

Laboratorijska dijagnostika bjesnoće



Željko Čač, Ivana Lojkić, Tomislav Bedeković i Mirko Lojkić

Uvod

Premda slovi kao najstarija poznata zoonoza, bjesnoća je još i danas opće prisutan javno-zdravstveni problem u svjetskim razmjerima. Naime, prema izvješćima Svjetske zdravstvene organizacije (WHO), glede incidencije u ljudi, što ujedno znači i smrtnost, ta se zaraza nalazi na 10. mjestu među infektivnim bolestima. Diljem svijeta zbog nje na godinu umire od 25000 do 55000 ljudi i to gotovo isključivo u zemljama tropskog zemljopisnog pojasa (Zanoni i sur., 2000.). Budući da od 193 zemalja članica WHO-a bjesnoću prijavljuje samo njih oko 90, za pretpostaviti je da je pravo stanje još i gore, jer su službene brojke, osim u Europi i Americi, uvijek znatno manje od stvarnih. Takvo stanje ne iznenađuje ako se zna da u većini nerazvijenih zemalja, gdje uglavnom prevladava urbani oblik bjesnoće, tek svaka deseta osoba, izložena riziku, prima adekvatnu medicinsku zaštitu

od bjesnoće u smislu prije i poslije ekspozicijskog cijepljenja, a za ostale – sredstava nema.

Uzročnik je bolesti virus koji kola unutar populacija vrlo prijemčivih vrsta divljih (lisica, vuk, kojot, šakal, kunopas, rakun, tvor, mungo, šišmiši krvosasi, kukcojedi i biljojedi) i domaćih životinja (pas). One u različitim dijelovima svijeta predstavljaju rezervoar virusa bjesnoće i stalan su izvor zaraze za druge životinje, a i čovjeka, kao posljednju kariku u tom smrtonosnom lancu.

Klasičan virus bjesnoće pripada porodici *Rhabdoviridae* i najznačajniji je predstavnik među sedam, do sada poznatih, serološki različitih genotipova unutar roda *Lyssavirus*. *Rabies virus* (genotip 1) uključuje sve klasične sojeve virusa bjesnoće, raširene diljem svijeta. Ostalih šest genotipova su virusu bjesnoće srodni virusi (rabies-re-

Dr. sc. Željko ČAČ, dr. vet. med., znanstveni suradnik, dr. sc. Ivana LOJKIĆ, znanstvena suradnica, Tomislav BEDEKOVIĆ, dr. vet. med., asistent, dr. sc. Mirko LOJKIĆ, dr. vet. med., redoviti profesor, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

lated viruses): *Lagos bat virus* (genotip 2), *Mokola virus* (genotip 3), *Duvenhage virus* (genotip 4), *European bat lyssavirus 1* (genotip 5), *European bat lyssavirus 2* (genotip 6) i *Australian bat lyssavirus* (genotip 7) (King i Crick, 1988., Schneider i Cox, 1994., Gould i sur., 1998., Bowen-Davies i Lowings, 2000., Davis i sur., 2005.). Svi genotipovi srodni virusu bjesnoće, osim *Lagos bat virusa*, uzrokuju bolest u čovjeka, koja se klinički ne razlikuje od bjesnoće uzrokovane klasičnim virusom (Smith, 1996.).

S obzirom da je riječ o bezuvjetno smrtonosnoj zoonozi, dijagnostički postupak pri ovoj bolesti mora biti nadasve brz, točan i jednostavan. Pravodobna i pouzdana je dijagnoza bitan čimbenik u svekolikoj prevenciji, budući da život čovjeka često ovisi o vremenu proteklom od dodira s bijesnom životinjom do cijepljenja.

Prepoznavanje bjesnoće do Pasteurovog vremena zasnivalo se samo na kliničkoj slici zaraženih ljudi i životinja te na njihovim – najčešće netipičnim – razudbenim nalazima. Poražavajuća je činjenica da se u pojedinim dijelovima nerazvijenog svijeta (Africi, Aziji) još uvijek, u trećem tisućljeću, nerijetko samo na taj način dijagnosticira ta pogubna bolest.

Postavljanje dijagnoze bjesnoće u živih životinja – samo na osnovi anamnestičkih podataka i kliničkih znakova – upitno je pa prema tome i vrlo rizično. Čak i u slučajevima kada su izvanjski znakovi vidno izraženi, moguće je tek opravdano posumnjati na bolest. No, pri imalo nejasnim stanjima, nužan je veliki oprez. Naime, bijesni psi i mačke u slučaju izostanka faze pojačanog uzbuđenja i agresivnosti

(*tiha bjesnoća!*) lako mogu biti prosuđeni kao – nezaraženi, što redovito završava kobno po ugrizene ljude. Jednako tako, osobe ugrizene od životinja oboljelih od posve drugih bolesti praćenih živčanim simptomima, kao što su primjerice bolest Aujeszzkoga, štenećak, bornanska bolest i toksoplazmoza u mačaka, bivaju nepotrebno podvrgnute postupku cijepljenja protiv bjesnoće. Zbog toga se kod svih uginulih ili usmrćenih klinički sumnjivih životinja dijagnoza obvezno mora potvrditi virološkim pretragama.

Kao i kod većine zaraznih bolesti, objektivna dijagnoza bjesnoće postavlja se na izravan i neizravan način isključivo u laboratorijskim uvjetima. U načelu, izravan dokaz temelji se na otkrivanju i prepoznavanju virusnog uzročnika, to jest njegovog antigena ili nukleinske kiseline u moždanom tkivu, slini ili likvoru. Neizravno se uzročnik bolesti potvrđuje nalazom specifičnih protutijela u krvnom serumu ili cerebrospinalnoj tekućini.

Začetnikom laboratorijske dijagnostike bjesnoće smatra se Zinke, koji je 1804. godine primijenio kuniće kao prve pokusne životinje u svrhu dokazivanja bolesti. No, gotovo tromjesečna inkubacija u kunića, kojima je slina klinički sumnjivih životinja bivala utrljana u skarificiranu kožu, činila je taj postupak, glede ugrizena čovjeka, dijagnostički bezvrijednim. Metodu je 1881. godine unaprijedio Pasteur nanoseći zarazni materijal izravno na površinu mozga trepaniranih kunića, skrativši time inkubaciju na najviše 14 dana, a uginuće na tri tjedna (cit. Karlović i Lojkić, 1987.).

Rutinska se dijagnostika bjesnoće do danas postupno usavršavala i uglavnom počiva na trima metodama: patohistološkoj pretrazi mozga s nalazom Negrijevih tjelešaca, dokazu virusa naciepljivanjem miševa ili stanične kulture te na otkrivanju virusnog antigena tehnikom imunofluorescencije.

Suvremena uporaba monoklonskih protutijela i enzimskih konjugata u imunoenzimnim testovima (ELISA) te primjena oligonukleotidnih početnica u metodi lančane reakcije polimerazom (PCR) višestruko je povećala osjetljivost i specifičnost tih postupaka pri otkrivanju virusa bjesnoće, kao i u dokazivanju njegova antigena ili nukleinske kiseline. Ipak, ponajprije zbog složenosti izvedbe i razmjerne skupocće, ti sofisticirani testovi nisu uvedeni u rutinsku dijagnostiku bjesnoće. Za sada oni služe za gensku tipizaciju lisavirusa te za razlikovanje mnogobrojnih sojeva klasičnog virusa bjesnoće s obzirom na životinjsku vrstu iz koje su izdvojeni i na geografsko podrijetlo tih životinja.

Serološke su pretrage, prije svega zbog primjene imunofluorescencije kao „zlatnog standarda“ u laboratorijskoj dijagnostici bjesnoće, također izgubile na svojoj važnosti u etiološkoj dijagnostici. Danas se one uglavnom rabe za provjeru imunog stanja ljudi i životinja nakon cijepljenja. Za kućne ljubimce, pse i mačke, provjera imuniteta je obvezatna prije njihova unosa u zemlje slobodne od bjesnoće, budući da strogi propisi tih zemalja ne priznaju potvrdu samo o cijepljenju. U europskim se pak državama, koje provode oralnu imunizaciju lisica protiv bjesnoće, serološkim postupcima istražuje nji-

hov imuni odziv u svrhu procjene uspješnosti takvih programa iskorjenjivanja bjesnoće. Od seroloških postupaka rabe se tri međunarodno priznata testa: virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN test), brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT) i imunoenzimni test (ELISA).

Ostali postupci kao npr. serum-neutralizacijski test na miševima (MNT), agar-gel imunodifuzija (AGID), reakcija vezanja komplementa (RVK), inhibicija hemaglutinacije (IHA) i radioimunološki test (RIA) u serološkoj dijagnostici bjesnoće primjenjuju se znatno rjeđe.

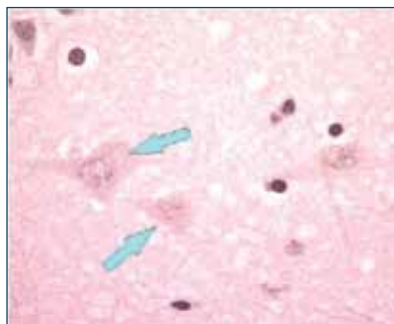
A) Etiološka dijagnostika bjesnoće

Patohistološka pretraga

Veliki iskorak u dijagnostici bjesnoće načinio je početkom prošlog stoljeća talijanski patolog A. Negri posebno opisujući specifične, eozinofilne, intracitoplazmatske uklopine u velikim ganglijskim stanicama mozga bijesnih životinja (Negri, 1903.), a koje su ubrzo, njemu u čast, nazvane njegovim imenom. Negrijeva tjelešca mogu se dokazati posebice u piramidnim stanicama Ammonovih rogova te u Purkinjevim stanicama malog mozga.

Prednosti histološke pretrage su brza i jednostavna provedba u vremenu od tek nekoliko sati, a njezin glavni nedostatak je upitna pouzdanost koja se kreće od 90-96% kod pasa, te 78-83% kod ostalih vrsta domaćih životinja (Schaff, 1941., cit. u Man-

ninger, 1959.). Uklopine se u neuronima počinju stvarati tek neposredno prije uginuća pa se u početnom stadiju bolesti, kod prijekvremeno utamanjenih životinja, većinom ne mogu dokazati. Zato stoji činjenica da dokaz Negrijevih tjelešaca u moždanom tkivu potvrđuje dijagnozu bjesnoće, ali je negativan nalaz ne isključuje.



Slika 1. Pozitivan patohistološki nalaz na bjesnoću; Negrijeva tjelešca u piramidnim stanicama Ammonovih rogova

Unatoč nedostatnoj vjerodostojnosti dobivenih nalaza, histološka se pretraga održala u dijagnostičkim laboratorijima, kao jedina brza metoda, više od pet desetljeća. Ipak, razvojem specifičnijih i osjetljivijih testova, ona danas u rutinskoj dijagnostici bjesnoće ima tek povijesno značenje.

Biološki pokus

Ucjepijavanjem zarazne sline izravno u mozak mišjoj sisančadi moguće je dokazati virus bjesnoće u oboljelih ljudi i životinja još za njihova života pa čak i prije pojave kliničkih simptoma bolesti. Nakon smrti, u istu svrhu rabi se 20%-tna suspenzija mozga umrlih osoba, ili ubijenih ili uginulih životinja (Koprowski, 1973.), a količina inokuluma iznosi 0.03 ml. S obzirom na to da

dio miševa može preživjeti infekciju u pokus se stavlja najmanje šest miševa. U slučaju pozitivna nalaza miševi ugibaju između 5. i 25. dana poslije infekcije, (p.i.), a uginuća se unutar prva četiri dana smatraju nespecifičnim.

Konačna se dijagnoza bjesnoće ne može postaviti samo na osnovi kliničkih simptoma ili uginuća pokusnih miševa, već se mora obvezatno potkrijepiti pretragom njihovih mozгова s ciljem dokazivanja virusnog antigena pomoću izravne imunofluorescencije (Goldwasser i Kissling, 1958.) ili izdvajanja virusa u kulturi stanica.

Dijagnostički postupak može se skratiti žrtvovanjem miševa iz usporedne pokusne skupine 4. i 7. dan p.i., uz istovjetnu primjenu imunofluorescencije ili postupka izdvajanja virusa (Kaplan 1966.).

Prema naputku Svjetske zdravstvene organizacije iz 1980. godine, biološki se pokus morao primijeniti pri svim dvojbenim imunofluorescentnim nalazima, kao i u slučajevima kada je klinički sumnjiva životinja ozlijedila čovjeka, a u koje je metodom imunofluorescencije dobiven negativan rezultat.

Tijekom pojave i širenja silvatične bjesnoće u Hrvatskoj, prije tridesetak godina, biološki pokus je služio i kao potpora imunofluorescenciji u slučaju pojave bjesnoće na nekom novom području ili pri prvom dokazu bolesti u pojedinih životinjskih vrsta.

Pouzdanost biološkog pokusa je gotovo apsolutna i procjenjuje se na oko 99%. (Kaplan, 1966.). No, vrijeme trajanja pokusa od čak 28 dana, potrebno za konačnu prosudbu rezultata pretrage, ograničava njegovu praktičnu vrijednost u rutinskoj dijagnostici bjesnoće.

Osim toga, uporaba pokusnih miševa u tu je svrhu, iz osnova zaštite životinja, u novije vrijeme potpuno napuštena, te zamijenjena jednako vrijednim postupkom izdvajanja i dokazivanja virusa u kulturi stanica. Zato se danas biološki pokus u svezi bjesnoće uglavnom još primjenjuje samo pri temeljito opravdanim znanstvenim istraživanjima.

Izdvajanje virusa u kulturi stanica

Objektivna dijagnoza bjesnoće može se, razmjerno brzo, postaviti umnažanjem virusa u odgovarajućoj kulturi stanica neposrednim naciepljivanjem slina, cerebrospinalne tekućine ili suspenzije moždanog tkiva zaraženih ljudi i životinja.

Za izvođenje se testa rabi linijska kultura stanica mišjih neuroblastoma, budući da su te stanice najosjetljivije na infekciju terenskim sojevima virusa bjesnoće (Bourthy i sur., 1989.). Konačno prepoznavanje virusa postiže se pretraživanjem inficirane stanične kulture imunofluorescentnom tehnikom.

Postupak je u prvom redu namijenjen potvrđivanju nalaza dobivenih otkrivanjem virusnog antigena pomoću izravne imunofluorescencije te za daljnje istraživanje bitnih značajki izdvojenih sojeva virusa.

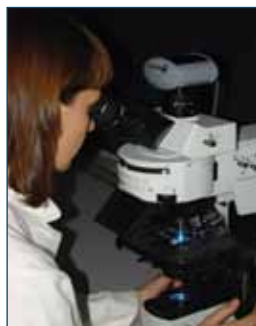
Tim se postupkom moraju pretražiti sve životinje u kojih je imunofluorescencijom dobiven upitan ili negativan nalaz, a klinička slika i anamnestički podaci upućuju na moguću bjesnoću. Poglavitito je to nužno učiniti u slučajevima dodira ljudi s takovim životinjama (WHO, 1980.).

U odnosu na klasičan biološki pokus, metoda izdvajanja virusa u staničnoj kulturi ima niz znatnih prednosti: skraćuje vrijeme dijagnoze na najviše tri dana, ne zahtijeva uporabu pokusnih životinja i znatno je jeftinija za izvođenje. Činjenica da je ovaj test jednako osjetljiv, a ponekad i osjetljiviji od biološkog pokusa (Rudd i sur., 1980.), presudan je razlog što je kultura stanica u novije vrijeme posve zamijenila pokusne miševe u laboratorijskoj dijagnostici bjesnoće.

Imunofluorescentni test

Imunofluorescentni test (IFT), test fluorescentnih protutijela (FAT = fluorescent antibody test) ili uobičajeno i kraće - imunofluorescencija (IF) je serološka metoda koja je u dijagnostiku bjesnoće uvedena sredinom prošlog stoljeća (Goldwasser i Kissling, 1958.), a još i danas predstavlja izborni postupak u rutinskoj dijagnostici bjesnoće u svim referentnim laboratorijima diljem svijeta.

Metoda je svojevrsna i veoma osjetljiva te objedinjuje točnost biološkog pokusa i brzinu patohistološke pretrage. Pomoću nje moguće je dobiti pouzdanu dijagnozu već u roku od 2-3 sata nakon dostave dijagnostičkog



Slika 2. Imunofluorescentni test; mikroskopsko pretraživanje preparata moždanog tkiva na bjesnoću

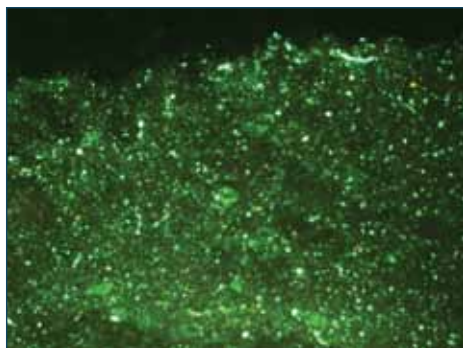
materijala u laboratorij. Prednost ove metode je i što se virusni antigen može dokazati čak i u djelomice raspadnutom uzorku tkiva.

Test se zasniva na mikroskopskoj pretrazi otisnutih preparata, razmaza ili smrznutih rezova moždanog tkiva, prethodno obrađenih sa specifičnim gamaglobulinom obilježenim fluorescentnom bojom. Kao antigen za pripremanje gamaglobulina služi virusni nukleoprotein s kojim se postiže izuzetno visoka specifičnost i dobar titar, a za bojenje se rabi fluorescein-izotiocianat (FITC) (Bourthy i sur., 1989.). Na taj su način pripravljeni, stručno nazvani *konjugati*, komercijalno dostupni od raznih proizvođača.

U pozitivnom se slučaju FITC-om obilježena serumska protutijela nepovratno vežu na virusni antigen u istraživanom tkivu, a nalaz se očituje u vidu jasno ograničenih, okruglih ili ovalnih, manjih ili većih tvorbi koje pod ultraljubičastim svjetlom mikroskopa fluoresciraju zelenom bojom. Riječ je o brojnim nakupinama antigenskih čestica koje zbog svoje sićušnosti nisu histološki prepoznatljive kao Negrijeva tjelešca.

Na ovaj se način isto tako mogu pretraživati kulture stanica i tkiva pokusnih životinja nakon infekcije virusom bjesnoće, a specifična monoklonska protutijela, primijenjena u ovoj tehnici, doprinijela su jednostavnijoj i bržoj genetskoj tipizaciji novo izdvojenih terenskih sojeva.

Metoda izravne imunofluorescencije rabi se, kao neprijeporan dijagnostički postupak, u virološkim laboratorijima Hrvatskog veterinarskog instituta od 1976. godine i njome je u protekle 33 go-



Slika 3. Imunofluorescentni test; mikroskopska slika pozitivna nalaza na bjesnoću – moždano tkivo jazavca

dine na bjesnoću pretraženo više od 96 000 različitih divljih i domaćih životinja.

Kornealni test

Kornealni je test (CT = cornea test) u laboratorijsku dijagnostiku bjesnoće uveo Schneider 1969. godine. Njime se pomoću izravne imunofluorescencije dokazuje prisutnost virusa u epitelnim stanicama rožnice već prvih dana bolesti, štoviše i prije pojave kliničkih znakova u bolesnika (Koch i sur., 1975.) te prirodno ili pokusno zaraženih životinja. Virus bjesnoće u rožnici ostaje trajno i može se otkriti u svim stadijima bolesti.

Pacijentu s encefalitičnim simptomima otisak se s rožnice uzima laganim dodiranjem predmetnog stakalca na njezin središnji dio. Nakon fiksiranja preparata, virusni se antigen otkriva uobičajenim postupkom izravne imunofluorescencije i dijagnoza se postiže već u roku od nekoliko sati. Pozitivan rezultat ovog testa potvrđuje bjesnoću, ali je ni negativan nalaz ne isključuje.

Imunofluorescentnim se testom mogu pretražiti i uzorci kože ljudi sumnjivih na zarazu (WHO, 1992.).

Koža se uzima s nuhalnog područja vrata zajedno s dlačnim folikulima koji sadržavaju periferne živce, a virus se bjesnoće u tom tkivu može dokazati već u najranijoj fazi bolesti. Tim se postupkom, pomoću kojeg je moguće razlučiti razne kliničke encefalitise pozitivni rezultati na početku bolesti mogu dobiti samo kod manjeg broja pacijenata. Napredovanjem bolesti povećava se broj pozitivnih nalaza, a u završnom stadiju virus ponovo može nedostajati u biopsiranom tkivu.

Ukupna osjetljivost testa veća je u uzorcima kože nego li u kornealnim otiscima, ali je za ishod pretrage u oba slučaja od presudnog značaja kakvoća uzetih uzoraka (WHO, 1992.).

Lančana reakcija polimerazom

Napredak molekularne biologije i nove spoznaje o strukturi virusnih proteina i sastavu nukleinske kiseline virusa bjesnoće, zajedno s razvojem sofisticiranih dijagnostičkih sredstava, pridonijeli su izradi osjetljivijih, specifičnijih i bržih testova u dijagnostici bjesnoće. Jedan od njih je test lančane reakcije polimerazom (PCR = polymerase chain reaction) za brzo otkrivanje svih sedam, do danas poznatih, genotipova virusa bjesnoće (Whitby i sur., 1997., Kulonen i sur., 1999.).

U načelu, tipizaciju lisavirusa kao i razlikovanje sojeva klasičnog virusa bjesnoće omogućila je uporaba specifičnih oligonukleotidnih početnica za svaki pojedini genotip virusa bjesnoće te određivanje nukleotidnog slijeda (sekvenciranje) pojedinih odsječaka genoma, praćenih filogenetskom analizom. Cijeli postupak

od izdvajanja virusne ribonukleinske kiseline (RNK) do RT-PCR (= Reverse Transcription PCR) traje oko 6 sati i osjetljiviji je od testa imunofluorescencije u slučajevima kada je moždano tkivo u raspadnutom stanju.

Radi što bržeg otkrivanja virusa sve se više primjenjuje tzv. RT-PCR u stvarnom vremenu (= real-time RT-PCR) koji ne zahtijeva uporabu elektroforeze nakon završetka testa, čime se bitno skraćuje vrijeme njegove provedbe.

At-cPCR (= air thermo-cycler PCR) je najbrži postupak pomoću kojeg je već unutar pet sati moguće s apsolutnom sigurnošću prepoznati sojeve klasičnog virusa bjesnoće i njemu srodne lisaviruse (Heaton i sur., 1999.).

PCR-ELISA u obliku gotovih kitova suvremeni je test za otkrivanje svih genotipova virusa bjesnoće u mozgu, slini i cerebrospinalnoj tekućini ljudi i životinja te u kulturi stanica i tkivima pokusnih životinja.

Imunoenzimni test

Imunoenzimni je test (ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay) također jednostavan, brz, osjetljiv i specifičan postupak za otkrivanje nukleokapsidnog antigena virusa bjesnoće u moždanom tkivu, slini i likvoru oboljelih ljudi i životinja. Uporabom gotovih, komercijalno dostupnih kitova, ovim se testom može dokazati virus i u inficiranim kulturama stanica te tkivima pokusno zaraženih životinja. Tehnika je nadasve korisna u svrhu epidemiološkog prosuđivanja bjesnoće (WHO, 1992.).

S ELISA testom poznatim i kao *brza enzimska imunodijagnoza bjesnoće* (RREID

= rapid rabies enzyme immunodiagnosis) moguće je virusni antigen učiniti vidljivim golim okom pa se pomoću specijalnih kitova pretraga na bjesnoću može obaviti i u terenskim uvjetima (Perrin i sur., 1992.). Testom se mogu pretraživati i djelomično autolitični uzorci tkiva, ali ne i uzorci prethodno konzervirani u formalinu (WHO, 1992.).

Posljednjih godina razvijen je novi kvantitativni postupak za otkrivanje virusa bjesnoće pomoću ovog testa. Metoda nazvana N-ELISA temelji se na određivanju količine viriona, prihvaćenih u jažicama mikroplitice, pomoću specifičnih poliklonskih protutijela virusa bjesnoće (Katayama i sur., 1999.).

B) Serološka dijagnostika bjesnoće

Virus-neutralizacijski imunofluorescentni test

Virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN test = fluorescent antibody virus neutralization test) je fluorescentni serološki postupak koji je Međunarodni ured za epizootije (O.I.E.) predložio za dokazivanje neutralizacijskih protutijela u krvnim serumima pasa, mačaka i lisica cijepljenih protiv bjesnoće (Aubert i sur., 1996., Cliquet i sur., 1998.).

Postupak virusne neutralizacije izvodi se u kulturi stanica bubrega hrčka (BHK-21) u mikrotitarskim pliticama, a neutralizacijski učinak protutijela vidljivim se učini uobičajenom tehnikom imunofluorescencije.

U testu se rabe soj virusa bjesnoće CVS 11 (Challenge Virus Standard), kontrolni pozitivni serum (O.I.E.-Standard), kontrolni negativni serum i standardni

IF-konjugat (FITC anti-rabies monoclonal globulin). Sam postupak traje dva dana, a konačna visina titrova protutijela u ispitujućim se serumima uspoređuje s titrom dobivenim u kontrolnom serumu (Cliquet i sur., 1998.). Vrijednost titrova jednaka ili viša od 0.5 I.U./ml je međunarodno prihvaćena kao pokazatelj uspješnosti imunizacije. Naime, to je najniži titar koji zaštićuje životinje od pokusne infekcije, s obzirom na to da u cijepljenih pasa i mačaka s titrovima višim od 0.5 I.U./ml nisu utvrđeni klinički slučajevi bjesnoće (Aubert, 1993.).

Osim u istraživanjima imunitetnog stanja lisiče populacije u okviru kampanja oralnog cijepljenja protiv bjesnoće (Pastoret i Brochier, 1998.) FAVN test nalazi primjenu i u neizostavnoj kontroli imuniteta profilaktički cijepljenih pasa i mačaka sa svrhom izdavanja uredovnih potvrda za njihov nesmetani unos u bjesnoćom nezaražena područja, kao što su primjerice sve skandinavske zemlje, Velika Britanija, Australija, Novi Zeland i dr. (WHO, 1992.).



Slika 4. Serološka dijagnostika bjesnoće; virus neutralizacijski imunofluorescentni test

Brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta

Brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT = rapid fluorescent fo-

cus inhibition test) je isto fluorescentni serološki postupak za dokazivanje neutralizacijskih protutijela virusa bjesnoće i jedan je od testova izbora u rutinskoj serologiji (Smith i sur., 1973.).

Prema preporuci Svjetske zdravstvene organizacije ovim se visoko specifičnim i osjetljivim testom provjerava imuni odgovor osoba cijepljenih protiv bjesnoće inaktiviranim cjepivima proizvedenim u kulturi stanica. Stručnjaci WHO-a ujedno predlažu da se serum-neutralizacijski test na miševima (MNT = mouse serum neutralization test) pri mjerenju razine protutijela u krvnom serumu ili likvoru necijepljenih pacijenata zamijeni s RFFIT-om, budući da je on brži i jednako osjetljiv kao i MNT (WHO, 1992.). Međunarodni ured za epizootije pak zagovara RFFIT za prosudbu imuniteta oralno cijepljenih lisica, dok za serološko pretraživanje profilaktički imuniziranih pasa i mačaka ovaj postupak nije međunarodno prihvaćen.

Načelo testa ogleda se u sposobnosti serumskih protutijela da spriječe infekciju stanica referentnim sojem virusa bjesnoće (CVS 11) te u završnom prepoznavanju tog učinka tehnikom izravne imunofluorescencije pomoću standardnog IF-konjugata. Pritom se u logaritamski razrijeđenim ispitujućim serumima utvrđuju titrovi neutralizacijskih protutijela i zatim uspoređuju s titrom kontrolnog pozitivnog seruma (Sureau i sur., 1982.).

U suštini, glede osnovnih ingrediencija pa i samog načina izvođenja postupka, RFFIT je veoma nalik FAVN testu. Razlikuju se samo po tome što se kod RFFIT-a primjenjuje novi klon

stanične kulture (BSR Cl13) i drugačiji kontrolni pozitivni serum (WHO-Standard) te što se u završnom dijelu postupka, poradi lakšeg očitavanja rezultata, uobičajene mikrotitarske plitice zamjenjuju manjim tzv. Terasaki pliticama. Najniža vrijednost titra neutralizacijskih protutijela, koja jamči zadovoljavajuću imunost, i pri ovom je testu 0.5 I.U./ml (WHO, 1992.).

Imunoenzimni test

Imunoenzimni testovi (ELISA), namijenjeni određivanju razine neutralizacijskih protutijela za virus bjesnoće u krvnom serumu ili plazmi pomoću pročišćenog virusnog glikoproteina, za sada su u uporabi pretežito u humanoj medicini. Doduše, usavršenim ELISA testnim sustavima, temeljenim na stafilokoknom (*Staphylococcus aureus*) proteinu A, mogu se na prisutnost protutijela za glikoprotein virusa bjesnoće u serumu, osim ljudi, pretraživati i pojedine životinjske vrste (pas, mačka, miš, zamorče, kunić, majmun). No, većina od bjesnoće slobodnih zemalja (Švedska, Norveška, Finska, Velika Britanija, Australija, Novi Zeland) ne priznaje ovaj postupak kao referentnu metodu za ocjenu imunitetnog stanja pasa i mačaka zaštitno cijepljenih protiv bjesnoće.

Ni za potrebe epidemioloških istraživanja kod divljih životinja, u smislu pratećih pretraga pri oralnoj imunizaciji lisica, ne postoje još primjereni ELISA testovi. Uporaba komercijalno dostupnih testova za tu namjenu iziskuje ponajprije jednu iscrpnu validaciju testnog sustava.

Prednosti imunoenzimne metode su što se u razmjerno kratkom vremenu

(3-4 sata) može pretražiti veliki broj seruma, što se u testu ne rabi živi virus te što se primjenom specijalnih komercijalnih kitova test može provesti i u terenskim uvjetima (Sureau i sur., 1982.).

Uporaba ELISA testa preporučuje se i u slučajevima sumnjivih nalaza dobivenih virus-neutralizacijskim testovima. Ipak, u odnosu na FAVN test i RFFIT, ELISA je manje osjetljiva metoda jer se u mjerenja, osim protutijela virusa bjesnoće, ponekad uključuju i razna druga protutijela, a i moguća bakterijska zagađenja mogu negativno utjecati na vjerodostojnost rezultata pretrage.

Sažetak

Dijagnostika bjesnoće, s obzirom na značaj te bolesti, od koje prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije na godinu umire do 55000 ljudi, mora biti nadasve brza, točna i pouzdana.

U rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici, za dokaz virusnog antigena, izborni postupak je tehnika fluorescentnih antitijela (FAT ili imunofluorescencija). Patohistološka pretraga moždanog tkiva na prisutnost Negrijevih tjelešaca već je odavno napuštena i danas ima tek povijesno značenje, a biološki pokus na miševima zamijenjen je jednako vrijednim postupkom izdvajanja virusa u kulturama stanica neposrednim naciepljivanjem sline, cerebrospinalne tekućine ili suspenzije moždanog tkiva zaraženih ljudi i životinja.

Objektivna dijagnoza može se vrlo brzo postaviti i pomoću imunoenzimnih testova (ELISA) te lančanom

reakcijom polimerazom (PCR). Potonja metoda, unatoč svoje velike osjetljivosti i specifičnosti u otkrivanju virusa bjesnoće te u dokazivanju njegova antigena ili nukleinske kiseline, ponajprije zbog složenosti izvedbe i razmjerne skupoće, nije uvedena u rutinsku dijagnostiku bjesnoće. Za sada ona služi za gensku tipizaciju lisavirusa te za razlikovanje mnogobrojnih sojeva klasičnog virusa bjesnoće.

U serološkoj dijagnostici rabe se tri standardizirane metode: imunoenzimni test (ELISA), virus-neutralizacijski imunofluorescentni test (FAVN-test) i brzi test inhibicije fluorescentnih žarišta (RFFIT). Njima se, dokazom specifičnih protutijela u krvnim serumima, provjerava imuni odaziv ljudi i životinja nakon cijepjenja protiv bjesnoće.

Literatura

1. AUBERT, M. F. A. (1993): Can vaccination validated by the titration of rabies antibodies in serum of cats and dogs be an alternative to quarantine measures? Bureau Hygiene Top. Dis. 68, 2-22.
2. AUBERT, M. F. A., F. CLIQUET and J. BARRAT (1996): Rabies. OIE Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, 3rd edn. Office Internat. Epizoot., Paris, 207.
3. BOURTHY, H., P. E. ROLLIN, J. VINCENT and P. SUREAU (1989): Comparative Field Evaluation of the Fluorescent-Antibody Test, Virus Isolation from Tissue Culture, and Enzyme Immunodiagnosis for Rapid Laboratory Diagnosis of Rabies. J. Clin. Microbiol. 27 (3), 519-523.
4. BOWEN-DAVIES, JENNY and P. LOWINGS (2000): Current perspectives on rabies. 1. The biology of rabies and

- rabies-related viruses. In *Practice* 22, 118-124.
5. CLIQUET, F., M. F. A. AUBERT and L. SAGNÉ (1998): Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods* 212, 79-87.
 6. DAVIS, P. L., E. C. HOLMES, F. LARROUS, W. H. M. VAN DER POEL, K. TJORNEHOJ, W. J. ALONSO and H. BOURTHY (2005): Phylogeography, population dynamics and molecular evolution of european bat lyssaviruses. *J. Virol.* 79, 10487-10497.
 7. GOLDWASSER, R. A. and R. E. KISSLING (1958): Fluorescent Antibody Staining of Street and Fixed Virus Antigens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98, 219-223.
 8. GOULD, A. R., A. D. HYATT, R. LUNT, J. A. KATTENBELT, S. HENGSTBERGER and S. D. BLACKSELL (1998): Characterization of a novel lyssavirus isolated from Pteropid bats in Australia. *Virus Res.* 54, 165-187.
 9. HEATON P. R., LORRAINE M. McELHINNEY and P. LOWINGS (1999): Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J. Virol. Methods* 81 (1-2), 63-69.
 10. KAPLAN, M. M. (1966): The laboratory in the diagnosis and prevention of rabies. *WHO Monogr. Ser.* 23, 11-16.
 11. KARLOVIĆ, M. i M. LOJKIĆ (1987): Dijagnostika bjesnoće od Pasteura do danas. *Vet. stanica* 18 (3), 151-156.
 12. KATAYAMA, Sh., M. YAMANAKA, S. OTA and Y. SHIMIZU (1999): A new quantitative method for rabies virus by detection of nucleoprotein in virion using ELISA. *J. Vet. Med. Sci.* 61 (4), 411-416.
 13. KING, A. A. and J. CRICK (1988): Rabies-related viruses. In: CAMPBELL, J. B. and K. M. CHARLTON (Eds.): *Rabies*. Kluwer Academic Publishers, Boston, 177-199.
 14. KOCH, F. J., J. W. SAGARTZ, D. E. DAVIDSON and K. LAWHASWASDI (1975): Diagnosis of human rabies by the cornea test. *Am. J. Clin. Pathol.* 63 (4), 509-515.
 15. KOPROWSKI, H. (1973): The mouse inoculation test. *WHO Monogr. Ser.* 23, 85-93.
 16. KULONEN, K., M. FEKADU, S. WHITFIELD and C. K. WARNER (1999): An Evaluation of Immunofluorescence and PCR Methods for Detection of Rabies in Archival Carnoy-Fixed, Paraffin-Embedded Brain Tissue. *J. Vet. Med. B* 46, 151-155.
 17. MANNINGER, R. (1959): *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere, Infektionskrankheiten, Wutkrankheiten. Lyssa*. WEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 637-668.
 18. NEGRI, A. (1903): Beitrag zum Studium der Aetiologie der Tollwut. *Ztschr. Hyg. Infektionskr.* 43, 507-528.
 19. PASTORET, P.-P. and B. BROCHIER (1998): Epidemiology and Elimination of Rabies in Western Europe. *Vet. J.* 156, 83-90.
 20. PERRIN, P., C. GONTIER, E. LECOCQ and H. BOURTHY (1992): A modified rapid enzyme immunoassay for the detection of rabies and rabies-related viruses: RREID-lyssa. *Biological* 20, 51-58.
 21. RUDD, R. J., CH. V. TRIMARCHI and M. K. ABELSETH (1980): Tissue Culture Technique for Routine Isolation of Street Strain Rabies Virus. *J. Clin. Microbiol.* 12 (4), 590-593.
 22. SCHNEIDER, L. G. (1969): The cornea test; a new method for the intra-vitam diagnosis of rabies. *Zbl. Vet. Med. B.* 16, 24-31.
 23. SCHNEIDER, L. G. and J. H. COX (1994): Bat lyssaviruses in Europe. In: RUPPRECHT, C. E., B. DIETZSCHOLD, H. KOPROWSKI (Eds.), *Lyssaviruses*. Springer-Verlag, Berlin, 207-218.
 24. SMITH, J. S., P. A. YAGER and G. M. BAER (1973): A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO* 48, 535-541.
 25. SMITH, J. S. (1996): New aspects of ra-

- bies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of the disease in the United States. *J. Clin. Microbiol. Rev.* 9, 166-176.
26. SUREAU, P., P. E. ROLLIN and H. ZELLER (1982): Corrélations entre l'éprouve immunoenzymatique, la séro-neutralisation et la réduction de foyers fluorescents pour le titrage des anticorps rabiques. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 5, 143-150.
 27. WHITBY, J. E., P. R. HEATON, H. E. WHITBY, E. O'SULLIVAN and P. JOHNSTONE (1997): Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and emzymelinked immunosorbent assay. *J. Virol. Methods* 69 (1-2), 63-72.
 28. WHO (1980): Rabies. Report of WHO consultation on rabies prevention and control 188, 1-43. World Health Organization, Geneva.
 29. WHO (1992): Expert Committee on Rabies, Geneva. Technical Report Series No. 824, 7-10.
 30. ZANONI, R. G., A. KAPPELER, U. M. MÜLLER, Ch. MÜLLER, A. I. WANDLER and U. BREITENMOSE (2000): Tollwutfreiheit der Schweiz nach 30 Jahren Fuchstollwut. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 142 (8), 423-429.

Laboratory diagnosis of rabies

Željko ČAČ, DVM, Ph.D., Scientific Associate, Ivana LOJKIĆ, Ph.D., Scientific Associate, Tomislav BEDEKOVIĆ, DVM, Assistant, Mirko LOJKIĆ, DVM, Ph.D., Full Professor, Croatian Veterinary Institute, Zagreb

Regarding to the importance of the disease, rabies diagnosis must be rapid, specific and accurate. According to the WHO data, 55000 people are dying from rabies every year.

In routine laboratory diagnosis of Rabies infection, fluorescent antibody technique (FAT) is a method of choice. Pathohistological detection of the Negri bodies in the brain tissue has only the historical importance today. Biological experiments on mice were replaced with virus isolation in cell culture from saliva, cerebrospinal fluid or brain tissue suspension of infected humans and animals.

Objective diagnosis could be obtained rapidly using immunoenzyme

methods (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR). Regardless of accuracy and specificity, PCR method is not included in routine diagnosis of rabies, but it is necessary for molecular characterization of Lyssaviruses and rabies virus strain differentiation.

Three standardized methods have application in serology: ELISA, fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN) and rapid fluorescence focus inhibition test (RFFIT). Those tests serve for control of immune status after anti rabies vaccination of humans and animals.