

Lijekovi i metode

Drugs and procedures

VIROLOŠKA DIJAGNOSTIKA REEMERGENTNIH INFEKCIJA: VIRUS DENGUE

VIROLOGY DIAGNOSIS OF RE-EMERGENT INFECTIONS: DENGUE VIRUS

TATJANA VILIBIĆ-ČAVLEK, SUNČANICA LJUBIN-STERNAK, ANDREA BABIĆ-ERCEG,
MARIO SVIBEN, GORDANA MLINARIĆ-GALINOVIĆ*

Deskriptori: Dengue – dijagnoza, virologija, imunologija; Dengue virus – izolacija, genetika, imunologija; Antitijela, virusna – u krvi nestrukturane virusne bjelančevine – u krvi; Virusna RNK – analiza; Virologija – metode

Sažetak. Dengue je akutna virusna bolest koju na čovjeka prenose komarci roda *Aedes* (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*). Uzročnik je virus porodice *Flaviviridae*, roda *Flavivirus*. Postoje četiri različita serotipa virusa dengue (1-4) koji se mogu održavati u endemskim područjima svijeta. Bolest se većinom pojavljuje u tropskim i subtropskim krajevima između 35° sjeverne i 35° južne geografske širine. Infekcija može biti asimptomatska ili se očitovati kao nespecifična febrilna bolest, dengue groznica, dengue hemoragijska groznica te dengue šok sindrom. Prisutnost komarca *Ae. albopictus* dokazana je i u Hrvatskoj. Prvi nalaz ovog komarca zabilježen je na području Zagreba u listopadu 2004. godine, a u jesen 2005. godine i u brojnim mjestima duž jadranske obale. Tijekom 2007. godine u nas su dokazana dva importirana slučaja dengue groznice, nakon čega su importirani slučajevi kontinuirano bilježeni. U kolovozu 2010. godine zabilježen je prvi slučaj autohtone dengue groznice u Hrvatskoj, na poluotoku Pelješcu. Iako Hrvatska nije endemsko područje za dengue, prisutnost odgovarajućeg vektora, kao i moguća opasnost od importiranih slučajeva dengue zahtijevaju suvremenu i pravodobnu dijagnostiku ove bolesti. Dijagnostika virusa dengue najčešće se provodi detekcijom virusne RNK, detekcijom antigena te serološkom dijagnostikom (dokaz specifičnih protutijela).

Descriptors: Dengue – diagnosis, virology, immunology; Dengue virus – isolation and purification, genetics, immunology; Antibodies, viral – blood; Viral nonstructural proteins – blood; RNA, viral – analysis; Virology – methods

Summary. Dengue is acute viral disease transmitted to humans by *Aedes* mosquitoes (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*). Dengue virus belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*. There are four dengue virus serotypes (1-4) which are maintained endemically. The disease is endemic in tropical and subtropical areas between latitudes 35° N and 35° S. Infections may be asymptomatic or may produce a wide spectrum of diseases: non-specific febrile illness, dengue fever, dengue haemorrhagic fever or dengue shock syndrome. For the first time in Croatia, *Ae. albopictus* was registered in Zagreb in October 2004. In autumn 2005, additional records of *Ae. albopictus* presence were made in many places along the Adriatic coast. During 2007, two cases of imported dengue fever were reported in Croatia, after which similar imported cases appeared continually. In August 2010, the first autochthonous case of dengue fever was recorded on the peninsula Pelješac. Though Croatia is not endemic for dengue, the existence of a corresponding vector and a latent threat by imported dengue cases demand state-of-the-art and timely diagnostics. The most commonly used methods in laboratory diagnosis of dengue infections involve detection of viral RNA, antigen detection and serologic methods (detection of antibodies).

Liječ Vjesn 2012;134:164–167

Dengue je najrasprostranjenija virusna bolest koju prenose člankonošci te je važan uzrok morbiditeta i mortaliteta diljem svijeta.^{1,2} Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije godišnje se ovim virusom inficira 60 milijuna ljudi, a dvije i pol milijarde ljudi žive u endemskim krajevima.³

Virus dengue je malen, ovijen RNK-virus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*. Genom virusa sadržava tri strukturna proteina: protein kapside (C), glikoprotein ovojnice (E) i membranski protein (prM) te sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. Na oba kraja genoma nalaze se nekodirajuće regije (5' i 3'NCR). Postoje četiri različita serotipa virusa dengue (1-4) koji se mogu održavati u endemskim područjima svijeta.⁴ Bolest se većinom pojavljuje u tropskim i subtropskim područjima između 35° sjeverne i 35° južne geografske širine.⁵

Virus se na čovjeka prenosi ubodom ženke komarca roda *Aedes*. Glavni je vektor vrsta *Ae. aegypti*, no virus mogu prenositi i druge vrste (*Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*).⁶ Ženka komarca inficira se sišući krv na zaraženom čovjeku u vrijeme viremije. Virus se umnožava u crijevu i drugim organima komarca, inficira žlijezde slinovnice te se pri uzimanju sljedećeg obroka krvi prenosi na drugog čovjeka.⁵

* Odjel za virologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (dr. sc. Tatjana Vilibić-Čavlek, dr. med.; doc. dr. sc. Sunčanica Ljubin-Sternak, dr. med.; prof. dr. sc. Gordana Mlinarić-Galinović, dr. med.), Odjel za molekularnu dijagnostiku, Hrvatski zavod za javno zdravstvo (dr. sc. Andrea Babić-Erceg, dr. med.), Odjel za parazitologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (dr. sc. Mario Sviben, dr. med.)

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. T. Vilibić-Čavlek, Odjel za virologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Rockefellerova 12, 10000 Zagreb, e-mail: tatjana.vilibic-cavlek@hzjz.hr

Primljeno 19. veljače 2011., prihvaćeno 16. travnja 2012.

Tablica 1. Metode koje se koriste u dijagnostici virusa dengue¹⁹
Table 1. Methods used in diagnosis of dengue virus¹⁹

Metoda / Method	Uzorak / Specimen	Vrijeme uzimanja uzorka (od početka simptoma) / Time of collection (after onset of symptoms)	Očekivano trajanje testa / Time to results
Izolacija virusa / Virus isolation	Krv, serum, tkivo / Blood, serum, tissue	1-5 dana / 1-5 days	1-2 tjedna / 1-2 weeks
Detekcija virusne RNA / Viral RNA detection	Krv, serum, plazma, tkivo / Blood, serum, plasma, tissue	1-5 dana / 1-5 days	1-2 dana / 1-2 days
Detekcija antigena / Antigen detection	Serum / Serum	1-6 dana / 1-6 days	1 dan / 1 day
IgM – ELISA, IF / IgM – ELISA, IF	Serum / Serum	Nakon 5 dana / After 5 days	1 dan / 1 day
IgG (parni serumi) – ELISA, IH, PRNT* / IgG (paired sera) – ELISA, IH, PRNT*	Serum	Serum akutne faze (1-5 dana); Serum rekonvalescentne faze (nakon 7-14 dana) / Acute serum (1-5 days); Convalescent serum (after 7-14 days)	> 7 dana / > 7 days

*ELISA = imunoenzimni test/ enzyme-linked immunosorbent assay, IF = neizravna imunofluorescencija/indirect immunofluorescence, IH = inhibicija hemaglutinacije/ inhibition hemagglutination, PRNT = neutralizacijski test redukcije plakova/ plaque reduction neutralization assay

Komarci se hrane većinom danju, na otvorenom prostoru. Ženka najčešće polaže jajašca u otvorenim spremištima za vodu.⁷

Infekcija virusom dengue može biti asimptomatska ili se očitovati različitim kliničkim oblicima: kao nespecifična febrilna bolest slična influenci, dengue groznica, dengue hemoragijska groznica te dengue šok sindrom.⁸

U posljednja se tri desetljeća izvorno tropska i suprotropska vrsta, komarac *Ae. albopictus* proširio iz Azije u Afriku, Ameriku i Europu.⁹ Prisutan je u susjednoj Italiji,¹⁰ Albaniji¹¹ i Crnoj Gori te je stoga širenje na područje Hrvatske bilo očekivano.¹² Prilagodba vrste umjetnim leglima te otpornost jajašaca na hladnoću i isušivanje omogućili su prenošenje i prilagođavanje vrste u novim područjima.⁷ Među umjetnim staništima posebno se ističu automobilske gume kao najpogodnije mjesto za polaganje jajašca. Tijekom stajanja na otvorenome u gumama se nakuplja kišnica i organske tvari (najčešće otpalo lišće), što osigurava povoljno mjesto za razvoj komaraca.¹²

Prvi nalaz komarca *Ae. albopictus* u Hrvatskoj zabilježen je u Zagrebu, u listopadu 2004. godine, a krajem ljeta i u jesen 2005. godine pronađen je na cijelom području priobalja, od Istre do Dubrovnika.^{12,13} Ličinke i odrasli komarci mogu se pronaći od travnja ili svibnja do studenoga.¹² Tijekom ljeta 2007. godine u nas su dokazana dva importirana slučaja dengue groznice, nakon čega su importirani slučajevi kontinuirano bilježeni.^{14,15} Svi osim jednoga su hrvatski državljani koji su boravili u endemskim područjima (Jugoistočna Azija, Južna Amerika).¹⁶ U kolovozu 2010. godine dokazan je prvi slučaj autohtone dengue groznice u južnoj Hrvatskoj, na poluotoku Pelješcu.^{17,18} Naknadnim seroepidemiološkim istraživanjem dokazana je nedavna infekcija virusom dengue u 15 stanovnika tog područja.¹⁸ Iako Hrvatska nije endemsko područje za dengue, prisutnost odgovarajućeg vektora, kao i moguća opasnost od importiranih slučajeva dengue zahtijevaju suvremenu i pravodobnu dijagnostiku ove bolesti.

Dijagnostika virusa dengue provodi se izolacijom virusa, detekcijom virusne RNK, detekcijom antigena te serološkim metodama (tablica 1).¹⁹⁻²¹

Izolacija virusa

Virus se može izolirati za vrijeme viremije (obično do petog dana od početka bolesti) iz seruma, plazme te mo-

nonuklearnih stanica periferne krvi. U slučaju odgođenog transporta uzorci se do 24 sata mogu pohraniti na 4-8 °C, a na duže vrijeme potrebno je smrznuti ih na -70 °C.⁵

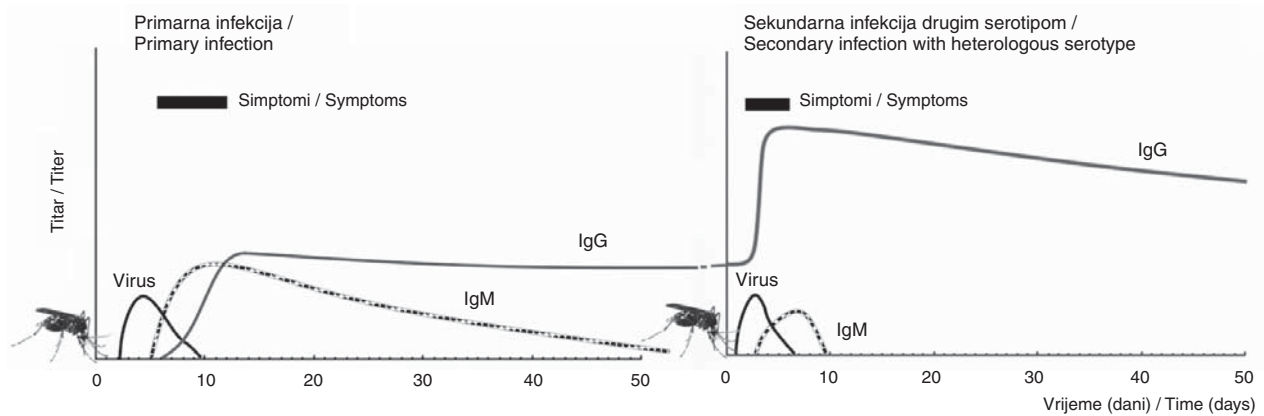
Za izolaciju virusa najpogodnije su stanične linije dobivene iz komarca C6/36 (*Ae. albopictus*) te AP61 (*Ae. pseudoscutellaris*). Virus dengue ne izaziva citopatski učinak te se prisutnost virusa (virusni antigen) u stanicama kulture dokazuje metodom imunofluorescencije (IF) s pomoću serotip-specifičnih monoklonskih protutijela. Za izolaciju se, iako manje uspješno, mogu iskoristiti i stanične kulture majmuskog bubrega (Vero, LLCMK2) te bubrega jednodnevnog hrčka (BHK-21).^{19,20}

Osim na stanične kulture, uzorci se mogu inokulirati intracerebralno u mišju sisančad ili intratorakalno u komarca. U miševa se mogu pojaviti simptomi encefalitisa, ali infekcija može biti i asimptomatska. Virusni se antigen dokazuje u moždanom tkivu životinje metodom IF. 10-14 dana nakon inokulacije u komarca virusni se antigen dokazuje metodom IF u zgnojčanim glavama komaraca.¹⁹

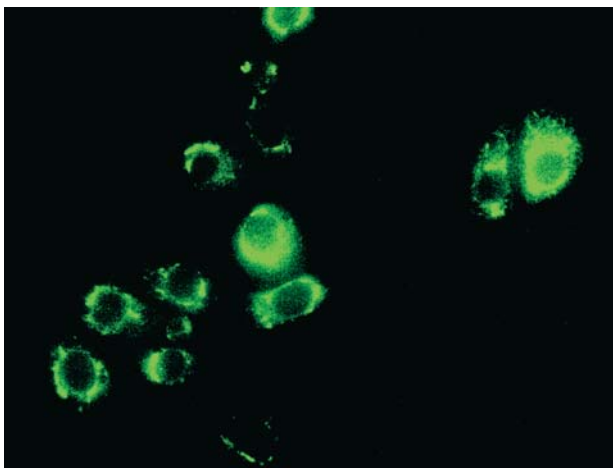
Molekularna dijagnostika

Uzorci za molekularnu dijagnostiku su krv, serum, plazma, tkiva ili komarci. Budući da je virusna RNK termolabilna, uzorke je potrebno transportirati do laboratorija na +4 °C.¹⁹ U upotrebi je nekoliko metoda koje se baziraju na lančanoj reakciji reverzna transkriptaza-polimeraza (RT-PCR). Najčešće se rabi metoda »nested« RT-PCR te real-time RT-PCR. Da bi se izbjegli lažno pozitivni nalazi, važno je za ciljnu sekvenciju odabrati dio genoma koji je specifičan za virus dengue, a različit kod ostalih flavivirusa i drugih srodnih virusa.^{21,22} U odnosu prema izolaciji virusa, osjetljivost RT-PCR metoda je od 80 do 100%, ovisno o ciljnoj sekvenciji te načinu amplifikacije ili detekcije PCR-produkta.¹⁹

a) »Nested« RT-PCR je metoda koja prvo rabi univerzalne, »pan«-dengue početnice za reverznu transkripciju i amplifikaciju, a zatim »nested« (ugniježđenu ili dvostruku) PCR-amplifikaciju za dokazivanje serotipova. Za detekciju svih serotipova virusa dengue (»pan«-dengue) rabe se početnice usmjerene na nekodirajuću 3'NCR-regiju genoma, a za razlikovanje serotipova one usmjerene prema C-genu. Produkti ove reakcije vizualiziraju se gel-elektroforezom uz uporabu etidij bromida, a umnoženi se produkti vide kao trake različite molekularne težine.¹⁹



Slika 1. Serološki odgovor tijekom primarne i sekundarne infekcije virusom dengue (prema: www.euroimmun.de)
Figure 1. Serologic response during primary and secondary dengue virus infection (according to: www.euroimmun.de)



Slika 2. Neizravni imunofluorescentni test: specifična antidengue protutijela u serumu bolesnika uzrokuju fluorescenciju citoplazme inficiranih stanica; Odsjek za virološku serologiju Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo (slikano ljubaznošću prof. dr. sc. J. Vraneš, Zavod za javno zdravstvo »Dr. Andrija Štampar«)

Figure 2. Indirect immunofluorescent assay: antibodies against dengue viruses cause a fluorescence of the infected cells; Division for virologic serology, Croatian National Institute of Public Health (picture taken by courtesy of professor J. Vraneš, Public Health Institute »Dr. Andrija Štampar«)

b) *Real-time* RT-PCR metoda je kojom je, rabeći uz početnice i hibridizacijsku sondu obilježenu fluorescentnom bojom, omogućena detekcija produkta u stvarnom vremenu bez potrebe za elektroforezom. *Real-time* RT-PCR može biti jednostruki (»singleplex«) koji detektira samo »pan«-dengue ili samo jedan serotip u jednoj reakciji ili višestruki (»multiplex«) koji može otkriti sva četiri serotipa u jednoj reakciji. Metoda može biti i kvantitativna.²³

Iako su ove metode vrlo osjetljive i nalazi se mogu dobiti u kratkom vremenu, imaju i nekih nedostataka. Metode nisu standardizirane, mogući su lažno negativni rezultati zbog genskih različitosti virusa dengue te nije moguće razlikovati primarnu od sekundarne infekcije.¹⁹

Detekcija antigena

NS1-gen čini vrlo konzervirani dio genoma virusa dengue. Visoke koncentracije NS1-antigena mogu se dokazati tijekom primarne, ali i tijekom sekundarne dengue infekcije

kada se nalazi u obliku imunih kompleksa koje tvori s već postojećim IgG-protutijelima.²⁴ NS1-antigen prisutan je u serumu duže vrijeme od virusne RNK (do devetog dana nakon početka bolesti).¹⁹ Zbog toga detekcija NS1-antigena može pomoći u dijagnostici infekcije virusom dengue u vrijeme kad virusna RNK više nije detektabilna. Testovi za dokaz NS1-antigena danas su komercijalno dostupni, no većina ovih testova ne može razlikovati serotipove virusa dengue.^{24,25}

Serološka dijagnostika

Tijekom primarne infekcije virusom dengue specifična IgM-protutijela mogu se detektirati u serumu u oko 50% bolesnika tri do pet dana nakon početka bolesti, u oko 80% bolesnika nakon pet dana te u gotovo svih bolesnika nakon 10 dana.¹⁹ IgM-protutijela dosežu maksimalne vrijednosti oko dva tjedna nakon pojave simptoma te obično nestaju za dva do tri mjeseca. Nizak titar IgG-protutijela može se naći već krajem prvog tjedna bolesti, nakon čega postupno raste i ostaje detektabilan dugo vremena nakon preboljele infekcije, a možda i doživotno. Tijekom ponovne (sekundarne) infekcije drugim serotipom virusa dengue titar IgG-protutijela raste brže i doseže više vrijednosti nego u primarnoj infekciji. Titar IgM-protutijela u sekundarnoj infekciji znatno je niži, a vrlo često i ispod razine detekcije (slika 1).^{26,27}

U serološkoj se dijagnostici najčešće primjenjuje imunoenzimni test (ELISA) te neizravni IF-test (slika 2) koji određuju klase IgM i IgG-protutijela. Pri interpretaciji nalaza treba isključiti moguće križne reakcije s drugim flavivirusima. Prednost IF-testa u odnosu prema ELISA-testu jest mogućnost određivanja protutijela specifičnih za serotip. Iako su često prisutne križne reakcije između serotipova, titar protutijela na serotip virusa koji je uzrokovao infekciju (tzv. homologna protutijela) obično je viši od titra heterolognih protutijela.^{28,29}

Test inhibicije hemaglutinacije (IH) temelji se na sposobnosti virusa dengue da uzrokuje aglutinaciju eritrocita guske ili ljudskih eritrocita grupe »0«. U prisutnosti specifičnih protutijela dolazi do inhibicije hemaglutinacije. Budući da ovaj test ne razlikuje klase protutijela, za dijagnozu dengue infekcije potrebno je testirati serum akutne (do petog dana bolesti) i rekonvalescentne faze (nakon 7-14 dana) radi usporedbe titra protutijela. Protutijela koja inhibiraju hemaglutinaciju također pokazuju križne reakcije s drugim flavivirusima.¹⁹

Neutralizacijski test redukcije plakova (PRNT, engl. *plaque reduction neutralization assay*) određuje titar neu-

tralizacijskih protutijela koji korelira sa zaštitom od infekcije. Jedino je ovim testom moguće precizno odrediti serotip virusa dengue. No metoda je tehnički zahtjevnija za izvođenje te se ne rabi u rutinskoj dijagnostici.^{30,31}

U nekim se laboratorijima za razlikovanje primarne od sekundarne infekcije rabi i određivanje IgG-aviditeta. Tijekom primarne infekcije stvaraju se IgG-protutijela niskog aviditeta, tj. niskog afiniteta za antigen. Napredovanjem infekcije dolazi do sazrijevanja imunološkog odgovora i IgG-protutijela poprimaju visok aviditet koji ostaje trajno visok. Sekundarnu dengue infekciju karakterizira brz porast IgG-protutijela visokog aviditeta. Ovaj test nije komercijalno dostupan te nije u širokoj primjeni.³²

Određivanje omjera IgM/IgG-protutijela također može pomoći u razlikovanju primarne od sekundarne dengue infekcije. Kod primarne dengue infekcije taj je omjer veći od 1,2 (ako se rabi razrijeđenje serumima 1:100) ili veći od 1,4 (ako se rabi razrijeđenje serumima 1:20).^{33,34}

U zaključku, brza i pouzdana dijagnostika virusa dengue od izuzetne je važnosti za kliničare (zbog rane dijagnostike težih oblika bolesti, potvrde slučajeva i diferencijalne dijagnoze prema drugim infektivnim bolestima), kao i za epidemiologe (provođenje preventivnih mjera te kontrola i nadzor epidemija). U Nacionalnome referentnom laboratoriju za arboviruse ECDC (engl. *European Center for Disease Control*) pri Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo provodi se serološka (ELISA, IF) i molekularna dijagnostika (»singleplex pan-dengue« real-time RT-PCR) virusa dengue.

L I T E R A T U R A

- Chen R, Vasilakis N. Dengue – Quo tu et quo vadis. *Viruses* 2011;3: 1562–608.
- Guzman MG, Halstead SB, Artsob H i sur. Dengue: A continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:7–16.
- www.who.int/csr/disease/dengue/impact
- Gubler D, Kuno G, Markoff L. Flaviviruses. U: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, str. 1101–52.
- Tsai TF, Vaughn DW, Solomon T. Flaviviruses. U: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ur. *Principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2005, str. 1926–50.
- www.cdc.gov/dengue/epidemiology
- Klobučar A, Merdić E, Benić N, Baklaić Ž, Krčmar S. First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *Am J Mosq Control Assoc* 2006;22(1): 147–8.
- Ross TM. Dengue virus. *Clin Lab Med* 2010;30(1):149–60.
- Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(5):e646.
- Dalla Pozza G, Majori G. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J Am Mosq Control Assoc* 1992;8:318–20.
- Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc* 1998;14(3):340–3.
- Klobučar A, Benić N. Azijski tigrasti komarac, *Stegomyia albopicta* (*Aedes albopictus*) u Zagrebu i Hrvatskoj. *HČJZ* 2006;2(8).
- Ferenčić N, Racz A. Prisutnost i širenje azijskog tigrastog komarca *Stegomyia albopicta* (*Aedes albopictus*) zapadnom obalom i unutrašnjošću Istre. *Med Jad* 2010;40(1–2):5–10.
- Pinazo MJ, Munoz J, Betica Lj i sur. Imported dengue hemorrhagic fever, Europe. *Emerg Infect Dis* 2008;14(8):1329–30.
- Markotić A, Betica Radić Lj, Maretić T. Virusni turizam: virus dengue. *Infektološki glasnik* 2007;27(4):181–4.
- Croatian National Institute of Public Health. Imported dengue. *Epidemiol News* 2007;8.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schönberg J, Günter S, Stark K, Frank C. Dengue virus infection in a traveller returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* 2010;15(4):pii=19677.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krčmar D i sur. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill* 2011;16(9): pii=1980513.
- WHO. Dengue – Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva: WHO Press; 2009.
- Samuel PP, Tyagi BK. Diagnostic methods for detection and isolation of dengue viruses from vector mosquitoes. *Indian J Med Res* 2006;123: 615–28.
- Leparc-Goffart I, Baragatti M, Temmam S i sur. Development and validation of real-time one step reverse transcription-PCR for the detection and typing of dengue viruses. *J Clin Virol* 2009;45:61–6.
- Gurukumar KR, Priyadarshini D, Patil JA i sur. Development of a real time PCR for detection and quantitation of Dengue viruses. *Virol J* 2009;6:10.
- Kong YY, Thay CH, Tin TC, Devi S. Rapid detection, serotyping and quantitation of dengue viruses by TaqMan real time one step RT-PCR. *J Virol Meth* 2006;138:123–30.
- Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, Villar LA, Parra B. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virol J* 2010;7:361.
- Hu P, Di B, Ding X i sur. Kinetics of non-structural protein 1, IgM and IgG antibodies in dengue type 1 primary infection. *Virol J* 2011; 2011:847.
- Chanama S, Anantapreecha S, A-nuegoonpipat A, Sa-gnasang A, Kurane I, Sawanpanyalert P. Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J Clin Virol* 2004;31(3):185–9.
- www.euroimmun.de
- De Souza VA, Tateno AF, Oliveira RR. Sensitivity and specificity of three ELISA-based assays for discriminating primary from secondary acute dengue virus infection. *J Clin Virol* 2007;39(3):230–3.
- Houghton-Trivino N, Montana D, Castallanos JE. Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis. *Rev Salud Publica* 2008;10(2):299–307.
- Roehring JT, Hombach J, Barrett AD. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. *Viral Immunol* 2008;21:123–32.
- Niedring M, Nitsche A, Donoso-Mantke O. Arthropod-borne viruses. U: Jerome KR. *Lennette's laboratory diagnosis of viral infections*. New York: Informa Healthcare; 2010, str. 449–57.
- De Souza VA, Fernandes S, Araujo ES i sur. Use of an immunoglobulin G avidity test to discriminate between primary and secondary dengue virus infection. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1782–4.
- Falconar AKI, de Plata E, Romero-Vivas CME. Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated. *Clin Vaccin Immunol* 2006;13(9):1044–51.
- Domingo C, de Ory F, Sanz JC i sur. Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travellers. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009;65(1):42–8.

