

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

dr Aleksandar M. Urošević

**Kliničke karakteristike, dugoročna prognoza i
funkcionalni ishod kod obolelih od
neuroinvazivnog oblika
Groznice Zapadnog Nila**

doktorska disertacija

Beograd, 2016. godina

UNIVERSITY IN BELGRADE

MEDICAL FACULTY

dr Aleksandar M. Urošević

**Clinical characteristics, long-term prognosis
and functional outcome in patients with
West Nile virus
neuroinvasive disease**

doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

MENTOR:

Prof. Dr Olga Dulović, redovni profesor, Klinika za infektivne i tropske bolesti
Kliničkog Centra Srbije, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

1. Prof. Dr Đorđe Jevtović, redovni profesor, Klinika za infektivne i tropske bolesti, Klinički Centar Srbije, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. Doc. Dr Branko Milošević, docent, Klinika za infektivne i tropske bolesti, Klinički Centar Srbije, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. Prof. Dr Svetlana Nikolić, redovni profesor u penziji, Klinika za infektivne i tropske bolesti, Klinički Centar Srbije, Medicinski Fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE: ____ / ____ / _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Olgi Dulović na ukazanom poverenju, nesebično prenetom znanju i iskustvu, kao i na savetima tokom izrade ove disertacije. Veliku zahvalnost dugujem doc. dr Branku Miloševiću na pomoći i podršci u stručnom i naučnom usavršavanju. Zahvaljujem se i ostalim članovima komisije, prof. dr Svetlani Nikolić i prof. dr Đorđu Jevtoviću. Posebno se zahvaljujem svojoj porodici i prijateljima na podršci i razumevanju, bez kojih izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

Posvećeno

Milici i Isidori

KLINIČKE KARAKTERISTIKE, DUGOROČNA PROGNOZA I FUNKCIONALNI ISHOD KOD OBOLELIH OD NEUROINVAZIVNOG OBLIKA GROZNICE ZAPADNOG NILA

REZIME

Uvod: Virus Zapadnog Nila (engl. West Nile virus - WNV) je neurotropni arbovirus, čija se cirkulacija u prirodi održava uspostavljanjem enzootskog ciklusa između komaraca i ptica a čovek predstavlja zadesnog, terminalnog domaćina infekcije. WNV je prvi put identifikovan u oblasti West Nile u Ugandi, 1937. godine, a povoljna ekološka situacija u oblasti Mediterana i Balkana dovodi do širenja WNV u ovu oblast i pojave epidemija u Italiji 2008-2009, Grčkoj i Rumuniji 2010, Grčkoj i Italiji 2011, Srbiji i Hrvatskoj 2012. godine. Do simptomatske WNV infekcije dolazi kod oko 20% inficiranih osoba, a kod manje od 1% inficiranih dolazi do pojave neuroinvasivnog oblika WNF (engl. West Nile virus neuroinvasive disease-WNND). WNND se klinički najčešće manifestuje kao meningitis (engl. West Nile meningitis- WNM), encefalitis (engl. West Nile encephalitis- WNE) i/ili akutna flacidna slabost (engl. Acute flaccid paralysis - AFP). Serološke analize krvi i CST (engl. enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA test) predstavljaju zlatni standard u dijagnostici humane WNV infekcije. U ovom trenutku ne postoji zvanično prihvaćena vakcina niti terapija specifična za humanu WNV infekciju. Najveći procenat smrtnih ishoda povezan sa WNV infekcijom u vezi je sa WNND, a veći mortalitet se uočava kod bolesnika sa encefalitisom (oko 20%) i sa AFP (10-50%) nego kod bolesnika sa meningitisom (1%). Perzistirajuće neurološke sekvele i nepotpun funkcionalni oporavak mogu se održavati mesecima i godinama posle WNND, a kod ovih bolesnika česti su simptomi poput malaksalosti, mišićne slabosti, glavobolje, otežanog pamćenja i depresije.

Cilj: Utvrditi faktore povezane sa razvojem encefalitisa kao teške kliničke forme WNND, faktore povezane sa nepovoljnom kratkoročnom i dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom i ispitati prediktivni značaj navedenih faktora.

Materijal i metode: U ispitivanje su uključeni bolesnici koji su lečeni u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije u Beogradu, tokom 2012. i 2013. godine i koji su ispunjavali kliničke i laboratorijske kriterijume za dijagnozu WNND. Na osnovu kliničke forme WNND, bolesnici su podeljeni u kategoriju sa meningitisom i kategoriju sa encefalitisom. Bolesnici sa meningitisom i encefalitisom svrstavani su u kategoriju bolesnika sa encefalitisom. Bolesnici sa znacima AFP udružene sa meningitisom ili encefalitisom svrstavani su u jednu od te dve kategorije. Kratkoročnom prognozom se označavao ishod na kraju hospitalizacije, na osnovu kog su bolesnici podeljeni u dve kategorije: preživeli i umrli. Dugoročnom prognozom podrazumevala se prognoza bolesnika sa WNND godinu dana po otpustu iz bolnice i funkcionalni ishod je procenjen uz pomoć modifikovane Rankin Skale (mRS) i Barthel indeksa, a povoljnim funkcionalnim ishodom smatrao se potpuni oporavak.

Rezultati: Kriterijume za uključivanje u istraživanje ispunilo je 207 bolesnika. Prosečna starost obolelih od WNND bila je 64.9 godina, a 72% obolelih bilo je uzrasta 60 i više (≥ 60) godina. Uzrast ≥ 60 godina registrovan je kod 129 (80.1%) bolesnika sa encefalitisom i 20 bolesnika (43.4%) sa meningitisom ($p < 0.001$). Odmakla životna dob (uzrast ≥ 60 godina) u univarijantnoj analizi predstavljala je faktor povezan sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom WNND ($p = 0.002$). Uzrast ≥ 60 godina je bio povezan i sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom ($p < 0.001$). Faktor rizika statistički značajno povezan sa razvojem encefalitisa bila je arterijska hipertenzija ($p = 0.001$). Odsustvo hroničnih bolesti kod obolelih od WNND bio je faktor povezan sa manjim rizikom od razvoja encefalitisa ($p < 0.001$). Arterijska hipertenzija, hronična

bubrežna insuficijencija i cerebrovaskularno oboljenje predstavljali su faktore povezane sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom, a arterijska hipertenzija, koronarna bolest i imunosupresija faktore povezane sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom WNND. Odsustvo hroničnih bolesti je bio faktor povezan sa povoljnijom i kratkoročnom i dugoročnom prognozom. Prosečna vrednost serumskog CRP bila je značajno veća kod bolesnika sa encefalitisom (50.7 ± 4.9 mg/L) nego kod bolesnika sa meningitisom (25.2 ± 4.7 mg/L) ($p=0.001$), vrednosti CRP >100 mg/L bile su prediktor smrtnog ishoda (OR 12.07; 95% CI 2.43-60.02). Na osnovu analize cerebrospinalne tečnosti obolelih od WNND, registrovane su prosečne vrednosti leukocita od $146/\text{mm}^3$, sa blagom predominacijom limfocita (52%), prosečnom proteinorahijom 1.04g/L i glikorahijom 4.0 mmol/L. Prosečna vrednost proteinorahije kod bolesnika sa encefalitisom (1.1 ± 0.53 g/L) bila je značajno veća nego kod bolesnika sa meningitisom (0.86 ± 0.48 g/L) ($p=0.015$), a proteinorahija >1g/L bila je nezavisni prediktor smrtnog ishoda (OR 7.21; 95% CI 1.56-33.8). Nuklearna magnetna rezonanca endokranijuma kod 6 bolesnika sa encefalitisom ukazala je na hiperintenzne T2W/FLAIR lezije u regijama tipičnim za WNND. Najteža komplikacija 15.5% kod bolesnika sa WNND bila je respiratorna insuficijencija sa potrebom mehaničkom ventilacionom potporom. Kod 161 bolesnika (78%) je registrovan encefalitis, a 46 bolesnika (22%) imalo je meningitis. AFP je registrovana kod 30 obolelih od WNND (14.5%) i kod svih je bila udružena sa encefalitisom, a prisustvo AFP je bilo povezano sa produženom hospitalizacijom i primenom mehaničke ventilacije. Klinički znaci rombencefalitisa registrovani su kod 84 bolesnika (40.6%). Svih 33 bolesnika (15.9%) sa smrtnim ishodom imalo je encefalitis. Potpuni funkcionalni oporavak posle godinu dana od otpusta zabeležen je kod 33/39 (84.6%) bolesnika sa meningitisom i kod 33/117 (28.2%) bolesnika sa encefalitisom ($p<0.001$).

Zaključak: WNND je sezonsko oboljenje koje je u Srbiji uzrokovano linijom 2 WNV, najčešće se javlja u Beogradskom okrugu u letnjem periodu, prenosi se ubodom komaraca, a boravak pored reke je najčešći rizik. Razvoj WNND je najčešći kod muškaraca uzrasta ≥ 60 godina, obolelih od arterijske hipertenzije, diabetes mellitusa ili koronarne bolesti. Uzrast ≥ 60 godina kod obolelih od WNND povezan je razvojem encefalitisa, nepovoljnom kratkoročnom i dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom. Arterijska hipertenzija predstavlja faktor povezan sa razvoj WNE, a arterijska hipertenzija, hronična bubrežna insuficijencija i prethodno cerebrovaskularno oboljenje predstavljaju faktore povezane sa smrtnim ishodom. Arterijska hipertenzija, koronarna bolest i imunosupresija su komorbiditeti povezani sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom, dok je odsustvo hroničnih bolesti faktor povezan sa povoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom. WNM se češće javlja kod mlađih bolesnika bez hroničnih bolesti, a karakterišu ga povoljna kratkoročna prognoza bez registrovanih smrtnih ishoda, povoljna dugoročna prognoza i uglavnom potpuni oporavak. Bolesnici sa WNE imaju nepovoljnu kratkoročnu i dugoročnu prognozu, sa potpunim oporavkom kod trećine obolelih. Razvoj encefalitisa predstavlja prediktor nepovoljne dugoročne prognoze. AFP kod obolelih od WNND je povezana sa dugotrajnom hospitalizacijom, respiratornom insuficijencijom, većom učestalošću smrtnog ishoda i nepovoljnom dugoročnom prognozom. Rombencefalitis je česta klinička forma kod obolelih od WNND u Srbiji, koji je povezan sa povoljnom kratkoročnom prognozom (izuzev obolelih sa encefalitisom moždanog stabla), ali i sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i svega trećinom bolesnika sa potpunim oporavkom.

Ključne reči: Virus Zapadnog Nila, neuroinvazivni oblik, smrtni ishod, dugoročna prognoza, funkcionalni ishod

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Infektivne bolesti

CLINICAL CHARACTERISTICS, LONG-TERM PROGNOSIS AND FUNCTIONAL OUTCOME IN PATIENTS WITH WEST NILE VIRUS NEUROINVASIVE DISEASE

ABSTRACT

Introduction: West Nile virus (WNV) is neurotropic arbovirus, which is maintained in nature by enzootic cycle between mosquitoes and birds. Humans are involved in this cycle as an incidental dead-end hosts. WNV was first identified in West Nile district in Uganda in 1937. Favored by the changes in ecologic situation, WNV emerged in Mediterranean and Balkan region and caused outbreaks in Italy in 2008-2009, Greece and Romania 2010, Greece and Italy 2011, Serbia and Croatia 2012. WNV infection is symptomatic in approximately 20% of those infected and less than 1% infected develops West Nile virus neuroinvasive disease (WNND). WNND is usually manifested as meningitis (WNM), encephalitis (WNE) and/or acute flaccid paralysis (AFP). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of blood and cerebrospinal fluid remains the gold standard in diagnostics of WNV infection. There is no registered vaccine or WNV specific therapy so far. Mortality from WNV infection is mostly associated with WNND, and fatality rate is bigger in WNE (20%) and AFP (10-50%) than in WNM (1%) cases. Persistent neurologic sequelae and incomplete functional recovery could be present months and years after the initial episode of WNND, and malaise, muscle weakness, headache, memory loss and depression are common symptoms.

Aim: To discover factors associated with encephalitis as the most severe form of WNND, factors associated with unfavorable short-term and long-term prognosis and functional outcome; to investigate predictive significance of these factors.

Methods: All the patients treated during 2012. and 2013. at Clinic for Infectious and Tropical Diseases, Clinical Center of Serbia, Belgrade, who met the clinical and laboratory criteria for WNND were included. Patients were divided in two categories based upon the clinical form of WNND: patients with meningitis and patients with encephalitis. Patients with meningoencephalitis were classified in the encephalitis group. Patients with AFP associated with meningitis or encephalitis were classified in one of those groups. Short-term prognosis was considered as the outcome at discharge, and cases were categorized in two groups: survived and dead. Long-term prognosis was considered as the functional outcome one year after the discharge, and it was estimated using modified Rankin Scale (mRS) and Barthel index. Complete recovery was considered as a favorable long-term functional outcome.

Results: Entry criteria were met by 207 patients. Mean age of WNND cases was 64.9, and 72% were 60 years and above (≥ 60). Age ≥ 60 was registered in 129 (80.1%) patients with WNE and 20 patients (43.4%) with WNM ($p < 0.001$). Advanced age was the factor associated with unfavorable short-term prognosis using the univariate analysis ($p = 0.002$). Age ≥ 60 was also associated with unfavorable long-term prognosis and functional outcome ($p < 0.001$). Arterial hypertension was found to be the risk factor associated with encephalitis development ($p = 0.001$). Lack of chronic illness in patients with WNND was found to be the factor associated with lower risk of encephalitis development ($p < 0.001$). Arterial hypertension, chronic renal insufficiency and history of cerebrovascular disease were strongly associated with death, and arterial hypertension, coronary disease and immunosuppression were strongly associated with unfavorable long-term prognosis and functional outcome. Lack of chronic illness was found to be associated with favorable short-term and long-term prognosis. Mean value of serum CRP was significantly higher in WNE patients (50.7 ± 4.9 mg/L) than in those with WNM (25.2 ± 4.7 mg/L) ($p = 0.001$) and value of CRP > 100 mg/L was the predictor of fatal outcome (OR

12.07; 95% CI 2.43-60.02). WNND patients cerebrospinal fluid analysis revealed the mean pleocytosis of $146/\text{mm}^3$, with mild lymphocytic predomination (52%), mean proteinorrhachia of 1.04g/L and glycorrachia of 4.0 mmol/L. Mean proteinorrhachia in WNE patients (1.1 ± 0.53 g/L) was significantly higher than in WNM (0.86 ± 0.48 g/L) ($p=0.015$), and proteinorrhachia >1 g/L was found to be the independent predictor of fatal outcome (OR 7.21; 95% CI 1.56-33.8). Brain nuclear magnetic resonance revealed hyperintense T2W/FLAIR lesions in typical areas in 6 patients with WNE. Respiratory failure was the most severe complication which was registered in 15.5% of patients with WNND. WNE was registered in 161 patients (78%) and 46 (22%) patients had WNM. AFP was registered in 30 patients with WNE and the presence of AFP was associated with prolonged hospitalization and mechanical ventilation. Clinical signs of rhombencephalitis were registered in 84 patients (40.6%). All 33 patients (15.9%) with fatal outcome had encephalitis. Complete functional recovery one year after discharge was registered in 84.6% of WNM patients and 28.2% of WNE patients ($p<0.001$).

Conclusion: WNND is a seasonal disease which is caused by lineage 2 WNV in Serbia, and it is most commonly present in Belgrade district during summer. WNV is transmitted by mosquitoes and the time spent near the river banks is the most frequent risk. WNND is more frequent in men ≥ 60 years with arterial hypertension, diabetes mellitus or coronary disease. Age ≥ 60 among patients with WNND is associated with more frequent encephalitis development, unfavorable short-term and long-term prognosis and functional outcome. Arterial hypertension is the risk factor for WNE, and arterial hypertension, chronic renal insufficiency and history of cerebrovascular disease are factors associated with fatal outcome. Arterial hypertension, coronary disease and immunosuppression are comorbidities associated with unfavorable long-term prognosis and functional outcome, while the lack of chronic illness is associated with higher chances for complete recovery. WNM is more common among

younger patients without chronic illnesses, and it is characterized by favorable short-term prognosis without fatal outcomes and favorable long-term prognosis with complete recovery in the majority of cases. WNE is the most common form of WNND and it is associated with unfavorable short-term and long-term outcome and complete recovery in only third of all cases. WNE development is the independent predictor of bad long-term prognosis. The presence of AFP among patients with WNND is associated with prolonged hospitalization, higher fatality rate, respiratory failure and unfavorable long-term prognosis. Rhombencephalitis is frequent form of WNND in Serbia and it is associated with favorable short-term prognosis (with the exception of brainstem encephalitis) but unfavorable long-term prognosis.

Keywords: West Nile virus, neuroinvasive disease, fatal outcome, long-term prognosis, functional outcome

Scientific field: Medicine - Infectious diseases

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Osnovne virusološke karakteristike virusa Zapadnog Nila	1
1.2.	Geografska distribucija i epidemiologija virusa zapadnog Nila	2
1.2.1.	Istorijat	2
1.2.2.	Ekološke karakteristike	4
1.2.3.	Prenošenje virusa zapadnog Nila	6
1.3.	Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila kod ljudi	7
1.4.	Kliničke karakteristike infekcije virusom Zapadnog Nila	9
1.4.1.	Kliničke manifestacije	9
1.4.2.	Neuroinvazivni oblik Groznice Zapadnog Nila	10
1.4.2.1.	Meningitis	11
1.4.2.2.	Encefalitis	11
1.4.2.3.	Akutna flakcidna slabost	12
1.4.3.	Citobiohemijska dijagnostika	12
1.4.4.	Virusološka dijagnostika	13
1.4.5.	Lečenje	14
1.4.6.	Kratkoročna prognoza i ishod	14
1.4.7.	Prevenција	14
1.5.	Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod neuroinvazivnog oblika Groznice Zapadnog Nila	16
2.	CILJEVI	17
3.	MATERIJAL I METODE	18
4.	REZULTATI	22
4.1.	Demografski podaci	22
4.2.	Komorbidity	29
4.3.	Simptomi, znaci i klinička forma oboljenja	32
4.3.1.	Simptomi i znaci	32

4.3.2.	Klinička forma oboljenja.....	36
4.4.	Laboratorijske analize.....	45
4.5.	Neuroradiološki nalazi.....	52
4.6.	Komplikacije.....	54
4.7.	Prediktori razvoja encefalitisa, smrtnog ishoda i nepovoljne dugoročne prognoze i funkcionalnog ishoda.....	56
5.	DISKUSIJA.....	58
6.	ZAKLJUČCI.....	80
7.	LITERATURA.....	82

1. UVOD

1.1. Osnovne virusološke karakteristike virusa Zapadnog Nila

Virus Zapadnog Nila (engl. West Nile virus - WNV) je neurotropni arbovirus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus* i serokompleksu virusa *Japanskog encefalitisa*. Genom WNV sastoji se iz jednolančane, pozitivno usmerene ribonukleinske kiseline veličine oko 12.000 nukleotida.

Postoji bar pet filogenetskih loza WNV, a do sada su samo filogenetska linija 1 WNV i filogenetska linija 2 povezivane sa značajnim oboljevanjem ljudi i uzrokovanjem epidemija (1). Filogenetska linija 1 WNV se može podeliti na 3 podtipa: izolati iz zapadne hemisfere, Afrike, srednjeg Istoka i Evrope pripadaju liniji 1a; Kunjin virus iz Australije predstavlja liniju 1b; izolati iz Indije pripadaju liniji 1c (2). Za liniju 2 WNV se donedavno smatralo da je manje patogena od linije 1 i da retko uzrokuje neuroinvazivni oblik infekcije, ali skorašnje epidemije ukazuju na cirkulaciju WNV linije 2 i njen neuropatogeni potencijal (3,4).

1.2. Geografska distribucija i epidemiologija virusa Zapadnog Nila

1.2.1. Istorijat

WNV je prvi put identifikovan kod bolesnice sa lakom febrilnom bolešću u Ugandi, 1937. godine, u oblasti West Nile, po kojoj je virus i dobio ime (5).

Prva epidemija uzrokovana WNV zabeležena je 1951. godine u Izraelu, u jednom malom gradiću u okolini Haife, gde je obolelo 123 osobe, bez smrtnih ishoda (6). U toku ove epidemije, do detalja su opisane kliničke karakteristike infekcije WNV, a kao glavni simptomi bolesti navedeni su povišena temperatura, glavobolja, mijalgije, anoreksija, abdominalni bolovi, egzantem i povraćanje.

Nekoliko velikih epidemija WNV u Egiptu u periodu od 1951. do 1954. godine dovelo je do još boljeg razumavanja ekologije, epidemiologije i kliničkih karakteristika WNV infekcije (6,7). Epidemiološke studije ukazale su na seroprevalencu od čak 60% u dolini Nila, a WNV infekcija je okarakterisana kao samoograničavajuća u većini slučajeva, sa malom učestalošću meningitisa ili encefalitisa. Uprkos tome što je vektorska priroda WNV infekcije pretpostavljena nekoliko godina ranije, istraživanja u Egiptu ukazala su na to da virus može biti izolovan samo kod komaraca ali ne i kod drugih artropoda, što je dovelo do zaključka da su primarni vektor upravo komarci. Tokom egipatskih istraživanja, sprovedene su i studije na bolesnicima sa terminalnom malignom bolešću, kojima je inokulisan WNV radi izazivanja pirogene reakcije koja bi dovela do, kako se tada smatralo, inhibicije rasta malignog tumora (8). Ova eksperimentalna istraživanja su dala dragocene rezultate, ukazujući na mogućnost detekcije WNV u krvi već posle 24 h od inokulacije, kao i na mogućnost održavanja viremije 6-12 dana, nekada i duže.

Usledile su epidemije u Izraelu 1957. godine, u Francuskoj 1962. godine i Južnoj Africi 1974. godine, tokom kojih su neurološke manifestacije bile retka pojava (9-11). Sporadične, manje epidemije sa sličnim karakteristikama obolelih javile su se još i u Rusiji, Španiji, Južnoj Africi i Indiji (12).

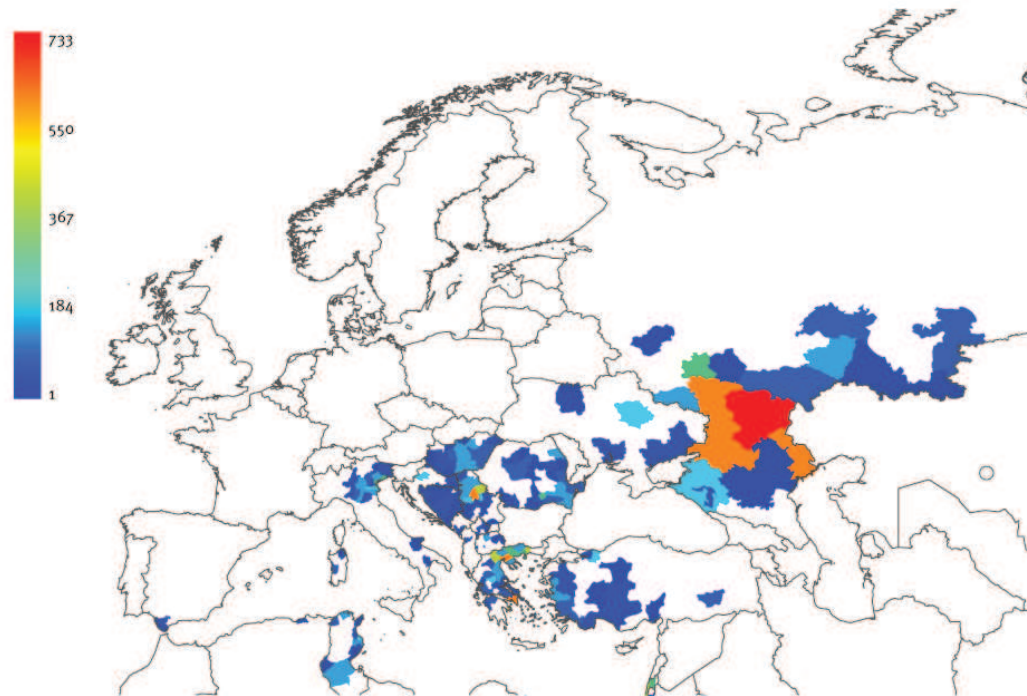
Tokom 90-ih godina XX veka, dolazi do značajnih promena epidemiologije i kliničkih karakteristika WNV infekcije. Velika epidemija WNV infekcije u Rumuniji 1996. godine, u okolini Bukurešta, bila je prva urbana epidemija i prva epidemija sa velikom učestalošću neuroinvazivnog oblika oboljenja. Epidemije u Maroku 1996. godine, u Tunisu 1997. godine; Italiji i Izraelu 1998. godine i Rusiji (okolina Volgograda) 1999. godine su se takođe karakterisale velikim brojem slučajeva sa neurološkim manifestacijama, zastupljenošću osoba starije životne dobi i visokom smrtnošću (12,13).

Prva epidemija WNV ikada zabeležena u Severnoj Americi dogodila se u Njujorku 1999. godine (14). Tokom narednih godina WNV se ustalio kao patogen u SAD do 2014. godine uzrokujući preko 40.000 obolelih od WNV infekcije sa 11.765 smrtnih ishoda (15).

Što se tiče Evrope, krajem prve decenije XI veka povoljna ekološka situacija u oblasti Mediterana i Balkana dovodi do širenja WNV u ovu oblast i pojave epidemija u Italiji 2008-2009, Grčkoj i Rumuniji 2010, Grčkoj i Italiji 2011, Srbiji i Hrvatskoj 2012.(16-21). Na slici broj 1. prikazan je kumulativni broj slučajeva WNV infekcije u Evropi i okolnim zemljama u periodu od 2010. do 2013. godine.

FIGURE 1

Cumulative number of human cases of West Nile virus infection in Europe and neighbouring countries, 2010 to 2013



Data source: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

Slika 1:Kumulativni prikaz slučajeva WNV infekcije u Evropi (slika dostupna na <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21135>)

1.2.2. Ekološke karakteristike WNV

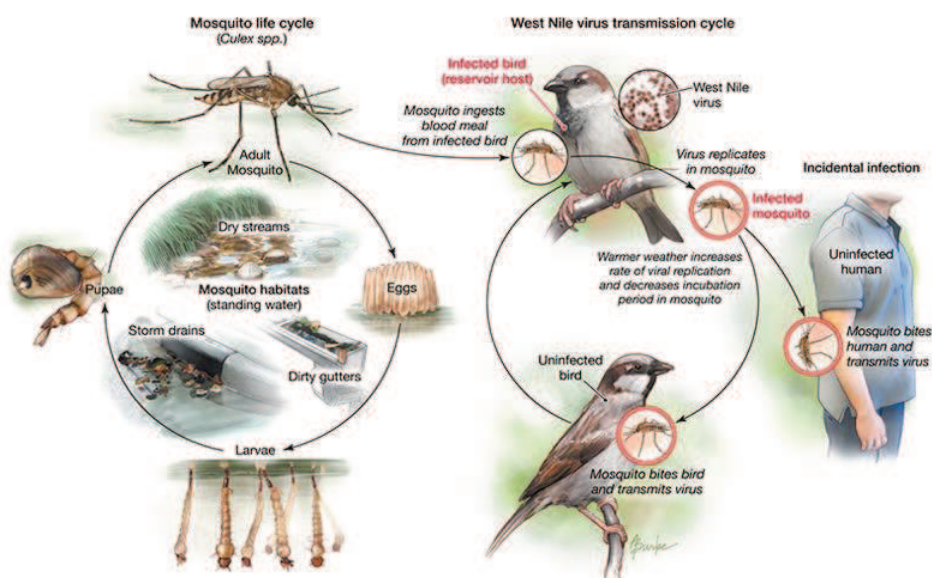
Cirkulacija WNV u prirodi se održava uspostavljanjem enzootskog ciklusa između više vrsta komaraca i preko 200 vrsta ptica. Komarci koji su najčešći vektori WNV pripadaju vrstama *Culex pipiens*, *Culex perexigius* i *Culex modestus*, dok je uloga drugih vrsta komaraca, pre svega *Aedes albopictus* još uvek nedovoljno ispitana (22).

WNV se kod zaraženih komaraca replikuje u raznim tkivima, uključujući centralni nervni sistem (CNS) i pljuvačne žlezde, uzrokujući necitopatogenu infekciju koja perzistira tokom čitavog života insekta. U ulozi komaraca kao vektora WNV, značajno je njihovo preživljavanje tokom zime radi započinjanja novog kruga infekcije, kao i mogućnost transovarijalnog

prenosa WNV sa ženki komaraca na njihova jaja, od kojih tokom proleća nastaju zrele jedinke sposobne da samostalno prenesu WNV (23,24).

Zaraženi komarci prenose infekciju na osetljive ptice kod kojih dolazi do viremije koja može trajati preko 100 dana, na osnovu čega ptice služe kao domaćin "pojačivač" (engl. amplifying host) (25). Najosetljivije na WNV infekciju su ptice iz roda *Passeriformes* (čavke, zebe, vrane, laste, ševe, vrapci) koje razvijaju visoku viremiju, a više od 80% komaraca koji ih ubodu postaje zaraženo (26). Zaražene ptice često prežive WNV infekciju i razvijaju trajni imunitet, ali osetljive jedinke mogu oboleti i uginuti. Povećanje smrtnosti među vranama i ostalim osetljivim pticama često prethodi pojavi humanih epidemija WNV u određenom regionu i može poslužiti kao svojevrsan nadzor (27). Migracija zaraženih ptica igra najvažniju ulogu u prenošenju WNV u nove geografske regione (28,29).

Čovek i još neki kičmenjaci (konj, pas, mačka) su osetljivi na WNV infekciju, ali kod njih je viremija niskog nivoa, zbog čega ne igraju značajnu ulogu u održavanju i prenošenju ovog virusa, već predstavljaju "terminalne" domaćine infekcije (slika broj 2)



Slika 2: Ciklus prenošenja WNV (slika dostupna na <http://www.alison-burke.com/works-lifescience.html>)

1.2.3. Prenošenje virusa Zapadnog Nila

Većina humanih slučajeva WNV infekcije nastaje kao posledica uboda zaraženih komaraca, ali se prenošenje virusa može odigrati i putem transfuzije krvi, transplantacije organa, dojenjem i transplacentarno (30,31). Kao retki, ali mogući putevi prenošenja WNV navode se respiratorni (putem aerosola), seksualni i prenošenje putem dijalize(32,33).

Istraživanja WNV infekcije kod trudnica ukazuju na 5% rizik od spontanog pobačaja, a rizik od prevremenog porođaja je 6%. Posebnu sklonost ka teškim formama oboljenja imaju bolesnici inficirani putem transplantiranog organa ili transfuzijom zaražene krvi, kod kojih je rizik za razvoj neuroinvazivnog oblika oboljenja značajno veći (34). Većina novorođene dece majki koje su tokom trudnoće inficirane WNV se rodi zdravo, ali su opisane kongenitalne forme oboljenja koje uključuju meningitis, encefalitis, horioretinitis, mikrocefaliju i intrakranijalne kalcifikacije (35).

1.3. Patogeneza humane infekcije virusom Zapadnog Nila

Najviše podataka o mehanizmima diseminacije i patogeneze WNV pružila su istraživanja na glodarima. Nakon intradermalnog uboda komarca zaraženog WNV i inokulacije virusa, prvo dolazi do njegove replikacije u Langerhansovim dendritičkim ćelijama (36). Dendritičke ćelije potom migriraju do regionalnih limfnih čvorova, odakle WNV prodire u krvotok i tako nastaje primarna viremija tokom koje se virus diseminuje u retikuloendotelni sistem (37). Replikacijom WNV u retikuloendotelnom sistemu nastaje sekundarna viremija, a završetak viremije koincidira sa pojavom serumskih antitela IgM klase, specifičnih za WNV. Virus se može izolovati iz krvi 1-2 dana posle uboda zaraženog komarca, a viremija najčešće traje do 7 dana. Kod čoveka je viremija najčešće niskog stepena i najčešće nije prisutna u fazi simptomatskog oboljenja, te se WNV retko izoluje iz krvi čak i uz upotrebu veoma osetljivih testova amplifikacije nukleinskih kiselina. Nasuprot tome, kod imunokompromitovanih bolesnika dolazi do prolongirane viremije i sporijeg razvoja antitela na WNV, što kao rezultat ima veću verovatnoću razvoja neuroinvazivnog oboljenja.

Mehanizmi kojim WNV i ostali neurotropni flavivirusi prolaze krvno-moždanu barijeru su uglavnom nepoznati, a prepostavlja se da najznačajniju ulogu igra hematogeni put prenosa. Kao drugi mogući mehanizmi koji doprinose razvoju infekcije CNS navode se: a) pasivni transport kroz endotel ili epitelijalne ćelije horoidnog pleksusa; b) infekcija olfaktornog nerva i transport kroz olfaktorni bulbus; c) mehanizam "Trojanskog konja" kada se virus prenosi do CNS putem inficiranih imunih ćelija i d) direktan aksonalni retrogradni transport iz inficiranih perifernih neurona (38-40).

Po ulasku u CNS, WNV dovodi do infekcije mikroglialnih ćelija koja je samoograničavajuća, ali dovodi do povećanog lučenja proinflamatornih citokina (interleukin-6, faktor tumorske nekroze α) i hemokina (CXCL10, CCL2,

CCL5). Infekcija nervnih ćelija WNV dovodi do povećane ekspresije hemokinskog receptora CCR5 i njegovog liganda CCL5 u CNS, što se povezuje sa infiltracijom CNS brojnim ćelijama koje eksprimiraju CCR5 receptor (CD4+ i CD8+ T limfociti, NK1.1+ ćelije, makrofagi) (41).

1.4. Kliničke karakteristike infekcije virusom Zapadnog Nila

1.4.1. Kliničke manifestacije

WNV infekcija je uglavnom asimptomatska, a do simptomatske infekcije dolazi kod oko 20% inficiranih (42). Posle inkubacije od 2-14 dana kod većine obolelih dolazi do pojave simptoma sličnih gripu: povišena temperatura, glavobolja, malaksalost, mijalgije, povraćanje i proliv (43). Ovaj nekomplikovan i samoograničavajući oblik WNV infekcije se naziva Groznica Zapadnog Nila (engl. West Nile Fever-WNF). Kod nekih bolesnika sa WNF se javlja makulozna ili makulopapulozna ospa, najčešće na trupu i ekstremitetima, koja je tranzitorna i može trajati vrlo kratko, nekada i manje od 24 sata (slika broj 3).



Slika 3: Prikaz makulopapulozne ospe kod WNV infekcije (slika dostupna na <http://medicaltreasure.com/west-nile-virus-rash/>)

Generalizovana limfadenopatija se takođe javlja kao jedna od manifestacija WNF. Prognoza WNF je uglavnom povoljna, smrtnost je niska i uglavnom se vezuje za starije uzrasne grupe i pogoršanje neke od hroničnih

bolesti. Kod prethodno zdravih osoba, oporavak od WNF može biti otežan, sa pojavom izražene malaksalosti koja utiče na svakodnevne aktivnosti i nekada perzistira mesecima (44).

Okularne manifestacije su česte tokom WNV infekcije. Najčešće se opisuju multifokalni horioretinitis i vitritis, za koje je karakteristično da kod većine obolelih protiču bez simptoma i spontano se oporavljaju (45,46). Od ostalih oftalmoloških manifestacija se navode iridociklitis, okluzivni vaskulitis i uveitis (47,48).

Kliničke manifestacije koje se sa različitom učestalošću mogu javljati u okviru WNV infekcije su miozitis sa znacima rabdomiolize, hepatitis, pankreatitis, miokarditis, orhitis i centralni insipidni diabetes (49-52).

1.4.2. Neuroinvazivni oblik Groznice Zapadnog Nila

Zahvaljujući neuroinvazivnosti i neurotropizmu WNV kod manje od 1% inficiranih osoba dolazi do pojave neuroinvazivnog oblika WNF (engl. West Nile virus neuroinvasive disease-WNND) (53).

Dok je kod mlađih osoba inficiranih WNV češća pojava WNF, rizik od razvoja WNND je značajno veći kod starijih bolesnika (54). Rizik kod starijih bolesnika se pre svega odnosi na pojavu encefalitisa, koji se u populaciji osoba starijih od 65 godina javlja kod 1 od 50 inficiranih (55). Ostali faktori rizika za razvoj WNND predstavljaju maligne bolesti, diabetes mellitus, arterijska hipertenzija, bubrežna bolest i muški pol (55-57). Imunokompromitovani bolesnici su pod povećanim rizikom od razvoja WNND, a procenjuje se da je ovaj rizik u grupi primalaca transplantiranog organa od inficiranog donora između 50% i 75% (58).

Što se tiče genetskih faktora predisponirajućih za razvoj WNND, osobe sa polimorfizmom gena za interferon-indukovanu oligoadenilatnu ciklazu i

homozigoti za delta 32 deleciju na genu koji kodira hemokinski receptor CCR5 su pod povećanim rizikom (59).

1.4.2.1. Meningitis

Meningitis uzrokovan WNV (engl. West Nile virus meningitis - WNM), slično drugim virusnim meningitisima, karakterističan je po naglom nastanku simptoma u vidu povišene temperature, glavobolje, povraćanja, ukočenog vrata, fotofobije, uz pojavu pozitivnih meningealnih znakova.

Teži slučajevi obolelih od meningitisa mogu zahtevati hospitalizaciju radi primene simptomatske terapije u lečenju glavobolje i dehidracije koja može nastati zbog profuznog povraćanja i proliva (60).

Kod obolelih od WNM odsutni su poremećaj svesti i fokalni neurološki simptomi i znaci, ali kod pojedinih slučajeva mogu se javiti tremor i mioklonus, kao i paraliza kranijalnih nerava (61).

1.4.2.2. Encefalitis

Encefalitis uzrokovan WNV (engl. West Nile virus encephalitis - WNE) nastaje zbog penetracije WNV u CNS i afekcije moždanog parenhima inflamatornim procesom, a u poređenju sa drugim kliničkim formama WNV encefalitis se češće javlja kod osoba starije životne dobi, naročito onih starijih od 55 godina (62).

WNE se klinički odlikuje povišenom temperaturom, malaksalošću, glavoboljom i drugim nespecifičnim simptomima WNV kojima se pridružuju poremećaj svesti i fokalni neurološki znaci, a po svojoj težini može varirati od blage i prolazne encefalopatije do teškog oblika encefalitisa praćenog komom i visokom smrtnošću (60).

Oboleli od encefalitisa često ispoljavaju neurološke znake kao što su ataksija, dizometrija, dizartrijska, miklonus, tremor i bradikinezija, što je posledica afiniteta WNV za moždane strukture bazalnih ganglija, moždanog stabla i cerebeluma (63-65).

Kliničke karakteristike WNE opisuju se i kod drugih flavivirusnih encefalitisa (Japanski encefalitis i Sent Luis encefalitis), te se oni međusobno ne mogu razlikovati na osnovu kliničke slike u akutnoj fazi oboljenja.

1.4.2.3. Akutna flakcidna slabost

Akutna flakcidna slabost (engl. Acute flaccid paralysis - AFP), povezana sa WNND može se javiti kao izolovana manifestacija ili kombinovano sa meningitisom ili encefalitisom (66). Do pojave AFP dolazi zbog virusne invazije prednjih rogova sive mase kičmene moždine, pa neki autori ovu formu WNND zbog svoje sličnosti sa poliomijelitisom ponekad označavaju i kao *polio-like sindrom* povezan sa WNV.

Učestalost AFP kod obolelih od WNND znatno varira u rezultatima objavljenih studija, a za razliku od encefalitisa, ovu formu oboljenja ne odlikuje predisponiranost starije populacije, već se s podjednakom učestalošću može javiti u bilo kom uzrastu (67).

AFP obolelih od WNND klinički se manifestuje u vidu naglo nastale, asimetrične, flakcidne slabosti jednog ili više ekstremiteta, bez gubitka senzibiliteta (68).

1.4.3. Citobiohemijska dijagnostika

Kompletna krvna slika obolelih od WNND je često bez većih odstupanja od normalnih vrednosti. Vrednosti leukocita su uglavnom u

referentnom opsegu ili su povišene, a moguća je i limfocitopenija i anemija lakšeg stepena (69).

Što se tiče biohemijskih analiza, povremeno se registruje hiponatrijemija, posebno kod obolelih od encefalitisa, a povišene vrednosti enzima jetre (AST, ALT) i mišićnih enzima (kreatin kinaza - CK) se beleže kod značajnog broja bolesnika sa WNND (70).

Citološka i biohemijska analiza cerebrospinalne tečnosti (CST) je od velikog značaja za dijagnostiku WNND. Citobiohemijski nalaz CST je kod ovih bolesnika uglavnom sličan kao i kod ostalih virusnih neuroinfekcija: laka do umerena pleocitoza sa predominacijom limfocita, lako do umereno povišena proteinorahija i normalna glikorahija (71).

1.4.4. Virusološka dijagnostika

Serološke analize krvi i CST (engl. enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA test) predstavljaju zlatni standard u dijagnostici humane WNV infekcije (70). Smatra se da se antitela specifična za WNV u IgM klasi kod 75% bolesnika pojave do 4. dana bolesti i kod 95% bolesnika do 7. dana bolesti. Otkrivanje WNV specifičnih antitela IgM klase u CST predstavlja ključ dijagnostike WNND, budući da su pokazatelj intratekalne sinteze antitela. Za razliku od drugih patogena, WNV specifična IgM pozitivnost može se održavati 12-16 meseci u serumu i 7 meseci u CST (72).

PCR (engl. polymerase chain reaction - PCR) dijagnostika se ne preporučuje u rutinskoj dijagnostici WNV infekcije, s obzirom na kratko trajanje viremije, što značajno utiče na smanjenu senzitivnost ove metode (73). Izolacija WNV putem kulture se takođe rutinski ne primenjuje zbog niske senzitivnosti.

1.4.5. Lečenje

U ovom trenutku ne postoji terapija specifična za humanu WNV infekciju koja je u rutinskoj upotrebi, mada je bilo pokušaja lečenja primenom ribavirina, interferona α i humanog imunoglobulina (71).

Bolesnici sa WNND se leče simptomatskom terapijom, a neki od njih zahtevaju lečenje u jedinicama intenzivne nege radi konstantnog monitoringa, prevencije i zbrinjavanja nastalih komplikacija, uz primenu mera fizikalne terapije (74).

1.4.6. Kratkoročna prognoza i ishod

Najveći procenat smrtnih ishoda povezan sa WNV infekcijom u vezi je sa WNND, a veći mortalitet se uočava kod bolesnika sa encefalitisom (oko 20%) i sa AFP (10-50%) nego kod bolesnika sa meningitisom (1%) (75).

Odmakla životna dob je jedan od faktora rizika koji se najčešće povezuju sa povećanom smrtnošću obolelih od WNND (14,76,77). Povećanje mortaliteta kod obolelih od WNND je pod značajnim uticajem hroničnih oboljenja kao što su kardiovaskularna oboljenja, hronične bubrežne bolesti, hronični hepatitis C i diabetes mellitus (3,14,78).

Kod značajnog procenta preživelih bolesnika sa WNND posle hospitalizacije neophodan je nastavak boravka u zdravstvenim ustanovama i primena rehabilitacije, a kod onih koji su otpušteni kući često je potrebna tuđa nega i pomoć (77).

1.4.7. Prevencija

Za sada nema registrovanih vakcina protiv WNV infekcije, mada postoje pokušaji da se efikasna vakcina proizvede (79).

Do pronalaženja vakcine protiv WNV infekcije koja će biti u širokoj upotrebi, prevencija je zasnovana na osnovnim principima, koji pre svega obuhvataju smanjenje broja komaraca, što su mere koje su pod jurisdikcijom državnih i opštinskih organa. Takođe je potrebno sprovesti i lične mere prevencije u cilju zaštite od uboda komaraca, kao što su primena repelenata, izbegavanje boravka pored reka i korišćenje zaštitnih mreža, što se naročito odnosi na kategorije sa povećanim rizikom od razvoja WNND.

1.5. Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod neuroinvazivnog oblika Groznice Zapadnog Nila

Dostupna saopštenja u svetskoj literaturi o dugoročnoj prognozi i sekvelama kod obolelih od WNND su najčešće rezultat istraživanja sprovedenih na osnovu anamnestičkih podataka dobijenih od bolesnika o njihovim kognitivnim i funkcionalnim poremećajima, a neka od istraživanja su izvršena uz korišćenje objektivnih, standardizovanih neuropsiholoških testova i upitnika.

Perzistirajuće neurološke sekvele i nepotpun funkcionalni oporavak mogu se održavati mesecima i godinama posle WNND, a kod ovih bolesnika česti su simptomi poput malaksalosti, mišićne slabosti, glavobolje, otežanog pamćenja i depresije (61,76,80,81). Neki od autora navode da se funkcionalni i kognitivni oporavak ne razlikuju značajno u zavisnosti od forme WNND, te da bolesnici sa meningitisom mogu imati prolongirane teškoće sa memorijom i koncentracijom, umorom i malaksalošću, slično bolesnicima sa WNF (76). Depresija se takođe opisuje kao moguća sekvela posle WNV infekcije, ali je rizik od teške depresije značajno veći kod bolesnika sa WNND (82). Sejvar navodi da neurološke sekvele i nepovoljan funkcionalni ishod ne moraju biti povezani sa lošim neurološkim statusom na početku bolesti i u svom istraživanju je zabeležio potpun oporavak takvih bolesnika, što je najverovatnije u vezi sa odsustvom komorbiditeta (61). Kod preživelih bolesnika sa AFP povezane sa WNND oporavak je spor, često sa višegodišnjom potrebom za kiseoničnom potporom (83).

2. CILJEVI

1. Ispitati demografske karakteristike obolelih od WNND i njihov uticaj na kliničku formu oboljenja, kratkoročnu i dugoročnu prognozu i funkcionalni ishod.
2. Ispitati učestalost komorbiditeta kod obolelih od WNND i njihov uticaj na kliničku formu oboljenja, kratkoročnu i dugoročnu prognozu i funkcionalni ishod bolesti.
3. Prikazati najčešće simptome i znake kod obolelih od WNND, odrediti učestalost različitih kliničkih formi oboljenja i ispitati uticaj kliničke forme bolesti na kratkoročnu i dugoročnu prognozu i funkcionalni ishod.
4. Prikazati vrednosti najznačajnijih biohemijskih i hematoloških analiza kod bolesnika sa WNND i njihovu povezanost sa kliničkom formom oboljenja, kratkoročnom i dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom.
5. Prikazati rezultate neuroradioloških pregleda sprovedenih kod obolelih od WNND.
6. Ispitati učestalost komplikacija kod bolesnika sa WNND i njihov uticaj na kratkoročnu i dugoročnu prognozu i funkcionalni ishod.
7. Analizirati prediktivni značaj faktora povezanih sa razvojem encefalitisa, faktora povezanih sa smrtnim ishodom i faktora povezanih sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom kod obolelih od WNND.

3. MATERIJAL I METODE

U ispitivanje su uključeni oboleli od WNND koji su lečeni u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije (KCS) u Beogradu, tokom 2012. i 2013. godine.

Prilikom sprovođenja istraživanja, ispoštovani su etički principi na kojima počiva Helsinška deklaracija. Istraživanje je odobreno od strane etičkog komiteta Medicinskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Svi bolesnici koji su uključeni u ispitivanje ispunjavali su kliničke i laboratorijske kriterijume za dijagnozu WNND.

Pod kliničkim kriterijumima za uključivanje u ispitivanje podrazumevalo se da oboleli imaju kliničku sliku neuroinvazivne bolesti, odnosno virusnog meningitisa, virusnog encefalitisa i/ili AFP jednog ili više ekstremiteta.

Virusnim meningitisom se smatralo oboljenje praćeno povišenom temperaturom, uz prisustvo meningealnih simptoma (glavobolja, ukočen vrat, povraćanje) i znakova (Kernigov znak, Brudzinski znak) i prisustvo pleocitoze u CST.

Virusnim encefalitisom je označena klinička slika kod obolelih sa prisustvom povišene temperature, uz bar jedan od sledećih kriterijuma: naglo nastao poremećaj svesti (kvalitativni i/ili kvantitativni), fokalni neurološki znaci, epileptični napad ili neuroradiološki pregled koji ukazuje na inflamaciju (kompjuterizovana tomografija - CT, nuklearna magnetna rezonanca - NMR).

AFP je definisana kao asimetrična, flakcidna slabost jednog ili više ekstremiteta, sa očuvanim senzibilitetom, koja se javila samostalno ili udružena sa meningitisom ili encefalitisom.

U istraživanju su korišćeni laboratorijski kriterijumi za dijagnozu WNF Evropskog Centra za Kontrolu i Prevenciju Bolesti (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC). Na osnovu ovih kriterijuma, svaka osoba koja je ispunjavala kliničke kriterijume, uz pozitivan serološki odgovor na WNV u IgM klasi u CST, smatrala se potvrđenim slučajem WNND. Svaka osoba koja je ispunjavala kliničke kriterijume uz pozitivan serološki odgovor na WNV u IgM ili IgG klasi u serumu smatrala se verovatnim slučajem WNND.

U ovom ispitivanju kao laboratorijski test za dijagnozu WNV infekcije je korišćen WNV specifični ELISA test (anti West Nile virus ELISA IgG and IgM EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG). Svi uzorci krvi i CST obolelih su analizirani uz pomoć ovog ELISA testa u Nacionalnoj laboratoriji za virusne hemoragične groznice i ARBO viruse u Institutu za virusologiju, vakcine i serume. Kod bolesnika sa inicijalno negativnim ELISA testom i visokim stepenom sumnje na WNV infekciju, ELISA test u serumu i/ili CST je ponavljan za 2-3 nedelje, sa istim tumačenjem laboratorijskih kriterijuma.

CT mozga korišćena je kao skrining metoda kako bi se isključili drugi, neinfektivni uzroci poremećaja svesti, a MR mozga je korišćen u zavisnosti od kliničkog nalaza.

Najčešći uzroci bakterijskih ili drugih virusnih infekcija CNS su isključeni uz korišćenje kulture CST, hemokultura i rutinskih virusoloških testova. Isključujući kriterijumi bili su vakcinacija protiv flavivirusnih obolenja (npr. žuta groznica), transfuzija krvi i transplantacija organa u poslednjih 6 meseci.

Kompletna laboratorijska dijagnostika, uključujući hematološke i biohemijske analize krvi i CST je sprovedena u Centru za biohemiju KCS, odsek na Klinici za infektivne i tropske bolesti KCS. Za analizu kompletne krvne slike korišćen je hematološki analizator Coulter HmX, Beckman Coulter. Sedimentacija eritrocita je određivana Westergreen metodom. Nivo fibrinogena

je određivan uz korišćenje Klausove metode Multifibren U reagensom na uređaju Sysmex® CA-1500 System, Siemens. Za određivanje biohemijskih analiza korišćen je biohemijski analizator Siemens Dimension Xpand, a korišćeni su reagensi istog proizvođača. Serumski nivo C-reaktivnog proteina (CRP) je određivan turbidimetrijskom metodom, serumske transaminaze i kreatin kinaza su određivane IFCC enzimskom metodom i natrijemija je određivana metodom "indirect sample sensing" uz pomoć QuikLITE® Integrated Multisensor Technology. Glikorahija je određivana metodom heksokinaze a proteinorahija uz korišćenje kolorimetrijske metode sa pirogalolom. Citološka analiza CST je izvršena ručno uz pomoć Nageott komore i Samsonovog rastvora.

Analizirane su demografske karakteristike (osnovni epidemiološki podaci, uzrast i pol), komorbiditeti, simptomi i znaci oboljenja, neuroradiološki nalazi i komplikacije kod bolesnika sa WNND.

Na osnovu kliničkih kriterijuma određivana je klinička forma WNND, na osnovu čega su bolesnici podeljeni u dve kategorije:

1. Bolesnici sa WNM
2. Bolesnici sa WNE

Bolesnici koji su ispunjavali dijagnostičke kriterijume za meningitis i encefalitis svrstavani su u kategoriju bolesnika sa WNE. Bolesnici sa znacima AFP udružene sa WNM svrstavani su u kategoriju bolesnika sa WNM. Bolesnici sa znacima AFP udružene sa WNE svrstavani su u grupu bolesnika sa WNE.

Kratkoročnom prognozom se označavao ishod na kraju hospitalizacije, na osnovu kog su bolesnici svrstani u dve kategorije:

1. Preživeli
2. Umrli

Dugoročnom prognozom podrazumevala se prognoza bolesnika sa WNND godinu dana po otpustu iz bolnice i funkcionalni ishod je procenjen uz pomoć modifikovane Rankin Skale (mRS) (prilog 1) i Barthel indeksa (prilog 2). Na osnovu funkcionalnog ishoda, bolesnici su rangirani u više grupa: bolesnici koji su se potpuno oporavili (mRS 0); funkcionalno nezavisni (mRS 1-2); funkcionalno zavisni (mRS 3-5); umrli tokom perioda praćenja (mRS 6). Povoljnim funkcionalnim ishodom smatrao se potpuni oporavak bolesnika (mRS 0). U cilju bolje preglednosti rezultata, prikazan je funkcionalni ishod bolesnika i prilikom otpusta iz bolnice uz rangiranje na identičan način kao pri proceni dugoročne prognoze.

Statistička obrada prikupljenih podataka izvršena je uz pomoć elektronske baze podataka u programu SPSS for Windows, verzija 11.5, uz korišćenje metoda deskriptivne i analitičke statistike.

Od metoda deskriptivne statistike korišćene su mere centralne tendencije (srednja vrednost i medijana) i varijabiliteta (standardna devijacija), kao i testovi za procenu normalnosti raspodele (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk test), što je bio preduslov za dalju statističku obradu.

U analizi parametarskih obeležja posmatranja korišćen je Studentov T-test. U analizi neparametarskih obeležja posmatranja, korišćeni su χ^2 test (kategorijska obeležja) ili Mann-Whitney U test (numerička obeležja). Korišćen je nivo značajnosti 0.05 uz interval poverenja (CI) 95%.

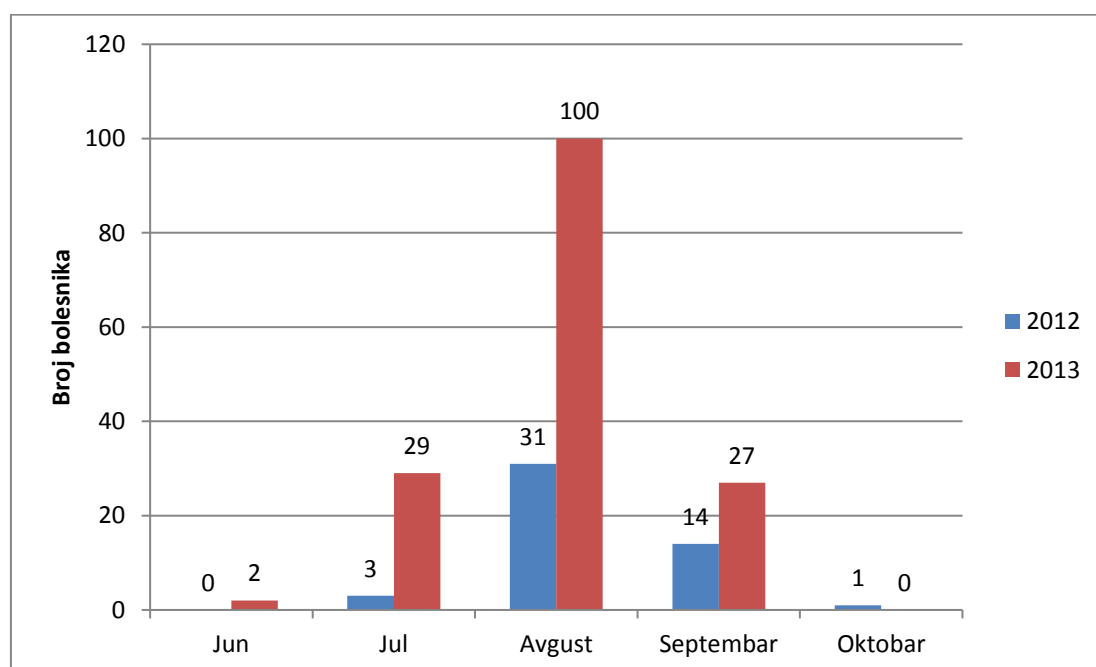
Multivarijantnom logističkom regresijom uz pomoć "Forward-Wald" modela određivan je prediktivni značaj svih faktora koji su na osnovu prethodno navedenih metoda statistički bili značajno povezani ($p \leq 0.05$) sa teškom formom WNND, smrtnim ishodom i nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom. Korišćen je nivo značajnosti 0.05, a rezultati su prikazani kao "Odds ratio" (OR) uz CI 95%. Kaplan-Majerova metoda korišćena je u proceni dužine preživljavanja obolelih od WNND.

4. REZULTATI

4.1. Demografski podaci

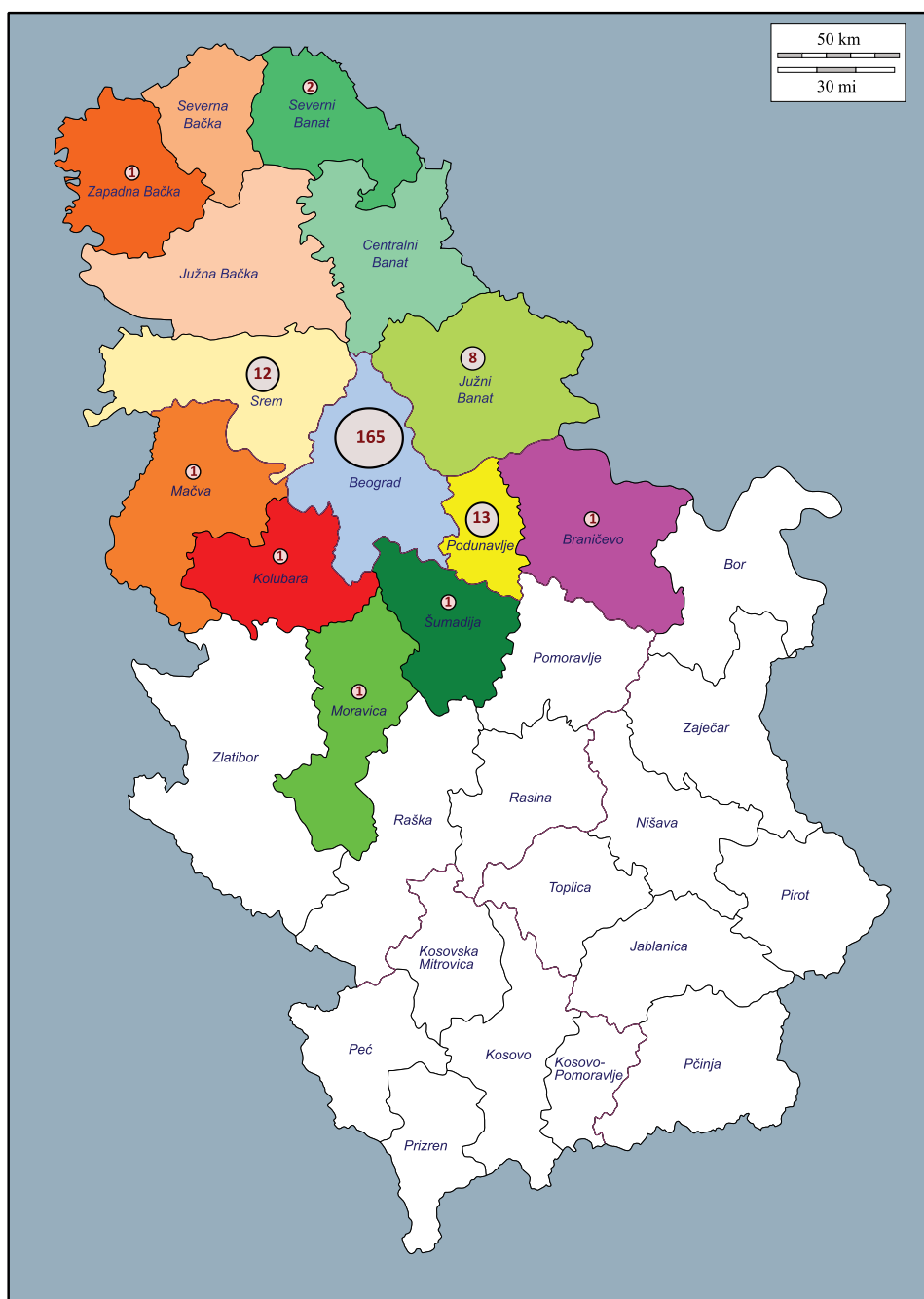
Kriterijume za uključivanje u studiju ispunjavalo je 207 bolesnika koji su lečeni od WNND u Klinici za infektivne i tropske bolesti KCS u Beogradu tokom 2012. i 2013. godine. Na osnovu primenjenih dijagnostičkih kriterijuma od ukupno 207 bolesnika bilo je 148 (71.5%) bolesnika sa potvrđenim WNND i 59 (28.5%) bolesnika sa verovatnim WNND.

Od ukupnog broja bolesnika uključenih u studiju, 49 bolesnika (23.7%) sa WNND lečeno je tokom 2012. godine, a 158 bolesnika (76.3%) tokom 2013. godine. Najveći broj bolesnika lečen je tokom meseca avgusta 2012. i 2013. godine. Distribucija obolelih od WNND na osnovu vremena nastanka simptoma prikazana je na grafikonu broj 1.



Grafikon 1: Distribucija slučajeva WNND prema vremenu pojave prvih simptoma

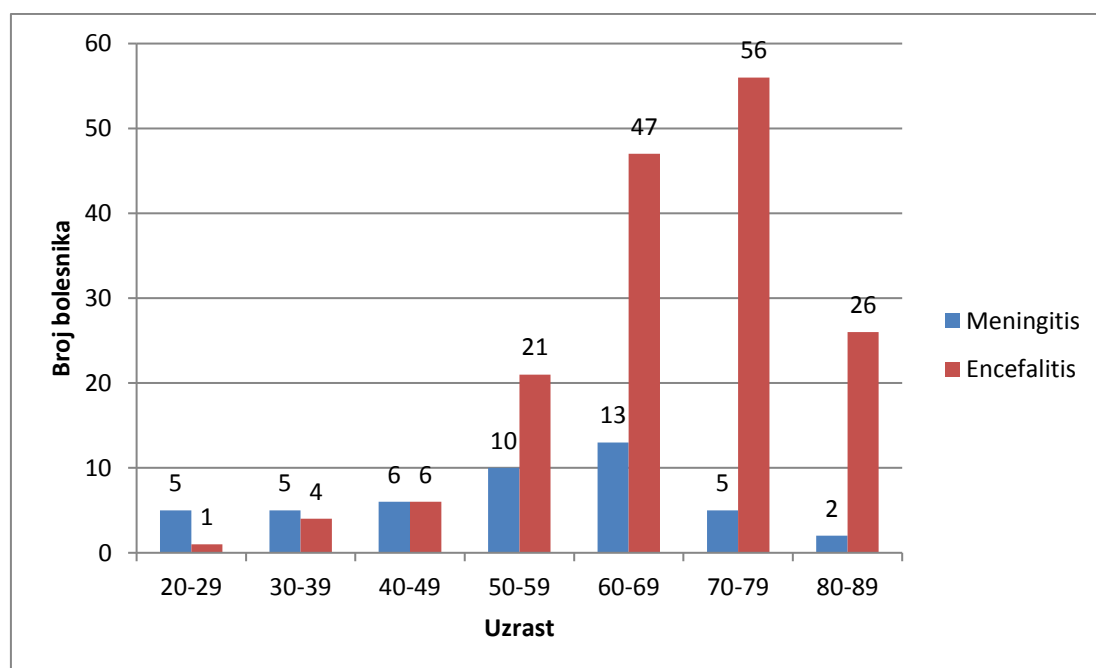
Najveći broj obolelih od WNND koji su hospitalizovani u Klinici za infektivne i tropske bolesti KCS bilo je iz Beogradskog okruga (165 bolesnika - 79.7%), Podunavskog (13 bolesnika - 6.3%) i Sremskog okruga (12 bolesnika - 5.8%) – grafikon 2.



Grafikon 2: Učestalost slučajeva WNND lečenih u Klinici za infektivne i tropske bolesti tokom 2012. i 2013. godine, po okruzima u Srbiji

Od potencijalnih faktora rizika za WNV infekciju, prisustvo komaraca u okolini obolelih je prijavljena kod 35% slučajeva, a boravak pored reke naveden je za 69% bolesnika.

Prosečna starost obolelih od WNND bila je 64.9 ± 14.3 godine (medijana 66.0 godina). Najmlađi bolesnik imao je 21 godinu, a najstariji 88 godina. Statistički dominantan broj od 149 bolesnika (71.9%) bilo je uzrasta 60 i više (≥ 60) godina ($p < 0.001$) (grafikon 3).

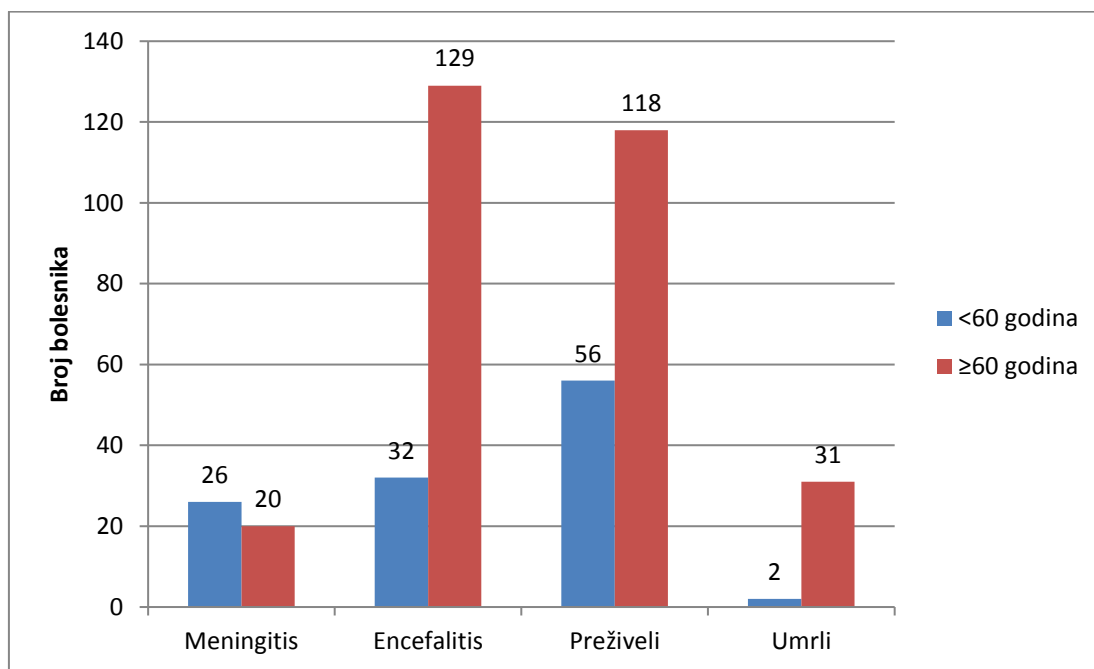


Grafikon 3: Uzrasna distribucija bolesnika sa WNND

Uzrast ≥ 60 godina registrovan je kod 129 (80.1%) bolesnika sa encefalitisom i 20 bolesnika (43.4%) sa meningitisom ($p < 0.001$) – grafikon 4. Prosečan uzrast bolesnika sa WNE bio je 68.3 godine, a prosečan uzrast obolelih sa WNM bio je 52.8 godina, a statistička analiza ukazuje na visoko značajnu razliku ($p < 0.001$).

Odmakla životna dob (uzrast ≥ 60 godina) u univarijantnoj analizi predstavljala je faktor povezan sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom WNND. Smrtni ishod je značajno češće bio registrovan kod bolesnika uzrasta

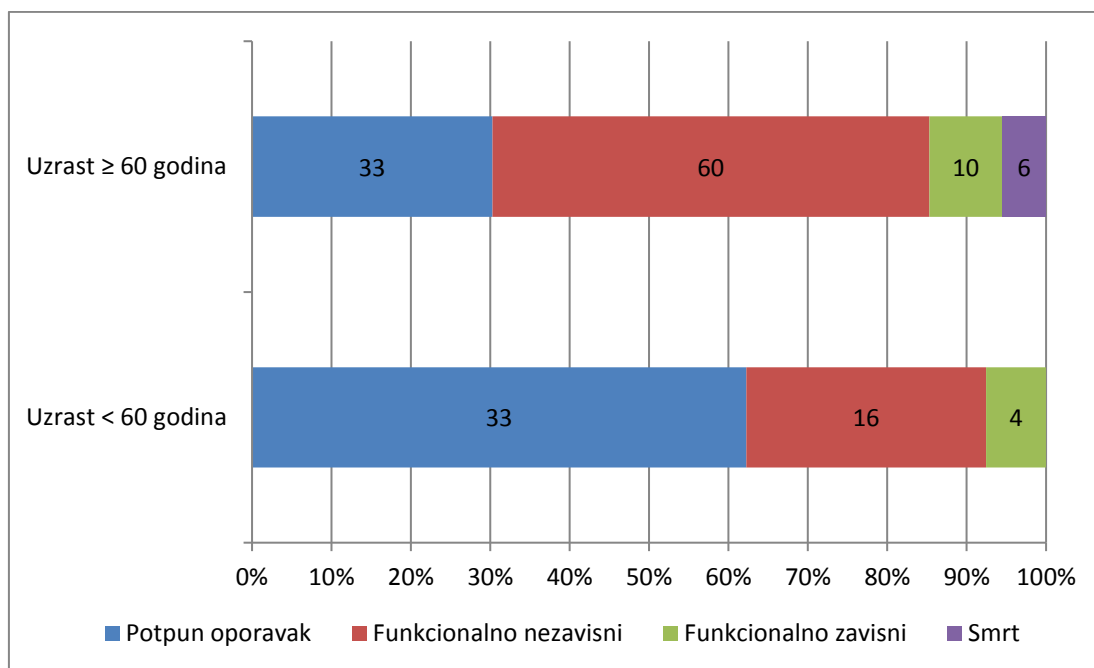
≥60 godina (31/149; 20.8%) u poređenju sa mlađom uzrasnom kategorijom (2/58; 3.4%) ($p=0.002$) – grafikon 4. Prosečna starost bolesnika sa smrtnim ishodom u našem istraživanju bila je 73.2 ± 9.7 godina, a bolesnici koji su preživeli bili su u proseku značajno mlađi, 63.3 ± 14.6 godina ($p<0.001$).



Grafikon 4: Zavisnost kliničke forme WNND i kratkoročne prognoze od uzrasta bolesnika

Kako bi se procenio rizik od smrtnog ishoda u zavisnosti od uzrasta, primenjena je logistička regresija uz korišćenje uzrasta kao kontinuirane varijable. Ovom analizom utvrđeno je da se kod naših bolesnika sa WNND sa svakom godinom života rizik od smrtnog ishoda povećavao za oko 7 procenata ($p<0.001$; OR = 1.07; CI (95%): 1.03-1.12).

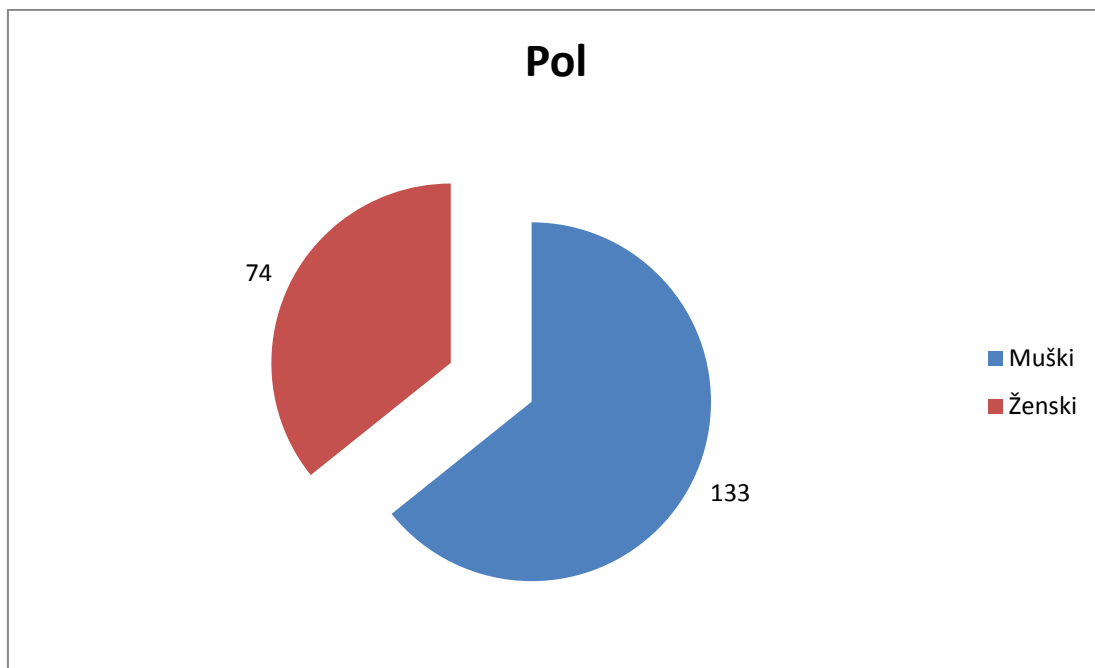
Što se tiče dugoročne prognoze, potpuni funkcionalni oporavak je zabeležen kod 33/103 bolesnika (32.0%) uzrasta ≥60 godina, dok je potpuni oporavak registrovan kod 33/53 bolesnika (62.2%) mlađih od 60 godina ($p<0.001$) – grafikon 5.



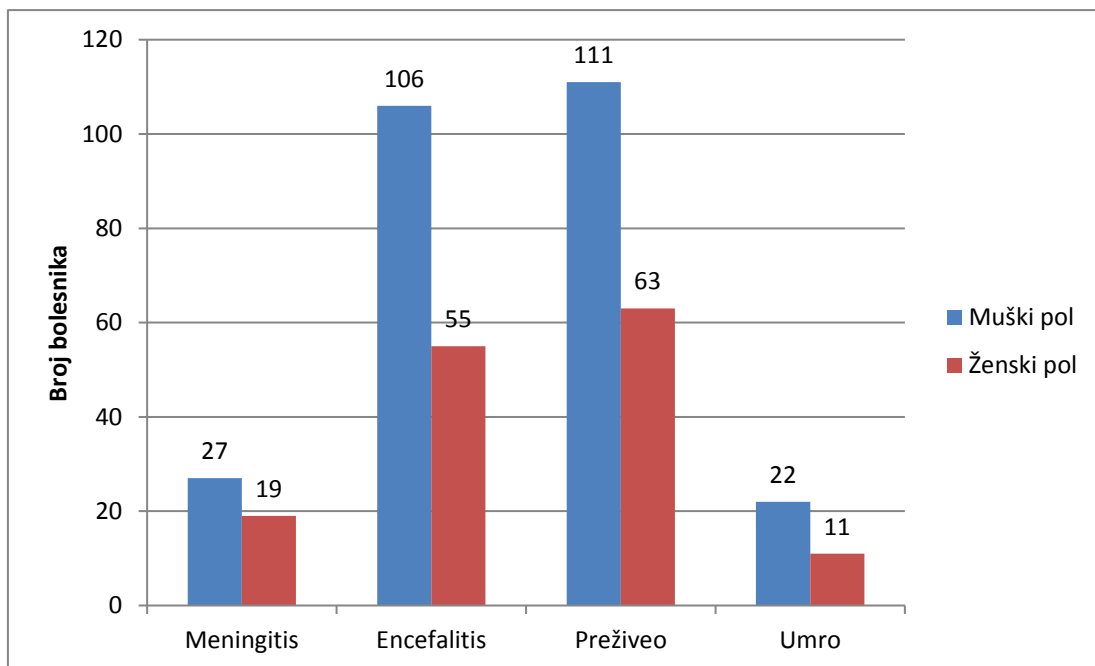
Grafikon 5: Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod bolesnika sa WNND u zavisnosti od uzrasne kategorije

U ispitivanom uzorku, muškog pola je bilo 133 bolesnika (64.3%), a ženskog pola 74 (35.7%) bolesnika, a predominacija muškog pola je bila statistički značajna ($p < 0.001$) - grafikon 6.

Nije dokazana statistička značajna povezanost pola sa zastupljenošću određene forme WNND ($p = 0.373$), niti sa kratkoročnom prognozom bolesti; ($p = 0.752$) - grafikon 7.

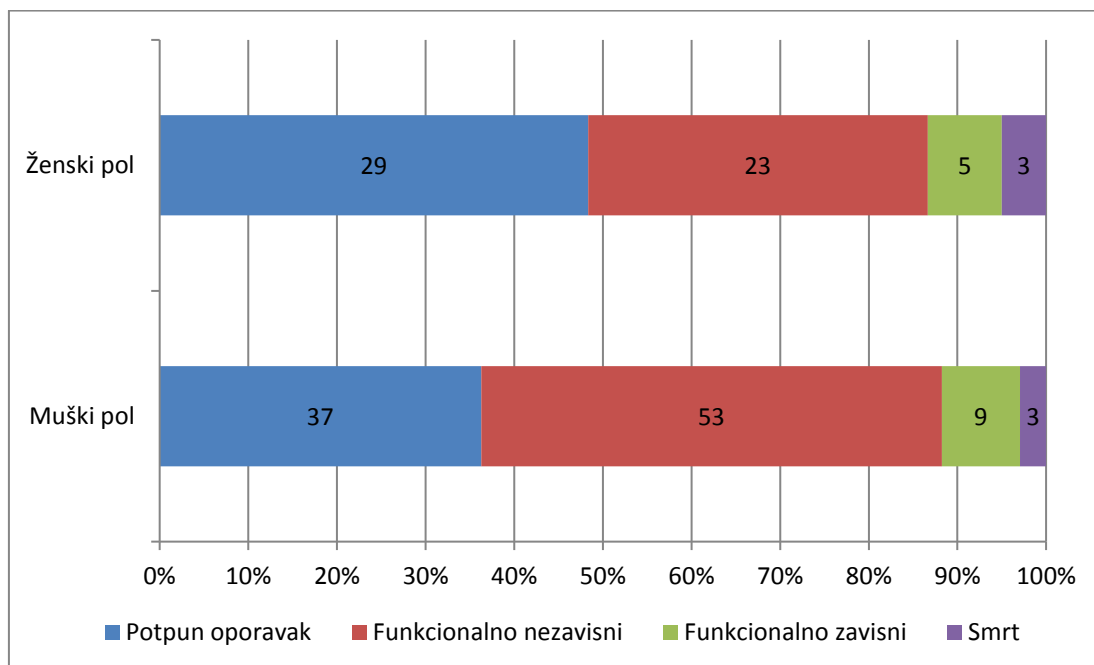


Grafikon 6: Distribucija po polu kod bolesnika sa WNND



Grafikon 7: Klinička forma WNND i kratkoročna prognoza u zavisnosti od pola

Kod obolelih od WNND, nismo dokazali da je pol bio faktor značajno povezan sa dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom ($p=0.100$) – grafikon 8.



Grafikon 8: Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod u zavisnosti od pola bolesnika sa WNND

4.2. Komorbiditeti

Komorbiditeti sa najvećom učestalošću kod naših bolesnika sa WNND bili su arterijska hipertenzija, registrovana kod 121 bolesnika (58.4%) i diabetes mellitus koji je registrovan kod 59 bolesnika (28.5%). Pod obolelima sa koronarnom bolešću (34; 16.4%) su se podrazumevali svi bolesnici sa anginom pectoris i prethodno lečenim infarktom miokarda. Ostali komorbiditeti koji bi se mogli povezati sa povećanim rizikom za razvoj WNND ili sa nepovoljnom prognozom oboljenja su ređe registrovani – tabela 1. Kod dominantnog broja imunosuprimiranih bolesnika (7/15), imunosupresija je bila posledica terapije hroničnog reumatološkog oboljenja kortikosteroidima. Od ukupno 6 bolesnika sa hroničnom bubrežnom insuficijencijom (HBI), 2 bolesnika su bila na hroničnom programu hemodijalize, a jedan bolesnik je imao transplantiran bubreg (više od godinu dana pre početka simptoma WNND).

Tabela 1: Najvažniji komorbiditeti kod bolesnika sa WNND

Karakteristike bolesnika	Broj pacijenata (%)
Komorbiditeti	
Arterijska hipertenzija	121 (58.4)
Diabetes mellitus	59 (28.5)
Koronarna bolest	34 (16.4)
Imunosupresija	15 (7.2)
Cerebrovaskularno oboljenje	12 (5.8)
Istorija maligne bolesti	7 (3.4)
HBI	6 (2.9)
Alkoholizam	5 (2.4)
Hronično pulmološko oboljenje	5 (2.4)
Hronična bolest jetre	3 (1.5)

Univarijantna analiza značaja različitih komorbiditeta kao faktora rizika povezanih sa razvojem teške kliničke slike (encefalitisa) kod bolesnika sa WNND prikazana je na tabeli 2. Faktor rizika statistički značajno povezan sa

razvojem encefalitisa bila je arterijska hipertenzija ($p=0.001$). Odsustvo hroničnih bolesti kod obolelih od WNND bio je faktor povezan sa manjim rizikom od razvoja encefalitisa ($p<0.001$).

Tabela 2: Povezanost komorbiditeta i kliničke forme WNND

	Meningitis N=46	Encefalitis N=161	P vrednost
Arterijska hipertenzija (%)	17 (37)	104 (65)	0.001
D.mellitus (%)	9 (20)	50 (31)	0.128
Koronarna bolest (%)	4 (9)	30 (19)	0.109
Imunosupresija (%)	1 (2)	14 (9)	0.132
HBI (%)	1 (2)	5 (3)	0.740
Cerebrovask. oboljenje (%)	0	12 (7)	0.056
Bez komorbiditeta (%)	27 (59)	35 (22)	<0.001

Neki od komorbiditeta, kao što su arterijska hipertenzija, HBI i cerebrovaskularno oboljenje predstavljali su faktore povezane sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom WNND - tabela 3. Odsustvo komorbiditeta je registrovano kod značajno većeg procenta obolelih koji su preživeli u poređenju sa obolelima kod kojih je registrovan smrtni ishod ($p=0.043$).

Tabela 3: Povezanost komorbiditeta kod obolelih od WNND sa smrtnim ishodom

	Preživeli N=174	Umrli N=33	P vrednost
Arterijska hipertenzija (%)	96 (55)	25 (76)	0.028
D.mellitus (%)	49 (28)	10 (30)	0.803
Koronarna bolest (%)	29 (17)	5 (15)	0.829
Imunosupresija (%)	11 (6)	4 (12)	0.239
HBI (%)	3 (2)	3 (9)	0.021
CVI (%)	7 (4)	5 (15)	0.012
Bez komorbiditeta (%)	57 (33)	5 (18)	0.043

Na osnovu univarijantne analize, komorbiditeti povezani sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom WNND bili su arterijska hipertenzija ($p=0.007$), koronarna bolest ($p=0.021$) i imunosupresija ($p=0.021$) – tabela 4. Odsustvo hroničnih bolesti kod bolesnika sa WNND bilo je povezano sa povoljnijom dugoročnom prognozom ($p<0.001$).

Tabela 4: Povezanost komorbiditeta sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom WNND

	Potpuni oporavak (mRS 0) N=66	Nepotpun oporavak (mRS 1-5) N=90	P vrednost
Arterijska hipertenzija (%)	26 (39)	55 (61)	0.007
D.mellitus (%)	15 (23)	25 (28)	0.475
Koronarna bolest (%)	5 (8)	19 (21)	0.021
Imunosupresija (%)	1 (2)	10 (11)	0.021
Cerebrovask. oboljenje (%)	1 (2)	5 (6)	0.195
Bez komorbiditeta (%)	34(52)	21 (23)	<0.001

4.3. Simptomi, znaci i klinička forma oboljenja

4.3.1. Simptomi i znaci

Prosečno trajanje simptoma kod obolelih od WNND pre prijema na hospitalizaciju bilo je 5.4 ± 3.2 dana (1 do 20 dana). Među svim prisutnim simptomima, povišena temperatura je bila najučestaliji, gotovo stalno prisutan simptom i registrovana je kod 202 bolesnika (97.6%) – tabela 5.

Tabela 5: Simptomi i znaci kod obolelih od WNND

	Meningitis N=46	Encefalitis N=161	Svi bolesnici N=207
Simptomi N (%)			
Povišena temperatura	45 (98)	157 (97)	202 (97.6)
Malaksalost	37 (80)	107 (66)	144 (69.5)
Neurološki simptomi	2 (4)	138 (86)	140 (67.6)
Glavobolja	37 (80)	75 (47)	112 (54.1)
Povraćanje	24 (52)	65 (40)	89 (42.9)
Bolovi u mišićima	18 (39)	43 (27)	61 (29.4)
Proliv	7 (15)	22 (14)	29 (14.0)
Ospa	6 (13)	12 (7)	15 (7.2)
Epileptični napad	0	6 (4)	6 (2.9)
Znaci N (%)			
Meningealni znaci	46 (100)	122 (76)	168 (81.1)
Poremećaj svesti	0	128 (80)	128 (61.8)
Ataksija	0	72 (45)	72 (34.7)
Tremor	4 (9)	50 (31)	54 (26.0)
AFP	0	30 (19)	30 (14.5)
Dizmetrija	0	26 (16)	26 (12.6)
Nistagmus	0	15 (9)	15 (7.2)
Dizartrija	0	13 (8)	13 (6.3)
Pareza facijalnog nerva	0	11 (7)	11 (5.3)
Diplopija	0	9 (6)	9 (4.3)
Koma	0	6 (4)	6 (2.9)

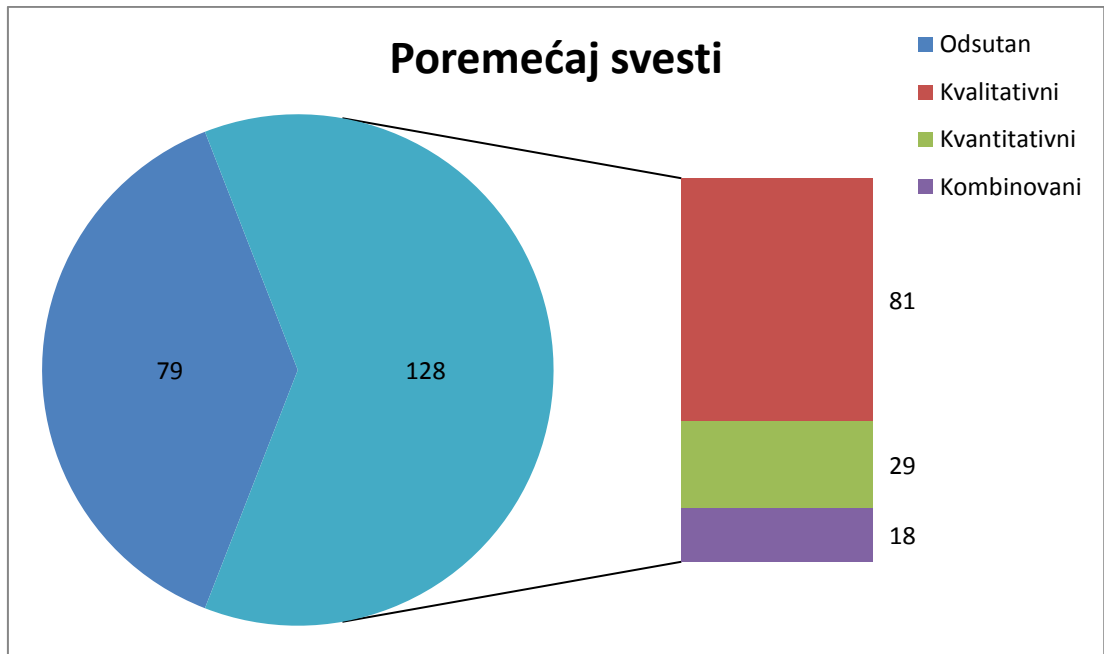
Sledeći po učestalosti simptomi kod bolesnika sa WNND bili su malaksalost (69.5%), neurološki simptomi (67.6%) i glavobolja (54.1%). Kod manjeg procenta obolelih od WNND bili su prisutni simptomi poput proliva (14.0%) i ospe (7.2%). Epileptični napadi su bili retko registrovani kao simptom WNND i to kod svega 6 bolesnika (2.9%).

Povišena temperatura se u proseku javljala posle 1.3 ± 1.1 dana (1 do 8 dana) od prvih simptoma. Neurološki simptomi (nestabilan hod, otežana komunikacija, pospanost i sl.) javljali su se 3.7 ± 2.3 dana (1 do 14 dana) posle početka bolesti. Ospa, koja je bila makulozna ili makulopapulozna zahvatala je trup i/ili ekstremitete, a izbijala je posle 3.7 ± 4.0 (od 1 do 15) dana od početka bolesti.

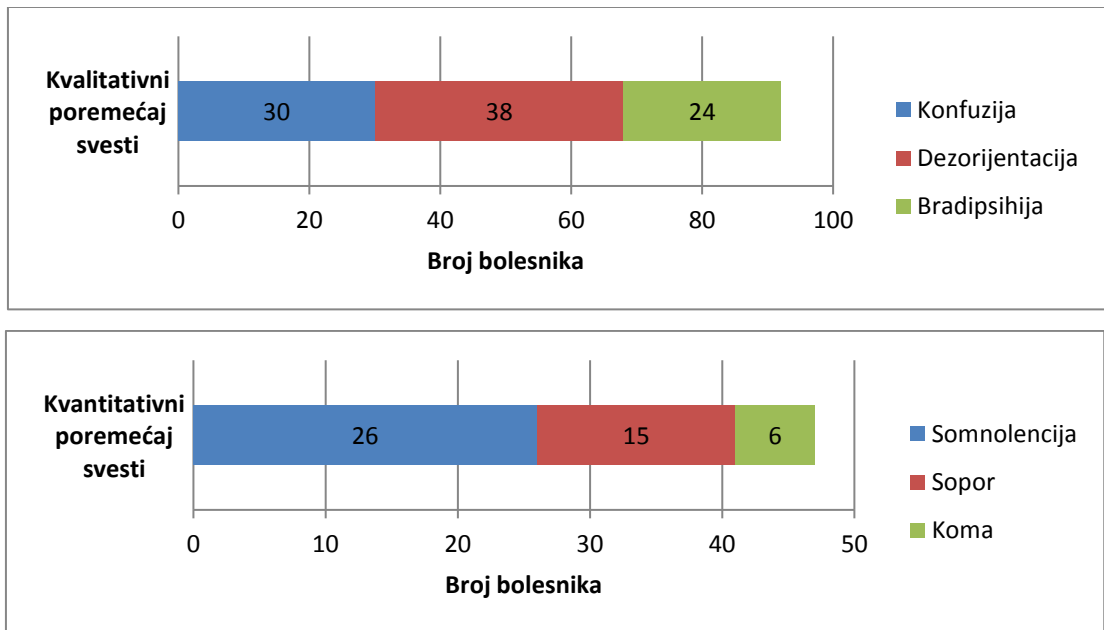
Od kliničkih znakova registrovanih kod obolelih od WNND po prijemu u bolnicu, pozitivni meningealni znaci bili su prisutni kod 168 (81,1%) bolesnika. Od ukupnog broja bolesnika sa pozitivnim meningealnim znacima, kod 100 bolesnika je registrovan poremećaj stanja svesti. Od preostalih 68 bolesnika sa urednim stanjem svesti i pozitivnim meningealnim znacima, kod 22 bolesnika tokom hospitalizacije dolazi do pojave poremećaja svesti ili drugih encefalitičnih znakova. Preostalih 46 bolesnika (22.3%) imalo je pozitivne meningealne znake bez encefalitičnih znakova te je ispunjavalo kliničke kriterijume za dijagnozu meningitisa.

Poremećaj svesti je bio najčešće registrovan znak afekcije moždanog parenhima, registrovan pri prijemu kod 128 (61.8%) bolesnika sa WNND. Od ukupnog broja bolesnika sa poremećajem svesti, kod 81 bolesnika je registrovan kvalitativni poremećaj svesti (konfuzija, dezorijentacija, bradipsihija, agitacija), a kod 29 bolesnika je bio prisutan kvantitativni poremećaj svesti (somnia, sopor ili koma). Kombinovani poremećaj svesti (kvantitativni + kvalitativni) imalo je 18 bolesnika – grafikon 9 i 10. Kod 33 bolesnika (15.9%), od kojih je 22

bilo sa pozitivnim i 11 sa negativnim meningealnim znacima, do pojave poremećaja stanja svesti dolazi u toku hospitalizacije na osnovu čega su kod 161 bolesnika (77.7%) postojali klinički kriterijumi za dijagnozu encefalitisa.

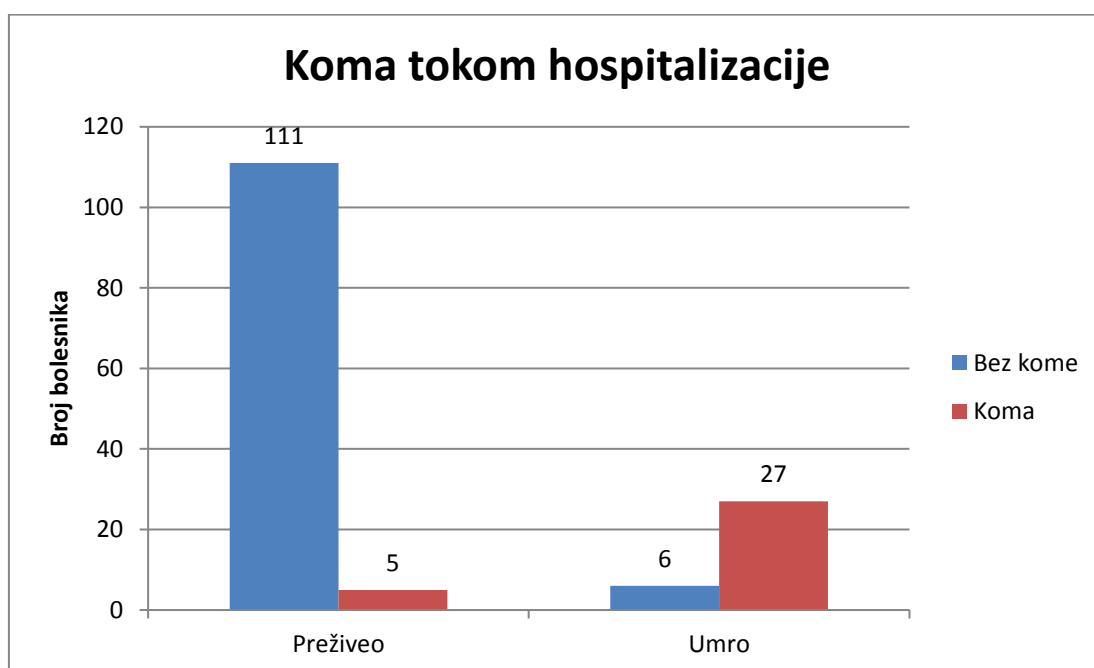


Grafikon 9: Poremećaj svesti kod bolesnika sa WNND



Grafikon 10: Kvalitativni i kvantitativni poremećaj svesti kod bolesnika sa WNND

Šest bolesnika (2.9%) bilo je u koma pri prijemu u bolnicu, dok je tokom hospitalizacije do razvoja kome došlo kod još 26 bolesnika. Ukupno je u koma bilo 32 bolesnika (15.4%) sa WNND. Prosečno trajanje kome kod obolelih bilo je 1.6 ± 5.5 dana (1 do 42 dana). Na osnovu statističke analize, prisustvo kome tokom hospitalizacije bilo je značajno povezano sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom ($p < 0.001$) – grafikon 11.

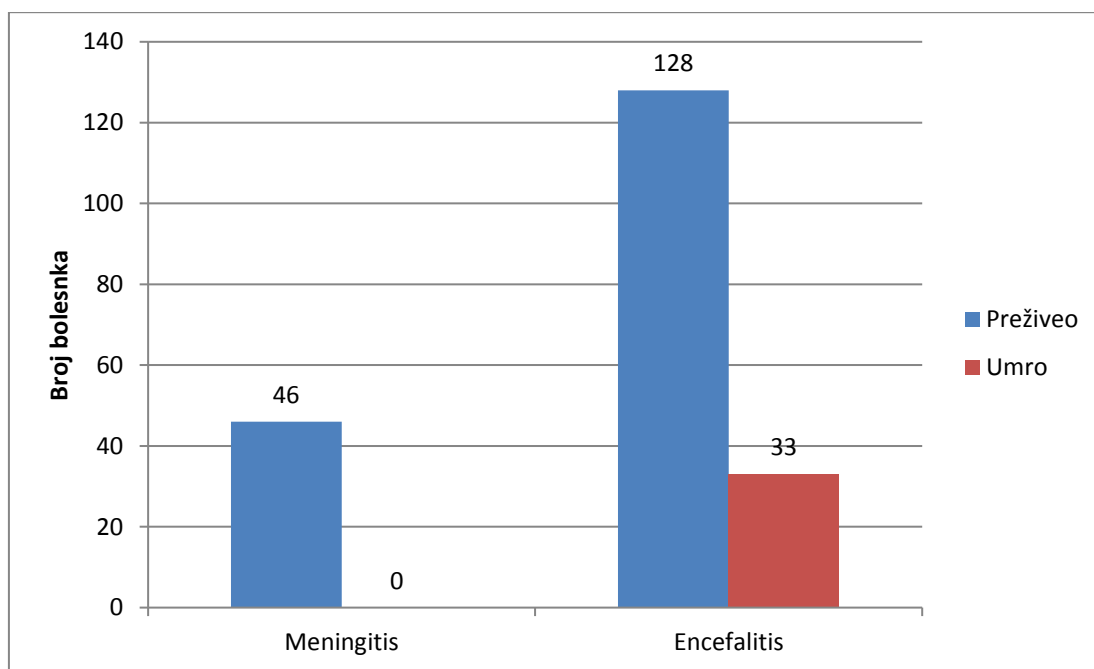


Grafikon 11: Povezanost kratkoročne prognoze WNND sa prisustvom kome tokom hospitalizacije

4.3.2. Klinička forma oboljenja

U našem istraživanju, od ukupnog broja obolelih od WNND, kod 161 bolesnika (77.7%) je registrovana klinička slika encefalitisa, a 46 bolesnika (22.3%) imalo je kliničku sliku meningitisa.

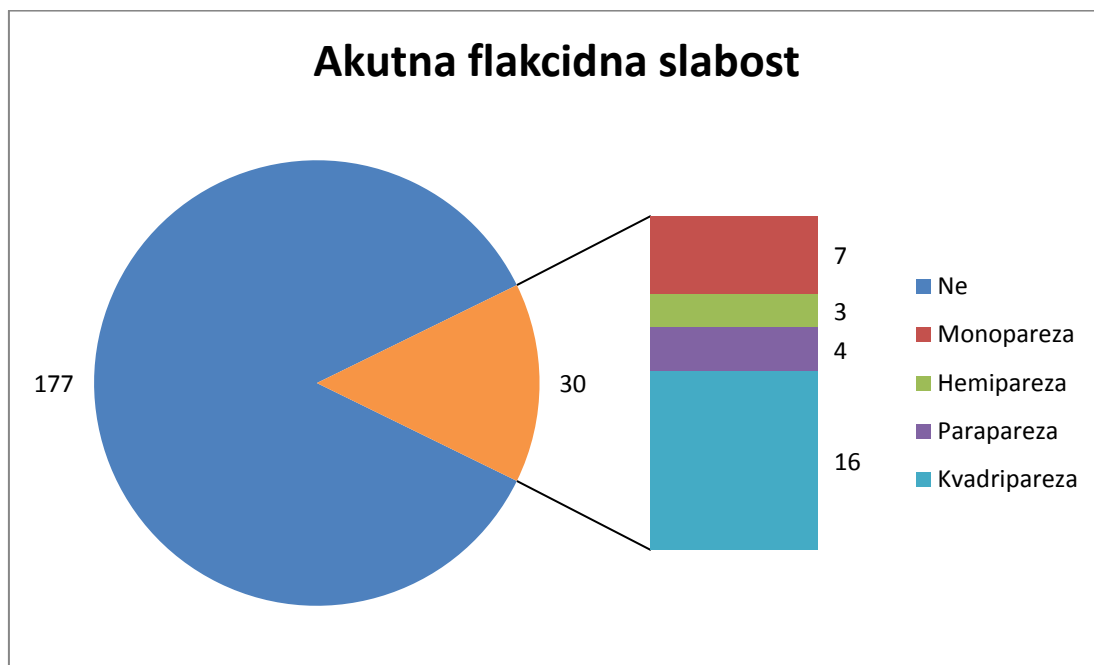
Svih 33 (15.9%) bolesnika sa WNND i smrtnim ishodom imalo je encefalitis, dok su svi bolesnici sa meningitisom preživeli. Smrtnost u kategoriji bolesnika sa WNE bila je 20.5%. U univarijantnoj analizi, klinička forma WNND bila je faktor visoko statistički značajno povezan sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom ($p < 0.001$) – grafikon 12.



Grafikon broj 12: Kratkoročna prognoza WNND u zavisnosti od kliničke forme bolesti

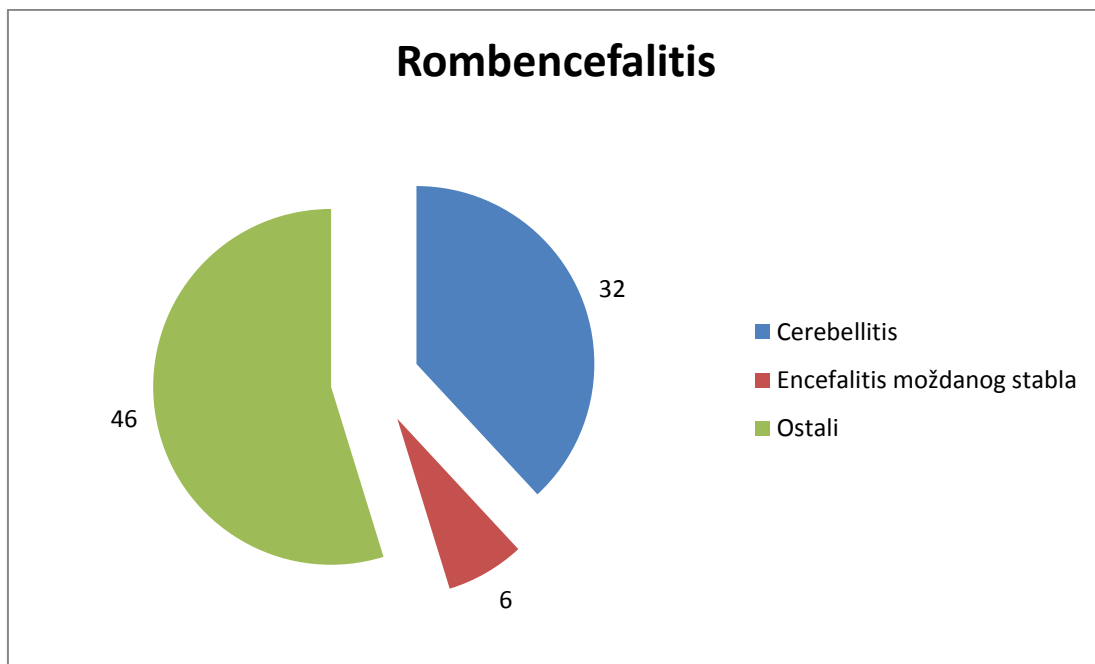
AFP je registrovana kod 30 obolelih od WNND (14.5%) i kod svih je bila udružena sa encefalitisom. U grupi bolesnika sa AFP, kod njih 16 bila je prisutna flakcidna kvadripareza/ kvadriplegija. Kod 7 bolesnika bila je prisutna monopareza/ monoplegija, 4 bolesnika razvilo je asimetričnu paraparezu i 3 bolesnika imalo je hemiparezu/ hemiplegiju – grafikon 13. Od ukupno 33 bolesnika sa smrtnim ishodom kod njih 11 je bila prisutna AFP, a prisustvo AFP

kod bolesnika sa WNND bilo je statistički visoko značajno povezano sa smrtnim ishodom ($p=0.001$) – grafikon broj 15.

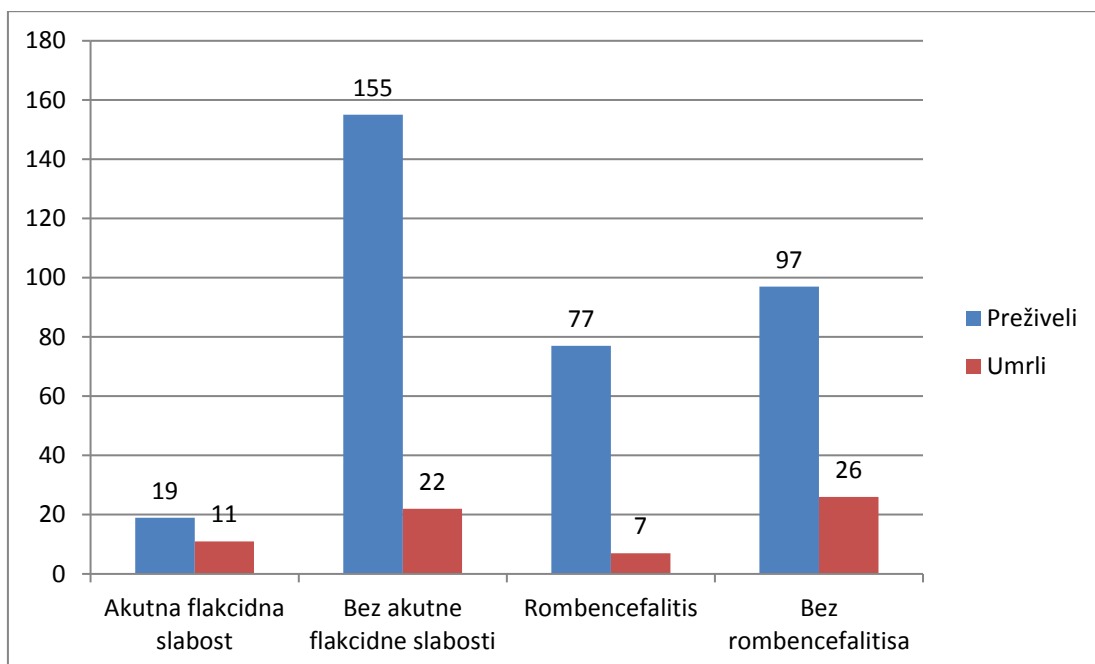


Grafikon 13: AFP kod obolelih od WNND

Klinički znaci rombencefalitisa registrovani su kod 84 bolesnika (40.6%) – grafikon 14. Klinička slika cerebelitisa manifestovala se cerebelarnom ataksijom kao dominantnim kliničkim znakom i registrovana je kod 32 obolela od WNND. Kod 46 bolesnika sa rombencefalitisom postojao je kvantitativni ili kvalitativni poremećaj svesti, a kod 6 bolesnika su postojali znaci encefalitisa moždanog stabla (disfagija, dizartriya, kardiorespiratorna insuficijencija). Od ukupno 84 bolesnika sa znacima rombencefalitisa umrlo je 7 bolesnika, uključujući i sve bolesnike sa znacima encefalitisa moždanog stabla. Uprkos nepovoljnoj prognozi encefalitisa moždanog stabla, rombencefalitis je bio povezan sa povoljnijom kratkoročnom prognozom ($p=0.013$) – grafikon 15.

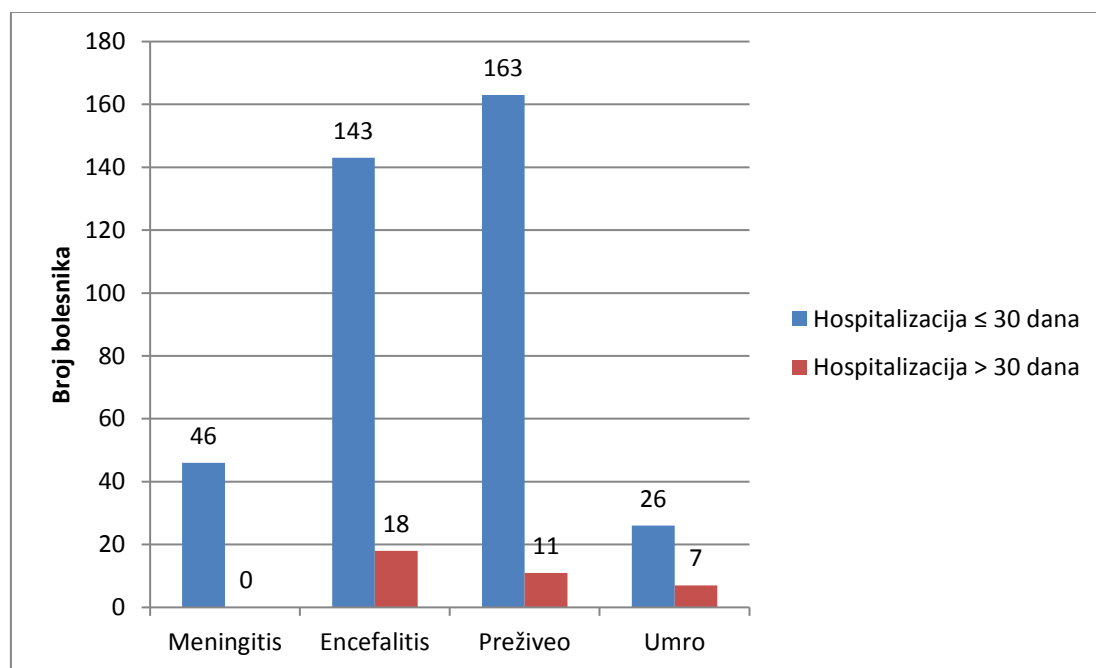


Grafikon 14: Rombencefalitis kod obolelih od WNND



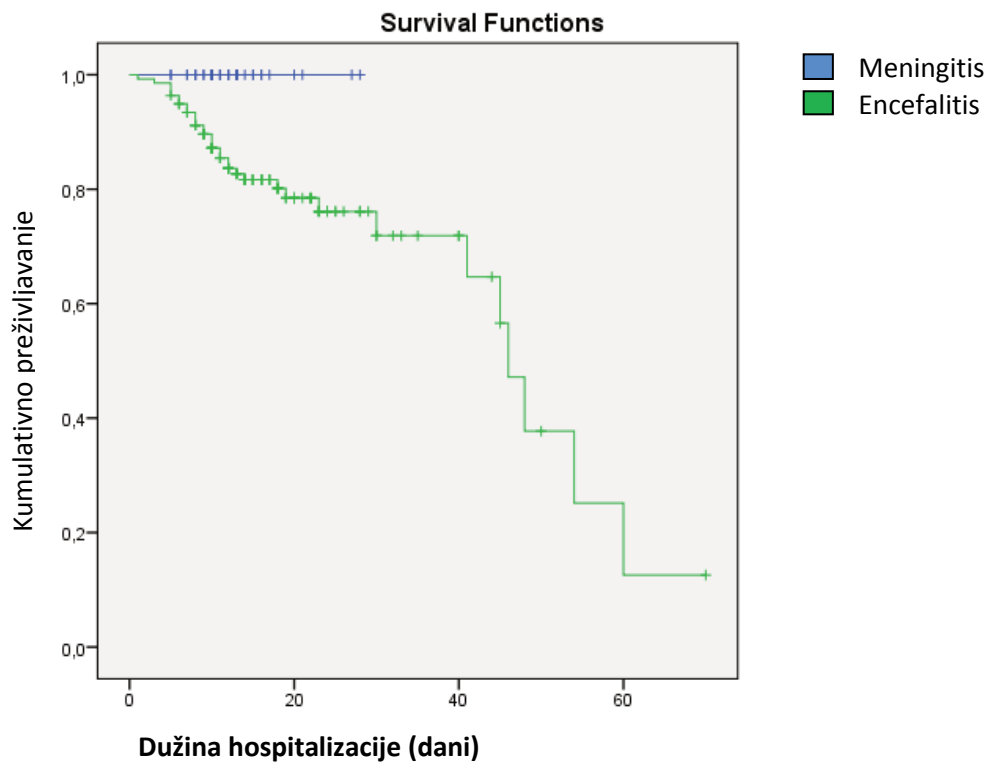
Grafikon 15: Povezanost kratkoročne prognoze kod obolelih od WNND sa prisustvom AFP i rombencefalitisa

Prosečno trajanje hospitalizacije kod bolesnika sa WNND bilo je 16.8 ± 11.0 dana (1-70 dana). Prosečno trajanje hospitalizacije bolesnika sa WNE bilo je duže (18.1 dan) u poređenju sa onom kod obolelih od WNM (12.3 dana) ($p=0.004$). Prolongirana hospitalizacija (duža od mesec dana) je bila neophodna kod 18 bolesnika sa WNE, a svi oboleli od WNM su zahtevali hospitalizaciju kraću od mesec dana ($p=0.018$) – grafikon 16. Od ukupno 18 bolesnika sa WNE i prolongiranom hospitalizacijom, kod 12 bolesnika (66.6%) je registrovana AFP. Prisustvo AFP je bilo povezano sa hospitalizacijom dužom od mesec dana kod obolelih od WNND ($p<0.001$). Hospitalizacija duža od mesec dana bila je statistički značajno povezana sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom ($p=0.005$) – grafikon 16.



Grafikon 16: Povezanost prolongirane hospitalizacije sa kliničkom formom WNND i nepovoljnom kratkoročnom prognozom

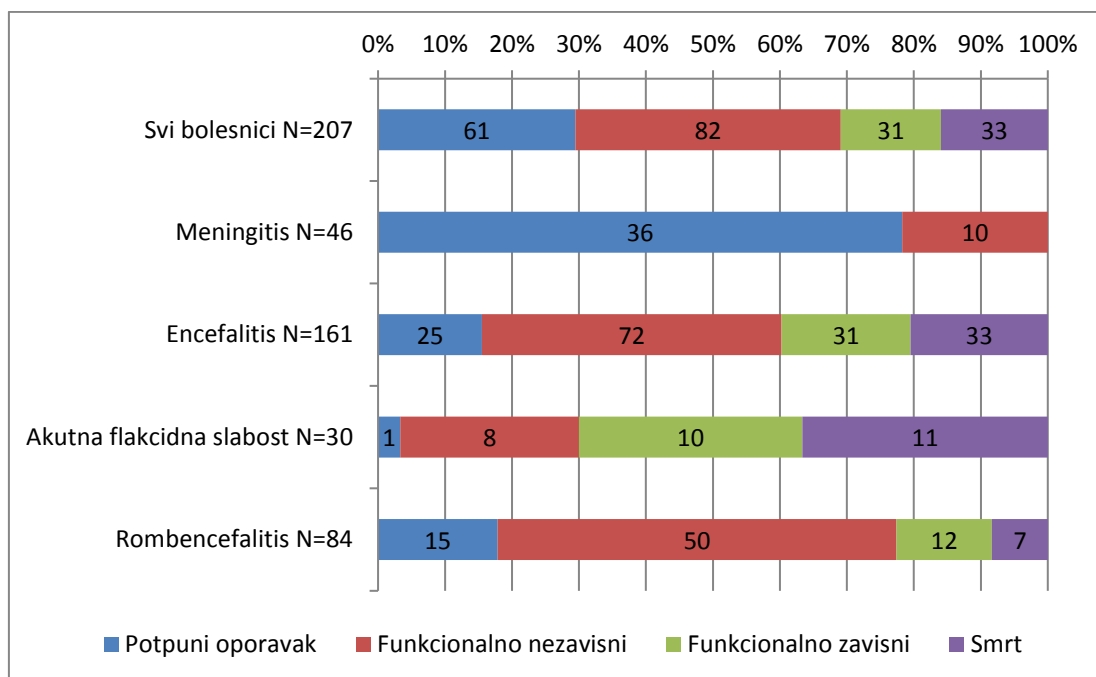
Na grafikonu 17. prikazana je Kaplan-Meier kriva kumulativnog preživljavanja u zavisnosti od forme WNND i dužine hospitalizacije.



Grafikon 17: Kaplan-Meier kriva kumulativnog preživljavanja obolelih od WNND

Smrtni ishod kod bolesnika sa WNND nastupao je posle prosečno 22.4 ± 16.6 dana od prvih simptoma oboljenja (6–67 dana).

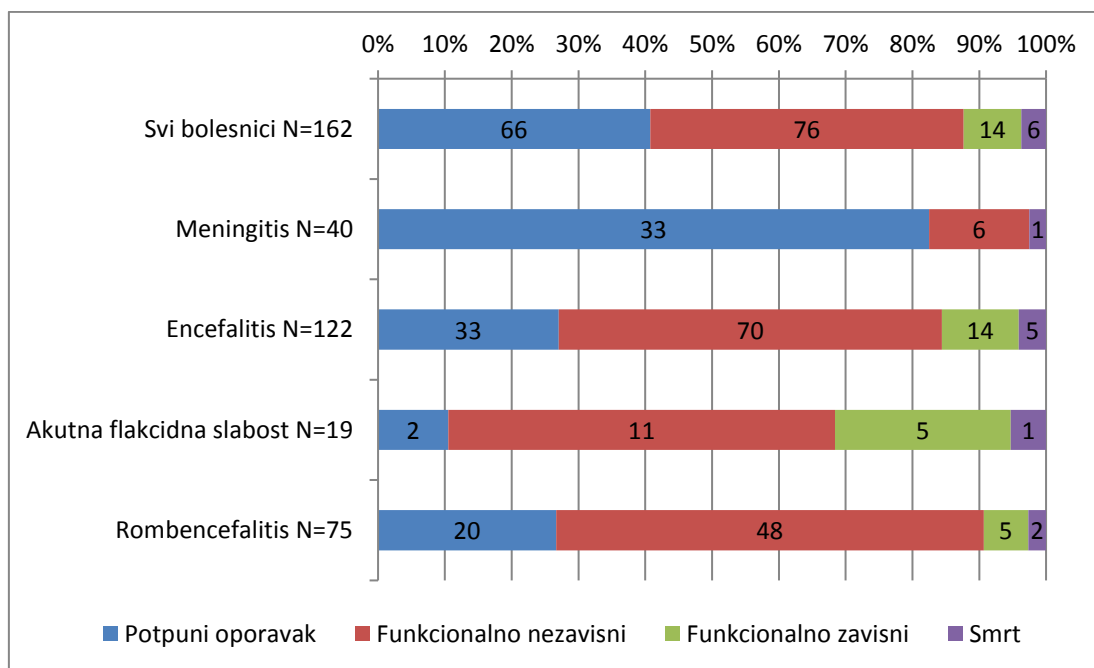
Na grafikonu 18. prikazan je funkcionalni ishod bolesnika pri otpustu iz bolnice, na osnovu koga se vidi da su svi bolesnici sa WNM otpušteni potpuno oporavljeni (mRS 0) ili funkcionalno nezavisni (mRS 1-2).



Grafikon 18: mRS pri otpustu kod obolelih od WNND

Potpuni oporavak pri otpustu je registrovan kod 25/161 (15.5%) bolesnika sa WNE, 1/30 (3.3%) bolesnika sa AFP i kod 15/84 (17.8%) bolesnika sa rombencefalitisom.

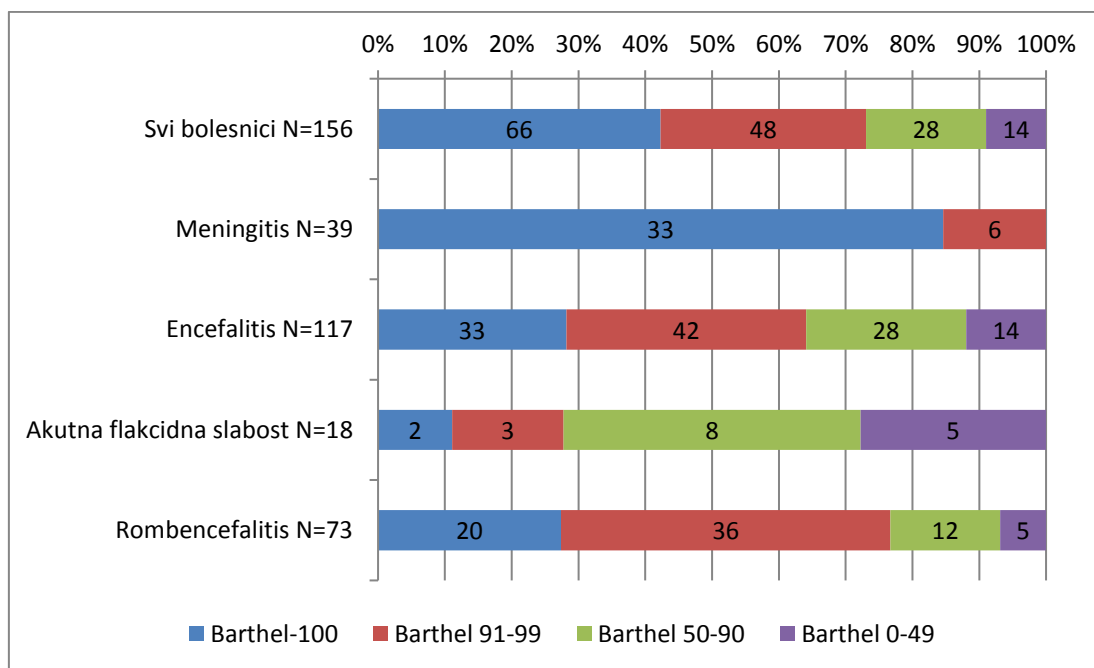
Praćenje obolelih od WNND i procena njihove dugoročne prognoze i funkcionalnog ishoda posle godinu dana od otpusta sprovedeno je kod 162 (93.1%) od ukupno 174 preživelih bolesnika. Tokom perioda praćenja umrlo je (mRS 6) 6 bolesnika (3.7%). Od preostalih 156 bolesnika, potpuno se oporavilo (mRS 0) 66 bolesnika (40.7%), funkcionalnu nezavisnost (mRS 1-2) je postiglo 76 bolesnika (46.8%), dok je funkcionalno zavisno (mRS 3-5) posle godinu dana bilo 14 bolesnika (8.5%) – grafikon broj 19.



Grafikon 19: Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod obolelih od WNND u zavisnosti od kliničke forme bolesti

Potpuni funkcionalni oporavak posle godinu dana od otpusta zabeležen je kod 33/39 (84.6%) bolesnika sa WNM i kod 33/117 (28.2%) bolesnika sa WNE ($p < 0.001$). Potpuni oporavak postiglo je 20/75 (26.6%) bolesnika sa rombencefalitisom i 2/19 (10.5%) bolesnika sa AFP. Funkcionalna zavisnost je bila prisutna kod 14 bolesnika sa WNE, od kojih je po 5 imalo AFP i rombencefalitis.

Funkcionalni ishod obolelih od WNND uz korišćenje Barthel indeksa prikazan je na grafikonu 20. Prosečna vrednost Barthel indeksa godinu dana posle hospitalizacije kod bolesnika sa WNM (99.4 ± 1.5) bila je statistički značajno veća od vrednosti Barthel indeksa kod bolesnika sa WNE (87.7 ± 18.1) ($p < 0.001$). Prosečna vrednost Barthel indeksa godinu dana po otpustu kod bolesnika sa rombencefalitisom bila je 91.3 ± 14.6 , a kod bolesnika sa AFP 73.3 ± 22.6 .



Grafikon broj 20: Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod u zavisnosti od forme WNND uz korišćenje Barthel indeksa

Što se tiče simptoma koji su registrovani kod obolelih od WNND godinu dana po otpustu, najčešće su registrovani malaksalost (51%), slaba koncentracija (20%), bolovi u mišićima (19%) i otežano pamćenje (17%). Kod bolesnika sa WNM godinu dana po otpustu najčešće su bili prisutni malaksalost, bolovi u mišićima i glavobolja, dok su se bolesnici sa WNE najčešće žalili na malaksalost, slabu koncentraciju, bolove u mišićima i otežano pamćenje.

Tabela 6: Simptomi kod bolesnika sa WNND godinu dana od otpusta

	Meningitis N=39	Encefalitis N=117	Svi bolesnici N=156
Malaksalost	6 (15)	74 (63)	80 (51.2)
Slaba koncentracija	1 (3)	31 (26)	32 (20.5)
Mijalgije	5 (13)	26 (22)	31 (19.8)
Otežano pamćenje	1 (3)	26 (22)	27 (17.3)
Neraspoloženost	2 (5)	22 (18)	24 (15.4)
Glavobolja	5 (13)	19 (16)	24 (15.4)
Slabost ekstremiteta	0	17 (14)	17 (10.9)
Ataksija	0	16 (13)	16 (10.2)
Nervoza	1 (3)	13 (11)	14 (8.9)
Tremor	3 (8)	11 (9)	14 (8.9)
Ukočen vrat	4 (10)	7 (6)	11 (7)
Pospanost	2 (5)	8 (7)	10 (7.1)
Vrtoglavica	0	9 (8)	9 (5.7)
Artralgije	3 (8)	3 (3)	6 (3.8)

4.4. Laboratorijske analize

Od ukupnog broja obolelih od WNND koji su uključeni u istraživanje, kompletne laboratorijske analize krvi i CST pri prijemu su bile dostupne kod 161 bolesnika. Vrednosti osnovnih hematoloških i biohemijskih analiza krvi urađenih pri prijemu kod bolesnika sa WNND prikazani su na tabeli 7.

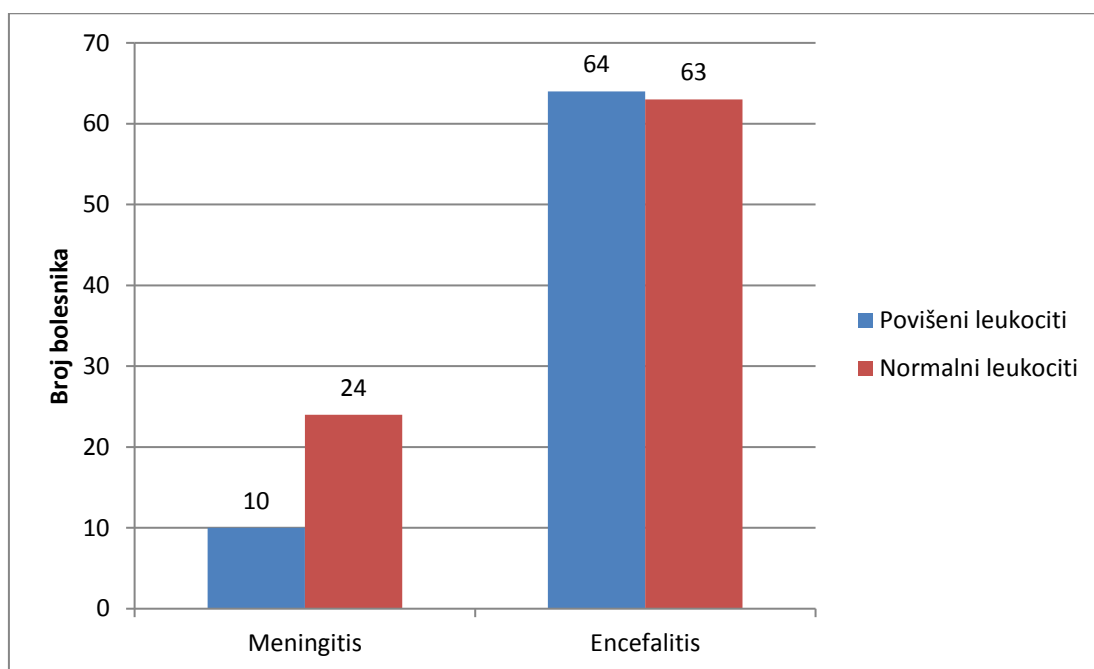
Tabela 7: Vrednosti hematoloških i biohemijskih analiza krvi kod bolesnika sa WNND

	Mean±SD	Min - Max	Referentne vrednosti
Hematološke analize			
Broj leukocita (x10 ⁹ /L)	10.6±4.2	3.4-32.2	3.4-9.7
Limfociti (%)	15.9±8.5	3.0-55.0	20.0-46.0
Broj eritrocita (x10 ¹² /L)	4.35±0.58	2.10-5.95	4.34-5.72 (M) 3.86-5.08 (Ž)
Hemoglobin (g/L)	131.6±19.8	133-179	138-175 (M) 119-157 (Ž)
Trombociti (x10 ⁹ /L)	184.7±70.9	53-584	158-424
Biohemijske analize			
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	42.1±24.3	5-120	≤ 20 mm/hr (M) ≤ 30 mm/hr (Ž)
Fibrinogen (g/L)	4.2±0.9	2.0-7.5	2.0-4.0
C-reaktivni protein (mg/L)	38.1±47.6	1.1-274.0	< 5mg/L
Natrijum (mmol/L)	139.1±5.4	125-159	135-148
AST (U/L)	53.5±60.2	11-575	< 37
ALT (U/L)	46.6±44.5	8-355	< 40
Kreatin kinaza (U/L)	812.5±1225.9	16-7855	< 200 (M) < 150 (Ž)

Prosečna vrednost leukocita kod bolesnika sa WNND bila je 10.6x10⁹/l. Prosečna vrednost leukocita kod bolesnika sa WNE (10.9±4.3) je bila veća od

prosečne vrednosti leukocita kod bolesnika sa WNM (9.3 ± 3.8) ali je ovaj rezultat bio izvan opsega statističke značajnosti ($p=0.056$).

Leukocitoza je bila prisutna kod 74 (45.9%) bolesnika, od kojih je 64 bolesnika bilo sa WNE i 10 sa WNM – grafikon broj 21. Statističkom analizom utvrđeno je da je prisustvo leukocitoze značajno češće bilo prisutno kod bolesnika sa WNE ($p=0.029$), ali nije bilo povezano sa prognozom WNND.



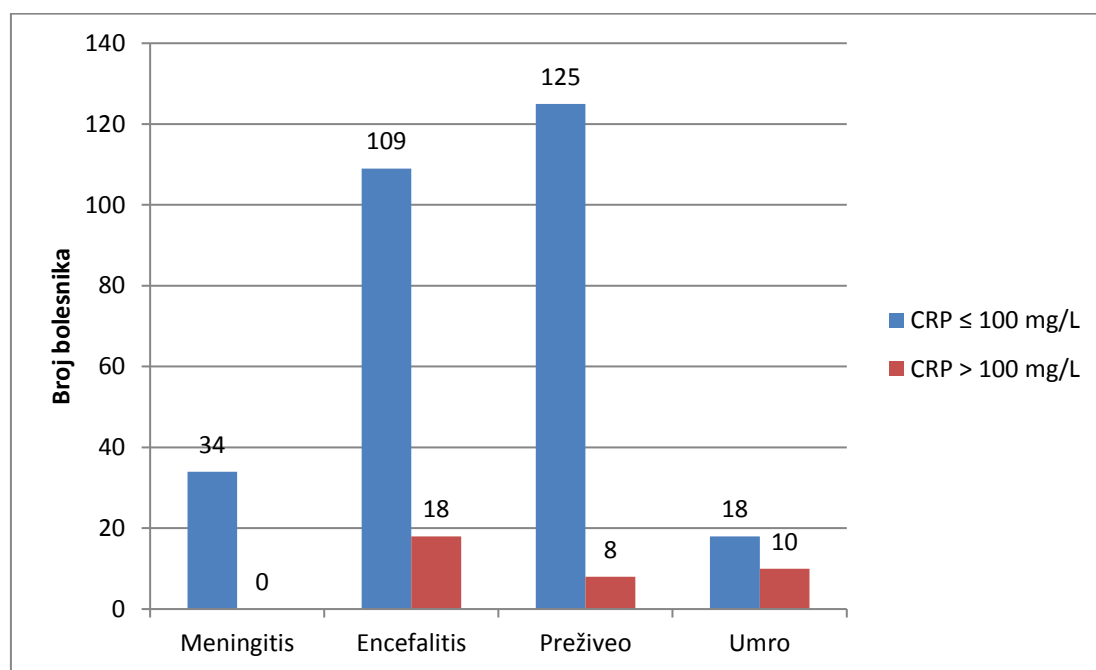
Grafikon 21: Povezanost leukocitoze i kliničke forme WNND

Prosečan procenat limfocita u leukocitarnoj formuli kod bolesnika sa WNND bio je $16.0\pm 8.5\%$. Limfocitopenija je registrovana kod 90 bolesnika (55.9%), a statistička analiza nije ukazivala na povezanost limfocitopenije sa kliničkom formom i prognozom WNND.

Anemija lakšeg stepena je bila prisutna kod 64 (39.7%) bolesnika, dok je anemija umerenog i teškog stepena bila prisutna kod 4 bolesnika. Nije utvrđena povezanost prisustva anemije sa kliničkom formom i prognozom WNND.

Trombocitopenija je registrovana kod 46 (28.6%) bolesnika, ali nije dokazan njen klinički niti prognostički značaj.

Sedimentacija eritrocita i vrednosti fibrinogena nisu se značajno razlikovale među grupama bolesnika sa WNM i WNE, niti su bile statistički značajno povezane sa prognozom WNND. Prosečna vrednost CRP bila je statistički značajno veća kod bolesnika sa encefalitisom (50.7 ± 4.9 mg/L) nego kod bolesnika sa meningitisom (25.2 ± 4.7 mg/L) ($p=0.001$). Vrednosti CRP iznad 100 mg/L su bile prisutne kod 18 bolesnika sa encefalitisom, a nisu registrovane kod bolesnika sa meningitisom ($p=0.020$) - grafikon 22. Vrednost CRP iznad 100 mg/L je bio faktor značajno povezan sa smrtnim ishodom ($p<0.001$) - grafikon 22.



Grafikon 22: Povezanost vrednosti CRP iznad 100 mg/L sa kliničkom formom i kratkoročnom prognozom WNND

Hiponatrijemija je registrovana kod 23 (14.3%) bolesnika sa WNND, ali prisustvo hiponatrijemije nije bilo povezano sa kliničkom formom niti prognozom bolesti.

Povišene vrednosti AST su bile prisutne kod 78 (48.4%) analiziranih bolesnika, a povišene vrednosti ALT kod 63 (39.1%) bolesnika sa WNND. Dva bolesnika sa povišenim enzimima jetre imalo je preegzistentno oboljenje jetre (hronični hepatitis C i zloupotreba alkohola). Povišene vrednosti enzima jetre nisu bile povezane sa kliničkom formom i prognozom WNND.

Povišene vrednosti CK su bile registrovane kod 108 bolesnika (67.1%). Među bolesnicima sa povišenim vrednostima CK, četiri bolesnika je imalo epileptični napad, a kod ostalih bolesnika isključeni su drugi uzroci rabdomiolize (infarkt miokarda, upotreba statina i sl.). Povišene vrednosti CK nisu bile povezane sa kliničkom formom i prognozom WNND.

Citološki i biohemijski nalaz CST kod obolelih od WNND prikazani su na tabeli broj 8.

Tabela broj 8: Hematološke i biohemijske analize CST kod bolesnika sa WNND

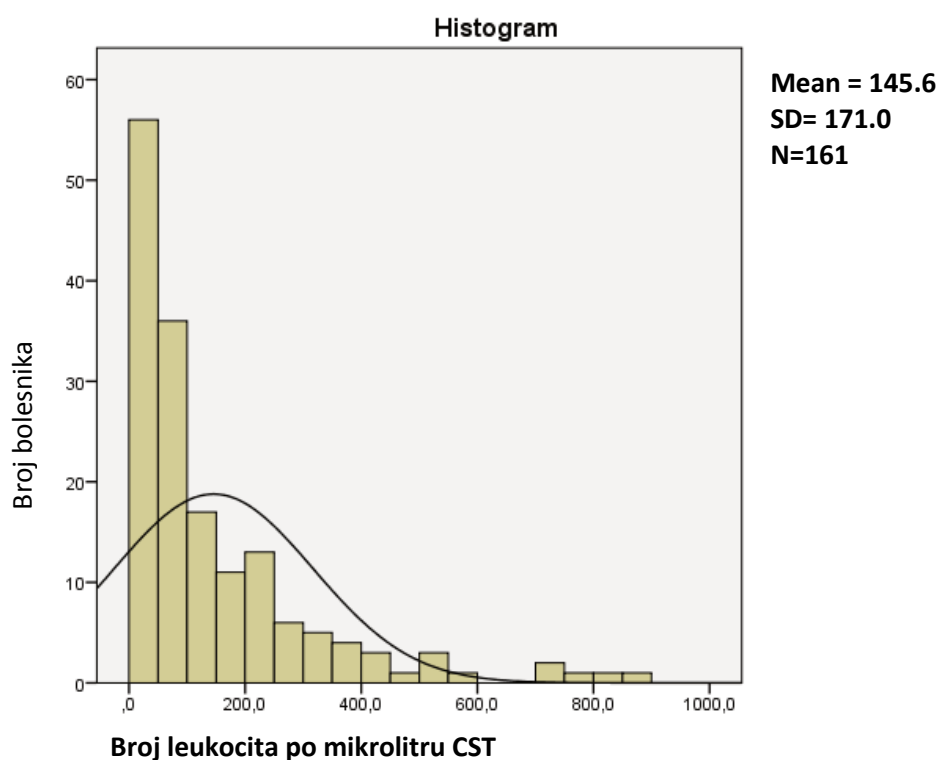
	Mean±SD	Min - Max	Referentna vrednost
Hematološke analize			
Broj leukocita (x10 ⁶ /L)	145.6±170.9	0-882	< 5x10 ⁶ /L
Limfociti (%)	52.0±27.8	1-100	/
Neutrofili (%)	47.6±27.7	0-99	/
Biohemijske analize			
Glikorahija (mmol/L)	4.0±1.4	1.7-9.9	2.7-4.1
Proteinorahija (g/L)	1.05±0.53	0.36-3.07	0.15-0.45

Ispitivanje citološkog nalaza u CST kod bolesnika sa WNND ukazala su na prosečnu vrednost leukocita od 146 po mikrolitru sa blagom predominacijom limfocita (52%).

Pleocitoza je registrovana kod 97% bolesnika sa WNE, sa prosečnim vrednostima leukocita 143±159 po mikrolitru CST i kod svih (100%) bolesnika

sa WNM, koji su imali prosečno 153 ± 210 leukocita po mikrolitru CST. Na osnovu statističke analize, nije dokazana značajna razlika u prisustvu pleocitoze, niti u prosečnom broju leukocita u CST u zavisnosti od kliničke forme oboljenja ($p=0.766$). Izražena pleocitoza (iznad 500 leukocita po mikrolitru CST) je registrovana kod 5% bolesnika sa WNE i kod 9% bolesnika sa WNM.

Na grafikonu 23, prikazan je histogram frekvencija vrednosti leukocita u CST (sa histogramom normalne raspodele) na kome se vidi da je kod najvećeg broja bolesnika nađeno do 50 leukocita po mikrolitru CST.

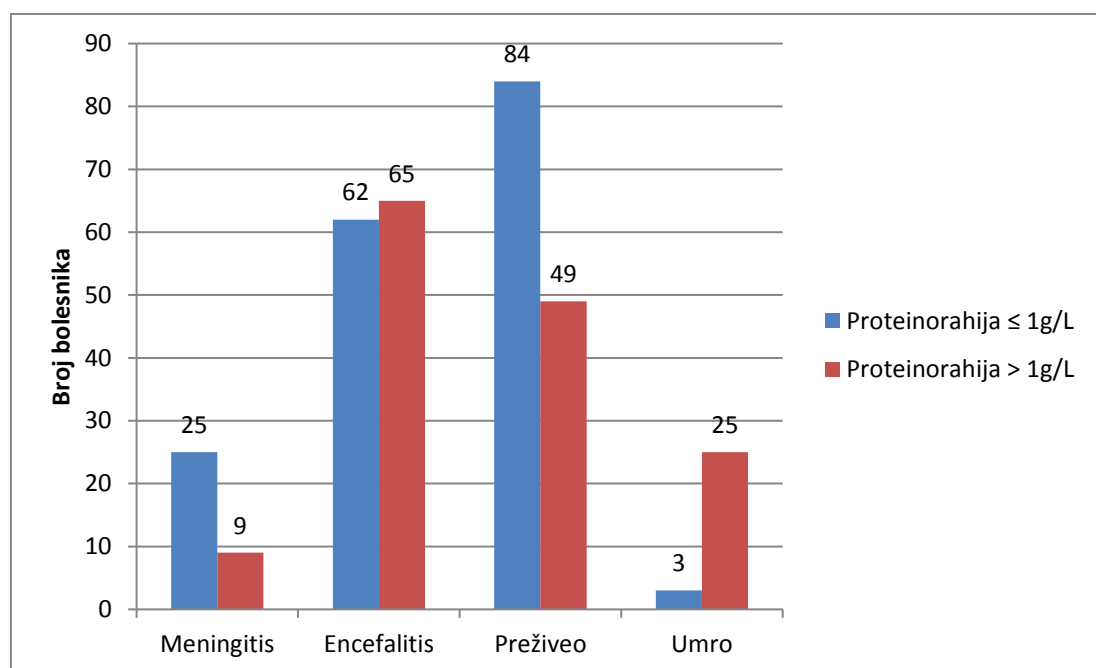


Grafikon 23: Raspodela vrednosti leukocita po mikrolitru CST kod bolesnika sa WNND, sa histogramom normalne raspodele

Na osnovu diferencijacije leukocita u CST kod obolelih od WNND, verifikovano je prosečno $53 \pm 28\%$ limfocita kod bolesnika sa encefalitisom, dok je prosečan broj limfocita kod bolesnika sa meningitisom bio $50 \pm 27\%$ ($p=0.567$).

Predominacija neutrofila u CST bila je prisutna kod 41% bolesnika sa WNE i 50% sa WNM ($p=0.343$). Kod bolesnika čiji su simptomi trajali manje od 3 dana pre analize CST, registrovan je prosečan procenat neutrofila u CST od $48\pm 25\%$, a kod bolesnika sa dužim trajanjem simptoma procenat neutrofila je iznosio $47\pm 29\%$ ($p=0.957$).

Vrednosti proteinorahije iznad 1g/L češće su bile registrovane kod bolesnika sa WNE (51%) nego kod bolesnika sa WNM (29%) ($p=0.010$).



Grafikon 24: Povezanost vrednosti proteinorahije iznad 1g/L sa kliničkom formom WNND i kratkoročnom prognozom

Prosečna vrednost proteinorahije kod bolesnika sa WNE (1.1 ± 0.53 g/L) bila je statistički značajno veća nego kod bolesnika sa WNM (0.86 ± 0.48 g/L) ($p=0.015$). Vrednost proteinorahije iznad 1g/L bila je povezana sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom WNND ($p<0.001$) - grafikon 25.

Hipoglikorahija (vrednost glikorahije niža od referentne vrednosti laboratorije 2.7 mmol/L), je registrovana kod 15 (9.3%) bolesnika sa WNND. Kod svih bolesnika sa hipoglikorahijom registrovane su normalne vrednosti

glukoze u krvi u vreme uzorkovanja CST. Među bolesnicima sa hipoglikorahijom, 12 bolesnika je imalo WNE, a 3 bolesnika WNM. Kod bolesnika sa WNND i hipoglikorahijom prosečno je bilo prisutno 243 ± 245 leukocita po mikrolitru CST, prosečan procenat limfocita $52 \pm 27\%$, glikorahija 2.2 ± 0.3 mmol/L i proteinorahija 1.49 ± 0.68 g/L.

U cilju određivanja prediktivnog značaja serumskog CRP iznad 100 mg/L i vrednosti proteinorahije iznad 1g/L izvršena je multivarijantna logistička regresija uz uključivanje drugih varijabli sa značajnom povezanošću sa smrtnim ishodom (uzrast ≥ 60 godina, mehanička ventilacija). Statistička značajnost vrednosti CRP iznad 100 mg/L i proteinorahije iznad 1g/L je zadržana u multivarijantnoj logističkoj regresiji, kojom je pokazano da su proteinorahija >1 g/L ($p=0.011$; OR 7.21; 95% CI 1.56-33.8) i CRP >100 mg/L ($p=0.002$; OR 12.07; 95% CI 2.43-60.02) bili nezavisni prediktori smrtnog ishoda kod obolelih od WNND – tabela 9.

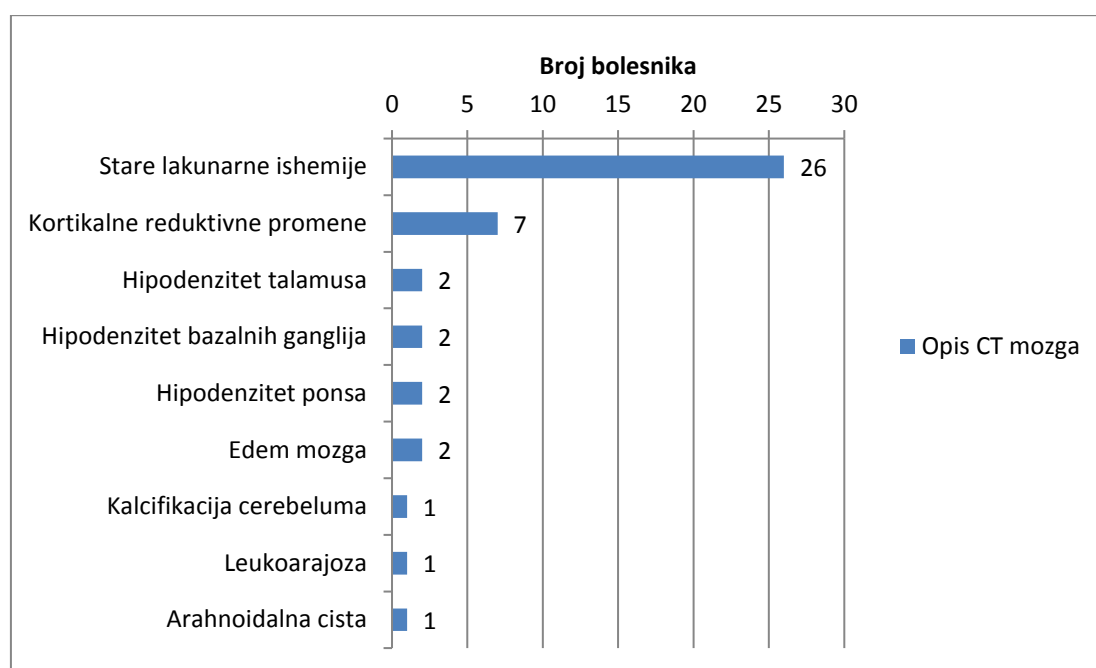
Tabela 9: Laboratorijske analize prediktori smrtnog ishoda kod obolelih od WNND

	Preživeo (N=133)	Umro (N=28)	P vrednost	Multivarijantna analiza - Odds ratio (95 % CI)
Krv				
Leukocitoza (%)	58 (44)	16 (57)	0.192	/
Anemija (%)	57 (43)	11 (39)	0.728	/
Trombocitopenija (%)	36 (27)	10 (36)	0.357	/
CRP >100 mg/L (%)	8 (6)	10 (36)	<0.001	7.21 (1.56-33.28)
Cerebrospinalna tečnost				
Leukociti $< 5 \times 10^6$ /L (%)	2 (1.5)	2 (7)	0.081	/
Leukociti $> 500 \times 10^6$ /L (%)	7 (5)	2 (7)	0.694	/
Neutrofili > 50 % (%)	59 (44)	10 (36)	0.401	/
Hipoglikorahija (%)	13 (10)	2 (7)	0.663	/
Proteinorahija > 1 g/L (%)	49 (37)	25 (89)	<0.001	12.07 (2.43-60.02)

4.5. Neuroradiološki nalazi

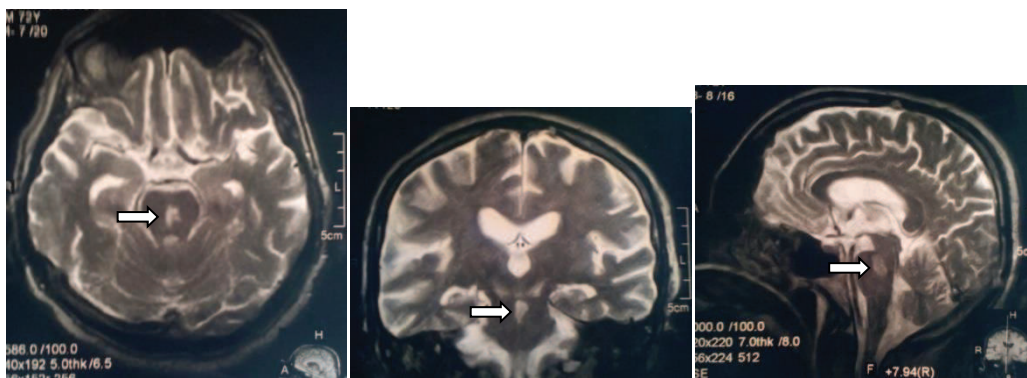
Od ukupno 207 bolesnika sa WNND, CT mozga urađen je kod 174 bolesnika (84.0%).

Nalaz CT mozga je opisan kao uredan kod 130 (75%) bolesnika. Patološki CT mozga je opisan kod 44 bolesnika, a rezultati su prikazani na grafikonu 25.



Grafikon 25: Opis CT pregleda mozga kod bolesnika sa WNND

NMR mozga urađena je kod 21 (10.1%) bolesnika sa WNND. Kod 9 bolesnika NMR mozga opisan je kao uredan. Kod 6 bolesnika sa WNE opisane su hiperintenzne T2W/FLAIR lezije: kod 2 bolesnika u predelu ponsa, kod 3 bolesnika u predelu bazalnih ganglija, jednog bolesnika u predelu temporalne regije i kod jednog u parijetookcipitalnoj regiji. Kod 2 bolesnika opisana je pahimeningopatija. Kod 4 bolesnika opisane su lezije neinflamatorne prirode (vaskularnog porekla).



Slika 3: NMR T2/FLAIR hiperintenzna lezija u regiji ponsa kod bolesnika sa WNND i encefalitisom moždanog stabla



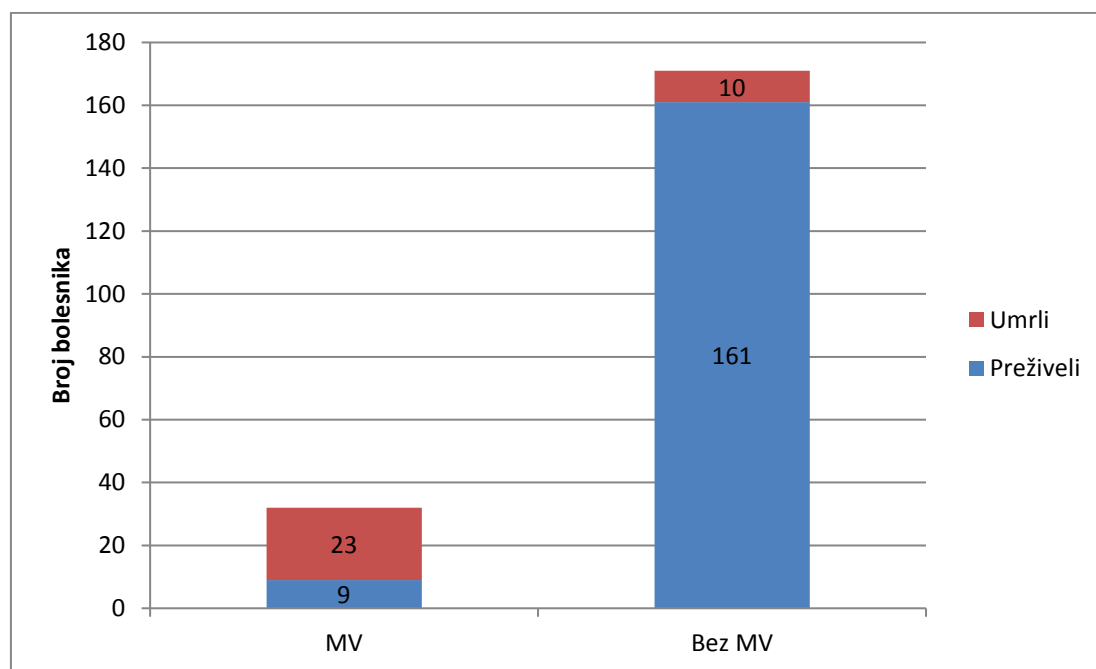
Slika 4: NMR T2/FLAIR multiple hiperintenzne lezije u regiji bazalnih ganglija (transverzalna i koronarna ravan) i parijetookcipitalne regije (sagitalna ravan) kod bolesnika sa WNE

NMR lumbosakralne kičme urađen je kod 2 bolesnika sa WNND i znacima AFP, kod jednog bolesnika sa monoparezom donjih ekstremiteta i kod drugog sa flakcidnom asimetričnom paraparezom. NMR lumbosakralne kičme ukazivao je na spinalni meningitis i arahnoiditis, a inflamatorne lezije kičmene moždine nisu opisane.

4.6. Komplikacije

Najteža komplikacija kod naših bolesnika sa WNND bila je respiratorna insuficijencija sa potrebom za endotrahealnom intubacijom i mehaničkom ventilacionom potporom. Mehanička ventilacija bila je neophodna kod 32 bolesnika (15.5%) sa WNE - grafikon 26. Među bolesnicima koji su zahtevali mehaničku ventilaciju bilo je 14 bolesnika (46.8%) sa znacima AFP.

Dužina primene mehaničke ventilacije prosečno je iznosila 8.9 ± 10.7 dana (1 do 47 dana). Primena mehaničke ventilacije duže od dve nedelje (15 do 47 dana) bila je neophodna kod 4 bolesnika sa WNE i znacima AFP. Od 33 bolesnika sa smrtnim ishodom mehanički je ventilisano 23 bolesnika. Statističkom analizom je utvrđena značajna povezanost mehaničke ventilacije sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom ($p < 0.001$) - grafikon 26.



Grafikon 26: Povezanost kratkoročne prognoze WNND sa mehaničkom ventilacijom

Što se tiče povezanosti mehaničke ventilacije sa dugoročnom prognozom, od 8 bolesnika koji su mehanički ventilisani niko nije postigao zadovoljavajući funkcionalni ishod (p=0.013).

Od ostalih komplikacija, najčešće su registrovani pneumonija, kod 22 bolesnika (10.6%), *Clostridium difficile* infekcija i infekcija urinarnog trakta – tabela 10. Kod 3 bolesnika sa urinarnom infekcijom izolovan je *Enterococcus sp*, kod 3 bolesnika *Klebsiella-Enterobacter sp.* i kod 2 bolesnika *Pseudomonas aeruginosa*. Od ukupno 2 bolesnika sa septičnim stanjem, kod jednog je iz hemokulture izolovan je ekstremno rezistentni *Acinetobacter baumannii* osetljiv samo na kolistin, a kod drugog *Proteus mirabilis*. Sem mehaničke ventilacije, pneumonije i akutne bubrežne insuficijencije, čije je prisustvo statistički značajno bilo povezano sa smrtnim ishodom u univarijantnoj analizi, ostale komplikacije nisu imale značajan uticaj na kratkoročnu i dugoročnu prognozu WNND u našem ispitivanju.

Tabela 10: Komplikacije kod bolesnika sa WNND i povezanost sa smrtnim ishodom

	Preživeli N=174	Umrli N=33	P vrednost
Meh. ventilacija (%)	9 (5)	23 (70)	<0.001
Pneumonija (%)	13(7)	9 (27)	0.013
Urinarna infekcija (%)	8 (5)	2 (6)	0.258
C. difficile (%)	9 (5)	2 (6)	0.211
Septično stanje (%)	2 (1)	0	0.567
Dekubitus (%)	2 (1)	1 (3)	0.429
Tromboflebitis (%)	6 (3)	1 (3)	0.895
Epi napad (%)	4 (2)	2 (6)	0.343
ABI (%)	4 (2)	6 (18)	0.001

4.7. Prediktori razvoja encefalitisa, smrtnog ishoda i nepovoljne dugoročne prognoze i funkcionalnog ishoda

Na osnovu rezultata multivarijantne logističke regresije, jedini prediktor razvoja WNE kao teške kliničke forme WNND bio je uzrast ≥ 60 godina (OR 3.4; 95% CI 1.6-7.3), dok je odsustvo komorbiditeta bilo prediktor razvoja WNM kao lakšeg kliničkog oblika (OR 0.3; 95% CI 0.1-0.6) – tabela broj 11.

Tabela 11: Prediktori razvoja encefalitisa kod obolelih od WNND

	Meningitis N=46	Encefalitis N=161	Multivarijantna analiza	
			P vrednost	Odds ratio (95 % CI)
Uzrast ≥ 60 godina (%)	20 (43)	129 (80)	0.001	3.4 (1.6-7.3)
HTA (%)	17 (37)	104 (65)	0.572	/
Bez komorbiditeta (%)	27 (59)	35 (22)	0.002	0.3 (0.1-0.6)

Prediktori smrtnog ishoda (tabela 12) kod naših bolesnika sa WNND bili su uzrast ≥ 60 godina (OR 15.3; 95% CI 1.6-140.8), prethodno lečeno cerebro-

Tabela 12: Prediktori smrtnog ishoda kod obolelih od WNND

	Preživelo N=174	Umro N=33	Multivarijantna analiza	
			P vrednost	Odds ratio (95 % CI)
Uzrast ≥ 60 godina (%)	118 (68)	31 (94)	0.016	15.3 (1.6-140.8)
Encefalitis (%)	128 (73)	33 (100)	0.378	/
HTA (%)	96 (55)	25 (76)	0.638	/
Bubrežna insuficijencija (%)	3 (2)	3 (9)	0.764	/
Cerebrovask. oboljenje (%)	7 (4)	5 (15)	0.026	7.1 (1.3-39.9)
Koma (%)	5 (3)	27 (82)	<0.001	153.1 (33.1-707.5)
AFP (%)	19 (11)	11 (33)	0.666	/
Hospitalizacija > 30 d (%)	11 (6)	7 (21)	0.851	/
Mehanička ventilacija (%)	9 (5)	23 (70)	0.606	/
Pneumonija (%)	13 (7)	9 (27)	0.617	/

vaskularno oboljenje (OR 7.1; 95% CI 1.3-39.9) i razvoj kome (OR 153.1; 95% CI 33.1-707.5).

Klinička slika encefalitisa bila je jedini nezavisni prediktor nepovoljne dugoročne prognoze kod naših bolesnika sa WNND (OR 9.1; 95% CI 3.3-25.1) – tabela broj 13.

Tabela broj 13: Prediktori nepovoljne dugoročne prognoze kod obolelih od WNND

	Potpuni oporavak (mRS 0) N=66	Neopotpuni oporavak (mRS 1-5) N=90	Multivarijantna analiza	
			P vrednost	Odds ratio (95 % CI)
Uzrast ≥ 60 godina (%)	33 (50)	70 (78)	0.083	/
Encefalitis (%)	33 (50)	84 (93)	<0.001	9.1 (3.3-25.1)
HTA (%)	26 (39)	55 (61)	0.928	/
Koronarna bolest (%)	5 (8)	19 (21)	0.519	/
Imunosupresija (%)	1 (2)	10(11)	0.070	/
Bez komorbiditeta (%)	34 (52)	21 (23)	0.757	/
Mehanička ventilacija (%)	0	8 (9)	0.999	/

5. DISKUSIJA

WNV je arbovirus koji se najčešće prenosi ubodom komarca, a najveći procenat inficiranih osoba ima asimptomatsku formu oboljenja. Do pojave WNND kao najtežeg oblika WNV infekcije dolazi kod jedne od 150 inficiranih osoba, a najčešće se klinički manifestuje kao virusni meningitis, virusni encefalitis i/ili AFP. Težina kliničke slike, dužina hospitalizacije obolelih, značajan mortalitet i neizvesna dugoročna prognoza svrstava WNND u oboljenja koja značajno opterećuju celokupan zdravstveni sistem u zemljama gde je WNV endemski prisutan.

Pojava sezonskih epidemija WNV, tokom leta i rane jeseni je danas redovna u pojedinim regijama Evrope, pre svega na Mediteranu, gde se prisustvo WNV smatra endemskim (84,85). Većina dosadašnjih epidemija u svetu uzrokovana je linijom 1 WNV koja je u bliskoj vezi sa linijom 1 WNV povezanom sa epidemijama u Izraelu i Severnoj Americi (86). Linija 2 WNV je dominantna u Africi, gde se beleži manje neuroloških oblika WNV infekcije u poređenju sa Severnom Amerikom i Evropom, na osnovu čega se dugo smatralo da je linija 2 manje patogena i manje neuroinvazivna u poređenju sa linijom 1 WNV (87).

WNV linije 2 u Evropi je prvi put identifikovan kada je izolovan iz tkiva mozga jastreba (*Accipiter gentiles*) u Mađarskoj 2004. godine, a iste godine u Rusiji je potvrđen i prvi humani slučaj uzrokovan linijom 2 WNV (88,89). Posle 2004. godine WNV linije 2 se brzo proširio u istočne delove Austrije i u zemlje Balkana (90). Širenje linije 2 WNV dovodi do pojave velike epidemije u Grčkoj 2010., Rumuniji 2010. i Italiji 2011. godine (91,92,93).

Prvi dokazi prisustva WNV u Srbiji sežu do 1972. godine, kada su Borđoški i saradnici svojim istraživanjem pronašli antitela specifična na WNV kod 2.6% do 4.7% testiranih seruma (94). Seroepidemiološke studije u bivšoj

Jugoslaviji krajem 80-ih godina XX veka ukazala su na prevalencu WNV 1-8% u Srbiji, 1-3% u Hrvatskoj i 1% u Bosni i Hercegovini, Kosovu i Crnoj Gori (95). Serološka istraživanja kod konja na teritoriji Srbije koja su sprovedeli Lupulović i saradnici tokom 2009. i 2010. godine ukazivala su na seropozitivnost kod 14% (42/349) ispitivanih konja i na mnogo intenzivniju cirkulaciju WNV u Srbiji nego što se do tada smatralo (96). Ovo istraživanje, uz već navedene podatke o epidemijama u zemljama iz okruženja, ukazivalo je na moguću pojavu WNV infekcije u Srbiji. Prvi humani slučajevi WNV infekcije u Srbiji su registrovani u Beogradu početkom avgusta 2012. godine, a do sredine oktobra iste godine u Klinici za infektivne i tropske bolesti KCS ukupno je lečeno 58 obolelih od infekcije WNV, dominantno sa WNND, a detaljan opis prve humane epidemije u Srbiji objavili su Popović i saradnici (20). Posle prve epidemije 2012. godine, usledila je još jedna epidemija u Srbiji 2013. godine sa 302 slučaja WNV infekcije (97).

Filogenetska analiza genoma WNV detektovanog iz tkiva divljih ptica u Srbiji rezultat je istraživanja koje su sprovedeli Petrović i saradnici (98). Ovo istraživanje je pokazalo da detektovani virusi pripadaju liniji 2 WNV koja je veoma filogenetski slična liniji 2 WNV odgovornoj za epidemije u Mađarskoj, Grčkoj i Italiji (98). Uprkos tome što u Srbiji za sada nije izolovan genetski materijal WNV iz humanog materijala, više autora ukazuje na povezanost epidemija u Srbiji sa linijom 2 WNV (98-100).

U literaturi se navodi da se većina epidemija WNV infekcije u umereno kontinentalnim i subtropskim zonama dešava sredinom leta i u ranu jesen (14,101,102). Tokom epidemija WNV infekcije 2012. i 2013. godine u Srbiji, dominantan broj slučajeva je registrovan upravo sredinom leta, tokom avgusta meseca. U skorašnjim, uglavnom urbanim epidemijama, kao faktori rizika za infekciju WNV navode se izloženost ubodima komaraca, dužina vremena provedena napolju, nemogućnost aplikacije repelenata, boravak u blizini reka i bara, kao i ustajalih voda (42,103).

Najveći procenat bolesnika obuhvaćenih ovim istraživanjem bilo je urbano stanovništvo. Prisutnost komaraca u okolini bolesnika je uočena kod oko trećine slučajeva sa WNND, a boravak pored reke naveden je kao faktor rizika za oko 70% bolesnika.

Učestalost WNND je značajno povezana sa uzrastom i povećava se sa godinama života. Uprkos tome što je pojava WNND moguća u svim uzrasnim grupama, proporcija osoba kod kojih se razvija WNND je značajno veća među osobama koje su odmakle životne dobi u poređenju sa mlađim osobama, što se pre svega odnosi na WNE (55,56). WNND se retko registruje kod dece i osoba mlađih od 30 godina (104).

U našem istraživanju, prosečna starost obolelih bila je 64.9 godina (21-88 godina; medijana 66.0 godina). Populacija uzrasta ≥ 60 godina bila je značajno zastupljenija i obuhvatala je 72% ukupno obolelih od WNND.

Na osnovu istraživanja koje su sproveli O'Leary i saradnici, incidenca WNND raste u proseku 1.5 puta sa svakom dekadom života, što kao rezultat ima 12 puta veći rizik da osobe stare 80-90 godina u kontaktu sa WNV razviju WNND nego osobe mlađe od 40 godina (62). Isto istraživanje ukazuje i na višestruko povećan rizik od smrtnog ishoda bolesnika sa WNND uzrasta 80-90 godina, koji je u poređenju sa obolelima mlađim od 40 godina čak 29 puta veći (RR 29.6 95% CI 14.2-62.0; n=4165).

Bode i saradnici su na osnovu svojih rezultata procenili da su bolesnici sa WNM značajno mlađi (medijana 43 godine) od bolesnika sa WNE (medijana 62 godine). Isti autori ukazuju da kod bolesnika sa WNND sa svakom godinom života raste rizik od smrtnog ishoda za oko 10 procenata (aOR 1.1 95% CI 1.0-1.3; n=228) (53). Našim ispitivanjem došli smo do sličnog zaključka, s obzirom da se rizik od smrtnog ishoda kod naših bolesnika sa WNND za svaku godinu života povećavao za oko 7 procenata ($p < 0.001$; OR = 1.07; 95% CI 1.03-1.12; n=207).

Papa i saradnici, koji su opisali karakteristike epidemije WNV infekcije u Grčkoj iz 2010. godine, navode da je od 65 bolesnika sa encefalitisom tokom ove epidemije čak 60 bilo uzrasta 50 i više godina, kao i da su svi bolesnici sa letalnim ishodom bili stariji od 70 godina (91).

Na povezanost starosti sa WNE kao najtežom formom WNND i sa smrtnim ishodom ovog oboljenja ukazuju i brojne druge studije (14,77,78,105).

U našem istraživanju, učestalost WNE bila je značajno veća (80%) u kategoriji obolelih od WNND uzrasta ≥ 60 godina. Bolesnici sa WNM bili su značajno mlađi od bolesnika sa WNE. Uzrast ≥ 60 godina u našem istraživanju je jedan od nezavisnih prediktora razvoja encefalitisa kod obolelih od WNND. Uzrast kod obolelih od WNND je bio faktor značajno povezan sa smrtnim ishodom. Oboleli od WNND sa smrtnim ishodom, bili su značajno stariji (prosečno 73 godine) od bolesnika koji su preživeli (prosečno 63 godine). Smrtnost u populaciji obolelih od WNND uzrasta ≥ 60 godina bila je značajno veća (20.8%) od smrtnosti bolesnika mlađih od 60 godina (3.4%). Na značajno veću smrtnost obolelih starije životne dobi ukazuju i autori iz Rumunije (15%) i Izraela (29%) (106,107). Uzrast ≥ 60 godina bio je nezavisni prediktivni faktor smrtnog ishoda kod naših bolesnika sa WNND.

Klee i saradnici su ispitivanjem dugoročne prognozu kod bolesnika sa WNND pronašli da su osobe mlađe od 65 godina imale veću verovatnoću potpunog oporavka u poređenju sa obolelima uzrasta 65 i više godina, a uzrast je bio i jedini značajan prediktor povoljne dugoročne prognoze (76).

U našem istraživanju, utvrđena je povezanost uzrasta i dugoročne prognoze kod obolelih od WNND, s obzirom da je potpuni oporavak registrovan kod 32% bolesnika uzrasta ≥ 60 godina, naspram 62% mlađih bolesnika. Ipak, nismo uspjeli da dokažemo prediktivni značaj uzrasta ≥ 60 godina na dugoročnu prognozu i funkcionalni ishod.

Tokom epidemije u Njujorku, gde je opisano 59 slučajeva WNV infekcije od kojih 37 bolesnika sa WNE muški pol je bio blago zastupljeniji (53%) (14). Jean i saradnici su istraživanjem epidemije u 40 okruga u Kaliforniji iz 2005. obuhvatili 880 slučajeva WNV infekcije i 305 slučajeva WNND i dokazali su da je jedan od faktora rizika za razvoj WNND bolesti bio i muški pol (108).

Murray i saradnici su, retrospektivno proučavajući medicinske kartone 172 bolesnika sa WNV infekcijom, dominantno sa WNND, ukazali na veću učestalost muškaraca među ukupnim brojem bolesnika i u subpopulaciji bolesnika sa encefalitisom. Univarijantnom statističkom analizom su pokazali da muški pol predstavlja faktor rizika za smrtni ishod, ali u multivarijantnom modelu muški pol nije zadržao nepovoljan prediktivni značaj (109).

U populaciji obuhvaćenoj našim istraživanjem, s obzirom na statistički značajnu predominaciju muškog pola, zaključili smo je da muški pol predstavljao značajan faktor rizika povezan sa razvojem WNND ($p < 0.001$). Međutim, nismo dokazali povezanost pola sa kliničkom formom WNND, niti povezanost pola sa nepovoljnom kratkoročnom prognozom (smrtnim ishodom), dugoročnom prognozom i funkcionalnim ishodom oboljenja.

S obzirom da se WNND može javiti nezavisno od starosne kategorije i pola bolesnika, očigledno je da postoje drugi faktori rizika za razvoj i nepovoljnu prognozu ovog oboljenja koji su vezani za samog bolesnika. Različiti komorbiditeti predstavljaju predispoziciju za razvoj WNND i smrtni ishod, a njihovo određivanje je naročito važno kako bi se identifikovale grupe bolesnika sa povećanim rizikom i preduzele neophodne preventivne mere.

Arterijska hipertenzija može doprineti narušavanju integriteta endotela krvnih sudova mozga i na taj način olakšavati ulazak i replikaciju WNV u CNS, time omogućavajući razvoj WNND (71). Sličan mehanizam predispozicije u literaturi se navodi i za cerebrovaskularna oboljenja.

Diabetes mellitus predstavlja poznat faktor rizika za razvoj različitih infekcija tako što dovodi do oštećenja urođenog i stečenog imuniteta, snižavajući hemotaksu i funkciju neutrofila, produkciju citokina i Th1 celularni imuni odgovor (110).

Imunosupresija dovodi do povećane replikacije WNV i produžavanja viremije, što predstavlja faktor rizika za razvoj WNND (71). Bolesnici sa hematološkim malignitetima i sniženom funkcijom T limfocita takođe imaju povećan rizik za pojavu WNND i lošu prognozu, a neki od autora navode konkomitantnu terapiju rituximabom sličnim faktorom rizika (109,111). Bolesnici sa transplantiranim organima takođe su pod povećanim rizikom za razvoj WNND, što može biti zbog posttransplantacione imunosupresivne terapije (112). Naročito visok rizik za razvoj teške kliničke slike WNND u poređenju sa uobičajenim putem infekcije ubodom komarca, imaju bolesnici inficirani zaraženim transplantiranim organom (113,114).

Nash i saradnici su dokazali da je diabetes mellitus značajan faktor rizika za smrtni ishod kod bolesnika sa WNND (RR 5.1; 95% CI 1.5-17.3), ujedno ukazujući na povećanu sklonost ovih bolesnika ka infekcijama (14).

Chowers i koautori u studiji iz Izraela naglašavaju protektivni značaj odsustva komorbiditeta na ishod WNND (107).

Deskriptivna studija 228 bolesnika sa WNV infekcijom iz Kolorada (2003.) ukazuje na povećan rizik od razvoja encefalitisa kod bolesnika sa diabetes mellitusom i zloupotrebom alkohola (53). Ista studija ukazuje na imunosupresiju i cerebrovaskularna oboljenja kao značajne faktore povezane sa smrtnim ishodom.

Jean i saradnici iz Kalifornije navode arterijsku hipertenziju i diabetes mellitus kao faktore rizika za razvoj WNND kod bolesnika sa WNV infekcijom (OR 2.08; 95% CI 1.18-2.09 odnosno OR 4.15; 95% CI 2.63-6.55) (108).

Murray i saradnici su dokazali da arterijska hipertenzija i kardiovaskularna oboljenja predstavljaju nezavisne faktore rizika za razvoj encefalitisa kod bolesnika sa WNV infekcijom, dok su kao faktori rizika za smrtni ishod u njihovom istraživanju navedeni hronična bubrežna bolest, hronični C virusni hepatitis i imunosupresija (78).

U velikom istraživanju na uzorku od 641 bolesnika sa WNND, Lindsey i koautori ukazuju da su značajni faktori za razvoj encefalitisa hronična bubrežna bolest, istorija maligne bolesti, zloupotreba alkohola, diabetes mellitus i arterijska hipertenzija (115). Isti autori su dokazali da je imunosupresija povezana sa nepovoljnim ishodom WNND.

U našem istraživanju, najčešći komorbiditeti kod bolesnika sa WNND bili su arterijska hipertenzija (58%), diabetes mellitus (28%) i koronarna bolest (16%). Ređe su registrovani imunosupresija (7%), prethodno cerebrovaskularno oboljenje (6%), istorija maligne bolesti (3%), hronična bubrežna insuficijencija (3%) i zloupotreba alkohola (2%).

Jedini faktor rizika među hroničnim bolestima povezan sa razvojem WNE bila je arterijska hipertenzija ($p < 0.001$). Prediktivni značaj arterijske hipertenzije za razvoj WNE nije dokazan, a odsustvo komorbiditeta bio je nezavisni prediktor manje verovatnoće razvoja encefalitisa kod obolelih od WNND.

Komorbiditeti povezani sa smrtnim ishodom kod naših bolesnika sa WNND bili su arterijska hipertenzija ($p = 0.028$), hronična bubrežna insuficijencija ($p = 0.021$) i prethodno cerebrovaskularno oboljenje ($p = 0.012$). Među navedenim komorbiditetima jedini nezavisni prediktor smrtnog ishoda bilo je prethodno cerebrovaskularno oboljenje.

Cook i saradnici su, prateći oporavak bolesnika sa WNV infekcijom tokom 6 meseci po otpustu iz bolnice, došli do zaključka da simptomi perzistiraju kod 53% bolesnika, a kod bolesnika sa arterijskom hipertenzijom ili

diabetes mellitusom rizik za perzistiranje simptoma bio je značajno veći (OR 2.8 95% CI 1.4-5.6; n=265) (116).

Loeb i koautori su u svojoj studiji prognoze bolesnika godinu dana posle WNV infekcije ukazali na povezanost dobre dugoročne prognoze kako u mentalnom, tako i fizičkom funkcionisanju sa odsustvom hroničnih oboljenja (117).

Kod naših ispitanika sa WNND, hronične bolesti povezane sa nepovoljnim oporavkom i funkcionalnim ishodom posle godinu dana praćenja, bile su arterijska hipertenzija ($p=0.007$), koronarna bolest (0.021) i imunosupresija (0.021). Odsustvo hroničnih bolesti bio je faktor povezan sa povoljnijom dugoročnom prognozom i potpunim oporavkom naših bolesnika sa WNND ($p<0.001$), ali nismo dokazali prediktivni značaj odsustva komorbiditeta.

Većina osoba inficiranih WNV (oko 80%) nema bilo kakve simptome, dok se simptomi kod 20% inficiranih razvijaju posle inkubacije koja najčešće traje 2 do 14 dana. Duži period inkubacije, do 21 dan se uglavnom opisuje kod imunokompromitovanih bolesnika (118). Simptomatska WNV infekcija može varirati od blagog oboljenja praćenog diskretnim simptomima u trajanju od nekoliko dana, do teških formi WNND praćenih smrtnim ishodom ili teškim sekvelama koje značajno narušavaju kognitivni i funkcionalni status bolesnika i mogu se održavati mesecima.

Najčešći simptomi WNND koji se navode u literaturi su povišena temperatura (70-100%), glavobolja (47-100%), malaksalost (42-85%) i poremećaj svesti (46-100%) (70,119-123). Kod naših bolesnika najučestaliji simptomi su bili povišena temperatura (98%), malaksalost (70%) i neurološki simptomi (68%). Prvi simptom WNND najčešće je bila povišena temperatura, koja se najčešće javljala već prvog dana bolesti (1.3 ± 1.1 dan). Naši bolesnici su hospitalizovani

oko 5.3 dana posle prvih simptoma, dok Nash i koautori navode da su simptomi njihovih bolesnika trajali 5.4 dana pre prijema (14).

Značajan broj bolesnika sa WNND manifestuje se pojavom nespecifičnih gastrointestinalnih simptoma kao što su povraćanje (30-75%) i proliv (15-35%), zatim se navode ospa (5-57%) i bolovi u mišićima (15-61%) (70,119-123). U našem ispitivanju dobili smo rezultate slične svetskim autorima, s obzirom na učestalost povraćanja (43%), proliva (14%) i bolova u mišićima (29%). Kod 7% naših bolesnika bila je prisutna makulozna ili makulopapulозна ospa, zahvatala je trup i/ili ekstremitete i izbijala je u proseku oko 4 dana od prvih simptoma. Učestalost ospe tokom epidemija WNV infekcije sredinom 20. veka i predominacijom bolesnika sa WNF bila je značajno veća (do 50%) u poređenju sa savremenim epidemijama i predominacijom WNND, sa učestalošću ospe do 22% (71,124-126). Simptomi sa niskom učestalošću kod bolesnika sa WNND uključuju gušobolju (5%), limfadenopatiju (2-4%) i simptome konjunktivitisa (3%) (14,107). U našem istraživanju kod obolelih od WNND nisu registrovani ovi simptomi. Epileptični napad je registrovan kod 3% naših bolesnika sa WNND (4% bolesnika sa encefalitisom), a u literaturi se navodi da su konvulzije moguća, ali retka pojava kod obolelih od WNND (127).

Posle uboda zaraženog komarca, kod inficirane osobe dolazi do kratkotrajne viremije koju kod predisponiranih osoba prati penetracija WNV kroz krvno-moždanu i krvno-likvorsku barijeru, odnosno dolazi do invazije CNS, što za posledicu ima razvoj WNND (128,129).

WNND se klinički ispoljava kao meningitis, encefalitis i/ili AFP, mada je distinkcija ovih entiteta često proizvoljna, a kombinovane forme oboljenja su uobičajene (70). U literaturi se može naći podatak da se kod oko 40% bolesnika sa WNND bolest ispoljava po tipu meningitisa, a oko 60% bolesnika razvije kliničku sliku encefalitisa (14,53,121).

WNM se klinički manifestuje kao i drugi virusni, odnosno "aseptični" meningitisi, povišenom temperaturom i simptomima i znacima meningealne inflamacije kao što su glavobolja, ukočen vrat, fotofobija, povraćanje (130). WNM uglavnom karakteriše povoljna prognoza, mada slično kao i WNF ovo oboljenje može precipitirati smrtni ishod kod starijih bolesnika i osoba sa pridruženim komorbiditetima (131). Ipak, najčešći klinički scenario je potpuni oporavak ovih bolesnika, uz povremeno dugotrajno održavanje inicijalnih simptoma, pre svega malaksalosti.

Meningealni znaci se na osnovu podataka iz literature registruju kod 19-57% bolesnika sa WNND (70). U našem istraživanju pozitivni meningealni znaci registrovani su kod preko 80% bolesnika, a kod 46 bolesnika (22%) nije bilo znakova lezije moždanog parenhima te su ispunjavali kliničke kriterijume za dijagnozu WNM. U literaturi se navodi da se kod bolesnika sa WNM za razliku od drugih virusnih meningitisa često javlja tremor, sa učestalošću i do 80% (132). Tremor je registrovan kod 9% naših bolesnika sa meningitisom. Hospitalizacija bolesnika sa meningitisom u našem istraživanju bila je kraća od mesec dana i prosečno je trajala 12.3 dana. Nijedan bolesnik sa WNM nije umro, a njih 78% se u potpunosti oporavilo do otpusta iz bolnice.

Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod bolesnika sa WNM su takođe bili povoljni, s obzirom da je potpuni oporavak (mRS 0) registrovan kod 85% bolesnika nakon godinu dana praćenja, a prosečna vrednost Barthel indeksa iznosila je 99.4. Povoljnu prognozu i potpuni oporavak većine bolesnika sa meningitisom opisuje i Sejvar (61). U našem istraživanju, najčešće prisutni simptomi kod obolelih od WNM posle godinu dana praćenja bili su malaksalost, mialgije i glavobolja. Klee i saradnici u svom istraživanju dugoročne prognoze bolesnika sa WNV infekcijom posle 6, 12 i 18 meseci od otpusta navode potpuni oporavak kod 44% bolesnika sa meningitisom. Isti autori navode malaksalost, otežano pamćenje i slabu koncentraciju kao najčešće subjektivne tegobe kod osoba sa preležanim WNM (76). Weatherhead i

saradnici navode da se 14% bolesnika sa WNM žali na ataksiju tokom perioda praćenja 1-3 godine od otpusta (133). Kod naših bolesnika sa WNM nije registrovana ataksija, slabost ekstremiteta i vrtoglavica u periodu praćenja.

WNE nastaje kao posledica inflamacije moždanog parenhima, a WNV ima poseban afinitet za regiju moždanog stabla, cerebeluma, bazalnih ganglija i prednjih rogova sive mase kičmene moždine (74,134). Histopatološki nalaz kod bolesnika sa WNE najčešće je karakterisan perivaskularnom limfoplazmocitnom infiltracijom, mikroglijalnim nodulima, reaktivnom proliferacijom astrocita, nekrozom i neuronofagijom sa predilekcijom ka strukturama talamusa, moždanog stabla i malomoždanih Purkinjeovih ćelija (135,136).

Početni simptomi WNE ne razlikuju se od prethodno navedenih nespecifičnih simptoma koji se javljaju kod obolelih od WNND (povišena temperatura, glavobolja, malaksalost, povraćanje). Sa zahvatanjem moždanog parenhima WNV infekcijom dolazi do pojave neuroloških simptoma, koji se pre svega odnose na različite forme poremećaja svesti, koji može biti kvalitativni (sommelencija, sopor, koma) i kvantitativni (dezorijentacija, konfuzija, agitacija, psihomotorni nemir), a dolazi i do pojave fokalnih neuroloških znakova, ređe i konvulzija (74).

Fokalni neurološki simptomi i znaci koji se javljaju kod bolesnika sa WNE su u direktnoj vezi sa regijom CNS koja je pogođena infekcijom (60). Tremor kod bolesnika sa WNE najčešće zahvata gornje ekstremitete, primarno je posturalni, mada može imati i kinetičku komponentu (63). Tremor se javlja sa učestalošću 12-100% u istraživanjima svetskih autora (14,130). Mioklonus se najčešće javlja u predelu gornjih ekstremiteta i lica, može biti prisutan i tokom sna, a njegovo prisustvo je tipično za WNE, jer se ne javlja se kod drugih flavivirusnih encefalitisa (70). U jednoj seriji bolesnika sa WNE trećina obolelih je imala znake mioklonusa (130). Parkinsonovi znaci (rigiditet, bradikinezija i posturalna nestabilnost) se takođe javljaju sa različitom

učestalosti kod bolesnika sa WNE. Opisuje se učestalost znakova lezije malog mozga, kao što su poremećaj koordinacije, ataksija i dizometrija 11% do 57% (119-121). Paraliza kranijalnih nerava se takođe može javiti kod bolesnika sa encefalitisom, a Weiss i saradnici opisuju ovu pojavu kod 11% slučajeva (121). Najčešće dolazi do paralize VII kranijalnog nerva, koja može biti unilateralna ili bilateralna, a afekcija VIII kranijalnog nerva klinički se prezentuje u vidu nistagmusa (61,122). Disfagija i dizartrija mogu biti znaci lezije kranijalnih nerava ali i znaci encefalitisa moždanog stabla.

U našem istraživanju klinička slika encefalitisa registrovana je kod 78% obolelih od WNND. Predominacija slučajeva sa WNE kod obolelih od WNND opisana je i od strane drugih autora (3,14,63,107).

Neurološki simptomi kod obolelih sa WNE u našem istraživanju su se javljali posle prosečno 3.7 ± 2.3 dana (1 do 14 dana) od početka bolesti. Jeha i saradnici upućuju na mogućnost razvoja neuroloških znakova i do tri nedelje od prvih simptoma oboljenja, što je značajno imati u vidu kako bi se i kod takvih bolesnika posumnjalo na WNND (120). Najčešće prisutan neurološki znak pri prijemu kod naših bolesnika sa WNE bio je poremećaj svesti, registrovan kod 128 bolesnika (80%). Poremećaj svesti označen je kao kvalitativni kod 63%, kvantitativni kod 23%, ili kombinovani, odnosno kvantitativno-kvalitativni kod 14% obolelih. Do naknadne pojave poremećaja svesti, odnosno razvoja kliničke slike encefalitisa, došlo je kod 33 bolesnika (16%). Chowers i saradnici navode progresiju poremećaja svesti kao jedan od nezavisnih prediktora smrtnog ishoda, ali mi nismo došli do sličnog zaključka (107).

Najčešće registrovani fokalni neurološki znaci kod naših bolesnika sa WNND i kliničkom slikom encefalitisa bili su ataksija (45%) i tremor (31%). Dizometrija, koja je upućivala na cerebelarnu leziju bila je prisutna kod 16% obolelih od WNE. Nistagmus je bio prisutan kod 9% obolelih, unilateralna paraliza facijalnog nerva kod 7% bolesnika sa encefalitisom.

Koma je registrovana kod 32 bolesnika sa encefalitisom, i to kod njih 6 pri prijemu, dok je kod 26 bolesnika do razvoja kome došlo u daljem toku hospitalizacije. Nedostatak WNV specifične terapije kojom bi se mogao izmeniti prirodni tok oboljenja najverovatnije ima važnu ulogu u značajnom broju obolelih sa progresijom poremećaja svesti. Koma je prosečno trajala 1.6 dana (1 do 42 dana), a njeno prisustvo bilo je jedan od faktora povezanih sa smrtnim ishodom. Prisustvo kome kod obolelih od WNND bilo je jedan od nezavisnih prediktora smrtnog ishoda.

Prosečno trajanje hospitalizacije kod obolelih sa WNE bilo je oko 18 dana, što je bilo značajno duže u poređenju s dužinom hospitalizacije kod bolesnika sa WNM (oko 12 dana). Patnaik i saradnici navode značajno dužu hospitalizaciju kod obolelih sa WNE (20 dana) nego kod obolelih sa WNM (10 dana) (137). Hospitalizacija duža od mesec dana u našem istraživanju bila je isključivo vezana za bolesnike sa WNE, što govori u prilog teške kliničke slike i sporog oporavka ovih bolesnika, a navedena dužina hospitalizacije bila je jedan od faktora povezanih sa smrtnim ishodom. U jednom revijalnom radu navodi se da dužina hospitalizacije kod obolelih od WNND iznosi od jednog do 333 dana, prosečno od 4 do 32 dana (138).

Smrtnost kod obolelih od WNND u našem istraživanju iznosila je 15.9%, dok drugi autori navode smrtnost od 4-14% (14,106,107). Veća smrtnost slično našem ispitivanju registrovana je u skorašnjim epidemijama u Italiji 2008-2010. (16%) i Grčkoj 2010. godine (17%), koje su kao i epidemije u Srbiji bile uzrokovane linijom 2 WNV (3,139). Svi bolesnici sa WNND kod kojih je registrovan smrtni ishod imali su encefalitis. Smrtnost u kategoriji bolesnika sa WNE bila je 20.5%. Većina svetskih autora navodi povećanu stopu smrtnosti u kategoriji obolelih sa WNE u poređenju sa ukupnim brojem obolelih od WNND (14,101,106,107). Iako je u našem istraživanju na osnovu univarijantne analize WNE bio značajno povezan sa smrtnim ishodom, multivarijantna analiza nije potvrdila nepovoljan prediktivni značaj ove forme WNND.

Kod preživelih bolesnika sa WNE često se održavaju dugotrajne neurološke sekvele. Poremećaji pokreta i ekstrapiramidni znaci kod ovih bolesnika mogu biti tranzitorni, ali mogu potrajati i godinama. Sejvar navodi održavanje tremora i parkinsonizma kod 38% bolesnika posle 8 meseci od otpusta (130). Carson i saradnici navode održavanje tremora godinu dana posle inicijalne bolesti, sa podjednakom učestalošću kod obolelih sa kliničkom slikom WNE i WNF, zbog čega impliciraju mogućnost razvoja subkliničke forme encefalitisa kod bolesnika sa WNF (140). Garcia i koautori na osnovu dokaza o perzistiranju neurološke i renalne WNV infekcije na animalnim modelima, sugerišu mogućnost hronične WNV infekcije i kod humanih slučajeva sa dugotrajnim neurološkim sekvelama (141). Klee i koautori navode potpuni oporavak kod 31% preživelih bolesnika sa encefalitisom posle godinu dana praćenja (76). Loeb i saradnici u svom istraživanju dugoročne prognoze obolelih sa WNV infekcijom su zaključili da oboleli sa encefalitisom/meningoencefalitisom zahtevaju duži oporavak u poređenju sa ostalim bolesnicima, kao i da je odsustvo komorbiditeta bilo povezano sa boljim oporavkom fizičkih funkcija, a odsustvo komorbiditeta i muški pol sa boljim oporavkom mentalnih funkcija (117). Gottfried i saradnici navode da kod bolesnika sa meningoencefalitisom uzrokovanim WNV posle godinu praćenja najčešće perzistiraju malaksalost (75%) i slabost ekstremiteta (58%) (142). Anastasiadou i kolege su ispitivali dugoročnu prognozu kod 22 bolesnika sa WNND (20 sa encefalitisom) 16 meseci po otpustu i utvrdili potpun oporavak kod 31% ispitanika (143). Perzistirajući simptomi kod ovih bolesnika bili su anoreksija (77%), slabost mišića (72%), teškoće sa memorijom (36%) i depresija (22%). Značajno je navesti da je prethodno navedeno istraživanje jedino kojim je ispitivana dugoročna prognoza kod bolesnika sa WNND koja je uzrokovana linijom 2 WNV.

U našem istraživanju, potpuni oporavak (mRS 0) posle godinu dana od otpusta zabeležen je kod 28% bolesnika sa encefalitisom, a prosečna vrednost

Barthel indeksa bila je 87.7. Dugoročna prognoza i funkcionalni ishod su se statistički značajno razlikovali u zavisnosti od kliničke forme WNND. Učestalost potpunog oporavka kao i vrednost Barthel indeksa posle godinu dana praćenja bili su značajno niži kod bolesnika sa WNE u poređenju sa obolelima sa WNM. Razvoj encefalitisa bio je jedini nezavisni prediktor nepovoljne dugoročne prognoze i funkcionalnog ishoda kod obolelih od WNND. Najčešće registrovani perzistirajući simptomi kod naših bolesnika sa WNE bili su malaksalost, slaba koncentracija, bolovi u mišićima i otežano pamćenje. Slabost ekstremiteta, ataksija i vrtoglavica bili su simptomi registrovani samo kod naših bolesnika sa WNE.

AFP kod bolesnika sa WNND nastaje zbog virusne invazije prednjih rogovia sive mase kičmene moždine, a manifestuje se asimetričnom flakcidnom slabošću ili oduzetošću ekstremiteta, bez gubitka senzibiliteta, a može se javiti kao nezavistan entitet ili udružen sa meningitisom ili encefalitisom (61). Na osnovu dostupnih podataka može se očekivati učestalost AFP i do 50% kod bolesnika sa WNND (74).

AFP je registrovana kod 30 (14.5%) naših bolesnika sa WNND i kod svih je bila udružena sa encefalitisom. Kvadripareza/kvadriplegija je registrovana kod 16, monopareza/ monoplegija kod 7, asimetrična parapareza kod 4 i hemiplegija kod 3 bolesnika sa AFP. Najveću učestalost bolesnika sa AFP i zahvaćenošću sva četiri ekstremiteta navode i drugi autori (61,66,144). Prisustvo AFP kod naših bolesnika sa WNND bilo je povezano sa prolongiranom hospitalizacijom i nepovoljnom kratkoročnom prognozom, odnosno smrtnim ishodom. Dugotrajna mehanička ventilacija (15 do 47 dana) u našem ispitivanju je sprovedena kod 4 bolesnika sa encefalitisom i AFP. Potrebu za prolongiranom hospitalizacijom bolesnika sa WNND i AFP, najčešće udruženu s dugotrajnom mehaničkom ventilacijom navodi i Sejvar (130).

Oporavak bolesnika sa WNND i AFP je spor, a dugoročnu prognozu često karakteriše nepotpun oporavak, sa održavanjem slabosti ekstremiteta i

funkcionalne zavisnosti (130). Delimičan oporavak mišićne snage oduzetih ekstremiteta nastupa posle 6-8 meseci, kada dalje poboljšanje najčešće nije moguće (145). U našem ispitivanju, potpuni oporavak je registrovan kod svega 10% preživelih bolesnika sa AFP, a ovi bolesnici su ostvarili i najnižu prosečnu vrednost Barthel indeksa (73.3) u poređenju sa drugim kliničkim formama WNND.

Rombencefalitis uzrokovan WNV posledica je afekcije struktura zadnje lobanjske jame, odnosno moždanog stabla i malog mozga, a u literaturi se navodi kao retka manifestacija WNND (61,146). Kod naših bolesnika rombencefalitis je bio uobičajena manifestacija, što su opisali Popović i saradnici u svom istraživanju kliničkih karakteristika obolelih od WNND tokom epidemije u Srbiji 2012. godine (147). Pepperell i saradnici iz Ontaria su objavili studiju koja opisuje značajan procenat obolelih sa slikom rombencefalitisa (20/64) i sa encefalitisom moždanog stabla (4/64) (144).

U našem istraživanju, od ukupno 161 bolesnika sa encefalitisom, kod 84 (52%) bolesnika bila je prisutna klinička slika rombencefalitisa, od kojih je kod 32 bolesnika imalo znake cerebelitisa, znaci encefalitisa moždanog stabla registrovani su kod 6 bolesnika, a kod preostalih 46 bolesnika bio je prisutan poremećaj svesti. Smrtni ishod je registrovan kod 7 bolesnika sa rombencefalitisom uključujući i 6 bolesnika sa znacima encefalitisa moždanog stabla. Klinička slika rombencefalitisa kod naših bolesnika sa WNND bila je povezana sa boljom kratkoročnom prognozom, odnosno manjom učestalošću smrtnog ishoda. Ipak, dugoročna prognoza bolesnika sa rombencefalitisom nije povoljna, s obzirom da je zabeležen potpuni oporavak kod svega 26% ovih bolesnika, slično bolesnicima sa WNE. Prosečna vrednost Barthel indeksa kod bolesnika sa rombencefalitisom bila je 91.3. Povoljnu dugoročnu prognozu uglavnom su imali bolesnici sa cerebelitisom.

U dijagnostici WNND, osnovni zadatak kliničara je da prepoznaju sve bolesnike sa mogućnošću WNV infekcije, obezbede im suportivno lečenje i

negu, kao i da isključe druge, potencijalno lečive uzroke CNS infekcija, što se pre svega odnosi na bakterijske i herpesvirusne infekcije. Sem iskustva kliničara, hematološke i biohemijske analize krvi i CST su najznačajniji elementi za pravovremenu dijagnostiku i etiološku diferencijaciju kod bolesnika sa infekcijom CNS.

Povišene vrednosti leukocita kod bolesnika sa WNND se navode u većini prethodno objavljenih studija, a najčešće se navode vrednosti leukocita do $20 \times 10^9/L$. Najveći broj leukocita od $30.8 \times 10^9/L$ zabeležili su istraživači iz Njujorka tokom epidemije 1999. godine (14). Maksimalna vrednost leukocita u našem ispitivanju bila je $32.2 \times 10^9/L$. Leukocitoza je registrovana kod skoro polovine naših bolesnika sa WNND, dok je u studiji iz Izraela iz 2000. godine leukocitoza zabeležena kod oko trećine bolesnika (107). U prikazu male serije slučajeva od 16 bolesnika sa WNND, Sejvar i saradnici su pronašli da bolesnici sa WNM imaju veću prosečnu vrednost leukocita u poređenju sa bolesnicima sa WNE (61). Suprotno ovim rezultatima, kod naših bolesnika sa WNM su zabeležene niže prosečne vrednosti leukocita u poređenju sa bolesnicima sa WNE, ali je rezultat bio izvan granice statističkog značaja. Ipak, leukocitoza je značajno češće registrovana kod naših bolesnika sa WNE nego sa WNM. S obzirom na ovu činjenicu, neophodno je da svi bolesnici sa infekcijom WNV i leukocitozom budu pomno praćeni, zbog rizika od encefalitisa kod bolesnika sa početnim znacima WNM ili samo WNF. U dva objavljena istraživanja limfocitopenija je bila prisutna kod 11/18 (38.8%) bolesnika a prosečna vrednost limfocita u leukocitarnoj formuli iznosio je 14.1% (14,121). U našem ispitivanju, više od polovine bolesnika imalo je limfocitopeniju, a prosečne vrednosti limfocita nisu se značajno razlikovale od rezultata navedenih istraživanja. Anemija je zabeležena kod 41% bolesnika tokom epidemije u Izraelu 2000, a Chowers i koautori koji su opisali ovu epidemiju pronašli su da je prisustvo anemije bilo značajno povezano sa smrtnim ishodom (107). Anemija lakšeg stepena bila je prisutna kod 42% naših bolesnika, ali nije bilo povezanosti

anemije i smrtnog ishoda WNND. Trombocitopenija je nađena kod 28% bolesnika i njeno prisustvo je bilo bez većeg kliničkog značaja u populaciji koju smo ispitali.

Prosečna vrednost CRP u krvi kod naših bolesnika sa WNE (50 mg/L) bila je značajno veća u poređenju sa bolesnicima sa WNM (25.2 mg/L). Vrednosti CRP iznad 100 mg/L su zabeležene samo kod bolesnika sa encefalitisom i u multivarijantnoj logističkoj regresiji predstavljale su nezavisni prediktor smrtnog ishoda kod obolelih od WNND (OR 7.21; 95% CI 1.5-33.3). Hiponatrijemija je registrovana od 33 to 50% bolesnika i to češće kod bolesnika sa encefalitisom, na osnovu izveštaja drugih autora (63,107,121). Kod naših bolesnika hiponatrijemija je retko registrovana i bila je podjednako zastupljena kod obolelih sa WNE i WNM. Povišene vrednosti enzima jetre u našoj studiji su registrovane kod 48% (AST) i 39% (ALT) bolesnika, a drugi autori navode da se povišene vrednosti enzima jetre može očekivati kod do 24% slučajeva (107,121). Vrednosti enzima jetre kod naših bolesnika bile su uglavnom lako do umereno povišene, bez signifikantne povezanosti sa kliničkom slikom i kratkoročnom prognozom oboljenja. Ipak, u svetu su zabeleženi slučajevi teške lezije jetre uzrokovane WNV, pa čak i sa znacima fulminantnog hepatitisa, odnosno akutne insuficijencije jetre (50). Povišene vrednosti CK odraz su mišićne lezije, odnosno rabdomiolize povezane sa WNV, što sugeriše da virusni miozitis predstavlja jednu od ekstraneuralnih manifestacija ove infekcije (148). Značajan broj naših bolesnika (67%) imalo je povišene vrednosti CK, te se može zaključiti da ovaj biohemijski marker tokom letnjeg perioda može biti značajan u postavljanju sumnje na WNV kao uzročnika akutne neuroinfekcije.

U velikoj seriji od 250 serološki potvrđenih slučajeva WNND, Tyler i saradnici su prijavili prisustvo pleocitoze u CST kod 97% bolesnika sa meningitisom i prosečne vrednosti leukocita u CST od 226/mm³ (149). Isti istraživači pronašli su pleocitozu u CST kod 95% bolesnika sa WNE i prosečnim brojem leukocita 227/mm³. Kod samo 8% bolesnika u obe grupe registrovane

su vrednosti pleocitoze od 500 ili više leukocita/mm³. Druge studije opisuju pleocitozu kod obolelih od WNND u opsegu od 0 do 2317/mm³ (14,107,121). Naši rezultati su veoma slični rezultatima Tyler-a i saradnika. Kod 95% naših bolesnika sa WNE i 91% bolesnika sa WNM verifikovana je pleocitoza do 500 leukocita/mm³. Prosečna vrednost pleocitoze bila je niža u našem uzorku (oko 145 leukocita). Odsustvo pleocitoze je zabeleženo kod 3% bolesnika sa WNE, što je značajan podsetnik za kliničare da normalan broj leukocita u CST ne isključuje encefalitis, što se pre svega odnosi na herpetični encefalitis, ali na osnovu naših rezultata i na WNE.

Predominacija limfocita u CST je tipična za sve virusne infekcije CNS, mada može biti odsutna tokom prvih 24-36 sati od početka simptoma (150,151). Bai i saradnici su otkrili da neutrofili kao ključni element nespecifičnog imuniteta imaju paradoksalnu ulogu u patogenezi WNV infekcije. Na osnovu njihovih rezultata pokazano je da tokom WNV infekcije dolazi do brze ekspresije hemokina koji privlače neutrofile (engl. neutrophil attracting chemokines) CXCL1 i CXCL2 (152). Neki od autora uočavaju predominaciju neutrofila kod pojedinih kategorija bolesnika sa WNND, dok drugi autori pretpostavljaju da je predominacija neutrofila u CST verovatnija na samom početku oboljenja (144,153). Rawal i saradnici su dokazali veće prosečne vrednosti neutrofila kod bolesnika kojima je uzorak CST uzet tokom prva tri dana od pojave prvih simptoma WNND (154). U našoj studiji, uočena je predominacija limfocita kod bolesnika sa WNE (53%) dok je kod bolesnika sa WNM prosečan procenat limfocita i neutrofila bio ujednačen. Tyler i saradnici u svojoj analizi navode da je kod 45% bolesnika sa WNM i 37% bolesnika sa WNE prisutna neutrofilna predominacija u CST (149). Naši rezultati ukazuju na mogućnost dužeg trajanja predominacije neutrofila u CST od uobičajena tri dana. Rezultati prethodno objavljenih studija sugerišu da vrednosti proteinorahije variraju od normalnih do veoma povišenih, čak i do 8,99g/L (14,107,121,144,154). Povišene vrednosti proteinorahije kod obolelih od infekcije

CNS u najvećoj meri su posledica narušenog integriteta krvno-likvorske barijere. Naše ispitivanje ukazuje na značajno veću učestalost proteinorahije iznad 1g/L kod bolesnika sa WNE nego kod onih sa WNM. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima Tyler-a i saradnika, ali ovi istraživači nisu pronašli značajnu korelaciju koncentracije proteina CST sa ishodom oboljenja u multivarijantnoj regresiji (149). Vrednost proteinorahije preko 1 g/L je bila nezavistan prediktor smrtnog ishoda u multivarijantnom regresionom modelu kod naših bolesnika sa WNND.

Koncentracija glukoze u CST je najznačajniji marker na osnovu koga se vrši inicijalna etiološka procena kod bolesnika sa infekcijom CNS. To se najpre odnosi na diferencijaciju virusnih infekcija od drugih, potencijalno lečivih uzroka (bakterijske, mikobakterijske i gljivične) infekcije CNS za koje je karakteristična snižena vrednost glukoze u CST, odnosno hipoglikorahija (155). Uprkos tome što je neuobičajena za virusne infekcije CNS, hipoglikoragija se sporadično viđa u infekcijama CNS uzrokovanim Mumps virusom, enterovirusima, virusom limfocitnog horiomeningitisa, herpes simplex virusom i herpes zoster virusom, ali se u literaturi ne navodi da je hipoglikorahija karakteristična za arbovirusne infekcije, pa ni WNND (156). U našoj studiji, hipoglikorahija je bila prisutna kod oko 10% bolesnika kod kojih je analiziran biohemijski nalaz CST. Većina bolesnika sa hipoglikorahijom imalo je WNE sa limfocitnom predominacijom u CST. Svi bolesnici sa hipoglikorahijom lečeni su parenteralnim antibioticima do pristizanja negativnih hemokultura, kultura CST i serološke potvrde WNV kao etiološkog agensa.

CT mozga nema mnogo značaja u dijagnostici WNND sem isključivanja druge etiologije poremećaja svesti. U našoj studiji, kao i kod drugih autora, CT mozga je najčešće ukazivao na stare promene koje su posledica cerebrovaskularnih oboljenja i znake u vezi sa odmaklim životnim dobom - redukcija moždanog parenhima (107). NMR mozga može biti uredan i kod najtežih formi WNND, a nekada se patološki nalaz uočava tek nedeljama posle

početka bolesti (130). Najkarakterističniji nalaz NMR mozga kod bolesnika sa encefalitisom predstavljaju bilateralne hiperintenzne promene u regiji bazalnih ganglija i talamusa na T2 i FLAIR sekvencama (157). Nalaz hiperintenznih T2/FLAIR lezija karakterističnih za WNND opisan je kod 6 naših bolesnika sa encefalitisom.

Respiratorna insuficijencija sa potrebom za hitnom endotrahealnom intubacijom i mehaničkom ventilacijom kod bolesnika sa WNND nastupa zbog razvoja poremećaja svesti i/ili paralize dijafragme i interkostalne muskulature (144). Nekada je teško definisati da li je respiratorna insuficijencija posledica mišićne slabosti, poremećaja svesti ili kombinacije oba uzročna faktora (53). Sejvar i koautori navode da se respiratorna insuficijencija najčešće javlja kod obolelih sa AFP, kao i da je njeno prisustvo često povezano sa smrtnim ishodom (66,83). Respiratorna insuficijencija s potrebom za mehaničkom ventilacijom bila je najteža komplikacija, neophodna kod 15.5 % naših bolesnika sa encefalitisom. Skoro polovina (46.8%) ventilisanih bolesnika bilo je sa znacima AFP. Smrtnost bolesnika koji su mehanički ventilisani bila je čak 72%. Respiratorna insuficijencija je bila faktor značajno povezan sa smrtnim ishodom ali i sa nepovoljnom dugoročnom prognozom, ali nismo dokazali prediktivni značaj respiratorne insuficijencije niti u kratkoročnoj, niti dugoročnoj prognozi bolesnika sa WNND. Druge komplikacije registrovane kod naših bolesnika sa WNND bile su pneumonija (10%), infekcija urinarnog trakta (6%), *Clostridium difficile* infekcija (5%) i septično stanje (1%). U studiji iz Ontarija, najčešće prisutne komplikacije kod obolelih od WNND bile su pneumonija (23%), bakterijemija (8%), tromboembolijski događaj (6%) i *Clostridium difficile* infekcija (5%).

WNND predstavlja značajan uzrok morbiditeta i mortaliteta u regijama sa endemskim prisustvom WNV. Težina kliničke slike, prolongirana hospitalizacija, česte komplikacije, potreba za dugotrajnom rehabilitacijom i nepotpun oporavak obolelih od WNND su faktori koji predstavljaju značajno

opterećenje za zdravstveni sistem i društvo u celini. S obzirom da se WNV od 2012. godine ustalio kao patogen na našem podneblju, neophodno je kontinuirano preduzimati sve preventivne mere u zaštiti ugroženih kategorija stanovništva i razmatrati WNV kao uzročnika širokog spektra neuroloških manifestacija tokom leta i rane jeseni u Srbiji.

6. ZAKLJUČCI

1. WNND je teško sezonsko oboljenje koje se javlja tokom leta i početkom jeseni, prenosi se ubodom komarca i u Srbiji je uzrokovano linijom 2 WNV.
2. WNND se najčešće javlja kod muškaraca uzrasta ≥ 60 godina, obolelih od arterijske hipertenzije, diabetes mellitusa ili koronarne bolesti.
3. WNM je klinička forma oboljenja koja se javlja kod mlađih bolesnika bez hroničnih bolesti, a karakterišu ga povoljna kratkoročna prognoza bez registrovanih smrtnih ishoda, povoljna dugoročna prognoza i potpuni oporavak većine obolelih.
4. WNE je najčešća klinička forma WNND, češće se javlja kod bolesnika uzrasta ≥ 60 godina sa arterijskom hipertenzijom, a karakterišu ga duga hospitalizacija, visoka smrtnost i nepovoljna dugoročna prognoza i funkcionalni ishod sa potpunim oporavkom trećine bolesnika.
5. AFP kod obolelih od WNND je povezana sa dugotrajnom hospitalizacijom, respiratornom insuficijencijom, većom učestalošću smrtnog ishoda i nepovoljnom dugoročnom prognozom sa potpunim oporavkom kod 10% obolelih.
6. Rombencefalitis je česta klinička forma WNND u Srbiji, povezana sa povoljnom kratkoročnom prognozom (izuzev obolelih sa encefalitisom moždanog stabla) i sa nepovoljnom dugoročnom prognozom i trećinom bolesnika sa potpunim oporavkom.
7. Kod bolesnika sa WNND u hematološkim i biohemijskim analizama krvi najčešće se registruje leukocitoza sa limfocitopenijom i anemija, povišene vrednosti enzima jetre i kreatin kinaze.

8. Nalaz u CST obolelih od WNND karakteriše laka do umerena pleocitoza, sa predominacijom limfocita, lakom do umerenom hiperproteinorahijom i u najvećem broju slučajeva urednim vrednostima glikorahije.
9. NMR mozga predstavlja neuroradiološku metodu izbora u dijagnostici WNND, kojom se mogu detektovati tipične T2/FLAIR lezije moždanog parenhima kod obolelih od WNND.
10. Najčešća i najteža komplikacija kod obolelih od WNND je respiratorna insuficijencija s potrebom za mehaničkom ventilacijom, koja je povezana sa nepovoljnom kratkoročnom i dugoročnom prognozom.
11. Nezavisni prediktor razvoja encefalitisa kod obolelih od WNND je uzrast ≥ 60 godina, a odsustvo hroničnih bolesti je nezavisni prediktor razvoja meningitisa.
12. Nezavisni prediktori smrtnog ishoda kod obolelih od WNND su uzrast ≥ 60 godina, prethodno cerebrovaskularno oboljenje, razvoj kome, vrednosti serumskog CRP > 100 mg/L i proteinorahije > 1 g/L.
13. Nezavisni prediktor nepovoljne dugoročne prognoze i funkcionalnog ishoda kod obolelih od WNND je razvoj encefalitisa.

7. LITERATURA

1. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol.* 2011; 85: 2964-74.
2. Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol.* 2007; 88: 875-84.
3. Danis K, Papa A, Theocharopoulos G, Dougas G, Athanasiou M, Detsis M, et al. Outbreak of West Nile virus infection in Greece, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 1868-72.
4. Rizzo C, Salcuni P, Nicoletti L, Ciufolini MG, Russo F, Masala R, et al. Epidemiological surveillance of west Nile neuroinvasive diseases in Italy, 2008 to 2011. *Eurosurveillance.* 2012; 17.
5. Smithburn KC, Hughes TP, Burke a W, Paul JH, African A. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med Hyg.* 1940; 20: 471-92.
6. Murgue B, Murri S, Triki H, Deubel V, Zeller HG. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951: 117-26.
7. Taylor R. M., Work T. H., Hurlbut H. S. A study of the ecology of West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med.* 1956; 5: 579-620.
8. Southam C. M., Moore A. E. Induced virus infections in man by the Egypt isolates of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 1954; 3: 19-50.
9. Hayes C. G. West Nile fever. *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology.* 1989: 59-88. In. TP Monath, Ed. Vol. V.
10. Panthier R. Epidemiologie du virus West Nile: etude d'un foyer en Camargue. I. Introduction. *Ann Inst Pasteur.* 1968; 114: 519-520.

11. McIntosh B. M., Jupp P. G., Dos Santos I. Epidemics of West Nile and Sindbis viruses in South Africa with *Culex (Culex) univittatus* Theobald as vector. *S Afr J Sci.* 1976; 72: 295–300.
12. Hubalek Z., Halouzka J. West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 643–650.
13. Platonov A. E., Shipulin G. A., Shipulina O. Y. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 128–132.
14. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O’Leary D, Murray K, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001; 344: 1807–14.
15. Final Cumulative Maps & Data for 1999–2014 | West Nile Virus | CDC [Internet]. *Cdc.gov.* 2016 [cited 5 April 2016]. Available from: <http://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cummapsdata.html>
16. Barzon L, Squarzon L, Cattai M, Franchin E, Pagni S, Cusinato R, et al. West Nile virus infection in Veneto region, Italy, 2008–2009. *Euro Surveill.* 2009; 14.
17. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Rebreanu R, et al. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Eurosurveillance.* 2011; 16: 19762
18. Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. 2011; 17: 1176–80.
19. Magurano F, Remoli ME, Baggieri M, Fortuna C, Marchi A, Fiorentini C BP et al. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 545–7.
20. Popović N, Milošević B, Urošević A, Poluga J, Lavadinović L, Nedeljković J, et al. Outbreak of west Nile virus infection among humans in Serbia, August to October 2012. *Eurosurveillance.* 2013; 18.

21. Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Pandak N, Peric L, Barbic L, et al. First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014; 14: 82–4.
22. Muñoz J, Ruiz S, Soriguer R, Alcaide M, Viana DS, Roiz D, et al. Feeding patterns of potential West Nile virus vectors in south-west Spain. *PLoS ONE.* 2012; 7: e39549.
23. Nasci RS, Savage HM, White DJ, Miller JR, Cropp BC, Godsey MS, et al. West Nile virus in overwintering *Culex* mosquitoes, New York City, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 742–4.
24. Anderson JF, Main AJ, Cheng G, Ferrandino FJ, Fikrig E. Horizontal and vertical transmission of West Nile virus genotype NY99 by *Culex salinarius* and genotypes NY99 and WN02 by *Culex tarsalis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86: 134–9.
25. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, et al. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 311–22.
26. Turell MJ, O’Guinn M, Oliver J. Potential for New York mosquitoes to transmit West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2000; 62: 413–4.
27. Guptill SC, Julian KG, Campbell GL, Price SD, Marfin AA. Early-season avian deaths from West Nile virus as warnings of human infection. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 483–4.
28. Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet M-T, et al. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 392–7.
29. Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6: 319–28.
30. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding--Michigan, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 877–8.

31. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Intrauterine West Nile virus infection--New York, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51: 1135-6.
32. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1167-73.
33. Kelley Md RE, Berger Md JR, Kelley Bs BP. West Nile virus meningoencephalitis: possible sexual transmission. *J La State Med Soc.* 2016; 168: 21-2.
34. Kumar D, Prasad GVR, Zaltzman J, Levy GA, Humar A. Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* 2004; 77: 399-402.
35. O'Leary DR, Kuhn S, Kniss KL, Hinckley AF, Rasmussen SA, Pape WJ, et al. Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics.* 2006; 117: 537-45.
36. Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol.* 2001; 117: 702-9.
37. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol.* 2000; 114: 560-8.
38. Monath TP, Cropp CB, Harrison AK. Mode of entry of a neurotropic arbovirus into the central nervous system. Reinvestigation of an old controversy. *Lab Invest.* 1983; 48: 399-410.
39. Garcia-Tapia D, Loiacono CM, Kleiboeker SB. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 110: 229-44.
40. Hunsperger EA, Roehrig JT. Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *J Neurovirol.* 2006; 12: 129-39.

41. Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao J-L, Murphy PM. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med*. 2005; 202: 1087-98.
42. Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, et al. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet*. 2001; 358: 261-4.
43. Hayes EB, Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med*. 2006; 57: 181-94.
44. Gottfried K, Quinn R, Jones T. Clinical description and follow-up investigation of human West Nile virus cases. *South Med J*. 2005; 98: 603-6.
45. Bains HS, Jampol LM, Caughron MC, Parnell JR. Vitritis and chorioretinitis in a patient with West Nile virus infection. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121: 205-7.
46. Vandenberg S, Shaikh S, Capone A, Williams GA. Multifocal choroiditis associated with West Nile virus encephalitis. *Retina*. 2003; 23: 97-9.
47. Kaiser PK, Lee MS M DA. Occlusive vasculitis in a patient with concomitant West Nile virus infection. *Am J Ophthalmol*. 2003; 136: 928-30.
48. Kuchtey RW, Kosmorsky GS, Martin D, Lee MS. Uveitis associated with West Nile virus infection. *Arch Ophthalmol*. 2003; 121: 1648-9.
49. Montgomery SP, Chow CC, Smith SW, Marfin AA, O'Leary DR, Campbell GL. Rhabdomyolysis in patients with west nile encephalitis and meningitis. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2005; 5: 252-7.
50. Georges AJ, Lesbordes JL, Georges-Courbot MC, Meunier DMY, Gonzalez JP. Fatal hepatitis from West Nile virus. *Ann l'Institut Pasteur*. 1987; 138: 237-44.
51. Perelman A, Stern J. Acute pancreatitis in West Nile Fever. *Am J Trop Med Hyg*. 1974; 23: 1150-2.

52. Sherman-Weber S, Axelrod P. Central diabetes insipidus complicating West Nile encephalitis. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 1042-3.
53. Bode A V, Sejvar JJ, Pape WJ, Campbell GL, Marfin A a. West Nile virus disease: a descriptive study of 228 patients hospitalized in a 4-county region of Colorado in 2003. *Clin Infect Dis*. 2006; 42: 1234-40.
54. Brown JA, Factor DL, Tkachenko N, Templeton SM, Crall ND, Pape WJ, et al. West Nile viremic blood donors and risk factors for subsequent West Nile fever. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7: 479-88.
55. Carson PJ, Borchardt SM, Custer B, Prince HE, Dunn-Williams J, Winkelman V, et al. Neuroinvasive disease and West Nile virus infection, North Dakota, USA, 1999-2008. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18: 684-6.
56. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for human West Nile virus disease - United States, 1999-2008. *MMWR Surveill Summ*. 2010; 59: 1-17
57. Cho H, Diamond MS. Immune responses to West Nile virus infection in the central nervous system. *Viruses*. 2012; 4: 3812-30.
58. Levi ME. West Nile Virus Infection in the Immunocompromised Patient. *Curr Infect Dis Rep*. 2013; 15: 478-85.
59. Tyler KL. Current developments in understanding of West Nile virus central nervous system disease. *Curr Opin Neurol*. 2014; 27: 342-8.
60. Sejvar JJ, Marfin AA. Manifestations of West Nile neuroinvasive disease. *Reviews in Medical Virology*. 2006; 16: 209-24.
61. Sejvar JJ, Haddad MB, Tierney BC, Campbell GL, Marfin A a, Van Gerpen J a, et al. Neurologic manifestations and outcome of West Nile virus infection. *JAMA*. 2003; 290: 511-5.
62. O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, et al. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2004; 4: 61-70.

63. Burton JM, Kern RZ, Halliday W, Mikulis D, Brunton J, Fearon M, et al. Neurological manifestations of West Nile virus infection. *Can J Neurol Sci.* 2004; 31: 185-93.
64. Kanagarajan K, Ganesh S, Alakhras M, Go ES, Recco RA, Zaman MM. West Nile virus infection presenting as cerebellar ataxia and fever: case report. *South Med J.* 2003; 96: 600-1.
65. Robinson RL, Shahida S, Madan N, Rao S KN. Transient parkinsonism in West Nile virus encephalitis. *Am J Med.* 2003; 115: 252-3.
66. Sejvar JJ, Bode A V, Marfin AA, Campbell GL, Ewing D, Mazowiecki M, et al. West Nile virus-associated flaccid paralysis. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11: 1021-7.
67. DeBiasi RL. West Nile virus neuroinvasive disease. *Curr Infect Dis Rep.* 2011; 13: 350-9.
68. Li J, Loeb JA, Shy ME, Shah AK, Tselis AC, Kupski WJ, et al. Asymmetric flaccid paralysis: a neuromuscular presentation of West Nile virus infection. *Ann Neurol.* 2003; 53: 703-10.
69. Petersen LR, Marfin AA. West Nile virus: a primer for the clinician. *Ann Intern Med.* 2002; 137: 173-9.
70. Davis LE, DeBiasi R, Goade DE, Haaland KY, Harrington JA, Harnar JB, et al. West Nile virus neuroinvasive disease. *Annals of Neurology.* 2006; 60: 286-300.
71. Campbell GL, Marfin AA, Lanciotti RS, Gubler DJ. West Nile virus. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2: 519-29.
72. Roehrig JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, et al. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile virus encephalitis cases. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 376-9.
73. Lanciotti RS, Kerst AJ. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 4506-13.

74. Kramer LD, Li J, Shi P-Y. West Nile virus. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 171-81.
75. Sejvar JJ. The long-term outcomes of human West Nile virus infection. *Clin Infect Dis.* 2007; 44: 1617-24.
76. Klee AL, Maidin B, Edwin B, Poshni I, Mostashari F, Fine A, et al. Long-term prognosis for clinical West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 1405-11.
77. Pervanidou D, Detsis M, Danis K, Mellou K, Papanikolaou E, Terzaki I, et al. West Nile virus outbreak in humans, Greece, 2012: third consecutive year of local transmission. *Euro Surveill.* 2014; 19: 20758
78. Murray KO, Baraniuk S, Resnick M, Arafat R, Kilborn C, Shallenberger R, et al. Clinical investigation of hospitalized human cases of West Nile virus infection in Houston, Texas, 2002-2004. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008; 8: 167-74.
79. De Filette M, Ulbert S, Diamond MS, Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary Research.* 2012; 43.
80. Ou AC, Ratard RC. One-year sequelae in patients with West Nile Virus encephalitis and meningitis in Louisiana. *J La State Med Soc.* 2005; 157: 42-6.
81. Gyure KA. West Nile virus infections. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2009; 68: 1053-60.
82. Berg PJ, Smallfield S, Svien L. An investigation of depression and fatigue post West Nile virus infection. *S D Med.* 2010; 63: 127-9, 131-3.
83. Sejvar JJ, Bode A V, Marfin AA, Campbell GL, Pape J, Biggerstaff BJ, et al. West Nile Virus-associated flaccid paralysis outcome. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 514-6.
84. Zeller HG, Schuffenecker I. West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23: 147-56.

85. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *Open Virol J.* 2010; 4: 29-37.
86. Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V, Smith J, Parker M, Steele K, et al. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northeastern United States. *Science.* 1999; 286: 2333-7.
87. Venter M, Swanepoel R. West Nile virus lineage 2 as a cause of zoonotic neurological disease in humans and horses in southern Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10: 659-64.
88. Bakonyi T, Ivanics E, Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenböck H, et al. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 618-23.
89. Platonov AE, Karan' LS, Shopenskaia TA, Fedorova M V, Koliashnikova NM, Rusakova NM, et al. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2011: 29-37.
90. Bakonyi T, Ferenczi E, Erdélyi K, Kutasi O, Csörgő T, Seidel B, et al. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet Microbiol.* 2013; 165: 61-70.
91. Papa A, Danis K, Baka A, Bakas A, Dougas G, Lytras T, et al. Ongoing outbreak of west nile virus infections in humans in greece, july - august 2010. *Eurosurveillance.* 2010; 15: 1-5.
92. Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI, Vazquez A, Tenorio A, Rebreanu R, et al. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.* 2011; 16: 19762.
93. Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D, Monachetti A, Tavio M, Del Gobbo R, et al. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill.* 2011; 16.

94. Bordjoški M, Gligić A, Bošković R. Arbovirusne infekcije u SR Srbiji. *Vojnosanit Pregl* 1972; 29: 173-5.
95. Vesenjāk-Hirjan J, Punda-Polić V, Dobe M. Geographical distribution of arboviruses in Yugoslavia. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol*. 1991; 35: 129-40.
96. Lupulovic D, Martin-Acebes MA, Lazic S, Alonso-Padilla J, Blazquez AB, Escribano-Romero E, et al. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11: 1303-5.
97. Di Sabatino D, Bruno R, Sauro F, Danzetta ML, Cito F, Iannetti S, et al. Epidemiology of West Nile disease in Europe and in the Mediterranean Basin from 2009 to 2013. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 907852.
98. Petrovic T, Blazquez AB, Lupulovic D, Lazic G, Escribano-Romero E, Fabijan D, et al. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: First isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Eurosurveillance*. 2013; 18.
99. Hernández-Triana LM, Jeffries CL, Mansfield KL, Carnell G, Fooks AR, Johnson N. Emergence of west nile virus lineage 2 in europe: a review on the introduction and spread of a mosquito-borne disease. *Front Public Health*. 2014; 2: 271.
100. Rizzoli A, Jimenez-Clavero MA, Barzon L, Cordioli P, Figuerola J, Koraka P, et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Eurosurveillance*. 2015; 20.
101. Platonov AE. West Nile encephalitis in Russia 1999-2001: were we ready? Are we ready? *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 951: 102-16.
102. Weinberger M, Pitlik SD, Gandacu D, Lang R, Nassar F, Ben David D, et al. West Nile fever outbreak, Israel, 2000: epidemiologic aspects. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 686-91.

103. Han LL, Popovici F, Alexander JP, Laurentia V, Tengelsen LA, Cernescu C, et al. Risk factors for West Nile virus infection and meningoencephalitis, Romania, 1996. *J Infect Dis.* 1999; 179: 230–3.
104. Yim R, Posfay-Barbe KM, Nolt D, Fatula G, Wald ER. Spectrum of clinical manifestations of West Nile virus infection in children. *Pediatrics.* 2004; 114: 1673–5.
105. Huhn GD, Austin C, Langkop C, Kelly K, Lucht R, Lampman R, et al. The emergence of west nile virus during a large outbreak in Illinois in 2002. *Am J Trop Med Hyg.* 2005; 72: 768–76.
106. Tsai T, Popovici F, Cernescu C, Campbell G, Nedelcu N. West Nile encephalitis epidemic in southeastern Romania. *Lancet.* 1998; 352: 767–71.
107. Chowers MY, Lang R, Nassar F, Ben-David D, Giladi M, Rubinshtein E, et al. Clinical characteristics of the West Nile fever outbreak, Israel, 2000. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7: 675–8.
108. Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA. Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13: 1918–20.
109. Murray K, Baraniuk S, Resnick M, Arafat R, Kilborn C, Cain K, et al. Risk factors for encephalitis and death from West Nile virus infection. *Epidemiol Infect.* 2006; 134: 1325–32.
110. Tanaka Y. Immunosuppressive mechanisms in diabetes mellitus. *Nihon Rinsho.* 2008; 66: 2233–7.
111. Levi ME, Quan D, Ho JT, Kleinschmidt-Demasters BK, Tyler KL, Grazia TJ. Impact of rituximab-associated B-cell defects on West Nile virus meningoencephalitis in solid organ transplant recipients. *Clin Transplant.* 2010; 24: 223–8.
112. Kumar D, Prasad GVR, Zaltzman J, Levy GA, Humar A. Community-acquired West Nile virus infection in solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* 2004; 77: 399–402.

113. Nett RJ, Kuehnert MJ, Ison MG, Orlowski JP, Fischer M, Staples JE. Current practices and evaluation of screening solid organ donors for West Nile virus. *Transpl Infect Dis*. 2012; 14: 268–77.
114. Rhee C, Eaton EF, Concepcion W, Blackburn BG. West Nile virus encephalitis acquired via liver transplantation and clinical response to intravenous immunoglobulin: case report and review of the literature. *Transpl Infect Dis* . 2011; 13: 312–7.
115. Lindsey NP, Staples JE, Lehman JA, Fischer M. Medical risk factors for severe West Nile Virus disease, United States, 2008-2010. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87: 179–84.
116. Cook RL, Xu X, Yablonsky EJ, Sakata N, Tripp JH, Hess R, et al. Demographic and clinical factors associated with persistent symptoms after West Nile virus infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 83: 1133–6.
117. Loeb M, Hanna S, Nicolle L, Eyles J, Elliott S, Rathbone M, et al. Prognosis after West Nile virus infection. *Ann Intern Med*. 2008; 149: 232–41.
118. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003; 349: 1236–45.
119. Sayao A-L, Suchowersky O, Al-Khathaami A, Klassen B, Katz NR, Sevick R, et al. Calgary experience with West Nile virus neurological syndrome during the late summer of 2003. *Can J Neurol Sci*. 2004; 31: 194–203.
120. Jeha LE, Sila CA, Lederman RJ, Prayson RA, Isada CM, Gordon SM. West Nile virus infection: a new acute paralytic illness. *Neurology*. 2003; 61: 55–9.
121. Weiss D, Carr D, Kellachan J, Tan C, Phillips M, Bresnitz E, et al. Clinical findings of West Nile virus infection in hospitalized patients, New York and New Jersey, 2000. *Emerg Infect Dis*. 2001; 7: 654–8.

122. Brilla R, Block M, Geremia G, Wichter M. Clinical and neuroradiologic features of 39 consecutive cases of West Nile Virus meningoencephalitis. *J Neurol Sci.* 2004; 220: 37–40.
123. Klein C, Kimiagar I, Pollak L, Gandelman-Marton R, Itzhaki A, Milo R, et al. Neurological features of West Nile Virus infection during the 2000 outbreak in a regional hospital in Israel. *J Neurol Sci.* 2002; 200: 63–6.
124. Goldblum N, Jasinska-Kingberg W, Klingberg MA, Marberg K, Sterk V V. The natural history of West Nile Fever. I. Clinical observations during an epidemic in Israel. *Am J Hyg.* 1956; 64: 259–69.
125. Goldblum N, Sterk V V, Paderski B. West Nile fever; the clinical features of the disease and the isolation of West Nile virus from the blood of nine human cases. *Am J Hyg.* 1954; 59: 89–103.
126. Spigland I, Jasinska-Klingberg W, Hofshi E, Goldblum N. Clinical and laboratory observations in an outbreak of West Nile fever in Israel in 1957. *Harefuah.* 1958; 54: 275–80.
127. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. *JAMA.* 2013; 310: 308–15.
128. Suthar MS, Diamond MS, Gale M. West Nile virus infection and immunity. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 115–28.
129. Samuel MA DM. Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol.* 2006; 80: 9349–60.
130. Sejvar JJ. Clinical manifestations and outcomes of West Nile virus infection. *Viruses.* 2014; 6: 606–23.
131. Sejvar JJ, Lindsey NP, Campbell GL. Primary causes of death in reported cases of fatal West Nile Fever, United States, 2002–2006. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11: 161–4.
132. Tyler KL. West Nile virus infection in the United States. *Arch Neurol.* 2004; 61: 1190–5.

133. Weatherhead JE, Miller VE, Garcia MN, Hasbun R, Salazar L, Dimachkie MM, et al. Long-term neurological outcomes in West Nile virus-infected patients: an observational study. *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 92: 1006–12.
134. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode A V., Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerging Infectious Diseases.* 2005; 11: 1174–9.
135. Kelley TW, Prayson RA, Ruiz AI, Isada CM, Gordon SM. The neuropathology of West Nile virus meningoencephalitis. A report of two cases and review of the literature. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119: 749–53.
136. Guarner J, Shieh W-J, Hunter S, Paddock CD, Morken T, Campbell GL, et al. Clinicopathologic study and laboratory diagnosis of 23 cases with West Nile virus encephalomyelitis. *Hum Pathol.* 2004; 35: 983–90.
137. Patnaik JL, Harmon H, Vogt RL. Follow-up of 2003 human West Nile virus infections, Denver, Colorado. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1129–31.
138. Patel H, Sander B, Nelder MP. Long-term sequelae of West Nile virus-related illness: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases.* 2015; 15: 951–9.
139. Rizzo C, Salcuni P, Nicoletti L, Ciufolini MG, Russo F, Masala R, et al. Epidemiological surveillance of west Nile neuroinvasive diseases in Italy, 2008 to 2011. *Eurosurveillance.* 2012; 17.
140. Carson PJ, Konewko P, Wold KS, Mariani P, Goli S, Bergloff P, et al. Long-term clinical and neuropsychological outcomes of West Nile virus infection. *Clin Infect Dis.* 2006; 43: 723–30.
141. Garcia MN, Hasbun R, Murray KO. Persistence of West Nile virus. *Microbes Infect.* 2015; 17: 163–8.
142. Gottfried K, Quinn R, Jones T. Clinical description and follow-up investigation of human West Nile virus cases. *South Med J.* 2005; 98: 603–6.

143. Anastasiadou A, Kakoulidis I, Butel D, Kehagia E, Papa A. Follow-up study of Greek patients with West Nile virus neuroinvasive disease. *Int J Infect Dis.* 2013; 17: 494-497.
144. Pepperell C, Rau N, Krajden S, Kern R, Humar A, Mederski B, et al. West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario. *CMAJ.* 2003; 168: 1399-405.
145. Cao NJ, Ranganathan C, Kupsky WJ, Li J. Recovery and prognosticators of paralysis in West Nile virus infection. *J Neurol Sci.* 2005; 236: 73-80.
146. Nichter CA, Pavlakis SG, Shaikh U, Cherian KA, Dobroszycki J, Porricolo ME, et al. Rhombencephalitis caused by West Nile fever virus. *Neurology.* 2000; 55: 153.
147. Popovic N, Milosevic B, Urosevic A, Poluga J, Popovic N, Stevanovic G, et al. Clinical characteristics and functional outcome of patients with West Nile neuroinvasive disease in Serbia. *J Neurol.* 2014; 261: 1104-11.
148. Medarov BI, Multz AS, Brown W, Lempert L. West Nile meningoencephalitis and rhabdomyolysis. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 2.
149. Tyler KL, Pape J, Goody RJ, Corkill M, Kleinschmidt-DeMasters BK. CSF findings in 250 patients with serologically confirmed West Nile virus meningitis and encephalitis. *Neurology.* 2006; 66: 361-5.
150. Varki AP, Puthuran P. Value of second lumbar puncture in confirming a diagnosis of aseptic meningitis. A prospective study. *Arch Neurol.* 1979; 36: 581-2.
151. Jaijakul S, Arias CA, Hossain M, Arduino RC, Wootton SH, Hasbun R. Toscana meningoencephalitis: A comparison to other viral central nervous system infections. *J Clin Virol.* 2012; 55: 204-8.
152. Bai F, Kong K, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR, et al. A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus. *J Infect Dis.* 2010; 202: 1804-12.

153. Crichlow R, Bailey J, Gardner C. Cerebrospinal fluid neutrophilic pleocytosis in hospitalized West Nile virus patients. *J Am Board Fam Pract.* 2004; 17: 470-2.
154. Rawal A, Gavin PJ, Sturgis CD. Cerebrospinal fluid cytology in seasonal epidemic West Nile virus meningo-encephalitis. *Diagn Cytopathol.* 2006; 34: 127-9.
155. Chow E, Troy SB. The Differential Diagnosis of Hypoglycorrhachia in Adult Patients. *Am J Med Sci.* 2014; 348: 186-90.
156. Cunha BA. The diagnostic usefulness of cerebrospinal fluid lactic acid levels in central nervous system infections. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1260-1.
157. Petropoulou KA, Gordon SM, Prayson RA, Ruggieri PM. West Nile virus meningoencephalitis: MR imaging findings. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005; 26: 1986-95.

Spisak skraćenica

WNV - Virus Zapadnog Nila (od engl. West Nile Virus)

CNS - centralni nervni sistem

CXCL10 - CXC ligand 10 ili interferon gama indukovani protein 10

CCL2 - hemokin ligand 2 / monocit hemotaksni protein-1

CCL5 - hemokin ligand 5

CCR5 - hemokinski receptor tip 5/ CD 195

CD4+ - cluster of differentiation 4

CD8+ - cluster of differentiation 8

WNF - Groznica Zapadnog Nila (od engl. West Nile fever)

WNND - Neuroinvazivni oblik Groznice Zapadnog Nila (od engl. West Nile virus neuroinvasive disease)

WNM - Meningitis uzrokovan WNV (od engl. West Nile virus meningitis)

WNE - Encefalitis uzrokovan WNV (od engl. West Nile virus encephalitis)

AFP - Akutna flacidna slabost (od engl. Accute flaccide paralysis)

AST - aspartat aminotransferaza

ALT - alanin aminotransferaza

CK - kreatin kinaza

CST - cerebrospinalna tečnost

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

PCR – reakcija lančanog umnožavanja (od engl. polymerase chain reaction)

CT – kompjuterizovana tomografija

NMR – nuklearna magnetna rezonanca

ARBO – posredovan artropodama kao vektorima (od engl. ARthropode BOrn)

CRP – C- reaktivni protein

IFCC - The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory
Medicine

mRS – modifikovana Rankin skala

OR – odds ratio

CI – interval poverenja (od engl. confidence interval)

HBI – hronična bubrežna insuficijencija

ABI – akutna bubrežna insuficijencija

HTA – arterijska hipertenzija

CXCL1 – hemokin ligand 1

CXCL2 – hemokin ligand 2

Prilog 1

MODIFIKOVANA RANKIN SKALA

SKALA	OPIS
0	BEZ SIMPTOMA
1	BEZ ZNAČAJNE ONESPOSOBLJENOSTI UPRKOS SIMPTOMIMA: SPOSOBAN ZA SVE UOBIČAJENE AKTIVNOSTI I OBAVEZE
2	LAKA ONESPOSOBLJENOST: NESPOSOBAN ZA PRETHODNE AKTIVNOSTI, ALI JE SPOSOBAN ZA SAMOSTALNU BRIGU O SEBI
3	UMERENA ONESPOSOBLJENOST: ZAHTEVA TUĐU POMOĆ, ALI JE SPOSOBAN ZA SAMOSTALAN HOD
4	UMERENO TEŠKA ONESPOSOBLJENOST: NESPOSOBAN ZA HOD BEZ POMOĆI I ZAHTEVA POMOĆ ZA OSNOVNE FIZIOLOŠKE POTREBE
5	TEŠKA ONESPOSOBLJENOST: VEZANOST ZA KREVET, INKONTINENCIJA I STALNA POTREBA ZA MEDICINSKOM NEGOM
6	SMRT

0 **POTPUNI OPORAVAK (BEZ DEFICITA)**

1-2 **FUNKCIONALNO NEZAVISNI**

3-5 **FUNKCIONALNO ZAVISNI**

6 **SMRT**

Prilog 2

MODIFIKOVANI BARTHEL INDEKS

	NEMOGUĆNOST	POTREBNA VELIKA POMOĆ	POTREBNA UMERENA POMOĆ	POTREBNA MALA POMOĆ	POTPUNA NEZAVISNOST
LIČNA HIGIJENA	0	1	3	4	5
KUPANJE	0	1	3	4	5
HRANJENJE	0	2	5	8	10
ODLAZAK U TOALET	0	2	5	8	10
PENJANJE UZ STEPENICE	0	2	5	8	10
OBLAČENJE	0	2	5	8	10
KONTROLA STOLICE	0	2	5	8	10
KONTROLA MOKRENJA	0	3	5	8	10
TRANSFER KREKET STOLICA	0	3	8	12	15
POKRETLJIVOST	0	3	8	12	15
POKRETLJIVOST UZ KOLICA	0	1	3	4	5

0-24 – POTPUNA ZAVISNOST

25-49 – TEŠKA ZAVISNOST

50-74 – UMERENA ZAVISNOST

75-90 – BLAGA ZAVISNOST

91-99 – MINIMALNA ZAVISNOST

Biografija autora

Dr Aleksandar Urošević rođen je 01.06.1977. godine u Gornjem Milanovcu, gde je završio osnovnu školu i Gimnaziju.

Na Medicinskom Fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirao je 2004. godine.

Od 2006. godine stalno je zaposlen u Klinici za infektivne i tropske bolesti Kliničkog Centra Srbije u Beogradu.

2012. godine odbranio je magistarsku tezu "Etiologija, kliničke karakteristike i patohistološki nalaz kod bolesnika sa akutnom insuficijencijom jetre".

2013. godine je položio specijalistički ispit iz oblasti infektivne bolesti.

Autor je objavio više radova iz oblasti infektivnih bolesti u stranim i domaćim časopisima.

I. Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Александар Урошевић

Број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Клиничке карактеристике, дугорочна прогноза и функционални исход код оболелих од неуроинвазивног облика Грознице Западног Нила

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 12.06.2016.



II. Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Александар Урошевић

Број индекса _____

Студијски програм докторска дисертација магистра наука

Наслов рада Клиничке карактеристике, дугорочна прогноза и функционални исход код оболелих од неуроинвазивног облика Грознице Западног Нила

Ментор Проф. др Олга Дуловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 12.06.2016.

III. Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Клиничке карактеристике, дугорочна прогноза и функционални исход код оболелих од неуроинвазивног облика Грознице Западног Нила

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 12.06.2016.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.