

Pregledi Reviews

INFEKCIJA VIRUSOM ZAPADNOG NILA: RE-EMERGENTNA BOLEST U HRVATSKOJ

WEST NILE VIRUS INFECTION: RE-EMERGENT DISEASE IN CROATIA

TATJANA VILIBIĆ-ČAVLEK, LJUBO BARBIĆ, SUNČANICA LJUBIN-STERNAK, IVA PEM-NOVOSEL,
VLADIMIR STEVANOVIĆ, IRA GJENERO-MARGAN, GORDANA MLINARIĆ-GALINOVIĆ*

Deskriptori: Virus Zapadnog Nila – patogenost, imunologija, izolacija; Infekcija virusom Zapadnog Nila – epidemiologija, prijenos, dijagnoza, prevencija

Sažetak. Virus Zapadnog Nila (VZN) malen je, ovijen, kuglast virus koji pripada porodici *Flaviviridae*, rodu *Flavivirus*, serokompleksu japanskog encefalitisa. Prirodni rezervoari VZN-a su ptice, a glavni vektori komarci roda *Culex*. Do sada je opisano sedam genskih linija VZN-a, od kojih su najrasprostranjenije linije 1 i 2 (Afrika, Sjeverna i Južna Amerika, Europa, Azija i Australija). Infekcija VZN-om u oko 80% slučajeva prolazi asimptomatski. U 20% zaraženih javlja se nespecifična febrilna bolest (VZN-groznica), a u manje od 1% razvija se neuroinvazivni oblik bolesti (meningitis, encefalitis, sindrom poliomijelitisa). Na području Hrvatske protutijela na VZN dokazana su u ljudi, medvjeda i konja. U kolovozu i rujnu 2012. godine prvi put su zabilježeni klinički slučajevi neuroinvazivne infekcije VZN-om u ljudi te asimptomatska akutna infekcija u konja u tri županije istočne Hrvatske. Dijagnoza je potvrđena serološkim testovima (imunoenzimni test, IgG-aviditet, neutralizacijski test redukcije plakova).

Descriptors: West Nile virus – pathogenicity, immunology, isolation and purification; West Nile fever – epidemiology, transmission, diagnosis, prevention and control

Summary. West Nile virus (WNV) is a small, enveloped, spherical virus that belongs to the family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*, Japanese encephalitis serocomplex. Natural reservoirs of WNV are birds, and the main vectors are mosquitoes of the genus *Culex*. There are seven genetic lineages of WNV. Lineages 1 and 2 are the most widely distributed (Africa, North and South America, Europe, Asia and Australia). About 80% of infections are asymptomatic. In 20% of patients nonspecific febrile disease occurs (West Nile fever). Less than 1% of infected persons will develop neuroinvasive WNV disease (meningitis, encephalitis, and poliomyelitis). In Croatia, antibodies to WNV were demonstrated in humans, bears and horses. In August-September 2012 clinical cases of human WNV neuroinvasive disease and asymptomatic acute infection in horses were reported for the first time in three eastern Croatian counties. The diagnosis was confirmed by serologic tests (enzyme immunoassay, IgG avidity, plaque-reduction neutralization test).

Liječ Vjesn 2013;135:156–161

Virus Zapadnog Nila: povijesni pregled

Virus Zapadnog Nila (VZN) izoliran je 1937. godine iz krvi febrilne žene na području Zapadnog Nila u sjevernoj Ugandi.¹ Nakon toga zabilježeni su sporadični slučajevi febrilne bolesti (VZN-groznica) na Srednjem istoku i u Africi, a 1951. godine prvi put je opisana epidemija u Izraelu kada su detaljno opisani glavni klinički simptomi infekcije VZN-om.² Daljnje epidemije u Egiptu tijekom 1951–1954. godine omogućile su bolje razumijevanje epidemioloških i kliničkih karakteristika infekcije VZN-om.³ Prvi slučajevi neuroinvazivne infekcije VZN-om opisani su 1957. godine za vrijeme epidemije u Izraelu. Od 1996. godine uočene su promjene epidemioloških karakteristika VZN-a i to prvi put tijekom epidemije u Rumunjskoj iste godine kada je zabilježen velik broj neuroinvazivnih oblika bolesti u urbanoj sredini.⁴ Potom se registriraju epidemije u Maroku, Tunisu, Italiji, Izraelu, Francuskoj i Rusiji koje su bile obilježene teškim oblicima bolesti, uključujući i neurološke komplikacije.^{5,6} Na zapadnoj je polutki infekcija VZN-om prvi put opisana 1999. godine u New Yorku, gdje je uz infekcije ljudi uzrokovala i pomor vrana.⁷ Iako način ulaska virusa u SAD nije razjašnjen, virus izoliran u SAD-u najslbližnji je virusu

koji je tijekom 1997. i 1998. godine uzrokovao epidemije u Izraelu. Sljedećih se godina virus širi i u ostale dijelove američkog kontinenta.⁸ Danas je VZN jedan od najrasprostranjenijih arbovirusa.

Biološke osobitosti virusa Zapadnog Nila

VZN je malen (~50 nm), ovijen, kuglast virus koji spada u porodicu *Flaviviridae*, rod *Flavivirus*, serokompleks japanskog encefalitisa. Genom čini jednolančana, pozitivna (+) RNK koja kodira tri strukturna proteina: protein kapside

* Odjel za virologiju, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (dr. sc. Tatjana Vilibić-Čavlek, dr. med.; doc. dr. sc. Sunčаница Ljubin-Sternak, dr. med.; prof. dr. sc. Gordana Mlinarić-Galinović, dr. med.), Zavod za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (prof. dr. sc. Ljubo Barbić, dr. med. vet.; Vladimir Stevanović, dr. med. vet.), Služba za epidemiologiju zaraznih bolesti, Hrvatski zavod za javno zdravstvo (Iva Pem-Novosel, dr. med.; prof. dr. sc. Ira Gjenero-Margan, 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 28. studenoga 2012., prihvaćeno 13. ožujka 2013.

(C), glikoprotein ovojnice (E) i prekursorski membranski protein (prM) te sedam nestrukturiranih proteina: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5.⁹ Umnožavanje VZN-a zbiva se u citoplazmi inficiranih stanica. Nakon vezanja za stanične receptore virus ulazi u stanicu endocitozom posredovanom receptorom. Zbog niskog pH u endosomu dolazi do konformacijskih promjena proteina ovojnice, fuzije virusa s membranom endosoma te otpuštanja RNK u citoplazmu. Genom djeluje kao mRNK i prevodi se u poliprotein. Zatim se sintetizira negativan (–) lanac RNK, koji služi kao kalup za sintezu pozitivnog (+) lanca genoma. Novosintetizirana genomska RNK spaja se s proteinom kapside i tvori nukleokapsidu. Virus dobiva ovojnicu pupanjem kroz intracelularne vezikule, a iz stanice se oslobađa egzocitozom ili lizom.¹⁰

Na temelju filogenetske analize do sada je opisano 7 genetskih linija (engl. *lineages*) VZN-a.¹¹ Dvije su glavne linije (1 i 2) koje se međusobno razlikuju 25–30% u slijedu nukleotida.⁸ Linija 1 uključuje sojeve VZN-a izolirane na području Afrike, Srednjeg istoka, Europe, Sjeverne Amerike, Australije (Kunjin virus) i Indije. Linija 2 obuhvaća sojeve s područja Južne Afrike i Madagaskara,¹² ali se nakon 2004. godine širi izvan endemskog područja te je najprije zabilježena u središnjoj Europi (Mađarska)¹³, a 2008. godine u istočnoj Europi.¹⁴ Tijekom 2010. godine opisane su epidemije uzrokovane linijom 2 VZN-a u Rumunjskoj¹⁵ i Grčkoj,¹⁶ a 2011. godine prvi put je zabilježena u Italiji.¹⁷ Linija 1 je virulentnija od linije 2, a čini se da su za razlike u patogenosti odgovorni nukleotidi koji kodiraju prM, E te NS-regije genoma VZN-a.¹⁸ U liniju 3 svrstan je soj virusa izoliran iz komaraca *Culex pipiens* u Češkoj (Rabensburg virus),¹⁹ a u liniju 4 soj izoliran iz krpelja *Dermacentor marginatus* na području Kavkaza te sojevi izolirani iz komaraca i žaba na području Volgograda.²⁰ Linijama 5 i 6 pripadaju sojevi izolirani na području Indije²¹ i Španjolske.²² Afrički virus Koutango usko je povezan s VZN-om te se smatra linijom 7.²³

Epidemiologija infekcije virusom Zapadnog Nila

Infekcija VZN-a tipična je zoonoza koju prenose vektori. U svome prirodnom ciklusu različite vrste ptica primarni su domaćini i rezervoari virusa, koji se prenosi uglavnom putem komaraca. Najčešći vektori VZN-a su komarci pripadnici roda *Culex* te rodova *Aedes* i *Ochlerotatus*. U ptica se može razviti klinički oblik bolesti različita intenziteta koji, ovisno o vrsti, varira od asimptomatske infekcije do mogućih masovnih uginuća.²⁴ Uz to, ptice mogu dulje vrijeme biti inficirane, što omogućuje endemizaciju bolesti u nekom području. U pojedinim je vrsta ptica dokazano izlučivanje virusa fekalnim i oralnim sekretom, što omogućava njihovo međusobno zaražavanje neposrednim i posrednim dodirima.^{25,26} U ptica, kao primarnog domaćina, razvija se visok stupanj viremije te su one izvor infekcije tijekom kraćeg ili duljeg vremena. Za razliku od njih, druge vrste životinja, kao i ljudi, nakon infekcije imaju vrlo nisku razinu viremije te su slučajni krajnji domaćini,²⁷ što je osobito važno s gledišta osobne zaštite i razumijevanja epidemiologije bolesti, kao i protuepidemijskih mjera. Praktično jedini način prirodnog prijenosa uzročnika na ljude i druge sisavce jest ubodom komaraca inficiranih tijekom hranjenja krvlju inficiranih ptica.^{28–30} Valja naglasiti da se nakon infekcije VZN može umnožavati i izlučivati iz žlijezda slinovnica komaraca te da je moguć transovarijalni prijenos na sljedeće generacije. Prezimljavanje inficiranih komaraca drugi je način moguće endemizacije bolesti u određenom području.³¹

Osim osnovnog prijenosa uzročnika na ljude putem komaraca, interhumani prijenos moguć je transfuzijom zaražene krvi,³² transplantacijom organa,^{33,34} dojenjem,³⁵ a opisan je i jedan slučaj transplacentalne infekcije.³⁶ Nadalje, opisane su i infekcije laboratorijskih radnika ubodom kontaminiranim iglama,^{37,38} kao i slučajevi zaražavanja putem ozljede nastale tijekom razudbe ptice³⁷ i zaraženog konja.³⁹

Na području Europe u posljednjih su nekoliko godina neuroinvasive infekcije VZN-om kontinuirano zabilježene u Italiji (2008.–2010. godine), Mađarskoj (2008.–2012. godine), Rumunjskoj (2010.–2012. godine) i Grčkoj (2010.–2012. godine).⁴⁰ Godine 2012. registrirana je velika epidemija u SAD-u, s najviše oboljelih u Teksasu. Do sada je prijavljeno ukupno 5128 oboljelih, od čega 2601 s neuroinvasivnim oblikom bolesti te 229 smrtnih slučajeva.⁴¹ U srpnju 2012. godine prvi put je registrirana epidemija infekcije VZN-om u Srbiji s 44 laboratorijski potvrđena slučaja i šest smrtnih slučajeva. Uz učestalu sezonsku pojavnost neuroinvasivnih oblika infekcije VZN-om posljednjih godina, dokazana je i endemizacija bolesti u svijetu,⁴² kao i u našem okruženju.⁴³

Prisutnost VZN-a na području Hrvatske prati se duži niz godina. U istraživanjima provedenim tijekom 1970–1974. godine protutijela na ovaj virus nađena su u 0,28%–4,9% stanovnika otoka Brača.⁴⁴ Na području sjeveroistočne Hrvatske IgG-protutijela na VZN dokazana su u 1,2% ispitanika, na području srednje Dalmacije u 3,4%, a na području južne Dalmacije (Korčula, Lastovo, Mljet, Šipan, Lopud) u 0,8% testiranih ispitanika.⁴⁵ Slične je rezultate pokazalo i istraživanje provedeno na području Brača, Hvara i Mljeta 1998. godine (seroprevalencija 0,44%–1,56%).⁴⁶ U seroepidemiološkom istraživanju provedenom tijekom 2007. godine na području sjeverozapadne Hrvatske u 300 dobrovoljnih davalaca krvi, dokazan je seropozitivitet na VZN od 0,3%.⁴⁷ Nadalje, u pilot-istraživanju provedenom 2011. godine u skupini od 306 slučajno odabranih zdravih ispitanika u dobi od 30 do 60 godina IgG-protutijela na VZN dokazana su u samo jednog ispitanika s područja istočne Hrvatske (0,3%) (podaci Nacionalnoga referentnog laboratorija za arbovirose i rikecije, HZJZ). Dokaz i proširenost infekcije VZN-om na području Hrvatske istraživani su i u životinja. Prvi dokaz infekcije ustanovljen je u smeđeg medvjeda 1993. godine⁴⁸ nakon čega slijedi dokaz infekcija u konja na području Đakova (2001.–2002. godine).⁴⁹ Infekcije konja dokazane su i opsežnim istraživanjem tijekom 2010. i 2011. godine čiji rezultati upućuju na moguću endemizaciju bolesti na području Hrvatske.⁵⁰ U rujnu 2012. godine dokazani su prvi klinički slučajevi humane neuroinvasive infekcije VZN-om u tri županije istočne Hrvatske. Infekcija je laboratorijski potvrđena u 7 bolesnika u dobi od 48 do 76 godina. Prije pojave humanih infekcija asimptomatska akutna infekcija VZN-om (dokaz IgM-protutijela) dokazana je u konja na području istih županija gdje su zabilježeni humani slučajevi.⁵¹

Patogeneza infekcije virusom Zapadnog Nila

Nakon uboda zaraženog komarca VZN inficira keratinocite⁵² i Langerhansove stanice koje migriraju u regionalne limfne čvorove gdje se zbiva primarno umnožavanje.⁵³ Nakon toga dospijeva u krv te nastaje kratkotrajna viremija s niskom razinom virusa koja nestaje pojavom IgM-protutijela. Virus se krvlju širi u visceralne organe (bubreg, jetra i slezena) gdje dolazi do sekundarnog umnožavanja, vjerojatno u epitelnim stanicama i makrofagima.⁵⁴ VZN se može vezati na Fc-receptore makrofaga, monocita i drugih stanica

retikuloendotela čime se pojačava njegovo umnožavanje i povećava razina viremije. Ovisno o stupnju viremije virus može prijeći hematoencefalnu barijeru i uzrokovati meningoencefalitis. Kao mogući mehanizmi ulaska virusa u središnji živčani sustav (SZS) navode se: a) pasivni transport preko endotela ili epitelnih stanica koroidnog pleksusa, b) preko olfaktornih živaca, c) putem inficiranih stanica imunskog sustava koje putuju u SZS, d) izravnim retrogradnim aksonalnim transportom iz inficiranih perifernih neurona.^{55,56} Čini se da ulasku virusa u SZS prethodi stimulacija receptora sličnih Tollu i porast čimbenika nekroze tumora alfa, što dovodi do povećane permeabilnosti hematoencefalne barijere.⁵⁷ VZN izravno inficira neurone, osobito u dubokim jezgrama i sivoj tvari mozga, moždanog debla i kralježnične moždine.⁵⁸

Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila

Incubacija iznosi 2–6 (14) dana. Većina infekcija (~80%) uzrokovanih VZN-om prolazi asimptomatski. U oko 20% zaraženih infekcija se očituje kao nespecifična febrilna bolest (VZN-groznica). U manje od 1% bolesnika razvija se neuroinvazivna bolest koja se očituje meningitisom, encefalitisom ili sindromom poliomijelitisa (akutna mlohava kljenut), iako se pojedini sindromi često preklapaju (tablica 1).^{59,60} Kao glavni rizični faktori za nastanak težih oblika bolesti navode se starija životna dob i imunosupresija. Pretpostavlja se da je smanjenje broja CD4 i CD8 T-limfocita koje se javlja s porastom životne dobi ključni faktor koji određuje težinu neuroloških simptoma i višu smrtnost u osoba starijih od 50 godina.⁶¹ Uloga drugih mogućih faktora kao što su npr. hipertenzija, dijabetes i cerebrovaskularne bolesti u patogenezi infekcije VZN-om još nije potvrđena.⁶²

VZN-groznica

VZN-groznica je samoizlječiva bolest, blaga tijekom i povoljna ishoda. Iako je starija dob neovisni rizični faktor za lošiji ishod VZN-groznice s višom smrtnosti, uzrok smrti u tih bolesnika može biti povezan s egzacerbacijom predležućih bolesti.⁶³ Rekonvalescencija u bolesnika svih dobnih skupina može biti prolongirana, praćena ekstremnom slabošću.

VZN-meningitis

VZN-meningitis javlja se u ~40% slučajeva svih neuroinvazivnih oblika infekcije VZN-om. Bolesnici su podjednake ili nešto mlađe životne dobi kao i oni koji obolijevaju od VZN-groznice. Ishod ovog oblika bolesti je povoljan, a trajanje oporavka i kratkotrajne posljedice bolesti (slabost, nemogućnost koncentracije) iste su kao i kod VZN-groznice.⁶⁴

VZN-encefalitis

VZN-encefalitis javlja se češće u osoba starijih od 55 godina i imunokompromitiranih. Povezuje se s visokim mortalitetom (~20%), a u petine osoba koje prebole akutnu bolest zaostaju trajne neurološke posljedice – tremor i/ili ataksija prisutni dulje od godine dana.⁶⁵

VZN-poliomijelitis

VZN-poliomijelitis posljedica je virusne infekcije donjega motornog neurona ili prednjih rogov kralježnične moždine, a očituje se akutnom mlohavom kljenuti karakterističnom za infekciju virusom poliomijelitisa. Najteža komplikacija ovog oblika bolesti, koja zahtijeva mehaničku ventilaciju, jest zatajenje respiratornog sustava uzrokovano paralizom ošita i međurebrenih mišića. Smrtnost kod ovog oblika bolesti iznosi >50%, a mnogim je osobama, koje tijekom oporavka nakon mehaničke ventilacije uspješno uspostave samostalnu respiraciju, godinama nužna pomoćna terapija kisikom.⁶⁶

Dijagnostika infekcije virusom Zapadnog Nila

Dijagnostika infekcije VZN-om provodi se izravnim (izolacija, molekularna dijagnostika) i neizravnim metodama (serološka dijagnostika) (tablica 2).⁴¹

Izolacija virusa

VZN se može izolirati iz krvi, cerebrospinalnog likvora (CSL) te postmortalno dobivenih uzoraka tkiva. Za izolaciju su najpogodnije stanične kulture bubrega afričkoga zelenog majmuna (Vero) i kuničjeg bubrega (RK-13, engl. *rabbit*

Tablica 1. – Table 1. Klinička slika infekcije virusom Zapadnog Nila⁶⁰ / Clinical features of West Nile virus infection⁶⁰

Karakteristika / Characteristic	VZN-groznica / WNV fever	VZN-meningitis / WNV meningitis	VZN-encefalitis / WNV encephalitis	VZN-poliomijelitis / WNV poliomyelitis
Učestalost kliničkih sindroma / Frequency of clinical syndromes	20%	<1%	<1%	<1%
Učestalost neuroinvazivnih oblika bolesti / Frequency of neuroinvasive syndromes	–	35–40%	55–60%	5–10%
Klinički simptomi / Clinical symptoms	Vrućica, glavobolja, umor, slabost, bol u mišićima, mučnina, otok limfnih čvorova, osip / Fever, headache, fatigue, malaise, myalgia, swelling of lymph nodes, rash	Simptomi VZN-groznice + meningitični simptomi (kočenje vrata, fotofobija) / Symptoms of WNV fever + meningismus (nuchal rigidity, photophobia)	Simptomi VZN-groznice + encefalopatija (smetenost, letargija) i/ili žarišni neurološki ispadi (tremor, poremećaji koordinacije, ataksija) / Symptoms of WNV fever + encephalopathy (confusion, lethargy) and (or) focal neurologic signs (tremor, movement disorders, ataxia)	Nagli nastanak kljenuti (kljenuti su mlohavi, asimetrični, praćeni gubitkom refleksa); moguće zahvaćanje respiratornih mišića; klasični simptomi VZN-a; infekcije ne moraju biti prisutni / Acute onset of limb paralysis (asymmetric, flaccid and areflexic); respiratory muscles may be involved; classical symptoms of WNV infection may be absent
Smrtnost / Mortality	<1%	<1%	20%	10–50%

VZN – virus Zapadnog Nila / WNV – West Nile virus

Tablica 2. Metode koje se rabe u dijagnostici infekcije virusom Zapadnog Nila⁴¹
 Table 2. Methods used in diagnosis of West Nile virus infection

Uzorak / Specimen	Testovi prvog izbora / 1 st choice tests	Testovi drugog izbora / 2 nd choice tests	Komentar / Comments
Serum / likvor Serum / cerebrospinal fluid (CSF)	Imunoenzimni test / Enzyme-linked immunosorbent assay Neutralizacijski test redukcije plakova / Plaque-reduction neutralization test	Test inhibicije hemaglutinacije / Inhibition hemagglutination Indirektni imunofluorescentni test / Indirect immunofluorescence assay	Osjetljivost RT-PCR*: 57% za likvor, <10% za serum / Real-time RT-PCR sensitivity: 57% for CSF, <10% for serum
Tkiva / Tissues	RT-PCR u stvarnom vremenu / Real-time RT-PCR Izolacija virusa / Virus isolation	Imunohistokemijski postupci / Immunohistochemistry Klasični RT-PCR / Standard RT-PCR	Osjetljivost RT-PCR u stvarnom vremenu veća od izolacije virusa / Real-time RT-PCR more sensitive than virus isolation

*RT-PCR – lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije/ reverse-transcriptase polymerase-chain reaction

kidney) na kojima virus stvara citopatski učinak. Prisutnost VZN-a u kulturi stanica dokazuje se metodom imunofluorescencije (IF) te lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse-transcriptase polymerase-chain reaction*, RT-PCR).⁶⁷ Za izolaciju su potrebni biosigurnosni uvjeti trećeg stupnja (BSL-3) te se ona uglavnom provodi u referentnim laboratorijima. VZN se rijetko izolira iz krvi oboljelih od neuroinvazivnih oblika bolesti budući da je viremija niskog stupnja i virus više nije prisutan u krvi u vrijeme pojave neuroloških simptoma.⁵⁹

Molekularna dijagnostika

RT-PCR metoda je izbora u molekularnoj dijagnostici VZN-a. Dvije su inačice ove metode: klasični RT-PCR i RT-PCR u stvarnom vremenu (engl. *real-time* RT-PCR) koji detektira ≥ 50 kopija virusne RNK/ml, što je oko 1000 puta osjetljivije od izolacije virusa (tablica 1). U usporedbi s klasičnom RT-PCR-metodom, metoda RT-PCR u stvarnom vremenu ima veću osjetljivost i specifičnost, moguće je kvantitativno odrediti broj kopija virusne RNK te je manja mogućnost kontaminacije uzorka.⁶⁸ Glavni je nedostatak ove metode nemogućnost prepoznavanja novih sojeva VZN-a nastalih zbog mutacija na mjestima na koja se vežu početnice.^{23,69}

Serološka dijagnostika

Dijagnostika infekcije VZN-om većinom se provodi serološkim metodama (detekcija protutijela u serumu i CSL-u). IgM-protutijela pojavljuju se u serumu oboljelih od četvrtog do sedmog dana bolesti⁷⁰ i u oko 36% oboljelih mogu perzistirati duže od godine dana.⁷¹ Budući da ne prolaze hema-toencefalnu barijeru, nalaz IgM-protutijela u CSL-u smatra se dijagnostički značajnim.⁷² U nekih je bolesnika opisana perzistencija IgM-protutijela u CSL-u do 199 dana.⁷³ Za detekciju IgM-protutijela najčešće se rabe imunoenzimni testovi na principu hvatanja IgM-protutijela (engl. IgM »capture« ELISA).⁷⁴ IgG-protutijela mogu se detektirati oko osmog dana bolesti i perzistiraju dugo vremena nakon prelojele infekcije.⁷⁵ Zbog mogućih križnih reakcija s drugim flavivirusima pozitivan nalaz ELISA-testa potrebno je potvrditi neutralizacijskim testovima. Od potvrdnih se testova najčešće primjenjuje neutralizacijski test redukcije plakova (engl. *plaque-reduction neutralization test*, PRNT) te mikro-neutralizacijski test (mikro-NT).⁷⁶ Iako i kod ovih testova postoji mogućnost križnih reakcija s drugim flavivirusima, titar neutralizirajućih protutijela na VZN obično je četverostruko viši od heterolognog titra na druge flaviviruse.⁵⁹

Metodom neizravne IF također je moguće razlikovati IgM i IgG-protutijela, no ovaj je test nešto manje osjetljivosti od ELISA-testa.⁷⁷ Kako bi se isključile križne reakcije s VZN-om, u Hrvatskoj je korisno istodobno učiniti i testiranje na virus dengue te virus krpeljnog meningoencefalitisa.

U serološkoj se dijagnostici provodi i određivanje aviditeta IgG-protutijela. Tijekom primarne infekcije VZN-om stvaraju se IgG-protutijela niskog aviditeta, tj. slabog afiniteta za antigen. Napredovanjem infekcije dolazi do sazrijevanja imunogenog odgovora i IgG-protutijela poprimaju visok aviditet koji ostaje trajno visok. Ovaj je test osobito koristan za razlikovanje akutne infekcije VZN-om u bolesnika s dugom perzistencijom IgM-protutijela.⁷⁸

Liječenje i prevencija infekcije virusom Zapadnog Nila

Specifičnog lijeka nema. Terapija je simptomatska, tj. antipireticima i analgeticima. Teži, posebno neurološki slučajevi bolesti zahtijevaju hospitalizaciju kako bi se moglo pružiti adekvatno suportivno liječenje (antiemetička, anti-edematozna terapija, mehanička ventilacija). Primjena ribavirina, interferona-alfa i VZN-specifičnih imunoglobulina do sada nije dovoljno ispitana.^{79,80}

Cjepiva protiv VZN-a za životinje su već duže vrijeme u praktičnoj primjeni. U Sjedinjenim Američkim Državama 2001. godine je registrirano prvo inaktivirano cjepivo za konje. Inaktivirano se cjepivo rabilo i u Izraelu od 2000. godine za cijepljenje gusaka. Nakon ovih početnih rezultata istraživanja cjepiva za VZN su nastavljena, što je rezultiralo praktičnom uporabom atenuiranog cjepiva, vektorskog cjepiva te DNK-cjepiva u veterinarskoj medicini.⁸¹

Za sada nema odobrenog cjepiva za VZN u ljudi, iako je nekoliko kandidata za cjepivo završilo fazu I, odnosno fazu II kliničkih ispitivanja. Prvu skupinu kandidata čine kimerična cjepiva sastavljena od atenuiranog soja virusa žute groznice (17D) ili virusa dengue (WN-DEN4) u koje su inkorporirani geni koji kodiraju E i prM-proteine VZN-a,⁸² a druga je vrsta DNK-cjepivo.⁸³

S obzirom na to da ne postoji mogućnost zaštite cjepivom kod ljudi, od izuzetne su važnosti nespecifične mjere prevencije bolesti. To se prije svega odnosi na kontrolu populacije komaraca adulticidnim i larvicidnim dezinfekcijskim mjerama kako bi se smanjila mogućnost prijenosa bolesti. Također poseban naglasak treba staviti na mjere osobne zaštite. Pri boravku na otvorenome savjetuje se nanošenje repelenata na kožu, nošenje košulja dugih rukava, dugih

hlača i čarapa. Većina je komaraca najaktivnija u zoru i sumrak pa u to doba valja izbjegavati boravak na otvorenome. Budući da je životni ciklus komaraca vezan uz vodu, treba iz okućnice ukloniti vodu iz svih mjesta gdje se ona može zadržavati duže od tjedan dana kako se ličinke ne bi razvile u odrasle jedinke (lonci, bačve, vaze za cvijeće, limenke i sl.).⁴¹

Programi kontrole infekcije virusom Zapadnog Nila

U programu nadzora infekcije VZN-om kao klasične zoonoze značajni se podaci mogu prikupiti kontrolom aktivnosti virusa u vektorima te domaćim i divljim životinjama na određenom području. Dokazano je da se aktivnost virusa na određenom području najranije može ustanoviti pretraživanjem uginulih ptica.^{84,85} Kako uginuća ptica u mnogome ovise o genskoj liniji i soju virusa, kao pouzdaniji pokazatelj virusne aktivnosti prije pojave kliničkih slučajeva u ljudi i životinja rabi se pretraživanje uzoraka komaraca i »sentinelnih« (stražarskih) životinja.⁴¹ Kao sentinelne životinje najčešće se rabe konji i/ili domaća perad. Zbog relativno visoke osjetljivosti konja na infekciju VZN-om⁸⁶ podaci prikupljeni kontrolom virusne aktivnosti u konja mogu biti rani pokazatelj opasnosti od infekcije i pojave kliničkih slučajeva u ljudi.^{85,87} Kako uginuća ptica, dokazana prisutnost uzročnika u vektorima, infekcije sentinelnih životinja i kliničke bolesti životinja nastaju pri nižoj razini virusne aktivnosti na nekom području, dokazano je da oni prethode pojavi bolesti u ljudi.^{88–90} To donekle omogućuje i predviđanje vremena pojavljivanja bolesti u ljudi. U skladu s navedenim mogućnost predviđanja područja i vremena obolijevanja ljudi provođenjem cjelovitog programa kontrole VZN-a, daje neprocjenjive podatke i smjernice u provođenju preventivnih protuepidemijskih mjera u svrhu zaštite javnog zdravlja. Stoga je koordinirano multidisciplinarno praćenje VZN-infekcije na državnoj razini osnova u suzbijanju i nadzoru nad ovom bolesti s kojom ćemo se vjerojatno susretati i u sljedećim godinama.

LITERATURA

- Smithburn KC, Hughes TP, Burke AW, Paul JG. A neurotropic virus isolated from a blood of a native of Uganda. *Am J Trop Med* 1940; 20(4):471–92.
- Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of West Nile virus in Israel. *J Infect Dis* 1953;7:128–32.
- Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS i sur. A study of the ecology of the West Nile virus in Egypt. *Am J Trop Med* 1956;5:579–620.
- Campbell GL, Ceianu CS, Savage HM. Epidemic West Nile encephalitis in Romania: waiting for history to repeat itself. *Ann New York Acad Sci* 2001;951:94–101.
- Hubalek Z, Halouzka J. West Nile fever – a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis* 1999;5:643–50.
- Platonov AE, Shipulin GA, Shipulina OY i sur. Outbreak of West Nile virus infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg Infect Dis* 2001;7:128–32.
- Nash D, Mostashari F, Fine A i sur. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med* 2001; 344:1807–14.
- Lanciotti RS, Roehrig JT, Deubel V i sur. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the northern United States. *Science* 1999;286(5448):2333–7.
- Mukhopadhyay S, Kim BS, Chipman PR, Rossman MG, Kuhn RJ. Structure of West Nile virus. *Science* 2003;302:248.
- Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. Flaviviridae: The viruses and their replication. U: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields Virology*, 5. izd. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2007. str. 1101–51.
- Mackenzie JS, Williams DT. The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health* 2009;56:338–56.
- May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett ADT. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J Virol* 2011;85(6):2964–74.
- Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K i sur. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2006; 12:618–23.
- Platonov AE, Fedorova MV, Karan MS, Shopenskaya TA, Platonova DV, Zhuravlev VI. Epidemiology of West Nile infection in Volgograd, Russia, in relation to climate change and mosquito (Diptera: Culicidae) bionomics. *Parasitol Res* 2008;103(1):45–53.
- Sirbu A, Ceianu CS, Panculescu-Gatej RI i sur. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill* 2011;16(2). pii=19762.
- Papa A, Xanthopoulou K, Gewehr S, Mourelatos S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1176–80.
- Bagnarelli P, Marinelli K, Trotta D i sur. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011. *Euro Surveill* 2011;16(43). pii=20002.
- Beasley DW, Davis CT, Whiteman M, Granwehr B, Kinney RM, Barrett AD. Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. *Arch Virol Suppl* 2004;18:35–41.
- Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I, Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis* 2005;11: 225–31.
- Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL i sur. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol Suppl* 2004;18:85–96.
- Bondre VP, Jadhav RS, Mishra AC, Yergolkar PN, Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol* 2007;88:875–84.
- Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S i sur. Putative new lineage of West Nile virus, Spain. *Emerg Infect Dis* 2010;16(3):549–52.
- De Filette M, Ulbert S, Diamong M, Sanders NN. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet Res* 2012;43:16.
- Marra P, Griffing S, Cafreey CL i sur. West Nile Virus and Wildlife. *Bioscience* 2004;54:393–402.
- McLean RG, Ubico SR, Docherty DE i sur. West Nile virus transmission and ecology in birds. *Ann NY Acad Sci* 2001;951:54–57.
- Kipp AM, Lehman JA, Bowen RA, i sur. West Nile virus quantification in feces of experimentally infected American and fish crows. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:688–690.
- Komar N. West Nile viral encephalitis. *Rev Sci Tech* 2000;19:166–76.
- Bell JA, Mickelson NJ, Vaughan JA. West Nile virus in host-seeking mosquitoes within a residential neighborhood in Grand Forks, North Dakota. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2005;5:373–82.
- Reisen WK, Fang Y, Martinez VM. Avian host and mosquito (Diptera: Culicidae) vector competence determine the efficiency of West Nile and St. Louis encephalitis virus transmission. *J Med Entomol* 2005; 42:367–75.
- Turell MJ, Sardelis MR, Dohm DJ, O'Guinn ML, Andreadis TG, Blow JA. An update on the potential of North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *Med Entomol* 2005;42:57–62.
- Goddard L, Roth A, Reisen WK, Scott TW. Extrinsic incubation period of West Nile virus in four California Culex (Diptera: Culicidae) species. *Proc Mosq Vector Control Assoc Calif* 2003;71:70–5.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Investigations of West Nile virus infections in recipients of blood transfusion. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002;51(43):973–4.
- Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A i sur. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med* 2003;348:2196–203.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). West Nile virus infections in organ transplant recipients – New York and Pennsylvania, August–September 2005. *Morb Mortal Wkly Rep* 2005;54(40):1021–3.
- Hinckley AF, O'Leary DR, Hayes EB. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics* 2007;119(3): 666–71.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Intrauterine West Nile virus infection – New York 2002. *Morb Mortal Wkly Rep* 2002; 51(50):1135–6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-acquired West Nile virus infections – United States, 2002. *JAMA* 2003; 289:414–5.
- Venter M, Burt FJ, Blumberg L, Fickl H, Paweska J, Swanepoel R. Cytokine induction after laboratory-acquired West Nile virus infection. *N Engl J Med* 2009;360:1260–2.
- Venter M, Steyl J, Human S i sur. Transmission of West Nile virus during horse autopsy. *Emerg Infect Dis* 2010;16(3):573–5.
- www.ecdc.europa.eu/en/Pages/home.aspx, pristupljeno 25.11.2012.
- www.cdc.gov/az/w.html, pristupljeno 25.11.2012.
- Murray KO, Walker C, Gould E. The virology, epidemiology, and clinical impact of West Nile virus: a decade of advancements in research since its introduction into the Western Hemisphere. *Epidemiol Infect* 2011;139:807–17.

43. Monaco F, Savini G, Calistri P i sur. West Nile disease epidemic in Italy: First evidence of overwintering in Europe? *Res Vet Sci* 2011; 91:321–6.
44. Vesenjāk-Hirjan J, Galinovic-Weisglass M, Brudnjak Z i sur. Island of Brač – Focus of Arbovirus Infections. U: Vesenjāk-Hirjan J, ur. Arboviruses in the Mediterranean Countries. ZbL. Bakt. Suppl 9. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag; 1980, str. 311–7.
45. Vesenjāk-Hirjan J. Arboviruses in Yugoslavia. U: Vesenjāk-Hirjan J, ur. Arboviruses in the Mediterranean Countries. ZbL. Bakt. Suppl 9. Stuttgart-New York: Gustav Fischer Verlag; 1980, str. 165–77.
46. Turković B, Brudnjak Z. Arboviruses in Croatia. *Acta Med Croat* 1998; 52:87–9.
47. Golubić D, Dobler G. Flavivirusi na području sjeverozapadne Hrvatske. U: Jeren T, ur. Knjiga sažetaka 79. znanstveno-stručnog simpozija »Novosti u infektologiji«. Trogir: Hrvatsko društvo za infektivne bolesti; 2011, str. 38–9.
48. Madić J, Huber D, Lugović B. Serological survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *J Wildl Dis* 1993;29:572–6.
49. Madić J, Savini G, Di Gennaro A i sur. Serological evidence for West Nile Virus infection in horses in Croatia. *Vet Res* 2007;160:772–3.
50. Barbić Lj, Listić E, Katić S i sur. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet Microbiol* 2012;159:504–8.
51. Vilibić-Čavlek T, Barbić Lj, Pem-Novosel I i sur. Outbreak of West Nile virus infection in humans and horses, Croatia, 2012. U: Larry Madoff, ur. Book of Abstracts. International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance. Beč: International Society for Infectious Diseases; 2013, str. 183–4.
52. Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA. Keratinocytes are cell targets of West Nile virus *in vivo*. *J Virol* 2011;85:5197–201.
53. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Phenotypic changes in Langerhans' cells after infection with arboviruses: A role in the immune response to epidermally acquired viral infection? *J Virol* 1996;70:4761–6.
54. Rios M, Zhang MJ, Grinev A i sur. Monocytes-macrophages are a potential target in human infection with West Nile virus through blood transfusion. *Transfusion* 2006;46:659–67.
55. Lim SM, Koraka P, Osterhaus ADME, Martina BEE. West Nile virus: immunity and pathogenesis. *Viruses* 2011;3:811–28.
56. Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD, Diamond MS. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:17140–5.
57. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikring E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004;10:1366–73.
58. Ceccaldi PE, Lucas M, Despres P. New insights on the neuropathology of West Nile virus. *FEMS Microbiol Lett* 2004;233:1–6.
59. Hayes EB, Sejvar JJ, Zaki SR, Lanciotti RS, Bode AV, Campbell GL. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis* 2005;11(8):1174–9.
60. Sejvar JJ. The long-term outcomes of human West Nile virus infections. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1617–8.
61. Brien JD, Uhrhlaib JL, Hirsch A, Wiley CA, Nikolich-Zugich J. Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. *J Exp Med* 2009;206(12):2735–45.
62. Jean CM, Honarmand S, Louie JK, Glaser CA. Risk factors for West Nile virus neuroinvasive disease, California, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13(12):1918–20.
63. Berner YN, Lang R, Chowder MY. Outcome of West Nile fever in older adults. *Am J Geriatr Soc* 2002;50:1844–6.
64. Klee AL, Maidin B, Edwin B i sur. Long-term prognosis for clinical West Nile virus infection. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1405–11.
65. Carson PJ, Konweko P, Wold KS i sur. Long-term clinical and neurophysiological outcomes of West Nile virus infection. *Clin Infect Dis* 2006;43:723–30.
66. Sejvar JJ, Bode AV, Marfin AA i sur. West Nile virus-associated flaccid paralysis. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1021–7.
67. Rossi SL, Ross TM, Evans JD. West Nile virus. *Clin Lab Med* 2010; 30(1):47–65.
68. Lanciotti RS, Kerst AJ, Nasci RS i sur. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:4066–71.
69. Linke S, Ellerbrok H, Niedrig M, Nitsche A, Pauli G. Detection of West Nile virus lineages and 2 by real-time RT-PCR. *J Virol Meth* 2007; 146:355–8.
70. Diamond MS, Sitati EM, Friend LD, Higgs S, Shrestha B, Engle M. A critical role for induced IgM in the protection against West Nile virus infection. *J Exp Med* 2003;198:1853–62.
71. Roehring JT, Nash D, Maldin B i sur. Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin M antibody in confirmed West Nile encephalitis cases. *Emerg Infect Dis* 2003;9:376–9.
72. Tyler KL. Emerging viral infections of the central nervous system. *Arch Neurol* 2009;66(8):939–48.
73. Kapoor H, Signs K, Somsel P, Downes FP, Clark PA, Massey JP. Persistence of West Nile virus (WNV) IgM antibodies in cerebrospinal fluid from patients with CNS disease. *J Clin Virol* 2004;31:289–91.
74. Martin DA, Muth DA, Brown T i sur. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol* 2000;38:1823–6.
75. Tardei G, Ruta S, Chitu V, Rossi C, Tsai TF, Cernescu C. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J Clin Microbiol* 2000;38: 2232–9.
76. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N i sur. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol* 2011;92:2821–9.
77. Malan AK, Stipanovich PJ, Martins TB, Hill HR, Litwin CM. Detection of IgG and IgM to West Nile virus. *Am J Clin Pathol* 2003;119: 508–15.
78. Fox JL, Hazell SL, Tobler LH, Busch MP. Immunoglobulin G avidity in differentiation between early and late antibody responses to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol* 2006;43(12):5873–5.
79. Anderson J, Rahal JJ. Efficacy of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus *in vitro*. *Emerg Infect Dis* 2002;8(1):107–8.
80. Ben-Nathan D, Samina I, Orr N. High titer human immunoglobulin as a specific therapy against West Nile virus encephalitis. *Hum Vacc* 2010; 6:279–81.
81. Dauphin G, Zientara S. West Nile virus: Recent trends in diagnosis and vaccine development. *Vaccine* 2007;25(30):5563–76.
82. Pletnev AG, Swayne DE, Speicher J, Rumyantsev AA, Murphy BR. Chimeric West Nile/dengue virus vaccine candidate: preclinical evaluation in mice, geese and monkeys for safety and immunogenicity. *Vaccine* 2006;24:6392–404.
83. Ledgerwood JE, Pierson TC, Hubka SA i sur. A West Nile virus DNA vaccine utilizing a modified promoter induces neutralizing antibody in younger and older healthy adults in a phase I clinical trial. *J Infect Dis* 2011;203:1396–404.
84. Guptill SC, Julian KG, Campbell GL, Price SD, Marfin AA. Early-season avian deaths from West Nile virus as warnings of human infection. *Emerg Infect Dis* 2003;9(4):483–4.
85. Laperriere V, Brugger K, Rubel F. Simulation of the seasonal cycles of bird, equine and human West Nile virus cases. *Prev Vet Med* 2011;98: 99–110.
86. Castillo-Olivares J, Wood J. West Nile virus infection of horses. *Vet Res* 2004;35:467–83.
87. Ward MP, Scheurmann JA. The relationship between equine and human West Nile virus disease occurrence. *Vet Microbiol* 2008;129:378–83.
88. Garcia-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Napp S i sur. Seroprevalence and risk factors associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain. *Vet Microbiol* 2012;160(3–4):341–6.
89. Corrigan RL, Waldner C, Epp T i sur. Prediction of human cases of West Nile virus by equine cases, Saskatchewan, Canada, 2003. *Prev Vet Med* 2006;76(3–4):263–72.
90. Angelini P, Tamba M, Finarelli AC i sur. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill* 2010;15(16).doi:pii=19547.

