikatu (jažica s antigenom i bez) dodaju uzorci koji se pretražuju kao i pozitivne i negativne kontrole koje su sastavni dio dijagnostičkog kompleta. Ako su Anti-HEV antitijela prisutna u uzorku tada nastaje kompleks antigen-antitijelo vezan na stjenke jažica. Nakon ispiranja, u jažice se dodaje konjugat sa peroksidazom hrena (HRP). On omogućava vezanje za anti-HEV antitijela i tvori se kompleks antigen-antitijelo-konjugat-HRP. Nakon uklanjanja viška konjugata ispiranjem, u jažice se dodaje otopina supstrata tetrametilbenzidina (TMB). Razlika u obojenosti između parnih i neparnih jažica proporcionalna je količini specifičnih antitijela prisutnih u uzorku. U prisutnosti antitijela pojavljuje se plava boja otopine koja nakon dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije postaje žuta, dok s druge strane u odsutnosti antitijela ne dolazi do obojenja.

### **3.2.1. ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test**

Za serološko pretraživanje seruma konja, pasa i mačaka u istraživanju je korišten komercijalni komplet za izvođenje imunoenzimskog testa (ELISA) „ID Screen® Hepatitis E Indirect Multi-species“ (ID.vet, Grabels, Francuska), a izvedba cjelokupnog postupka načinjena je sukladno uputama proizvođača.

U izvedbi dijagnostičke metode korišten je navedeni dijagnostički komplet koji sadržava:

1. Mikrotitracijske plitice s 96 jažica u koje je tijekom proizvodnje vezan antigen u svako drugi stupac sa po 8 jažica
2. Koncentrirani konjugat (10x)
3. Pozitivna kontrola
4. Negativna kontrola

5. Puferska otopina 2 (otopina za razrjeđivanje seruma)
6. Puferska otopina 3 (otopina za razrjeđivanje konjugata)
7. Koncentrirana otopina za ispiranje (20X)
8. Otopina supstrata (TMB)
9. Otopina za zaustavljanje reakcije (0,5 M)



**Slika 1.** Sadržaj komercijalnog dijagnostičkog kompleta ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test

Osim navedenoga komercijalnog kompleta za izvedbu pretrage korišten je sljedeći pribor i oprema:

1. Jednokanalna automatska mikropipeta zapremine 10-100  $\mu$ l (Eppendorf)
2. Višekanalna automatska mikropipeta zapremine 10-100  $\mu$ l (Eppendorf)
3. Čitač mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska)
4. Ispirač mikrotitracijskih plitica (Hydroflex, Tecan, Männedorf, Švicarska)
5. Tresilica (Vortex)
6. Lateks rukavice
7. Nastavci za pipete

Uz navedeno za pripremu radne otopine za ispiranje od koncentrirane otopine za ispiranje koja je dio dijagnostičkog kompleta korištena je i destilirana voda.

### **3.2.2. Izvođenje pretrage**

Prije korištenja sve komponente komercijalnog ELISA kompleta te pretraživani serumi temperiraju se pri sobnoj temperaturi ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Svi reagensi se prije uporabe homogeniziraju na tresilici.

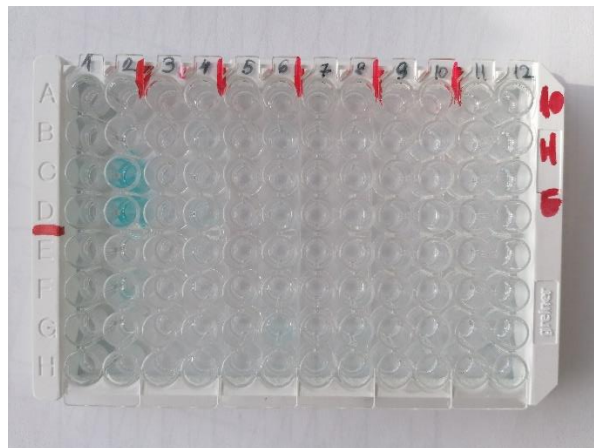
U prvom koraku, u svaku mikrotitracijsku jažicu dodaje se automatskom višekanalnom pipetom po  $190\ \mu\text{L}$  puferske otopine 2 (otopina za razrjeđivanje seruma). Nakon toga se dodaje u po četiri jažice pozitivni, odnosno negativni kontrolni serum te u po dvije jažice svaki pretraživani serum u količini od po  $10\ \mu\text{L}$ .

Mikrotitracijska ploča s dodanim razrjeđenim serumima se zatim inkubira 45 minuta ( $\pm 4$  minute) pri  $21\ ^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Nakon inkubacije se isprazni sadržaj jažica i plitice se ispiru pomoću ispiraća mikrotitracijskih plitica 3 puta s po  $300\ \mu\text{L}$  radne otopine za ispiranje (Slika 2.). Zatim se načini radna otopina konjugata tako da se koncentrirani konjugat, koji je dio dijagnostičkog kompleta, razrijedi s puferskom otopinom 3, koja je također dio kompleta, u omjeru 1:10. Zatim se doda po  $100\ \mu\text{L}$  tako razrjeđenog konjugata u prethodno isprane jažice te se mikrotitracijska plitica inkubira 30 minuta ( $\pm 3$  minute) pri  $21\ ^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Nakon inkubacije ponovno se isprazne jažice mikrotitracijske plitice i isperu 3 puta s po  $300\ \mu\text{L}$  radne otopine za ispiranje pomoću automatskog ispiraća mikrotitracijskih plitica.



**Slika 2.** Uređaju za automatsko ispiranje mikrotitracijskih plitica

U sljedećoj fazi se u svaku jažicu dodaje po 100  $\mu$ L otopine supstrata te se plitica inkubira pri sobnoj temperaturi ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ) tijekom 15 minuta ( $\pm 2$  minuta) u mraku (Slika 3.).



**Slika 3.** Mikrotitracijska plitica nakon inkubacije, a prije dodavanja otopine za zaustavljanje reakcije

Iza navedene inkubacije dodaje se u svaku jažicu mikrotitracijske plitice po 100  $\mu$ L otopine za zaustavljanje reakcije razgradnje supstrata peroksidazom. Ovisno o prisutnosti ili odsutnosti



protutijela u pretraživanim uzorcima seruma vidljivo je žuto obojenje različitog intenziteta ili sadržaj jažice ostaje bezbojan. Rezultati načinjenih pretraga se očitavaju pomoću čitača mikrotitracijskih plitica pri valnoj duljini od 450 nm.

### **3.2.3. Validacija testa**

Sukladno uputama proizvođača, radi pouzdanosti i vjerodostojnosti postignutih rezultata svakog pojedinog pretraživanja, propisane su vrijednosti aritmetičke sredine očitavanja apsorbancije pozitivnog kontrolnog seruma te omjer srednje vrijednosti očitavanja kontrolnog pozitivnog i kontrolnog negativnog seruma koji jamči pouzdanost rezultata na pojedinoj mikrotitracijskoj plitici.

Izvođenje testa smatra se valjanim ako je:

Srednja vrijednost očitanih rezultata za pozitivni kontrolni serum veća od 0,350:

$$OD_{PC} > 0.350$$

Omjer srednje vrijednosti očitanih rezultata za pozitivni kontrolni serum i srednje vrijednosti rezultata za negativni kontrolni serum za ispravno izvedenu pretragu mora biti veća od 3:

$$OD_{PC} / OD_{NC} > 3$$

### **3.2.4. Izračunavanje i interpretacija rezultata pretrage ispitujućih uzoraka seruma**

Nakon načinjene pretrage očitane su vrijednosti rezultata za svaki pojedini pretraživani serum pomoću čitača mikrotitracijskih plitica na valnoj duljini od 450 nm.

Radi interpretacije rezultata izračunava se omjer očitane srednje vrijednosti apsorbancije pojedinog pretraživanog seruma i srednje vrijednosti očitanih rezultata pozitivnog kontrolnog seruma te se dobiveni broj množi sa 100 kako bi bio izražen u postotcima. Na ovaj način za svaki

pretraživani serum izračunat je kompeticijski postotak u odnosu na pozitivni kontrolni serum prema sljedećoj formuli:

$$S/P = ( OD_{Uzoraka} / OD_{PC} ) * 100$$

Sukladno vrijednosti kompeticijskog postotka rezultat pretrage pojedinog seruma može biti:

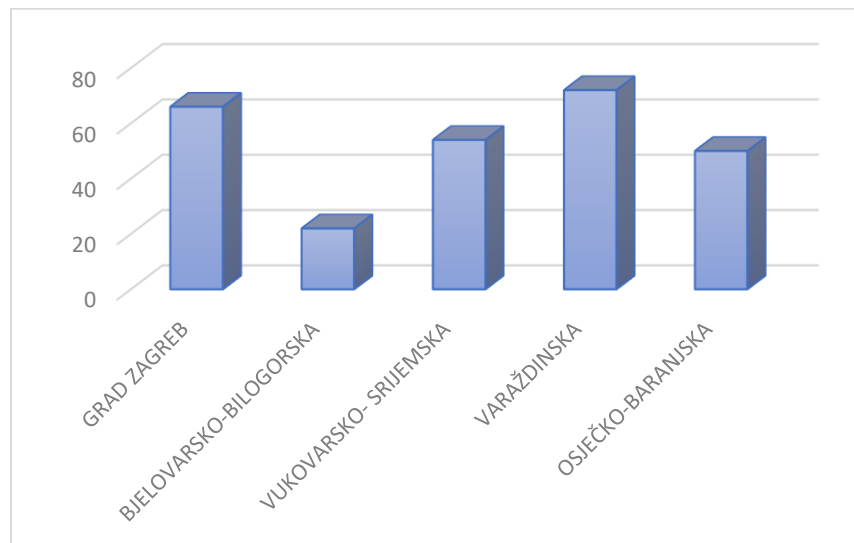
- a. pozitivan – kompeticijski postotak veći ili jednak 70% ( $S/N \% \geq 70\%$ )
- b. sumnjiv – kompeticijski postotak veći od 60% i manji od 70% ( $70\% < S/N \% > 60\%$ )
- c. negativan – kompeticijski postotak manji ili jednak 60% ( $S/N \% \leq 60\%$ )

## 4 REZULTATI

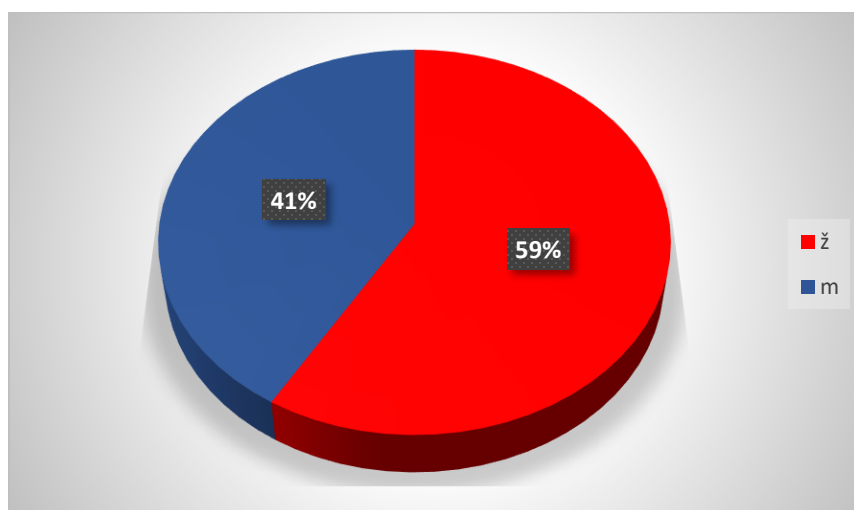
U istraživanju je ukupno pretraženo 264 uzorka konja. Uzorci seruma prikupljali su se po županijama i prvenstveno su prikupljeni za istraživanje bolesti Zapadnog Nila, a zatim su ostatni uzorci seruma pohranjeni na temperaturu - 20°C u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. U ovom istraživanju koristili su se nasumično odabrani uzorci iz Bjelovarsko-bilogorske županije, grada Zagreba, Osiječko-baranjske županije, Varaždinske županije i Vukovarsko-srijemske županije (Tablica 1., Grafikon 1.). Prema spolu pretraženo je 108 (41%) muških i 156 (59%) ženskih životinja (Grafikon 2.). Pretražene životinje bile su u dobi od 18 mjeseci do 15 godina (Grafikon 3.).

**Tablica 1.** Prikaz rezultata za pretražene uzorke konja po županijama

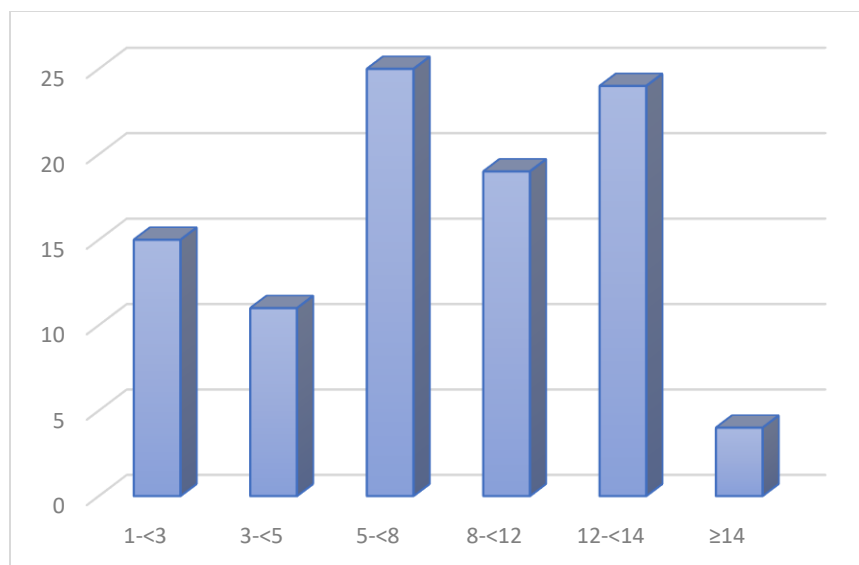
ŽUPANIJA	BROJ PRETRAŽENIH UZORAKA KONJA	POZITIVNI	SUMNJIVI	NEGATIVNI
GRAD ZAGREB	66	0	0	66
BJELOVARSKO- BILOGORSKA	22	0	0	22
VUKOVARSKO- SRIJEMSKA	54	0	0	54
VARAŽDINSKA	72	0	0	72
OSJEČKO- BARANJSKA	50	0	0	50
UKUPNO	264	0	0	264



**Grafikon 1.** Pretražena populacija konja po županijama



**Grafikon 2.** Pretražena populacija konja prema spolu



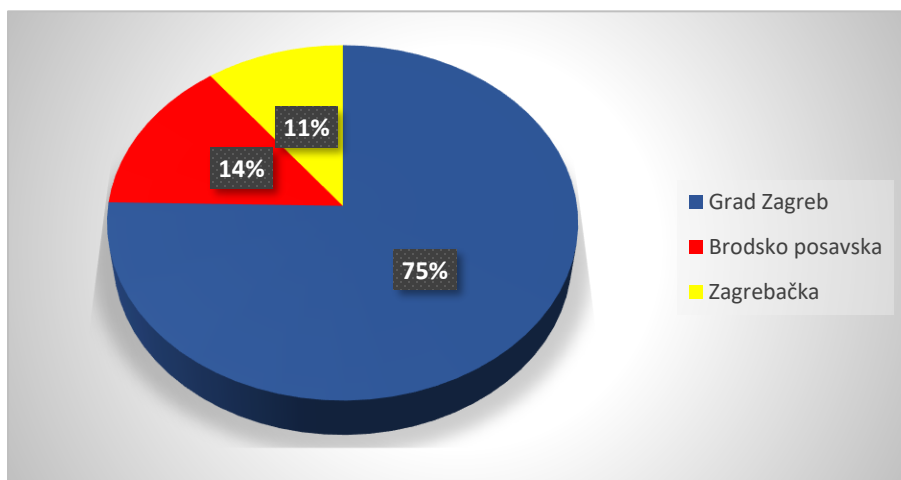
**Grafikon 3.** Pretražena populacija konja prema dobi

Uzorci seruma konja s područja pet županija kontinentalne Hrvatske pretraženi su komercijalnim dijagnostičkim kompletom ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test i njihovim pretraživanjem nisu dokazani pozitivni rezultati.

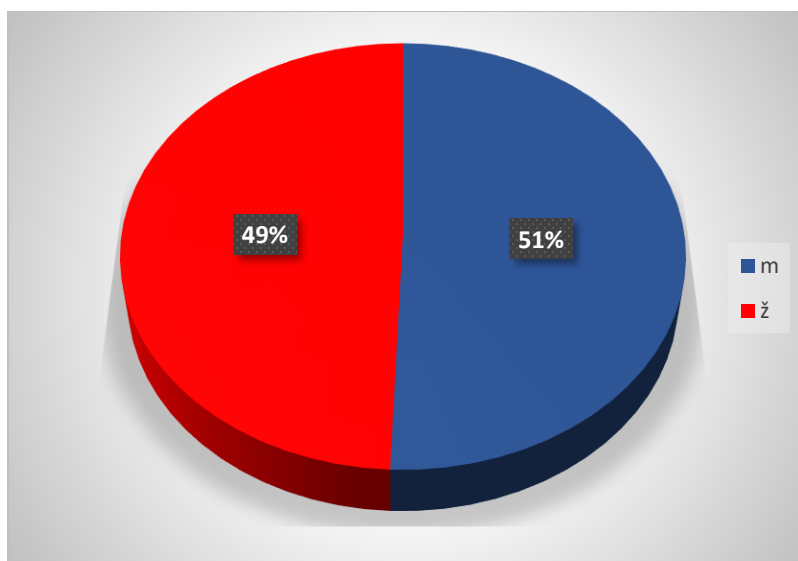
U svrhu određivanja prisustva i seroprevalencije infekcije kućnih ljubimaca ukupno je pretraženo 308 uzoraka seruma pasa s područja tri županije. Najveći broj pretraženih pasa je iz županije Grad Zagreb, dok je nešto manji broj pretraženih životinja bio iz Brodsko-posavske i Zagrebačke županije (Tablica 2., Grafikon 4.). Prema spolu pretraženo je 156 muških i 152 ženske životinje (Grafikon 5.). Psi obuhvaćeni istraživanjem bili su u dobi od 2 mjeseca do 17 godina (Grafikon 6.)

**Tablica 2.** Prikaz rezultata za pretražene uzorke pasa po županijama

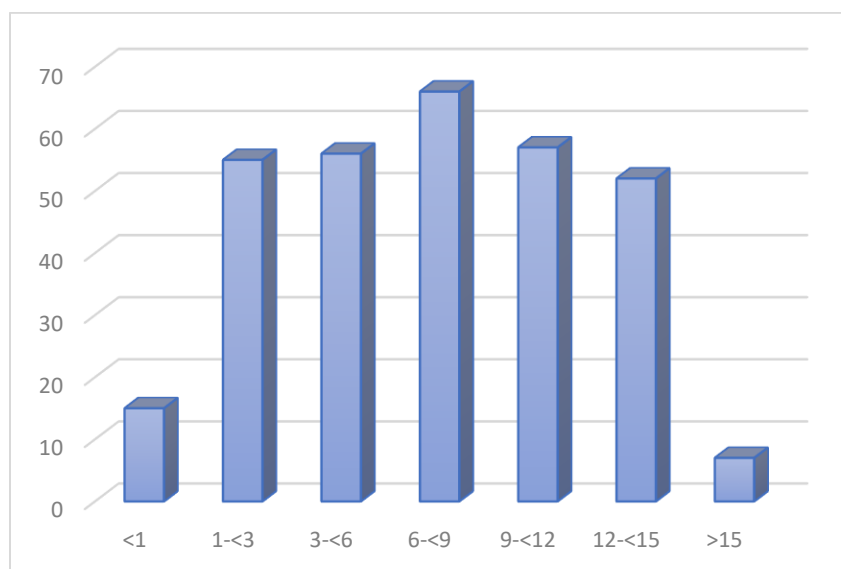
ŽUPANIJA	BROJ PRETRAŽENIH UZORAKA PASA	POZITIVNI	SUMNJIVI	NEGATIVNI
GRAD ZAGREB	232	1	0	231
BRODSKO- POSAVSKA	44	0	0	44
ZAGREBAČKA	32	0	0	32
UKUPNO	308	1	0	307



**Grafikon 4.** Pretražena populacija pasa prema županijama



**Grafikon 5.** Pretražena populacija pasa prema spolu



**Grafikon 6.** Pretražena populacija pasa prema dobi

Od pretraženih 308 uzoraka jedan je pas (0,3%) bio serološki pozitivan na razini očitano pozitivnog kontrolnog seruma što indirektno ukazuje na visoku razinu antitijela za HEV. Radilo se o muškom psu, križane pasmine s područja grada Zagreba u dobi od 16 godina koji je na Klinike

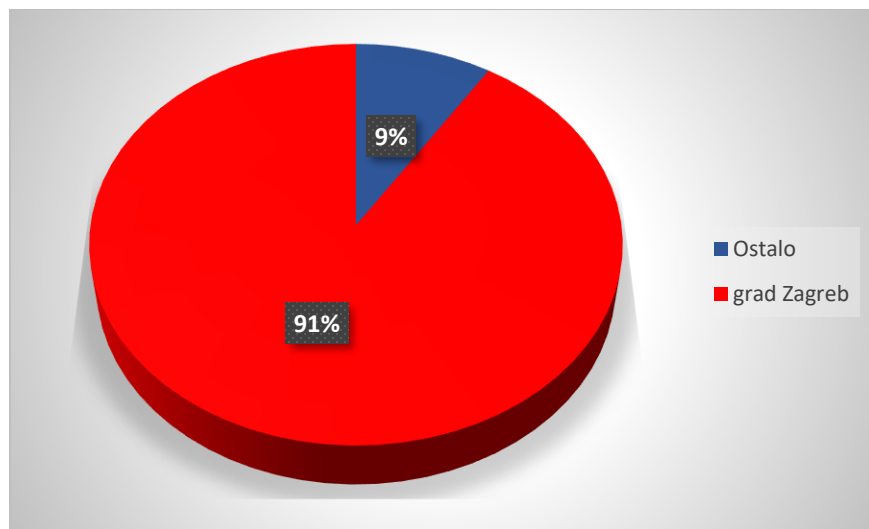
Veterinarskoga fakulteta zaprimljen zbog akutnog povraćanja. Stacioniran je i liječen zbog akutnog gastroenteritisa, a zbog hematoloških i biokemijskih pokazatelja (pokazatelji oštećenja jetre, Bilirubin 43,3  $\mu\text{mol/L}$ , AST 308 U/L, AP 759 U/L) postavljena je sumnja na leptospirozu koja je laboratorijski isključena. Nakon tjedan dana je otpušten s Klinika Veterinarskoga fakulteta te se potpuno oporavio. S obzirom na nalaze i dokazana antitijela HEV-IgG te dob životinje u kojoj je moguća imunosupresija ostaje mogućnost da je klinička slika bila uzrokovana infekcijom HEV.

U ovom istraživanju pretraženo je ukupno 80 mačaka s područja grada Zagreba (91%) i osam životinja (9%) s područja ostalih županija Republike Hrvatske (Tablica 3., Grafikon 7.). Prema spolu pretraženo je 51% muških i 49% ženskih životinja (Grafikon 8.). Životinje su bile u dobi od 2 mjeseca do 18 godina (Grafikon 9.).

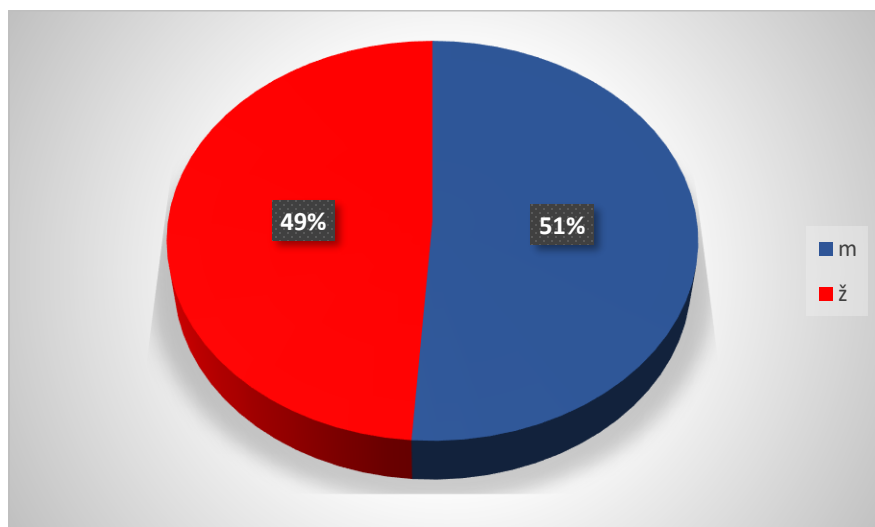
**Tablica 3.** Prikaz rezultata za pretražene uzorke mačaka po županijama

ŽUPANIJA	BROJ PRETRAŽENIH UZORAKA MAČAKA	POZITIVNI	SUMNJIVI	NEGATIVNI
GRAD ZAGREB	80	0	0	80
OSTALE ŽUPANIJE	8	0	0	8
UKUPNO	88	0	0	88

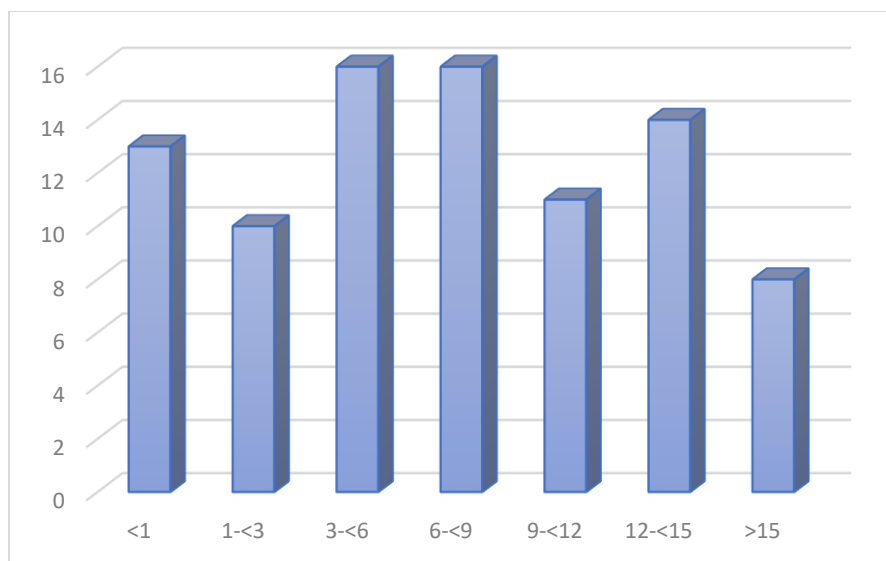




**Grafikon 7.** Pretražena populacija mačaka prema županiji



**Grafikon 8.** Pretražena populacija mačaka prema spolu



**Grafikon 9.** Pretražena populacija mačaka prema dobi

Svi pretraženi uzorci seruma mačaka u ovom istraživanju bili su negativni pretraživanjem komercijalnim kompletom ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test.

## 5 RASPRAVA

Virusa hepatitisa E (HEV) danas predstavlja veliki javnozdravstveni problem. Do prije deset godina slučajevi infekcije HEV-om u Europi uglavnom su bili vezani za putnike koji su se vraćali iz Azije, ali u današnje vrijeme hepatitis E pojavljuje se u mnogim europskim zemljama najčešće povezivan sa zoonotskim prijenosom.

Utvrđeno je da anti-HEV seroprevalencija u jugoistočnoj Europi uvelike varira, ovisno o proučavanoj populaciji, zemljopisnom području i korištenim metodama. Također je utvrđeno da su stope seroprevalencije IgG antitijela u različitim skupinama ljudi značajno razlikuju pa je tako u Hrvatskoj iznosila od 1,1% do 24,5% , dok je 20,9% u Bugarskoj, 5,9% do 17,1% u Rumunjskoj, 15% u Srbiji, 9,7% u Grčkoj i 2% do 9,7% u Albaniji. Među mogućim čimbenicima rizika starija dob je bila najznačajniji prediktor seropozitivnosti HE u većini istraživanja (MRZLJAK i sur., 2019.).

Istraživanjima učestalosti infekcija HEV u životinja u istim državama IgG antitijela u domaćih svinja otkrivene su u 20% do 54,5% životinja u Srbiji, 29,2% do 50% u Bugarskoj, 38,94% do 50% u Rumunjskoj, a vrlo široki raspon seroprevalencije od 31,1% do čak 91,7% zabilježen je u Hrvatskoj. Seroprevalencija u divljih svinja bila je do 10,3% u Rumunjskoj te trostruko viša i ujednačena u Sloveniji (30,3%) i Hrvatskoj (31,1%) (MRZLJAK i sur. , 2019.).

Iako je svinja dobro poznat rezervoar za HEV, protutijela specifična na HEV pronađena su i u goveda različitih pasmina poput žutih goveda (YAN i sur., 2016.), Holštajn-frizijskih goveda (HUANG i sur., 2016.) i ostalih pasmina mliječnih goveda (EL-TRAS i sur., 2013.). Prevalencija anti-HEV IgG bila je 4,4% do 6,9% u Indiji, 1,4% u Brazilu, od 10,4% do 37% u Kini i do 15% u SAD-u. Suprotno tome, HEV-RNA je u goveda potvrđena u samo nekoliko istraživanja. Sojevi HEV-GT4 bili su identificirani u krava Holštajn pasmine koje se drže na mješovitoj farmi zajedno sa svinjama u jugozapadnoj Kini i u žutih goveda iz istočne Kine (HUANG i sur., 2016 .; YAN i sur., 2016.). Budući da je mješoviti uzgoj domaće stoke učestao u istraživanim regijama Kine sojevi dokazani u goveda vrlo su srodni sojevima svinja, pa je međuvrtni prijenos sa svinja na goveda najvjerojatniji razlog ovog nalaza (SPAHR i sur., 2017.). Uz goveda, antitijela za HEV

dokazivana su i u malih preživača, ovaca i koza. Istraživanja provedena u Egiptu dokazala su stopu seroprevalencije u koza od 9,4% te u ovaca od 4,4% (EL-TRAS i sur., 2013.). U SAD-u specifična HEV antitijela su otkrivena u 16% koza (SANFORD i sur., 2013.). U Italiji HEV-GT3 sojevi su otkriveni u 11 od 119 uzoraka koza što daje seroprevalenciju od 9,24 %, a sojevi su vrlo srodni sojevima dokazanim u divljih svinja na istom području (DI MARTINA i sur., 2016.). HEV-GT3 specifična IgG protutijela potvrđena su i u Španjolskoj u 0,6% koza i 1,92% ovaca (PERALTA i sur., 2009.).

U Španjolskoj RNA virusa hepatitisa E otkrivena je u 7 od 861 ispitanih kopitara. Pojedinačna prevalencija bila je 0,4% (3/692) u konja, 1,2% (1/86) u magaraca i 3,6% (3/83) u mazgi. HEV je bio znatno zastupljeniji u mazgi u usporedbi s konjima ( $P = 0,019$ ). Dob zaraženih životinja kretala se od jedne do 18 godina. Kako je prevalencija HEV bila veća u izrazito starih životinja nego u odraslih ( $P = 0,003$ ) i mladih životinja ( $P = 0,005$ ), utvrđena je velika korelacija infekcija HEV i vrste i dobi kopitara ( $P < 0,001$ ) (GARCIA- BOCAGNERA i sur., 2018.).

U Egiptu od 200 uzoraka konja serološki pretraženih ELISA-om za IgG antitijela na HEV, 26 ih je bilo pozitivno. Potvrdom antitijela na HEV virus u 13% pretraženih konja autori zaključuju da oni mogu biti inficirani HEV, te pretpostavljaju da su slučajni domaćin ili možda i rezervoari (SAAD i sur., 2007.). Sličan rezultat je postignut istraživanjem mogućnosti infekcije konja HEV u istočnoj Kini. Pretražujući ukupno 101 konja, prisustvo anti-HEV IgG antitijela dokazano je u 17,8% pretraženih životinja, a 2% ih je bilo pozitivno na HEV-3-RNA (ZHANG i sur., 2008.).

U usporedbi s navedenim istraživanjima, u ovom radu serološki je pretraženo ukupno 264 uzoraka seruma konja iz različitih županija Republike Hrvatske i svih 264 uzorka bilo je negativno. Ovaj rezultat može biti posljedica različitog načina držanja i korištenja životinja na području RH u odnosu na Egipat i Kinu kao i razlika u epidemiološkoj slici HEV u ljudi pa posredno i okolišu. U našim uzgojima konji imaju minimalan kontakt s domaćim svinjama te najvjerojatnije uopće ne dolaze u kontakt s divljim, a također nisu opisivane epidemije HE u ljudi. Razlike u odnosu na pozitivne dokaze infekcija u konja u Španjolskoj mogu biti i posljedica korištenja različitih metoda. Naime u Španjolskoj je dokazivana virusna RNA molekularnim metodama, a u našem istraživanju dokaz protutijela. Stoga razlika možda može biti uvjetovana i izostankom imunološke

reakcije i tvorbe detektibilne količine protutijela u konja nakon infekcije s HEV ili neusklađenošću antigena u korištenom testu s cirkulirajućim sojevima što zasigurno treba biti dodatno istraženo. Sveukupno iz rezultata ovog istraživanja proizlazi da neovisno o dokazanoj mogućoj infekciji konja u svijetu ovakva je mogućnost u epizootiološkim i epidemiološkim uvjetima Republike Hrvatske minimalna te konji nisu u riziku od infekcije HEV. Samim time konji ne predstavljaju značajan rizik niti u javnom zdravstvu na području Republike Hrvatske.

Istraživanja seroprevalencije HEV u pasa su provedena u nekoliko država uključivši i neke europske države. Primjerice u Nizozemskoj je provedeno serološko istraživanje mogućnosti infekcija HEV u pasa i dokazana su anti-HEV antitijela u serumu 30 pasa od ukupno 162 pretražena (18,52%) (LI i sur., 2020.). Osim u Nizozemskoj istraživanje je provedeno i u Velikoj Britaniji, Južnoj Koreji, Kini te Njemačkoj. U Njemačkoj je seroprevalencija HEV u pasa bila čak 56,6% (DAHNER i sur., 2018.), dok je u Velikoj Britaniji iznosila 0,8% (MCELROY i sur., 2015.). U ostalim dijelovima svijeta seroprevalencija od 28,2% ustanovljena je u Južnoj Koreji (LYOO i sur., 2019.), a u različitim regijama Kine od 13,54% do 36,55% (ZHANG i sur., 2008., LIANG i sur., 2014.; ZENG i sur., 2017. ).

Za razliku od tih zemalja, u ovom istraživanju pretraženo je 308 uzoraka seruma pasa s područja Zagreba, Zagrebačke županije, Brodsko-posavske i Bjelovarsko-bilogorske županije od kojih je samo jedan pas bio pozitivan na anti-HEV antitijela što odgovara seroprevalenciji od 0,3 %. Seroprevalencija ustanovljena na području Republike Hrvatske značajno je manja od seroprevalencija HEV infekcija u svim drugim državama s izuzetkom Velike Britanije. Razlog za ovako nisku seroprevalenciju u odnosu na primjerice Nizozemsku i Njemačku može biti u usklađenosti antigena u korištenom testu sa cirkulirajućim sojevima na području RH. Također uzrok ovakvih razlika može biti i u pretraživanoj populaciji s obzirom da je u ovom istraživanju najznačajniji broj pasa bio iz skupine kućnih ljubimaca koji borave u kućanstvima u urbanim sredinama. Samim tim rizik od izloženosti HEV u Republici Hrvatskoj je očito zanemariv u ovakvih životinja kao i njihov posljedični značaj za javno zdravstvo. Bilo bi interesantno nastaviti istraživanje pretraživanjem lovačkih pasa koji često borave na istim prostorima kao i divlje svinje, a također su i u povremenom izravnom dodiru s njima. Ipak, bez obzira što su HEV-IgG antitijela dokazana u samo jedne životinje značajno je istaknuti da je taj pas bio u starijoj dobi te zaprimljen

zbog akutnog gastroenteritisa, a biokemijski pokazatelji su ukazivali na oboljenje jetre. Iako nemamo konačni dokaz da je ova klinička slika bila posljedica infekcije HEV, potrebno je nastaviti istraživanja i u slučaju ovakvih kliničkih znakova u kućnih ljubimaca načiniti pretragu i na HEV. Tek ovakvim ciljanim istraživanjem uz pokušaj dokazivanja uzročnika iz kliničkih uzoraka oboljelih životinja mogli bi razjasniti značaj HEV infekcije i eventualno kliničko očitovanje u pasa.

Osim pasa u Nizozemskoj su isti znanstvenici istraživali i seroprevalenciju infekcija HEV u mačaka. Ovim istraživanjem, prvim ovakvim u Europi, HEV infekcija je serološki dokazana u sedam od 47 (14,89 %) pretraženih mačaka ( LI i sur., 2020.). Istraživanja seroprevalencije HEV u mačaka je provedeno i u Aziji te je dokazana seroprevalencija u mačaka od 6,28% u Kini (LIANG i sur., 2014. ), 8,1% u Koreji (SONG i sur. 2010.) te čak 33% u Japanu (OKAMOTO i sur., 2004.)

U ovom istraživanju pretraženo je ukupno 88 uzoraka seruma mačaka s područja grada Zagreba, Zagrebačke županije i Primorsko-goranske županije od kojih nijedan uzorak nije bio pozitivan. Navedeni rezultat potvrđuje da su na području Republike Hrvatske infekcije mačaka HEV iznimno rijetke te da zasigurno nemaju značajniju ulogu u epidemiologiji ove bolesti i ne predstavljaju rizik za širenje HEV na ljude. Za potpunije spoznaje sljedeća istraživanja bilo bi dobro proširiti na pretraživanje mačaka litalica kao vjerodostojnijeg pokazatelja prisustva virusa u okolišu uključujući i eventualno prisustvo u glodavcima.

Istraživanje infekcija HEV u konja i kućnih ljubimaca, životinjskih vrsta u najbližem suživotu i kontaktu s ljudima, još uvijek su vrlo rijetka, a u RH nikada do sada nisu provedena. Rezultati provedenoga istraživanja potvrđuju da su infekcije HEV ovih vrsta životinja u epidemiološkim i epizootiološkim prilikama RH zanemarive. Od ukupno 660 pretraženih životinja sve tri istraživane vrste s područja RH infekcija HEV je potvrđena samo u jednog psa (0,15%). Ovaj podatak nam daje sigurnost da konji i kućni ljubimci trenutno ne predstavljaju značajan čimbenik u širenju HEV na ljude, te da se protuepidemijske mjere u epidemiološkoj i epizootiološkoj situaciji RH prvenstveno moraju usmjeriti na uzgoje domaćih svinja, sprječavanje infekcije tijekom kontakta s divljim svinjama i generalno sigurnost hrane.

Međutim, zbog prve potvrđene infekcije psa HEV na području RH dokazane ovim istraživanjem zasigurno je opravdano provoditi daljnja istraživanja i u životinjskih vrsta obuhvaćenih ovim istraživanjima. Posebno je naglašena potreba za nastavkom istraživanja s obzirom da je serološki pozitivan pas pokazivao kliničke znakove akutnog gastroenteritisa uz pokazatelje oštećenja jetre, tipične kliničke znakove za ljude oboljele od HE. Iako nemamo laboratorijsku potvrdu da je ovo stanje pouzdano bilo posljedica infekcije HEV, ovakva mogućnost se može opravdano razmatrati. Stoga daljnja istraživanja trebaju uključiti reprezentativni uzorak za cijelu RH koji bi obuhvatio sve specifičnosti poput vjerojatno učestalijeg hranjenja sirovim mesom pasa i mačaka u ruralnim sredinama u odnosu na one obuhvaćene ovim istraživanjem ili veću razinu izloženosti u lovačkih pasa kako bi razjasnili epidemiološki značaj kućnih ljubimaca. S druge strane potrebno je dodatno istražiti moguće infekcije HEV u životinja s akutnim gastroenteritisom i oštećenjima jetre. Provedbom navedenih istraživanja bi dodatno razjasnili različite aspekte ove emergentne zoonoze kao doprinos javnom zdravstvu, ali i veterinarskoj kliničkoj praksi.

## 6 ZAKLJUČCI

1. Istraživanje uloge konja i kućnih ljubimaca u epizootiologiji i epidemiologiji hepatitisa E, emergentne bolesti na području Republike Hrvatske, provedeno je prvi put.
2. Pretraživanjem uzoraka seruma konja i mačaka s područja RH protutijela za HEV nisu dokazana.
3. Protutijela su dokazana u jednoga psa tako da je seroprevalencija u pasa određena ovim istraživanjem iznosila 0,3%.
4. Serološki pozitivan pas je pokazivao kliničku sliku koja odgovara kliničkoj slici u ljudi oboljelih od hepatitisa E.
5. Infekcije HEV u konja i domaćih mesojeda na području RH su zanemariv rizik za javno zdravlje.
6. Protuepidemijske mjere u skladu s trenutnom epidemiološkom i epizootiološkom situacijom na području RH prvenstveno se moraju usmjeravati na uzgoje domaćih svinja, sprječavanje infekcija ljudi u kontaktu s divljim svinjama te termičku obradu mesa domaćih i divljih svinja.
7. Pri kliničkom očitovanju hepatitisa u pasa potrebno je oboljele životinje pretražiti i na HEV kako bi dobili podatke o kliničkom značaju ove infekcije u pasa.



## 7 LITERATURA

AGGARWAL, R. (2013): Hepatitis E: Epidemiology and Natural History. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 3(2), 125–133. doi: 10.1016/j.jceh.2013.05.010

AGGARWAL, R., A. GOEL (2016) : Advances in hepatitis E - I: virology, pathogenesis and diagnosis. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10(9):1053–63 doi:10.1080/17474124.2016.1185362

COLSON, P., P. BORENTAIN, B. QUEYRIAUX, M. KABA, V. MOAL, P. GALLIAN, R. GEROLAMI (2010) : Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *The Journal of infectious diseases*, 202(6), 825–834. doi.org/10.1086/655898

ČIVLJAK, R., ĐAKOVIĆ RODE O., JEMERŠIĆ L., TOPIĆ A., TURALIJA M., ČAČIĆ M., KUZMAN I. (2013) : Autochthonous hepatitis E in a patient from Zagreb: a case report. *Croatian. J. Infect.* 33: 35–39

DAHNER, L., F.J. CONRATHS, N. REIMER, M.H. GROSCHUP, M. EIDEN (2018.) : Molecular and serological surveillance of hepatitis E virus in wild and domestic carnivores in Brandenburg, Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* 65(5):1377–1380. doi: 10.1111/tbed.12877

DI MARTINA, B., F. DI PROFIO, I. MELEGARI, V. SARCHESE, S. ROBOTTO, F. MARSILIO, V. MARTELLA (2016). Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats. *Virus Research*, 225, 69–72. doi.org/10.1016/j.virusres.2016.09.008

DINJAR KUJUNDŽIĆ, P., PAVIČIĆ ŠARIĆ J., BETICA RADIĆ Lj., MRZLJAK A. (2018): Fulminant hepatitis E on a livertransplantation list. Proceeding from the “Emerging and neglected zoonoses in the One Health context”, Zagreb, 18-19 October. 83

ĐAKOVIĆ RODE, O., JEMERŠIĆ L., BRNIĆ D., PANDAK N., MIKULIĆ R., BEGOVAC J., VINCE A. (2014) : Hepatitis E in patients with hepatic disorders and HIV-infected patients in Croatia: is one diagnostic method enough for hepatitis E diagnosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33: 2231-2236 DOI:10.1007/s10096-014-2187-7

EL-TRAS, W. F., A. A. TAYEL, N. N. EL-KADY (2013). Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses and Public Health*, 60, 244–251. doi. org/10.1111/j.1863-2378.2012.01516.x

EMERSON, S.U., VA ARANKALLE, RH PURCEL (2005) : Thermal stability of hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 192(5):930–3 doi: 10.1086/432488

- GARCIA-BOCANGERA, I., A. RIVERA, J. CABALLERO-GOMEZ, P. LOPEZ-LOPEZ, D. CANO-TERRIZA, M. FRIAS, S. JIMANEZ-RUIZ, M. A. RISALDE, J. C. GOMEZ-VILLAMANDO, A. RIVERO-JUAREZ (2018) : Hepatitis E virus infection in equines in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 66(1):66-71. doi: 10.1111/tbed.12962
- GOEL, A., R. AGGARWAL (2020): Hepatitis E: Epidemiology, Clinical Course, Prevention, and Treatment. *Gastroenterol. Clin. North. Am.* 49(2), 315-330. doi: 10.1016/j.gtc.2020.01.011
- HE, W., Y. WEN, Y. XIONG, M. ZHANG, M. CHENG, Q. CHEN (2018): The prevalence and genomic characteristics of hepatitis E virus in murine rodents and house shrews from several regions in China. *BMC. Vet. Res.* 14:414. doi.org/10.1186/s12917-018-1746-z
- HUANG, F., Y. LI, W. YU, S. JING, J. WANG, F. LONG, C. LIU, Q. PAN (2016). Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatol.* 64(2), 350–359. doi.org/10.1002/hep.28668
- JAISWAL, S.P., A.K. JAIN, G. NAIK, N. SONI, D.S. CHITNIS (2001): Viral hepatitis during pregnancy. *Int J. Gynaecol. Obstetr.* 72(2):103–8. doi: 10.1016/s0020-7292(00)00264-2
- JELIČIĆ, P., JEMERŠIĆ L., BRUMEN V., JANEV-HOLCER N., PROHIĆ A., BARBIĆ LJ., TABAIN I., STEVANOVIĆ V., VILIBIĆ-ČAVLEK V. (2017): Seroprevalence of hepatitis E in professionally exposed groups in Croatia: preliminary results. 7 th International Congress "Veterinary Science and Profession", Zagreb, p.55. 35
- JELIČIĆ, P., VILIBIĆ-ČAVLEK T., VILIBIĆ M., JEMERŠIĆ L., KOLARIĆ B., KUČINAR J., BARBIĆ LJ., STEVANOVIĆ V., JANEV-HOLCER N., TABAIN I., BRUMEN V., ĐAKOVIĆ I., PROHIĆ A., KOŠEC V., KAIĆ B. (2017): Seroprevalence of hepatitis E in different population groups in Croatia. 7th Congress of Slovenian Microbiological Society, Bled, Slovenia, p.155
- JEMERŠIĆ, L., KEROS T., MALTAR LJ., BARBIĆ LJ., VILIBIĆ ČAVLEK T., JELIČIĆ P., ĐAKOVIĆ RODE O., PRPIĆ J. (2017) : Differences in hepatitis E virus (HEV) presence in naturally infected seropositive domestic pigs and wild boars - an indication of wild boars having an important role in HEV epidemiology. *Vet. Arhiv.* 87 (6), 651-663. doi:10.24099/vet.arhiv.170208
- JOHNE, R., A. PLENGE-BONIG, M. HESS, R.G. ULRICH, J. REETZ, A. SCHIELKE (2010): Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91(3):750–8 doi: 10.1099/vir.0.016584-0
- JUAREZ, A. R., A. AGUILERA, A. AVELLON, M.G. DELTORO, F. GARCIA, C. GORTAZAR, L. E. MORANO (2018) : Executive summary: Consensus document of the diagnosis, management and prevention of infection with the hepatitis E virus: Study Group for Viral Hepatitis ( GEHEP ) of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology ( SEIMC ). *Enfermed. Infecc. Microbiol. Clín.* doi:10.1016/j.eimc.2018.06.014

KAMAR, N., J. SELVES, J.M. MANSUY (2008): Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 358:811–817. doi: 10.1056/NEJMoa0706992

KAMAR, N., F. ABRAVANEL, S. LHOME, L. ROSTAING, J. IZOPET (2015) : Hepatitis E virus: chronic infection, extra-hepatic manifestations, and treatment. *Clin. Res.Hepatol.Gastroenterol.* 39(1):20–7. doi: 10.1016/j.clinre.2014.07.005

KANAI, Y., S. MIYASAKA, S. UYAMA, S. KAWAMI, Y. KATO-MORI, M. TSUJIKAWA, M. YUNOKI, S. NISHIYAMA, K. IKUTA, K. HAGIWARA (2012) Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. *BMC Res. notes.* 5:4 doi: 10.1186/1756-0500-5-4

KHUROO, M. S. (1980): Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from posttransfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* 68:818–824

LENGGENHAGER, D., A.WEBER (2019): Clinicopathologic features and pathologic diagnosis of hepatitis E. *Hum. Pathol.* 96:34-38. doi: 10.1016/j.humpath.2019.10.003.

LI, Y., C. QU, B. SPEE, R.ZHANG, L. C. PENNING, R. A. de MAN, M. P. PEPPELENBOSCH, H. FIETEN, Q. PAN (2020) : Hepatitis E virus seroprevalence in pets in the Netherlands and the permissiveness of canine liver cells to the infection. *Ir. Vet. J.* 73: 6. doi: 10.1186/s13620-020-00158-y

LIANG, H., J. CHEN, J. XIE, L. SUN, F. JI, S. HE (2014.) : Hepatitis E virus serosurvey among pet dogs and cats in several developed cities in China. *PloS. One.* 9(6):e98068. doi: 10.1371/journal.pone.0098068.

LYOO, K.S., S.J YANG, W. NA, D. SONG (2019.) : Detection of antibodies against hepatitis E virus in pet veterinarians and pet dogs in South Korea. *Ir. Vet. J.* 72:8. doi: 10.1186/s13620-019-0146-4.

MCELROY, A., R. HIRAIDE, N. BEXFIELD, H. JALAL, J. BROWNLIE, I. GOODFELLOW (2015.) : Detection of hepatitis E virus antibodies in dogs in the United Kingdom. *PloS. One.* 10(6):e0128703. doi: 10.1371/journal.pone.0128703

MILETIĆ LOVRIĆ, M., STOJIC VIDOVIĆ M., HEČIMOVIĆ A., MIHALJEVIĆ I., JEMERŠIĆ L., STRAUSS-PATKO M., JUKIĆ I. (2016.) : Seroprevalence of hepatitis E among Croatian blood donors. *Vox. Sang.* 111: 309 DOI: 10.1111/vox.12429

MRZLJAK, A., ĐAKOVIĆ RODE O., DINJAR KUJUNDŽIĆ P., PERKOV S., VINCE A. (2017): Seroprevalence of hepatitis E virus among liver transplant patients in Croatia: preliminary pilot study data. 27th ECCMID, Vienna, 22-25 EV0274.

MRZLJAK A., DINJAR KUJUNDŽIĆ P., ĐAKOVIĆ RODE O., KOLARIĆ B., VINCE A. (2018): Socio-demographic risk factors for high seroprevalence among liver transplant recipients in Croatia. 4th Central and Eastern European Meeting on Hepatitis and HIV, Prague, 10-12. October;. *Rev. Antivir. Ther. Infec.t Dis.* 12: 6

MRZLJAK, A., P. DINJAR-KUJUNDŽIĆ, L. JERMEŠIĆ, J. PRPIĆ, LJ. BARBIĆ, V. SAVIĆ, V. STEVANOVIĆ, T. VILIBIĆ-CAVLEK (2019) : Epidemiology of hepatitis E in South-East Europe in the "One Health" concept. *World. J. Gastroenterol.* 25(25): 3168-3182 doi: 10.3748/wjg.v25.i25.3168

OKAMOTO, H, M. TAKAHASHI, T. NISHIZAWA, R. USUI, E. KOBAYASHI (2004.) : Presence of antibodies to hepatitis E virus in Japanese pet cats. *Infection.* 32(1):57–58. doi: 10.1007/s15010-004-3078-0.

PERALTA, B., M. BIARNES, G. ORDONEZ, R. PORTA, M. MARTIN, E. MATEU, S.PINA, X.J. MENG (2009). Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.* 137(2009), 31–36. doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.12.010

PRPIĆ, J., S. ČERNI, D. ŠKORIĆ, T. KEROS, D. BRNIĆ, Ž. CVETNIĆ (2015) : Distribution and molecular characterization of Hepatitis E virus in domestic animals and wildlife in Croatia. *Food. Environ. Virol.* 7: 195–205. doi.org/10.1007/s12560-015-9193-5 PMID: 25820413

PRPIĆ, J., T. KEROS, M. VUCELJA, L. BJEDOV, O. Đ. RODE, J. MARGALETIĆ, B. HABRUN, L. JEMERŠIĆ (2019): First evidence of hepatitis E virus infection in a small mammal (yellow-necked mouse) from Croatia. *PLoS. One.* 14(11), e0225583. doi: 10.1371/journal.pone.0225583

PURDY, M.A., T.J. HARRISON, S. JAMEEL, X-J MENG, H. OKAMOTO, W. H. M. VAN DER POEL, D. B. SMITH (2017) : ICTV virus taxonomy profile: hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 98(11):2645–6. doi: 10.1099/jgv.0.000940

SAAD, M. D., H. A. HUSSEIN , M. M. BASHANDY, H. H. KAMEL, K.C. EARHART , D. J. FRYAUFF, M. YOUNAN, A. H. MOHAMED (2007) : Hepatitis E virus Infection in Work Horses in Egypt *Infect. Genet. Evol.* 7(3):368-73. doi: 10.1016/j.meegid.2006.07.007

SANFORD, B. J., S.U. EMERSON, R.H. PURCELL, R.E. ENGLE, B.A. DRYMAN, T.E. CECERE, X. J. MENG (2013). Serological evidence for a hepatitis E virus-related agent in goats in the United States. *Transbound. Emerg. Dis.* 60(6), 538–545. doi.org/10.1111/tbed.12001

SMITH, D.B, P. SIMMOND, S. JAMEEL, E.U. EMERSON, T.J. HARRISON , X.J. MENG, et al. (2014) Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95: 2223–2232. doi.org/10.1099/vir.0.068429-0 PMID: 24989172

SMITH, D.B., P. SIMMOND, J. IZOPET, E.F. OLIVEIRA-FILHO, R.G. ULRICH, R. JOHNE , et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. (2016) *J. Gen. Virol.* 97: 537–542. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393> PMID: 26743685

SONG, Y.J., H.J. JEONG, Y.J. KIM, S.W. LEE, J.B. LEE, S. Y. PARK (2010.): Analysis of complete genome sequences of swine hepatitis E virus and possible risk factors for transmission of HEV to humans in Korea. *J. Med. Virol.* 82(4):583–591. doi: 10.1002/jmv.21730.

SPAHR, C., T. KNAUF-WITZENS, T. VAHLENKAMP, R. G. ULRICH, R. JOHNE (2018) : Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review *Zoon. Pub. Health.* 65(1):11-29. doi: 10.1111/zph.12405

TAKAHASHI, M., T. TANAKA, H. TAKAHASHI, Y. HOSHINO, S. NAGASHIMA, JIRINTAI, H. MIZUO, Y. YAZAKI, T. TAKAGI, M. AZUMA, E. KUSANO, N. ISODA, K. SUGANO, H. OKAMOTO (2010) : Hepatitis E Virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: characterization of HEV virions in blood circulation. *J. Clin. Microbiol.* 48(4):1112–25. doi:10.1128/JCM.02002-09

VILIBIĆ CAVLEK, T., VILIBIĆ M., KOLARIĆ B., JEMERŠIĆ L., KUČINAR J., BARBIĆ LJ., BAGARIĆ A., STEVANOVIĆ V., TABAIN I., SVIBEN M., JUKIĆ V., MLINARIĆ-GALINOVIĆ G. (2016.) Seroepidemiology of Hepatitis E in Selected Population Groups in Croatia: A Prospective Pilot Study. *Zoon. Pub. Health.* 63: 494-502 DOI: 10.1111/zph.12254

VON WULFFEN, M., D. WESTHOLTER, M. LUTGEHETMANN, S. PISCHKE (2018): Hepatitis E; Still Waters Run Deep. *J Clin. Trans. Hepatol.* 2018;6(1):40–7 doi: 10.14218/JCTH.2017.00030

WEDEMEYER, H. , S. PISCHKE, M.P. MANNAS (2012): Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterol.* 142(6):1388-1397.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.014.

WU, J.C., I.J. SHEEN, T.Y. CHIANG (1998) : The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: epidemiological and molecular analyses. *Hepatol.* 27:1415–1420

YAN, B., L. ZHANG, L. GONG, J. LV, Y. FENG, J. LIU, L. SONG, X. QING, A. XU (2016). Hepatitis E virus in Yellow Cattle, Shandong, Eastern China. *EmerG. Infect. Dis.* 22(12), 2211–2212. doi: 10.3201/eid2212.160641

ZENG, M.Y., H. GAO, X.X. YAN, W.J. QU, Y.K. SUN, G.W. FU (2017.) : High hepatitis E virus antibody positive rates in dogs and humans exposed to dogs in the south-west of China. *Zoon. Pub. Health.* 64(8):684–688. doi: 10.1111/zph.12377.

ZHANG, W., Q. SHEN, J. MOU, G. GONG, Z. YANG, L. CUI, J. ZHU, G. JU, X. HUA (2008.)  
Hepatitis E virus infection among domestic animals in Eastern China. *Zoon. Pub. Health.* 55, 291–  
298. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01136.x>

## 8 SAŽETAK

### INFEKCIJE VIRUSOM HEPATITISA E U KONJA I PASA NA PODRUČJU REPUBLIKE HRVATSKE

Virus hepatitisa E (HEV) uzročnik je hepatitisa E u ljudi širom svijeta. Zbog izloženosti velikog dijela stanovništva te posljedično i značajnog broja oboljelih infekcija HEV je jedna od značajnijih ugroza javnog zdravstva na globalnoj razini. Virus hepatitisa E dijeli se u osam genotipova od kojih genotipovi HEV GT-3 i HEV GT-4 imaju zoonotska svojstva i mogu se proširiti sa životinja na ljude. Do sada je dokazano da su domaća svinja, divlja svinja i jelen najznačajnije vrsta za prijenos HEV na ljude. Izloženost HEV-u potvrđena je i kod nekih drugih vrsta, ali istraživanja infekcija HEV u konja i kućnih ljubimaca, životinjskih vrsta u najbližijem suživotu i kontaktu s ljudima, još uvijek su vrlo rijetka, a u RH nikada do sada nisu provedena.

Cilj ovog istraživanja bio je po prvi put ispitati prisutnost i prevalenciju infekcije virusom hepatitisa E u konja i domaćih mesojeda. Ukupno je pretraženo 264 uzorka seruma konja, 308 uzorka seruma pasa i 88 uzoraka seruma mačaka uz pomoć komercijalnog ELISA testa (ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test). Od ukupno 660 pretraženih životinja sve tri istraživane vrste s područja RH infekcija HEV je potvrđena u jednog psa (0,15%). Ovaj podatak nam dokazuje da konji i kućni ljubimci trenutno ne predstavljaju značajan čimbenik u širenju HEV, te da se protuepidemijske mjere u epidemiološkoj i epizootiološkoj situaciji RH prvenstveno moraju usmjeriti na uzgoje domaćih svinja, sprječavanje infekcije tijekom kontakta s divljim svinjama i generalno sigurnost hrane.

Međutim, zbog prve potvrđene infekcije psa HEV na području RH dokazane ovim istraživanjem zasigurno je opravdano provoditi daljnja istraživanja i u pretraživanih vrsta u svrhu prikupljanja dodatnih epizootioloških i epidemioloških spoznaja. Štoviše, s obzirom da je serološki pozitivan pas pokazivao kliničke znakove akutog gastroenteritisa i poremećaja funkcije jetre potrebno je nastaviti istraživanje i radi razjašnjavanja značaja infekcije pasa virusom hepatitisa E u veterinarskoj kliničkoj praksi.

Ključne riječi: HEV, zoonoza, prevalencija, domaći mesojedi, konj

## **9 SUMMARY**

### **HEPATITIS E VIRUS INFECTIONS IN HORSES AND DOGS IN THE REPUBLIC OF CROATIA**

The hepatitis E virus (HEV) is the cause of hepatitis E in humans around the world. Due to the exposure of a large part of the population and consequently a significant number of infected infections, HEV is one of the most significant threats to public health globally. The hepatitis E virus is divided into eight genotypes of which the HEV GT-3 and HEV GT-4 genotypes have zoonotic properties and can be spread from animals to humans. So far, it has been proven that domestic pigs, wild boar and deer are the most important species for the transmission of HEV to humans. Exposure to HEV has been confirmed in some other species, but research on HEV infections in horses and pets, animal species in close coexistence and contact with humans, is still very rare, and has never been conducted in the Republic of Croatia.

The aim of this study was to examine for the first time the presence and prevalence of hepatitis E virus infection in horses and domestic carnivores. A total of 264 horse serum samples, 308 dog serum samples and 88 cat serum samples were examined using a commercial ELISA (ID Screen Hepatitis E Indirect Multi-species test). Out of a total of 660 examined animals, all three studied species from the territory of the Republic of Croatia, HEV infection was confirmed in one dog (0.15%). This data proves that horses and pets are currently not a significant factor in the spread of HEV, and that anti-epidemic measures in the epidemiological and epizootiological situation of the Republic of Croatia must primarily focus on breeding domestic pigs, prevent infection during contact with feral pigs and general food safety.

However, due to the first confirmed HEV infection in the territory of the Republic of Croatia, proven by this research, it is certainly justified to conduct further research in the searched species in order to collect additional epizootiological and epidemiological knowledge. Moreover, since a serologically positive dog showed clinical signs of acute gastroenteritis and liver dysfunction, research should be continued to clarify the significance of hepatitis E virus infection in dogs in veterinary clinical practice.

Key words: HEV, zoonosis, prevalence, domestic carnivores, horse



## ***10 ŽIVOTOPIS***

Rođena sam 12. lipnja 1995. godine u Zadru gdje sam završila osnovnu školu Smiljevac. Nakon osnovne škole svoje obrazovanje nastavljam u gimnaziji Jurja Barakovića od 2010. do 2014. Po završetku srednje škole 2014. godine upisujem Veterinarski fakultet s ciljem da se prebacim na Stomatološki fakultet. Tijekom prve godine studija uviđam mogućnosti Veterinarskog fakulteta i odlučujem ga završiti. Uključujem se u studentsku udruhu IVSA 2016. godine u kojoj aktivno sudjelujem i iste te godine odlazim na svoju 1. studentsku razmjenu u Beč, a nakon toga 2019. godine u Pariz. Postajem član Studentskog zbora Veterinarskog fakulteta 2019. godine. Tijekom studija radila sam razne studentske poslove uz pomoć kojih sam stekla dodatne komunikacijske vještine. Kao student pohađala sam i brojne stručne seminare i kongrese.