

NON-POLIO ENTEROVIRUSNE INFEKCIJE U HRVATSKOJ TIJEKOM DESETOGODIŠNJEG RAZDOBLJA (2000.-2009.): VIROLOŠKE I EPIDEMIOLOŠKE ZNAČAJKE

SUNČANICA LJUBIN-STERNAK, TATJANA VILIBIĆ-ČAVLEK, BERNARD KAIĆ¹, BORISLAV ALERAJ¹,
SILVIJA ŠOPREK², MARIO SVIBEN i GORDANA MLINARIĆ-GALINOVIĆ

Služba za mikrobiologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, ¹ Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti, Hrvatski zavod za javno zdravstvo i ² Klinika za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“, Zagreb, Hrvatska

Cilj rada bio je prikazati virološke i epidemiološke značajke non-polio enterovirusnih (NPEV) infekcija u desetogodišnjem razdoblju (2000.-2009.) u Republici Hrvatskoj. Tijekom navedenog razdoblja u Laboratoriju za enteroviruse Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo obrađeno je 2754 kliničkih uzoraka prikupljenih od 1880 bolesnika s kliničkom slikom enterovirusne infekcije. Dijagnoza enterovirusne infekcije dokazana je izolacijom virusa u staničnoj kulturi, a virusi su tipizirani metodama neizravne imunofluorescencije i/ili testom neutralizacije. NPEV infekcija dokazana je u 394 od 1880 bolesnika (21%). Osobe muškog spola češće su oboljevale od osoba ženskog spola u omjeru 1,8:1. Broj oboljelih najveći je u dobnoj skupini predškolske i školske djece. Bolesnici u kojih su izolirani NPEV najčešće su imali dijagnozu seroznog meningitisa - 234/394 (59,4%). Infekcije su najčešće bile uzrokovane echovirusima (218/394; 55,3%), zatim coxsackie B (126/394; 32,0%) i coxsackie A (31/394; 7,9%) virusima, a rjeđe su dokazani echovirus 22 - parechovirus 1 (16/394; 4,1%) i enterovirus 71 (3/394; 0,8%). Coxsackie B5 i B4 virusi kontinuirano se detektiraju tijekom istraživnog razdoblja s učestalijom pojavom svakih 4-5 godina. Najčešći izolat echovirusa bio je echovirus 18 koji se detektira kontinuirano od 2000. do svoje epidemije 2006. godine. Echovirus 6 i echovirus 30 također se izoliraju kontinuirano s vršnim vrijednostima 2002. i 2008., odnosno 2002., 2006. i 2008. godine.

Ključne riječi: non-polio enterovirusi, serotipovi, epidemiologija, Hrvatska

Adresa za dopisivanje: Doc. dr. sc. Sunčanica Ljubin-Sternak, dr. med.
Odjel za virologiju
Hrvatski zavod za javno zdravstvo
Rockefellerova 12
10 000 Zagreb, Hrvatska
Tel: +385 1 4863 295
Fax: +385 1 4683 017
e-pošta: sljsternak@hzjz.hr

UVOD

Ljudski non-polio enterovirusi (NPEV) zajedno s poliovirusom i životinjskim enterovirusima čine rod *Enterovirus*, porodice *Picornaviridae*, unutar kojeg se danas svrstava najmanje 92 serotipa humanih patogena (1). Prvotna, povijesna klasifikacija enterovirusa bazirana na kliničkoj slici u ljudi, patogeni infekcije u mišje sisančadi i rastu u staničnoj kulturi svrstava viruse iz ovog roda u polioviruse, coxsackie A, coxsackie B i echoviruse, a kasnije izdvojeni virusi klasificirani su kao enterovirusi 68-102 (2). Razvojem molekularnih dijagnostičkih metoda uspostavljena je nova klasifikacija roda *Enterovirus* u kojoj su NPEV svrstani u 4 vrste ljudskih

enterovirusa: A, B, C i D (3-5). Iako većina infekcija uzrokovana NPEV prolazi bez simptoma, NPEV uzrokuju simptomatske infekcije središnjeg živčanog sustava, febrilne bolesti s osipom ili bez osipa, bolest šake stopala i usta, herpanginu, akutni hemoragijski konjunktivitis, pleurodiniju, miokarditis i neonatalnu sepsu (6-9). Dugo je „zlatni standard“ za dijagnostiku enterovirusa bila kultivacija u staničnoj kulturi s naknadnom tipizacijom tipno-specifičnim hiperimunim serumima (10). Metoda koja sve više zamjenjuje izolaciju enterovirusa je molekularna detekcija pomoću tzv. „panenterovirus – PCR“ testa, osjetljivijeg od kultivacije, ali koji ne razlikuje tipove enterovirusa. U slučaju molekularne

tipizacije koristimo se metodom sekvenciranja VP-1 gena koji kodira tipno specifične epitope virusa te genotipovi odgovaraju serotipovima (11). Enterovirusi se primarno umnažaju u probavnom sustavu, dugo izlučuju stolicom, a prenose fekalno-oralnim i rjeđe dišnim putem. Kako nema specifične terapije za liječenje tih infekcija dijagnostika i prevencija u smislu dobre osobne higijene važne su mjere kontrole tih bolesti. NPEV su prisutni svugdje u svijetu, a u zemljama s umjerenom klimom javljaju se u ljetnim mjesecima. O prisutnosti infekcija uzrokovanih NPEV-ima i tipovima NPEV-a koji kruže u nas publicirano je svega nekoliko radova, uglavnom u obliku prikaza epidemija, odnosno kraćih izvještaja za samo neke određene godine (12-15).

CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je prikazati virološke i epidemiološke značajke NPEV infekcija u desetogodišnjem razdoblju (2000.-2009.) u Republici Hrvatskoj.

METODE RADA

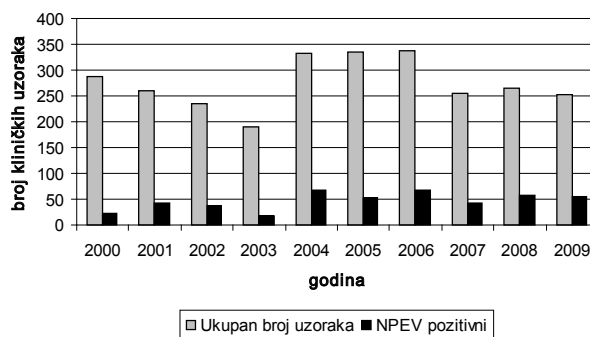
Istraživanje je retrospektivno i obuhvaća desetogodišnje razdoblje od 1.1. 2000. do 31.12. 2009. godine. Podaci su prikupljeni iz protokola Laboratorija za enteroviruse koji je sastavni dio Nacionalnog polio laboratorija Svjetske zdravstvene organizacije u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo. Tijekom navedenog razdoblja u Laboratorij za enteroviruse pristiglo je i obrađeno 2754 kliničkih uzoraka (1711 stolica, 827 cerebrospinalnih likvora i 216 briseva ždrijela/nazofaringealnih sekreta) prikupljenih od 1880 bolesnika s kliničkom slikom enterovirusne infekcije kao i njihovih kontakata. Uzorci su većinom prikupljeni od bolesnika hospitaliziranih u Klinici za infektivne bolesti „Dr Fran Mihaljević“ u Zagrebu, ali i s odjela za zarazne bolesti drugih bolnica u Republici Hrvatskoj. Uzorci su obrađeni na standardni način (10) i inokulirani na tri vrste stanične kulture: kontinuiranu kulturu bubrega majmuna – GMK (engl. *Green Monkey Kidney*), kontinuiranu kulturu rabdomiosarkoma – RD i kontinuiranu kulturu mišjih fibroblasta na čijim stanicama se iskazuje humani stanični receptor za poliovirus – L20B. Stanične kulture dobivene su od Regionalnog referentnog Laboratorija (*WHO Labnet, National Public Health Institute, Helsinki, Finska*). Nakon porasta tj. pojave citopatičnog učinka na GMK i/ili RD staničnim kulturama, ali ne i na L20B staničnoj kulturi

virusi su tipizirani testom neizravne imunofluorescencije (*Light Diagnostics, Temecula, CA*) i/ili testom neutralizacije u mikrotitarskim pločicama (10) pomoću 18 skupina standardnih hiperimunih seruma (*Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene, Bilthoven, the Netherlands*).

REZULTATI

Tijekom desetogodišnjeg razdoblja izolirana su 463 virusa iz 2754 klinička uzorka (16,8%), odnosno dokazana je infekcija nekim NPEV-om u 394 od 1880 bolesnika (21%) - 61 izolat dokazan je u dva ili više uzorka istog bolesnika. Broj pozitivnih kliničkih uzoraka u odnosu na broj obrađenih kliničkih uzoraka po godinama prikazan je na sl. 1. Postotak detektiranih NPEV-a varirao je tijekom ispitivanog razdoblja, najveći je zabilježen 2009. godine (21,8%), zatim slijedi 2008.-a sa 21,6% te 2004.-ta i 2006.-ta sa 20,1% detektiranih NPEV-a. Najmanje NPEV-a detektirano je 2000. godine (8,0%).

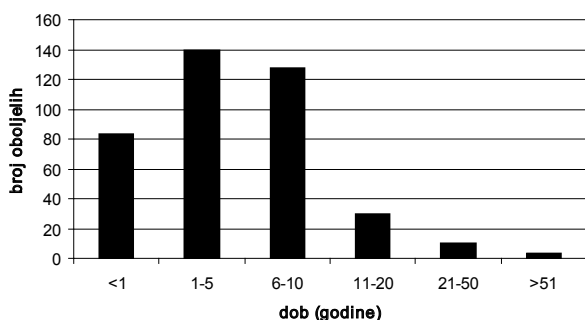
Najviše NPEV-a izolirano je iz stolica bolesnika 381/1711 (22,3%), zatim iz briseva ždrijela ili nazofaringealnog sekreta 27/216 (12,5%), a najmanje iz likvora 55/827 (6,7%).



Sl. 1. Broj uzoraka zaprimljenih i obrađenih u Laboratoriju za enteroviruse Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, tijekom desetogodišnjeg razdoblja

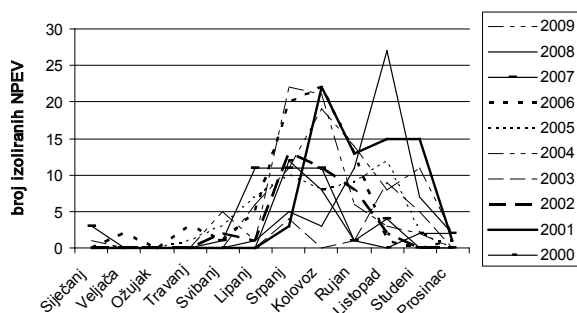
Od 394 bolesnika s dokazanom infekcijom ovim virusima, 252 ih je bilo muškog i 142 ženskog spola, odnosno osobe muškog spola češće su oboljevale od osoba ženskog spola u omjeru 1,8:1. Srednja dob osoba s infekcijom uzrokovanom NPEV-ima iznosila je 5,8 godina. Dobna raspodjela oboljelih prikazana je na sl. 2. Bolesnici u kojih je izoliran neki od NPEV najčešće su imali dijagnozu seroznog menin-

gitisa 234/394 (59,4%), rjeđe enterokolitisa 33/394 (8,4%) odnosno febrilne bolesti s osipom ili bez osipa 25/394 (6,3%), dok su ostali bolesnici obrađeni zbog sumnje na enterovirusnu infekciju u sklopu nekih drugih kliničkih sindroma kao što je npr. respiratorni katar, akutna mlohava kljenut i njihovi kontakti i dr.



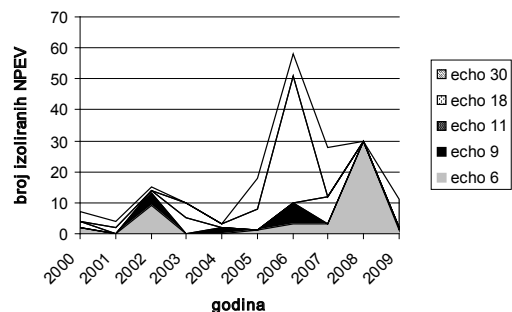
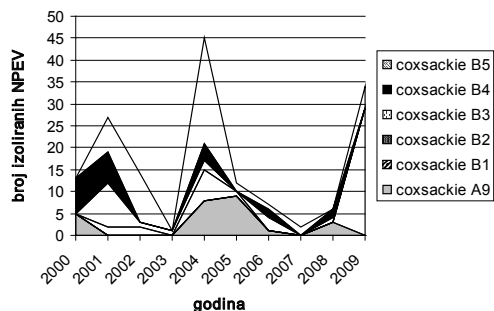
Sl. 2. Dobna raspodjela oboljelih od infekcija uzrokovanih non-polio enterovirusima

Na sl. 3. prikazana je sezonska raspodjela NPEV infekcija po mjesecima i godinama. Vršna vrijednost infekcija većinom je zabilježena od srpnja do studenog. Infekcije su najčešće bile uzrokovane echovirusima (218/394; 55,3%), zatim coxsackie B (126/394; 32,0%) i coxsackie A (31/394; 7,9%) virusima, a rjeđe su dokazani echovirus 22 - parechovirus 1 (16/394; 4,1%) i enterovirus 71 (3/394; 0,8%). Najčešće dokazani serotipovi echovirusa bili su: 6, 9, 11, 13, 14, 18 i 30 (45/218, 21%; 14/218, 6,4%; 18/218, 8,3%; 15/218, 6,9%; 11/218, 5,0%; 55/218, 25,2% i 42/218, 19,3%), dok su serotipovi 2, 3, 4, 5, 7, 12, 20, 21, 25 i 26 dokazani u manjem broja bolesnika ili u pojedinačnim slučajevima. Coxsackie B5 bio je najzastupljeniji serotip među coxsackie B virusima



Sl. 3. Sezonska raspodjela non-polio enterovirusnih infekcija u Republici Hrvatskoj u desetogodišnjem razdoblju

(50/126, 40%), dok je Coxsackie A9 bio najčešće dokazan Coxsackie A virus (26/31, 84%). Na sl. 4a i 4b prikazana je učestalost najčešćih serotipova NPEV dokazanih u Hrvatskoj tijekom desetogodišnjeg razdoblja po godinama i tipu.



Sl. 4 a i b. Najčešće dokazani tipovi non-polio enterovirusa u Republici Hrvatskoj tijekom desetogodišnjeg razdoblja po godinama i tipu

RASPRAVA

Ljudski NPEV uzrokuju različite bolesti od neprimjetnih i vrlo blagih infekcija do teških kliničkih sindroma kao što su: serozni meningitis, encefalitis, akutne mlohove kljenuti, miokarditis i neonatalna sepsa. Eradikacijom poliomijelitisa koja je u Republici Hrvatskoj proglašena 2002. godine epidemiološke i virološke značajke infekcija uzrokovanih NPEV-ima postaju od izuzetne važnosti budući da pojedini serotipovi NPEV mogu uzrokovati paraličnu bolest nalik na poliomijelitis. Nadalje, infekcija NPEV-ima najčešći je uzrok seroznog meningitisa u razvijenim zemljama.

Dijagnoza enterovirusne infekcije u ovom radu postavljena je temeljem izolacije tih virusa u staničnoj kulturi. Iako je prednost ove metode mogućnost re-

lativno jeftine tipizacije metodama neizravne imunofluorescencije i neutralizacije pomoću standardnih hiperimunih seruma ona sa sobom nosi i neke posebne zahtjeve. Za izolaciju virusa na staničnoj kulturi potrebno je određeno vrijeme (3-14 dana) kao i velika stručnost laboratorijskog osoblja. Također, poznato je da se određeni tipovi coxsackie A virusa ne mogu umnožiti u staničnoj kulturi (4).

Najbolji klinički materijal za izolaciju NPEV-a je stolica, zatim bris ždrijela ili nazofaringealni ispirak, i na kraju cerebrospinalni likvor (16). Virus je u stolici prisutan u visokom titru i u mnogo duljem razdoblju nego u bilo kojem drugom uzorku (17) što su potvrdili i rezultati ove studije (22,3% pozitivnih uzoraka stolica, 12,7% pozitivnih briseva ždrijela ili nazofaringealnih aspirata i 6,7% pozitivnih cerebrospinalnih likvora).

Osjetljivost izolacije na staničnoj kulturi u odnosu na molekularnu dijagnostiku je niža i ovisi o vrsti kliničkog uzorka. Osjetljivost metode izolacije NPEV-a iz stolice u odnosu na reverznu transkripciju lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR) iznosi od 71% do 87%, dok je osjetljivost izolacije NPEV-a iz cerebrospinalnog likvora daleko niža i iznosi 38% do 59% u odnosu na istu metodu molekularne dijagnostike (18). Stoga je za potrebe potvrde kliničke dijagnoze enterovirusnog meningitisa neophodno dijagnostiku enterovirusa iz likvora provoditi metodom RT-PCR (9,18). Međutim, tom metodom ne možemo odrediti tip NPEV, te u slučaju epidemiološke potrebe za tipizacijom virusa, nakon detekcije NPEV-a RT-PCR metodom javlja se potreba za daljnjim skupim postupcima kao što je sekvenciranje dijela virusnog genoma. Stoga je poželjno od oboljelog istodobno uzorkovati likvor i stolicu i u potonjem uzorku pokušati izolaciju virusa.

Uzorci za dijagnostiku tih infekcija prikupljeni su u velikoj većini od hospitaliziranih bolesnika te stoga ne iznenađuje podatak da je 59,4% bolesnika s dokazanom enterovirusnom infekcijom imalo dijagnozu seroznog meningitisa. Također je potvrđena već otprije zapažena činjenica da češće obolijevaju osobe muškog spola (12) – u ovom istraživanju omjer bolesnih osoba muškog spola u odnosu na ženski iznosi 1,8:1. Takav se nalaz u literaturi pokušava protumačiti raznim sociološkim i biološkim čimbenicima (4). Iako prema seroepidemiološkim istraživanjima nije dokazana veća prokuženost

muškog spola moguće je da su muška djeca zbog razlike u odgoju, ponašanju i načinu igre više izložena susretu s NPEV-ima. U dječaka je također zabilježena dulja ekskrecija virusa u stolici praćena višim titrovima što povećava mogućnost dijagnoze tih infekcija (4).

Broj oboljelih u ovoj studiji najveći je u dobnoj skupini predškolske i školske djece (sl. 2.) što se podudara s prijašnjim studijama u kojima je zapaženo da nakon prve godine života broj oboljelih s godinama raste sve do školske dobi, a da nakon 14. godine života naglo opada (12). Različite dobne skupine različito su osjetljive na infekciju NPEV-ima, a i klinička slika, tijek i prognoza bolesti ovise o dobi. Infekcije karakterizirane osipom, najčešće uzrokovane coxsackie A i echovirusima, obično su ozbiljnijeg tijeka u odraslih osoba, dok s druge strane neki NPEV-i uzrokuju klinički teške infekcije u veoma ranoj dječjoj dobi kao što je fulminantna virusna sepsa (19). Općenito se može reći da se serozni meningitis i encefalitis uzrokovan NPEV-ima pojavljuje najčešće u dobnoj skupini od 5 do 14 godina života (4), što je u skladu i s našim rezultatima jer je većina oboljelih bila hospitalizirana s dijagnozom seroznog meningitisa.

U zemljama umjerenog klimatskog pojasa infekcije uzrokovane NPEV-ima imaju izrazit sezonski karakter i najčešće se javljaju u ljetnim i jesenskim mjesecima iako se epidemije mogu produžiti i u zimske mjesece (4). U našoj zemlji se te infekcije javljaju na isti način, a detekcija NPEV-a često se proteže i u zimske mjesece.

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su pojedini serotipovi NPEV-a varirali iz godine u godinu. Coxsackie B5 i B4 virusi kontinuirano se detektiraju tijekom istraživanog razdoblja s učestalijom pojavom svakih 4-5 godina. Niti jedan izolat coxsackie B1 virusa nije bio zabilježen sve do njegove epidemijske 2009. godine. Najčešći izolat ehovirusa bio je Echovirus 18 koji je bio prisutan kontinuirano od 2000. do svoje epidemijske 2006. godine. Echovirus 6 i echovirus 30 također se izoliraju kontinuirano s vršnim vrijednostima 2002. i 2008., odnosno 2002., 2006. i 2008. godine. Takvu izmjenu pojedinih serotipova NPEV-a tijekom navedenog razdoblja zapažili su i Trallero i sur. u Španjolskoj (20). S obzirom da virusi ne poznaju državne granice očekivano je u susjednim zemljama u istom razdoblju zabilježena pojava istih serotipova NPEV-a (20,21).

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na specifičan obrazac pojavljivanja pojedinih serotipova NPEV-a u Hrvatskoj. Epidemijski obrazac (echovirus 18 i coxsackie B1) karakteriziran je vršnim vrijednostima povećanog broja izolacija u pojedinim godinama. Nasuprot tome endemski virusi izoliraju se svake godine u podjednakom broju (Coxsackie B3) ili pokazuju blaže epidemijske vrhove svakih nekoliko godina (Echovirus 30 i 6, Coxsackie B4 i B5). Podaci o NPEV infekcijama s obzirom na serotip i njihov specifičan obrazac pojavljivanja značajno doprinose pravodobnom odgovoru na te infekcije u dijagnostičkom, kliničkom i epidemiološkom smislu.

LITERATURA

1. Stanway G, Brown F, Christian P i sur. Family Picornaviridae. U: Faquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desseberger U, Ball LA, ur. *Virus taxonomy. Eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. London: Elsevier/Academic Press; 2005, 757-78.
2. Brown BA, Maher K, Flemister MR i sur. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99, and 102. *J Gen Virol* 2009; 90: 1713-23.
3. Minor PD, Muir P. Enteroviruses. U: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Schoub BD, Griffiths PD, Mortimer P, ur. *Principles and practice of clinical virology*. 6th ed. Oxford: John Wiley & Sons Ltd., 2009, 601-24.
4. Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. U: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott W&W-Wolters Kluwer, 2007, 839-93.
5. Lo CW, Wu KG, Lin MC i sur. Application of a molecular method for the classification of human enteroviruses and its correlation with clinical manifestations. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43: 354-9.
6. Fališevac J, Svara V, Bačun-Kubović M, Rulnjević J, Smerdel S. Klinička zapažanja kod oboljenja izazvanih enterovirusima u 1963. godini. *Lijec Vjesn* 1965; 87: 1207-16.
7. Petričević I, Brudnjak Z, Fališevac J. Istraživanje etiologije kratkotrajnih febrilnih oboljenja u 1970. godini. *Lijec Vjesn* 1975; 97: 4-10.
8. Mlinarić-Galinović G, Ugrčić I, Detić D, Božikov J. Epidemiological picture of respiratory viral infections in Croatia. *Acta Med Iug* 1991; 45: 203-11.
9. Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C i sur. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PLoS ONE* 2007; 2: e674
10. WHO Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. *Polio Laboratory Manual*, 4th edition. Geneva, Switzerland: WHO Document Production Services; 2004, 98-100.
11. Zerr DM. *Common viral infections of childhood*. U: Jerome KR, ur. *Lennette's laboratory diagnosis of viral infections*. 4th ed. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2010, 226-45.
12. Borčić B, Kružić V, Weisglass-Galinović M i sur. Some epidemiologic and virologic patterns of enterovirus outbreak in SR Croatia in 1979. *Lijec Vjesn* 1981; 103: 225-30.
13. HZJZ. Bornholmska bolest. *Epidemiološki vjesnik*. 1996; 2: 2-4.
14. HZJZ. Enterovirusi u cirkulaciji u ljetu 2005. *Epidemiološki vjesnik* 2005; 7: 4.
15. HZJZ. Enterovirusi u cirkulaciji u ljetu 2007. *Epidemiološki vjesnik* 2007; 8: 3.
16. Oberste MS, Pallansch MA. Coxsackieviruses. U: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (ur.). *Desk encyclopedia of human and medical virology*. Oxford: Elsevier, 2010, 58-64.
17. Chung PW, Huang YC, Chang LY, Lin TY, Ning HC. Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 167-70.
18. Terletskaia-Ladwig E, Meier S, Hahn R, Leinmüller M, Schneider F, Enders M. A convenient rapid culture assay for detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *J Med Microbiol* 2008; 57: 1000-6.
19. Nathan M, Walsh R, Hardin JT i sur. Enteroviral sepsis and ischemic cardiomyopathy in a neonate: case report and review of literature. *ASAIO J* 2008; 54: 554-5.
20. Trallero G, Avellon A, Otero A i sur. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. *J Clin Virol* 2010; 47: 170-6.
21. Kapusinszky B, Szomor KN, Farkas A, Takacs M, Berencsi G. Detection of non-polio enteroviruses in Hungary 2000-2008 and molecular epidemiology of enterovirus 71, coxsackievirus A16, and echovirus 30. *Virus Genes* 2010; 40: 163-73.

S U M M A R Y

VIROLOGIC AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF NON-POLIO INFECTION IN CROATIA OVER A TEN-YEAR PERIOD (2000-2009)

S. LJUBIN-STERNAK, T. VILIBIĆ-ČAVLEK, B. KAIĆ¹, B. ALERAJ¹, S. ŠOPREK², M. SVIBEN
and G. MLINARIĆ-GALINOVIĆ

*Microbiology Service, Croatian Public Health Institute and School of Medicine, University of Zagreb,
¹Service for Epidemiology of Infectious Diseases, Croatian Public Health Institute and
²Dr. Fran Mihaljević University Hospital for Infectious Diseases, Zagreb, Croatia*

Aim: The aim of the present study was to show the virologic and epidemiological characteristics of non-polio enterovirus (NPEV) infection over a ten-year period in Croatia.

Methods: During the 2000-2009 period, the Laboratory for Enteroviruses, Croatian Public Health Institute analyzed 2754 clinical samples collected from 1880 patients with a clinical picture of enteroviral infection. The diagnosis of enteroviral infection was confirmed by virus isolation in cell culture. Viruses were typed using indirect immunofluorescence and/or neutralization assay.

Results: NPEV was proven in 394 (21%) of 1880 patients. Males were more commonly infected than females, at a ratio of 1.8:1, while the number of infected cases was highest among preschoolers and schoolchildren. Patients with isolated NPEV were most frequently diagnosed with aseptic meningitis (234/394; 59.4%). Infections were most commonly caused by echoviruses (218/394; 55.3%), followed by Coxsackie B (126/394; 32.0%) and Coxsackie A (31/394; 7.9%) viruses, rarely by echovirus 22 - parechovirus 1 (16/394; 4.1%) and enterovirus 71 (3/394; 0.8%). In most cases, echoviruses of the following serotypes were proven: 6, 9, 11, 13, 14, 18 and 30 (45/218, 21%; 14/218, 6.4%; 18/218, 8.3%; 15/218, 6.9%; 11/218, 5.0%; 55/218, 25.2% and 42/218, 19.3%), while serotypes 2, 3, 4, 5, 7, 12, 20, 21, 25 and 26 were evidenced in a minority of patients or individual cases. Coxsackie B5 was the predominant serotype among Coxsackie B viruses (50/126, 40%), while Coxsackie A9 was most common Coxsackie A virus (26/31, 84%). Coxsackie B5 and B4 viruses were continually detected during the study period and appeared more frequently every four to five years. The most common echovirus isolate was echovirus 18, detected continually between 2000 and the outbreak year of 2006. Echovirus 6 and echovirus 30 were also isolated continually with peaks in 2002 and 2008, or 2002, 2006 and 2008.

Conclusion: The results of this study pointed to a specific pattern of the occurrence of certain NPEV serotypes in Croatia. The epidemic pattern (echovirus 18 and Coxsackie B1) was characterized by peaks with an elevated number of isolations in given years. Contrary to this, endemic viruses were isolated in similar counts every year (Coxsackie B3), or manifested milder epidemic peaks every few years (echoviruses 30 and 6, Coxsackie B4 and B5). Data on NPEV infections, given their serotype and specific pattern of occurrence, contribute significantly to prompt diagnostic, clinical and epidemiological response to NPEV infections.

Key words: non-polio enteroviruses, serotypes, epidemiology, Croatia