

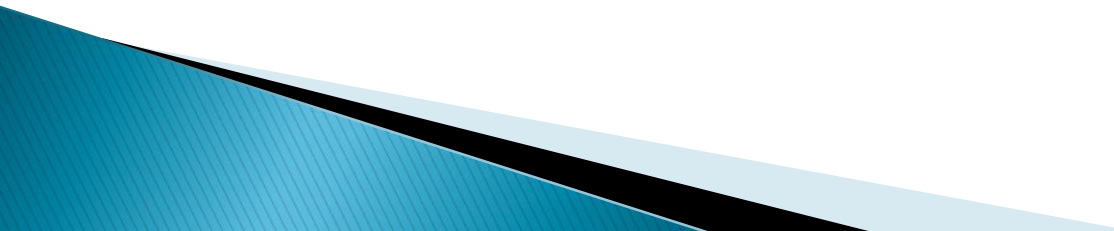


ZAVOD ZA JAVNO  
ZDRAVSTVO  
OSJEČKO-BARANJSKE  
ŽUPANIJE

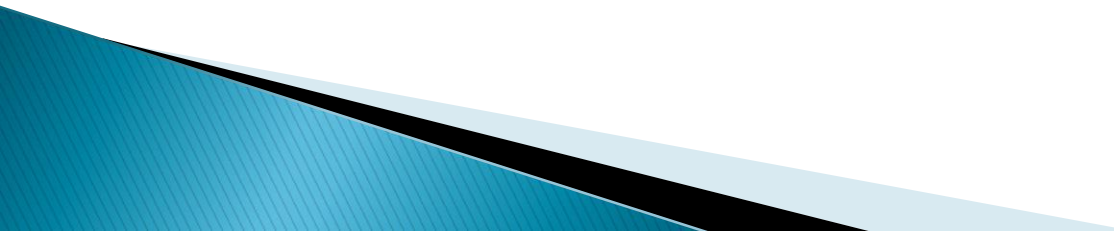
# **STRUKTURA , BIOLOŠKA SVOJSTVA I DIJAGNOSTIKA ZIKA VIRUSA I DRUGIH ARBOVIRUSNIH INFEKCIJA**

Snježana Loci-Zvocak, dr. med.

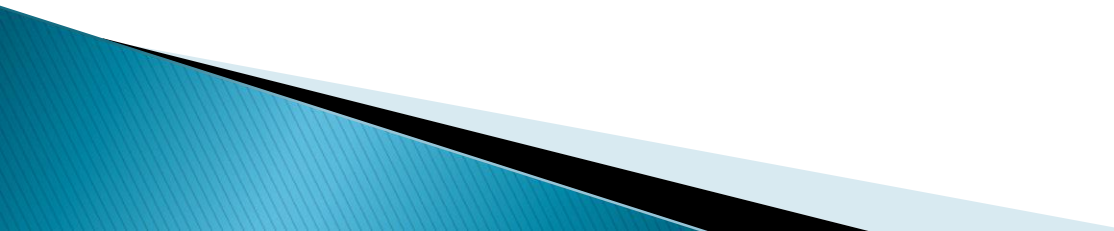
# *Arbovirusne infekcije:*

- ▶ Emergentne ili re-emergentne ;
  - ▶ kao novootkrivene, ili
  - ▶ one kod kojih se nedavno znatno povećala učestalost pojavljivanja, ili
  - ▶ proširio geografski, vektorski ili domaćinski obim
  - ▶ 70 godina/400 emergentnih ili re – emergentnih bolesti
  - ▶ 70 % zoonoze, koje prenose razni vektori
  - ▶ veliku grupu čine arbovirusne infekcije – klasifikovane prema prenosnicima, zglavkarima
- 

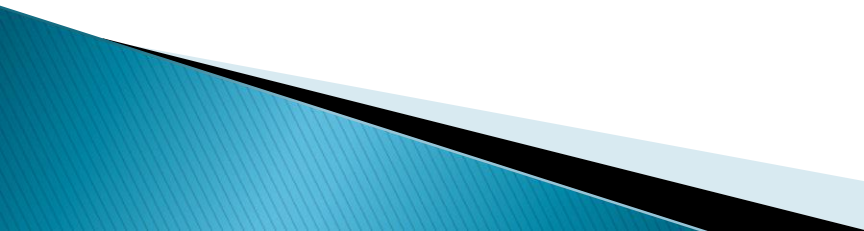
# *Arbovirusne infekcije:*

- ▶ 500 različitih virusa / 80 patogeno za ljude
  - ▶ *Togaviridae* – *Alphavirus* (virus čikungunja...) i *Rubivirus*
  - ▶ *Flaviviridae* - *Flavivirus* (virus žute groznice, virus Zapadnog Nila, Usutu virus, virus Zika, virus denga), *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 ćeliju endocitozom
  - ▶ stapanje virusne ćelije s opnom endozoma
  - ▶ oslobađanje kapside i genoma u citoplazmu
  - ▶ vezivanje za ribosome
  - ▶ replikacija – spajanje ranih i kasnih proteina
  - ▶ pupljenje 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 ćeliju, 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:*

- ▶ dve 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 denga
- ▶ struktura ostaje očuvana na 40° C
- ▶ kompaktna površinska struktura – sposobnost preživljavanja u nepovoljnoj okolini
- ▶ inaktivacija: 70% etanol, 1% hipohlorit, temp. >60° C
- ▶ osušen u okolini zadržava infektivnost duže od 3 dana

# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

## ▶ Direktne metode:

izolovanje virusa

molekularna diagnostika

detektovanje virusnih antigena

## ▶ Indirektne metode:

serološka diagnostika



## *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

- ▶ Izolovanje virusa: - krv
  - cerebrospinalni likvor (CSL)
  - zglobna tečnost
  - postmortalno dobijeni uzorci tkiva
- Ljudi predstavljaju slučajne domaćine s kratkotrajnom viremijom i niskim nivoom virusa što umanjuje uspešnost izolovanja, osim virusa žute groznice, virusa denga i čikungunja virusa



# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

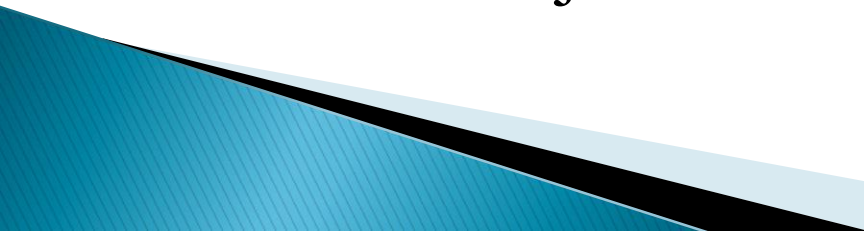
## ▶ Serološki postopci:

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

# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

- ▶ Neutralizacioni testovi:
  - virus neutralizacioni test – VNT
  - neutralizacioni test redukcije plakova  
(PRNT; plaque-reduction neutralization test)
- test inhibicije hemaglutinacije

## *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

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

## ***Dijagnostika arbovirusnih infekcija:***

Serologija	Trajanje testa	Osetljivost	Specifičnost
ELISA	3-4 sata	visoka	niska
IFA	2-3 sata	umerena	umerena
Neutralizacioni testovi	4-7 dana	umerena	visoka
Inhibicija hemaglutinacije	2-4 sata	niska	umerena

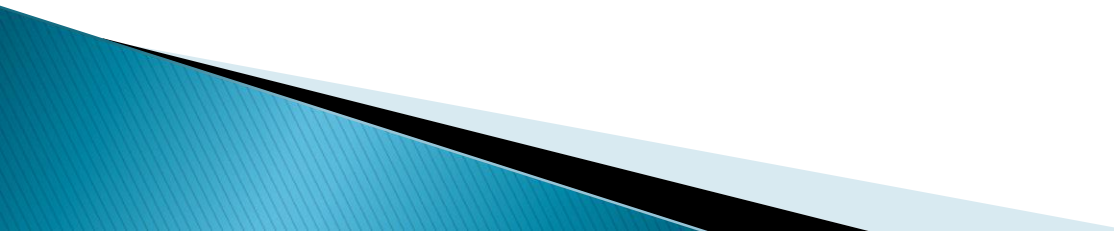
# *Dijagnostika arbovirusnih infekcija:*

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

## ***Dijagnostika arbovirusnih infekcija:***

<b>Detekcija virusa</b>	<b>Trajanje testa</b>	<b>Osetljivost</b>	<b>Specifičnost</b>
Izolacija virusa	1-7 dana	visoka	visoka
RT-PCR	2-4 sata	visoka	visoka
Detektovanje antigena (ELISA)	3-5 sati	umerena	visoka
Elektronska mikroskopija	30 minuta	niska	visoka

## *Dijagnostika virusne infekcije Zika:*

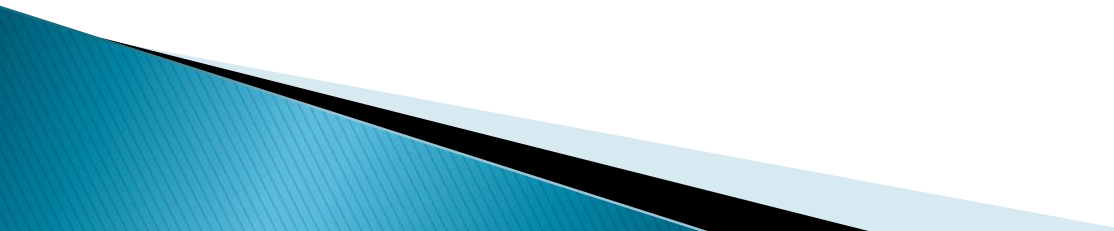
- ▶ ZIKV/RNK : u krvi, urinu, pljuvački, semenoj tečnosti, plodnoj vodi, tkivu posteljice, tkivu mozga
  - ▶ izolacija virusa: ćelijska kultura Vero – citopatski učinak u obliku vakuolizacije citoplazme, žarišne degeneracije i piknoze
  - ▶ molekularna dijagnostika – “pan-flavi” početnice, specifične početnice
  - ▶ serološke reakcije; ELISA, IFA, neutralizacioni test
  - ▶ ukrštene reakcije: preboleli DENV
- 

# *Dijagnostika virusne infekcije Zika:*

- ▶ ECDC, kriterijumi za lab. dijagnostiku ZIKV:
- ▶ a) verovatna infekcija: ZIKV IgM antitela uz epidemiološku poveznicu – kontakt s potvrđenim slučajem, boravak u području s dokazanom transmisijom virusa unutar 2 ned., pre početka simptoma;
- ▶ b) potvrđena infekcija: prisutnost ZIKV RNK u serumu ili drugim uzorcima (pljuvačka, urin, tkiva) ili ZIKV IgM antitela te ZIKV PRNT titar  $> 20$  ili ZIKV PRNT  $> 4$  puta u odnosu na titar drugih flavivirusa



## *Dijagnostika infekcije virusom denga:*

- ▶ DENV: serum, plazma, mononuklearne stanice periferne krvi
  - ▶ Izolovanje virusa: ćelijske linije dobijene iz komarca – ne izaziva citopatski učinak, dokazuje metodom IF pomoću serotip specifičnih monoklonskih antitela
  - ▶ Molekularne metode – veća osetljivost 80 – 100%
- 

# *Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila:*

- ▶ VZN: u krvi, CSL, postmortalno dobijena tkiva
- ▶ Izolovanje virusa: Vero ćelije (ćelijska kultura bubrega afričkog majmuna) i bubrega zeca
- ▶ RT – PCR metoda izbora  $>50$  kopija virusne RNK/ml, 1000 puta osjetljivije od izolacije virusa
- ▶ serološka dijagnostika: ELISA, IFA, neutralizacioni testovi
- ▶ IgM antitela – od 4. do 7. dana bolesti, mogu opstati duže od godinu dana
- ▶ nalaz IgM antitela u CSL- dijagnostički značajan (200 dana)
- ▶ opstajanje IgM antitela + niska vrednost aviditeta IgG antitela = nedavna VZN infekcija

# *Dijagnostika virusa Zapadnog Nila u tkivu komarca:*

- ▶ Sakupljanje uzoraka, prevoz 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
- izolovanje i identifikacija virusne nukleinske kiseline pomoću “in house” testnih protokola ili komercijalnih dijagnostičkih kompleta

## ***Zaključak:***

- ▶ Koordinisano 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 kod ljudi. ”*