

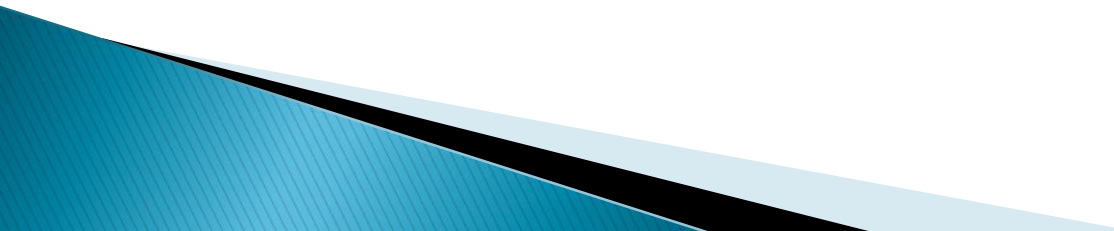


ZAVOD ZA JAVNO  
ZDRAVSTVO  
OSJEČKO-BARANJSKE  
ŽUPANIJE

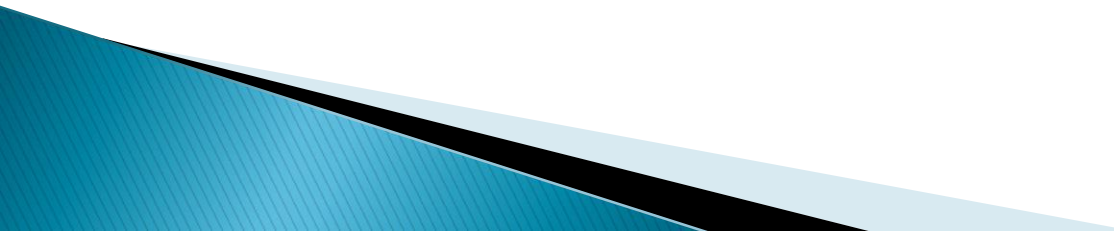
# **STRUKTURA , BIOLOŠKA SVOJSTVA I DIJAGNOSTIKA ZIKA VIRUSA I DRUGIH ARBOVIRUSNIH INFEKCIJA**

Snježana Loci-Zvocak, dr. med.

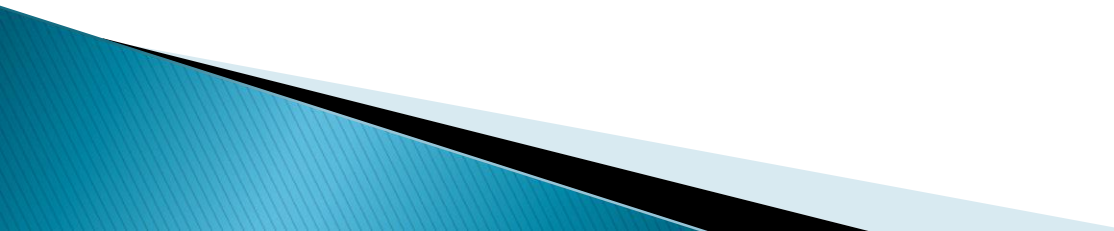
# *Arbovirusne infekcije:*

- ▶ Emergentne ili re – emergentne ;
  - ▶ kao novootkrivene, ili
  - ▶ one u kojih se nedavno znatno povećala incidencija, ili
  - ▶ proširio geografski, vektorski ili domaćinski raspon
  - ▶ 70 godina / 400 emergentnih ili re – emergentnih bolesti
  - ▶ 70 % zoonoze, koje prenose razni vektori
  - ▶ veliku skupinu čine arbovirusne infekcije – klasificirane prema prijenosnicima, člankonošcima
- 

# *Arbovirusne infekcije:*

- ▶ 500 različitih virusa / 80 patogeno za ljude
  - ▶ *Togaviridae* – *Alphavirus* (virus Chykungunya...) i *Rubivirus*
  - ▶ *Flaviviridae* - *Flavivirus* (virus žute groznice, virus Zapadnog Nila, Usutu virus, virus Zika, virus dengue), *Pestivirus*, *Hepacivirus*
  - ▶ *Bunyaviridae* - *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, *Hantavirus*, *Tospovirus*
  - ▶ *Reoviridae* – *Orthoreovirus*, *Obivirus*, *Rotavirus*, *Coltivirus*.....
- 

# *Građa i umnožavanje Alphavirusa*

- ▶ 45 – 75 nm, kuglasti
  - ▶ jednolančana (+) RNK
  - ▶ dvoslojna lipidna ovojnica, glikoproteinski izdanci E1, E2, E3 – za određivanje pojedinih tipova virusa
  - ▶ ulazi u stanicu endocitozom
  - ▶ stapanje virusne stanice s opnom endosoma
  - ▶ oslobađanje kapside i genoma u citoplazmu
  - ▶ vezanje za ribosome
  - ▶ replikacija – sintetiziranje ranih i kasnih proteina
  - ▶ pupanje kroz citoplazmatsku opnu
- 

## *Građa i umnožavanje Flavivirusa:*

- ▶ 40 – 50 nm, kuglasti, obavijeni virusi
- ▶ jednolančana (+) RNK
- ▶ tri strukturna proteina: C, M, E
- ▶ glikoprotein E – adsorpcija na stanicu, epitopi za neutralizaciju i inhibiciju hemaglutinacije
- ▶ glikoproteini C i M – bez značajne uloge u patogenezi i klasifikaciji
- ▶ razlika između *Alphavirusa* i *Flavivirusa* – građa genoma

## *Struktura i biološka svojstva Zika virusa:*

- ▶ dvije genetske linije ZIKV (afrička i azijska)
- ▶ afrička – slabije virulencije
- ▶ E- protein vrlo sličan onom u neurovirulentnom virusu Zapadnog Nila, ostali proteini pokazuju sličnost s proteinima virusa dengue
- ▶ struktura ostaje očuvana na 40° C
- ▶ kompaktna površinska struktura – sposobnost preživljavanja u nepovoljnoj okolini
- ▶ inaktivacija: 70% etanol, 1% hipoklorit, temp. >60° C
- ▶ osušen u okolini zadržava infektivnost duže od 3 dana

# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

## ▶ Izravne metode:

izolacija virusa

molekularna diagnostika

detekcija virusnih antigena

## ▶ Neizravne metode:

serološka diagnostika



# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

- ▶ Izolacija virusa: - krv
  - cerebrospinalni likvor (CSL)
  - zglobna tekućina
  - postmortalno dobiveni uzorci tkiva
- Ljudi predstavljaju slučajne domaćine s kratkotrajnom viremijom i niskom razinom virusa što umanjuje uspješnost izolacije, osim virusa žute groznice, virus dengue i chikungunya virus



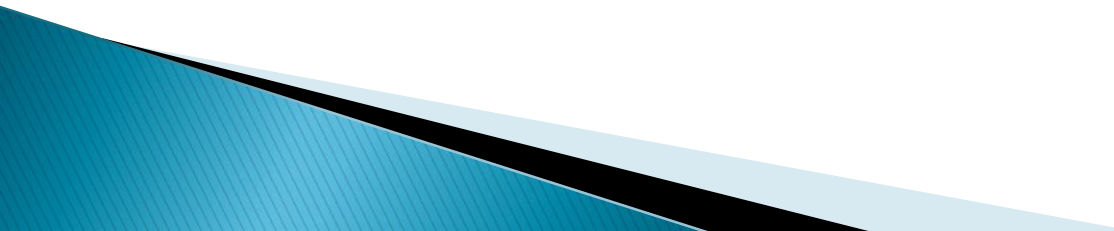
# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

## ▶ Serološki postopci:

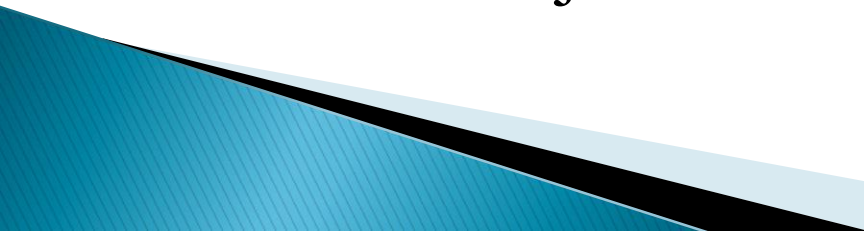
- imunoenzimni test  
(ELISA; *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- indirektni imunofluorescentni test  
(IFA; *indirect immunofluorescence assay*)

# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

## ▶ Neutralizacijski testovi:

- virus neutralizacijski test – VNT
  - neutralizacijski test redukcije plakova  
(PRNT; plaque-reduction neutralization test)
  - test inhibicije hemaglutinacije
- 

## *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

- ▶ IgM protutijela se pojavljuju u serumu 3-8 dana nakon početka bolesti i perzistiraju 30-90 dana, kod VZN i do 500 dana
  - ▶ četverostruki porast titra u parnim uzorcima seruma dodatni je laboratorijski dokaz infekcije
  - ▶ neutralizacijska protutijela su specifična za serotip i perzistiraju u serumu mnogo godina nakon preboljele infekcije, ponekad doživotno
  - ▶ dodatni test za potvrdu akutne/nedavne infekcije koristi se određivanje aviditeta IgG protitijela
- 

## *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

Serologija	Trajanje testa	Osjetljivost	Specifičnost
ELISA	3-4 sata	visoka	niska
IFA	2-3 sata	umjerena	umjerena
Neutralizacijski testovi	4-7 dana	umjerena	visoka
Inhibicija hemaglutinacije	2-4 sata	niska	umjerena

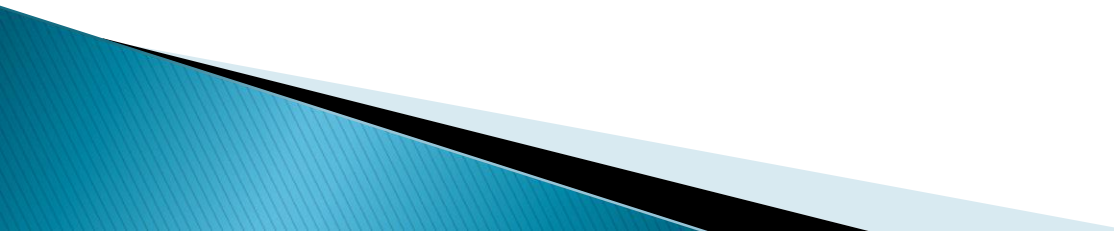
# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

- ▶ Molekularna dijagnostika:
  - klasični RT-PCR (*engl; reverse-transcriptase polymerase chain reaction*)
  - RT-PCR u stvarnom vremenu
    - ~ veća osjetljivost i specifičnost
    - ~ kvantitativno određivanje broja kopija
    - ~ manja mogućnost kontam. uzorka

## *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

Detekcija virusa	Trajanje testa	Osjetljivost	Specifičnost
Izolacija virusa	1-7 dana	visoka	visoka
RT-PCR	2-4 sata	visoka	visoka
Detekcija antigena (ELISA)	3-5 sati	umjerena	visoka
Elektronska mikroskopija	30 minuta	niska	visoka

## *Dijagnostika virusne infekcije Zika:*

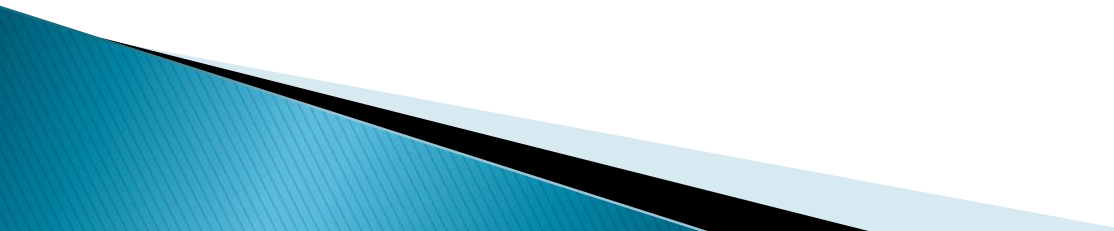
- ▶ ZIKV/RNA : u krvi, urinu, slini, sjemenoj tekućini, plodnoj vodi, tkivu posteljice, tkivu mozga
  - ▶ izolacija virusa: stanična kultura Vero – citopatski učinak u obliku vakuolizacije citoplazme, žarišne degeneracije i piknoze
  - ▶ molekularna dijagnostika – “pan-flavi” početnice, specifične početnice
  - ▶ serološke reakcije; ELISA, IFA, neutralizacijski test
  - ▶ križne reakcije: preboljela DENV
- 

## *Dijagnostika virusne infekcije Zika:*

- ▶ ECDC, kriteriji za lab. dijagnostiku ZIKV:
- ▶ a) vjerojatna infekcija: ZIKV IgM protutijela uz epidemiološku poveznicu – kontakt s potvrđenim slučajem, boravak u području s dokazanom transmisijom virusa unutar 2 tj, prije početka simptoma;
- ▶ b) potvrđena infekcija: prisutnost ZIKV RNA u serumu ili drugim uzorcima (sline, urin, tkiva) ili ZIKV IgM protutijela te ZIKV PRNT titar  $> 20$  ili ZIKV PRNT  $> 4$  puta u odnosu na titar drugih flavivirusa



## *Dijagnostika infekcije virusom dengue:*

- ▶ DENV: serum, plazma, mononuklearne stanice periferne krvi
  - ▶ Izolacija virusa: stanične linije dobivene iz komarca – ne izaziva citopatski učinak, dokazuje metodom IF pomoću serotip specifičnih monoklonskih protutijela
  - ▶ Molekularne metode – veća osjetljivost 80 – 100%
- 

# *Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila:*

- ▶ VZN: u krvi, CSL, postmortalno dobivena tkiva
- ▶ Izolacija virusa: Vero stanice ( stanična kultura bubrega afričkog majmuna) i bubrega kunića
- ▶ RT – PCR metoda izbora >50 kopija virusne RNK/ml, 1000 puta osjetljivije od izolacije virusa
- ▶ serološka dijagnostika: ELISA, IFA, neutralizacijski testovi
- ▶ IgM protutijela – od 4. do 7. dana bolesti, mogu perzistirati duže od godinu dana
- ▶ nalaz IgM protutijela u CSL- dijagnostički značajan (200 dana)
- ▶ perzistencija IgM protutijela + niska vrijednost aviditeta IgG protutijela = nedavna VZN infekcija

# *Dijagnostika virusa Zapadnog Nila u tkivu komarca:*

- ▶ Prikupljanje uzoraka, prijevoz i skladištenje pulova komaraca na odgovarajući način:
  - transport: temp. +4 do +8
  - skladištenje: temp. +2 do -8 / 12 sati
  - zamrzavanje -20 do -80 do analize uzoraka
- izolacija i identifikacija virusne nukleinske kiseline pomoću “in house” testnih protokola ili komercijalnih dijagnostičkih kompleta

## ***Zaključak:***

- ▶ Koordinirano multidisciplinarno praćenje

*“ Kontrola aktivnosti virusa u vektorima te domaćim i divljim životinjama na određenom području je vrlo važna jer donekle omogućuje predviđanje vremena pojavljivanja bolesti u ljudi. ”*