

## Dijagnostika arbovirusnih infekcija

Tatjana Vilibić-Čavlek<sup>1,2</sup>, Andrea Babić-Erceg<sup>2,3</sup>, Ljubo Barbić<sup>4</sup>,  
Vladimir Stevanović<sup>4</sup>, Vladimir Savić<sup>5</sup>, Gordana Mlinarić-Galinović<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Odjel za virologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo*

<sup>2</sup>*Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

<sup>3</sup>*Odjel za molekularnu dijagnostiku, Hrvatski zavod za javno zdravstvo*

<sup>4</sup>*Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

<sup>5</sup>*Centar za peradarstvo, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb*

### Sažetak

Dijagnostika arbovirusa uključuje izravne (izolacija virusa, molekularna dijagnostika, detekcija virusnih antigena) i neizravne metode (serološka dijagnostika). Budući da u ljudi arbovirusi većinom uzrokuju kratkotrajnu viremiju s niskom razinom virusa, dijagnoza se većinom provodi serološkim metodama. Najčešće se koriste imunoenzimni i indirektni imunofluorescentni test. Zbog mogućih križnih reakcija između virusa unutar istog roda, posebno virusa koji pripadaju istoj seroskupini, svaki je reaktivni rezultat potrebno potvrditi neutralizacijskim testovima (virus neutralizacijski test i neutralizacijski test redukcije plakova).

U skupinu arbovirusa (engl. *arthropod borne*) svrstano je više od 500 virusa, od kojih bolest u ljudi uzrokuje njih oko 150. Prirodni rezervoari ovih virusa su kralježnjaci, a vektori člankonošci (npr. komarci, krpelji i nevidi). U nekim je vrstama člankonožaca opisan transovarijalni prijenos pa oni istodobno predstavljaju i rezervoare virusa. Arbovirusi se održavaju u prirodi na područjima gdje obitavaju njihovi rezervoari i vektori. Najbrojniji su u tropskom i subtropskom klimatskom pojasu, a sezonska aktivnost ovisi o ekološkim stanjima, kao što je npr. vlaga i temperatura koji utječu na gustoću populacije vektora i rezervoara (1).

Arbovirusi pripadaju različitim porodicama virusa, a za javno zdravstvo najveći značaj imaju virusi iz roda *Flavivirus* (virus žute groznice, virus dengue; DENV, virus krpeljnog

encefalitisa; KEV, virus Zapadnog Nila; VZN), roda *Alphavirus* (chikungunya virus; CHIKV), roda *Phlebovirus* (virus papataci groznice, virus groznice Rift Valley) te roda *Nairovirus* (virus krimsko-kongoanske hemoragijske groznice) (1, 2).

Većina infekcija uzrokovanih arbovirusima prolazi asimptomatski. Klinički manifestne bolesti očituju se kao nespecifična febrilna bolest sa ili bez osipa, encefalitis, artritis/artralgija te hemoragijska groznica (3).

Dijagnostika arbovirusa uključuje izravne (izolacija virusa, detekcija virusne nukleinske kiseline, detekcija virusnih antigena) i neizravne metode (serološka dijagnostika) (tablica 1). Izolacija virusa moguća je iz krvi, cerebrospinalnog likvora (CSL), zglobne tekućine te postmortalno dobivenih uzoraka tkiva. Za većinu arbovirusa, ljudi predstavljaju slučajne krajnje domaćine s kratkotrajnom viremijom i niskom razinom virusa što umanjuje uspješnost izolacije. Iznimku čine virus žute groznice, virus dengue i chikungunya virus koji i u ljudi uzrokuju viremiju s višom razinom virusa (2).

Arbovirusi se umnožavaju u različitim vrstama primarnih i kontinuiranih staničnih kultura, kulturama dobivenim od komaraca te u mišjoj sisančadi. Budući da su za izolaciju većinom potrebni biosigurnosni uvjeti trećeg ili četvrtog stupnja (BSL-3/4), ona se provodi samo u referentnim laboratorijima. U molekularnoj se dijagnostici koriste isti uzorci kao i za izolaciju virusa. Od molekularnih metoda koriste se klasični RT-PCR (engl; *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*) te RT-PCR u stvarnom vremenu. U usporedbi s klasičnom metodom, RT-PCR u stvarnom vremenu ima veću osjetljivost i specifičnost, moguće je kvantitativno odrediti broj kopija virusne RNK te je manja mogućnost kontaminacije uzorka (4).

Dijagnostika arbovirusnih infekcija uglavnom se provodi serološkim postupcima. Najčešće se koriste imunoenzimni test (ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assay*) i indirektni imunofluorescentni test (IFA; *indirect immunofluorescence assay*). Zbog mogućih križnih reakcija, posebno između virusa unutar iste seroskupine, svaki je reaktivni test potrebno potvrditi neutralizacijskim testovima (virus neutralizacijski test-VNT i neutralizacijski test redukcije plakova, PRNT; *plaque-reduction neutralization test*). Test inhibicije hemaglutinacije (HI; *hemagglutination inhibition*) temelji se na sposobnosti arbovirusa da aglutiniraju eritrocite guske ili ljudske eritrocite grupe "0". U prisutnosti specifičnih protutijela dolazi do inhibicije hemaglutinacije. Reakcija vezanja komplementa se, zbog slabije osjetljivosti, danas rijetko koristi (5).

Kod većine arbovirusnih infekcija, IgM antitijela se pojavljuju u serumu 3-8 dana nakon početka bolesti i perzistiraju 30-90 dana, no kod nekih infekcija, npr. VZN mogu perzistirati do 500 dana. Nalaz IgM protutijela u likvoru ili četverostruki porast titra u parnim uzorcima seruma dodatni je laboratorijski dokaz infekcije kod takvih slučajeva. Neutralizacijska protutijela su specifična za serotip i perzistiraju u serumu mnogo godina nakon preboljele infekcije, a ponekad i doživotno. HI protutijela rastu brzo unutar prvog tjedna i ostaju prisutna dugo vremena nakon infekcije. Protutijela koja se dokazuju u IFA pokazuju sličnu dinamiku kao NT i HI protutijela, dok je prosječno trajanje protutijela koja vežu komplement oko 2-3 godine (2, 6).

Kao dodatni test za potvrdu akutne/nedavne primarne infekcije koristi se određivanje aviditeta IgG protutijela. U početku primarne infekcije stvorena IgG protutijela su niskog aviditeta (niskog afiniteta za antigen). Sazrijevanjem imunološkog odgovora, IgG protutijela poprimaju visoki aviditet koji ostaje trajno visok. Ovaj je test osobito koristan za razlikovanje akutne/nedavne infekcije u bolesnika s dugom perzistencijom IgM-protutijela (7).

Prilikom tumačenja seroloških nalaza potrebno je uzeti u obzir moguće križne reakcije kao i podatke o cijepljenju te putovanju u endemska područja.

**Tablica 1.** Osnovne značajke metoda koje se koriste u dijagnostici arbovirusa (2)

	Trajanje testa	Osjetljivost	Specifičnost
<b>Detekcija virusa</b>			
Izolacija virusa	1-7 dana	Visoka	Visoka
RT-PCR	2-4 sata	Visoka <sup>a</sup>	Visoka
Hibridizacijske metode	3-4 sata	Visoka <sup>b</sup>	Umjerena
Detekcija antigena (ELISA)	3-5 sati	Umjerena <sup>c</sup>	Visoka
Elektronska mikroskopija	30 min	Niska <sup>d</sup>	Visoka
<b>Serologija</b>			
ELISA	3-4 sata	Visoka	Niska
IFA	2-3 sata	Umjerena	Umjerena
Imunoblot testovi	2-4 sata	Umjerena	Umjerena
Neutralizacijski testovi	4-7 dana	Umjerena	Visoka
Inhibicija hemaglutinacije	2-4 sata	Niska	Umjerena

<sup>a</sup>oko 200 virusnih kopija/ml; <sup>b</sup>oko $10^4$  virusnih čestica/mL; <sup>c</sup>oko 0,01 g antigena/ml;

<sup>d</sup> $\geq 10^6$  virusnih čestica/ml

U tablici 2 prikazane su metode koje se koriste u dijagnostici medicinski značajnijih arbovirusa.

**Tablica 2.** Metode koje se koriste u dijagnostici najznačajnijih arbovirusa (2)

Uzročnik	Metoda		
	Rana akutna faza	Kasna akutna faza	Rekonvalescencija
Virus krpeljnog encefalitisa	RT-PCR <sup>a</sup> , VI <sup>b</sup> , IHA <sup>c</sup>	IgM ELISA <sup>d</sup> /IFA <sup>e</sup> , HI <sup>f</sup>	IgM/IgG ELISA, IgM/IgG IFA, HI
Virus Zapadnog Nila	PCR, VI, IHA	IgM ELISA/IFA, HI	IgM/IgG ELISA, IgM/IgG IFA, HI
Virus dengue	RT-PCR, VI, IHA, ELISA (NS1)	IgM ELISA/IFA, HI	IgM/IgG ELISA, IgM/IgG IFA
Virus papataci groznice	RT-PCR, VI	IB <sup>g</sup> , IgM IFA	IB, IgM IFA, IgM/IgG ELISA
Chikungunya v.	RT-PCR, VI, IHA	IgM ELISA/IFA, IgM IFA, HI	IgM/IgG IFA, IgM/IgG ELISA
Virus krimsko-kongoanske HG	PCR, VI	IgM/IgG ELISA, IgM IFA	IgM/IgG ELISA, IgG IFA
Virus žute groznice	PCR, VI, IHA	IgM ELISA/IFA	IgM/IgG ELISA, IgM/IgG IFA
Usutu virus	VI, RT-PCR	IgM ELISA	IgM/IgG ELISA

<sup>a</sup>RT-PCR; reverzna transkriptaza-lančana reakcija polimeraze, <sup>b</sup>VI; izolacija virusa, <sup>c</sup>IHA; imunohistokemijska analiza, <sup>d</sup>ELISA; imunoenzimni test; <sup>e</sup>IFA; indirektni imunofluorescentni test; <sup>f</sup>HI; inhibicija hemaglutinacije, <sup>g</sup>IB; imunoblot

U značajnije arboviruse dokazane na području Hrvatske spadaju KEV (8-10), VZN (11-13), DENV (14, 15), virus papataci groznice (16) te nedavno dokazan Usutu virus (USUV) (17, 18).

### Virus krpeljnog encefalitisa

KEV je moguće izolirati iz krvi ili CSL inokulacijom u mišju sisančad ili stanične kulture (BHK-21; bubreg jednodnevnog hrčka, engl. *baby hamster kidney*, pileći fibroblasti) u kojima se prisutnost virusa (virusni antigen) dokazuje pomoću imunofluorescentnog testa. U serološkoj se dijagnostici najčešće koriste ELISA i IFA koji određuju IgM i IgG protutijela.

IgM protutijela prisutna su najmanje šest tjedana, no mogu perzistirati do 10 mjeseci nakon infekcije ili čak dulje (19). Zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima (VZN, DENV, virus žute groznice i dr.), za potvrdu infekcije koriste se neutralizacijski testovi (VNT i PRNT) (6, 20). Kao dodatna metoda za potvrdu primarne infekcije virusom KE koristi se i određivanje aviditeta IgG protutijela. Ova je metoda osobito korisna za razlikovanje akutne/nedavne infekcije u slučajevima duge perzistencije IgM protutijela (21).

### **Virus Zapadnog Nila**

VZN se može izolirati iz krvi, CSL te postmortalno dobivenih uzoraka tkiva. Za izolaciju su najpogodnije stanične kulture bubrega afričkoga zelenog majmuna (Vero) i bubrega kunića (RK-13; engl. *rabbit kidney*) u kojima se prisutnost virusa dokazuje metodom IFA te RT-PCR. RT-PCR je metoda izbora u molekularnoj dijagnostici VZN-a. Dvije su inačice ove metode: klasični RT-PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR) koji detektira  $\geq 50$  kopija virusne RNK/ml, što je oko 1000 puta osjetljivije od izolacije virusa (22, 23). U serološkoj se dijagnostici primjenjuju ELISA i IFA, a reaktivni rezultati potvrđuju neutralizacijskim testovima. IgM-protutijela pojavljuju se u serumu oboljelih od četvrtog do sedmog dana bolesti te u oko 36% oboljelih mogu perzistirati duže od godine dana. Budući da ne prolaze hematoencefalnu barijeru, nalaz IgM-protutijela u CSL-u smatra se dijagnostički značajnim. U nekih je bolesnika opisana perzistencija IgM-protutijela u CSL-u do 199 dana. U slučaju perzistencije IgM protutijela, niska vrijednost aviditeta IgG protutijela ukazuje na nedavnu VZN infekciju (6, 7).

### **Virus dengue**

DENV se može izolirati iz seruma, plazme te mononuklearnih stanica periferne krvi. Za izolaciju virusa najpogodnije su stanične linije dobivene iz komarca (*C6/36-Ae. albopictus* te *AP61-Ae. pseudoscutellaris*). DENV ne izaziva citopatski učinak (CPU) te se prisutnost virusa u stanicama kulture dokazuje metodom IF pomoću serotip-specifičnih monoklonskih protutijela. Izolacija je moguća i u staničnim kulturama majmunske bubrega (Vero, LLCMK<sub>2</sub>), kulturi bubrega hrčka (BHK-21), mišjoj sisančadi te intratorakalnom inokulacijom u komarca. U molekularnoj se dijagnostici primjenjuju metoda "nested" RT-PCR i RT-qPCR. U odnosu prema izolaciji virusa, osjetljivost molekularnih metoda je veća i iznosi 80 do 100%. NS1-antigen DENV može se dokazati tijekom primarne, ali i sekundarne DENV infekcije kada je prisutan u obliku imunih kompleksa s već postojećim IgG protutijelima.

NS1-antigen prisutan je u serumu do devetog dana nakon početka bolesti, u vrijeme kad virusna RNK više nije detektabilna (24). U serološkoj se dijagnostici koriste ELISA te IFA. Prednost IFA testa u odnosu prema ELISA testu jest mogućnost određivanja protutijela specifičnih za serotip DENV. Iako su često prisutne križne reakcije između serotipova, titar homolognih protutijela obično je viši od titra heterolognih protutijela. Serotip DENV moguće je precizno odrediti neutralizacijskim testovima (25).

### **Virus papataci groznice**

Virus papataci groznice može se izolirati iz krvi 1-2 dana nakon početka simptoma te CSL (tip Toscana). Sicilijanski i napuljski tipovi virusa rastu u staničnim kulturama majmuskog bubrega (Vero, LLCMK<sub>2</sub>) i BHK-21, a tip Toscana i u kulturama CV-1 (stanice majmuskog bubrega) te SW13 (stanice kore nadbubrežne žlijezde) u kojima stvaraju CPU, dok ne rastu u staničnim kulturama dobivenim od komaraca. Najučinkovitija metoda za izolaciju je intracerebralna inokulacija u mišju sisančad, no ona se zbog zahtjevnosti rijetko primjenjuje. RT-PCR ima veću osjetljivost u odnosu na izolaciju flebovirusa. U serološkoj se dijagnostici koriste ELISA i IFA, a reaktivni se rezultati zbog križnih reakcija između flebovirusa potvrđuju pomoću VNT (26).

### **Usutu virus**

USUV se može izolirati iz krvi te CSL u različitim vrstama staničnih kultura od kojih su najpogodnije Vero, stanična kultura svinjskog bubrega (PK-15; engl. *porcine kidney*) te embrionalni fibroblasti guske u kojima stvara CPU. Izolacija USUV moguća je i u alantoičnoj vrećici oplodjenog gušćjeg jajeta te mišjoj sisančadi. USUV RNK može se dokazati u serumu i CSL metodom RT-PCR. Od seroloških se metoda koriste ELISA i IFA uz potvrdu pomoću VNT i PRNT. Iako su neutralizacijska protutijela tipno specifična, križne su reakcije moguće i u testu VNT (27, 28). Virusi koji pripadaju istom serokompleksu kao npr. USUV i VZN posjeduju oko 80% identičnih aminokiselina u E proteinu koji je odgovoran za tvorbu neutralizacijskih protutijela. U slučaju križnih reakcija, dijagnozu potvrđuje četverostruko veći titar homolognih protutijela u odnosu na titar heterolognih protutijela. Virusi koji pripadaju različitim serokompleksima kao npr. USUV i KEV imaju oko 40% identičnih aminokiselina u E proteinu te obično ne pokazuju križne reakcije u VNT (20).

Nacionalni referentni laboratorij za arboviruse i rikcije pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo provodi rutinsku (serološku i molekularnu) dijagnostiku gore navedenih arbovirusa

zajedno sa suradnim ustanovama, Veterinarskim fakultetom Sveučilišta u Zagrebu (Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom) te Hrvatskim veterinarskim institutom (Centar za peradarstvo).

## Literatura

1. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. U: Knipe DM, Howley PM (ur). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, str. 1101-51.
2. Niedrig M, Nitsche A, Donoso-Mantke O. Arthropode-borne viruse. U: Jerome KR (ur). *Lennette's laboratory diagnosis of viral infections*. 4th ed. Informa Healthcare: New York, 2010, 450-7.
3. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol* 2012; 55(3):191-203.
4. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS, i sur. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4066-71.
5. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, i sur. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol* 2011; 92:2821-9.
6. Roehring JT, Nash D, Maldin B, i sur. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:376-9.
7. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 43(12):5873-5.
8. Borčić B, Kaić B, Gardašević-Morić L, Turković B. Krpeljni meningoencefalitis u Gorskom Kotaru - nove spoznaje. *Liječ vjesn* 2001; 123(7-8):163-4.
9. Golubić D, Dobler G. Flavivirusi u sjeverozapadnog Hrvatskoj. *Infektol glasnik* 2012; 32(4):153-7.
10. Miletić-Medved, Đaković-Rode O, Cvetko-Krajinović L, Markotić A. Krpeljni meningoencefalitis u hrvatskoj srednjoj Posavini: seroepidemiološko ispitivanje u šumskih radnika. *Infektol glasnik* 2011; 31(2):87-94.
11. Barbić L, Listeš E, Katić S, i sur. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet Microbiol* 2012; 159(3-4):504-8.
12. Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, i sur. First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2014; 14(1):82-4.
13. Kurolt IC, Krajinović V, Topić A, Kuzman I, Baršić B, Markotić A. First molecular analysis of West Nile virus during the 2013 outbreak in Croatia. *Virus Res* 2014; 189C:63-6.
14. Gjenero Margan I, Aleraj B, Krajcar D, i sur. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill* 2011; 16(9):pii=19805.
15. Kurolt IC, Betica-Radić L, Daković-Rode O, i sur. Molecular characterization of dengue virus 1 from autochthonous dengue fever cases in Croatia. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(3):E163-5.
16. Punda-Polić V, Mohar B, Duh D, i sur. Evidence of an autochthonous Toscana virus strain in Croatia. *J Clin Virol* 2012; 55(1):4-7.

17. Barbic Lj, Vilibic-Cavlek T, Listes E, i sur. Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2013; 13(10):772-4.
18. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic Lj, i sur. First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection* 2014; 42(4):689-95
19. Holzmann H. Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine* 2003; 21:3-40.
20. Stiasny K, Aberle SW, Heinz FX. Retrospective identification of human cases of West Nile virus infection in Austria (2009 to 2010) by serological differentiation from Usutu and other flavivirus infections. *Euro Surveill* 2013; 18(43):pii=20614.
21. Gassmann C, Bauer G. Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *J Med Virol* 1997; 51(3):242-51.
22. Savić V. Virus Zapadnog Nila. *Veterinarska stanica* 2012; 43(5):365-70.
23. Vilibić-Čavlek T, Barbić Lj, Ljubin-Sternak S, i sur. Infekcija virusom Zapadnog Nila: re-emergentna bolest u Hrvatskoj. *Liječ vjesn* 2013; 135:156-61.
24. WHO. Dengue - Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press; 2009.
25. Vilibić-Čavlek T, Ljubin-Sternak S, Babić-Erceg A, i sur. Virološka dijagnostika reemergentnih infekcija: virus dengue. *Liječ vjesn* 2012; 134:164-7.
26. Charrel RN, Bichaud L, de Lamballerie X. Emergence of Toscana virus in the mediterranean area. *World J Virol* 2012; 1(5):135-41.
27. Weissenböck H, Chvala-Maansberger S, Bakonyi T, Nowotny N. Emergence of Usutu virus in Central Europe: diagnosis, surveillance and epizootiology. U: Takken W, Knols BGJ. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Wageningen: Academic Publishers; 2007, str. 153-68.
28. Vazquez A, Jimenez-Clavero M, Franco L, i sur. Usutu virus: potential risk of human disease in Europe. *Euro Surveill* 2011; 16(31):pii=19935.