

## DIJAGNOSTIKA VIRUSA DENGE: SEROLOŠKE I DRUGE KLASIČNE VIRUSOLOŠKE METODE

Prim.dr.sc. Oktavija Đaković Rode  
Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zagreb

## Virus denge (dengue virus, DENV)

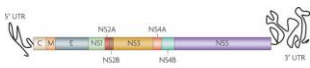
- Obitelj *Flaviviridae*
- Rod *Flavivirus*

- 4 antigeno različita serotipa:
  - DENV-1
  - DENV-2
  - DENV-3
  - DENV-4

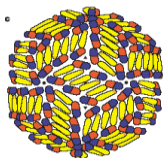


## Dengue virus, DENV

- Mali, kuglasti ovijeni virus promjera 45-55 nm
- Jednolančana (+) RNK oko 11 kb
- 1 ORF kodira proteine:
  - 3 strukturna: C (kapside), M (membrane), E (ovojnice),
  - 7 nestrukturiranih proteina: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5
- E protein → odgovoran za serotipnu specifičnost, vezanje za Rp, virusni je hemaglutinin, inducira neutralizacijska antitijela, sudjeluje u fuziji membrane i sklapanju viriona
  - 3 različite domene E proteina:
    - I crvena – tipno specifični epitopi (subkompleksi)
    - II žuta – grupni i podgrupni epitopi reaktivni s flavivirusima
    - III plava – receptori, tipno specifični epitopi

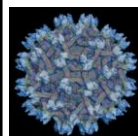


Nature Reviews | Microbiology



Modis, Ogata, Clements, et. al., 2004

## RASPROSTRANJENOST SEROTIPOVA DENV



1970.g.

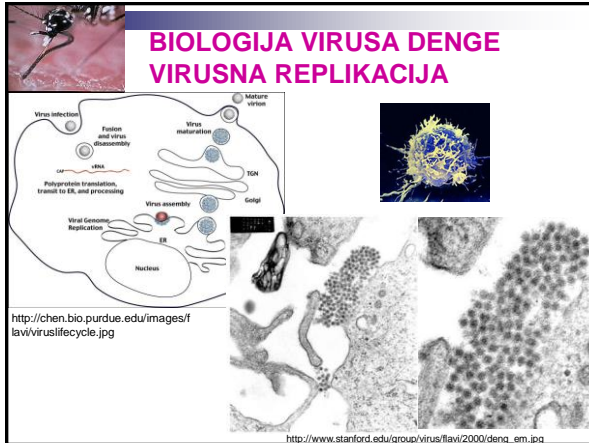


2004.g.



Guzman, December 2010

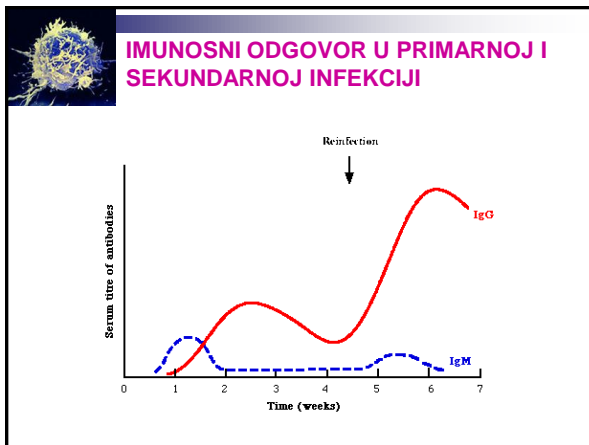
Nature Reviews | Microbiology



## PRIMARNA INFEKCIJA

### HUMORALNI I STANIČNI IMUNOSNI ODGOVOR

- Neutralizacijska antitijela
  - zaustavljaju fuziju DENV sa staničnom membranom
- Dendritičke stanice aktiviraju limfocite T
- Memorijske stanice stvaraju antitijela za borbu protiv istog serotipa



## SEKUNDARNA INFEKCIJA ISTIM DENV SEROTIPOM vs. INFEKCIJA NOVIM DENV SEROTIPOM

- **Antibody Dependent Enhancement (ADE)**
  - Kada osoba koja ima At. za dengue jednog serotipa oboli od DENV drugog serotipa. At. od prvog DENV serotipa pokušavaju zaustaviti drugi serotip.
  - Kada se At jednog serotipa vežu za novi DENV serotip križno reagiraju i zapravo povećaju sposobnost vezanja virusa i onesposobe imunski sustav da reagira kao što bi normalno trebao.
  - At. se vežu za virus i stvaraju kompleks koji veže Fc receptor.
  - At. su križno reaktivna, ali ne uništavaju virus i DENV može dalje ući u stanicu (obično fagocit), spoji se s membranom i započne ekstenzivno oštećenje budući da trigerira imunski sustav da oslobodi velike količine proupalnih citokina. Prekomjerno oslobađanje ovih citokina djeluje na krvne žile i pojačava njihovu propusnost, što inicijalno uzrokuje hemoragije i denga hemoragijsku vrućicu.
- jačanje antitijela IgG
- Fc-receptor
- Prijašnja (ranija) infekcija → veća viremija, skraćeno vremena inkubacije → brža progresija bolesti
- ADE ostaje problem ~ 20 godina nakon prve infekcije

## DENGA INFEKCIJA



- Prijenos ubodom komarca (*Aedes aegypti*)
- Inkubacija 3-14 dana
- Akutna bolest i viremija 3-7 dana
- oporavak ili progresija prema hemoragijskoj vrućici i sindromu šoka

## DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA

**Virusi:** Influenza, HIV, Hepatitis A, žuta groznica, Hantavirus, Morbilli, Rubella, Coxsackie i drugi enterovirusi, parvovirus B19, Chikungunya virus, EBV

**Bakterije:** tifusna groznica, šarlah, Meningococemia

**Paraziti:** Malaria, Leptospirosis, Rickettsiosis, Leishmaniasis, Chagasova bolest

**Gljive:** Cryptococcus, Blastomycosis, Histoplasmosis

**Neinfektivne bolesti:** maligne bolesti, reumatske, vaskulitis, drug fever, druge rijetke bolesti

**Bolesti koje se prenose komarcima**

**Protozoa:** Malaria

**Nematode:** Filariasis, dirofilariasis

**Alphaviruses:** Chikungunya fever, Mayaro fever, Ross River fever, Eastern, Western i Venezuelan equine encephalitis

**Flaviviruses:** West Nile fever, Zika fever, St. Louis encephalitis, Japanese encephalitis, žuta groznica

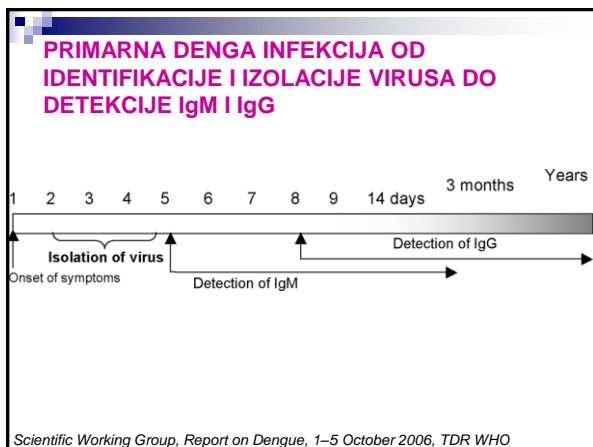
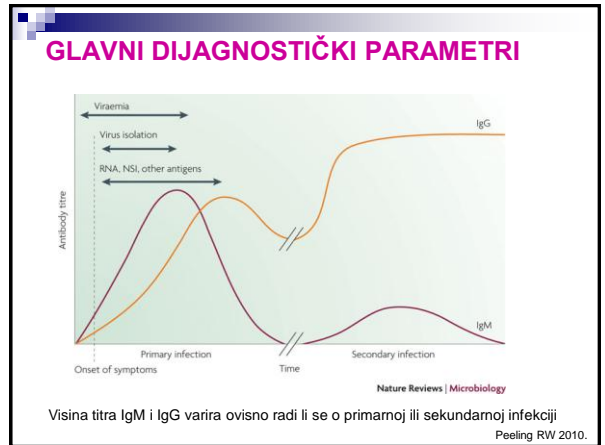
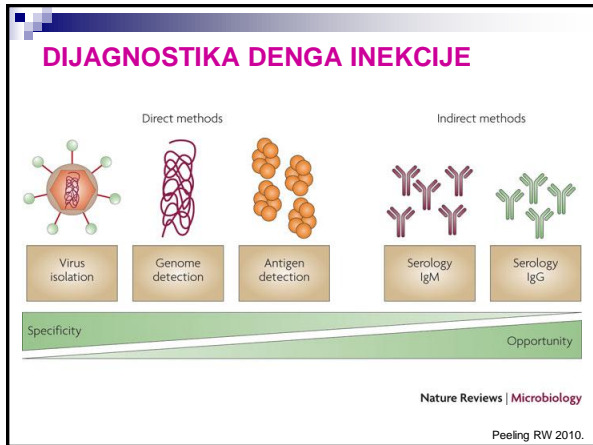
**Bunaviruses:** LaCrosse encephalitis, Oropouche virus, Bwamba fever, California encephalitis

## DIJAGNOZA DENGA



## DIJAGNOZA DENGA





## IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA VIRUSA

- **UZORCI:** puna krv, serum, plazma ili tkiva u letalnim slučajevima (jetra, slezena, limfni čvorovi i druga tkiva)
- Akutna faza **0-7. dan** bolesti (viremija)
- Inokulacija dijagnostičkih uzoraka u
  - komarce
  - stanične kulture komaraca *Aedes albopictus* C6/36 i *Aedes pseudoscutellaris* AP61 ili sisavaca Vero ili LLC-MK2 stanice
  - intracerebralna inokulacija u sisajuće miševe.
- Identifikacija serotipa imunofluorescentnim testovima serotipno specifičnim monoklonskim antitijelima, metodom PCR ili neutralizacijskim testom PRNT (*plaque reduction neutralization test*)

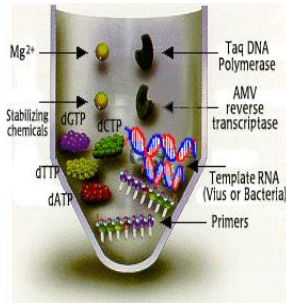


- Korisno za istraživanja bazične virusologije, epidemiologije i patogeneze
- Ne koristi se za rutinsku dijagnostiku

<http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/dengue/slideset/sect1/image/virus-isolation-cell-culture2.jpg>

## MOLEKULARNI TESTOVI

- Brži, pouzdanija dijagnoza
- Dokaz virusne RNK
  - NAAT (*nucleic acid amplification test*),
  - RT-PCR (*reverse transcriptase PCR*),
  - real time RT-PCR,
  - NASBA (*nucleic acid-sequence based amplification assay*)
- RT-PCR – novi "zlatni standard"
- Oprez – lažno pozitivni rezultat zbog kontaminacije

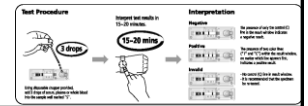
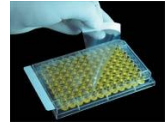


<http://animalintron.co.kr/Image/RT-pcr.gif>

## DETEKCIJA ANTIGENA U KRVI

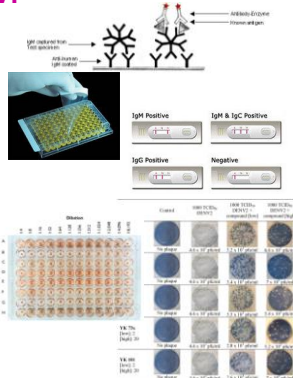
- Nestrukturni protein NS1 u krvi **do 9. dana** nakon početka bolesti

- Metode:
  - Capture ELISA → vezanje antigena za serotipno specifična monoklonska antitijela
  - Brzi imunokromatografski testovi (ICA) za dokaz NS1 antigena

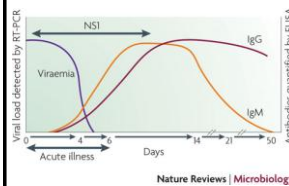


## SEROLOŠKI TESTOVI

- IgM, IgG, (IgA)
  - Protein virusne ovojnice E
- Metode:
  - MAC-ELISA (M antibody capture ELISA)
  - IgG ELISA
  - Imunokromatografski test (ICA)
  - Inhibicija hemaglutinacije
  - PRNT (*plaque reduction neutralization test*)

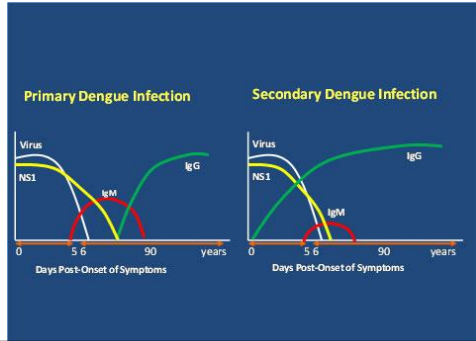


## Denga infekcija i dijagnostički markeri virus/antigen, IgM i IgG

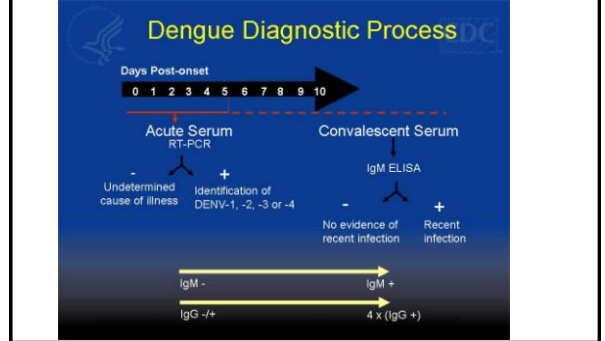


- IgM → pojavljuje se **3-5 d.** bolesti u **50%** hospitaliziranih bolesnika **6-10 d.** bolesti u **93%** bolesnika **10-20 d.** nakon početka u **99%** bolesnika
- IgM doseže **vrh oko 2 tjedna** nakon početka temperature
- postepeno pada na nedetektabilnu razinu tijekom sljedećih **2-3 mjeseca**
- IgG tipno-specifični → detektabilan u niskom titru **krajem prvog tjedna** bolesti i sporo raste

## IMUNOSNI ODGOVOR U PRIMARNOJ I SEKUNDARNOJ DENGA INFEKCIJI



## ALGORITAM SEROLOŠKE DIJAGNOSTIKE DENGA INFEKCIJE



## LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA DENGA INFEKCIJE

**Potvrda denga infekcije**    **Vjerojatna denga infekcija**

- Izolacija virusa
- Dokaz genoma
- Detekcija antigena
- Serokonverzija IgM ili IgG u parnim uzorcima
- IgM pozitivan
- Povišeni titar IgG
  - $\geq 1280$  u testu inhibicije hemaglutinacije

## PREDNOSTI I OGRANIČENJA RAZLIČITIH DENGA TESTOVA

TEST	PREDNOSTI	OGRANIČENJA
<b>Izolacija i identifikacija virusa</b>	Potvrda infekcije Specifična Identificira serotip	Akutni serum (0-5 dan od početka) Stručnost i odgovarajuća usluga - skupo Traje >1 tjedan Ne razlikuje prim. i sek. infekciju
<b>Detekcija RNK</b>	Potvrda infekcije Specifična i osjetljiva Identificira serotip i genotip Rezultat za 24-48-sati	Moguće lažno poz. zbog kontaminacije Akutni serum (0-5 dan od početka) Stručnost i skupa lab. oprema Ne razlikuje prim. i sek. infekciju
<b>Detekcija antigena</b>		
Klinički uzorak (krv za NS1 Ag)	Potvrda infekcije Jednostavno izvođenje Jeftinije od izolacije i PCR	Manje osjetljiv od izolacije ili RNK
Tkivo letalnih slučajeva (za imunohistokemiju)	Potvrda infekcije	Manje osjetljiv od izolacije ili RNK detekcija Ekspertiza patologa
<b>Serološki testovi</b>		
IgM ili IgG serokonverzija	Potvrda infekcije Najjeftiniji Jednostavan	IgM nizak u sekundarnoj infekciji Za potvrdu $\geq 2$ uzorka Može razlikovati prim. od sek. infekcije
IgM detekcija (jedan uzorak)	Identificira moguće denge Za praćenje i otkrivanje epidemije i monitoriranje uspjeha prevencije	IgM nizak u sekundarnoj infekciji

## OSOBITOSTI IDEALNOG DENGA TESTA

### RANA DIJAGNOZA

- Razlikovanje denge od drugih bolesti sa sličnom kliničkom slikom (malarija, leptospiroza, tifusna groznica, tifus, Chikungunya)
- Visoko osjetljiv u akutnoj fazi infekcije
- Omogućava brzi rezultat
- Ne skup
- Jednostavan za upotrebu
- Stabilan na temperaturi  $\geq 30^{\circ}\text{C}$  za terensko testiranje, ako je potrebno

### EPIDEMIOLOŠKO PRAĆENJE I ISTRAŽIVANJE EPIDEMIJE

- **Prvi prioritet**
- Što prije pozitivan nakon početka simptoma da omogući rano upozorenje
- Visoko specifičan
- Determinira DENV serotipove

### Drugi prioritet

- Razlikovanje primarne i sekundarne infekcije
- Veliki kapacitet testiranja
- Dugi rok upotrebe

## Serološka dijagnostika denge u Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

- Uzorak: serum, plazma, puna krv
- Metoda: imunokromatografski test (ICA)
- Određivanje:
  - Antigen NS1
  - IgM i IgG antitijela



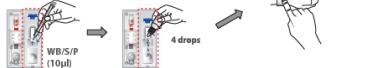
## Antigen NS1 IgM i IgG protutijela

### Test Procedure

Dengue NS1 Ag



Dengue IgG/IgM



### Interpretation



## Testiranje uzoraka seruma za anti-denga IgG EIA testom

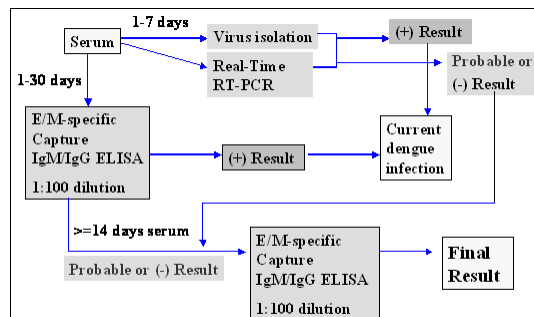


- 88 HIV-pozitivnih ispitanika – prof.dr. Josip Begovac
- 100 DDK iz dubrovačkog područja - dr. Vesna Lasica Polanda
- 97 uzoraka bolesnika bez simptoma denge - prim.dr. Ljiljana Betica Radić
- IgG ELISA:
  - inaktivirani purificirani DENV 1-4 virus
    - DENV-1 TH-Sman, DENV-2 TH-36, DENV-3 H87, DENV-3 H241
  - Focus Diagnostics

## Rezultati testiranja uzoraka seruma za anti-denga IgG EIA testom

- DDK 10/2010.:
  - 81 muškarac; 19 žena
  - Dubrovnik 46; Orebić 34; Gruda 8; Trpanj 3; Ston 2; po 1 Cavtat, Mokošica, Potonje, Mlini, Slano, Opuzen, Metković
- Dubrovački bolesnici 2009/2010:
  - 53 muškarca; 44 žene
- Svi ispitanici iz dubrovačkog područja kao i HIV-ispitanici → **negativna anti-denga IgG antitijela**

## ALGORITAM DIJAGNOSTIKE DENGA INFEKCIJE



## FLAVIVIRIDAE

PODSKUPINE ILI KOMPLEKSI ZNAČAJNI ZA ČOVJEKA	Rod: <i>Flavivirus</i> (68 virusa)
kompleks virusa <b>žute groznice</b>	JF ( <i>Yellow fever</i> )
kompleks <b>dengue</b>	4 virusa <b>DENV</b>
kompleks virusa <b>japanskog encefalitisa</b>	v. japanskog encefalitisa (JEV) St. Louis (SLEV) Murray Valley encefalitis (MVE) <b>West Nile</b> (WNV) Kunjin (KUNV)
kompleks virusa koje prenose <b>krpelji</b>	Far Eastern subtype (daleko-istočni) Siberian (sibirski) Louping ill Powasan <b>Europski krpeljni encefalitis</b>



