

Flavivirusi u sjeverozapadnoj Hrvatskoj

**Dragutin GOLUBIĆ¹⁾, prim. dr. sc.,
dr. med., specijalist infektolog
Gerhard DOBLER²⁾, prof. dr. sc., dr. med.,
specijalist mikrobiologije i epidemiologije**

¹⁾Infektologija, Županijska bolnica Čakovec,
I. G. Kovačića 1e, Čakovec

²⁾Bundeswehr Institute of Microbiology,
Department of Virology and Rickettsiology,
Neuherbergstrasse 1, D-80937 Munich,
Germany

Ključne riječi

*Flavivirusi
serologija
sjeverozapadna Hrvatska*

Key words

*Flaviviruses
serology
north-west Croatia*

Primljeno: 2012-07-09

Received: 2012-07-09

Prihvaćeno: 2012-12-18

Accepted: 2012-12-18

Uvod

Vektorima prenosivi flavivirusi su s medicinskog aspekta najznačajniji arbovirusi u Europi i Aziji. Dosađanjim istraživanjima utvrđeno je više od 500 arbovirusa [1], koji kao emergentni ili re-emergentni uzročnici mogu predstavljati stalnu opasnost za ljude i životinje [2]. Rod *Flavivirus* član je obitelji *Flaviviridae* i sadrži ovojnicu s

jednostrukom RNA pozitivnog polariteta, duljine 11.000 – 12.000 nukleotida. Ovaj rod tvori sedamdesetak virusa koji se prenose ili krpeljima (*tick-born* grupa) ili komarcima (*mosquito-born* grupa) ili su svrstani u grupu bez vektora [3]. Brojne epidemije izazvane arbovirusima zadnjih desetljeća ukazuju na značajnost arbovirusa za medicinsku i veterinarsku medicinu. Ove se epidemije javljaju globalno i nisu ograničene samo na tropska područja ili na

Znanstveni članak

Svrha ovog rada bila je odrediti seroprevalenciju IgG protutijela na flaviviruse, virus krpeljnog meningoencefalitisa (KMEV), West Nile virus (WNV) i dengue virus (DENV) u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske. Tristo uzoraka seruma dragovoljnih darivatelja krvi skupljeno je 1997. i 2007. godine u Međimurskoj županiji, znanom endemskom području za KME. Prisutnost IgG protutijela određivana je za KMEV, WNV i DENV ELISA metodom, a pozitivni rezultati potvrđeni su testom indirektno imunofluorescencije koristeći Flavivirus Biochip tehniku. Godine 1997. od 300 uzoraka seruma, 9 (3 %) bilo je pozitivno na KMEV. U 2007. godini od 300 uzoraka seruma iz istog područja, na KMEV bilo je pozitivno 48 (16 %), 1 (0,3 %) na WNV i niti jedan na DENV. Naši podaci dokumentiraju porast seroprevalencije na KMEV populacije sjeverozapadne Hrvatske, a što je najvjerojatnije rezultat učestalijeg cijepljenja protiv KMEV i također prisutnosti ranije infekcije s WNV, što potvrđuje eksponiranost WNV zdrave populacije u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. DENV može biti importiran ljudima koji dolaze iz ili su posjećivali endemska područja. Rezultati ove studije mogu biti od pomoći javnom zdravstvu u odabiru i planiranju odgovarajućih mjera intervencijske i preventivne strategije.

Flaviviruses in the north-west Croatia

Scientific paper

The aim of this study was to assess the seroprevalence of IgG antibodies to flaviviruses, tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV), and Dengue virus (DENV) in the north-western part of Croatia. Three hundred samples of sera were obtained from blood donors in 1997 and again in 2007 in the Međimurje County, a known endemic region for TBE in the north-western part of Croatia. The presence of IgG antibodies was assessed for TBEV, WNV, and DENV by ELISA and for confirmation of positive results by indirect immunofluorescence using Flavivirus Biochips. In 1997, out of 300 sera, 9 (3 %) were positive to TBEV. In 2007 we found 48 (16 %) positive sera for TBEV, 1 (0.3 %) for WNV and none for DENV. Our data have documented an increase in TBEV seroprevalence among the population of northwestern Croatia, which is probably the result of a more frequent vaccination against TBEV and also the presence of definitive past WNV infection in Croatia, confirmed by documented exposure of the healthy population to WNV. Dengue fever can be imported by people coming from or visiting an endemic area. The results of this study will help public health authorities to determine and plan appropriate intervention and prevention strategies.

zemlje u razvoju, jer i ljudi i robe u bilo koji dio svijeta stignu u dan ili dva. U Europi, flavivirusi s najvažnijim medicinskim značenjem, svakako su virus krpeljnog meningoencefalitisa (KMEV) (grupa koju prenose krpelji) i virus Zapadnog Nila (WNV, od engl. *West Nile virus*) (grupa koju prenose komarci) [4, 5].

Neki autori povezuju povećani značaj arbovirusa s klimatskim promjenama, povećanom urbanizacijom i povećanim putovanjem [6]. Krpeljni meningoencefalitis (KME) je endemičan u mnogim zemljama Europe i Azije. U nekim zemljama je u zadnjem desetljeću zapažen porast broja bolesnika s KME, posebno u Češkoj, Njemačkoj, Švicarskoj i Sloveniji [7]. U Hrvatskoj se zadnjih desetak godina prosječno prijavi 27,5 (raspon 11–44) slučajeva KME godišnje [7] (Tablica 1).

U zadnjem desetljeću opisano je nekoliko epidemija i epizootija WNV infekcije s visokim mortalitetom u humanoj i animalnoj populaciji i to 1996. godine u Rumunjskoj [8], 1999. godine u NewYorku, SAD [9] i u Mađarskoj 2008. godine [10]. Noviji podaci govore o prvoj opisanoj epidemiji WNV infekcije u Grčkoj s više stotina oboljelih [11,12].

Još jedan flavivirus koji je zapažen i u Europi je Usutu virus, koji je izvorno izoliran u komaraca u Africi. Godine 2001. otkriven je i izvan Afrike i to kao uzročnik epizooti-

je u ptica (kosova) u Austriji [13]. Od tada se Usutu virus može naći u pojedinim dijelovima Austrije i Mađarske, što govori za moguću enzootiju. U 2010. godini dva su bolesnika umrla od infekcije Usutu virusom u Italiji, a iste godine Usutu virus prvi puta je izoliran i u komaraca u dolini rijeke Rajne u Njemačkoj [14, 15]. Usutu virus prenose komarci i serološki je vrlo sličan WNV. Obzirom na blisku antigeničnost s WNV, ELISA test za IgG protutijela na WNV također otkriva i IgG protutijela na Usutu virus.

Hrvatska je srednjoeuropska i mediteranska zemlja te su stoga prisutne srednjoeuropske endemske bolesti u kontinentalnom dijelu, a mediteranske endemske bolesti u priobalnom dijelu zemlje. S enormnim porastom prometa diljem svijeta, uz robu i putnike prenose se različiti uzročnici i vektori, pa su tako registrirane importirane, neendemske bolesti za taj dio Europe, npr. denga hemoragijska vrućica u Hrvatskoj [16], chikungunya vrućica i WNV infekcija u Italiji [17]. Hrvatska je popularno turističko odredište turista iz različitih dijelova svijeta. Rute ptica selica iz Europe u Afriku i natrag prolaze preko Hrvatske, što omogućuje unos i prijenos raznih uzročnika koji se prenose artropodima, a koji nisu prisutni u Hrvatskoj. U 2010. godini opisan je prvi humani slučaj denga vrućice akviriran u Hrvatskoj u jednog turista iz Njemačke, koji se vratio s odmora u Hrvatskoj [18], a nakon toga je detaljnijom epidemiološkom obradom nađena još jedna bolesnica s auto-

Tablica 1. Slučajevi KME u Hrvatskoj i Međimurskoj županiji od 1997. – 2010. godine

Table 1. TBE cases in Croatia and Međimurje County in the period 1997–2010

	Broj slučajeva KME/Number of TBE cases	
	Hrvatska/Croatia (4,290.612 stanovnika/inhabitants)*	Međimurska županija/Međimurje County (114,435 stanovnika/inhabitants)*
1997	25	6
1998	24	3
1999	26	5
2000	18	8
2001	27	1
2002	30	2
2003	36	3
2004	38	9
2005	28	8
2006	20	2
2007	11	4
2008	20	1
2009	44	1
2010	36	3

(Izvor: Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Epidemiologija / Source: Croatian National Institute of Public Health, Epidemiology unit)

*Popis stanovništva 2011. godine / Census 2011.

KME – krpeljni meningoencefalitis / TBE – Tick-borne encephalitis

htonom denga vrućicom [19]. Iste 2010. godine, utvrđeni su prvi autohtoni slučajevi humane denga vrućice u južnoj Francuskoj, točnije u Nici [20].

Zbog antigenih karakteristika grupe flavivirusa i posljedičnih križnih reakcija u odnosu na pojedine članove te grupe, u interpretaciji serologije na pojedine flaviviruse potrebno je učiniti serološke testove na sve članove ove grupe virusa koji su prisutni u određenom lokalitetu. U svrhu istraživanja flavivirusa u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, proveli smo seroepidemiološko istraživanje analizirajući prisustvo IgG protutijela na KMEV, WNV i virus denga (DENV) u dragovoljnih davatelja krvi u Međimurskoj županiji, sjeverozapadnom dijelu Hrvatske. Također smo usporedili rezultate seroprevalencije KMEV 2007. godine s rezultatima serologije na KMEV provedenim na istom području 1997. godine u sklopu drugog istraživanja [21].

Ispitanici i metode

Tijekom 1997. godine skupljeno je 300 uzoraka seruma dobrovoljnih davatelja krvi na transfuziji Županijske bolnice Čakovec i pohranjeno u ledenicu do transporta u laboratorij. Serumi su bili iz grupe uzoraka iz istraživanja provedenih 1997. godine [21].

U djelatnosti za transfuzijsku medicinu Županijske bolnice Čakovec 2007. godine skupljeno je 300 seruma dobrovoljnih davatelja krvi i pohranjeno u ledenicu do transporta u laboratorij. Sudionici ove studije bili su zdrave odrasle osobe iz opće populacije dobnog raspona 18–70 godina, jednakog postotka oba spola i različitih zanimanja. Uzorci seruma uzeti su kod dolaska u djelatnost za transfuzijsku medicinu tijekom rutinske akcije prikupljanja krvi. Svi su sudionici potpisali informirani pristanak za testiranje njihove krvi na uzročnike koje prenose člankonošci. Etičko povjerenstvo Županijske bolnice Čakovec dalo je suglasnost za ovo istraživanje.

Tijekom 1997. godine 300 seruma testirano je testom ELISA (Enzygnost, DADE-Behring, Marburg, Njemačka) na prisutnost IgM i IgG specifičnih protutijela na KMEV [21].

Godine 2007. godine 300 seruma testirano je na specifična IgG protutijela na KMEV i WNV testom ELISA (EUROIMMUN, Lübeck, Njemačka). Reaktivni serumi u jednom od tri testa ELISA, potvrđeni su testom indirektno imunofluorescencije koristeći Flavivirus Biochip I (EUROIMMUN, Lübeck, Njemačka). Četverostruki ili viši titar protutijela na flaviviruse označen je kao specifičan.

Svi su serumi također testirani testom Dengue-IgG ELISA (EUROIMMUN, Lübeck, Njemačka), a kao antigen korišten je virus denga tip 2. Svi reaktivni serumi potvrđeni su testom Dengue-Biochip (Euroimmun). Serumi u razrjeđenju 1:10 testirani su u Biochipu na specifična

protutijela virusa denga serotipa 1–4. Korišten je test indirektno imunofluorescencije prema uputama proizvođača, a svi serumi titra 10 i više smatraju se pozitivni.

Rezultati

Testiranjem 300 seruma tijekom 1997. godine nađeno je devet (3 %) pozitivnih na IgG specifična protutijela na KMEV. Nažalost, isti serumi nisu više dostupni za testiranje na WNV i DENV.

Od 300 seruma skupljenih 2007. godine iz istog područja Hrvatske, nađeno je 48 (16 %) pozitivnih na IgG specifična protutijela na KMEV. Svi pozitivni serumi, osim jednog, imali su četverostruki ili viši titar na KMEV u odnosu na ostale flaviviruse. Jedan serum (0,3 %) bio je jako pozitivan na WNV protutijela, a negativan na KMEV i DENV protutijela. Taj je serum označen kao WNV-IgG pozitivan. Interesantno je naglasiti da ovaj serum, s visokim titrom protutijela na WNV IgG u dva testa, pripada 70-godišnjoj ženskoj osobi iz ruralnog dijela Međimurja, koja nikad nije putovala izvan Hrvatske. Također nikada nije primala transfuziju krvi, niti imala transplantaciju tkiva ili organa. Svi testirani serumi bili su negativni na DENV IgG (Tablica 2). Nažalost, korištenom metodom, TBE-ELISA i TBE-Biochip, nije moguće diferencirati protutijela stečena prirodnom infekcijom od protutijela induciranih cijepljenjem.

Tablica 2. Rezultati serološkog testiranja IgG protutijela na KMEV 1997. godine te na KMEV, WNV i DENV 2007. godine

Table 2. The results of serologic tests for antibodies to TBEV in 1997 and TBEV, WNV and DENV in serum samples in 2007

	1997.	2007.	p
KMEV/TBEV	9/300 (3 %)	48/300 (16 %)	<0,001
WNV		1/300 (0,3 %)	
DENV		0/300	

KMEV – virus krpeljnog meningoencefalitisa, WNV – virus Zapadnog Nila, DENV – dengue virus

TBEV – Tick-borne encephalitis virus, WNV – West Nile virus, DENV – Dengue virus

Rasprava

Iako je područje Hrvatske između rijeka Drave i Save poznato kao endemsko područje za KMEV (kao prirodna žarišta) još od 1953. godine [22], službena registracija ove bolesti započela je tek 1986. godine [23]. Od tog vremena prosječno se godišnje registrira 27,4 slučajeva KME, u rasponu od 18 do 44. Ova se bolest javlja u kontinentalnom dijelu Hrvatske sjeverno od 45° sjeverne paralele i

tek sporadično na Jadranskoj obali [23]. U Austriji, zahvaljujući dobro organiziranoj vakcinaciji, seroprevalencija u općoj populaciji porasla je na 86 % u 2008. godini [24], a incidencija KME je u padu [25]. Povišena seroprevalencija za KMEV (od 3 % na 16 %) u sjeverozapadnoj Hrvatskoj je obećavajuća, iako još daleko od zadovoljavajuće, a prema našem mišljenju rezultat je bolje procijepljenosti opće populacije. Slično se može uočiti prateći brojeve registriranih slučajeva KME u Hrvatskoj i u Međimurskoj županiji u zadnjih 12 godina (Tablica 1). Bez obzira na prisutne fluktuacije ukupnog broja slučajeva KME u Hrvatskoj i Međimurskoj županiji, udio slučajeva KME u Međimurju u ukupnom broju u Hrvatskoj nije značajnije smanjen. U drugim zemljama u kojima je KME endemičan, npr. južna Njemačka, broj slučajeva KME nije značajnije smanjen, iako je postotak cijepljenih porastao na >50 % (Dobler, neobjavljeni podaci). Cijepljenje osoba s povećanim rizikom za akviriranje KMEV infekcije trebalo bi unaprijediti i stimulirati, bez obzira što rizik infekcije ovisi o nizu čimbenika kao što su lokacija, sezonsvo te različite aktivnosti u prirodi [26].

Nađena WNV seroprevalencija u sjeverozapadnoj Hrvatskoj od 0,3 % djeluje vrlo nisko, a i u susjednoj Italiji postotak WNV IgG seroprevalencije iznosi 0,7–0,8 % što je gotovo kao u ovom istraživanju [27]. Slični rezultati nađeni su u populaciji konja u istočnoj Hrvatskoj, gdje je utvrđeno 0,4 % pozitivnih seruma konja na WNV IgG protutijela, što ukazuje na mogući rizik za humanu WNV infekciju [28, 29]. Ptice selice također igraju važnu ulogu u unosu WNV u nova područja. U prilog tome govori i podatak o inficiranosti ptica selica s WNV u susjednoj Sloveniji od 2,8 % u dvije uzastopne godine [30]. Ovi podaci ujedno ukazuju na prisutan rizik od WNV infekcije za humanu i animalnu populaciju u Hrvatskoj.

Daljnja istraživanja u komaraca u ovim područjima i seropozitivnost konja, trebali bi otkriti WNV serotip, prevalenciju virusa u komaraca i vrste komaraca koji su uključeni u prirodni prijenos ovog virusa. Ovakve informacije mogle bi dati dodatne činjenice na osnovu kojih bi se mogao procijeniti rizik od WNV infekcije u ljudi u Hrvatskoj i moguće promjene u virusnoj aktivnosti za vrijeme okolišnih i klimatskih promjena. Klimatske promjene (povišena temperatura i vlažnost zraka), ptice selice i povećani turistički promet, glavni su čimbenici u širenju WNV infekcije diljem svijeta [31].

Tijekom 2010. godine jedan njemački turist, isključivo boraveći na Jadranskoj obali u Hrvatskoj, pri povratku u Njemačku, požalio se na vrućicu i jake bolove u mišićima. Serološkom dijagnostičkom obradom dokazana je infekcija s DENV, vjerojatno denge virusom tipa 1 [19]. Nakon toga, u južnoj je Hrvatskoj, točnije na poluotoku Pelješcu, učinjeno opsežno epidemiološko istraživanje, kada je nađeno još jedan autohtoni slučaj denge infekcije. Serološkom obradom lokalnog pučanstva u mjestu gdje je boravio njemački turist, nađeno je 9/14 DENV IgG pozitivnih seruma

i 7/14 DENV IgM pozitivnih seruma [19]. U istraživanju tijekom 1988. godine ispitana je prokuženost s dengue virusom u sjeveroistočnom dijelu Hrvatske, kada je metodom inhibicije hemaglutinacije nađena prisutnost protutijela na DENV 1 od 2,1 % i na DENV 2 od 3,9 % [32]. U našem istraživanju nismo imali niti jedan pozitivan serum na DENV testirano ELISA metodom. Budući je u Hrvatskoj DENV infekcija detektirana 2010. godine, kada je na različitim priobalnim lokacijama nađen komarac *Aedes albopictus*, moguća je bila i lokalna transmisija ovog virusa. Slična situacija primijećena je i 2010. godine u Nici, u južnoj Francuskoj, gdje je DENV serotip 1 bio unesen s otoka Martinik. Virus je privremeno mogao cirkulirati u južnoj Francuskoj, vjerojatno u komarcu *Aedes albopictus* te uzrokovati nekoliko autohtonih DENV infekcija u Nici [20]. Denga virusnu infekciju trebalo bi svakako uvrstiti u diferencijalnu dijagnozu vrućice u putnika koji se vraćaju iz zemalja koje su endemične za ovu bolest (tropska i subtropska područja). U priobalnim područjima Hrvatske tigrasti komarac *Aedes albopictus* je prisutan i taj je komarac kompetentan prijenosnik DENV. Zbog toga postoji rizik novog ili ponovljenog unosa DENV i drugih arbovirusa (npr. virus Chikungunya) u zemlje s različitim klimatskim zonama, kao što su npr. Hrvatska, Italija i Francuska. Ove bi zemlje trebale pažljivo pratiti mogući unos novih patogena. Djelovanje klimatskih promjena i globalno zatopljenje moglo bi imati važan utjecaj na širenje DENV infekcije i dijagnoza ove bolesti mogla bi biti znatno češća u nadolazećem vremenu.

Zaključak

U prikazanom istraživanju serološki je potvrđena prisutnost virusa KME u sjeverozapadnom dijelu Hrvatske, točnije Međimurskoj županiji, uz blagi porast seroprevalencije od 3 % na 16 % u promatranom desetogodišnjem razdoblju. Kao najbolja preventivna mjera protiv infekcije KMEV preporuča se aktivna imunizacija u sjeverozapadnoj Hrvatskoj, kao i u svim europskim zemljama koje su endemične za KME. WNV i DENV infekcija u sjeverozapadnoj Hrvatskoj mogu se steći izuzetno rijetko. Povišena temperatura i vlažnost zraka vezano uz veće količine padalina, utječu na pojavu artropoda, koji su glavni vektori u širenju arbovirusnih bolesti, a što može povećati broj humanih i animalnih WNV i DENV infekcija. Promjene ovih okolišnih čimbenika bitno utječu na medicinski i veterinarski značaj ovih artropodima prenosivih flavivirusa. Nužna su daljnja istraživanja koja bi detaljnije razjasnila mogućnosti pojave i širenja flavivirusa u ovim krajevima.

Zahvala

Zahvaljujemo Helmutu Petersu, Diagnostic DADE Behring, Marburg, Njemačka, za provedbu serologije Enzygnost testom za KMEV.

Literatura

- [1] International Catalog of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates (4th Edition). Karabatsos N (ur.). American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, TX, USA, 1985: 1147.
- [2] Powers Ann M. Overview of Emerging Arboviruses. *Future Virology* 2009; 4: 391–401.
- [3] Thiel HJ, Collet MS, Gould ML i sur. Family Flaviviridae. U: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA ur. *Virus taxonomy: Eight Report of the International Committee on Taxonomy Viruses*. San Diego, Elsevier Academic Press, 2005, 991–998.
- [4] Lundström JO. Mosquito-borne viruses in western Europe: a review. *J Vector Ecol* 1999; 24: 1–39.
- [5] Dobler G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet Microbiol* 2010; 140: 221–228.
- [6] Semenza JC, Menne B. Climate Change and Infectious Diseases in Europe. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 365–75.
- [7] Süss J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 2008; 13: 18916.
- [8] Tsai TF, Popovici F, Cernescu C, Campbell GL, Nedelcu NI. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet* 2009; 352: 767–771.
- [9] Anonymous. Outbreak of West Nile-like viral encephalitis – New York. *Morb Mortal Wkly Rep* 1999; 48: 845–849.
- [10] Krisztalovics K, Ferenczi E, Molnar Z i sur. West Nile virus infections in Hungary. *Euro Surveill* 2008; 13: 19030.
- [11] Papa A, Danis K, Baka A i sur. Ongoing outbreak of West Nile virus infections in humans in Greece, July–August 2010. *Euro Surveill* 2010; 15: 9644.
- [12] Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z i sur. Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean Basin. *Open Virol J* 2010; 22: 29–37.
- [13] Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A i sur. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, in central Europe. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 652–6.
- [14] Jöst H, Bialonski H, Maus D i sur. Isolation of Usutu virus in Germany. *Am J Trop Med Hyg* 2011; 86: 551–3.
- [15] Valaquez A, Jimenez-Clavero MA, Franco L i sur. *Euro Surveill* 2011; 16: 19935
- [16] Pinazo MJ, Muñoz J, Betica L i sur. Imported dengue hemorrhagic fever, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(8): 1329–30.
- [17] Rezza G. Chikungunya and West Nile virus outbreaks: what is happening in north-eastern Italy? *Eur J Public Health* 2007; 19: 236–237.
- [18] Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schöneberg I, Günther S, Stark K, Frank C. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* 2010; 15(40): 19677.
- [19] Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D i sur. Autochthonous Dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill* 2011; 16: 19805.
- [20] La Ruche G, Souarès Y, Armengaud A, i sur. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill*. 2010; 15: 19676.
- [21] Golubić D, Hegeduš-Jungvirth M, Golubić R. Lajmska boreliozna u djece u sjeverozapadnoj Hrvatskoj. *Pediatr Croat* 2000; 44: 151–5.
- [22] Vesenjaj-Hirjan J. Tick-borne encephalitis in Croatia. U: Tick-borne encephalitis in Croatia (Yugoslavia). Vesenjaj-Hirjan J., ur: rad JAZU No. 372, Zagreb, 1–9.
- [23] Borčić B, Kaić B, Kralj V. Some epidemiologic data on TBE and Lyme borreliosis in Croatia. *Zentralbl Bacteriol* 1999; 289: 540–7.
- [24] Heinz FX. Tick-borne encephalitis virus and other flaviviruses. X International Jena Symposium on Tick-borne Diseases, Weimar, Germany, 2009; Abstract no. 61.
- [25] Donoso Mantke O, Escadafal C, Niedrig M, Pfeffer M, on behalf of the Working group for Tick-borne encephalitis virus. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill* 2011; 16: 19976.
- [26] Mansfield KL, Johnson NJ, Phipps LP, Stephenson JR, Fooks AR, Solomon T. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* 2009; 90: 1781–1794.
- [27] Rossini G, Cavrini F, Pierro A i sur. First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 – case report. *Euro Surveill* 2008; 13: 19002.
- [28] Madić J, Savini G, Di Gennaro A i sur. Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Listes E Vet Rec* 2007; 160: 772–3.
- [29] Garcia-Bocanegra I, Jaé-Téllez JA, Napp S i sur. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 2397–9.
- [30] Račnik J, Zorman Rojs O, Jelovšek M i sur. Serological evidence of West Nile virus in wild living passerine birds in Slovenia. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance Vienna, Austria, February 23–25, 2007; Abstract 17.009; 126.
- [31] Soverow JE, Wellenius GA, Fisman DN, Mittleman MA. Infectious Diseases in a Warming World: How Weather Influenced West Nile in the United States (2001–2005). *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1049–1052.
- [32] Ropac D, Gould E, Punda V, Vesenjaj-Hirjan J. Prokuženost ispitivanja iz sjeveroistočne Hrvatske dengue virusom. *Liječ Vjesn* 1988; 110: 177–180.