

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Branimir Krištofić

**Značaj određivanja aviditeta protutijela IgG u
dijagnostici infekcije uzrokovane
virusom Zapadnog Nila**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Odjelu za virologiju, Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo, pod vodstvom dr.sc. Tatjane Vilibić-Čavlek i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2014/2015.

Popis kratica :

VZN (engl. *West Nile virus*; WNV) - Virus Zapadnog Nila

ELISA (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*) - imunoenzimni test

AI (engl. *avidity index*) - indeks aviditeta

RAI (engl. *relative avidity index*) - relativni indeks aviditeta

prM - prekursorski membranski protein

CSL - cerebrospinalni likvor

RK-13 (engl. *rabbit kidney*) - stanična kultura zečjeg bubrega

IF - imunofluorescencija

RT-PCR (engl. *reverse transcription polymerase chain reaction*) - lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije

BSL-3 (engl. *biosafety level*) - biosigurnosna razina

PRNT (engl. *plaque reduction neutralization test*) - neutralizacijski test redukcije plakova

mikroNT - mikroneutralizacijski test

ECDC (engl. *European Centre for Diseases Control*) - Europski centar za kontrolu bolesti

AFP (engl. *acute flaccid paralysis*) - akutna mlohava kljenut

PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*) - fosfatni pufer

SADRŽAJ:

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. Virus Zapadnog nila: povijesni pregled.....	1
1.2. Etiologija i biološke osobitosti virusa Zapadnog Nila.....	1
1.3. Epidemiologija i epizootiologija infekcije virusom Zapadnog Nila.....	2
1.4. Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila.....	5
1.5. Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila.....	5
1.6. Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila.....	7
1.7. Liječenje i prevencija infekcije virusom Zapadnog Nila.....	8
2. HIPOTEZA.....	10
3. CILJ RADA.....	10
4. MATERIJALI I METODE.....	11
4.1. Materijali.....	11
4.2. Metode.....	11
5. REZULTATI.....	15
6. RASPRAVA.....	20
7. ZAKLJUČCI.....	22
8. ZAHVALE.....	23
9. LITERATURA.....	24
10. ŽIVOTOPIS.....	27

SAŽETAK

Značaj određivanja aviditeta protutijela IgG u dijagnostici infekcije uzrokovane virusom Zapadnog Nila

Branimir Krištofić

Dijagnoza infekcije virusom Zapadnog Nila (VZN) najčešće temelji na serološkim metodama. IgM protutijela uobičajeno se smatraju biljekom akutne infekcije, međutim dokazano je da IgM protutijela u nekih bolesnika s VZN infekcijom mogu perzistirati i do 500 dana. Određivanje IgG aviditeta koristi se za razlikovanje akutne/nedavne od prošle infekcije u serološkoj dijagnostici raznih virusa te bi se moglo koristiti i u dijagnostici VZN infekcije.

Kako bi utvrdili značaj aviditeta IgG protutijela u dijagnostici VZN infekcije, analizirali smo ukupno 42 IgM i/ili IgG pozitivna uzorka seruma. Uzorci su dobiveni od 27 bolesnika u kojih je potvrđena VZN neuroinvazivna bolest i 15 asimptomatskih osoba. VZN IgM/IgG protutijela te aviditet IgG protutijela određeni su pomoću komercijalnog imunoenzimnog testa. IgM protutijela detektirana su u 35 (83,3%) uzoraka seruma. Akutna/nedavna VZN infekcija dokazana je na temelju niske/granične vrijednosti indeksa aviditeta (AI) u 32 (91,4%) IgM pozitivna uzorka. U 3 IgM pozitivna uzorka (8,6%), dokazan je visok AI što je ukazivalo na perzistentna VZN IgM protutijela. Akutna infekcija je potvrđena pomoću aviditeta IgG protutijela u 27/27 (100%) bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom te u 5/15 (33,3%) asimptomatskih ispitanika. U svih su bila detektabilna IgM protutijela. U 3 (20,0%) IgM pozitivna kao i 7 (46,7%) IgM negativnih asimptomatskih ispitanika, detektirana su IgG protutijela visokog AI, što je upućivalo na raniju VZN infekciju. Dokazana je značajna korelacija između vrijednosti IgM protutijela i AI (više vrijednosti IgM protutijela bile su povezane sa značajno nižim AI; $p < 0,001$). Niske vrijednosti AI ukazivale su na VZN infekciju nastalu unutar 32 dana.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je određivanjem IgG aviditeta moguće razlikovati akutnu/nedavnu od ranije VZN infekcije u osoba sa simptomatskom i asimptomatskom VZN infekcijom. Aviditet IgG protutijela predstavlja značajan serološki biljeg za potvrdu primarne VZN infekcije, osobito u slučajevima atipičnog serološkog odgovora (graničnih ili perzistentnih IgM protutijela).

Ključne riječi: virus Zapadnog Nila, serologija, IgG aviditet

SUMMARY

Value of IgG avidity determination in diagnosis of West Nile virus infection

Branimir Krištofić

Diagnosis of WNV infection is usually based on serologic methods. Classically, IgM is considered as a marker of acute infection. However, IgM antibodies to WNV have been shown to persist for up to 500 days in some patients. Avidity testing for the differentiation between acute/recent and past antibody response has been used in the serologic diagnosis of several viruses and could be used in diagnosis of WNV infection.

To evaluate the value of IgG avidity determination in diagnosis of WNV infection we analyzed a total of 42 WNV IgM and/or IgG positive serum samples. Samples were obtained from 27 patients with confirmed WNV neuroinvasive disease and 15 asymptomatic cases. WNV IgM/IgG and IgG avidity testing were performed using a commercial enzyme-linked immunosorbant assay. IgM antibodies were detected in 35 (83.3%) samples. Acute/recent WNV infection was documented by low/borderline avidity index (AI) in 32 (91.4%) IgM positive samples. In 3 IgM positive samples (8.6%), high AI was detected indicating persisting IgM antibodies from previous infection. According to clinical symptoms, acute infection was confirmed using IgG avidity in 27/27 (100%) patients with neuroinvasive WNV infection and 5/15 (33.3%) asymptomatic subjects. All of them had detectable IgM antibodies. In 3 (20.0%) IgM positive as well as 7 (46.7%) IgM negative asymptomatic subjects, IgG antibodies of high AI were detected indicating past WNV infection. There was a significant correlation between value of IgM antibodies and AI (higher IgM value was associated with lower AI; $p < 0.001$). Low AI values were indicative of WNV infection in the period of less than 32 days.

Results of this study indicate that IgG avidity could differentiate acute/recent from past WNV infection in both symptomatic and asymptomatic persons. IgG avidity represents a valuable serologic marker for confirmation of primary WNV infection, especially in cases of atypical serologic response (borderline or persisting IgM antibodies).

Key words: West Nile virus, serology, IgG avidity

1. UVOD

1.1. Virus Zapadnog Nila: Povijesni pregled

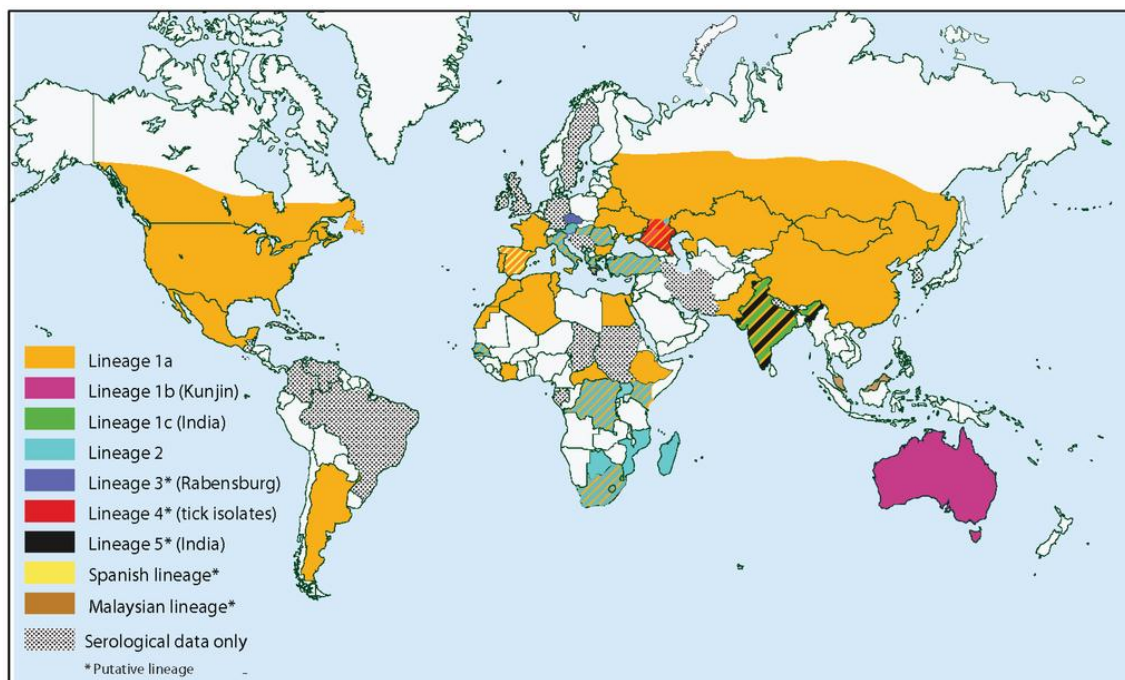
Virus Zapadnog Nila (VZN) prvi je puta izoliran 1937. godine iz krvi febrilne žene u sjevernoj Ugandi na području Zapadnog Nila, po čemu je dobio i ime (1). Od tada je zabilježeno nekoliko sporadičnih obolijevanja na Srednjem Istoku i u Africi, a glavni klinički simptomi VZN infekcije prvi puta su detaljno opisani tijekom epidemije u Izraelu 1951. godine (2). Od 1996. godine zabilježene su epizootije i epidemije u Rumunjskoj s čestom pojavom neuroinuzivnih oblika te kasnije u Maroku, Tunisu, Italiji, Izraelu, Francuskoj i Rusiji (3). Na zapadnoj polutki VZN je prvi puta dokazan 1999. godine u New Yorku. Soj je bio izrazito virulentan i pripadao liniji 1 (uz infekcije velikog broja ljudi uzrokovao je nagli masovni pomor ptica, prvenstveno vrana) (4).

1.2. Etiologija i biološke osobitosti virusa Zapadnog Nila

VZN je relativno malen (~50 nm), ovijen, kuglasti virus. Svrstan je u porodicu *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*, serokompleks japanskog encefalitisa, zbog svoje uske povezanosti s virusima japanskog encefalitisa, Usutu, Murray Valley, St. Louis encefalitisa i još nekim manje važnim flavivirusima te skupine. Genom virusa čini jednolančana, pozitivna (+) RNK koja kodira ukupno 10 proteina od kojih su tri strukturna: protein kapside (C), prekursorski membranski protein (prM) i glikoprotein (E), te sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (5).

Na temelju filogenetskih analiza do sada je opisano 7 genskih linija VZN od kojih su linije 1 i 2 najznačajnije, najučestalije i najproširenije te trenutno obje cirkuliraju u Europi (slika 1). Te se linije međusobno razlikuju u slijedu nukleotida 25-30%. Linija 1 uključuje sojeve VZN koji su izolirani na području Afrike, Srednjeg Istoka, Europe, Sjeverne Amerike, Australije (Kunjin virus) i Indije. Linija 2 većinom obuhvaća sojeve izolirane s područja Južne Afrike i Madagaskara, ali su nakon 2004. godine izdvojeni sojevi koji pripadaju toj liniji na području središnje i istočne Europe. Linija 1 je virulentnija od linije 2 i općenito neuroinuzivni sojevi pripadaju uglavnom toj liniji, no nedavno je opisan i vrlo virulentan soj pripadnik linije 2 VZN-a u južnoj Africi i Mađarskoj. Čini se da su za razlike u patogenosti između te dvije linije odgovorni nukleotidi koji kodiraju prM, E te NS regije genoma VZN-a.

Soj virusa koji je izoliran iz komarca *Culex pipiens* u Češkoj (Rabensburg virus) pripada liniji 3, a liniji 4 pripadaju virusi izolirani iz krpelja *Dermacentor marginatus* na području Kavkaza te sojevi izolirani iz komaraca i žaba na području Volgograda. Sojevi izolirani na području Indije i Španjolske pak pripadaju linijama 5 i 6 (soj Sarawak Kunjin). Afrički virus Koutango je genetski usko povezan s VZN-om i smatra se linijom 7 (6).



Slika 1. Zemljopisna rasprostranjenost virusa Zapadnog Nila

Izvor: Ciota AT, Kramer LD. Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus.

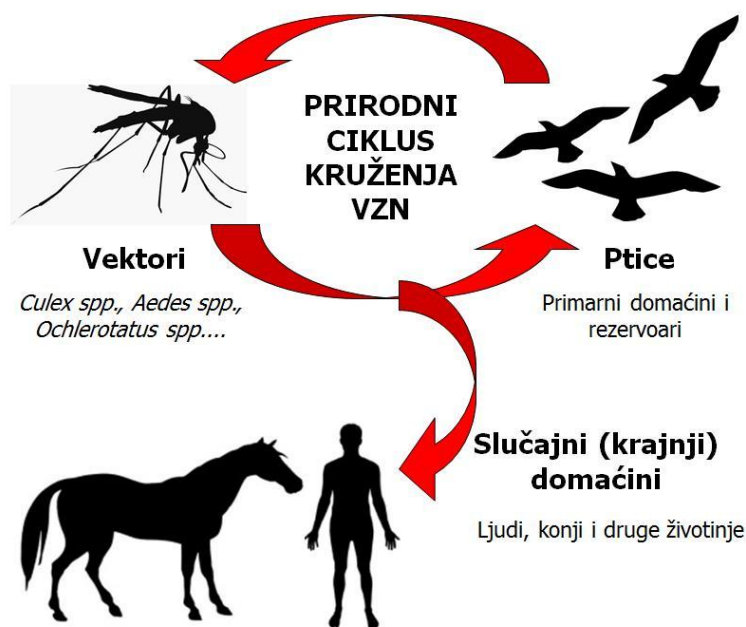
Viruses 2013; 5(12):3021-47.

Dostupno na adresi: www.depts.washington.edu/galelab/wnv.html

1.3. Epidemiologija i epizootologija infekcije virusom Zapadnog Nila

U prirodnom ciklusu ove tipične zoonoze koja se prenosi vektorima različite vrste ptica su prirodni rezervoari virusa. Najčešći vektori kojima se VZN prenosi su komarci i to iz rodova *Culex* te rodova *Aedes* i *Ochlerotatus*. Ljudi, konji te drugi sisavci, ako budu zaraženi virusom u tom prirodnom ciklusu dalje ne mogu biti izvor infekcije. Razlog tome je

prvenstveno taj što je u njih razina viremije vrlo niska i nedovoljna za daljnji prijenos, odnosno nastavak prirodnog ciklusa (7).



Slika 2. Prirodni ciklus kruženja virusa Zapadnog Nila

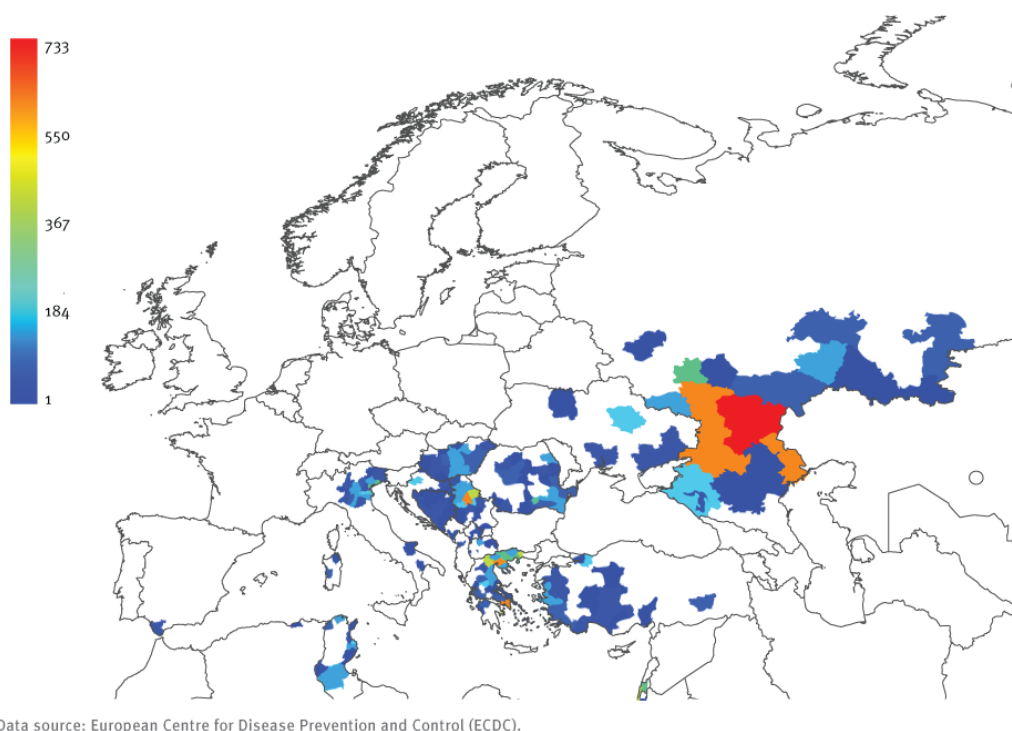
Izvor: Barbić Lj, i sur. Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj: veterinarski aspekt. Hrvatski veterinarski vjesnik 2013; 7-8:46-54.

Dostupno na: www.veterina.com.hr/?p=2822

Suprotno tome, u ptica je razina viremije vrlo visoka te one mogu predstavljati izvor infekcije kroz kraće ili dulje vrijeme, što može pogodovati i endemizaciji bolesti na nekom području. Drugi način endemizacije virusa u nekom području je prezimljavanje komaraca u istom, a vjeruje se da tome mogu pridonijeti i neke vrste ptica selica, budući da u njih viremija traje i dulje od tri mjeseca. U pojedinih vrsta ptica (vrane, svrake, šojke, galebovi i dr.) zabilježen je i feko-oralni način prijenosa neposrednim i posrednim kontaktom, a također se neke insektivorne ptice mogu zaraziti ingestijom komaraca (8). Potrebno je naglasiti i mogućnost umnožavanja i izlučivanja virusa iz žlijezda slinovnica komaraca nakon infekcije VZN-om, kao i transovarijalni prijenos virusa u komaraca na sljedeće generacije. Najvažniji i praktički jedini način prirodnog prijenosa uzročnika na ljude i druge sisavce jest ubodom

komaraca koji su se inficirali hraneći se krvlju VZN-om inficiranih ptica u vrijeme viremije tj. kada okolišni uvjeti pogoduju umnožavanju virusa u visokim titrovima, što je najčešće slučaj u kasno ljeto i ranu jesen. Osim opisanog načina prijenosa, zabilježen je i interhumani prijenos koji je moguć transfuzijom zaražene krvi, transplantacijom organa, dojenjem, a opisan je i jedan opisani slučaj transplacentarne infekcije. Opisane su, nadalje, i infekcije zdravstvenih djelatnika koji su se inficirali prilikom slučajnog uboda kontaminiranim iglama ili ozljedama nastalim prilikom razudbe ptica i zaraženog konja (7, 8).

Nakon 2008. godine, humane infekcije VZN-om kontinuirano se bilježe na području Europe (Italija, 2008-2010. godine, Mađarska 2008-2012. godine, Rumunjska 2010-2012. godine i Grčka 2010-2012. godine).



Slika 3. Humane infekcije uzrokovane virusom Zapadnog Nila na području Europe u razdoblju od 2010. do 2013. godine

Izvor: Rizzoli A, et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. *Euro Surveill.* 2015;20(20):pii=21135

Dostupno na adresi: www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V20N20/RIZZOLI-fig1.png

Na području Hrvatske, protutijela na VZN sporadično su dokazana u ljudi, konja, peradi i smeđeg medvjeda. Prvi humani klinički slučajevi neuroinvazivne VZN infekcije opisani su 2012. godine nakon čega se kontinuirano pojavljuju tijekom sljedećih sezona prijenosa. Do sada je neuroinvazivna VZN infekcija dokazana u ukupno 28 bolesnika s područja šest hrvatskih županija. Uz akutne humane infekcije zabilježene su i akutne asimptomatske infekcija konja u županijama gdje su dokazani humani slučajevi (7-10).

1.4. Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila

Nakon inokulacije ubodom komarca, VZN inficira keratinocite i Langerhansove stanice koje migriraju u regionalne limfne čvorove gdje se odvija primarno umnožavanje virusa. Nakon toga slijedi nova faza infekcije u kojoj virus putem limfnog sustava dopijeva u sistemsku cirkulaciju i uzrokuje kratkotrajnu viremiju s niskom razinom virusa u krvi, a ona prestaje pojavom specifičnih IgM protutijela. Putem krvi virus se širi u visceralne organe (bubreg, jetra i slezena) gdje dolazi do sekundarnog umnožavanja virusa, vjerojatno u epitelnim stanicama i makrofagima. Ovisno o stupnju viremije, virus može prijeći hematoencefalnu barijeru, prodrijeti u središnji živčani sustav i uzrokovati meningoencefalitis. Opisana su četiri mehanizma ulaska virusa u središnji živčani sustav: pasivnim transportom preko endotela ili epitelnih stanica koroidnog pleksusa, preko olfaktornih živaca, putem inficiranih stanica imunskog sustava ili izravnim retrogradnim aksonalnim transportom iz perifernih inficiranih neurona. VZN izravno inficira neurone u dubokim jezgrama sive tvari, moždanog debla i kralješničke moždine te uzrokuje njihovu degeneraciju i gubitak stanične strukture. Eksperimentalna istraživanja pokazuju da je virusom inducirana apoptotična smrt stanice mehanizam odgovoran za oštećenje neurona (11).

1.5. Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila

Pri infekciji VZN-om inkubacija iznosi 2-6 (14) dana. Većina infekcija (~80%) prolazi asimptomatski, dok se u oko 20% slučajeva očituje kao nespecifična febrilna bolest (VZN-groznica) koja je slična influenci. U manje od 1% slučajeva razvija se neuroinvazivna bolest koja se može očitovati u obliku meningitisa, encefalitisa ili sindroma poliomijselitisa (akutna

mlohava kljenut). Starija životna dob i imunosupresija navode se kao glavni rizični čimbenici za nastanak težih oblika bolesti (12).

Tablica 1. Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila (13)

	Učestalost kliničkih sindroma	Učestalost neuroinvazivnih oblika	Klinički simptomi	Smrtnost
VZN groznica	20%	-	vrućica, glavobolja, umor, slabost, bolovi u mišićima, mučnina, otok limfnih čvorova, osip	<1%
VZN meningitis	< 1%	35 - 40%	simptomi VZN groznice + meningitički simptomi (kočenje šije, fotofobija)	< 1%
VZN encefalitis	< 1%	55 - 60%	simptomi VZN groznice + encefalopatija (smetenost, letargija) i/ili žarišni neurološki ispadi (tremor, poremećaji koordinacije, ataksija)	20%
VZN poliomijelitis	< 1%	5 - 10%	nagli nastanak mlohavih, asimetričnih kljenuti, praćenih gubitkom refleksa; moguće zahvaćanje respiratornih mišića, klasični simptomi VZN infekcije ne moraju biti prisutni	10 - 50%

VZN-groznica je samoizlječiva bolest blaga tijeka i povoljna ishoda koja uglavnom prolazi za 2-6 dana, međutim u nekim slučajevima rekonvalescencija može biti prolongirana i praćena ekstremnom slabošću. VZN-meningitis se javlja u oko 40% slučajeva svih neuroinvazivnih oblika bolesti. Ishod VZN-meningitisa također je povoljan, a u trajanju oporavka i posljedicama pokazuje sličnosti s VZN-groznicom. Osobe starije od 55 godina te

imunokompromitirane osobe češće oboljevaju VZN-encefalitisa koji se povezuje s dosta visokim mortalitetom (~20%). Ova bolest također ostavlja trajne neurološke posljedice u obliku tremora i/ili ataksije u petine osoba koje prebole akutnu bolest. Posljednji i ujedno najteži oblik neuroinvazivne infekcije očituje se kao VZN-poliomijelitis, a javlja se kao posljedica infekcije donjega motornog neurona ili prednjih rogova kralješničke moždine. Očituje se akutnom mlohavom kljenuti, a kao najteža komplikacija javlja se paraliza ošita i međurebrenih mišića što dovodi do zatajenja respiratornog sustava i posljedične smrtnosti koja kod ovog oblika infekcije iznosi >50%. Mnogim je osobama koje tijekom oporavka nakon mehaničke ventilacije uspješno uspostave samostalnu respiraciju, godinama neophodna pomoćna terapija kisikom (13).

1.6. Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila

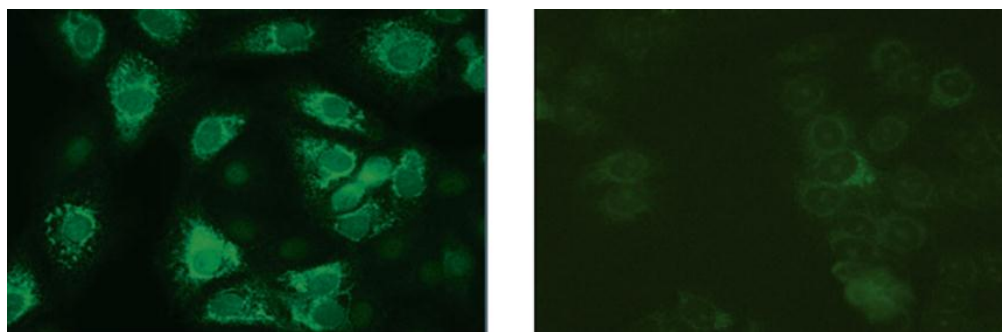
Dijagnostika VZN infekcije uključuje izravne (izolacija, molekularna dijagnostika) i neizravne metode (serološka dijagnostika).

VZN može se izolirati iz krvi, cerebrospinalnog likvora (CSL) i postmortalno dobivenih uzoraka tkiva. Za izolaciju su najpogodnije stanične kulture bubrega afričkog zelenog majmuna (Vero) i kuničjeg bubrega (RK-13) na kojima je vidljiv citopatski učinak (CPU). Nakon pojave CPU, metode imunofluorescencije (IF) i lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-PCR) koriste se za potvrdu prisustva VZN-a u kulturi stanica. Budući da su za izolaciju potrebni biosigurnosni uvjeti trećeg stupnja (BSL-3), ona se uglavnom provodi samo u referentnim laboratorijima (14).

Metoda izbora u molekularnoj dijagnostici VZN-a je RT-PCR. Postoje dvije glavne inačice ove metode: klasični RT-PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu koji je oko 1000 puta osjetljiviji od izolacije budući da detektira ≥ 50 kopija virusne mRNK/ml. Nemogućnost prepoznavanja novih sojeva VZN-a zbog mutacija na mjestima na koje se vežu početnice glavni je nedostatak ove metode (15).

Dijagnostika infekcije VZN-om većinom se provodi serološkim metodama i to detekcijom protutijela u serumu i CSL-u. IgM protutijela se pojavljuju u serumu oboljelih osoba od četvrtog do sedmog dana bolesti i u oko 36% oboljelih ona mogu perzistirati i do godinu dana. Nalaz IgM protutijela u CSL-u smatra se dijagnostički značajnim budući da ona

ne prolaze hematoencefalnu barijeru. Za detekciju IgM protutijela najčešće su u uporabi imunoenzimski testovi koji su bazirani na principu hvatanja IgM protutijela (engl. IgM „capture“ ELISA). Protutijela IgG se u oboljelih mogu detektirati oko osmog dana bolesti i perzistiraju dugo vremena nakon infekcije. VZN IgM i IgG protutijela mogu se dokazati i indirektnim imunofluorescentnim testom (IFA) (16, 17).



Slika 4. Indirektni imunofluorescentni test za detekciju protutijela na virus Zapadnog Nila (pozitivan i negativan nalaz)

Izvor: www.euroimmun.com

Pozitivan nalaz ELISA i IFA testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testovima zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima kao što su Usutu i dengue virus te osobito na području Hrvatske proširen virus krpeljnog encefalitisa (16, 17). Od potvrđenih testova primjenjuju se neutralizacijski test redukcije plakova (engl. *plaque-reduction neutralization test*; PRNT) te mikroneutralizacijski test (mikro-NT). Iako i kod ovih testova postoji mogućnost križnih reakcija s drugim flavivirusima, titar neutralizirajućih protutijela na VZN u potvrđenim je testovima četverostruko viši od heterolognog titra na druge flaviviruse (18). Važna metoda u serološkoj dijagnostici je i određivanje aviditeta protutijela IgG. Tijekom primoinfekcije uzrokovane nekim flavivirusima stvaraju se IgG protutijela koja su niskog aviditeta, odnosno slabog afiniteta za antigen. Kako infekcija napreduje dolazi do sazrijevanja imunskog odgovora i IgG protutijela poprimaju visoki aviditet koji ostaje trajno visok (19, 20).

1.7. Liječenje i prevencija infekcije virusom Zapadnog Nila

Za liječenje VZN infekcije ne postoji specifična terapija, već je ona simptomatska i uglavnom podrazumijeva upotrebu analgetika i antipiretika. Teži, osobito neuroinvazivni oblici bolesti zahtijevaju hospitalizaciju i adekvatno suportivno liječenje (antiemetičku, antiedematoznu terapiju te mehaničku ventilaciju).

Cjepiva protiv VZN-a za životinje su već dulje vrijeme u uporabi (od prvog inaktiviranog cjepiva za konje registriranog u SAD-u 2001. godine). U veterinarskoj medicini trenutno su u uporabi atenuirana, vektorska te DNK-cjepiva. Iako još nema odobrenog cjepiva za VZN u ljudi, nekoliko je kandidata za cjepivo završilo fazu I (kimerična cjepiva sastavljena od atenuiranog soja virusa žute groznice-17D ili virusa dengue-WN-DEN4 u koje su uneseni geni koji kodiraju prM i E proteine VZN-a), odnosno fazu II (DNK-cjepivo) kliničkih ispitivanja (21).

Nespecifične mjere prevencije su od iznimne važnosti u ljudi, budući da ne postoji mogućnost specifične prevencije cjepivom. Nespecifične mjere se prvenstveno odnose na kontrolu populacije komaraca dezinfekcijskim mjerama kako bi se smanjila mogućnost vektorskog prijenosa bolesti. Budući da je životni ciklus komaraca vezan uz vodu, trebalo bi iz okućnica ukloniti vodu sa svih mjesta gdje bi se ona mogla zadržati duže od tjedan dana (lonci, bačve, vaze za cvijeće, limenke i sl.) kako bi se spriječio razvoj ličinki u odrasle jedinke. Poseban naglasak također se daje mjerama osobne prevencije prilikom boravka na otvorenom koje uključuju nanošenje repelenata na kožu, nošenje majica ili košulja dugih rukava, dugih hlača i čarapa. Boravak na otvorenome trebalo bi osobito izbjegavati u zoru i sumrak, jer je u to doba većina komaraca najaktivnija (22).

2. HIPOTEZA

Aviditet protutijela IgG je pouzdan pokazatelj akutne/nedavne VZN infekcije.

3. CILJEVI RADA

Zbog duge perzistencije IgM protutijela u velikog broja bolesnika s VZN infekcijom, klasičnim serološkim metodama (određivanje IgM i IgG protutijela) nije sa sigurnošću moguće potvrditi akutnu primarnu infekciju.

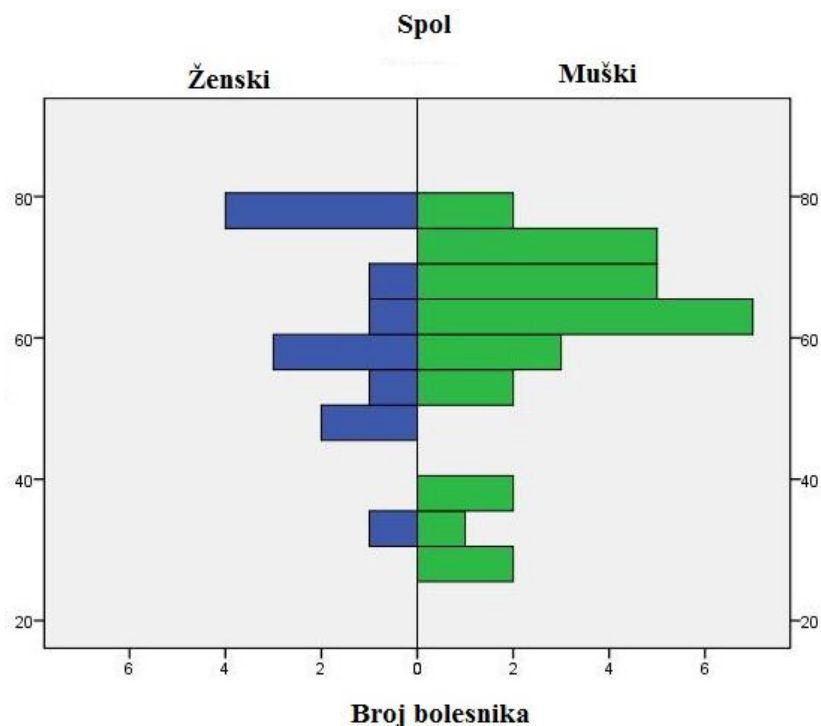
Cilj ovog rada je analizirati značaj određivanja aviditeta IgG protutijela kao dodatnog serološkog biljega u dijagnostici VZN infekcije u:

- bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom
- asimptomatskih osoba s dokazanim VZN protutijelima.

4. MATERIJALI I METODE

4.2. Materijali

Tijekom tri uzastopne sezone (srpanj 2012. godine - prosinac 2014. godine), u ukupno 42 uzorka seruma s dokazanim VZN IgM i/ili IgG protutijelima određen je aviditet IgG protutijela. Uzorci su dobiveni od 27 bolesnika s kliničkim simptomima neuroinvazivne VZN infekcije (meningitis, encefalitis, akutna mlohava kljenut) uzetim u razdoblju od 8 do 50 dana nakon početka bolesti te 15 asimptomatskih osoba testiranih tijekom istraživanja seroprevalencije VZN infekcije u Hrvatskoj (23) (slika 5).



Slika 5. Raspodjela ispitanika s VZN infekcijom prema spolu i dobi

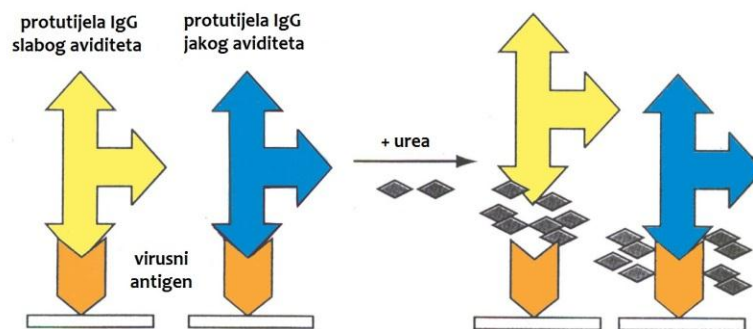
4.2. Metode

Specifična VZN IgM i IgG protutijela te aviditet IgG protutijela dokazani su pomoću komercijalnih dijagnostičkih ELISA testova (Euroimmun, Lübeck, Njemačka).

Protokol za određivanje IgG aviditeta

Sadržaj testa:

1. Mikrotitar pločica presvučena s VZN antigenom
2. Pozitivni kontrolni serum s IgG protutijelima visokog aviditeta (C1)
3. Pozitivni kontrolni serum s IgG protutijelima niskog aviditeta (C2)
4. Otopina konjugata (anti-humana IgG protutijela obilježena peroksidazom)
5. Otopina supstrata (tetrametilbenzidin)
6. Otopine uree
7. Fosfatni pufer (PBS)
8. Otopina za ispiranje
9. Otopina za zaustavljanje reakcije (stop otopina)



Slika 6. Princip testa IgG aviditeta

Izvođenje testa:

1. Ispitivani serum se razrijeđuje 1:101 (10 µl seruma + 1,0 ml pufera za razrijeđivanje)
2. Stavi se 100 µl kontrolnog seruma te ispitivanog seruma (razrijeđenog) istodobno u dva različita stripa mikrotitar pločice prema protokolu. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Protokol:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	C1	C1	P7	P7	P15	P15						
2	C2	C2	P8	P8	P16	P16						
3	P1	P1	P9	P9	P17	P17						
4	P2	P2	P10	P10	P18	P18						
5	P3	P3	P11	P11								
6	P4	P4	P12	P12								
7	P5	P5	P13	P13								
8	P6	P6	P14	P14								

3. Stavi se 200 µl otopine uree u sve udubine prvog stripa, te 200 µl PBS u udubine drugog stripa. Inkubira se 10 minuta na sobnoj temperaturi.
4. Ispere se 3 puta s 300 µl otopine za ispiranje.
5. Stavi se 100 µl konjugata u sve udubine. Inkubira se 30 minuta na sobnoj temperaturi.
6. Ispere se 3 puta s 300 µl otopine za ispiranje.
7. Stavi se 100 µl otopine kromogen supstrata u sve udubine. Inkubira se 15 minuta na sobnoj temperaturi zaštićeno od danjeg svjetla.
8. Stavi se 100 µl stop otopine u sve udubine.

Očitavanje apsorpcione vrijednosti vrši se spektrofotometrijski pri 450/620 nm unutar 30 minuta od dodavanja stop otopine.

Izračunavanje indeksa aviditeta i tumačenje rezultata

$$\text{RAI (relativni indeks aviditeta) \%} = \frac{\text{OD seruma obrađenog s ureom}}{\text{OD neobrađenog seruma}} \times 100$$

Vrijednosti RAI

Vrijednost RAI	Značenje	Tumačenje rezultata
< 40%	protutijela niskog aviditeta	akutna primarna infekcija
40% - 60%	granične vrijednosti	post-akutna infekcija
> 60%	protutijela visokog aviditeta	ranija infekcija

U svih su ispitanika s dokazanom VZN infekcijom potvrđena neutralizacijska protutijela u OIE Referentnom centru za virus Zapadnog Nila, Istituto "G. Caporale", Teramo, Italija prema kriterijima za dijagnostiku VZN infekcije Europskog centra za kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Control, ECDC*) (18).

5. REZULTATI

Tablica 1a. Rezultati seroloških pretraga u 27 bolesnika s VZN neuroinvazivnom infekcijom

	Klinička dijagnoza	VZN ELISA IgM (omjer) ^a	VZN ELISA IgG (RU/ml) ^b	VZN IgG AI ^c	VZN VNT ^d (titar)
1	Meningoencefalitis, AFP*	2,10	102	26%	20
2	Meningoencefalitis	1,70	132	26%	20
3	Meningoencefalitis	3,30	40	16%	10
4	Meningoencefalitis, AFP*	3,30	60	11%	20
5	Meningoencefalitis	4,10	125	16%	40
6	Meningoencefalitis	2,90	56	38%	20
7	Meningoencefalitis	3,52	132	37%	10
8	Meningoencefalitis	1,51	85	32%	10
9	Meningitis	2,77	62	23%	10
10	Meningitis	2,02	90	42%	20
11	Meningitis	2,57	36	20%	20
12	Meningitis	2,12	58	22%	20
13	Meningitis	1,89	90	28%	5
14	Meningoencefalitis	2,37	106	35%	10
15	Meningoencefalitis	3,19	17	16%	10
16	Meningitis	3,62	63	12%	5
17	Meningoencefalitis	3,03	122	37%	20
18	Meningitis	4,03	70	25%	20
19	Meningitis	3,67	75	16%	20
20	Meningitis	3,03	16	16%	5
21	Meningitis	2,55	105	33%	40
22	Meningitis	1,50	90	50%	20
23	Meningitis	4,14	72	34%	10
24	Meningitis	2,04	155	60%	10
25	Meningitis	1,72	80	35%	5
26	Meningoencefalitis	2,34	28	25%	10
27	Meningoencefalitis	2,33	145	57%	20

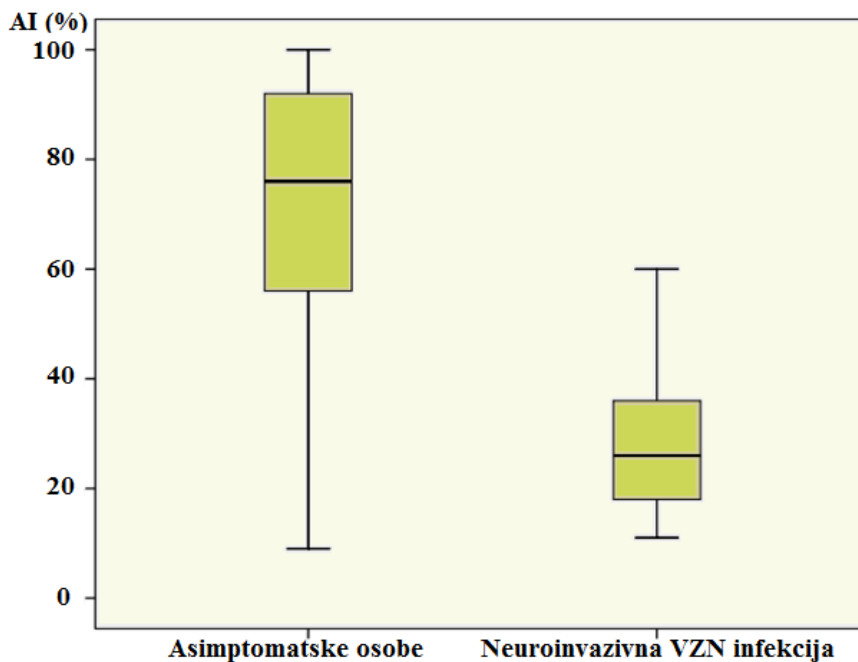
Tablica 1b. Rezultati seroloških pretraga u 15 asimptomatskih osoba s VZN infekcijom

	VZN ELISA IgM (omjer)	VZN ELISA IgG (RU/ml)	VZN IgG AI (%)	VZN VNT (titar)
1	2,1	90	19%	10
2	3,5	23	9%	10
3	1,4	>200	57%	10
4	2,0	200	38%	10
5	1,5	150	72%	20
6	0,3	106	92%	5
7	1,7	116	61%	10
8	0,4	>200	100%	5
9	0,3	132	76%	5
10	0,6	>200	85%	20
11	0,3	>200	96%	20
12	3,15	>200	55%	20
13	0,85	105	92%	10
14	0,23	>200	85%	40
15	0,25	179	82%	80

^a<8 negativan, 8-1.1 graničan, >1.1 pozitivan; ^b<16 negativan, 16-22 graničan, >22 pozitivan; ^c<40% nizak AI, 40-60% graničan AI, >60% visok AI; ^dVNT=virus neutralizacijski test

VZN IgM protutijela dokazana su u ukupno 34 (80,9%) osoba, dok je 1 osoba (2,4%) imala graničan IgM nalaz. Preostalih 7 ispitanika (16,7%) nije imalo detektabilna IgM protutijela.

Nizak AI imalo je ukupno 26 (61,9%) bolesnika, graničan AI 6 (14,3%) te visok AI 10 (23,8%) bolesnika. Prosječna vrijednost AI iznosila je 24,5% u bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom te 67,5% u asimptomatskih osoba (slika 7).



Slika 7. Prosječna vrijednost AI u bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom i asimptomatskih osoba

Od ukupno 35 ispitanika s pozitivnim/graničnim protutijelima IgM, nizak AI (akutna infekcija) je dokazan u njih 26 (74,2%), a graničan AI (postakutna infekcija) u 6 (17,2%). Tri ispitanika s detektabilnim IgM protutijelima (8,5%) imala su visok AI (ranija VZN infekcija).

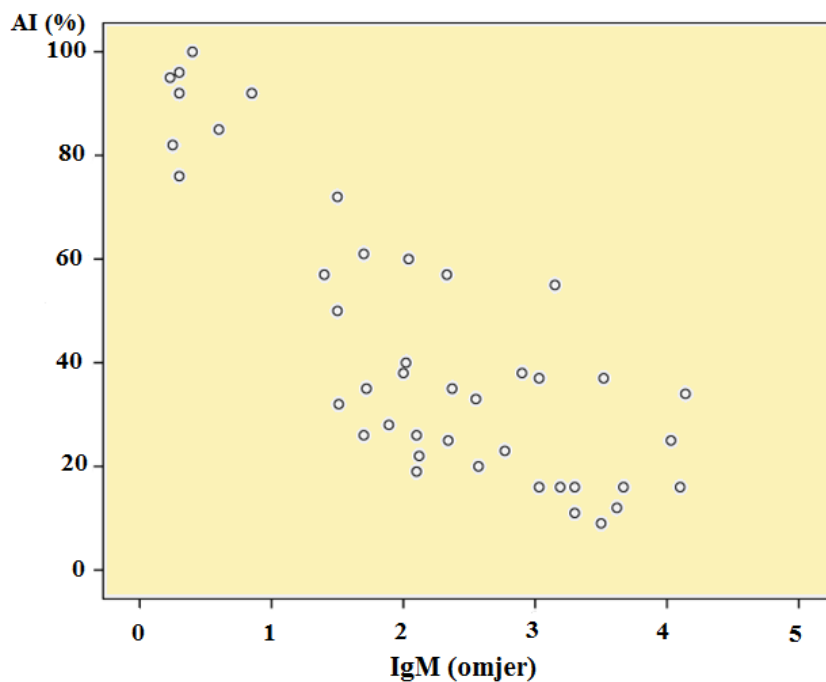
Svi bolesnici s neuroinvazivnom VZN infekcijom imali su detektabilna IgM protutijela. Pomoću IgG aviditeta u 23/27 (85,2%) bolesnika potvrđena akutna infekcija, a u 4 bolesnika (14,8%) postakutna VZN infekcija.

U skupini asimptomatskih osoba, 7/15 (46,6%) je imalo detektabilna IgM protutijela, 1 (6,7%) je imao graničan IgM nalaz dok u 7 (46,7%) IgM protutijela nisu dokazana. Pomoću AI akutna je VZN infekcija dokazana u 3/8 (37,5%) ispitanika s pozitivnim/graničnim IgM protutijelima, postakutna infekcija u 2 (25,0%) te ranija infekcija u 3 (37,5%) osoba. Svih 7 ispitanika s nedetektabilnim IgM protutijelima imalo je visok aviditet IgG protutijela (tablica 3).

Tablica 2. Aviditet IgG protutijela u odnosu na nalaz IgM protutijela

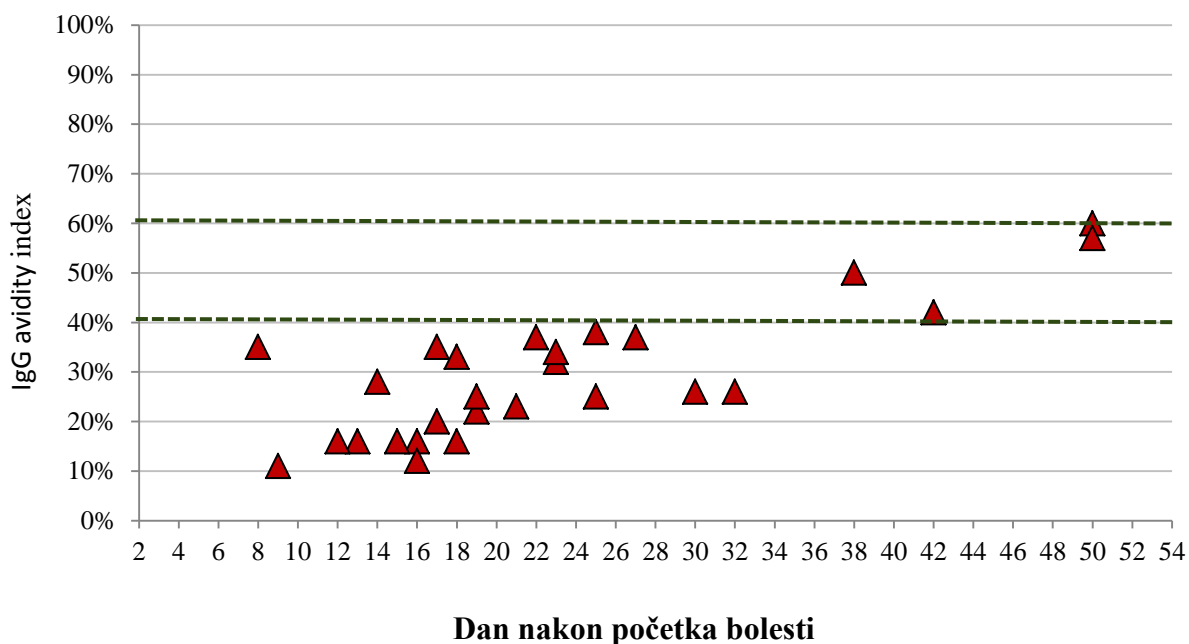
	N (%)	Nizak AI N (%)	Graničan AI N (%)	Visok AI N (%)
Svi ispitanici (N=42)				
IgM pozitivan/graničan	35 (100)	26 (74,2)	6 (17,2)	3 (8,6)
IgM negativan	7 (100)	0	0	7 (100)
VZN neuroinvazivna bolest (N=27)				
IgM pozitivan	27 (100)	23 (85,2)	4 (14,8)	0
IgM negativan	0	-	-	-
Asimptomatske osobe (N=15)				
IgM pozitivan/graničan	8 (100)	3 (37,5)	2 (25,0)	3 (37,5)
IgM negativan	7 (100)	0	0	7 (100)

Uočena je korelacija između vrijednosti IgM protutijela i IgG aviditeta (slika 8). U uzorcima seruma s visokim vrijednostima IgM protutijela dokazane su statistički značajno niže vrijednosti AI (Spearmanov koeficijent korelacije=0,776; $p < 0,001$).



Slika 8. Vrijednosti AI u odnosu na vrijednosti IgM protutijela

Na slici 9 prikazane su vrijednosti IgG aviditeta u bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom s obzirom na dan od početka bolesti. Svi bolesnici testirani unutar 32 dana od početka bolesti imali su niske vrijednosti 40%. Dva bolesnika testirana 38. i 42. dan imala su vrijednosti AI od 50% odnosno 42%, dok su dva bolesnika testirana 50. dan imala vrijednosti AI 58% odnosno 60%.



Slika 9. Vrijednosti indeksa aviditeta u bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom s obzirom na dan bolesti

6. RASPRAVA

Zbog kratkotrajne i niske viremije u ljudi, dijagnostika VZN infekcije većinom se provodi serološkim metodama. Nalaz IgM protutijela uobičajeno se smatra pokazateljem akutne odnosno nedavne primarne infekcije (16). Međutim, postoji velika varijabilnost u trajanju IgM protutijela koja u nekih bolesnika mogu biti detektabilna dulje od godinu dana (17). Nedavno objavljeno istraživanje iz Hustona dokazalo je perzistenciju IgM protutijela (pozitivan ili graničan nalaz) u 42%, 34% i 23% osoba u trajanju od 1, 6 i 8 godina nakon primarne VZN infekcije (24). Stoga nalaz protutijela IgM u serumu ne mora nužno biti znak akutne/nedavne VZN infekcije (17). U takvim slučajevima rutinskim serološkim metodama nije moguće razlikovati IgM protutijela nastala tijekom primarne VZN infekcije od rezidualnih IgM protutijela. Isto tako nije moguće razlikovati specifična VZN protutijela od heterotipnih, križno reaktivnih protutijela te protutijela nastalih kao rezultat poliklonske stimulacije. Sazrijevanjem imunološkog odgovora tijekom primarne infekcije dolazi do promjena u aviditetu IgG protutijela te se njegovo određivanje pokazalo korisnim u dijagnostici nekih flavivirusnih infekcija kao npr. krpeljnog encefalitisa (25) te dengue (26).

U ovom je istraživanju ukupno 83,3% ispitanika imalo pozitivan/graničan nalaz IgM protutijela. Pomoću testa IgG aviditeta, akutna/postakutna VZN infekcija potvrđena je u 91,4% IgM pozitivnih osoba dok je u preostalih 8,6% ispitanika visok aviditet IgG protutijela ukazivao je na rezidualna IgM protutijela. Sve osobe s klinički manifestnom VZN infekcijom imale su niske odnosno granične vrijednosti AI. No pomoću određivanja IgG aviditeta, akutna odnosno postakutna VZN infekcija potvrđena je i u 62,5% IgM seropozitivnih asimptomatskih osoba, dok je u njih 37,5% visok IgG aviditet ukazivao na raniju serokonverziju.

Neki su radovi utvrdili povezanost vrijednosti IgM protutijela i IgG aviditeta (27). Slične je rezultate pokazalo i ovo istraživanje tj. dokazana je korelacija između vrijednosti IgM protutijela i AI. Više vrijednosti IgM protutijela bile su povezane sa statistički značajno nižim vrijednostima AI, dok su kod nižih vrijednosti IgM protutijela vrijednosti AI bile značajno više ($p < 0,001$). To je posebno bilo vidljivo u skupini asimptomatskih osoba gdje su svi ispitanici s visokim vrijednostima AI imali omjer IgM protutijela < 2 .

Sazrijevanje imunološkog odgovora tijekom primarne infekcije praćeno je kod raznih virusnih infekcija. Većina je istraživanja pokazala porast IgG aviditeta u imunokompetentnih osoba s niskih na visoke vrijednosti tijekom 4 do 6 mjeseci nakon primarne infekcije (28, 29). Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su svi bolesnici s neuroinvazivnom VZN infekcijom testirani unutar mjesec dana od početka bolesti imali vrijednosti IgG aviditeta <40%. Bolesnici testirani nakon 32 dana imali su vrijednosti 42%-50%, a oko 50 dana nakon početka bolesti, vrijednosti su već vrlo blizu visokih (58% odnosno 60%). Sličnu je dinamiku sazrijevanja IgG protutijela pokazalo istraživanje kanadskih autora koji su u razdoblju od 10 do 43 dana nakon početka bolesti dokazali nizak aviditet u 97% bolesnika (19). Nasuprot tome, američki su autori dokazali ranije sazrijevanje aviditeta. Nizak aviditet nađen je u uzorcima seruma testiranim u razdoblju do 20 dana, dok su nakon približno 40 dana u većine bolesnika vrijednosti već porasle na visoke vrijednosti tj. >60% (20).

U zaključku, rezultati ovog istraživanja pokazali su da određivanje aviditeta IgG protutijela pouzdan biljeg pomoću kojeg je moguće razlučiti akutnu/nedavnu primarnu VZN infekciju u bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom kao i asimptomatskih osoba s detektabilnim IgM protutijelima. Akutna odnosno postakutna infekcija potvrđena je na temelju AI u ukupno 92,4% ispitanika (100% bolesnika te 62,5% asimptomatskih osoba). Nizak IgG aviditet, u kombinaciji s visokim vrijednostima IgM protutijela ukazuje na VZN infekciju nastalu unutar mjesec dana.

Razlikovanje akutne infekcije od perzistentnih IgM protutijela kod bolesnika s kliničkim simptomima neuroinvazivne bolesti osobito je važno kliničarima budući da i neki drugi virusi čija se sezonska pojavnost preklapa sa sezonstvom VZN-a (npr. enterovirusi) mogu uzrokovati sličnu kliničku sliku kao i VZN. Također je diferencijalno dijagnostički važno isključiti neke bakterijske uzročnike koji se liječe antibiotskom terapijom kao što je npr. *Listeria monocytogenes*. Listerioza se također može očitovati meningitisom, posebno u imunokompromitiranih osoba koje predstavljaju rizičnu skupinu i za VZN infekciju.

Nadalje, dokaz akutnih asimptomatskih infekcija je vrijedan podatak za praćenje epidemiološke situacije odnosno pokazatelj proširenosti kao i cirkulacije virusa u pojedinim sezonama prijenosa što je osobito važno pri planiranju protuepidemijskih dezinfekcijskih mjera.

Posebno treba naglasiti važnost određivanja IgG aviditeta u slučajevima nejasnih nalaza rutinskih seroloških pretraga kao što je graničan nalaz IgM protutijela. Zbog svega navedenog, određivanje IgG aviditeta trebalo bi uključiti u rutinski dijagnostički algoritam za VZN infekciju.

7. ZAKLJUČCI

1. VZN IgM protutijela dokazana su u ukupno 35 (83,3%) ispitanika; 27/27 (100%) bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom i 8/15 (53,3%) asimptomatskih osoba
2. Pomoću IgG aviditeta, akutna/nedavna primarna VZN infekcija potvrđena je u ukupno 32/35 (92,4%) ispitanika s dokazanim pozitivnim/graničnim IgM protutijelima: 27/27 (100%) bolesnika s neuroinvazivnom VZN infekcijom i 5/8 (62,5%) asimptomatskih osoba
3. Dokazana je statistički značajna korelacija između vrijednosti IgM protutijela i IgG aviditeta (više vrijednosti IgM protutijela bile su povezane sa značajno nižim vrijednostima AI; $p < 0,001$)
4. Pozitivan nalaz IgM protutijela uz nizak IgG aviditet ukazuje na VZN infekciju nastalu unutar mjesec dana
5. Zbog moguće duge perzistencije IgM protutijela tijekom VZN infekcije, aviditet IgG protutijela pouzdan je pokazatelj akutne/postakutne primarne VZN infekcije.

8. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr.sc. Tatjani Vilibić-Čavlek na mentorstvu te stručnim savjetima tijekom izrade ovog rada kao i izv.prof.dr.sc. Branku Kolariću na pomoći pri statističkoj obradi podataka.

9. LITERATURA

1. Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JG (1940) A neurotropic virus isolated from a blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med* 20:471-492.
2. Bernkopf H, Levine S, Nerson R (1953) Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis* 7:128-132.
3. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, Lelli R (2010) Epidemiology of West Nile in Europe and in the Mediterranean basin. *Open Virol J* 4:29-37.
4. Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M (2001) The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 344:1807-1814.
5. Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM (2007) *Flaviviridae: The viruses and their replication*. U: Knipe DM, Howley PM (Ur.) *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, str. 1101-51.
6. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT (2011) Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol* 85:2964-2974.
7. Barbić L, Listeš E, Katić S, Stevanović V, Madić J, Starešina V, Labrović A, Di Gennaro A, Savini G (2012) Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet Microbiol* 159:504-508.
8. Savić V (2012) Virus Zapadnog Nila. *Veterinarska stanica* 43:365-370.
9. Pem-Novosel I, Vilibic-Cavlek T, Gjenero-Margan I, Pandak N, Peric Lj, Barbic Lj, Listes E, Cvitkovic A, Stevanovic V, Savini G (2014) First outbreak of West Nile virus neuroinvasive disease in humans, Croatia, 2012. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 14:82-84.
10. Vilibic-Cavlek T, Kaic B, Barbic L, Pem-Novosel I, Slavic-Vrzic V, Lesnikar V, Kurecic-Filipovic S, Babic-Erceg A, Listes E, Stevanovic V, Gjenero-Margan I, Savini G (2014) First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection* 42:689-695.

11. Lim SM, Koraka P, Osterhaus ADME, Martina BEE (2011) West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses* 3:811-828.
12. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL (2005) Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 11:1174-1179.
13. Sejvar JJ (2007) The long-term outcomes of human West Nile virus infections. *Clin Infect Dis* 44:1617-1624.
14. Rossi SL, Ross TM, Evans JD (2010) West Nile virus. *Clin Lab Med* 30:47-65.
15. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G (2007) Detection of West Nile virus lineages and 2 by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 146:355-358.
16. Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C (2000) Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 38:2232-2329.
17. Roehring JT, Nash D, Maldin B, Labowitz A, Martin DA, Lanciotti RS, Campbell GL. (2003) Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 9:376-379.
17. Golubić D, Dobler G (2012) Flavivirusi u sjeverozapadnog Hrvatskoj. *Infektol glasnik* 32:153-157.
18. Di Gennaro A, Lorusso A, Casaccia C, Conte A, Monaco F, Savini G (2014) Serum neutralization assay can efficiently replace plaque reduction neutralization test for detection and quantitation of West Nile virus antibodies in human and animal serum samples. *Clin Vaccine Immunol* 21:1460-1462.
19. Levett PN, Sonnenberg K, Sidaway F, Shead S, Niedrig M, Steinhagen K, Horsman GB, Drebot MA (2005) Use of immunoglobulin G avidity assays for differentiation of primary from previous infections with West Nile virus. *J Clin Microbiol* 43:5873-5875.

20. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP (2006) Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 13:33-36.
21. Dauphin G, Zientara S (2007) West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 25:5563-5576.
22. Vilibić-Čavlek T, Barbić L, Ljubin-Sternak S, Pem-Novosel I, Stevanović V, Gjenero-Margan I, Mlinarić-Galinović G (2013) Infekcija virusom Zapadnog Nila: re-emergentna bolest u Hrvatskoj. *Liječ Vjesn* 135:156-161.
23. Vilibić-Čavlek T, Pem-Novosel I, Barbić Lj, Savić V, Santini M, Kurečić-Filipović S, Babić-Erceg A, Stevanović V, Pandak N, Klobučar A, Kaić B, Gjenero-Margan I, Mlinarić-Galinović G. Nove arbovirusne infekcije u Hrvatskoj. 3. Hrvatski epidemiološki kongres, Šibenik, 2015. str. 112 (sažetak)
24. Murray KO, Garcia MN, Yan C, Gorchakov R (2013) Persistence of detectable immunoglobulin M antibodies up to 8 years after infection with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg* 89:996-1000.
25. Gassmann C, Bauer G (1997) Avidity determination of IgG directed against tick-borne encephalitis virus improves detection of current infections. *J Med Virol* 51:242-251.
26. Prince HE, Yeh C, Lapé-Nixon M (2011) Utility of IgM/IgG ratio and IgG avidity for distinguishing primary and secondary dengue virus infections using sera collected more than 30 days after disease onset. *Clin Vaccine Immunol* 18:1951-1956.
27. Leite M, Siciliano S, Rocha LSA, Justa MTR, Cesar KR, Granato CFH (2008) Avidity to *Toxoplasma gondii*: correlation between specific IgM levels and percentage IgG-antibody. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 50:237-242.
28. Vilibić-Čavlek T, Ljubin-Sternak S, Vojnović G, Sviben M, Mlinarić-Galinović G (2012) The role of IgG avidity in diagnosis of cytomegalovirus infection in newborns and infants. *Coll Antropol* 36:297-300.
29. Hedman K, Lappalainen M, Soderlund M, Hedman L (1993) Avidity of IgG in serodiagnosis of infectious diseases. *Rev Med Microbiol* 4:123-129.

10. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Branimir Krištofić

Godina rođenja: 1990.

Adresa: Ivana Meštrovića 14, 40000 Čakovec

Telefon: 040-365-050

Mobilni telefon: 091/7979439

E-mail: branimirkristofic@gmail.com

Školovanje:

Srednja škola: Prva gimnazija Varaždin - opći smjer, Varaždin, 2009.

Fakultet: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2015.

Strani jezici:

Engleski jezik

Njemački jezik

Aktivnosti:

Članstvo u zboru : „Zagrebački liječnici pjevači“ od 2012.

Objava 3 stručna rada u časopisu „Alcoholism“.