

Miša Korva¹, Tatjana Avšič-Županc²

Mikrobiološka diagnostika virusnih okužb pri popotnikih

Microbiological diagnostics of viral infections in returning travelers

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: dengue, chikungunya, rumena mrzlica, MPOX, hemoragične vročice

Popotniki se pogosto domov vrnejo bolni, zaradi česar jih kar 80 % poišče zdravniško pomoč. Zaradi globalizacije in dostopnejših potovanj zabeležimo pri potnikih iz Slovenije vse pogostejše bolezni, ki so sicer endemične v Afriki, Aziji, na Karibih, v Amerikah ali ob Indijskem oceanu. Klinična slika in anamneza bolnika običajno nista zadostni za postavitve diagnoze. Zato je za nedvomno potrditev povzročitelja potrebna občutljiva, sodobna in zanesljiva mikrobiološka diagnostika. Med najpogostejšimi virusnimi tropskimi boleznimi pri popotnikih, še posebej pri tistih, ki se vračajo s povišano telesno temperaturo, bolečinami v mišicah ali sklepih ter izpuščaji, so arbovirusi. Med njimi pa so najpogostejši povzročitelji virusi denge, chikungunya in Zika. Večje tveganje za resnejše okužbe imajo popotniki, ki se pogosto vračajo v tujino, da bi obiskali prijatelje in sorodnike, in tam ostanejo dlje časa. Pri takih popotnikih je pomembno, da pomislimo tudi na porajajoče se viruse, ki so sicer redki, a lahko povzročijo hude bolezni, kot npr. bližnjevzhodni respiratorni sindrom, krimsko-kongoška hemoragična mrzlica ali virusna bolezen ebola. Pravočasna prepoznavanje teh ni pomembna le zaradi zdravljenja popotnika, ampak tudi zaradi velikega vpliva teh bolezni na javno zdravje, saj so znane po hitrem mednarodnem širjenju.

ABSTRACT

KEY WORDS: dengue, chikungunya, yellow fever, MPOX disease, viral haemorrhagic fevers

The acutely ill returning traveler is a common clinical scenario. Because of globalization and increased accessibility of travel, travelers from Slovenia are increasingly at risk for diseases that are otherwise endemic to Africa, Asia, the Caribbean, the Americas, or the Indian Ocean. The patient's clinical picture and anamnestic history are usually insufficient to make a diagnosis. Therefore, a sensitive, state-of-the-art, reliable microbiology laboratory is required to confirm the diagnosis. Among the most common tropical diseases in travelers, especially those who return with fever, muscle or joint pain, and rash, are certainly arboviruses, such as dengue, chikungunya, and the Zika virus. A special group of travelers are those frequently returning abroad to visit friends and relatives and staying for extended periods of time, as they are at a higher risk for serious

¹ Doc. dr. Miša Korva, univ. dipl. mikrobiol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; misa.korva@mf.uni-lj.si

² Prof. dr. Tatjana Avšič-Županc, univ. dipl. biol., Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zaloška cesta 4, 1000 Ljubljana; tatjana.avsic@mf.uni-lj.si

infections. In such cases, it is important to be vigilant for rare but highly pathogenic emerging infections such as Middle East Respiratory Syndrome, Crimean-Congo hemorrhagic fever, or the Ebola virus disease. Timely detection of such diseases is important, not only for the treatment of the traveler, but also because they are known to spread rapidly and could have major public health implications.

UVOD

Zaradi globalizacije, povečanja mobilnosti, nizkocenovnih letov in boljše dostopnosti eksotičnih lokacij postajajo bolezni, povezane s potovanji, vse pogostejše in tako je njihovo pravočasno in zanesljivo prepoznavanje vse pomembnejše. Svetovna turistična organizacija (United Nations World Tourism Organization, UNWTO) ocenjuje, da bosta do leta 2030 letno potovali kar dve milijardi ljudi (1). Raziskave iz Evrope in Združenih držav Amerike so poročale, da 43–79 % popotnikov zbolí med bivanjem v državah v razvoju in novo industrializiranih državah ali takoj po vrnitvi (2, 3). V Sloveniji zabeležimo pri potnikih iz tujine vsako leto več 10 primerov bolezni, ki so sicer endemične v Afriki, Aziji ali Amerikah. Po podatkih EuroTravNet so akutna driska, virusni sindromi s kožnimi manifestacijami ali brez njih ter malarija najpogostejši razlogi za obisk zdravnika (4).

Klinična slika in anamneza bolnika pogosto ne zadostujeta za postavitev diagnoze, zato je razvoj občutljive, sodobne mikrobiološke diagnostike izrednega pomena. Za nedvomen dokaz okužbe uporabljamo tako molekularne metode, ki so hitre in lahko z njimi neposredno dokažemo posameznega povzročitelja, kot tudi serološke metode, pri katerih je diagnostično okno širše, vendar je zaradi navzkrižne reaktivnosti protiteles včasih tolmačenje rezultatov zahtevno.

Epidemiologija tropskih bolezni je zapletena in pogosto povezana s spremenjajočimi se okoljskimi razmerami. Mnogi patogeni se prenašajo s prenašalci (vektorji) in imajo živalske rezervoarje, ki so povezani

z zapletenimi življenjskimi krogi. Zaradi vseh teh dejavnikov je stalen nadzor nad njihovim pojavljanjem precejšen izziv. Svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) spremlja širjenje bolezni po vsem svetu in vodi seznam bolezni, ki imajo epidemični ali pandemični potencial (5, 6). Trenutno spremljane bolezni, ki vključujejo virusne povzročitelje, so zbrane v tabeli 1, v prispevku pa bomo predstavili tiste, ki jih pogosteje beležimo v Sloveniji pri potnikih iz tropskih krajev.

OKUŽBA Z VIRUSOM DENGÉ

Virus dengué (angl. *dengue virus*, DENV) spada v družino *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*. Ločimo štiri različne tipe DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 in DENV-4), med katerimi težje in smrtno primere pogosteje povzročata virusa DENV-2 in DENV-3. Ljudje se z virusom dengué okužijo s piki okuženih komarjev ščitarjev (*Aedes (A.) aegypti*). Bolezen, ki je endemična v tropskih in subtropskih predelih Azije, Afrike in Amerike, na Karibskem otočju in v delu Pacifika, označuje WHO za najhitreje porajajočo se svetovno virusno bolezen. Z vračanjem viremičnih potnikov z endemičnih območij se lahko DENV razširi tudi v druge države. Čeprav je v Evropi mrzlica dengué še vedno vnesena bolezen, je v zadnjih desetih letih povzročila številne manjše izbruhe na jugu Francije in na Hrvaškem ter obsežno epidemijo v letih 2012–13 na Madeiri (7). Okužbe z DENV lahko potekajo brez simptomov, običajno poteka kot samoomejujoča vročinska bolezen, klasična denga ali kot težka hemoragična oblika s sindromom šoka (8).

Tabela 1. Pregled virusnih bolezni z epidemičnim ali pandemičnim potencialom, ki jih spremlja WHO (prirejeno po 6). JV – jugovzhodna; J – južna; MERS – bližnjevzhodni respiratorni sindrom (angl. *Middle East respiratory syndrome*); MERS-CoV – koronavirus bližnjevzhodnega respiratornega sindroma (angl. *Middle East respiratory syndrome coronavirus*) Z – Zahodna.

Bolezen	Virusni povzročitelj	Klinična slika	Vektor/rezervoar	Endemično območje
mizlica chikungunya	virus chikungunya; družina <i>Togaviridae</i>	vročina, slabo počutje, makulopapulozen izpuščaj ter bolečine v mišicah in sklepih	komarji <i>Aedes</i> spp., ptiči in mali glodavci	Afrika, JV Azija, J Amerika, Karibsko otočje, Indijski ocean, Evropa*
mizlica denga	virus denga; družina <i>Flaviviridae</i>	visoka vročina, glavobol, retroorbitalne bolečine, bolečine v mišicah in sklepih	komarji <i>Aedes</i> spp., primati	Azija, Afrika in Amerika, Karibsko otočje, Pacifik, Evropa*
mizlica Zika	virus Zika; družina <i>Flaviviridae</i>	vročina, bolečine v sklepih in mišicah, glavobol, vnetja očesna veznica, makulopapulozni izpuščaj	komarji <i>Aedes</i> spp.	Azija, Afrika in Amerika, Karibsko otočje, Pacifik
rumena mrzlica	virus rumene mrzlice; družina <i>Flaviviridae</i>	vročina, zlatenica, krvavitve	komarji <i>Aedes</i> spp., primati	podсахarska Afrika, J Amerika
MERS	virus MERS-CoV; družina <i>Coronaviridae</i>	znaki okužbe dihal, kašelj, zasoplost, vročina	kamele, netopirji <i>Rhinolophus</i> spp.	Arabski polotok
MPOX	virus opičjih koz; družina <i>Poxviridae</i>	utrujenost, vročina, bolečine v mišicah, izpuščaj	prenos s tesnim stikom med ljudmi; opice, podgane, veeverice	Z in Centralna Afrika, (svet)
gripa	virus influenzae; družina <i>Orthomyxoviridae</i>	vročina, glavobol, mialgija, slabo počutje	vodne ptice (labodi, race)	svet
krimsko-kongoška hemoragična mrzlica	virus krimsko-kongoške hemoragične mrzlice; družina <i>Paramyxoviridae</i>	vročina, mialgije, motnje prebavil, petehije	klopi <i>Hyalomma</i> spp., živina, zajci in perutnina	Afrika, Balkan, Bližnji vzhod in Azija
virusna okužba ebola	virus ebola; družina <i>Flaviviridae</i>	visoka vročina, utrujenost, bolečine v mišicah, petehije, bolečina v prsih, artralgije	afriški sadjejedi, netopirji, primati	Z in Centralna Afrika
virusna okužba Marburg	virus Marburg; družina <i>Flaviviridae</i>	visoka vročina, glavobol, slabo počutje, bolečine v mišicah, driska, krvavitve	egiptovski sadjejedi, netopir (<i>Rousettus aegyptiacus</i>)	Afrika
mrzlica Lassa	virus Lassa; družina <i>Arenaviridae</i>	slabo počutje, vročina, krvavitve	afriška podgana <i>Mastomys natalensis</i>	Z Afrika
virusna okužba Hendra	virus Hendra; družina <i>Paramyxoviridae</i>	vročina, znaki dihal	netopirji <i>Pteropus</i> spp., konji	Azija, Avstralija, Pacifik
virusna okužba Nipah	virus Nipah; družina <i>Paramyxoviridae</i>	vročina, virusna pljučnica	netopirji <i>Pteropus</i> spp.	JV Azija
mizlica doline Rift	virus doline Rift; družina <i>Phenuiviridae</i>	vročina, bolečine v sklepih in mišicah	komarji <i>Aedes</i> spp.	Afrika, Arabski polotok

*avtohtoni izbruhi po vnosu z viremičnim popotnikom

Prenos

V naravnem okolju se DENV ohranja s kroženjem v t. i. silvatičnem krogu med primati in gozdnimi vrstami komarjev iz rodu *Aedes*. Učinkovitejšje je ohranjanje virusa v epidemičnem krogu med okuženimi ljudmi in komarji vrste *A. aegypti* in *A. albopictus* (tigrasti komar). Okužene osebe, ki so običajno viremične teden dni, so tako za ohranjanje in razširjanje DENV najpomembnejši gostitelji. Samica komarja se okuži s pitjem krvi viremičnega vretenčarja in ostane kužna vse življenje (od enega do treh mesecev) (8).

Klinična slika

Virus denga povzroča klinično različne oblike bolezni, kjer se večina okužb izrazi v obliki mrzlice denga. Po nekajdnevni inkubacijski dobi nastopijo običajni znaki, kot so visoka vročina, glavobol, retroorbitalne bolečine, bolečine v mišicah in sklepih. Pojavi se anoreksija, bolečine v trebuhu, bruhanje in slabost. To je čas visoke viremije in pri skoraj 80 % bolnikov se pojavi makulopapulozen ali petehialen izpuščaj. Pri otrocih je potek bolezni milejši kot pri odraslih, okrevanje je običajno popolno. Za klinično težje oblike bolezni, kot je denga z opozorilnimi znaki in težka denga, so značilni še trombocitopenija, ascites, različne krvavitve (petehije, krvavitve sluznic, melena in hematemeza) in povečana prepustnost krvnih žil. Hipovolemija kot posledica izgube plazme zaradi povečane žilne prepustnosti vodi v življenjsko nevaren šok. Težka oblika denge je bolezen, ki prizadene mlajše otroke na visoko endemičnih območjih, kjer je običajno prisotnih več tipov DENV, in osebe, ki imajo ponovno okužbo s heterolognim tipom virusa (9, 10). Pri ponovni okužbi s heterolognim tipom DENV se bolezen lahko poslabša tudi zaradi negativnega vpliva imunskega odziva, kjer že obstoječa protitelesa iz prvotne okužbe – namesto da bi nevtralizirala virus – spodbudijo nastanek vnetnih cito-

kinov in kemokinov, ki dodatno poškoduje endotelij žil (8).

Mikrobiološka diagnostika

Najpogosteje se za dokaz okužbe z DENV uporabljajo posredne metode, kot sta encimski imunski test in imunofluorescenčna metoda. Z njimi ugotavljamo značilna protitelesa razreda IgM in IgG, ki so v serumu bolnikov običajno prisotna ob koncu prvega tedna bolezni. Akutno okužbo z DENV potrdimo z dokazom značilnih protiteles razreda IgM ali s serokonverzijo oz. s porastom titra protiteles razreda IgG v parnih serumskih vzorcih. Ponovno (sekundarno) okužbo lahko dodatno dokažemo tudi z določanjem avidnosti protiteles razreda IgG. Pri tolmačenju rezultatov serološkega testiranja bolnikov, okuženih z DENV, je potrebna previdnost, saj je navzkrižna reaktivnost med številnimi flavivirusi izjemno visoka. Poleg tega moramo vedeti, da ostanejo po okužbi z enim od tipov DENV vseživljenjska protitelesa, ki so za virusni tip značilna, a le delno ščitijo pred okužbo z drugimi tipi DENV. Poskus osamitve virusa iz vzorca akutnega seruma ali krvi bolnika je najbolj specifična metoda za dokaz okužbe, vendar je slabo občutljiva (9). Zato se vse bolj uporabljajo metode neposrednega dokaza virusnih antigenov (npr. nestrukturna beljakovina 1, NS1) ali dokaz genoma virusa s številnimi molekularnimi različicami obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (angl. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR), ki dovoljujejo določitev virusnega bremena ali/in opredelitev tipa DENV. Virusno RNA je mogoče v krvi dokazati do 8. dneva od pojava kliničnih znakov bolezni, do 16. dneva bolezni pa lahko RNA DENV dokažemo v seču (11).

Zdravljenje, preprečevanje in nadzor

Ker posebnega zdravila za zdravljenje okužb z DENV ni, temelji podporno zdravljenje na spremljanju bolnikovih življenjskih funkcij

in hematološkega stanja. Glede na svetovni porast števila okužb z DENV in vedno večje število klinično težjih oblik bolezni je potreba po učinkovitem zdravlilu in cepivu nujna. Številna kandidatna cepiva, ki so živa oslABLJena štirivalentna cepiva, so prešla vse faze preizkušanja. Vendar sta učinkovitost in varnost cepiv proti okužbam z DENV še vedno vprašljivi predvsem zaradi pomanjkanja primerne živalskega modela in zaradi pojava, da se hemoragična in težka oblika bolezni denga običajno razvijeta pri bolnikih s ponovno heterologno okužbo in pri otrocih na visoko endemičnih območjih (10). Leta 2022 sta bili na voljo dve komercialni cepivi (Dengavaxia in Qdenga). Cepivo Dengavaxia, odobreno leta 2018, je priporočeno le za ljudi, ki so bili predhodno že okuženi z virusom denga (12). Cepivo Qdenga je bilo odobreno leta 2022 v Indoneziji in se je izkazalo za učinkovito ne glede na predhodno izpostavljenost (13).

OKUŽBA Z VIRUSOM CHIKUNGUNYA

Virus chikungunya (angl. *chikungunya virus*, CHIKV) uvrščamo v rod *Alphavirus*, v družino *Togaviridae*. Človek se s CHIKV okuži s pikom okuženega komarja ščitarja (*A. aegypti*) ali tigrastega komarja (*A. albopictus*). Virus je endemičen v tropskih in subtropskih predelih Afrike, na otokih Indijskega oceana, v Indiji in Jugovzhodni Aziji ter od leta 2013 naprej na Karibih in v Južni Ameriki. V Italiji so imeli leta 2007 prvi izbruh avtohtonih primerov okužb s CHIKV, naslednjega pa leta 2017. Skoraj vsako leto poročajo o avtohtonih primerih tudi v južni Franciji (7). CHIKV povzroči redko asimptomatsko okužbo, običajno se razvije blaga vročinska bolezen ali vročinska bolezen z izpuščajem in hudimi bolečinami v sklepih ter mišicah (14).

Prenos

Podobno kot DENV se tudi CHIKV v narašči ohranja v gozdnem krogu, med prenašalci

(komarji iz rodu *Aedes*) in vretenčarskimi gostitelji (večinoma primati). Mnogo učinkovitejši prenos CHIKV je v epidemičnem, mestnem krogu, kjer se virus s komarji ščitarji in tigrastimi komarji širi z viremičnih oseb na dovzetne ljudi (15).

Klinična slika

Po kratki inkubacijski dobi (tri dni) se pojavi akutna faza bolezni z nenadno povišano telesno temperaturo (do 40 °C), ki lahko traja do deset dni. Pojavijo se makulopapulozen izpuščaj ter bolečine v mišicah in sklepih. Običajno so bolečine v mišicah in oteklih sklepih v akutni fazi tako hude, da bolnika zelo oslabijo in mu otežijo gibanje. Pri velikem deležu bolnikov se akutna faza nadaljuje v kronično, z značilnimi poliartralgijami, ki lahko vztrajajo mesece ali leta. Bolezen poteka najhuje pri dojenčkih in osebah, starejših od 65 let. Ostali zapleti, povezani z okužbo s CHIKV, so meningoencefalitis, dihalna odpoved, akutni hepatitis in ledvična odpoved, ki so prav tako pogostejši pri otrocih in starejših (14, 16).

Mikrobiološka diagnostika

Mikrobiološka diagnostika okužb s CHIKV je pomembna zaradi izključitve drugih virusnih bolezni s podobno klinično sliko. Poleg značilnih kliničnih znakov (nenaden pojav povišane telesne temperature in močne bolečine v sklepih ali artritis) so ključni epidemiološki podatki, kot so bivanje ali potovanje v endemične kraje in pik komarja. Akutno okužbo s CHIKV ugotovimo z dokazom virusne RNA v vzorcih seruma ali krvi z RT-PCR v realnem času in z dokazom značilnih protiteles. Virusni genom lahko dokažemo le v prvem tednu po pojavu kliničnih znakov bolezni. Posredno potrdimo okužbo s CHIKV z ugotavljanjem značilnih protiteles razreda IgM, ki se pojavijo prvi teden bolezni in jih lahko dokažemo še leto dni po okužbi (16). Protitelesa razreda IgG nastanejo večinoma ob koncu prvega tedna po pojavu kliničnih znakov

bolezni. Serološko potrdimo akutno okužbo s CHIKV z dokazom značilnih protiteles razreda IgM in IgG ali s štirikratnim porastom titra značilnih protiteles razreda IgG v parnih vzorcih serumov (15). Načeloma omogočajo serološke preiskave specifično potrditev okužb s CHIKV, vendar o navzkrižni reaktivnosti med alfavirusi, kot so virus reke Ross (Avstralija) in virus Mayaro (Brazilija) ter virus Sindbis (Evropa), nimamo natančnih podatkov (17).

Zdravljenje, preprečevanje in nadzor

Namenskega zdravila in odobrenega cepiva za preprečevanje okužb s CHIKV še ni. Zdravljenje bolnikov običajno vključuje uporabo protivnetnih zdravil za blaženje simptomov. Preprečevanje okužb s CHIKV temelji predvsem na omejevanju stikov s prenašalci (komarji) in zmanjševanju njihovega števila. Viremične bolnike je treba opozoriti, da se morajo vsaj teden dni ščititi pred piki komarjev, saj tako preprečimo prenos virusa na dovzetne komarje ter zmanjšamo možnost širjenja virusa na ljudi v bližnji okolici, ki lahko vodi v izbruh.

OKUŽBA Z VIRUSOM ZIKA

Virus Zika (angl. *Zika virus*, ZIKV) je RNA virus, ki spada v rod *Flavivirus*, družino *Flaviviridae*, ter se prenaša predvsem s pikom komarja. Osamili so ga leta 1947 v afriški državi Uganda iz opic, nato pa je skoraj pol stoletja ostal neopažen – vse do epidemije na otoku Yap v Mikroneziji leta 2007, od koder se je razširil v Francosko Polinezijo in v druge države v Pacifiku (18). Od leta 2015, ko se je ZIKV pojavil v Braziliji, se je epidemija ZIKV dramatično razširila v Latinski Ameriki, Srednji in Severni Ameriki ter na Karibih (19). Epidemija ZIKV je vzbudila skrb predvsem zaradi sočasnega naglega naraščanja števila novorojenčkov z mikrocefalijo in drugimi nevrološki motnjami (20). Zaradi povezave okužbe

nosečnic z ZIKV in posledično motenj v razvoju ploda ter pogostih pojavov nevroloških zapletov, kot je Guillain-Barréjev sindrom, pri odraslih osebah je WHO širjenje ZIKV prepoznala kot dogodek mednarodnih razsežnosti, ki pomeni resno tveganje za javno zdravje (21, 22).

Prenos

ZIKV se primarno prenaša s pikom okužene samice komarja ščitarja. Dokazali so, da je za okužbo z ZIKV dovzeten tudi tigra-sti komar, ki je široko razširjen v Južni Evropi, Združenih državah Amerike in v večjem delu Azije (19). Učinkovit je tudi neektorski prenos ZIKV, predvsem z matere na plod kakor tudi s spolnimi odnosi. ZIKV se lahko prenese ob spolnem stiku z okuženega moškega ali ženske na spolnega partnerja ali partnerko, saj so v semenski tekočini prisotni kužni virusni delci še dva meseca po pojavu kliničnih znakov (23). Skrb vzbujajoč je vertikalni, kongenitalni način prenosa ZIKV, ki lahko vodi v hudo nevrološko prizadetost, možganske nepravilnosti, vključno z mikrocefalijo in smrtjo otroka (24). Prenos s transfuzijo krvi in krvnih pripravkov ter darovanih organov so opisali, vendar so na endemičnih območjih težko ugotovljivi in sledljivi (25).

Klinična slika

Po nekaj dni trajajoči inkubacijski dobi zbolijo le 20–30 % okuženih oseb. Najpogostejši simptomi in znaki vključujejo vročino, bolečine v sklepih in mišicah, glavobol, vnete očne veznice in makulopapulozni izpuščaj, običajno po vsem telesu. Laboratorijski izvidi so večinoma normalni. Bolnišnična oskrba je redka, saj bolnikeve težave večinoma izzvenijo v tednu dni. Ker so simptomi podobni okužbama z DENV in CHIKV, ki sta prav tako endemični v trop-skem in subtropskem pasu, je postavitev diagnoze samo na podlagi klinične slike lahko napačna (19, 20).

Mikrobiološka diagnostika

Dokaz okužbe z ZIKV temelji na neposrednem dokazu virusnega genoma ali posrednem ugotavljanju protiteles, ki nastanejo po okužbi. Z RT-PCR v realnem času dokažemo okužbo z ZIKV v krvi, serumu ali plazmi v prvem tednu po pojavu kliničnih znakov (viremija). Virusno RNA lahko dokažemo tudi v seču 10–20 dni po pojavu kliničnih znakov ali v semenski tekočini, kjer je prisotna še dva meseca po klinično izraženi bolezni (26). Protitelesa proti ZIKV ugotavljamo z encimsko imunsko ali imuno-fluorescenčno metodo. Medtem ko zaznamo značilna protitelesa razreda IgM proti ZIKV že v prvem tednu bolezni in so ta dokazljiva dva do tri mesece po okužbi, se značilna protitelesa razreda IgG pojavijo šele v drugem tednu bolezni in jih je mogoče dokazati še mesece po preboleli okužbi. Zaradi velike verjetnosti navzkrižno reaktivnih protiteles med flavivirusi, ki so lahko posledica okužbe ali cepljenja (npr. virus rumene mrzlice, virus klopnega meningoencefalitisa, virus japonskega encefalitisa, DENV, virus Zahodnega Nila in virus Usutu), je potrebna previdnost pri razlagi seroloških rezultatov (27).

Zdravljenje, preprečevanje in priporočila

Za okužbe z ZIKV ni namenskega protivirusnega zdravila, prav tako še ni na voljo cepiva. Simptomatsko in podporno zdravljenje vključuje paracetamol, antihistaminike, hidracijo in počitek (25). Bolniki se morajo v prvem tednu bolezni zaščititi pred nadaljnjimi piki komarjev, saj tako zmanjšamo tveganje za prenos virusa na komarje ter preprečimo, da bi se virusna okužba širila na ljudi v bližnji okolici (27). Nosečnicam in ženskam, ki načrtujejo nosečnost, odsvetujejo potovanja na območja, kjer poteka aktiven prenos ZIKV. Osebam brez simptomov, ki se vračajo z endemičnih območij ZIKV, svetujemo pregradno zaščito pri spolnih odnosih vsaj osem tednov po

vrnitvi. Osebam s klinično izraženo boleznijo in potrjeno okužbo z ZIKV odsvetujejo zanositev vsaj naslednjih šest mesecev (18).

OKUŽBA Z VIRUSOM RUMENE MRZLICE

Virus rumene mrzlice (angl. *yellow fever virus*, YFV) spada prav tako v rod *Flavivirus* in je kot prototip soroden drugim virusom istega rodu, kot so DENV, ZIKV, virus japonskega encefalitisa in virus Zahodnega Nila. YFV se prenaša na ljudi predvsem s komarji vrste *Haemagogus* sp. in *Aedes* sp. (28). Rumena mrzlica je endemična v trop-ski podsaharski Afriki in v manjši meri v deževnih gozdovih Južne Amerike, kjer virus pogosto najdemo pri opicah. Velika epidemija rumene mrzlice je bila v letih 2016–2018 v Braziliji, vsakoletni izbruhi bolezni pa se v Nigeriji pojavljajo od leta 2017 dalje (29). Klinični spekter rumene mrzlice sega od asimptomatske ali blage okužbe do morebitno življenjsko nevarnih stanj s krvavitvijo in zlatenico (30).

Prenos

YFV se v naravi ohranja s kroženjem med prenašalci, komarji, in gostitelji, primati. Primati predstavljajo le prehodnega gostitelja, saj je viremija v njih kratkotrajna. Prenasalci komarji so hkrati tudi glavni gostitelji, v katerih se virus pomnožuje. Komarji ostanejo kužni vse življenje in v njih se YFV prenaša tako transstadialno kot transovarialno. Poznamo tri oblike kroženja. Enzootični, gozdni krog predstavlja glavni način ohranjanja virusa v naravi. Tu virus kroži med gozdnimi komarji (rodova *Aedes* v Afriki in *Haemagogus* v Južni Ameriki) in opicami. Človek v tem primeru predstavlja le naključnega gostitelja s posamičnimi primeri, ko se zadržuje v gozdu. Za ljudi je najpomembnejši savanski krog virusa. Ta se pojavi ob razširitvi gozdnih komarjev v človeška naselja v bližini gozdov. Po prenosu virusa na ljudi se le-ta ohranja s kroženjem med komarji in ljudmi, kar

omogoči nastanek izbruhov in epidemij. Poznan je tudi mestni krog, kjer se virus ohranja s kroženjem med komarji ščitarji in ljudmi. V Južni Ameriki je v preteklosti ta način predstavljal glavni delež okužb pri ljudeh. Z obsežnim nadzorom nad komarji v mestih pa t. i. mestne rumene mrzlice v Južni Ameriki ne beležijo več (8, 30).

Klinična slika

Klinična slika rumene mrzlice variira od asimptomatske okužbe, neznačilnega vročinskega obolenja, do sistemske okužbe z vročino, zlatenico, krvavitvami in ledvično odpovedjo. Značilen klinični potek rumene mrzlice je v splošnem podoben poteku drugih arbovirusnih bolezni s kratko inkubacijsko dobo, ki ji sledi akutno dvestopenjsko obolenje. Prva stopnja bolezni nastopi nenadno, od tri do šest dni po vbodu okuženega komarja (31). Spremljajo jo znaki neznačilnega vročinskega obolenja, vročina, mrzlica, utrujenost, glavobol, bolečine v mišicah, sklepih in križu, slabost, bruhanje, ki trajajo približno tri dni. S podrobnejšim pregledom bolnika lahko tudi v tej stopnji bolezni opazimo nekaj bolj značilnih znakov rumene mrzlice, kot so pordelost obraza in vratu, pordele očne veznice, jagodno obarvan jezik in bradikardija. Tej stopnji sledi obdobje brez vročine, ki traja do dva dni. Bolniki z blažjo obliko bolezni si na tej stopnji opomorejo. Pri 12 % bolnikov nastopi druga stopnja bolezni, t. i. stopnja zastrupitve, ki ima težji potek (32). Ponovno se pojavijo vročina, bolečine v trebuhu in bruhanje. Prisotne so tudi krvavitve, v začetku običajno kot izbljuvana ali izkašljana kri, kri v blatu, krvavitve iz dlesni in na mestih vbodov z injekcijskimi iglami. Bolniki so zlatenični in kažejo znake ledvične odpovedi (oligurija). Lahko pride do hude zlatenice in tudi močnih notranjih krvavitev, napredujoče ledvične odpovedi, hipotenzije in šoka, ki jim sledita koma in smrt. Smrtnost rumene mrzlice je različna, običajno 20–50 %. Bolniki, ki okužbo pre-

živijo, običajno popolnoma okrevajo, vendar je doba okrevanja dolga, z več tednov trajajočo zlatenico in motnjami v delovanju jeter in ledvic (30, 33).

Mikrobiološka diagnostika

Pri bolnikih na endemičnih področjih s klasičnim potekom rumene mrzlice lahko diagnozo postavimo že na podlagi kliničnih znakov. V rutinski laboratorijski diagnostiki se najpogosteje uporablja encimska imunska metoda, ki je hitra in občutljiva ter omogoča dokaz značilnih protiteles razreda IgM in IgG, ki so v serumu bolnikov običajno prisotna približno teden dni po okužbi, v začetku druge stopnje bolezni. Za zanesljivo potrditev okužbe z YFV je treba dokazati serokonverzijo oz. štirikratni porast titra značilnih protiteles v serumu (8, 34). Oviro pri uporabi seroloških metod oz. tolmačenju rezultatov predstavljajo navzkrižno reaktivna protitelesa, ki so lahko posledica okužbe ali cepljenja proti drugim flavivirusom (35). Prav tako je možno v serumu oseb, ki so se cepile proti rumeni mrzlici, zaslediti protitelesa razreda IgM še nekaj časa po cepljenju (36).

Slaba stran seroloških metod je tudi ta, da protiteles v prvi stopnji bolezni ni mogoče dokazati. Takrat lahko okužbo potrdimo z neposrednim dokazom virusa z osamitvijo virusa na celičnih kulturah komarjev ali z dokazom virusne RNA v vzorcih bolnikov. Metoda osamitve virusa je časovno zamudna, tehnično zahtevna in razmeroma nevarna, zato za hitro diagnostiko okužb ni primerna. Za neposredno dokazovanje okužb z YFV običajno uporabljajo molekularne metode RT-PCR za dokaz virusne RNA v krvi bolnikov, ki razvijejo visoko viremijo že dva do tri dni po okužbi. Virusno breme je v krvi zaznavno vsaj do 10. dneva bolezni, diagnostično okno pa lahko še podaljšamo s pomnoževanjem virusne RNA v seču, ki je pogosto pozitiven tudi do 20. dneva bolezni (30, 37).

Zdravljenje, preprečevanje in priporočila

Posebnega zdravila za zdravljenje rumene mrzlice ni. Zdravljenje bolnikov je simptomatsko in podporno ter temelji na spremljanju bolnikovih življenjskih znakov in hematološkega stanja (30).

Zato je večjega pomena preprečevanje okužb, predvsem s cepljenjem. Prvo cepivo proti rumeni mrzlici so razvili že leta 1940. To je živo, oslabiljeno cepivo virusnega seva 17D, ki je nastalo s postopno oslabiljivijo prvega izoliranega seva YFV, seva Asibi (1927). Cepivo je dobro imunogeno, z več kot 95 % stopnjo serokonverzije pri prejemnikih (36, 38). Čeprav je zaščita po cepljenju najverjetneje vseživljenjska, pa mednarodne zdravstvene organizacije za prebivalce endemičnih področij priporočajo poživitevno cepljenje vsakih deset let.

OKUŽBA Z VIRUSOM OPIČJIH KOZ

Do pomladi 2022 je bila bolezen opičjih koz (angl. *monkeypox*, MPOX) redka zoonoza, ki jo je povzročila okužba z virusom opičjih koz (angl. *monkeypox virus*, MPXV), iz rodu *Orthopoxvirus*, družine *Poxviridae* (39). Bolezen je endemična v področjih tropskega pasu Zahodne in Centralne Afrike, zlasti v Demokratični republiki Kongo, kjer se večina primerov bolezni pojavi pri otrocih, med petim in devetim letom starosti, ki se okužijo predvsem s stiki z okuženimi afriškimi neveri-cami in drugimi malimi glodavci (40, 41). Konec maja 2022 so prvič sočasno poročali o številnih primerih MPOX v več kot 90 državah v Evropi, Ameriki, vzhodnem Sredozemlju, zahodnem Tihem oceanu in jugovzhodu Azije. Trenutno beležimo več kot 86.700 potrjenih primerov po vsem svetu (42).

Prenos

Virus se prenaša s tesnim stikom z okuženo osebo (preko lezij, med spolnim stikom, kapljično ob dolgotrajnejšem stiku), žival-

jo ali kontaminiranimi površinami (oblačila, posteljnina ali brisače) (43).

Klinična slika

V večini primerov je MPOX redka, a morebitno resna virusna bolezen, ki se običajno začne z gripi podobno boleznijo in oteklimi bezgavkami ter napreduje do razširjenega izpuščaja na obrazu in telesu. Resnost bolezni je odvisna od bolnikove starosti in sočasnih bolezni, poročali pa so o smrtnosti do 15 %, pri čemer so mlajši otroci najbolj ogroženi (44). Na splošno bolezen poteka v treh stopnjah: stopnja inkubacije, prodromalna stopnja in obdobje izpuščaja. Inkubacijska doba običajno traja 7–14 dni, lahko pa tudi dlje (5–21 dni), simptomi in znaki pa trajajo od dva do pet tednov. V prodromalni stopnji nastopi vročina, bolečine v mišicah, glavobol, bolečine v hrbtu, vneto grlo in otekle bezgavke, ki jim sledi širok, a dobro omejen izpuščaj. Ti izpuščaji gredo nato skozi pet stopenj: makula, umblicirana papula, vezikula, psevdopustula in po 7–14 dneh krusta (39). Večinoma gre za samozajezitveno bolezen, ki izzveni v dveh do štirih tednih.

Mikrobiološka diagnostika

Poleg epidemiološkega poizvedovanja in klinične slike je mikrobiološka diagnostika osrednja pri potrditvi diagnoze. Akutno okužbo z MPXV potrdimo z molekularnimi metodami, kot je metoda verižne reakcije s polimerazo (angl. *polymerase chain reaction*, PCR) v realnem času, saj je hitra, visoko specifična in občutljiva (45). Najprimernejši klinični vzorci za mikrobiološko diagnostiko so bris, aspirat ali biopsija kožnih sprememb ter skarifikat kraste. Vzorci krvi niso primerni za zanesljivo potrditev akutne okužbe zaradi kratke viremije v prodromalni stopnji pred pojavom kliničnih znakov (46). Nadaljnje sekvenciranje celotnih genomov MPXV omogoča spremljanje genetske raznolikosti in razširjanja virusa ter določanje značilnih mutacij,

ki lahko vplivajo na občutljivost molekularnih testov (47). Specifičen protitelesni odziv se pojavi praktično takoj, ko se razvije izpuščaj. Najprej se pojavijo protitelesa IgM, ki naraščajo približno dva tedna, nato se začnejo zmanjševati in izginejo v enem letu, medtem ko se protitelesa IgG prav tako pojavijo hitro po nastanku izpuščaja in naraščajo približno šest tednov po začetku bolezni, nato pa lahko vztrajajo še desetletja (45). Ugotavljanje značilnih protiteles je zaradi serološke navzkrižnosti med poksvirusi primernejša za epidemiološke raziskave in spremljanje odziva po cepljenju (48). Klasične mikrobiološke tehnike, kot sta osamitev virusa iz kužnine na celičnih kulturah in elektronska mikroskopija, omogočajo popolno opredelitev virusa, vendar jih lahko opravljajo le laboratoriji z visoko stopnjo varnosti (49).

Zdravljenje, preprečevanje in priporočila

Večinoma je zdravljenje bolezni MPOX simptomatsko, pri težjih primerih ali bolnikih s tveganjem za razvoj težje bolezni (imunsko oslabljeni bolniki, otroci, nosečnice ali doječe matere) pa lahko uporabijo protivirusna zdravila, kot so tekovirimat, brincidofovir in cidofovir ali zdravljenje z intravenskimi imunskimi globulini vakcinije (angl. *vaccinia immune globulin intravenous*, VIGIV) (45). Najpomembnejša preventiva pred širjenjem bolezni je dosledno upoštevanje higienskih ukrepov, izogibanje tesnim stikom s kužnimi osebami ali osamitev oseb na domu, dokler se njihove kožne lezije ne zacelijo. Dodatno lahko širjenje bolezni preprečujemo tudi s cepljenjem, in sicer imamo na voljo cepivi z živim oslabljenim virusom vakcinije Ankara, ki se ne pomnožuje v človeški celici (Imvanex®, Jynneos®). Cepivo lahko uporabimo kot zaščito pred izpostavitvijo (en odmerek) ali po izpostavitvi (dva odmerka v razmiku 28 dni) pri osebah, starejših od 18 let (50).

OKUŽBA Z VIRUSI HEMORAGIČNIH MRZLIC

Virusne hemoragične mrzlice (VHM) so skupina zoonotskih virusov, ki predstavljajo pomembno grožnjo svetovnemu javnemu zdravju zaradi visoke nalezljivosti in smrtnosti. To so virusi z RNA-genomom iz virusnih družin *Arenaviridae* (virus Junin, virus Machupo, virus Chapare, virus Sabia, virus Guanarito, virus Lassa, virus Lujo), *Nairoviridae* (virus krimsko-kongoške hemoragične mrzlice), *Hantaviridae* (virus Andes, virus Sin Nombre, virus Choclo, virus Puumala, virus Dobrava, virus Hantaan), *Phenuiviridae* (virus doline Rift) in *Filoviridae* (virus ebola, virus Marburg). V naravi se virusi ohranjajo v živalskem rezervoarju in se lahko z vektorjem (npr. klopm) ali neposredno (izločki glodavcev, poginuli primati, netopirji ...) prenesejo na človeka. Virusi se izjemno hitro in učinkovito širijo s kužnimi aerosoli obolelih oseb in z neposrednim stikom s krvjo ter drugimi telesnimi tekočinami bolnikov. Zaradi izjemnega tveganja in nevarnosti jih v večini uvrščamo v najvišjo, četrto skupino nevarnih bioloških dejavnikov, za katere so potrebni posebni zaščitni ukrepi tako pri rokovanju z bolniki kot tudi z njihovimi biološkimi vzorci (51).

Prenos

VHM so razširjene po vsem svetu, vendar so tesno povezane z naravnim rezervoarjem in se po navadi pojavljajo v manjših ali večjih izbruhih. Večinoma se prenašajo s stikom ali vdihavanjem okuženih materialov iz živalskih rezervoarjev ali s prenašalci (npr. klopi); vendar je za večino VHM možno širjenje s človeka na človeka prek stika z okuženo krvjo in drugimi telesnimi tekočinami (52).

Klinična slika

Inkubacijska doba VHM je relativno dolga in traja 2–35 dni (v povprečju 21 dni), klinični potek bolezni pa je hiter in buren.

Kljub podobni klinični sliki VHM se celični tropizem, tarčni organski sistem in molekularni mehanizmi patogeneze med posameznimi virusi razlikujejo, vseeno pa je vsem skupno, da okužijo antigen predstavljene celice in preprečijo njihovo zorenje, s čimer zavrejo protivirusni imunski odziv (51). Klinična stopnja bolezni se začne s splošnimi znaki, kot so povišana telesna temperatura, mrzlica, glavobol, bolečine v mišicah, slabost, bruhanje. Ob koncu prvega tedna bolezni se lahko pojavi makulopapulozen izpuščaj, krvavitve po koži in sluznicah (predvsem v prebavilih in sečilih ter spolovilih predelu) ter notranjih organih. Med laboratorijskimi kazalci so značilni trombocitopenija, levkopenija, povišani jetrni encimi, povišana vrednost uree in kreatinina, proteinurija in motnje v strjevanju krvi. Ob nastopu kliničnih znakov so bolniki že visoko kužni, zato je pri obravnavi nujno potrebna osebna varovalna oprema. Tej stopnji sledi povečano virusno razmnoževanje, dejavno zaviranje imunskega odziva gostitelja in čezmerno sproščanje vnetnih citokinov, kar povzroči obsežno aktivacijo endotelija, povečano žilno prepustnost s posledičnim znižanjem tlaka, s tem pa večorgansko odpoved in smrt (51, 52).

Mikrobiološka diagnostika

Mikrobiološka diagnostika okužbe z VHM temelji na neposrednem dokazu virusa v krvi ali izločkih bolnika. Za potrditev akutne okužbe najpogosteje uporabljamo metodo RT-PCR v realnem času, kjer dokazujemo virusno RNA. Kvantitativna različica metode RT-PCR v realnem času omogoča določanje virusnega bremena v krvi in služi kot napovedni dejavnik za težji potek bolezni, saj ima 90 % smrtnih primerov virusno breme večje od 10^8 kopij/ml (53, 54). Pri bolnikih z blažjim potekom bolezni je možno tudi dokazovanje značilnih protiteles razreda IgG in IgM, najpogosteje z encimsko imunsko metodo (angl. *enzyme linked immu-*

no assay, ELISA) in z metodo posredne imunofluorescence (angl. *immunofluorescent assay*, IFA). Posredno potrdimo okužbo z dokazom značilnih protiteles razreda IgM ali s serokonverzijo oz. porastom ravni značilnih protiteles razreda IgG v parnih serumih. Pomembno je poudariti, da so pogostokrat v začetni fazi bolezni in pri bolnikih s težjim potekom bolezni, značilna protitelesa odsotna, zato je nujno sočasno dokazovanje značilnih protiteles in virusnega genoma (51). Zaradi visoke kužnosti bioloških materialov bolnikov z VHM lahko mikrobiološko diagnostiko izvajajo samo posebej usposobljeni mikrobiološki laboratoriji, ki imajo dostop visokovarnostnih laboratorijev, kot sta laboratorij tretje ali četrte stopnje biološke varnosti. Klinične vzorce bolnikov, ki jih preiskujejo v biokemičnih in mikrobioloških laboratorijih, je treba za prenos v laboratorije primerno shraniti v posebej za to pripravljenih transportnih posodah, ki jih dodatno označimo z nalepko biohazard (biološko nevarna kužnina).

Zdravljenje, preprečevanje in priporočila

Pri zdravljenju VHM je treba upoštevati dva glavna pristopa:

- možnost specifičnega protivirusnega zdravljenja (monoklonska protitelesa, konvalescentna plazma) in
- obsežno podporno zdravljenje za preprečevanje večorganske odpovedi,

saj oba pristopa ključno vplivata na ugodnejši izid bolezni (55). Za večino VHM nimamo na voljo ustreznih cepiv (razen cepiv za virusno bolezen ebolo: ERVEBO® (angl. *Zaire Ebola vaccine*), Zabdeno in Mvabea), vendar pa so v zadnjem času razvili več kandidatnih cepiv, ki so v različnih stopnjah kliničnega preizkušanja in kažejo obetavne rezultate za prihodnost (51). Med preventivnimi ukrepi je najpomembnejša stroga osamitev bolnikov, saj so njihova kri, telesne

tekočine in izločki največji vir okužbe. Izjemno pomembna je zaščita medicinskega osebja, ki prihaja v stik z morebitno okuženim materialom in bolniki. Osebje mora imeti primerno opremo in zaščito ter se mora ravnati po strogih pravilih osamitvenih ukrepov. Osebna zaščita vključuje obvezno nošenje zaščitnega plašča, rokavic, ščitnikov obutve, maske, zaščitnih očal in po potrebi tudi obraznih respiratorjev s filtri HEPA (angl. *high efficiency particulate air*).

ZAKLJUČEK

Velik delež popotnikov se s potovanja vrne z vročino ali drugimi kliničnimi znaki, ki zahtevajo obravnavo v zdravstvenem siste-

mu. Temeljita anamneza s posebnim poudarkom na opisu poti in dejavnosti ter skupaj z dobrim poznavanjem zemljepisne razširjenosti in inkubacijske dobe tropskih bolezni omogoča postavitev delovne diferencialne diagnoze, ki jo potem potrdimo z ustreznimi laboratorijskimi in diagnostičnimi preiskavami (56). Izkušen mikrobiološki laboratorij s širokim naborom diagnostičnih preiskav, ki obsegajo tako neposredne kot posredne mikrobiološke tehnike, je v takšnih primerih ključnega pomena za hitro postavitev diagnoze in ima pomembno vlogo, predvsem kadar obstajajo možnosti za nadaljnje preprečevanje širjenja bolezni.

LITERATURA

1. UNWTO: Statistics of Tourism [internet]. Madrid: United Nations World Tourism Organization; c2023 [citirano 2023 Mar 27]. Dosegljivo na: www.unwto.org/statistics
2. Angelo KM, Kozarsky PE, Ryan ET, et al. What proportion of international travellers acquire a travel-related illness? A review of the literature. *J Travel Med.* 2017; 24 (5): 10.1093/tax046.
3. Fink D, Wani RS, Johnston V. Fever in the returning traveller. *BMJ.* 2018; 360: j5773.
4. Grobusch MP, Weld L, Goorhuis A, et al. Travel-related infections presenting in Europe: A 20-year analysis of EuroTravNet surveillance data. *Lancet Reg Health Eur.* 2020; 1: 100001.
5. WHO: Disease outbreak news [internet]. Geneva: World Health Organization; 2023 [citirano 2023 Mar 27]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news>
6. McEntire CRS, Song KW, McInnis RP, et al. Neurologic manifestations of the World Health Organization's list of pandemic and epidemic diseases. *Front Neurol.* 2021; 12: 634827.
7. Barzon L. Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol.* 2018; 107: 38–47.
8. Avšič Županc T, Saksida A. Flavivirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski Razgledi; 2011. p. 151–67.
9. Muller DA, Depelzena AC, Young PR. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis.* 2017; 215 (Supl 2): S89–95.
10. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: Knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17 (3): e88–100.
11. Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: A laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (6): 2047–52.
12. World Health Organization (September 2018). Dengue vaccine: WHO position paper – September 2018«. *Weekly Epidemiological Record.* 2018; 93 (36): 457–76.
13. Biswal S, Borja-Tabora C, Martinez Vargas L, et al. Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4–16 years: A randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2020; 395 (10234): 1423–33.
14. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, et al. Chikungunya virus: An update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17 (4): e107–17.
15. Fajs L, Avšič Županc T. Togavirusi. In: Poljak M, Petrovec M, eds. *Medicinska virologija*. Ljubljana: Medicinski razgledi; 2011. p. 183–92.
16. Natrajan MS, Rojas A, Waggoner JJ. Beyond fever and pain: Diagnostic methods for Chikungunya virus. *J Clin Microbiol.* 2019; 57 (6): e00350–19.
17. Jacobsen S, Patel P, Schmidt-Chanasit J, et al. External quality assessment studies for laboratory performance of molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *J Clin Virol.* 2016; 76: 55–65.
18. WHO: Zika virus [internet]. Geneva: World Health Organization; 2022 [citirano 2023 Mar 27]. Dosegljivo na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Zika-virus>
19. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, et al. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res.* 2016; 130: 69–80.
20. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, et al. Zika virus. *N Engl J Med.* 2016; 374 (16): 1552–63.
21. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, et al. Zika virus and birth defects: Reviewing the evidence for causality. *N Engl J Med.* 2016; 374 (20): 1981–7.
22. Broutet N, Krauer F, Riesen M, et al. Zika virus as a cause of neurologic disorders. *N Engl J Med.* 2016; 374 (16): 1506–9.
23. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, et al. Sexually acquired Zika virus: A systematic review. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23 (5): 296–305.
24. Pomar L, Musso D, Malinger G, et al. Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome. *Prenat Diagn.* 2019; 39 (6): 420–30.
25. Baud D, Gubler DJ, Schaub B, et al. An update on Zika virus infection. 2017; 390 (10107): 2099–109.
26. Medin CL, Rothman AL. Zika virus: The agent and its biology, with relevance to pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 2017; 141(1): 33–42.
27. Avšič Županc T. Virus Zika. *Med Razgl.* 2017; 56 (S2): 205–9.
28. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: A reemerging threat. *Clin Lab Med.* 2010; 30: 237–260.

29. Amraoui F., Pain A., Piorkowski G., et al. Experimental adaptation of the yellow fever virus to the mosquito *Aedes albopictus* and potential risk of urban epidemics in Brazil, South America. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 14337.
30. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. Yellow fever virus: Diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol.* 2018; 56 (10): e00827-18.
31. Johansson MA, Arana-Vizcarrondo N, Biggerstaff BJ, et al. Incubation periods of yellow fever virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83: 183-8.
32. Johansson MA, Vasconcelos PF, Staples JE. The whole iceberg: Estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014; 108: 482-7.
33. Monath TP, Vasconcelos PF.. Yellow fever. *J Clin Virol.* 2015; 64:160-73.
34. Domingo C, Escadafal C, Rumer L., et al. First international external quality assessment study on molecular and serological methods for yellow fever diagnosis. *PLoS One.* 2012; 7: e36291.
35. Allwinn R, Doerr HW, Emmerich P, et al. Cross-reactivity in flavivirus serology: New implications of an old finding? *Med Microbiol Immunol.* 2002; 190: 199-202.
36. Gibney KB, Edupuganti S, Panella AJ, et al. Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 1112-5.
37. Bae HG, Nitsche A, Teichmann A, et al. Detection of yellow fever virus: A comparison of quantitative real-time PCR and plaque assay. *J Virol Methods.* 2003; 110: 185-91.
38. Edupuganti S, Eidex RB, Keyserling H, et al. A randomized, double-blind, controlled trial of the 17D yellow fever virus vaccine given in combination with immune globulin or placebo: Comparative viremia and immunogenicity. *Am J Trop Med Hyg.* 2013; 88: 172-7.
39. Dou YM, Yuan H, Tian HW. Monkeypox virus: Past and present. *World J Pediatr.* 2023; 19 (3): 224-30.
40. Durski KN, Mccollum AM, Nakazawa Y, et al. Emergence of monkeypox—West and Central Africa, 1970-2017. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2018; 67: 306-10.
41. Reynolds MG, Doty JB, Mccollum AM, et al. Monkeypox re-emergence in Africa: A call to expand the concept and practice of one health. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019; 17: 129-39.
42. CDC: 2022 Mpox Outbreak Global Map [internet]. Centers for Disease Control and Prevention; 2022 [citirano 2023 Mar 27]. Dosegljivo na: <https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/response/2022/world-map.html>
43. Walter K, Malani PN. What Is Monkeypox? *JAMA.* 2022; 328 (2): 222.
44. Di Giulio DB, Eckburg PB. Human monkeypox: An emerging zoonosis. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4: 15-25.
45. Huang Y, Mu L, Wang W. Monkeypox: Epidemiology, pathogenesis, treatment and prevention. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7 (1): 373.
46. Palich R, Burrell S, Monsel G, et al. Viral loads in clinical samples of men with monkeypox virus infection: A French case series. *Lancet Infect Dis.* 2023; 23 (1): 74-80.
47. Happi C, Adetifa I, Mbala P, et al. Urgent need for a non-discriminatory and non-stigmatizing nomenclature for monkeypox virus. *PLOS Biol.* 2022; 20 (8): e3001769.
48. Karem KL, Reynolds M, Braden Z, et al. Characterization of acute-phase humoral immunity to monkeypox: Use of immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay for detection of monkeypox infection during the 2003 North American outbreak. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005; 12 (7): 867-72.
49. Nakhaie M, Arefinia N, Charostad J, et al. Monkeypox virus diagnosis and laboratory testing. *Rev Med Virol.* 2023; 33(1): e2404.
50. Mitjà O, Ogoina D, Titanji BK, et al. Monkeypox. *Lancet.* 2022; 401 (10370): 60-74.
51. Flórez-Álvarez L, de Souza EE, Botosso VF, et al. Hemorrhagic fever viruses: Pathogenesis, therapeutics, and emerging and re-emerging potential. *Front Microbiol.* 2022; 13: 1040093.
52. Marty A. M., Jahrling P. B., Geisbert T. W. Viral hemorrhagic fevers. *Clin. Lab. Med.* 2006; 26 (2): 345-86.
53. Racsa L. D., Kraft C. S., Olinger G. G., et al. Viral hemorrhagic fever diagnostics. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62, 214-19.
54. Das S., Rundell M. S., Mirza A. H., et al. A multiplex PCR/LDR assay for the simultaneous identification of category A infectious pathogens: Agents of viral hemorrhagic fever and Variola Virus. *PLoS One.* 2015; 10: e0138484.
55. Ippolito G., Feldmann H., Lanini S., et al. Viral hemorrhagic fevers: Advancing the level of treatment. *BMC Med.* 2012; 10: 31.
56. D'Acremont V, Ambresin AE, Burnand B, et al. Practice guidelines for evaluation of fever in returning travelers and migrants. *J Travel Med.* 2003; 10 (S2): S25-S52.