

# Serološko testiranje hepatitis E virusne infekcije u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu

---

Franić, Krešimir

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:326730>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Krešimir Franić**

**Serološko testiranje hepatitis E virusne  
infekcije u Hrvatskom zavodu za  
transfuzijsku medicinu**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

*Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Dijagnostika i terapija virusnih infekcija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, i to u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti uz mentorstvo izv. prof. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete te komentorstvo dr. sc. Manuele Miletić.*

*Zahvaljujem se komentorici dr. sc. Manuli Miletić te mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti na pomoći i stručnom vodstvu, a pogotovo na strpljenju i razumijevanju. Posebno hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci i bezgraničnom povjerenju.*

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Otkriće virusa hepatitisa E.....	1
1.2. Strukturne karakteristike.....	1
1.3. Klasifikacija.....	2
1.3.1. Orthohepevirusi.....	2
1.4. Epidemiologija.....	3
1.4.1. HEV u zemljama u razvoju.....	3
1.4.2. HEV u razvijenim zemljama.....	3
1.5. Klinička slika.....	4
1.5.1. Rizične skupine.....	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	6
3. MATERIJALI I METODE.....	7
3.1. Materijali.....	7
3.1.1. Uzorci.....	7
3.1.2. Analizator.....	7
3.1.3. Kemikalije, pribor i testovi.....	8
3.2. Metode.....	10
3.2.1. Serološki testovi.....	10
3.2.3. Statistički test.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
4.1. Rezultati.....	17
4.1.1. Serološko testiranje.....	17
4.2. Rasprava.....	19
4.2.1. HZTM.....	19
4.2.2. Značenje rezultata.....	20
4.2.3. Testiranje krvi dobrovoljnih davatelja.....	24

4.2.4. Nestandardiziranost testova.....	24
5. ZAKLJUČCI.....	26
6. POPIS KRATICA .....	27
7. LITERATURA.....	29
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	32
8.1. Sažetak .....	32
8.2. Summary.....	33
9. PRILOZI .....	34
9.1. Tablica s podacima.....	34
9.2. Detaljan statistički izračun.....	46
9.2.1. Statističko ispitivanje HEV IgM seroprevalencije.....	46
9.2.2. Statističko ispitivanje HEV IgG seroprevalencije .....	48

## 1. UVOD

Virusni hepatitis skupina su zaraznih bolesti koje zahvaćaju jetreno tkivo, a uzrokuju ih virusi hepatitisa A, B, C, D i E koji mogu prouzročiti akutnu ili kroničnu bolest. Virusni hepatitis razlikuju se prema načinu prijenosa, načinu na koji oštećuju jetru i učinku na stanje organizma. Godišnje umre oko 1,4 milijuna ljudi od virusnog hepatitisa diljem svijeta (<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/#Hepatitis>).

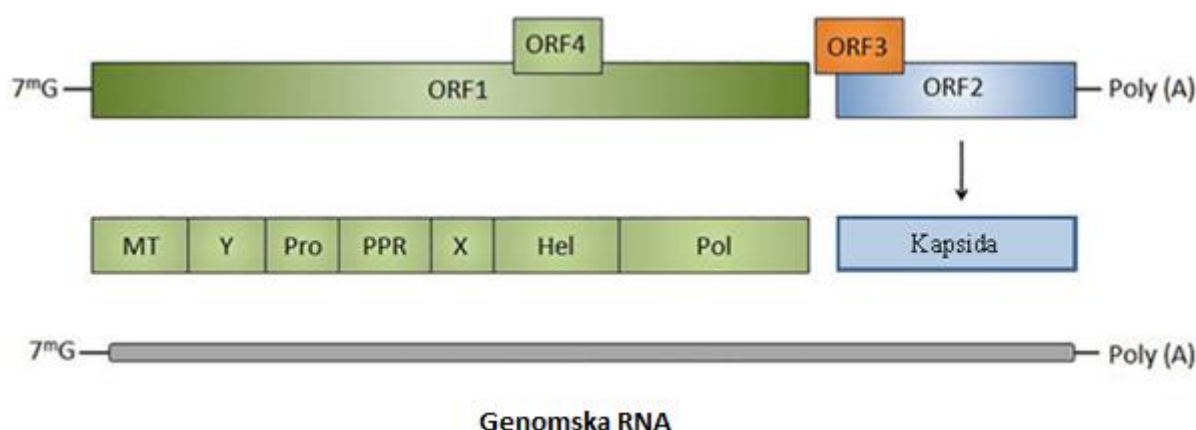
Smrtni slučajevi su pretežno povezani s cirozom i hepatocelularnim karcinomom (engl. *Hepatocellular Carcinoma*, HCC) koji su posljedica kronične infekcije virusom hepatitisa B (HBV; 887 000 smrtnih slučajeva) i virusom hepatitisa C (HCV; 399 000 smrtnih slučajeva). S druge strane, usred akutnih komplikacija virusima hepatitisa A (HAV; 11 000 smrtnih slučajeva) i hepatitisa E (HEV; 44 000 smrtnih slučajeva) brojke smrtnih slučajeva znatno su niže (Rasche i sur., 2019).

### 1.1. Otkriće virusa hepatitisa E

Postojanje epidemije non-A, non-B hepatitisa koji nije povezan s transfuzijom krvi, prvi put prepoznata je u Indiji kasnih 1970-ih. Nakon toga, sovjetski znanstvenik koji je istraživao izbijanje neobjašnjivog non-A, non-B hepatitisa među vojnicima u Afganistanu progutao je skupni uzorak stolice pogođenih vojnika. Razvio je akutni hepatitis, a u fecesu je identificiran elektronskom mikroskopijom novi virus. Gotovo desetljeće kasnije, virusni genom novoimenovanog hepatitisa E virusa uspješno je sekvenciran (Webb i Dalton, 2019).

### 1.2. Strukturne karakteristike

HEV je neovijeni virus promjera 27 - 34 nm s pozitivno usmjerenom jednolančanom RNA. Genom HEV-a određen je 1991. godine i sastoji se od dva kratka nekodirajuća područja koja okružuju tri otvorena okvira čitanja (engl. *Open Reading Frame*, ORF-1–3;), slika 1. ORF-1 kodira nestrukturane proteine potrebne za replikaciju i obradu proteina (RNA-helikaza, metiltransferaza, RNA-polimeraza ovisna o RNA, cistein proteaza), a sadržava i hipervarijabilnu regiju bez znatnije uloge u infektivnosti virusa. ORF-2 kodira kapsidne proteine i važno je područje u izradi cjepiva. ORF-3 kodira protein od 114 aminokiselina koji ima funkcije u reguliranju staničnog okoliša (Đaković Rode i sur., 2016).



**Slika 1.** Prikaz HEV genoma. Genomska organizacija HEV-a klasično je podijeljena u tri ORF-a (ORF-1, ORF-2 i ORF-3,) dok neki genotipovi imaju i dodatni ORF-4. 5' nekodirajuća regija je zatvorena sa 7-metilgvanozinom (7mG), a 3' nekodirajuća regija je poliadenilirana [Poly(A)]. ORF-1 kodira za nestrukturane proteine uključujući metiltransferazu (MT), regije nepoznate funkcije (Y, PPR i X), cisteinsku proteazu (Pro), helikazu (Hel) i RNA polimerazu ovisnu o RNA (Pol). ORF-2 kodira kapsidni protein, a ORF-3 je multifunkcionalni protein koji pomaže u oslobađanju viriona iz zaražene stanice, preuzeto s <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.577339/full>

### 1.3. Klasifikacija

HEV se svrstava u porodicu Hepeviridae i rodove *Orthohepevirus* i *Piscihepevirus*. Rod *Piscihepevirus* sastoji se od usamljene vrste virusa pastrve označene kao *Piscihepevirus A*. Rod *Orthohepevirus* dalje je podijeljen u četiri vrste označene slovima od A do D. *Orthohepevirus A* i štakorski *Orthohepevirus C* odgovorni su za ljudske bolesti (Pankovics i sur., 2020).

#### 1.3.1. Orthohepevirusi

U rod *Orthohepevirus A* svrstano je 8 genotipova, a 5 genotipova mogu uzrokovati infekciju čovjeka. HEV genotip 1 (HEV-1) i HEV genotip 2 (HEV-2) pogađaju samo ljude. HEV genotipovi 3 i 4 (HEV-3 i HEV-4) primarno inficiraju svinje, veprove i jelene, a HEV genotip 7 (HEV-7) izoliran je iz deva. Ptičji izolati jedini su genotip *Orthohepevirusa B*. *Orthohepevirus C* uključuje izolate štakora i ostalih glodavaca, a *Orthohepevirus D* vezan je za šišmiše (Khuroo i sur., 2016).

## **1.4. Epidemiologija**

Hepatitis E globalno je rasprostranjen virus, a poznata su dva epidemiološka obrasca distribucije. Tako se HEV može pojaviti endemski i tada su u podlozi HEV-1 (u većoj mjeri) i HEV-2 (rjeđe) genotipovi. S druge strane, ako se infekcije pojavljuju sporadično, uzročnici su genotipovi HEV-3 (češće) i HEV-4 (rjeđe) (Raji i sur., 2022).

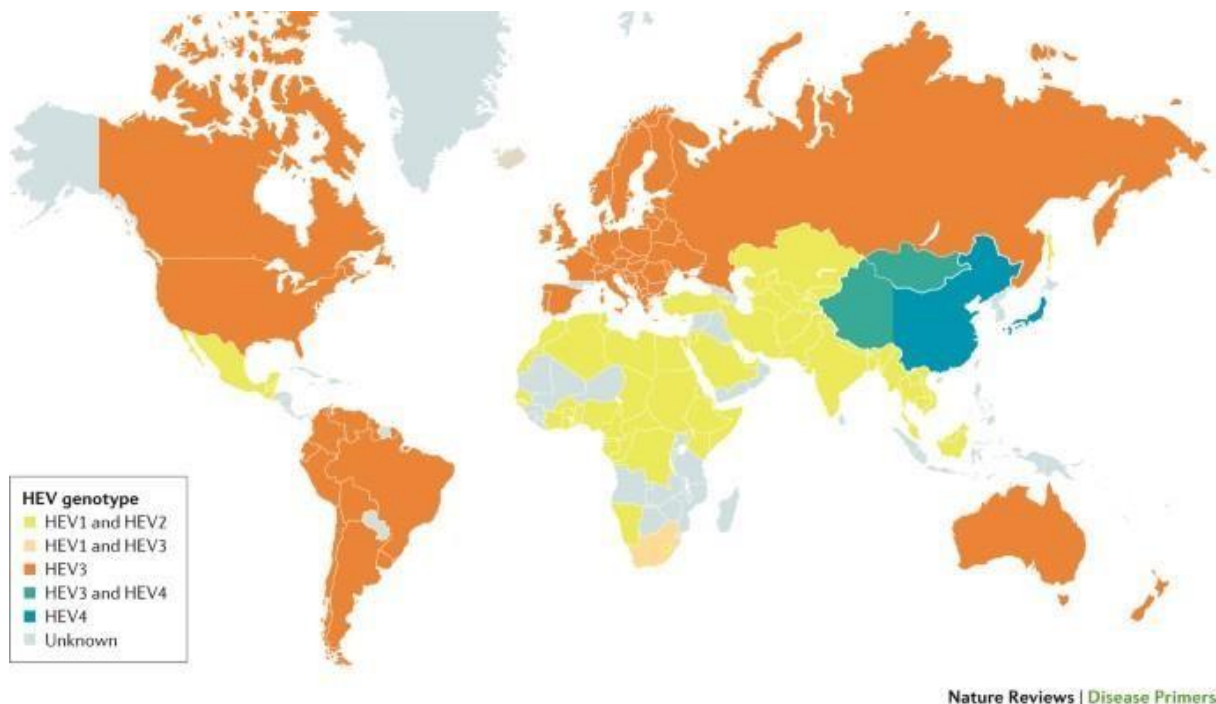
### **1.4.1. HEV u zemljama u razvoju**

HEV-1 dominira u južnoj i središnjoj Aziji, na Dalekom istoku, u sjevernoj Africi i na Karibima, a HEV-2 je predominantan u Meksiku i zapadnoj Africi (slika 2). Dakle, to su zemlje kod kojih se hepatitis E pojavljuje endemski. Prenosi se fekalno-oralnim putem, onečišćenom vodom i kontaminiranom hranom (Đaković Rode i sur., 2016). Zemlje u razvoju karakterizira nedavno poboljšanje u socioekonomskom statusu i bolji pristup sanitarnim uvjetima i opskrbi vodom. HEV infekcija u zemljama u razvoju uzročnik je četvrtine slučajeva akutnog hepatitisa. S druge strane, kod zemalja kod kojih je socioekonomski razvoj izrazito spor, HEV infekcija se pojavljuje u većem obimu (hiperendemski) i uzročnik je više od polovice slučajeva akutnog hepatitisa (Khuroo i sur., 2016).

### **1.4.2. HEV u razvijenim zemljama**

Dugo su slučajevi infekcije u razvijenim zemljama bili isključivo povezivani s putovanjima u područja gdje prevladavaju infekcije genotipovima 1 i 2. Naknadno je primijećeno da su dominantni genotipovi u ovim zemljama različiti (Colson i sur., 2010). HEV-3 rasprostire se diljem Europe, Amerike, Kine i Japana, a HEV-4 dominira u Kini, Indiji i Indoneziji. Ti genotipovi prisutni su u različitim životinjskim vrstama (najčešće domaće i divlje svinje te jeleni i školjkaši) kod kojih ne uzrokuju klinički manifestne bolesti (Đaković Rode i sur., 2016). Da je riječ o zoonozama, potvrđeno je aminokiselinskom sličnošću sljedova ljudskih HEV izolata sa životinjskim izolatima HEV-a. Virus se prenosi sa životinje na čovjeka putem probavnog sustava. Izvor infekcije predstavlja hrana (zaraženo meso i mesne prerađevine) koja se konzumira bez da je adekvatno termički obrađena (Raji i sur.; 2022). Osim hrane, izravn kontakt sa životinjama povećava rizik od zaraze. Brojne studije pokazale su veću seroprevalenciju kod farmera, šumara, lovaca i ljudi koji rade u klaonicama (Denner, 2019).





**Slika 2.** Epidemiološka karta svijeta s obzirom na HEV genotip, preuzeto s <https://www.nature.com/articles/nrdp201786>

## 1.5. Klinička slika

Infekcije su u većini slučajeva blagog kliničkog tijeka i prolaze spontano. Asimptomatske infekcije i do deset puta su češće od simptomatskih koje najčešće pogađaju osobe u dobi od 15 do 40 godina. U simptomatskih pacijenata, inkubacija prosječno traje 40 dana (2 do 8 tjedana). Početni su simptomi obično nespecifični - malaksalost, gubitak apetita, vrućica, mučnina i povraćanje. Tjedan-dva nakon pojave općih simptoma može se razviti žutica uz taman urin i blijedu stolicu (<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/#Hepatitis>).

### 1.5.1. Rizične skupine

Iako većina akutnih HEV infekcija ne zahtijeva nekakvu posebnu terapiju kod imunokompetentnih pacijenata, dosljedno se pokazuje da je HEV-1 infekcija povezana s visokom letalnom stopom (20 %) kod trudnica u trećem tromjesečju trudnoće. Akutna HEV infekcija popraćena eklampsijom ili hemoragijskim komplikacijama stanje je koje može dovesti do zatajenja jetre i smrtnog ishoda. Općenito, HEV-1 i HEV-2 uzrokuju ozbiljniju

prezentaciju akutnog hepatitisa od HEV-3 i HEV-4 koji rjeđe dovodi do teške akutne HEV infekcije i to kod starijih muškaraca i pacijenata s kroničnim bolestima jetre (Aslan i Balaban, 2020). Opasnost genotipova HEV-3 i HEV-4 oslanja se na pacijente koji su na imunosupresivnoj terapiji. Najbolji primjer su primatelji transplantiranih organa koji mogu razviti kroničnu HEV infekciju koja može dovesti do po život opasne ciroze (Horvatits i sur., 2019).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Za virus hepatitisa E karakteristično je da ga većina ljudi preboli asimptomatski i to je razlog zašto je zapostavljen unutar skupine virusa koji uzrokuju hepatitis. Zbog svojih specifičnih rizičnih skupina gdje ima letalan potencijal, ipak biva prepoznat kao prijetnja te je stavljen u znanstveni fokus. Budući da se serološko testiranje uzoraka krvi pacijenata na hepatitis E virus nije provodilo kao rutinsko testiranje u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, cilj ovog rada je prikazati rezultate serološkog testiranja pacijenata na hepatitis E od uvođenja testiranja, 2.9.2019. godine pa do 31.12.2020. godine, procijeniti seroprevalenciju, usporediti rezultate s rezultatima testiranja dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) i ispitati postoji li statistički značajna razlika u seroprevalenciji između dviju populacije (pacijenti i DDK). Izuzetno je važno istaknuti u znanstvenoj zajednici, među kliničarima i laboratorijskim stručnjacima kolika je važnost testiranja na hepatitis E.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Uzorci**

Tijekom 2019. i 2020. godine, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti (OKB), prikupio je 506 uzoraka seruma koje je serološki testirao na prisutnost HEV antitijela. Prvi serumi su ispitivani 2. rujna, 2019. godine, kada je i uvedeno testiranje pacijenata na HEV, a zadnji 31. prosinca, 2020. godine. Riječ je o uzorcima pacijenata čija je uputna dijagnoza većinski vezana uz jetrene bolesti. Osim toga, dijagnoze su uključivale različite gastrointestinalne patologije te tumorska oboljenja. Značajan broj uzoraka pristigao je iz transplantacijske ambulante Kliničke bolnice Merkur radi praćenja moguće infekcije prije transplantacije. Uzorci seruma pripremljeni su za ispitivanje prema standardnim operativnim postupcima, a ispitivanje je obavljeno prema uputama proizvođača.

##### **3.1.2. Analizator**

Za analizu uzoraka korišten je analizator Gemini tvrtke Stratec koji se temelji na ELISA metodi (engl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*), slika 3. Riječ je o potpuno automatiziranom uređaju koji provodi sve radnje od ulaska epruvete u analizator pa sve do prikaza dobivenih vrijednosti. Naime, za identifikaciju uzoraka analizator koristi optički čitač koji očitava crtični kod (barkod) sadržan na epruveti, a za identifikaciju reagensa nužno je postaviti reagens na označenu poziciju unutar kućišta za reagense. Kada je reagens pri kraju ili kada ga nedostaje, analizator izdaje upozorenje jer sadrži senzore koji registriraju volumen reagensa. Što se analitičkog dijela tiče, analizator izvodi radnje pipetiranja uzoraka i reagensa te njihovu inkubaciju. Dalje se nadovezuju također automatizirane radnje ispiranja i naposljetku očitavanja vrijednosti apsorbancije pri određenoj valnoj duljini. Prikaz vrijednosti apsorbancija uzoraka vidljiv je na računalnom zaslonu integriranom uz sami analizator.



*Slika 3. Gemini analizator tvrtke Stratec. Instrumenti sadržani u analizatoru su: mikropipete, ELISA inkubator, ELISA sustav za ispiranje (engl. ELISA washer), ELISA sustav za očitavanje (engl. ELISA reader) i računalni zaslon, preuzeto s <https://www.medicalexpo.com/prod/diatron/product-68218-803353.html>*

### **3.1.3. Kemikalije, pribor i testovi**

U ovom istraživanju korišteni su komercijalni testovi HEV IgM Dia.Pro Srl (Milano, Italy), osjetljivost testa je 95 %, a specifičnost 100 %, i HEV IgG Dia.Pro Srl (Milano, Italy), osjetljivost testa je 100 %, a specifičnost 100 %.

Sadržaj test-kompleta HEV IgM Dia.Pro testa:

- mikrotitarska ploča;
- negativna i pozitivna kontrolna otopina;
- diluent za uzorke: citratni pufer s dodanim detergentom (0,5 % Tween 20) i konzervansima (0,09 % natrijev-azid i 0,045 % ProClin 300);
- pufer za ispiranje: fosfatni pufer s dodanim detergentom (0,5 % Tween 20) i konzervansom (0,045 % ProClin 300);
- konjugat: smjesa kozjih poliklonskih anti-ljudskih IgM antitijela konjugiranih s peroksidazom iz hrena (HEV IgM Dia.Pro);

- kromogen/supstrat: 0,03 % tetrametilbenzedin (TMB) i 0,02 % vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puferirani s citratno fosfatnim puferom;
- stop otopina: 0,3 M sulfatna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);
- neutralizacijski reagens za reumatoidni faktor.

Sadržaj test-kompleta HEV IgG Dia.Pro testa:

- mikrotitarska ploča;
- negativna i pozitivna kontrolna otopina;
- kalibrator;
- diluent za uzorke: citratni pufer s dodanim detergentom (0,5 % Tween 20) i konzervansima (0,09 % natrijev-azid i 0,045 % ProClin 300);
- test diluent: tris pufer s dodanim konzervansom (0,045 % ProClin 300);
- pufer za ispiranje: fosfatni pufer s dodanim detergentom (0,5 % Tween 20) i konzervansom (0,045 % ProClin 300);
- konjugat: smjesa kozjih poliklonskih anti-ljudski IgM antitijela konjugiranih s peroksidazom iz hrena (HEV IgG Dia.Pro);
- kromogen/supstrat: 0,03 % tetrametilbenzedin (TMB) i 0,02 % vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) puferirani s citratno fosfatnim puferom;
- stop otopina: 0,3 M sulfatna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### **3.1.3.1. Mikrotitarska ploča**

Mikrotitarska ploča sadrži 96 jažica na koje je vezan rekombinantni antigen. Prema uputama proizvođača za HEV IgM test, jažica A1 rezervirana je za slijepu probu (SP). Slijede jažice za negativne kontrole (NK), pozitivnu kontrolu (PK) i naposljetku jažice za uzorke (U). Nešto drugačiji raspored je kod HEV IgG testa zato što se koristi i kalibrator (KAL). U tablici 1 prikazana je shema mikrotitarske ploče HEV IgM testa, a u tablici 2 shema mikrotitarske ploče HEV IgG testa.

*Tablica 1. Shema mikrotitarske ploče prilikom analize 12 uzoraka na HEV IgM*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SP	U4	U12									
B	NK	U5										
C	NK	U6										
D	NK	U7										
E	PK	U8										
F	U1	U9										
G	U2	U10										
H	U3	U11										

*Tablica 2. Shema mikrotitarske ploče prilikom analize 12 uzoraka na HEV IgG*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SP	U2	U10									
B	NK	U3	U11									
C	NK	U4	U12									
D	NK	U5										
E	KAL	U6										
F	KAL	U7										
G	PK	U8										
H	U1	U9										

## 3.2. Metode

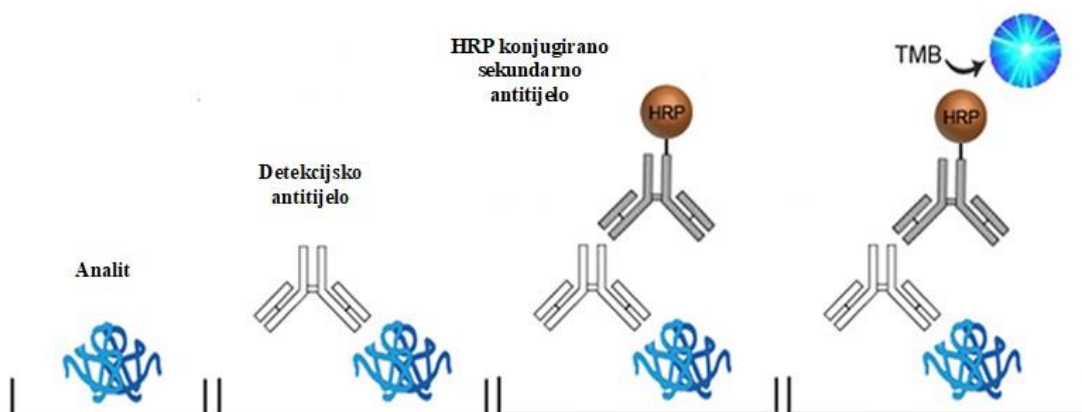
### 3.2.1. Serološki testovi

Prisutnost antitijela na HEV detektirala se ELISA metodom. Riječ je o kvalitativnom testu u formatu mikrotitarske ploče. Uzorci su testirani na IgG i IgM zasebno, a princip metode je podudaran.

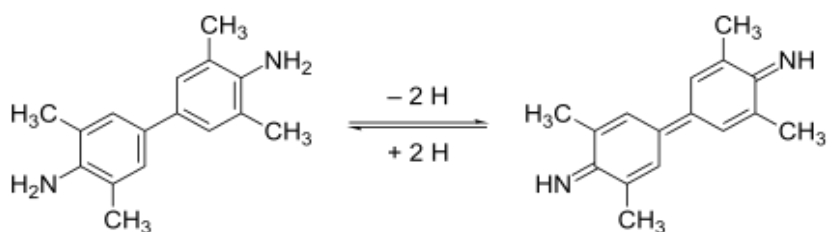
#### 3.2.1.1. Princip metode

Jažice su obložene HEV specifičnim rekombinantnim antigenima koji predstavljaju imunodominantne determinante sva 4 genotipa.

- U prvom koraku dolazi do vezanja antitijela na antigen. Dakle, u jažice se dodaje diluent i uzorak te se antitijelo prisutno u uzorku veže za antigen na površini jažice (slika 4). Slijedi korak ispiranja u kojem se uklanjaju svi nevezani proteini iz uzorka;
- Drugi korak karakterizira dodavanje sekundarnog antitijela u vidu kozjeg poliklonskog antitijela konjugiranog s peroksidazom iz hrena (engl. *HorseRadish Peroxidase*, HRP). Dakle, konjugati su označeni anti-ljudski IgG (HEV IgG Dia.Pro) i anti-ljudski IgM (HEV IgM Dia.Pro) koji će se vezati za antitijela iz kompleksa antigen - antitijelo (slika 4). Nakon inkubacije, slijedi ispiranje svih nevezanih konjugiranih antitijela;
- U trećem koraku nakon dodavanja kromogena (tetrametilbenzidin, TMB) i supstrata (vodikov peroksid,  $H_2O_2$ ) dolazi do promjene boje u plavu (slika 4). Naime, ako je prisutan vezani konjugat, TMB djeluje kao donor vodika za redukciju vodikovog peroksida u vodu kataliziranu peroksidazom iz hrena. Dolazi do oksidacije kromogena pa TMB prelazi iz diamino oblika u diimino oblik koji uzrokuje plavo obojenje otopine (slika 5). Slijedi inkubacija;



**Slika 4.** Shema metode ELISA, preuzeto s <https://www.lsbio.com/resources/devkitfaq>



**Slika 5.** Oksidacija tetrametilbenzedina u obojeni diimino oblik, preuzeto s <https://en.wikipedia.org/wiki/3,3%27,5,5%27-Tetramethylbenzidine>



- U četvrtom koraku dodaje se sulfatna kiselina za zaustavljanje reakcije. Dodatak kiseline će uzrokovati promjenu obojenja pozitivnih kontrola i pozitivnih uzoraka od plave do žute boje. Intenzitet obojenja svake jažice mjeri se kao apsorbancija pri 450/620 nm.

### 3.2.1.2. Izračun vrijednosti razgraničenja (*engl. cut-off*)

Prije bilo kakvih izračuna i interpretacije rezultata HEV IgM testa, rezultati apsorbancija moraju zadovoljiti validacijske kriterije za slijepu probu, negativnu kontrolu i pozitivnu kontrolu:

- $SP < 0,100$  OD (*engl. Optical Density*)
- $NK < 0,100$  OD
- $PK > 0,500$  OD.

Za izračun cutoff-a (CO) proizvođač je dao jednadžbu u kojoj koristimo srednju vrijednost negativnih kontrola uvećanih za 0,250.

$$CO = NK + 0,250$$

S druge strane, rezultati apsorbancija HEV IgG testa moraju zadovoljiti sljedeće validacijske kriterije uključujući i kriterij za kalibrator (KAL):

- $SP < 0,100$  OD
- $NK < 0,050$  OD
- $PK > 1,000$  OD
- $KAL > 1,1$  S/CO.

Za izračun cutoff-a proizvođač je dao jednadžbu u kojoj koristimo srednju vrijednost negativnih kontrola uvećanih za 0,350.

$$CO = NK + 0,350.$$

#### 3.2.1.2.1. Interpretacija rezultata za HEV IgM test

Za interpretaciju rezultata koristi se omjer očitavanja uzorka (S) i cutoff-a. Ako je vrijednost S/CO manja od 1, tada govorimo o negativnom rezultatu odnosno zaključujemo da ispitaniku nisu detektirana HEV IgM antitijela. Za vrijednosti S/CO koje se nalaze između 1,0 i 1,2 interpretacija je dvosmislena, odnosno u sivoj zoni - slabo pozitivno, i preporuka je da se

ispitanik ponovno podvrgne ispitivanju, tjedan do dva nakon prvog uzorkovanja. Kada je omjer S/CO veći od 1,2, tada govorimo o pozitivnom rezultatu testa koji je indikativan u smislu postojanja anti-HEV IgM, ali i HEV infekcije, tablica 3. Svaki pozitivan rezultat ponovljen je u duplikatu te se konačnim rezultatom smatrao onaj koji ima 2 od 3 ista rezultata.

**Tablica 3. Interpretacija rezultata za HEV IgM**

<i>S/CO</i>	<i>INTERPRETACIJA</i>
<b>&lt; 1,0</b>	Negativan rezultat
<b>1,0 - 1,2</b>	Siva zona - slabo pozitivan rezultat. Ponoviti testiranje nakon 2 tjedna
<b>&gt; 1,2</b>	Pozitivan rezultat

### **3.2.1.2.2. Interpretacija rezultata za HEV IgG test**

Za interpretaciju rezultata koristi se omjer očitavanja uzorka (S) i cutoff-a. Ako je vrijednost omjera (S/CO) manja od 0,9, tada govorimo o negativnom rezultatu odnosno zaključujemo da ispitaniku nisu detektirana HEV IgG antitijela. Za vrijednosti S/CO koje se nalaze između 0,9 i 1,1 interpretacija je dvosmislena, odnosno siva zona - slabo pozitivno, i preporuka je da se ispitanik ponovno podvrgne ispitivanju, tjedan do dva nakon prvog uzorkovanja. Kada je omjer S/CO veći od 1,1, tada govorimo o pozitivnom rezultatu testa koji je indikativan u smislu postojanja HEV IgG antitijela, tablica 4.

**Tablica 4. Interpretacija rezultata za HEV IgG**

<i>S/CO</i>	<i>INTERPRETACIJA</i>
< 0,9	Negativan rezultat
0,9 – 1,1	Siva zona – slabo pozitivan rezultat. Ponoviti testiranje nakon 2 tjedna
> 1,1	Pozitivan rezultat

### 3.2.2. Statistički test

Obzirom na to da rezultat seroloških testova može biti pozitivan (i slabo pozitivan ulazi u ovu kategoriju) ili negativan, za obrađivanje takvih kvalitativnih podataka korišten je kategorijski hi-kvadrat test ( $\chi^2$  test). To je praktičan test u slučajevima kada želimo utvrditi je li neke dobivene frekvencije odstupaju od frekvencije koje očekujemo.  $\chi^2$  test je korišten kako bi se utvrdilo je li frekvencija pozitivnog rezultata u serološkim testovima ove studije odstupa od frekvencije pozitivnog rezultata već prije provedene studije (HZTM, 2014.g.). Tada je moguće zaključiti je li relativni rizik (RR) u smislu bivanja serološki pozitivnim jednak u obje studijske kohorte ili pak različit (DDK naspram TP). Apsolutne frekvencije su uvrštene u kontingencijsku tablicu i onda je statistički ispitivana nul hipoteza ( $H_0$ ) prema kojoj se opažena kontingencijska tablica ne razlikuje od očekivane kontingencijske tablice.  $\chi^2$  računamo prema formuliranom izrazu gdje se  $O_i$  odnosi na opaženo, a  $E_i$  na očekivano:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Izračunata  $\chi^2$  vrijednost korištena je za usporedbu s *graničnom  $\chi^2$  vrijednošću* koja je sadržana u statističkim tablicama (tablica 5), a pritom su u obzir uzeti i stupnjevi slobode ( $df=1$ ) i razina značajnosti testa ( $\alpha=0,05$ ). Ako je izračunata vrijednost veća od granične ( $\chi^2 > \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}$ ) tada se  $H_0$  odbacuje i zaključujemo da postoji razlika između opažene i očekivane kontingencijske tablice uz razinu pouzdanosti  $\alpha=0,05$ . Dakle, osobe iz jedne studije imaju različit relativni rizik

biti serološki pozitivnim u odnosu na osobe iz druge studije. Ukoliko je situacija obratna ( $\chi^2 < \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}$ ) onda se prihvaća  $H_0$  i zaključujemo da ne postoji razlika između tablica odnosno da je relativni rizik za obje studijske kohorte jednak. S druge strane, različiti računalni programi kada je  $\chi^2$  test u pitanju računaju vrijednost  $p$ . Naime, površina ispod  $\chi^2$  krivulje iznosi 1. Vrijednost  $\chi^2$  dijelu tu površinu na dvije ( $p$  te  $1 - p$ ). Ako je vrijednost  $p < 0,05$  što predstavlja razinu statističke značajnosti testa onda se  $H_0$  odbacuje. U obrnutom slučaju se prihvaća. U ovoj studiji neće biti korišteni računalni programi koji računaju vrijednost  $p$ , ali će rezultati dobiveni preko statističkih tablica biti interpretirani kao  $p < 0,05$  ili  $p > 0,05$ .

*Tablica 5. Granična  $\chi^2$  vrijednost određena je brojem stupnjeva slobode (prvi stupac) i razinom značajnosti testa (prvi redak), preuzeto s <https://ib.bioninja.com.au/higher-level/topic-10-genetics-and-evolu/102-inheritance/chi-squared-table.html>*

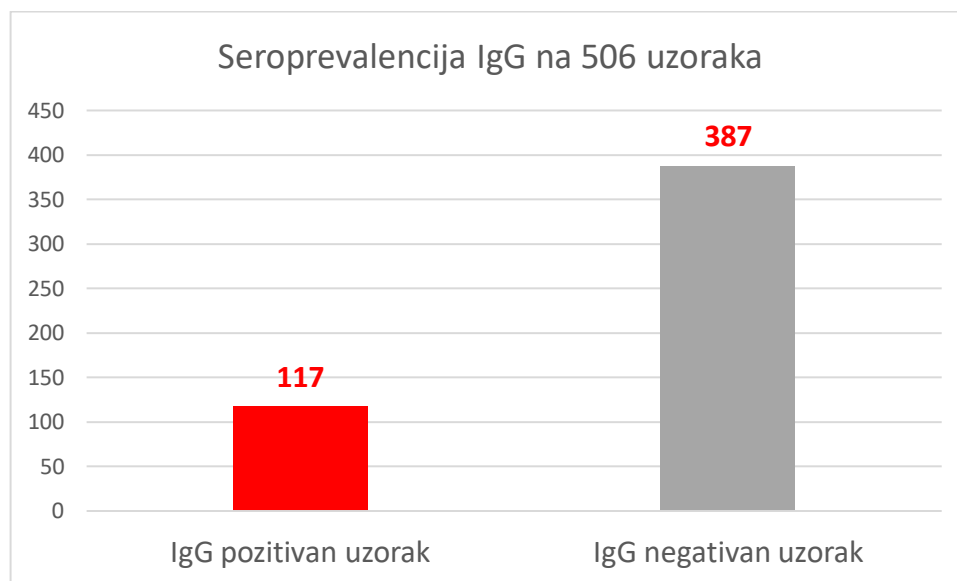
Degree of Freedom	Probability of Exceeding the Critical Value									
	0.99	0.95	0.90	0.75	0.50	0.25	0.10	0.05	0.01	
1	0.000	0.004	0.016	0.102	0.455	1.32	2.71	3.84	6.63	
2	0.020	0.103	0.211	0.575	1.386	2.77	4.61	5.99	9.21	
3	0.115	0.352	0.584	1.212	2.366	4.11	6.25	7.81	11.34	
4	0.297	0.711	1.064	1.923	3.357	5.39	7.78	9.49	13.28	
5	0.554	1.145	1.610	2.675	4.351	6.63	9.24	11.07	15.09	
6	0.872	1.635	2.204	3.455	5.348	7.84	10.64	12.59	16.81	
7	1.239	2.167	2.833	4.255	6.346	9.04	12.02	14.07	18.48	
8	1.647	2.733	3.490	5.071	7.344	10.22	13.36	15.51	20.09	
9	2.088	3.325	4.168	5.899	8.343	11.39	14.68	16.92	21.67	
10	2.558	3.940	4.865	6.737	9.342	12.55	15.99	18.31	23.21	
11	3.053	4.575	5.578	7.584	10.341	13.70	17.28	19.68	24.72	
12	3.571	5.226	6.304	8.438	11.340	14.85	18.55	21.03	26.22	
13	4.107	5.892	7.042	9.299	12.340	15.98	19.81	22.36	27.69	
14	4.660	6.571	7.790	10.165	13.339	17.12	21.06	23.68	29.14	
15	5.229	7.261	8.547	11.037	14.339	18.25	22.31	25.00	30.58	
16	5.812	7.962	9.312	11.912	15.338	19.37	23.54	26.30	32.00	
17	6.408	8.672	10.085	12.792	16.338	20.49	24.77	27.59	33.41	
18	7.015	9.390	10.865	13.675	17.338	21.60	25.99	28.87	34.80	
19	7.633	10.117	11.651	14.562	18.338	22.72	27.20	30.14	36.19	
20	8.260	10.851	12.443	15.452	19.337	23.83	28.41	31.41	37.57	
22	9.542	12.338	14.041	17.240	21.337	26.04	30.81	33.92	40.29	
24	10.856	13.848	15.659	19.037	23.337	28.24	33.20	36.42	42.98	
26	12.198	15.379	17.292	20.843	25.336	30.43	35.56	38.89	45.64	
28	13.565	16.928	18.939	22.657	27.336	32.62	37.92	41.34	48.28	
30	14.953	18.493	20.599	24.478	29.336	34.80	40.26	43.77	50.89	
40	22.164	26.509	29.051	33.660	39.335	45.62	51.80	55.76	63.69	
50	27.707	34.764	37.689	42.942	49.335	56.33	63.17	67.50	76.15	
60	37.485	43.188	46.459	52.294	59.335	66.98	74.40	79.08	88.38	
	<b>Not Significant</b>							<b>Significant</b>		

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati

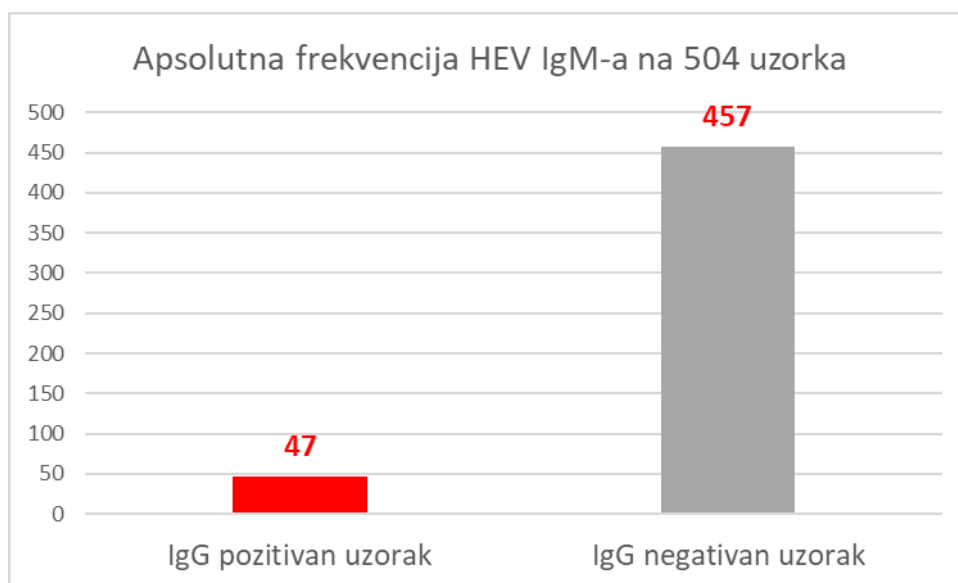
#### 4.1.1. Serološko testiranje

Od 504 uzoraka seruma pacijenata testiranih komercijalnim HEV IgG Dia.Pro testom, u 117 uzoraka detektirana su HEV IgG antitijela, grafikon 1. Seroprevalencija izražena u postocima iznosi 23,2 %.



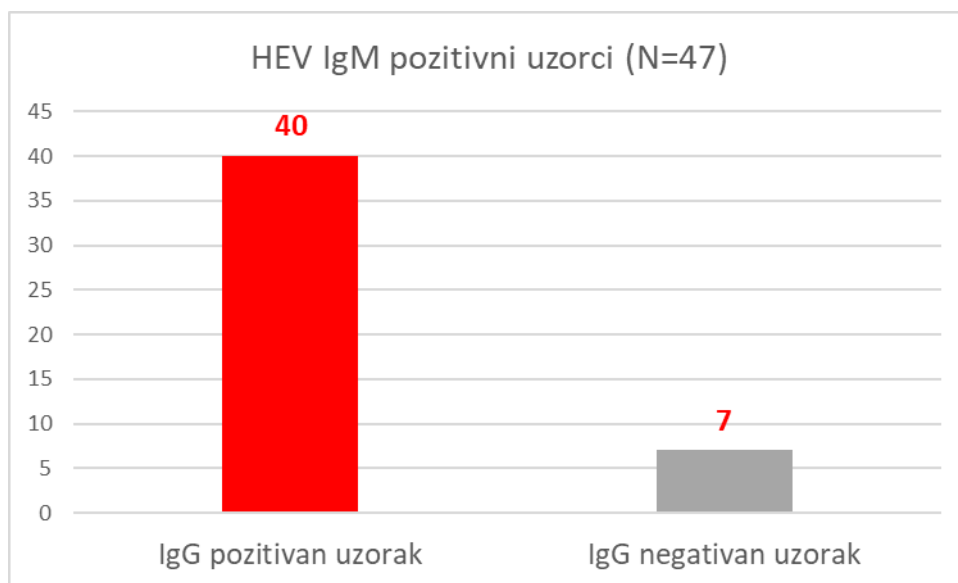
*Grafikon 1. Apsolutna frekvencija HEV IgG-a*

Od 504 uzoraka seruma pacijenata testiranih komercijalnim HEV IgM Dia.Pro testom, u 47 uzoraka detektirana su HEV IgM antitijela, grafikon 2. Seroprevalencija izražena u postocima iznosi 9,3 %.

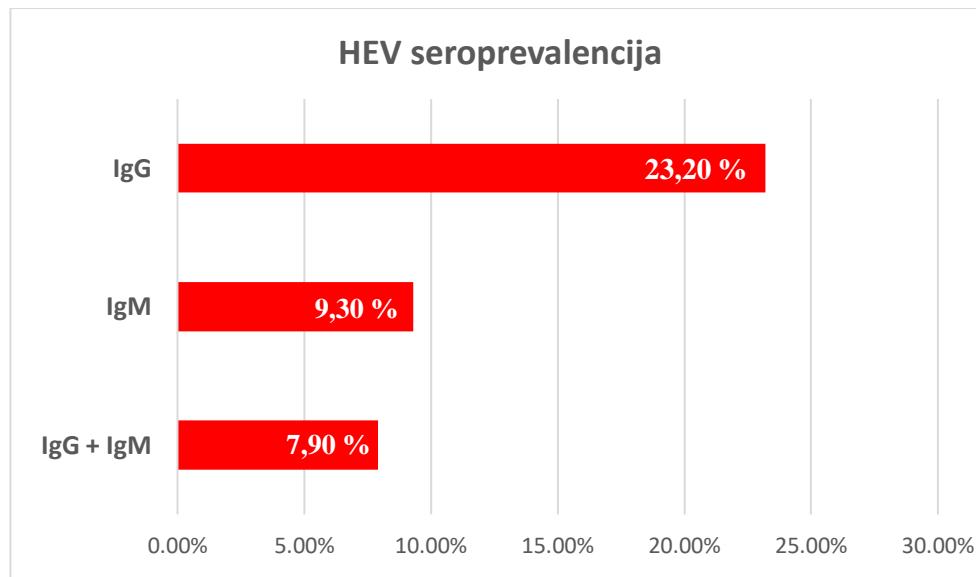


**Grafikon 2.** Apsolutna frekvencija HEV IgM-a

Od 47 uzoraka pozitivnih na HEV IgM, njih 40 (85,1 %) pokazala su pozitivitet i u HEV IgG Dia.Pro testu. Dakle, postotak uzoraka koji su pozitivni u oba testa u postocima iznosi 7,9 %, grafikon 3. U grafikonu 4 prikazana je ukupna izračunata seroprevalencija HEV IgG i HEV IgM u ispitivanoj populaciji pacijenata.



**Grafikon 3.** HEV IgG rezultat među HEV IgM pozitivnim uzrocima krvi pacijenta



*Grafikon 4. Sumirani prikaz seroprevalencije HEV IgG-a i HEV IgM-a u ispitivanoj populaciji pacijenata u postocima (relativna frekvencija)*

## 4.2. Rasprava

### 4.2.1. HZTM

HEV infekcija je dugo smatrana akutnom bolešću bez potencijala progresije u kroničnu bolest. S obzirom na opisane slučajeve HEV infekcije s kroničnim i smrtnim ishodima kod imunokompromitiranih pacijenata i primatelja organa, sve se više počelo gledati na HEV infekciju kao prijetnju u nastajanju. Zbog toga su se počele razvijati brojne studije kojima je u interesu istraživanja bila HEV prevalencija među dobrovoljnim darivateljima krvi, darivateljima organa ili pak prevalencija kod imunokompromitiranih pacijenata kao što su HIV/AIDS pacijenti (Miletić i sur., 2019). Upravo iz tih razloga, virus hepatitisa E je postao predmet zanimanja i među hrvatskim znanstvenicima.

Naime, Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu (HZTM) je neprofitna, ovlaštena zdravstvena ustanova koja obavlja transfuzijsku, laboratorijsku i farmaceutsku djelatnost. Ujedno je i Referentni centar za transfuzijsku medicinu Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. HZTM kao ustanova od velikog značaja za zdravstvo dužan je pratiti stručna iskustva i novosti, provoditi istraživanja i trajno primjenjivati nove znanstvene spoznaje radi postizanja veće sigurnosti dobrovoljnih davatelja i pacijenata te veće sigurnosti i djelotvornosti proizvoda i usluga ([https://hztm.hr/politika\\_kvalitete/](https://hztm.hr/politika_kvalitete/)). Tako je Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih



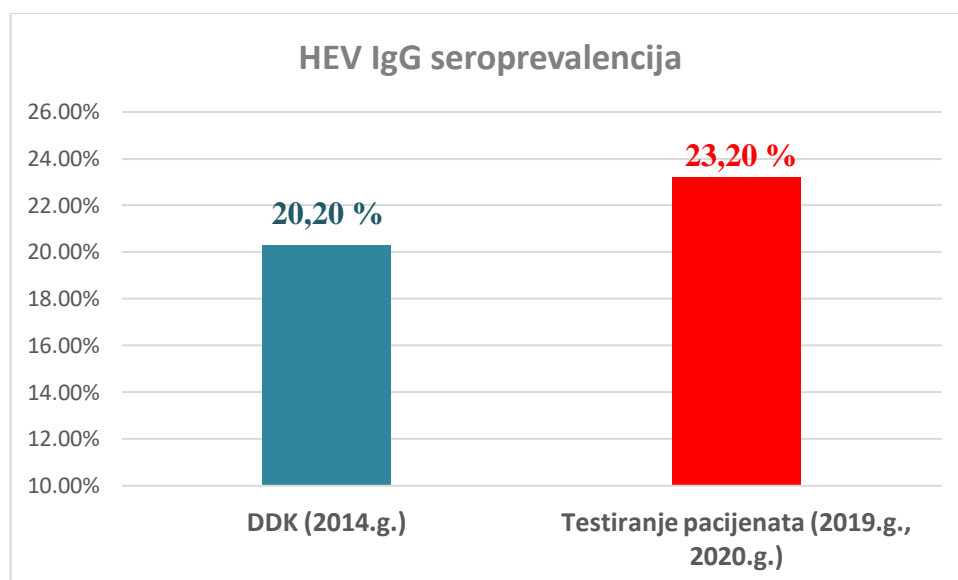
bolesti (koji je sastavni dio HZTM-a) u 2014. godini proveo studiju HEV seroprevalencije na zdravim ispitanicima. Ispitivani su na antitijela IgG i IgM.

Dakle, prikupljeno je 1036 uzoraka seruma dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK) koji su dali suglasnost za sudjelovanje u studiji. HEV seroprevalencija u DDK-a procijenjena je s četiri dostupna testa (3 ELISA testa i jednim imunoblot (IB) testom). Različiti testovi za otkrivanje antitijela na HEV pokazali su visoku seroprevalenciju HEV IgG u Hrvatskoj među DDK-a. Tako su primjerice komercijalni Dia.Pro HEV testovi pokazali HEV IgG seroprevalenciju od 20,2 % dok je HEV IgM seroprevalencija iznosila 4,4 %. Niti jedan IgM pozitivan uzorak nije bio pozitivan na HEV RNA (Miletić i sur., 2019).

Naime, imunoglobulini klase M pentamerna su antitijela koja se prva pojavljuju kod inicijalnog kontakta s antigenom. Općenito imaju bitnu ulogu u aktivaciji komplementa dok imunoglobulin klase G zbog svoje visoke specifičnosti prema antigenu usmjereniji su ka neutralizaciji istog (Keyt i sur., 2020). Dakle, HEV IgM je prisutan već u ranoj fazi kliničke bolesti i može perzistirati nekoliko mjeseci. S druge strane, HEV IgG pojavljuje se ubrzo nakon odgovora IgM i može trajati nekoliko godina (Lhomme i sur., 2016). Zbog tih različitih karakteristika, svaka klasa ima svoj poseban interpretativni značaj. Dinamika stvaranja antitijela bitna je za postavljanje dijagnoze.

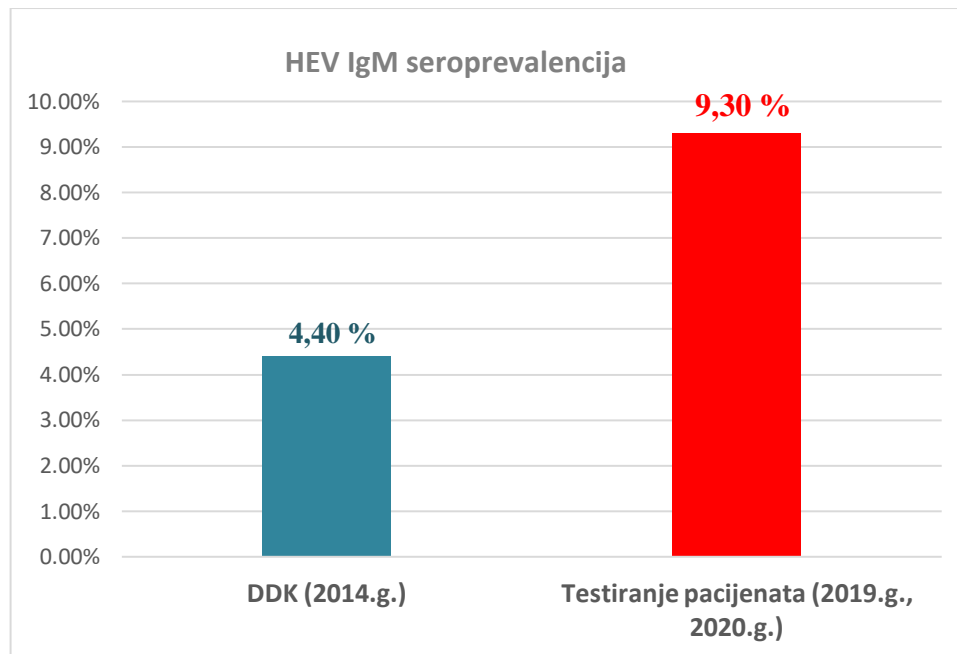
#### **4.2.2. Značenje rezultata**

Važno je napomenuti da je studija provedena na DDK-a završila, a HZTM odnosno OKB nastavlja s kliničkim testiranjem pacijenata što je temelj studije prikazane u ovom radu. Rezultati ove studije koja je obuhvatila više od 500 uzoraka testiranih između 2.9.2019. godine i 31.12.2020. godine, ne odnose se na zdravu populaciju već na pacijente čije su anamneze inducirale potrebu za dijagnostikom virusnog hepatitisa. Sada je moguće usporediti rezultate seroprevalencije ove studije s rezultatima studije provedene 2014. godine na uzorcima donirane krvi. Obje studije su koristile isti komercijalni test, grafikon 5.



**Grafikon 5.** Rezultati seroprevalencije dviju studija dobiveni istim komercijalnim testom (HEV IgG Dia.Pro)

HEV IgG prevalencija u studiji koja obuhvaća testiranje pacijenata pokazala se neznatno većom u odnosu na studiju koja je obuhvatila DDK-a (23,2 % naspram 20,2 %). Hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) test tu razliku nije pokazao statistički značajnom uz razinu značajnosti testa  $\alpha=0,05$ . Izračunata je hi-kvadrat vrijednost ( $\chi^2=1,76$ ), granična vrijednost je određena iz tablice ( $\chi^2_{df=1,\alpha=0,05}=3,84$ ), a iz njihovih vrijednosti proizlazi da je  $p > 0,05$  ( $\chi^2 < \chi^2_{df=1,\alpha=0,05}$ ). Detaljan statistički izračun nalazi se u prilogu (poglavlje 9). Sličnu seroprevalenciju možemo objasniti time što imunoglobulini klase G perzistiraju dugo (od 1 do 14 godina) i pokazatelj su prošle infekcije. Dakle, ukoliko pacijent ima simptome akutnog virusnog hepatitisa, a uobičajeni uzročnici su isključeni (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV) tada samo prisustvo HEV IgG-a bez detektiranih HEV IgM i HEV RNA nema veliki dijagnostički značaj (Đaković Rode i sur., 2016).



**Grafikon 6.** Rezultati seroprevalencije dviju studija dobiveni istim komercijalnim testom (HEV IgM Dia.Pro)

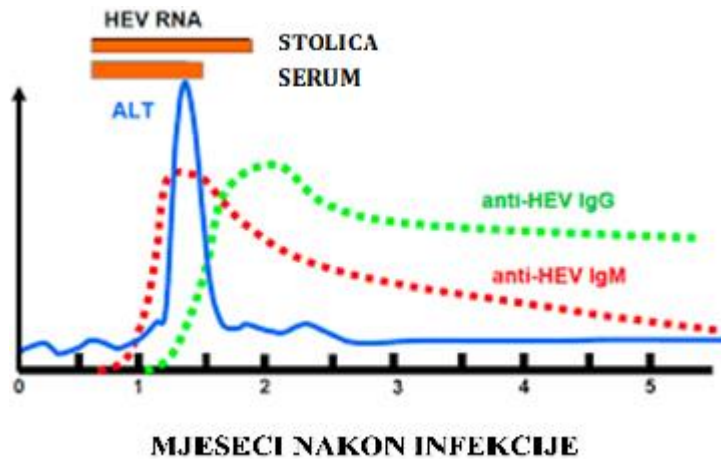
HEV IgM prevalencija u studiji koja obuhvaća testiranje pacijenata pokazala se većom u odnosu na studiju koja je obuhvatila DDK-a (9,3 % naspram 4,4 %).  $\chi^2$  test tu razliku pokazao je statistički značajnom uz razinu značajnosti testa  $\alpha=0,05$ . Izračunata je hi-kvadrat vrijednost ( $\chi^2=15,13$ ), a granična vrijednost je određena iz tablice ( $\chi^2_{df=1,\alpha=0,05}=3,84$ ), a iz njihovih vrijednosti proizlazi da je  $p < 0,05$  ( $\chi^2 > \chi^2_{df=1,\alpha=0,05}$ ). Detaljan statistički izračun nalazi se u prilogu (poglavlje 9). Tu veću seroprevalenciju možemo objasniti time što se radilo o pacijentima kod kojih je postojala sumnja od strane liječnika na postojanje HEV infekcije.

Naime, dinamika antitijela klase M spregnuta je s pojavom simptoma pa tako znamo da dva tjedna nakon početka bolesti oko 90 % pacijenata s akutnom bolešću ima pozitivna HEV IgM antitijela. Osim toga, u vrijeme pojave kliničkih simptoma, antitijela HEV IgM dosežu najvišu koncentraciju. Detektabilna su oko 8 tjedana i nakon 32 tjedna u većine se pacijenata više ne mogu utvrditi. Dakle, ukoliko pacijent ima simptome virusnog hepatitisa, a uobičajeni uzročnici su isključeni (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV) onda je preporučljiva dijagnostika na HEV. To je preporuka i od strane europske organizacije kao što je European Association for the Study of the Liver (EASL) (Dalton i sur., 2018).

Prisustvo HEV IgM-a tada je indikativno u smislu postojanja HEV infekcije, no HEV IgM kao jedini pozitivni parametar nije siguran dokaz akutne bolesti zbog mogućih nespecifičnih reakcija u testovima. Dijagnostički izazov je križni odgovor antitijela na druge hepatotropne viruse kao što su Epstein-Barrin virus (EBV), citomegalovirus (CMV) ili hepatitis A virus (HAV). Iz tih razloga, svaki pozitivni nalaz primarnog testiranja potrebno je potvrditi imunoblot metodom (WB) (Đaković Rode i sur., 2016). To nije praksa koja se koristila prilikom testiranja pacijenata prikazanom u ovom diplomskom radu, ali je za sve HEV IgM pozitivne uzorke testiranje ponavljano u duplikatu.

Imunokompetentne osobe u velikoj većini HEV infekciju prebole asimptomatski, a serološki testovi će detektirati antitijela na HEV. Obzirom na dostatan imunosni sustav takvih pojedinaca koji aktivno proizvodi antitijela na strani antigen kao što je HEV, detekcija HEV RNA je otežana. Ako se i dokaže, onda je HEV RNA detektabilna kroz kraće vremensko razdoblje. U Njemačkoj je opisana serija slučajeva od 10 asimptomatskih davatelja krvi zaraženih HEV-om i navedeno je da su svi DDK-a spontano razriješili viremiju u plazmi unutar 20 - 80 dana (Kraef i sur., 2018).

S druge strane, određivanje HEV RNA posebno je važno za imunosuprimirane pacijente kod kojih je deficitaran imunosni odgovor pa se antitijela ne stvaraju u dovoljnoj količini. Takvi pacijenti mogu imati lažno negativne serološke biljege infekcije. Nedostatak antitijela očituje se olakšanom detekcijom HEV RNA i dužim trajanjem viremije. Pozitivan RT-PCR nakon minimalno 3 - 6 mjeseci od dijagnoze HEV-a potvrda je kronične HEV infekcije (Murali i sur., 2015). Obzirom da je studija Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu iz 2014. godine provedena na zdravoj populaciji, populaciji DDK-a, onda ne čudi rezultat da niti u jednom HEV IgM pozitivnom uzorku nije detektirana i HEV RNA. Dakle, uz adekvatan imunosni odgovor, viremija ima slab potencijal perzistiranja i detektiranja (slika 6).



*Slika 6. Tijek HEV infekcije kod imunokompetentnih pojedinaca. Povišena koncentracija ALT-a ukazuje na akutni virusni hepatitis još i prije nego što to čini imunosni odgovor u vidu sinteze antitijela. HEV RNA perzistira kratko, preuzeto s <https://www.mdpi.com/1999-4915/8/8/212/htm>.*

#### 4.2.3. Testiranje krvi dobrovoljnih davatelja

Kako je opisan niz slučajeva HEV infekcije uzrokovanih transfuzijom, tako se počelo govoriti o testiranju darivane krvi na HEV RNA. Od 2012. godine, više od 3,2 milijuna EU donacija testirano je na HEV RNA, a ukupna stopa iznosila je jedan pozitivan uzorak na 3109 donacija. Neke države procijenile su da je potreba za testiranjem na HEV RNA opravdana unatoč saznanjima da rizik infekcije putem hrane nadmašuje rizik od infekcije posredovane transfuzijom. Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) u svom priopćenju iz 2017. godine napominje da bi provjera darivane krvi trebala ići ruku pod ruku s podizanjem svijesti kliničara i strogim prehrambenim preporukama za rizične pacijente (Boland i sur., 2019). Kao i u većini zemalja tako i u Hrvatskoj, testiranje na HEV RNA nije uvršteno među pretrage kojima se testiraju uzorci krvi od DDK-a.

#### 4.2.4. Nestandardiziranost testova

Proveden je velik broj studija o seroprevalenciji HEV IgG-a u Europi, međutim, rezultati tih studija pokazali su veliku varijabilnost stopa seroprevalencije, čineći interpretaciju takvih studija problematičnom. Većina studija koristila je različite HEV IgG ELISA testove s različitom specifičnošću i osjetljivošću što ima utjecaja na pouzdanost rezultata. Naime, stope seroprevalencije prvenstveno ovise o korištenom serološkom testu, zatim o geografskoj regiji

i studijskoj kohorti (opća populacija, pacijenti s HIV-om, primatelji presađenih organa, osobe u kontaktu sa svinjama i divljim životinjama) (Hartl i sur., 2016). Obzirom na tako značajan utjecaj korištenog testa na rezultate, studije često ispituju seroprevalenciju pomoću više različitih komercijalnih testova.

Primjer tome je i studija Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu iz 2014. godine gdje je seroprevalencija HEV IgG s obzirom na četiri testa (Dia.Pro HEV IgG, Mikrogen recomWell HEV IgG\_old, recomWell HEV IgG\_new, IB Mikrogen recomLine HEV IgG) iznosila 20,2 %, 9,6 %, 18,1 % te 17,8 %. Kod ispitivanja HEV IgM-a osim što su dobivena 4 rezultata, pozitivni uzorci su potvrđivani imunoblotom (Miletić i sur., 2019). Korištenje više testova ima pozitivan utjecaj na kvalitetu studije dok se ne razviju standardizirani testovi. Valja napomenuti da ipak serološki testovi nove generacije imaju bolju osjetljivost i specifičnost od starijih široko korištenih seroloških testova (Aslan i Balaban, 2020).

## 5. ZAKLJUČCI

- U vremenskom razdoblju od 2.9.2019. godine, kada je uvedeno serološko testiranje krvi pacijenta na biljege hepatitisa E (HEV) u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu, u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti, pa do 31.12.2020. godine, izračunata je seroprevalencija HEV IgG-a od 23,2 % te HEV IgM-a od 9,3 %;
- Seroprevalencija HEV IgG-a od 23,2 % u ispitivanoj populaciji pacijenata ne razlikuje se statistički od seroprevalencije HEV IgG-a dobivenoj u studiji na dobrovoljnim davateljima krvi, 20,2 %, ispitano istim testom (Dia.Pro), što upućuje na zaključak da je HEV i naša autohtona infekcija;
- Seroprevalencija HEV IgM-a od 9,3 % u ispitivanoj populaciji pacijenata razlikuje se statistički od seroprevalencije HEV IgM-a dobivenoj u studiji na dobrovoljnim davateljima krvi, 4,4 %, ispitano istim testom (Dia.Pro), upućuje na zaključak da ukoliko pacijent ima simptome virusnog hepatitisa, a uobičajeni uzročnici su isključeni (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV), preporučljiva je serološka dijagnostika na HEV;
- Korišteni testovi za serološko testiranje na HEV imaju zadovoljavajuću osjetljivost i specifičnost te algoritam ponavljanja testiranja u slučaju anti-HEV IgM pozitivnog rezultata daje pouzdane rezultate;
- Rezultati ovog diplomskog rada pokazuju važnost serološkog testiranja pacijenata na biljege virusnog hepatitisa E koji se do sada smatrao infekcijom vezanoj samo za endemske zemlje.

## 6. POPIS KRATICA

- $\chi^2$  – hi kvadrat
- CMV – citomegalovirus
- CO – vrijednost razgraničenja (engl. *cut-off*)
- DDK – dobrovoljni darivatelji krvi
- EASL – *European Association for the Study of the Liver*
- EBV – Epstein-Barr virus
- ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*
- ELISA – enzimski adsorpcijski imunotest (engl. *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)
- $H_0$  – nul hipoteza
- HAV – virus hepatitisa A
- HBV – virus hepatitisa B
- HCV – virus hepatitisa C
- HDV – virus hepatitisa D
- HEV – virus hepatitisa E
- HEV IgG – imunoglobulini klase G specifični za antigene virusa hepatitisa E
- HEV IgM – imunoglobulini klase M specifični za antigene virusa hepatitisa E
- HZTM – Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
- KAL – kalibrator
- NK – negativna kontrola
- OD – optička gustoća (engl. *Optical Density*)
- OKB – Odjel za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti
- ORF – otvoreni okvir za čitanje (engl. *Open Reading Frame*)



- PK – pozitivna kontrola
- RR – relativni rizik
- S/CO – omjer očitavanja uzorka (S) i cutoff-a
- TP – testiranje pacijenata

## 7. LITERATURA

Aslan AT, Balaban HY. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroenterol*, 2020, 26, 5543-5560.

Boland F, Martinez A, Pomeroy L, O'Flaherty N. Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. *Transfus Med Hemother*, 2019, 46, 95-103.

Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*, 2010, 202, 825-34.

Dalton HR, Kamar N, Baylis SA, Moradpour D, Wedemeyer H, Negro F. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J Hepatol*, 2018, 68, 1256-1271.

Denner J. Hepatitis E virus (HEV)-The Future. *Viruses*, 2019, 11, 251.

Đaković Rode O, Jemeršić L, Vince A. Hepatitis E u Hrvatskoj – smjernice za dijagnostiku i liječenje. *Liječnički vjesnik*, 2016, 138, 289-296.

Hartl J, Otto B, Madden RG, Webb G, Woolson KL, Kriston L, Vettorazzi E, Lohse AW, Dalton HR, Pischke S. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses*, 2016, 8, 211.

Horvatits T, Schulze Zur Wiesch J, Lütgehetmann M, Lohse AW, Pischke S. The Clinical Perspective on Hepatitis E. *Viruses*, 2019, 11, 617.

Kar P, Karna R. A Review of the Diagnosis and Management of Hepatitis E. *Curr Treat Options Infect Dis*, 2020, 12, 310-320.

Keyt BA, Baliga R, Sinclair AM, Carroll SF, Peterson MS. Structure, Function, and Therapeutic Use of IgM Antibodies. *Antibodies (Basel)*, 2020, 9, 53.

Khuroo MS, Khuroo MS, Khuroo NS. Transmission of Hepatitis E Virus in Developing Countries. *Viruses*, 2016, 8, 253.

Kraef C, Schlein C, Hiller J, Westhölter D, Denzer U, Horvatits T, Peine S, Lohse AW, Lütgehetmann M, Polywka S, Pischke S. Course of HEV viremia and anti-HEV IgM/IgG response in asymptomatic blood donors. *J Clin Virol*, 2018, 105, 26-30.

Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E Pathogenesis. *Viruses*, 2016, 8, 212.

Miletić M, Vuk T, Hećimović A, Stojić Vidović M, Jemeršić L, Jukić I. Estimation of the hepatitis E assay-dependent seroprevalence among Croatian blood donors. *Transfus Clin Biol*, 2019, 26, 229-233.

Mrzljak A, Dinjar-Kujundzic P, Jemersic L, Prpic J, Barbic L, Savic V, Stevanovic V, Vilibic-Cavlek T. Epidemiology of hepatitis E in South-East Europe in the "One Health" concept. *World J Gastroenterol*, 2019, 25, 3168-3182.

Murali AR, Kotwal V, Chawla S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World J Hepatol*, 2015, 7, 2194-201.

Pankovics P, Némethy O, Boros Á, Pár G, Szakály P, Reuter G. Four-year long (2014-2017) clinical and laboratory surveillance of hepatitis E virus infections using combined antibody, molecular, antigen and avidity detection methods: Increasing incidence and chronic HEV case in Hungary. *J Clin Virol*, 2020, 124.

Politika kvalitete, 2019., [https://hztm.hr/politika\\_kvalitete](https://hztm.hr/politika_kvalitete), pristupljeno 13.8.2022.

Raji YE, Toung OP, Taib NM, Sekawi ZB. Hepatitis E Virus: An emerging enigmatic and underestimated pathogen. *Saudi J Biol Sci*, 2022, 29, 499-512.

Rasche A, Sander AL, Corman VM, Drexler JF. Evolutionary biology of human hepatitis viruses. *J Hepatol*, 2019, 70, 501-520.

Virusni hepatitis, 2018., <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/#Hepatitis>, pristupljeno 6.8.2022.

Webb GW, Dalton HR. Hepatitis E: an underestimated emerging threat. *Ther Adv Infect Dis*, 2019, 6.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

### 8.1. Sažetak

Za virus hepatitisa E (HEV) karakteristično je da ga većina ljudi preboli asimptomatski. Ipak, za određene skupine kao što su trudnice, pacijenti na imunosupresivnoj terapiji te za imunokompromitirane pojedince s već postojećim bolestima jetre, HEV infekcija može dovesti do letalnog ishoda.

Tijekom 16 mjeseci (2019. i 2020. godine), nešto više od 500 pacijenata serološki je ispitivano na biljege hepatitisa E u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM), i to u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti (OKB). Korišteni su komercijalni HEV IgG Dia.Pro i HEV IgM Dia.Pro testovi koji se temelje na ELISA metodi. Ispitivanja su obavljena na Gemini analizatoru i kompletan protokol pratio je upute proizvođača. Obzirom na rezultate testiranja pacijenata (TP), HEV IgG seroprevalencija iznosi 23,2 % (117 uzoraka) dok je stopa HEV IgM seroprevalencije 9,3 % (47 uzoraka).

HZTM još je 2014. godine proveo seroprevalencijsku studiju koja je obuhvatila 1036 uzoraka dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK). HEV seroprevalencija u DDK-a procijenjena je s četiri dostupna testa (3 ELISA i 1 imunoblot test). Uspoređeni su rezultati dobiveni Dia.Pro testom. HEV IgM seroprevalencija među TP statistički je značajno veća u odnosu na DDK (9,3 % naspram 4,4 %) što je dokazano hi-kvadrat testom ( $\chi^2$  test) uz razinu značajnosti testa  $\alpha=0,05$  ( $\chi^2=15,13 > \chi^2_{df=1,\alpha=0,05}=3,84$ ,  $p < 0,05$ ). Ova veća HEV IgM seroprevalencija može se objasniti činjenicom da je riječ o pacijentima kod kojih je liječnik posumnjao na HEV infekciju. Rezultati ove studije pokazuju da je, ukoliko pacijent ima simptome virusnog hepatitisa, a uobičajeni uzročnici su isključeni (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV), preporučljiva je serološka dijagnostika na biljege virusnog hepatitisa E. Statistički značajna razlika nije primijećena kod HEV IgG seroprevalencije (23,2 % naspram 20,2 %,  $\chi^2=1,77 < \chi^2_{df=1,\alpha=0,05}=3,84$ ,  $p > 0,05$ ) što upućuje na zaključak da je HEV i naša autohtona infekcija.

## 8.2. Summary

The characteristic of hepatitis E virus (HEV) is that most people get over it asymptotically. However, for certain groups such as pregnant women, patients on immunosuppressive therapy and immunocompromised individuals with pre-existing liver diseases, HEV infection can lead to a fatal outcome.

During 16 months (2019 and 2020), slightly more than 500 were serologically tested for hepatitis E markers at the Croatian Institute for Transfusion Medicine (CITM), in the Department for Diagnostics of Blood Transmitted Diseases. Commercial HEV IgG Dia.Pro and HEV IgM Dia.Pro tests were used, based on ELISA. Two tests were used, one for HEV IgG and the other for HEV IgM. Both tests are a product of the same producer (Dia.Pro Srl, Milan, Italy) and the principle of the method used is the ELISA. Tests were performed on Gemini analyzer and the complete procedure followed the producer's instructions. Considering the results of patient testing (TP), the HEV IgG seroprevalence is 23.2 % (117 samples) while the HEV IgM seroprevalence rate is 9.3 % (47 samples).

In 2014, CITM conducted a seroprevalence study that included 1036 samples from voluntary blood donors (VBD). HEV seroprevalence in VBD was assessed with four available tests (3 ELISA and 1 immunoblot (IB) test). The results obtained with Dia.Pro test were compared. HEV IgM seroprevalence among TP is significantly higher compared to VBD (9.3 % vs. 4.4 %) as proven by the chi-square test ( $\chi^2$  test) with a significance level of  $\alpha=0.05$  ( $\chi^2=15.13 > \chi^2_{df=1, \alpha=0.05}=3.84$ ,  $p < 0.05$ ). This higher HEV IgM seroprevalence can be explained by the fact that these are patients in whom the doctor suspected HEV infection. The results of these studies show that, if the patient has symptoms of viral hepatitis, and the usual causative agents are excluded (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV), serological diagnosis for markers of viral hepatitis E is recommended. No statistically significant difference was observed in HEV IgG seroprevalence (23.2 % vs. 20.2 %,  $\chi^2=1.77 < \chi^2_{df=1, \alpha=0.05}=3.84$ ,  $p > 0.05$ ) which leads to the conclusion that HEV is also our autochthonous infection.

## 9. PRILOZI

### 9.1. Tablica s podacima

*Tablica 6. Prikaz rezultata testiranja pacijenata provedenog u HZTM-u u vremenskom razdoblju od 2.9.2019. do 31.12. 2020. godine.*

	Datum	Anti-HEV IgG	S/CO	Anti-HEV IgM	S/CO
1	2.9.2019	NEG	0.161;0.142	NEG.	0.184;0.166
2	2.9.2019	<b>POZ</b>	1.295;1.313	NEG.	0.177;0.169
3	3.9.2019	NEG	0.144;0.510	NEG.	0.156;0.465
4	4.9.2019	NEG	0.295;0.287	<b>POZ</b>	2.378;1.983
5	6.9.2019	NEG	0.062	NEG.	0.147
6	9.9.2019	NEG	0.131	NEG.	0.178
7	10.9.2019	<b>POZ</b>	2.593;2.635	NEG.	0.454
8	10.9.2019	<b>POZ</b>	8.934	NEG.	0.854;0.977
9	11.9.2019	NEG	0.066	NEG.	0.263
10	12.9.2019	NEG	0.082	NEG.	0.130
11	12.9.2019	NEG	0.102	NEG.	0.103
12	12.9.2019	NEG	0.111	NEG.	0.289
13	12.9.2019	NEG	0.231	NEG.	0.244
14	12.9.2019	NEG	0.219	NEG.	0.192
15	12.9.2019	NEG	0.157	NEG.	0.168
16	12.9.2019	NEG	0.222	NEG.	0.609;0.289
17	13.9.2019	NEG	0.858;0.823	NEG.	0.182
18	17.9.2019	NEG	0.801	NEG.	0.192
19	18.9.2019	NEG	0.074	<b>poz. slabo</b>	1.056;0.944;1.158
20	18.9.2019	NEG	0.114	NEG.	0.347
21	19.9.2019	NEG	0.068	NEG.	0.182
22	19.9.2019	<b>POZ</b>	2.036	<b>poz. slabo</b>	2.182;1.563
23	20.9.2019	NEG	0.149	NEG.	0.151
24	20.9.2019	NEG	0.163	NEG.	0.368
25	24.9.2019	<b>POZ</b>	1.299	<b>POZ</b>	1.368;1.639
26	25.9.2019	NEG	0.128	NEG.	0.147
27	25.9.2019	NEG	0.119	NEG.	0.104
28	25.9.2019	NEG	0.119	NEG.	0.104
29	26.9.2019	NEG	0.108	NEG.	0.108
30	26.9.2019	<b>POZ</b>	1.302	NEG.	0.157;0.316
31	1.10.2019	<b>POZ</b>	6.122	NEG.	0.389
32	2.10.2019	NEG	0.288	NEG.	0.140

33	3.10.2019	NEG	0.111	NEG.	0.158
34	9.10.2019	NEG	0.077	NEG.	0.181
35	9.10.2019	NEG	0.151	NEG.	0.140
36	11.10.2019	<b>POZ</b>	4.048	NEG.	0.491
37	11.10.2019	NEG	0.068	NEG.	0.176
38	15.10.2019	NEG	0.051	NEG.	0.206
39	16.10.2019	<b>POZ</b>	1.937;2.406	<b>poz. slabo</b>	1.463;1.704
40	16.10.2019	NEG	0.088	NEG.	0.111
41	17.10.2019	NEG	0.102	NEG.	0.211
42	18.10.2019	NEG	0.179	NEG.	0.110
43	23.10.2019	NEG	0.045	NEG.	0.136
44	24.10.2019	<b>POZ</b>	1.159;1.092	NEG.	0.400
45	24.10.2019	NEG	0.120	NEG.	0.119
46	25.10.2019	NEG	0.080	NEG.	0.098
47	26.10.2019	<b>POZ</b>	2.925	NEG.	0.252
48	28.10.2019	NEG	0.409		nije traženo
49	28.10.2019	NEG	0.105	NEG.	0.315
50	29.10.2019	NEG	0.150	NEG.	0.349
51	29.10.2019	<b>POZ</b>	3.570	NEG.	0.392
52	29.10.2019	<b>POZ</b>	8.815	NEG.	0.609
53	30.10.2019	NEG	0.227	NEG.	0.166
54	30.10.2019	NEG	0.848	NEG.	0.176
55	31.10.2019	<b>POZ</b>	7.007	<b>POZ</b>	2.053;2.103
56	31.10.2019	<b>POZ</b>	2.857;2.534	NEG.	0.306
57	4.11.2019	NEG	0.370	NEG.	0.242
58	5.11.2019	NEG	0.096	NEG.	0.134
59	6.11.2019	<b>POZ</b>	1.606;1.609	<b>POZ</b>	1.686;1.902
60	8.11.2019	NEG	0.133	NEG.	0.184
61	15.11.2019	<b>POZ</b>	8.290	NEG.	0.495
62	15.11.2019	<b>POZ</b>	2.706	NEG.	0.209
63	18.11.2019	NEG	0.324	NEG.	0.286
64	19.11.2019	NEG	0.065	NEG.	0.232
65	21.11.2019	NEG	0.071	NEG.	0.188
66	22.11.2019	NEG	0.148	NEG.	0.207
67	26.11.2019	<b>POZ</b>	8.188;8.102	<b>POZ</b>	10.666;10.620
68	27.11.2019	<b>POZ</b>	1.494	NEG.	0.396
69	28.11.2019	<b>POZ</b>	9.179	NEG.	0.353
70	28.11.2019	NEG	0.533	NEG.	0.153
71	29.11.2019	NEG	0.071	NEG.	0.170
72	29.11.2019	NEG	0.037	NEG.	0.081
73	29.11.2019	NEG	0.119	NEG.	0.095
74	3.12.2019	NEG	0.062	NEG.	0.173
75	3.12.2019	NEG	0.119	NEG.	0.098
76	3.12.2019	NEG	0.091	NEG.	0.149
77	3.12.2019	NEG	0.154;0.111	NEG.	0.142;0.187
78	4.12.2019	<b>POZ</b>	2.705;2.914	<b>POZ</b>	10.805;10.722



79	4.12.2019	NEG	0.173;0.120	NEG.	0.141;0.122
80	4.12.2019	NEG	0.165;0.200	NEG.	0.168;0.178
81	5.12.2019	NEG	0.082;0.080	NEG.	0.204;0.178
82	5.12.2019	NEG	0.177;0.131	NEG.	0.165;0.165
83	6.12.2019	NEG	0.168;0.160	NEG.	0.217;0.237
84	6.12.2019	<b>POZ</b>	2.736;2.608	NEG.	0.254;0.234
85	6.12.2019	<b>POZ</b>	9.208;9.317	<b>POZ</b>	5.693;5.617
86	9.12.2019	NEG	0.191;0.174	NEG.	0.118;0.132
87	10.12.2019	NEG	0.060;0.085	NEG.	0.205;0.192
88	12.12.2019	NEG	0.051;0.037	NEG.	0.113;0.116
89	12.12.2019	<b>POZ</b>	6.998;7.195	NEG.	0.305;0.281
90	12.12.2019	<b>POZ</b>	2.342;2.485	<b>POZ</b>	1.821;1.931
91	13.12.2019	NEG	0.108;0.091	NEG.	0.106;0.109
92	13.12.2019	NEG	0.077;0.065	NEG.	0.466;0.483
93	13.12.2019	<b>POZ</b>	1.984;1.999	NEG.	0.150;0.150
94	14.12.2019	NEG	0.088;0.097	NEG.	0.329;0.332
95	16.12.2019	NEG	0.174;0.168	NEG.	0.158;0.161
96	16.12.2019	<b>POZ</b>	1.468;1.251	NEG.	0.477;0.497
97	16.12.2019	<b>POZ</b>	8.318;8.053	<b>POZ</b>	3.509;3.705
98	16.12.2019	NEG	0.199;0.188	NEG.	0.201;0.205
99	18.12.2019	NEG	0.308;0.305	NEG.	0.178;0.184
100	19.12.2019	NEG	0.051;0.048	NEG.	0.124;0.127
101	19.12.2019	NEG	0.151;0.174	NEG.	0.205;0.201
102	19.12.2019	NEG	0.071;0.082	NEG.	0.188;0.231
103	23.12.2019	NEG	0.100;0.088	NEG.	0.525;0.509
104	23.12.2019	NEG	0.438;0.464	NEG.	0.619;0.635
105	23.12.2019	<b>POZ</b>	2.033;2.096	NEG.	0.877;0.832
106	24.12.2019	NEG	0.060;0.060	<b>poz. slabo</b>	1.161;1.171
107	27.12.2019	NEG	0.160;0.137	NEG.	0.487;0.496
108	31.12.2019	NEG	0.101;0.112	NEG.	0.168;0.175
109	31.12.2019	NEG	0.233	NEG.	0.298
110	3.1.2020	NEG	0.216	NEG.	0.311
111	3.1.2020	NEG	0.049	NEG.	0.217
112	3.1.2020	NEG	0.086	NEG.	0.220
113	4.1.2020	NEG	0.063	NEG.	0.220
114	8.1.2020	<b>POZ</b>	5.480	NEG.	0.204
115	8.1.2020	NEG	0.239	NEG.	0.102
116	8.1.2020	NEG	0.165	NEG.	0.159
117	9.1.2020	NEG	0.139	NEG.	0.173
118	10.1.2020	NEG	0.048	NEG.	0.095
119	10.1.2020	NEG	0.245	NEG.	0.108
120	15.1.2020	NEG	0.106	NEG.	0.191
121	15.1.2020	NEG	0.095	NEG.	0.127
122	17.1.2020	<b>POZ</b>	6.598	NEG.	0.284
123	17.1.2020	NEG	0.109	NEG.	0.184
124	17.1.2020	NEG	0.150	NEG.	0.185

125	18.1.2020	NEG	0.164	NEG.	0.192
126	20.1.2020	NEG	0.085	NEG.	0.208
127	21.1.2020	NEG	0.116	NEG.	0.122
128	24.1.2020	NEG	0.085	NEG.	0.118
129	24.1.2020	NEG	0.116	NEG.	0.111
130	24.1.2020	NEG	0.099	NEG.	0.247
131	25.1.2020	NEG	0.125	NEG.	0.121
132	25.1.2020	POZ	6.526;6.608	POZ	1.695;1.651
133	27.1.2020	NEG	0.102	NEG.	0.172
134	29.1.2020	NEG	0.264	NEG.	0.274
135	29.1.2020	NEG	0.369	NEG.	0.294
136	30.1.2020	NEG	0.105	NEG.	0.147
137	30.1.2020	NEG	0.275	NEG.	0.207
138	31.1.2020	POZ	9.116;8.895	POZ	4.250;4.267
139	31.1.2020	POZ	8.005;7.426	NEG.	0.384
140	3.2.2020	NEG	0.105	NEG.	0.167
141	3.2.2020	POZ	4.769;5.159	NEG.	0.280;0.307
142	5.2.2020	NEG	0.190	NEG.	0.145
143	5.2.2020	NEG	0.196	NEG.	0.209
144	7.2.2020	POZ	1.559	NEG.	0.148
145	7.2.2020	NEG	0.147	NEG.	0.199
146	7.2.2020	NEG	0.095	NEG.	0.279
147	8.2.2020	NEG	0.092	NEG.	0.168
148	8.2.2020	NEG	0.051	NEG.	0.148
149	10.2.2020	NEG	0.198	NEG.	0.185
150	10.2.2020	NEG	0.095	NEG.	0.131
151	11.2.2020	NEG	0.085	NEG.	0.189
152	13.2.2020	NEG	0.114	NEG.	0.185
153	13.2.2020	NEG	0.569	NEG.	0.152
154	17.2.2020	NEG	0.048	NEG.	0.189
155	17.2.2020	NEG	0.114	NEG.	0.149
156	17.2.2020	NEG	0.133	NEG.	0.129
157	18.2.2020	NEG	0.085	NEG.	0.159
158	19.2.2020	NEG	0.145	NEG.	0.163
159	19.2.2020	NEG	0.165	NEG.	0.146
160	19.2.2020	NEG	0.165	NEG.	0.136
161	21.2.2020	NEG	0.079	NEG.	0.401
162	21.2.2020	NEG	0.267	NEG.	0.219
163	24.2.2020	NEG	0.287	NEG.	0.146
164	24.2.2020	NEG	0.116	NEG.	0.166
165	26.2.2020	NEG	0.116	NEG.	0.144
166	26.2.2020	NEG	0.190	NEG.	0.130
167	27.2.2020	NEG	0.076	NEG.	0.226
168	27.2.2020	NEG	0.093	NEG.	0.113
169	27.2.2020	POZ	10;10	NEG.	0.968;0.943
170	27.2.2020	NEG	0.196	NEG.	0.166

171	27.2.2020	NEG	0.128	NEG.	0.151
172	28.2.2020	NEG	0.437	NEG.	0.031
173	28.2.2020	NEG	0.161	NEG.	0.136
174	28.2.2020	<b>POZ</b>	7.579	<b>POZ</b>	2.677
175	28.2.2020	NEG	0.147	NEG.	0.150
176	3.3.2020	NEG	0.102	NEG.	0.098
177	3.3.2020	NEG	0.102	NEG.	0.116
178	3.3.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.399;1.499
179	6.3.2020	NEG	0.170	NEG.	0.154
180	6.3.2020	NEG	0.190	NEG.	0.171
181	9.3.2020	<b>POZ</b>	1.874	NEG.	0.429
182	11.3.2020	NEG	0.099	NEG.	0.269
183	11.3.2020	<b>POZ</b>	1.416	NEG.	0.092
184	11.3.2020	NEG	0.165	NEG.	0.198
185	11.3.2020	NEG	0.071	NEG.	0.178
186	12.3.2020	NEG	0.270	NEG.	0.318
187	12.3.2020	NEG	0.159	NEG.	0.481
188	12.3.2020	NEG	0.413	NEG.	0.217
189	12.3.2020	NEG	0.151	NEG.	0.234
190	13.3.2020	NEG	0.074	NEG.	0.149
191	14.3.2020	NEG	0.082	NEG.	0.377
192	16.3.2020	<b>POZ</b>	7.846	NEG.	0.785
193	16.3.2020	NEG	0.145	NEG.	0.312
194	18.3.2020	NEG	0.312	NEG.	1.382;0.382;0.511
195	7.4.2020	NEG	0.156	NEG.	0.351
196	10.4.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	14;14
197	14.4.2020	NEG	0.69	NEG.	0.123
198	15.4.2020	NEG	0.098	NEG.	0.185
199	15.4.2020	<b>poz. slabo</b>	0.971;1.089	NEG.	0.198
200	15.4.2020	<b>POZ</b>	7.288	NEG.	0.335
201	17.4.2020	NEG	0.591	NEG.	0.087
202	20.4.2020	NEG	0.120	NEG.	0.481
203	21.4.2020	NEG	0.137	NEG.	0.441
204	22.4.2020	NEG	0.440	NEG.	0.192
205	23.4.2020	NEG	0.142	NEG.	0.351
206	24.4.2020	NEG	0.174	NEG.	0.497
207	28.4.2020	NEG	0.149	NEG.	0.210
208	4.5.2020	NEG	0.500	NEG.	0.133
209	5.5.2020	NEG	0.198	NEG.	0.273
210	5.5.2020	NEG	0.190	NEG.	0.246
211	5.5.2020	NEG	0.102	NEG.	0.309
212	5.5.2020	NEG	0.207	NEG.	0.388
213	8.5.2020	NEG	0.159	NEG.	0.383
214	11.5.2020	NEG	0.127	NEG.	0.346
215	12.5.2020	NEG	0.119	NEG.	0.272
216	13.5.2020	NEG	0.133	NEG.	0.265

217	14.5.2020	<b>POZ</b>	3.642;3.349	NEG.	0.165
218	14.5.2020	NEG	0.133	NEG.	0.622
219	14.5.2020	NEG	0.099	NEG.	0.257
220	19.5.2020	NEG	0.122	NEG.	0.226
221	20.5.2020	NEG	0.230	NEG.	0.280
222	20.5.2020	<b>poz. slabo</b>	0.969;1.089	NEG.	0.267
223	21.5.2020	NEG	0.185	NEG.	0.287
224	21.5.2020	NEG	0.079	NEG.	0.218
225	23.5.2020	NEG	0.188	NEG.	0.336
226	25.5.2020	NEG	0.065	NEG.	0.189
227	25.5.2020	NEG	0.145	NEG.	0.300
228	26.5.2020	NEG	0.805	NEG.	0.303
229	26.5.2020	NEG	0.170	NEG.	0.252
230	26.5.2020	NEG	0.199	NEG.	0.171
231	26.5.2020	NEG	0.128	NEG.	0.262
232	27.5.2020	NEG	0.113	NEG.	0.178
233	27.5.2020	NEG	0.108	NEG.	0.222
234	28.5.2020	NEG	0.042	NEG.	0.064
235	29.5.2020	NEG	0.230	NEG.	0.434
236	29.5.2020	NEG	0.210	NEG.	0.229
237	1.6.2020	<b>POZ</b>	10	NEG.	0.382
238	1.6.2020	NEG	0.195	NEG.	0.252
239	1.6.2020	<b>POZ</b>	7.539	NEG.	0.332
240	1.6.2020	NEG	0.260	NEG.	0.579
241	1.6.2020	NEG	0.173	NEG.	0.269
242	1.6.2020	NEG	0.450	NEG.	0.232
243	2.6.2020	NEG	0.198	NEG.	0.262
244	3.6.2020	NEG	0.351	NEG.	0.352
245	3.6.2020	NEG	0.147	NEG.	0.289
246	4.6.2020	NEG	0.170	NEG.	0.178
247	6.6.2020	<b>POZ</b>	8.268	<b>POZ</b>	4.022;3.365
248	8.6.2020	<b>POZ</b>	6.908	<b>poz. slabo</b>	0.777;1.087;0.839
249	9.6.2020	NEG	0.113	NEG.	0.152
250	12.6.2020	NEG	0.173	NEG.	0.178
251	12.6.2020	NEG	0.224	NEG.	0.240
252	13.6.2020	NEG	0.584	NEG.	0.235
253	16.6.2020	NEG	0.224	NEG.	0.390
254	16.6.2020	NEG	0.330	NEG.	0.210
255	16.6.2020	NEG	0.056	NEG.	0.216
256	18.6.2020	NEG	0.267	NEG.	0.172
257	19.6.2020	NEG	0.210	NEG.	0.124
258	19.6.2020	NEG	0.450	NEG.	0.160
259	20.6.2020	NEG	0.100	NEG.	0.214
260	23.6.2020	<b>POZ</b>	1.851	NEG.	0.240
261	24.6.2020	NEG	0.117	NEG.	0.252
262	24.6.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.260;1.318

263	24.6.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.852;1.504
264	25.6.2020	NEG	0.235	NEG.	0.174
265	26.6.2020	NEG	0.179	NEG.	0.241
266	26.6.2020	NEG	0.142	NEG.	0.288
267	26.6.2020	NEG	0.457	NEG.	0.171
268	26.6.2020	NEG	0.116	NEG.	0.174
269	27.6.2020	NEG	0.182	NEG.	0.181
270	29.6.2020	NEG	0.248	NEG.	0.255
271	29.6.2020	NEG	0.130	NEG.	0.184
272	30.6.2020	<b>POZ</b>	2.061	NEG.	0.349
273	30.6.2020	NEG	0.087	NEG.	0.159
274	1.7.2020	NEG	0.113	NEG.	0.205
275	1.7.2020	NEG	0.523	NEG.	0.259
276	1.7.2020	NEG	0.175	NEG.	0.246
277	2.7.2020	NEG	0.130	NEG.	0.302
278	2.7.2020	NEG	0.248	NEG.	0.205
279	3.7.2020	NEG	0.105	NEG.	0.208
280	3.7.2020	<b>poz. slabo</b>	0.969;0.740	<b>poz. slabo</b>	1,215;0.813;0.908
281	3.7.2020	<b>POZ</b>	7.626	<b>POZ</b>	1.350;1.232
282	3.7.2020	NEG	0.116	NEG	0.319
283	3.7.2020	NEG	0.196	NEG.	0.367
284	7.7.2020	NEG	0.301	NEG.	0.505
285	7.7.2020	<b>POZ</b>	10	NEG.	0.437
286	7.7.2020	NEG	0.763	NEG.	0.238
287	7.7.2020	NEG	0.088	NEG.	0.421
288	7.7.2020	NEG	0.324	NEG.	0.385
289	8.7.2020	NEG	0.111	NEG.	0.186
290	8.7.2020	NEG	0.131	NEG.	0.244
291	8.7.2020	NEG	0.096	NEG.	0.142
292	9.7.2020	NEG	0.125	NEG.	0.147
293	9.7.2020	NEG	0.199	NEG.	0.172
294	10.7.2020	NEG	0.142	NEG.	0.276
295	10.7.2020	NEG	0.256	NEG.	0.500
296	13.7.2020	NEG	0.125	NEG.	0.191
297	13.7.2020	NEG	0.145	NEG.	0.332
298	13.7.2020	NEG	0.265	NEG.	0.428
299	13.7.2020	NEG	0.142	NEG.	0.342
300	14.7.2020	NEG	0.150	NEG.	0.311
301	14.7.2020	NEG	0.224	NEG.	0.244
302	15.7.2020	NEG	0.085	NEG.	0.234
303	15.7.2020	NEG	0.281	NEG.	0.273
304	16.7.2020	<b>POZ</b>	2.826	<b>POZ</b>	1.900;2.167;2.128
305	16.7.2020	NEG	0.144	NEG.	0.527
306	16.7.2020	<b>POZ</b>	1.450	NEG	0.492
307	16.7.2020	NEG	0.902;0.476	NEG.	0.328
308	20.7.2020	<b>POZ</b>	6.541	NEG.	0.894;0.836

309	20.7.2020	NEG	0.078	NEG.	0.184
310	21.7.2020	NEG	0.185	NEG.	0.288
311	21.7.2020	NEG	0.216	NEG.	0.301
312	21.7.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	9.826;8.818
313	22.7.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.586;1.388
314	23.7.2020	<b>POZ</b>	3.381		nije traženo
315	23.7.2020	NEG	0.267	NEG.	0.485
316	24.7.2020	<b>POZ</b>	6.220	NEG	0.381
317	24.7.2020	NEG	0.110	NEG.	0.145
318	27.7.2020	<b>POZ</b>	7.483	<b>POZ</b>	1.967;1.417
319	27.7.2020	<b>POZ</b>	1.808	NEG.	0.253
320	29.7.2020	NEG	0.172	NEG.	0.454
321	31.7.2020	NEG	0.500	NEG.	0.589
322	31.7.2020	<b>POZ</b>	2.501	NEG.	0.282
323	3.8.2020	NEG	0.195	NEG.	0.432
324	3.8.2020	NEG	0.189	NEG.	0.402
325	3.8.2020	<b>POZ</b>	5.765	<b>poz.slabo</b>	1.174;1.017
326	3.8.2020	<b>POZ</b>	5.869	NEG	0.392
327	3.8.2020	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.720;1.551
328	4.8.2020	NEG	0.209	NEG.	0.472
329	4.8.2020	NEG	0.161	NEG.	0.262
330	6.8.2020	NEG	0.467	NEG.	0.489
331	6.8.2020	<b>POZ</b>	1.572;1.292	<b>POZ</b>	2.739;3.205
332	6.8.2020	NEG	0.851	NEG.	0.252
333	7.8.2020	NEG	0.238;0.230	<b>POZ</b>	1.924;1.914
334	7.8.2020	NEG	0.153	NEG.	1.028;0.242;0.329
335	10.8.2020	NEG	0.051	NEG.	0.184
336	10.8.2020	NEG	0.142	NEG.	0.804
337	10.8.2020	NEG	0.088	NEG.	0.266
338	11.8.2020	<b>POZ</b>	6.873	NEG.	1.640;0.782;0.779
339	11.8.2020	NEG	0.210	NEG.	0.968
340	14.8.2020	NEG	0.085	NEG.	0.293
341	17.8.2020	NEG	0.080	NEG.	0.280
342	18.8.2020	NEG	0.469	NEG.	0.421
343	18.8.2020	<b>POZ</b>	10	NEG	0.325
344	18.8.2020	<b>POZ</b>	4.225	<b>poz. slabo</b>	0.966;1.120
345	18.8.2020	NEG	0.057	NEG.	0.157
346	20.8.2020	NEG	0.117	NEG.	0.187
347	20.8.2020	<b>POZ</b>	7.053	NEG.	0.270
348	20.8.2020	NEG	0.134	NEG.	0.251
349	20.8.2020	NEG	0.476	NEG.	0.273
350	25.8.2020	NEG	0.682	NEG.	0.789;0.949
351	21.8.2020	<b>POZ</b>	8.346	NEG.	0.971;0.888
352	24.8.2020	<b>POZ</b>	8.146	<b>POZ</b>	6.968
353	24.8.2020	NEG	0.208	<b>POZ</b>	1.477;1.305
354	26.8.2020	NEG	0.094	NEG.	0.162

355	27.8.2020	NEG	0.150	NEG.	0.231
356	29.8.2020	NEG	0.105	NEG.	0.108
357	31.8.2020	NEG	0.284	NEG.	0.231
358	31.8.2020	NEG	0.591	NEG.	0.174
359	1.9.2020	NEG	0.144	NEG.	0.202
360	2.9.2020	NEG	0.858	NEG.	0.150;0.166
361	3.9.2020	NEG	0.243	NEG	0.255
362	3.9.2020.	NEG	0.080	NEG	0.180
363	7.9.2020.	NEG	0.149	NEG	0.124
364	8.9.2020.	NEG	0.309	NEG	0.203
365	8.9.2020.	<b>POZ</b>	3.183	NEG	0.259
366	8.9.2020.	NEG	0.117	NEG	0.141
367	8.9.2020.	NEG	0.086	NEG	0.164
368	10.9.2020.	<b>POZ</b>	5.617	NEG	0.592
369	10.9.2020.	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	14
370	10.9.2020.	NEG	0.268	NEG	0.163
371	10.9.2020.	NEG	0.430	NEG	0.592
372	14.9.2020.	NEG	0.140	NEG	0.169
373	15.9.2020.	NEG	0.194	NEG	0.232
374	15.9.2020.	<b>POZ</b>	2.300	NEG	0.729
375	16.9.2020.	<b>POZ</b>	8.379	NEG	0.598
376	17.9.2020.	NEG	0.143	NEG	0.172
377	17.9.2020.	NEG	0.152	NEG	0.338
378	17.9.2020.	NEG	0.157	NEG	0.186
379	17.9.2020.	NEG	0.220	NEG	0.201
380	17.9.2020.	NEG	0.217	NEG	0.346
381	21.9.2020.	NEG	0.297	NEG	0.177
382	23.9.2020.	<b>POZ</b>	5.376	<b>POZ</b>	1.386
383	23.9.2020.	NEG	0.503	NEG	0.174
384	24.9.2020.	NEG	0.314	NEG	0.212
385	24.9.2020.	NEG	0.141	<b>POZ</b>	1.318
386	24.9.2020.	NEG	0.062	NEG	0.145
387	25.9.2020.	<b>POZ</b>	6.771	<b>POZ</b>	5.354
388	29.9.2020.	<b>POZ</b>	7.796	NEG	0.682
389	29.9.2020.	<b>POZ</b>	5.028	NEG	0.417
390	30.9.2020.	NEG	0.463	NEG	0.271
391	1.10.2020.	NEG	0.148	NEG	0.262
392	1.10.2020.	NEG	0.338	NEG	0.146
393	1.10.2020.	NEG	0.358	NEG	0.174
394	1.10.2020.	<b>POZ</b>	4.483	NEG	0.581
395	5.10.2020.	NEG	0.170	NEG	0.132
396	6.10.2020.	NEG	0.204	NEG	0.546
397	6.10.2020.	NEG	0.241	NEG	0.250
398	6.10.2020.	NEG	0.345	NEG	0.211
399	7.10.2020.	NEG	0.068	NEG	0.226
400	7.10.2020.	NEG	0.259	NEG	0.203

401	7.10.2020.	NEG	0.136	NEG	0.165
402	7.10.2020.	<b>POZ</b>	10	NEG	0.958, 0.973
403	7.10.2020.	<b>POZ</b>	7.730	NEG	0.730, 0.729
404	8.10.2020.	NEG	0.105	NEG	0.468
405	8.10.2020.	NEG	0.134	NEG	0.394
406	8.10.2020.	NEG	0.136	NEG	0.345
407	8.10.2020.	NEG	0.136	NEG	0.216
408	9.10.2020.	NEG	0.477	NEG	0.174
409	12.10.2020.	NEG	0.443	NEG	0.226
410	12.10.2020.	NEG	0.398	NEG	0.548, 0.411
411	13.10.2020.	<b>POZ</b>	8.234	NEG	0.304
412	13.10.2020.	NEG	0.199	NEG	0.593
413	13.10.2020.	<b>POZ</b>	2.257	NEG	0.337
414	13.10.2020.	NEG	0.312	NEG	0.211
415	13.10.2020.	<b>POZ</b>	3.768	NEG	0.389
416	14.10.2020.	NEG	0.150	NEG	0.286
417	14.10.2020.	<b>POZ</b>	5.234	NEG	0.319
418	14.10.2020.	NEG	0.133	NEG	0.307
419	15.10.2020.	NEG	0.329	NEG	0.136
420	15.10.2020.	NEG	0.306	NEG	0.253
421	15.10.2020.	NEG	0.221	NEG	0.235
422	16.10.2020.	NEG	0.091	NEG	0.232
423	16.10.2020.	NEG	0.179	NEG	0.311
424	16.10.2020.	NEG	0.176	NEG	0.189
425	16.10.2020.	<b>POZ</b>	4.846	NEG	0.170
426	19.10.2020.	NEG	0.239	NEG	0.295
427	21.10.2020.	NEG	0.134	NEG	0.228
428	22.10.2020.	NEG	0.266	NEG	0.194
429	22.10.2020.	NEG	0.685	NEG	0.396
430	23.10.2020.	<b>POZ</b>	3.821	NEG	0.304
431	23.10.2020.	NEG	0.133	NEG	0.168
432	23.10.2020.	NEG	0.272	NEG	0.468
433	24.10.2020.	NEG	0.198	NEG	0.251
434	26.10.2020.	NEG	0.399	NEG	0.231
435	26.10.2020.	NEG	0.165	NEG	0.231
436	26.10.2020.	NEG	0.212	NEG	0.280
437	27.10.2020.	NEG	0.202	NEG	0.468
438	27.10.2020.	NEG	0.145	NEG	0.175
439	28.10.2020.	NEG	0.108	NEG	0.225
440	28.10.2020.	NEG	0.117	NEG	0.187
441	28.10.2020.	NEG	0.222	NEG	0.315
442	28.10.2020.	<b>poz. slabo</b>	0.946, 0,443, 1.017	NEG	0,434
443	29.10.2020.	NEG	0.063	NEG	0.328
444	29.10.2020.	NEG	0.254	NEG	0.555
445	20.10.2020.	NEG	0.180	<b>POZ</b>	1.479, 1.483
446	31.10.2020.	NEG	0.339	NEG	0.223



447	2.11.2020.	<b>POZ</b>	1.169	NEG	0.223
448	3.11.2020.	NEG	0.182	NEG	0,214
449	5.11.2020.	<b>POZ</b>	2.067	NEG	0.248
450	5.11.2020.	NEG	0.082	NEG	0.333
451	6.11.2020.	<b>POZ</b>	6.230	<b>poz. slabo</b>	1.017, 1.080
452	9.11.2020.	NEG	0.150	NEG	0.511
453	9.11.2020.	NEG	0.156	NEG	0.430
454	9.11.2020.	<b>POZ</b>	1.367	NEG	0.239
455	9.11.2020.	<b>POZ</b>	3.621	NEG	0.218
456	10.11.2020.	<b>POZ</b>	4.637	NEG	0.265
457	11.11.2020.	NEG	0.203	NEG	0.389
458	11.11.2020.	<b>POZ</b>	2.952	<b>poz. slabo</b>	1.278
459	12.11.2020.	NEG	0.150	NEG	0.136
460	12.11.2020.	NEG	0.531	NEG	0.260
461	12.11.2020.	NEG	0.172	NEG	0.228
462	16.11.2020.	NEG	0.176	NEG	0.448
463	16.11.2020.	NEG	0.567	NEG	0.376
464	17.11.2020.	NEG	0.360	NEG	0.384
465	17.11.2020.	<b>POZ</b>	7.236	NEG	0.809, 1.122, 0.882
466	19.11.2020.	NEG	0.147	NEG	0.242
467	19.11.2020.	NEG	0.221	NEG	0.579, 0.358,
468	19.11.2020.	NEG	0.394	NEG	0.163
469	20.11.2020.	<b>POZ</b>	4.388	<b>POZ</b>	3.087, 3.489
470	20.11.2020.	NEG	0.279	NEG	0.241
471	24.11.2020.	<b>POZ</b>	10	NEG	0.767
472	24.11.2020.	NEG	0.278	NEG	0.218
473	25.11.2020.	<b>POZ</b>	7.943	NEG	0.237
474	25.11.2020.	NEG	0.131	NEG	0.156
475	26.11.2020.	<b>POZ</b>	2.858	NEG	0.496
476	26.11.2020.	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.302
477	26.11.2020.	<b>POZ</b>	5.224	NEG	0.328
478	27.11.2020.	NEG	0.331	NEG	0.131
479	30.11.2020.	NEG	0.191	NEG	0.151
480	30.11.2020.	NEG	0.077	NEG	0.200
481	2.12.2020.	NEG	0.150	NEG	0.165
482	2.12.2020.	NEG	0.262	NEG	0.193
483	3.12.2020.	<b>POZ</b>	2.55	NEG	0.725, 0.687
484	4.12.2020.	NEG	0.756	NEG	0.319
485	4.12.2020.	NEG	0.511	NEG	0.150
486	7.12.2020.	NEG	0.607	NEG	0.140
487	8.12.2020.	NEG	0.773	NEG	0.237
488	9.12.2020.	NEG	0.599	NEG	0.146
489	9.12.2020.	NEG	0.535	NEG	0.130
490	11.12.2020.	NEG	0.353	NEG	0.292
491	12.12.2020.	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.376, 1.381
492	14.12.2020.	NEG	0.334	NEG	0.170

<b>493</b>	14.12.2020.	NEG	0.353	NEG	0.190
<b>494</b>	14.12.2020.	NEG	0.495	NEG	0.158
<b>495</b>	15.12.2020.	NEG	0.181	NEG	0.187
<b>496</b>	16.12.2020.	NEG	0.167	NEG	0.170
<b>497</b>	16.12.2020.	NEG	0.187	NEG	0.161
<b>498</b>	16.12.2020.	NEG	0.471	NEG	0.246
<b>499</b>	16.12.2020.	NEG	0.351	NEG	0.402
<b>500</b>	18.12.2020.	NEG	0.164	NEG	0.167
<b>501</b>	22.12.2020.	NEG	0.237	NEG	0.191
<b>502</b>	22.12.2020.	<b>poz. slabo</b>	1.015	NEG	0.356
<b>503</b>	23.12.2020.	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	6.654, 5.165
<b>504</b>	23.12.2020.	NEG	0.1863	NEG	0.1941
<b>505</b>	28.12.2020.	<b>POZ</b>	10	<b>POZ</b>	1.073, 1.346, 1.213
<b>506</b>	31.12.2020.	NEG	0.658	NEG	0.319

## 9.2. Detaljan statistički izračun

### 9.2.1. Statističko ispitivanje HEV IgM seroprevalencije

Opaženo (O)		HEV IgM Dia.Pro test		UKUPNO
		+	-	
GRUPA	DDK	446	90	1036
	TP	47	457	504
UKUPNO		93	1447	1540

*Tablica 7. Opažena kontingencijska tablica*

Rizik HEV IgM pozitiviteta za svaku grupu:

$$R_{TP} = N_{\text{pozitivnih}}/N_{\text{ukupno}} = 47/504 = 0,0933$$

$$R_{DDK} = N_{\text{pozitivnih}}/N_{\text{ukupno}} = 46/1036 = 0,0444$$

Relativni rizik (RR):

$$RR = R_{TP}/R_{DDK} = 0,0933/0,044 = 2,1$$

Je li RR statistički značajno različit od 1, statistički se ispituje u nastavku. Izrađena je očekivana kontingencijska tablica gdje su vrijednosti izračuna prema izrazu:

$$E_r = M_r \times M_c / N$$

( $M_r$  – ukupno u redu,  $M_c$  – ukupno u stupcu,  $N$  – svi uzorci zajedno)

OČEKIVANO (E)		HEV IgM Dia.Pro test		UKUPNO
		+	-	
GRUPA	DDK	1036x93/1540 = 63	1036x1447/1540= 973	1036
	TP	504x93/1540 = 30	504x1447/1540 = 474	504
UKUPNO		93	1447	1540

**Tablica 8.** Očekivana kontingencijska tablica koja pretpostavlja da je rizik HEV IgM pozitiviteta u obje grupe jednak ( $H_0$ )

Sada kada je izrađena očekivana kontingencijska tablica imamo podatke za izračun  $\chi^2$  vrijednosti i to prema izrazu:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

$$\chi^2 = (46-63)^2/63 + (990-973)^2/973 + (47-30)^2/30 + (457-474)^2/474$$

$$\chi^2 = 15,13$$

Grafičnu  $\chi^2$  vrijednost uzeta je iz tablice (poglavlje 3) :

$$\chi^2_{df=1, \alpha=0,05} = 3,84$$

S obzirom da je  $\chi^2 > \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}$  zaključeno je da se  $H_0$  odbacuje i da je RR statistički značajno različit od 1 uz razinu značajnosti testa koja iznosi  $\alpha=0,05$ .

### 9.2.2. Statističko ispitivanje HEV IgG seroprevalencije

Opaženo (O)		HEV IgG Dia.Pro test		UKUPNO
		+	-	
GRUPA	DDK	209	827	1036
	TP	117	387	504
UKUPNO		326	1214	1540

*Tablica 9. Opažena kontingencijska tablica*

Rizik HEV IgG pozitiviteta za svaku grupu:

$$R_{TP} = N_{\text{pozitivnih}}/N_{\text{ukupno}} = 117/504 = 0,2321$$

$$R_{DDK} = N_{\text{pozitivnih}}/N_{\text{ukupno}} = 209/1036 = 0,2017$$

Relativni rizik (RR):

$$RR = R_{TP}/R_{DDK} = 0,2321/0,2017 = 1,15$$

Je li RR statistički značajno različit od 1, statistički se ispituje u nastavku. Izrađena je očekivana kontingencijska tablica.

Očekivano (E)		HEV IgG Dia.Pro test		UKUPNO
		+	-	
GRUPA	DDK	1036x326/1540= 219	1036x1216/1540= 817	1036
	TP	504x326/1542= 107	504x1216/1542= 397	504
UKUPNO		326	1214	1540

**Tablica 10.** Očekivana kontingencijska tablica koja pretpostavlja da je rizik HEV IgG pozitiviteta u obje grupe jednak ( $H_0$ )

Sada kada je izrađena očekivana kontingencijska tablica imamo podatke za izračun  $\chi^2$  vrijednosti i to prema izrazu:

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

$$\chi^2 = (209-219)^2/219 + (827-817)^2/817 + (117-107)^2/107 + (387-397)^2/397$$

$$\chi^2 = 1,77$$

Graničnu  $\chi^2$  vrijednost uzeta je iz tablice (poglavlje 3) :

$$\chi^2_{df=1, \alpha=0,05} = 3,84$$

S obzirom da je  $\chi^2 < \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}$  zaključeno je da se  $H_0$  prihvaća i da RR statistički nije značajno različit od 1 uz razinu značajnosti testa koja iznosi  $\alpha=0,05$ .

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Serološko testiranje hepatitis E virusne infekcije u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu

Krešimir Franić

### SAŽETAK

Za virus hepatitisa E (HEV) karakteristično je da ga većina ljudi preboli asimptomatski. Ipak, za određene skupine kao što su trudnice, pacijenti na imunosupresivnoj terapiji te za imunokompromitirane pojedince s već postojećim bolestima jetre, HEV infekcija može dovesti do letalnog ishoda. Tijekom 16 mjeseci (2019. i 2020. godine), nešto više od 500 pacijenata serološki je ispitivano na biljege hepatitisa E u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu (HZTM), i to u Odjelu za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti (OKB). Korišteni su komercijalni HEV IgG Dia.Pro i HEV IgM Dia.Pro testovi koji se temelje na ELISA metodi. Ispitivanja su obavljena na Gemini analizatoru i kompletan protokol pratio je upute proizvođača. Obzirom na rezultate testiranja pacijenata (TP), HEV IgG seroprevalencija iznosi 23,2 % (117 uzoraka) dok je stopa HEV IgM seroprevalencije 9,3 % (47 uzoraka). HZTM još je 2014. godine proveo seroprevalencijsku studiju koja je obuhvatila 1036 uzoraka dobrovoljnih darivatelja krvi (DDK). HEV seroprevalencija u DDK-a procijenjena je s četiri dostupna testa (3 ELISA i 1 imunoblot (IB) test). Uspoređeni su rezultati dobiveni Dia.Pro testom. HEV IgM seroprevalencija među TP statistički je značajno veća u odnosu na DDK (9,3 % naspram 4,4 %) što je dokazano hi-kvadrat testom ( $\chi^2$  test) uz razinu značajnosti testa  $\alpha=0,05$  ( $\chi^2=15,13 > \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}=3,84$ ,  $p < 0,05$ ). Ova veća HEV IgM seroprevalencija može se objasniti činjenicom da je riječ o pacijentima kod kojih je liječnik posumnjao na HEV infekciju. Rezultati ove studije pokazuju da je, ukoliko pacijent ima simptome virusnog hepatitisa, a uobičajeni uzročnici su isključeni (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV), preporučljiva serološka dijagnostika na biljege virusnog hepatitisa E. Statistički značajna razlika nije primijećena kod HEV IgG seroprevalencije (23,2 % naspram 20,2 %,  $\chi^2=1,77 < \chi^2_{df=1, \alpha=0,05}=3,84$ ,  $p > 0,05$ ) što upućuje na zaključak da je HEV i naša autohtona infekcija.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

- Rad sadrži: 49 stranica, 12 grafičkih prikaza, 10 tablica i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: hepatitis E, kliničko testiranje pacijenata, seroprevalencija
- Mentor: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
- Komentor: **Dr. sc. Manuela Miletić**, specijalist medicinske biokemije, Dom zdravlja Zagrebačke županije, Velika Gorica
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Manuela Miletić**, specijalist medicinske biokemije, Dom zdravlja Zagrebačke županije, Velika Gorica

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Biochemistry and Molecular Biology  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Serological testing of hepatitis E virus infection at the Croatian Institute of Transfusion Medicine

Krešimir Franić

#### SUMMARY

The characteristic of hepatitis E virus (HEV) is that most people get over it asymptotically. However, for certain groups such as pregnant women, patients on immunosuppressive therapy and immunocompromised individuals with pre-existing liver diseases, HEV infection can lead to a fatal outcome. During 16 months (2019 and 2020), slightly more than 500 were serologically tested for hepatitis E markers at the Croatian Institute for Transfusion Medicine (CITM), in the Department for Diagnostics of Blood Transmitted Diseases. Commercial HEV IgG Dia.Pro and HEV IgM Dia.Pro tests were used. The principle of used method is ELISA. Tests were performed on Gemini analyzer and the complete procedure followed the producer's instructions. Considering the results of patient testing (TP), the HEV IgG seroprevalence is 23.2 % (117 samples) while the HEV IgM seroprevalence rate is 9.3 % (47 samples). In 2014, CITM conducted a seroprevalence study that included 1036 samples from voluntary blood donors (VBD). HEV seroprevalence in VBD was assessed with four available tests (3 ELISA and 1 immunoblot (IB) test). The results obtained with Dia.Pro test were compared. HEV IgM seroprevalence among TP is significantly higher compared to VBD (9.3 % vs. 4.4 %) as proven by the chi-square test ( $\chi^2$  test) with a significance level of  $\alpha=0.05$  ( $\chi^2=15.13 > \chi^2_{df=1, \alpha=0.05}=3.84$ ,  $p < 0.05$ ). This higher HEV IgM seroprevalence can be explained by the fact that these are patients in whom the doctor suspected HEV infection. The results of these studies show that, if the patient has symptoms of viral hepatitis, and the usual causative agents are excluded (HAV, HBV, HCV, EBV, CMV), serological diagnosis for markers of viral hepatitis E is recommended. No statistically significant difference was observed in HEV IgG seroprevalence (23.2 % vs. 20.2 %,  $\chi^2=1.77 < \chi^2_{df=1, \alpha=0.05}=3.84$ ,  $p > 0.05$ ) which leads to the conclusion that HEV is also our autochthonous infection.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Thesis includes: 49 pages, 12 figures, 10 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: hepatitis E, clinical testing of patients, seroprevalence

Mentor: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Manuela Miletić, Ph.D.**, *European Specialist in Laboratory Medicine*, Zagreb County Health Center Velika Gorica

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Anita Somborac Bačura, Ph.D.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Manuela Miletić, Ph.D.**, *European Specialist in Laboratory Medicine*, Zagreb County Health Center Velika Gorica

The thesis was accepted: January 2023.



