

Dijagnostičke metode u virologiji

Žugaj, Manuela

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:808557>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

DIJAGNOSTIČKE METODE U VIROLOGIJI

DIAGNOSTIC METHODS IN VIROLOGY

Manuela Žugaj

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Silvije Černi

SADRŽAJ:

1	UVOD	1
2	MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE VIRUSA	2
2.1	Lančana reakcija polimerazom (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>).....	2
2.2	Lančana reakcija polimerazom s prethodnom reverznom transkripcijom.....	5
2.3	Kvantitativna lančana reakcija polimerazom	5
2.4	<i>In situ</i> hibridizacija	6
2.5	Southernova i northernška metoda otiska.....	7
3	SEROLOŠKE DIJAGNOSTIČKE METODE	10
3.1	Test ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	10
3.2	Westernska metoda otiska	14
3.3	Imunofluorescencija i enzimski imunotest (EIA).....	15
3.4	Inhibicija hemaglutinacije	17
3.5	Precipitacijske imunodifuzijske tehnike	18
4	MIKROSKOPIJA	19
5	LITERATURA	20
6	SAŽETAK	22
7	SUMMARY	23
8	ŽIVOTOPIS	24

1 UVOD

Virusi su obligatni unutarstanični paraziti čija replikacija ovisi o biokemijskim procesima stanice domaćina. Osnovni oblik virusa sastoji se od nukleinske kiseline (RNA ili DNA) okružene proteinskim omotačem. Neki virusi imaju dodatnu ovojnicu građenu od lipida, proteina i glikoproteina. Virologija je znanost koja se bavi ovim malim, ali medicinski značajnim biološkim entitetima. Važno je poznavati njihovu strukturu, oblik i genetički materijal jer upravo ta svojstva omogućuju njihovu replikaciju, rasprostranjivanje i infektivnost (Murray i sur., 2015). Budući da virusi uzrokuju razne bolesti, ljudima je posebno važno proučavati ih i pronalaziti dijagnostičke metode kojima bi ih identificirali i u konačnici spriječili razvoj bolesti. Dijagnoza podrazumijeva otkrivanje bolesti i njezinog uzročnika pomoću različitih dijagnostičkih metoda o kojima će više biti rečeno u ovom radu. Glavna podjela dijagnostičkih metoda je na: molekularne metode, koje se bave detekcijom virusnih nukleinskih kiselina proteina; serološke metode, koje se temelje na interakciji antitijela i antigena te mikroskopsko pretraživanje tkiva i stanica koje su promijenjene pod utjecajem virusne aktivnosti.

Također, virusi se mogu uzgajati u kulturama stanica, no kako je taj proces znatno sporiji od ostalih metoda i koristi se za potrebe biološke karakterizacije (Louten, 2016.).

Obzirom na nedavno nastalu pandemiju (širenje zarazne bolesti globalnih razmjera) bolesti COVID-19, naučili smo kako je važno razvijati brze i pouzdane dijagnostičke metode zbog brzog razvoja bolesti kod virusnih zaraza te radi sprječavanja nekontroliranog rasprostranjivanja virusa (Kennedy, 2005).

2 MOLEKULARNE METODE DETEKCIJE VIRUSA

Molekularna dijagnostika temelji se na detekciji virusne nukleinske kiseline, DNA (deoksiribonukleinska kiselina) ili RNA (ribonukleinska kiselina), te virusnih proteina u kliničkim uzorcima. Prednost molekularnih metoda je njihova osjetljivost (mogućnost detekcije vrlo niskih koncentracija nukleinskih kiselina u tkivu), specifičnost (raspoznavanje srodnih sojeva koji se razlikuju već samo u jednom nukleotidu) i njihova brzina koja omogućuje rano otkrivanje zaraze i praćenje tijeka bolesti. Također nije potrebna izolacija potencijalno zaraznih virusnih čestica, što osigurava veću sigurnost rada s uzorcima. (Murray i sur., 2015). Još jedna prednost ovih metoda je detekcije virusa koji se ne mogu kultivirati, kao što su humani papiloma virusi, parvovirusi i virusi hepatitisa. Također, omogućuju otkrivanje virusa koji su latentno prisutni u stanicama.

Nedostatak molekularnih metoda detekcije virusa je korištenje skupe opreme, potreba za visoko educiranom radnom snagom te moguća križna kontaminacija uzoraka u laboratoriju.

Metode umnažanja virusne nukleinske kiseline se najčešće koriste, a u njih spadaju lančana reakcija polimerazom i njene inačice. Rjeđe se koriste metode detekcije virusne nukleinske kiseline hibridizacijom (Southernova i northernška metoda otiska), ali je hibridizacija *in situ* vrlo korisna za detekciju virusnih čestica direktno u tkivu. Također, postoje molekularne metode koje detektiraju proteine, kao što je npr. metoda točkastog otiska (*dot blot*), i tehnike za analizu rezultata (elektroforeza i sekvenciranje) koje mogu koristiti proteine i nukleinske kiseline.

Zbog razvoja tehnologije, dostupnosti opreme u laboratorijima, brzine i osjetljivosti, molekularne metode se sve više koriste u odnosu na serološke metode detekcije i uzgoja virusa u kulturi (Made Artika i sur., 2020).

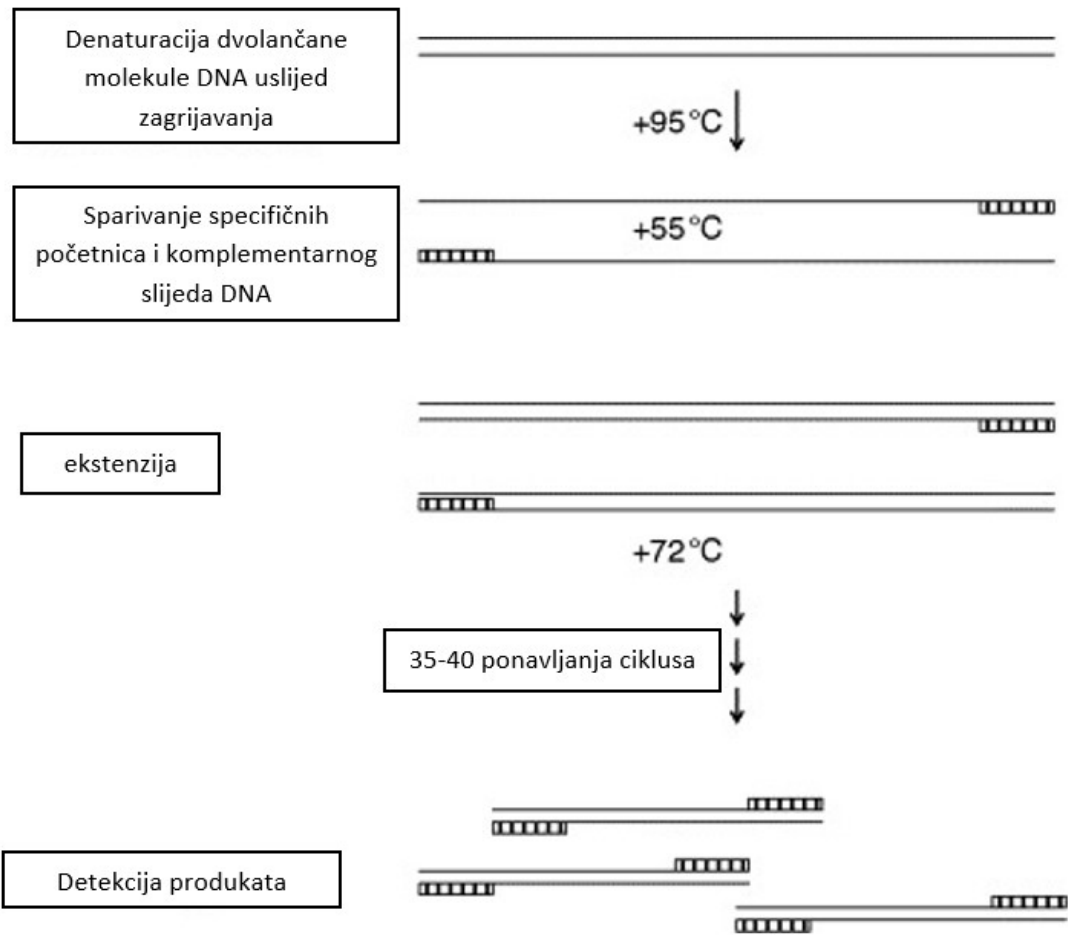
2.1 Lančana reakcija polimerazom (PCR, *polymerase chain reaction*)

Lančana reakcija polimerazom (PCR) je metoda koja u kratkom vremenu stvara puno kopija željenog slijeda virusne molekule DNA iz kliničkog uzorka (obično iz krvnih stanica ili tkiva). Nakon izolacije iz uzorka, molekula DNA inkubira se s oligomernim početnicama komplementarnim krajevima željenog slijeda molekule DNA koji želimo umnožiti, DNA-polimerazom, nukleotidima i odgovarajućim puferom. Reakcijska smjesa stavlja se u PCR uređaj (Slika 1) koji prilagođava temperaturu smjese.

Reakcija se odvija u tri stadija: denaturacija, sparivanje i ekstenzija (Slika 2). U prvom koraku lanci dvolančane DNA molekule se razdvajaju (denaturiraju) pod utjecajem visoke temperature (oko 95°C). Zatim se temperatura snizi kako bi se omogućilo vezanje početnica na komplementarne dijelove lanca (oko 55°C). Konačno, temperatura se prilagodi optimalnoj temperaturi pri kojoj je aktivna DNA-polimeraza (oko 72°C). U ovom slučaju taj enzim je izoliran iz termofilne bakterije te podnosi temperaturu pri kojoj dolazi do denaturacije DNA molekule. Enzim sintetizira nove lance od krajeva početnica u smjeru 5' prema 3' dodavanjem nukleotida iz otopine. Na taj način iz jedne DNA molekule dobivamo dvije kopije. Opisana tri koraka se ponavljaju u 20-40 ciklusa te se početna ciljana sekvenca umnoži eksponencijalno i do milijun puta u nekoliko sati. Za analizu dobivenih kopija koristi se elektroforeza na agaroznom gelu ili sekvenciranje. Zbog brzine i jednostavnosti i osjetljivosti ova metoda se najčešće koristi u dijagnozi virusnih bolesti (Murray i sur., 2015.; Louten, 2016.)



Slika 1 Uređaj u kojem se odvija lančana reakcija polimerazom (<https://www.sensoquest.de/what-is-a-thermocycler/?lang=en>)



Slika 2 Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom. Prvi korak: denaturacija dvolančane DNA molekule; drugi korak hibridizacija početnica; treći korak: sinteza novih lanaca.

Ponavljanje ciklusa 30-40 puta te detekcija produkata.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128905/>)

2.2 Lančana reakcija polimerazom s prethodnom reverznom transkripcijom

Za viruse s RNA genomom (kakav je primjerice SARS-CoV-2) se koristi metoda lančana reakcija polimerazom uz prethodnu transkripciju tzv. RT-PCR. Uključuje korake klasične PCR tehnike opisane u prethodnom poglavlju, ali izoliranu RNA molekulu prije umnažanja treba prepisati reverznom transkripcijom u komplementarnu DNA molekulu (cDNA). To se postiže korištenjem enzima reverzna transkriptaza dobivenog iz retrovirusa (Louten, 2016.).

Ovakva reakcija se može provesti u jednom ili dva koraka. U prvoj verziji se reverzna transkripcija i umnažanje sekvenci odvijaju u istoj reakcijskoj smjesi. Na taj način se dobivaju brzi rezultati, ali je izazov optimizirati te dvije reakcije. Druga opcija je odvijanje reakcija u odvojenim epruветama, se omogućuje i nešto veća osjetljivost od prvog slučaja, ali zahtijeva više vremena (Udugama i sur., 2020).

2.3 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

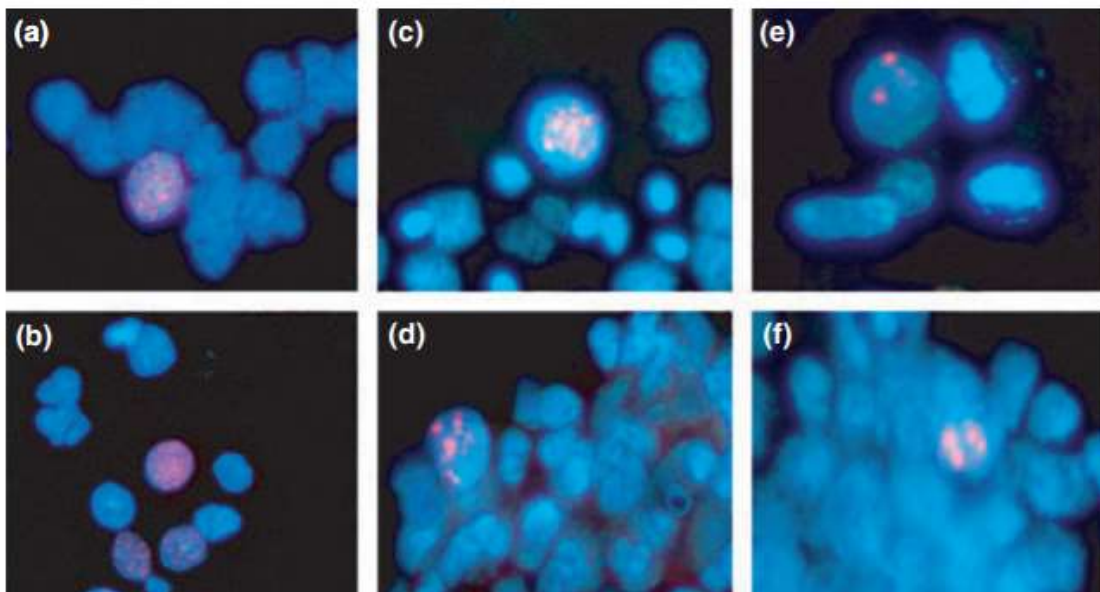
Kvantitativni PCR je vrlo korisna metoda za kvantificiranje virusnog materijala u uzorku uz istovremeno praćenje reakcije u stvarnom vremenu. Ako se u materijalu nalazi više molekula DNA (ili RNA koja se mora reverzno transkribirati), više će se novih molekula DNA replicirati u PCR reakciji, što znači da je brzina reakcije proporcionalna količini nukleinskih kiselina u uzorku (Murray i sur., 2015). Ova varijanta klasične PCR metode omogućuje bolju osjetljivost, reproducibilnost, brzinu, smanjuje rizik od kontaminacije te uključuje vizualizaciju rezultata u svakom trenutku reakcije pa ne zahtijeva detekciju rezultata elektroforezom ili nekom drugom metodom. Također, ova metoda omogućava istodobno otkrivanje i analizu nekoliko različitih nukleinskih kiselina tj. detekciju više virusa iz jednog uzorka. Najčešći pristup ove metode koristi fluorescentnu boju koja se veže za molekulu DNA, slično kao etidijev bromid. Uređaj u kojem se odvija reakcija kontinuirano prati fluorescenciju u svakom ciklusu. Intenzitet fluorescencije se povećava kako se povećava koncentracija novonastalih molekula DNA. Jedna od primjena kvantitativnog PCR je praćenje efikasnosti terapije kod infekcije s virusima kao što je virus HIV (Mackay i sur., 2002.; Vainionpää & Leinikki, 2008; Modrow i sur., 2013; Vero i sur., 2017).

2.4 *In situ* hibridizacija

Hibridizacija *in situ* omogućuje preciznu lokalizaciju virusa u histološkom uzorku (tkivo najčešće dobiveno biopsijom) ili razmazu stanica pomoću komplementarnih oligonukleotidnih proba (RNA ili DNA probe). Prije obrade potrebno je fiksirati ili zamrznuti tkivo kako bi nukleinske kiseline ostale sačuvane. Probe treba obilježiti radi detekcije, a obično se obilježavaju fluorescentnim bojama ili radioaktivnim izotopima (rjeđe). Ako se radi o bojanju fluorescentnim molekulama metoda se još naziva i fluorescentom hibridizacijom *in situ* (FISH).

Prisutnost virusne nukleinske kiseline se može vizualizirati u tkivu (ili stanicama) pomoću fluorescencijskog mikroskopa ili rendgenskim zrakama u slučaju korištenja radioaktivno obilježenih proba (Kennedy, 2005; Modrow i sur., 2013; Murray i sur., 2015).

Prednost ove metode je detekcija latentnih virusnih zaraza kod kojih je virus u stanju mirovanja u stanici. Jedan od takvih virusa je humani papilomavirus (HPV), a vizualizacija FISH metodom je prikazana na slici 3. Naime, ova metoda zahtijeva stručno i educirano osoblje, skupu laboratorijsku opremu pa je dostupnost izvedbe negativna strana (Modrow i sur., 2013; Ho i sur., 2011).



Slika 3 Prikaz vizualizacije humanog papilomavirusa u razmazu stanica grlića maternice metodom fluorescentna hibridizacija *in situ* (FISH) (Ho i sur., 2011).

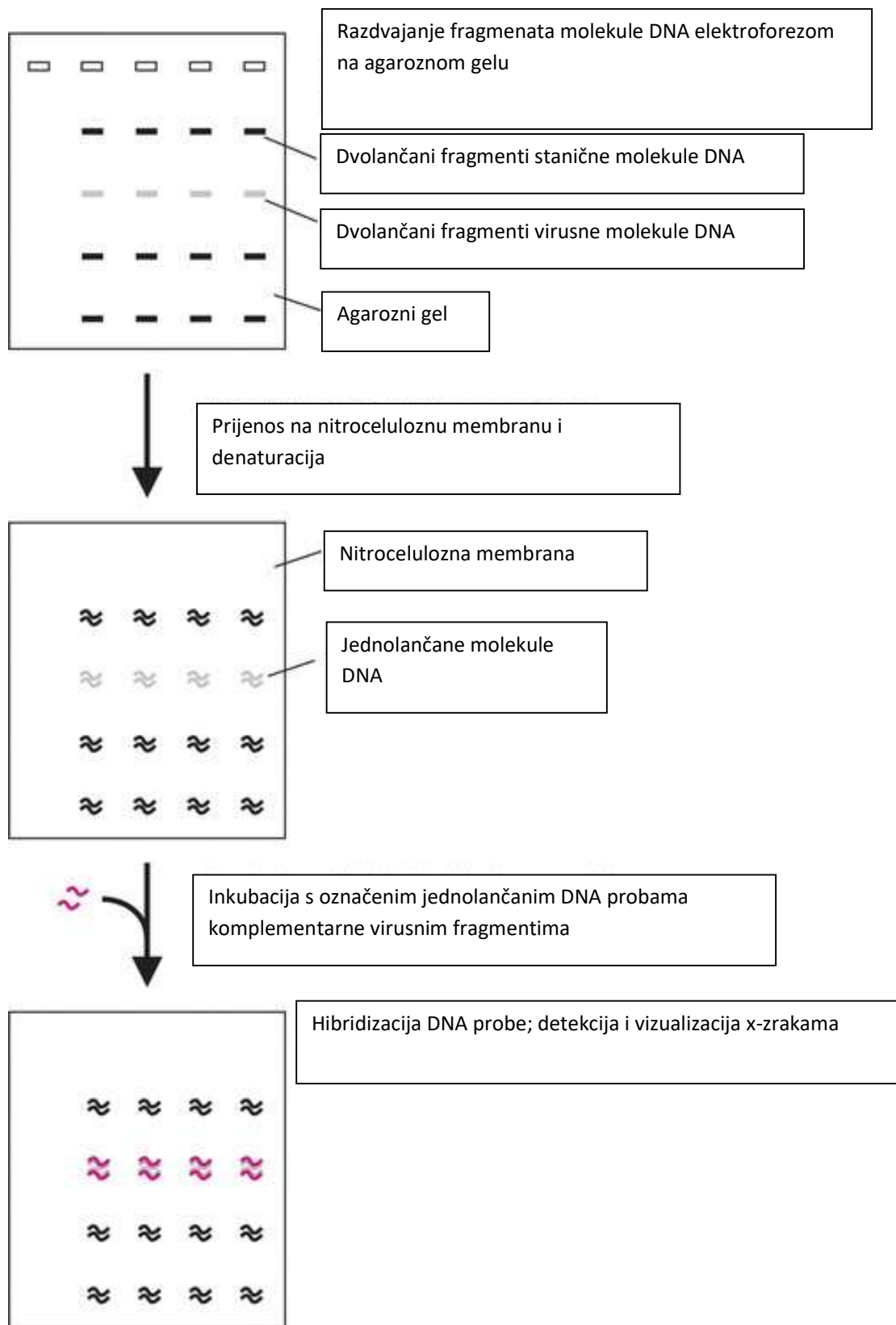
2.5 Southernova i northernška metoda otiska

Virusne nukleinske kiseline mogu se izolirati iz zaraženih stanica te detektirati i kvantificirati Southernovom i northernškom metodom otiska. Obje se temelje na istom principu (Slika 4).

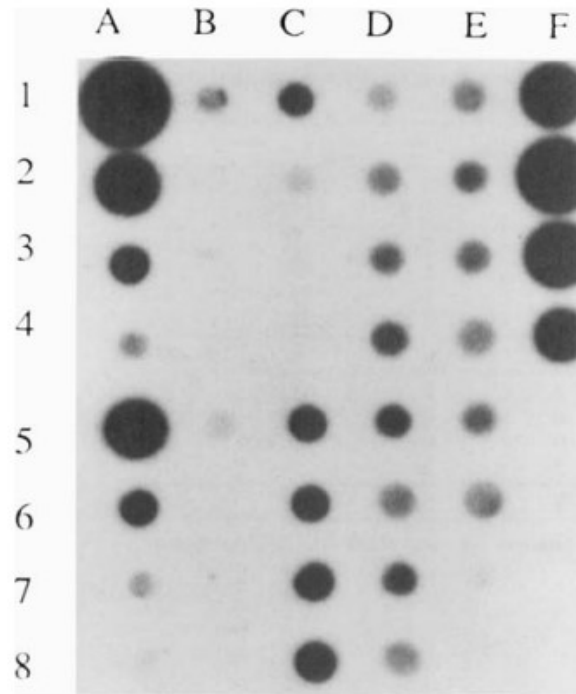
Southernova metoda otiska odnosi se na detekciju dvolančane molekule DNA. Najprije se molekula DNA umnaža metodom PCR, zatim se obrađuje restrikcijским enzimima (dobivaju se kraći fragmenti) pa se fragmenti razdvajaju elektroforezom u agaroznom gelu. Sljedeći korak je prijenos fragmenata s agaroznog gela na membranu (najlonsku ili nitroceluloznu) pomoću kapilarinih sila što ih stvaraju slojevi filter papira. Na membrani se nalaze specifične nukleotide probe (DNA ili RNA) koje se komplementarno vežu za prethodno denaturiranu molekulu DNA s gela te formiraju dvolančane molekule. Probe su obilježene neizotopnim spojevima (npr. biotin) ili radioaktivno označenim nukleotidima. Nakon hibridizacije, membrana se tretira enzimima koji u reakciji sa spojevima kojima je obilježena proba daju obojenje koje detektiramo uređajem. U slučaju radioaktivnog obilježavanja, nukleinske kiseline detektiramo x-zrakama.

Northernška metoda otiska uključuje korake kao što su prethodno opisani izuzev obrade restrikcijским enzimima, a njome se detektira virusna molekula RNA. (Modrow i sur.,2013; Streit i sur., 2009).

Pojednostavljena alternativa ovih metoda je točkasti otisak (*Dot blot*). Klinički uzorak se direktno nanosi na membranu te se dodaju obilježene komplementarne nukleotidne probe za detekciju nukleinskih kiselina ili proteina. Rezultat prikazuje slika 5. (Murray i sur., 2015).



Slika 4 Prikaz Southernove metode otiska (Modrow i sur., 2013)



Slika 5 Fotografija pločice dobivene metodom točkastog otiska. Uzorci su testirani na prisutnost HPV virusa. Uzorci u stupcu E i redu 7-8, stupcu F redovi 5-8, se interpretiraju kao negativan test. Svi ostali su pozitivni, te je prisutan virus HPV (Morris i sur., 1990).

3 SEROLOŠKE DIJAGNOSTIČKE METODE

Specifična reakcija antitijela i antigena je temelj seroloških metoda. One omogućuju detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju antigena ili antitijela (proizvedenih od strane imunskog sustava u reakciji protiv virusnih antigena) u kliničkim uzorcima. Ove metode koriste kliničke uzorke u tekućem obliku, najčešće serum. Također, daju informaciju o kakvoći odgovora imunskog sustava pacijenta na zarazu te o njegovoj izloženosti zarazi (Murray i sur., 2015). Iako korisne, serološke dijagnostičke metode nisu dovoljno osjetljive na vrlo nisku koncentraciju virusnih proteina (Louten, 2016.)

Imunofluorescencija, test ELISA, enzimski imunotest i westernska metoda otiska spadaju u kategoriju seroloških testova koja se koristi antigenima (ili antitijelima) vezanim za čvrstu podlogu koja specifično reagiraju s antitijelima, a detektiraju se promjenom boje zbog djelovanja enzima vezanog na antitijelo. Ove metode su primjenjive na viruse za koje su dostupna specifična antitijela za laboratorijsku upotrebu.

Nadalje, precipitacijske metode temelje se na stvaranju kompleksa antigen-antitijelo te njihovo vidljivo taloženje. U ovu kategoriju spadaju jednostruka i dvostruka radijalna difuzija.

Konačno, test inhibicije hemaglutinacije koristi inhibicijsku aktivnost stvaranjem imunokompleksa te se time sprječava aktivnost virusa zbog vezanja antitijela za istog.

Ovo su samo neke od najkorištenijih metoda te svaka od njih ima svoje inačice. U nastavku će biti opisan osnovni princip tih metoda (Kennedy, 2005).

3.1 Test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

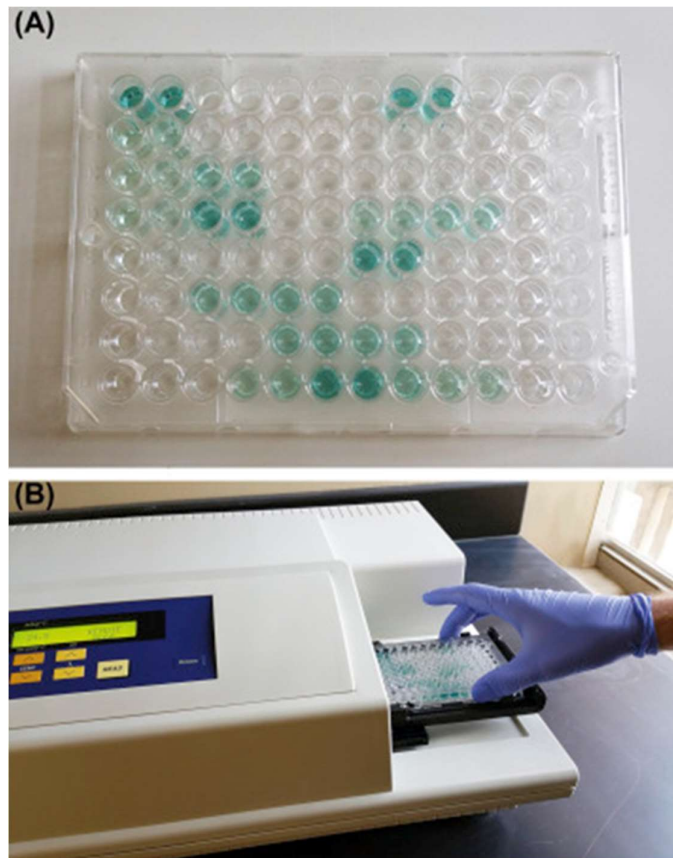
Test ELISA je dijagnostička metoda koja se temelji na specifičnoj reakciji antigen-antitijelo. Odnosno, detektira virusne antigene (proteine) ili specifična antitijela u tekućim uzorcima (serum, urin).

Najpoznatija varijacija ove metode je tzv. sendvič-ELISA koja se odvija na mikrotitarskoj pločici s 96 bazenčića (Sika 6). U bazenčiće s puferom se dodaju antitijela koja se fiksiraju za dno te hvataju antigen iz seruma pacijenta. Slijedi ispiranje pa dodatak seruma. Ako je u serumu prisutan virusni protein specifično će se ga vezati antitijelo, a ako nije, odstranit će se sljedećim ispiranjem. Zatim se dodaju antitijela povezana s enzimom te se specifično vežu na virusni antigen formirajući kompleks nalik na sendvič (Louten, 2016.). Dodatkom supstrata u otopinu

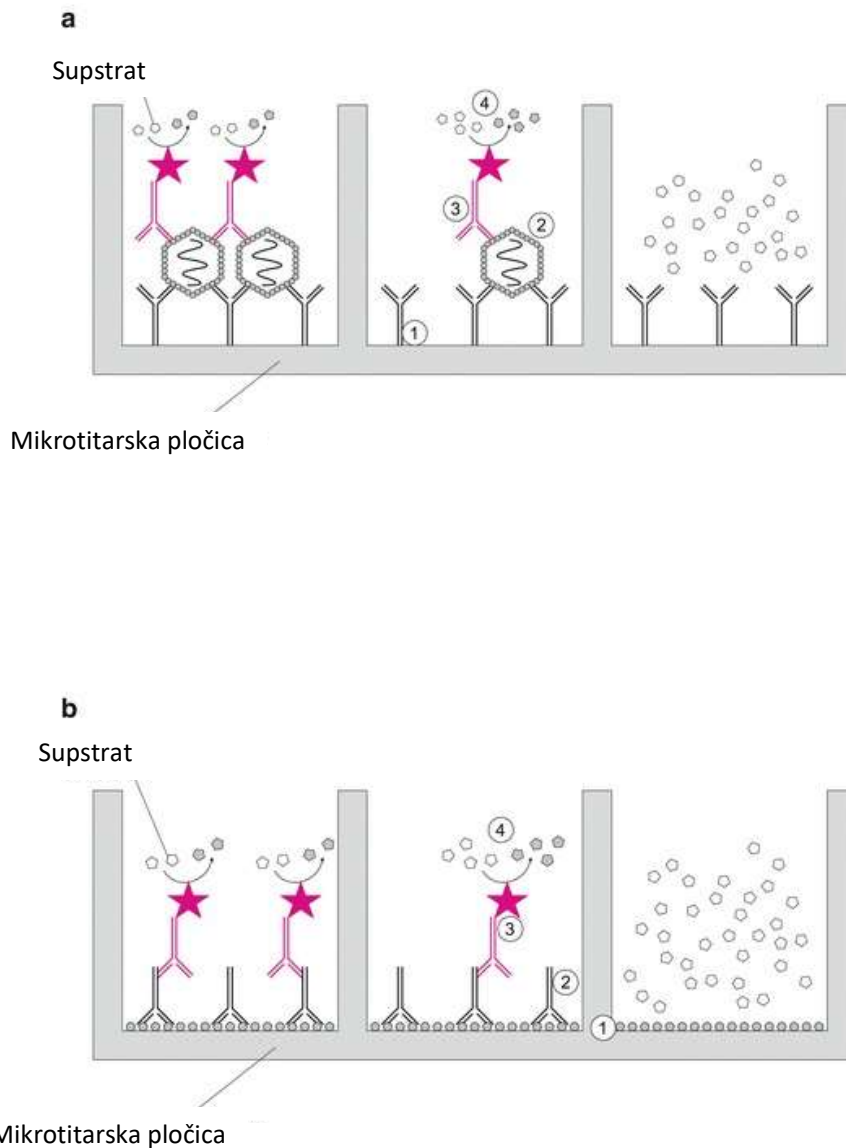
enzimatskom razgradnjom dolazi do promjene boje ako je prisutan virusni antigen u serumu što ukazuje na pozitivan serološki test (Aydin, 2015.). Promjena boje detektira se spektrofotometrom (Slika 6) koji mjeri intenzitet obojenja i uspoređuje ga s negativnom kontrolom. Na taj način dobivamo semikvantitativne rezultate (Modrow i sur., 2013).

Osim virusnog antigena, moguće je detektirati i specifična antitijela nastala prilikom reakcije imunskog sustava na virus. To daje informaciju o pacijentovoj izloženosti virusu. Ovaj indirektan test ELISA koristi bazenčice s vezanim antigenom na dnu te se na njih vežu antitijela iz seruma pacijenta ako ih ima. Na ta antitijela se specifično vežu dodatna antitijela s enzimom. Dodatak supstrata dovodi do reakcije kao što je prethodno opisano (Slika 7). Budući da nakon svakog ispiranja treba proći određeno vrijeme, cijela metoda traje nekoliko sati, no rezultati su dostupni u istom danu pa je test ELISA prikladan gotovo za sve viruse (adenovirusi, virus gripe, rotavirusi, norovirusi i sl.) (Louten, 2016.).

Radioimunotest (RIA) je slična metoda, a koristi radioizotopom obilježene antigene ili antitijela kako bi se dobila informacija o njihovoj količini. Radioaktivni raspad se kvantitativno mjeri instrumentima. Osnovni princip je isti kao kod metode ELISA, samo što se umjesto enzimima označenih protutijela koriste radioaktivno označene molekule (Murray i sur., 2015).



Slika 6 (a) Mikrotitarska pločica, (b) spektrofotometar.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150318/>)



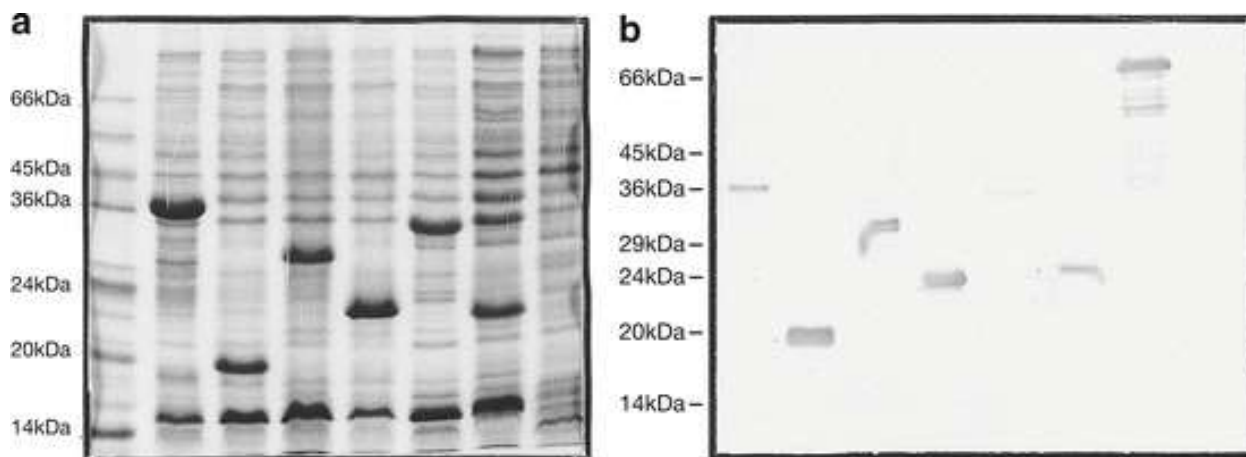
Slika 7 Prikaz testa ELISA. (a) Sendvič-ELISA: 1. antitijela specifična za virus se fiksiraju za podlogu bazenčića, 2. virusni antigen iz uzorka se veže na ta antitijela, 3. antitijela povezana s enzimom, 4. reakcija supstrata i enzima daje obojenje. (b) indirektna ELISA. 1. Virusni protein vezan za podlogu bazenčića, 2. serum pacijenta sadrži specifična antitijela za taj antigen, 3. Sekundarno antitijelo s enzimom se veže za primarnonantitijelo, 4. Dodatak supstrata i reakcija promjene boje. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123206>)

3.2 Westernska metoda otiska

Westernska metoda otiska služi otkrivanju i određivanju relativne količine proteina u uzorku. Prethodno izolirani virusni proteini iz uzorka razdvajaju se prema veličini elektroforezom u poliakrilamidnom gelu (Slika 8). Zbog ovog koraka je ovo u naravi molekularna metoda, no pri detekciji koristi serološku reakciju pa se svrstava u serološke dijagnostičke metode (Murray i sur., 2015)

Razdvojeni proteini s gela prenose se na nitroceluloznu ili najlonsku membranu te se inkubiraju sa serumom koji sadrži antitijela te specifično reagiraju s proteinima. Zatim se na membranu dodaju specifična antitijela s vezanim enzimom koja specifično reagiraju s antitijelima iz seruma. Dodatkom supstrata dolazi do enzimske razgradnje i ovisno o vrsti enzima i supstrata može doći do promjene boje i fluorescencije što detektiramo uređajem (Modrow i sur., 2013) Na taj način se vizualizira položaj proteina koji daje informaciju o njihovoj veličini i količini (Abbas i sur. 2018).

Westernska metoda otiska se često koristi kao potvrda rezultata testa ELISA i potvrđivanje serokonverzije tj. vremena potrebnog za razvoj specifičnih antitijela te mogućnost njihove detekcije (npr. test za virus humane imunodeficijencije, HIV) (Louten, 2016.).



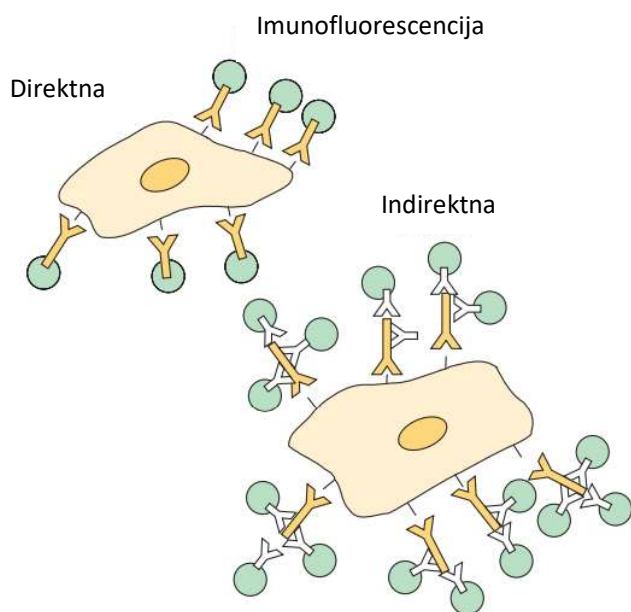
Slika 8 Primjer detekcije virusnih proteina. (a) razdvojeni proteini na poliakrilamidnom gelu; (b) proteini s gela preneseni na nitroceluloznu membranu detektirani westernskom metodom otiska

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123206/>)

3.3 Imunofluorescencija i enzimski imunotest (EIA)

Antigeni (proteini) virusa se mogu nalaziti u stanici ili na njenoj površini. Imunofluorescencija je odlična metoda za njihovu detekciju i lokalizaciju. Zaražene stanice ili tkivo se inkubiraju s protutijelima na koje su vezani fluorokromi (fluorescentni kemijski spoj koji može emitirati svjetlost nakon svjetlosne ekscitacije). Ona se vežu specifično za željeni antigen te daju informaciju o njegovom položaju i prisutnosti. Pretraživanje tkiva ili stanica odvija se pomoću fluorescencijskog mikroskopa jer je njime moguće vidjeti fluorescentno obilježena antitijela. Postoje dvije varijante ove metode: direktna imunofluorescencija (antigeni su obilježeni fluorescentno označenim antitijelima) i indirektna imunofluorescencija (antigeni su obilježeni neoznačenim primarnim antitijelima na koja se potom vežu sekundarna antitijela obilježena fluorokromom) (Slika 9).

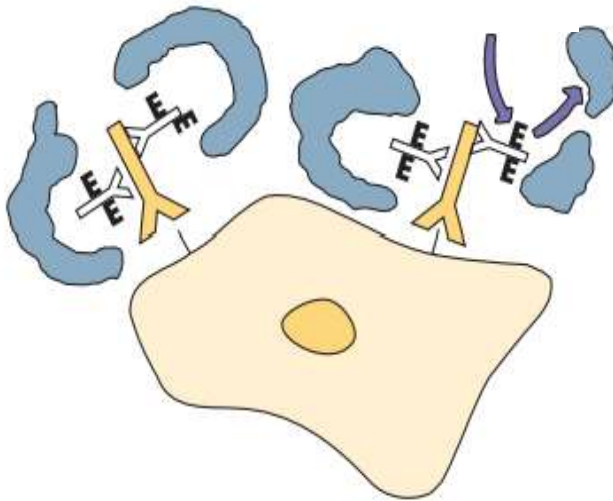
Enzimski imunotest funkcioniра na istom principu kao i imunofluorescencija. Razlika je u tome što se umjesto fluorescentno obilježenih antitijela koriste antitijela obilježena enzimom koji svojom aktivnošću (razgradnjom supstrata) stvara obojenje (Slika 10). (Abbas i sur., 2018; Murray i sur., 2015).



Slika 9 Prikaz direktne i indirektnе imunofluorescencije (Murray i sur., 2015).

Enzimski imunotest

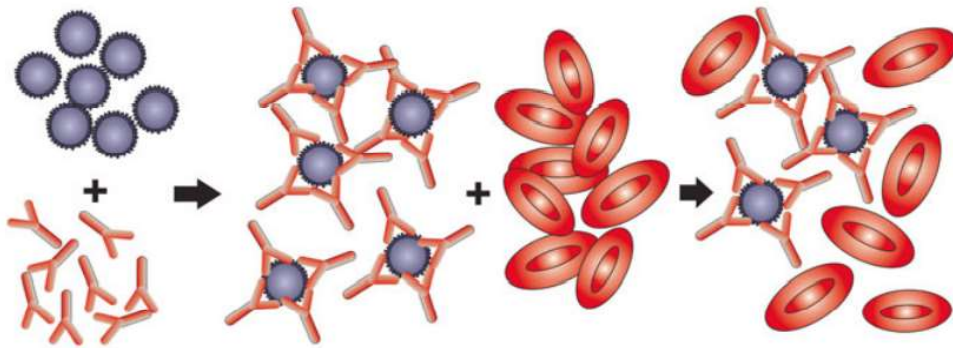
Supstrat



Slika 10 Shematski prikaz enzimskog imunotesta (Murray i sur., 2015).

3.4 Inhibicija hemaglutinacije

Inhibicija hemaglutinacije (HI) je klasična laboratorijska tehnika za klasifikaciju virusa koji uzrokuju hemaglutinaciju. Primjer takvih virusa je virus gripe koji aglutinira crvene krvne stanice preko interakcije glikoproteina na površini virusa (hemaglutinin) i receptora na površini eritrocita. Inhibicija hemaglutinacije omogućuje identifikaciju subtipova virusa gripe ili kvantificiranje odgovora antitijela na infekciju određenim sojem virusa (Pedersen, 2014). Prisutnost specifičnih antitijela sprječavaju vezanje virusa na eritrocite te time onemogućavaju hemaglutinaciju (Slika 11). Ovom metodom ispituje se npr. proizvodnja antitijela nakon primjene novih cjepiva za gripu (Murray i sur., 2015).

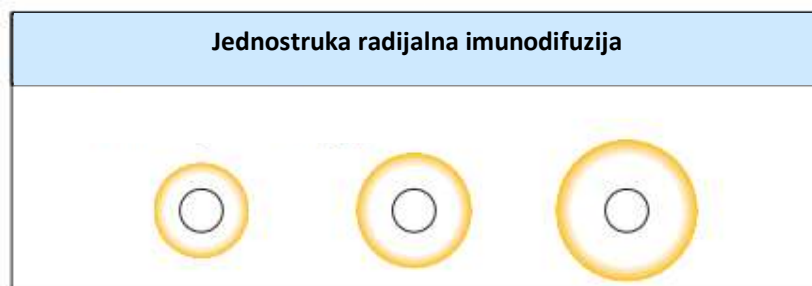


Slika 11 Inhibicija hemaglutinacije. (1) virus i antitijelo se inkubiraju (2) ako su specifično podudarni, vežu se (3) dodaju se eritrociti u smjesu (4) virus se ne može vezati na eritrocit jer ga sprječava na njega vezano antitijelo te je hemaglutinacija blokirana. (Pedersen, 2014).

3.5 Precipitacijske imunodifuzijske tehnike

Specifični antigen-antitijelo kompleksi mogu se detektirati precipitacijskim metodama. Metoda se temelji na stvaranju netopljivih kompleksa (imunoprecipitati) u području zone ekvivalencije tj. području gdje je optimalni omjer antigena i antitijela pa antitijela međusobno povezuju i umrežuju čestice antigena koje se zbog toga talože.

Jednostruka radijalna imunodifuzija (SRID, *Single radial immunodiffusion*) koristi reaktant fiksiran u podlogu, dok se drugi unosi u jažice. Reaktanti su antitijela i antigeni. Kada uneseni reaktant difundira u podlogu stvara se bijeli prsten oko jažice iz koje je difundirao zbog interakcija antigen-antitijelo (Slika 12). Što je veća količina reaktanta, ondifundira dalje kako bi dosegao točku ekvivalencije te nastaje precipitacijski prsten. Dakle, promjer prstena ovisi o koncentraciji reaktanta. Metoda se primjenjuje pri kvantifikaciji i detekciji antitijela ili antigena.



Slika 12 Jednostruka radijalna imunodifuzija. U gelu se već nalazi antigen. Područje oko precipitacijskog prstena je proporcijalno koncentraciji antigena (Murray i sur., 2015).

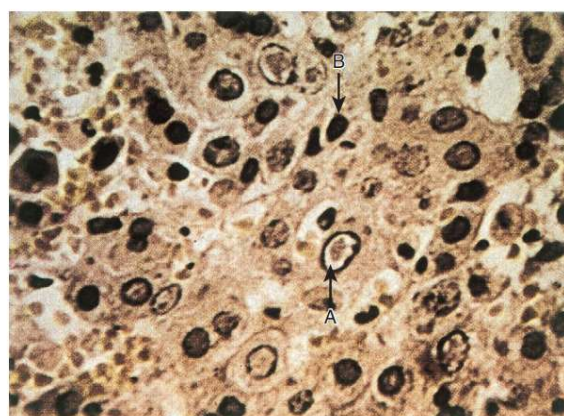
Dvostruka radijalna imunodifuzija (DRID, *double radial immunodiffusion*) koristi reaktante koji se oba unose u jažice u inertnom gelu. Antigeni i antitijela difundiraju jedni prema drugima te dolazi do specifične reakcije. Na mjestu izjednačenja koncentracija reaktanata nastaje bijeli talog (imunoprecipitat) u kojem se nalaze kompleksi antigen-antitijelo. Ovom reakcijom, osim detekcije antigena ili antitijela, u određenoj izvedbi moguće je odrediti njihovu relativnu koncentraciju. Metoda također omogućuje određivanje srodnosti antigena (Murray i sur., 2015).

4 MIKROSKOPIJA

Zaraza mnogim virusima rezultira citopatološkim efektima na stanicama. Ti efekti uključuju morfološke promjene, liziranje stanica, vakuolizacije, nastanak sincicija te inkluzijskih tijela. Sincicij označuje velike višezegrene stanice formirane fuzijom više stanica, što je primjerice uzrokovano virusom HIV (humani papiloma virus) ili virusom ospica (Slika 13). Inkluzijska tijela su histološke promjene na stanicama uzrokovane nakupljanjem virusnih komponenti te raspadnutih staničnih dijelova. Neki od virusa koji uzrokuju stvaranje inkluzijskih tijela su citomegalovirus (CMV) i herpes simpleks virus (HSV) (Slika 14). Ove promjene i strukture je moguće vidjeti u svjetlosnim mikroskopom. Elektronska mikroskopija se također može koristiti u detekciji i identifikaciji nekih virusa ili virusnih čestica, ali u kliničkim istraživanjima se zbog slabe dostupnosti ne koristi često (Murray i sur., 2015).



Slika 13 Formiranje sincicija kao posljedica infekcije virusom ospica (Murray i sur., 2015).



Slika 14 Unutarstanične uklopine nastale kao posljedica infekcije virusa herpes simpleks (Murray i sur., 2015).

5 LITERATURA

- Abba, M. C. i Golijow, C. D. (2004) „Herpes simplex virus genotyping: Multiple optional PCR-based RFLP systems and a non-isotopic single-strand conformation polymorphism method“, *Journal of Virological Methods*, 118(1), str. 73–76. doi: 10.1016/j.jviromet.2004.01.013.
- Abbas, A. K., Lichtmann, A. H. i Pillai, S. (2018) *Stanična i molekularna imunologija*. 8th izd. Uredio D. Batinić i V. Lukinović-Škudar. Zagreb: Medicinska naklada.
- Aydin, S. (2015) „A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA“, *Peptides*, 72, str. 4–15. doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
- Bergmans, H. E. Al i Gaastra, W. (bez datuma) „Chapter 28 Dot-Blot Hybridization Method“, str. 385–390.
- Brussaard, C. P. D., Marie, D. i Bratbak, G. (2000) „Flow cytometric detection of viruses“, *Journal of Virological Methods*, 85(1–2), str. 175–182. doi: 10.1016/S0166-0934(99)00167-6.
- Goudouris, E. S. (2021) „Laboratory diagnosis of COVID-19“, *Jornal de Pediatria*, 97(1), str. 7–12. doi: 10.1016/j.jpmed.2020.08.001.
- Ho, C. M. i ostali (2011) „Clinical significance of signal pattern of high-risk human papillomavirus using a novel fluorescence in situ hybridization assay in cervical cytology“, *Clinical Microbiology and Infection*, 17(3), str. 386–394. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03186.x.
- Kennedy, M. (2005) „Methodology in diagnostic virology“, *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 8(1), str. 7–26. doi: 10.1016/J.CVEX.2004.09.009.
- Louten, J. (2016) „Detection and Diagnosis of Viral Infections“, *Essential Human Virology*, str. 111–132. doi: 10.1016/B978-0-12-800947-5.00007-7.
- Mackay, I. M., Arden, K. E. i Nitsche, A. (2002) „Real-time PCR in virology“, *Nucleic Acids Research*, 30(6), str. 1292–1305. doi: 10.1093/nar/30.6.1292.
- Made Artika, I., Wiyatno, A. i Ma'roef, N. (2020) „Pathogenic viruses: Molecular detection and characterization“. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104215.

Modrow, S. i ostali (2013) „Molecular virology“, *Molecular Virology*, 9783642207, str. 1–1016. doi: 10.1007/978-3-642-20718-1.

Murray, P., Rosenthal, K. i Pfaller, M. (2015) *Medical Microbiology 8th Edition*, Elsevier. doi: 10.1093/milmed/155.7.a26.

Murray, P., Rosenthal, K. i Pfaller, M. (2015) *Medical Microbiology 8th Edition*, Elsevier. doi: 10.1093/milmed/155.7.a26.

Pedersen, J. C. (2014) „Hemagglutination-inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus“, *Methods in Molecular Biology*, 1161, str. 11–25. doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8_2.

Streit, S. i ostali (2009) „Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues“, *Nature Protocols*, 4(1), str. 37–43. doi: 10.1038/nprot.2008.216.

Udugama, B. i ostali (2020) „Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection“. doi: 10.1021/acsnano.0c02624.

Vainionpää, R. i Leinikki, P. (2008) „Diagnostic Techniques: Serological and Molecular Approaches“, *Encyclopedia of Virology*, str. 29–37. doi: 10.1016/B978-012374410-4.00585-9.

Vero, S. i ostali (2017) „A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything“, *Frontiers in Microbiology* | www.frontiersin.org, 8, str. 108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

Web stranice:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techish/> pristupljeno 19.9.2021

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)63873-8/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)63873-8/fulltext)
pristupljeno 19.9.2021

[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)63873-8/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)63873-8/fulltext)
pristupljeno 10.9.2021

6 SAŽETAK

Virusi igraju važnu ulogu u prirodi jer zaražavaju različite domaćine. Budući da su obligatni unutarstanični paraziti, uzrokuju razne bolesti te svojim djelovanjem potiču promjene u živim stanicama koje mogu imati ulogu i u evoluciji.

Obzirom da postoji mnogo različitih virusa, različite strukture i bioloških karakteristika, za njihovu uspješnu dijagnostiku potreban je velik broj dijagnostičkih testova. Nisu svi pristupi primjenjivi kod svih virusnih bolesti pa je važno znati koju metodu i kada odabrati.

Molekularnim metodama detektiramo virusne nukleinske kiseline ili proteine. Specifične su i osjetljive, što znači da se u uzorku s vrlo malom koncentracijom virusa može detektirati njihova prisutnost. Molekularne metode su obično temeljene na umnažanju dijelova virusnog genoma različitim izvedbama lančane reakcije polimerazom, elektroforetskoj analizi dobivenih molekula DNA ili virusnih proteina te detekciji virusnog genoma tehnikama hibridizacije.

S druge strane, serološke se metode, temeljene na reakciji antigena i antitijela, koriste za detekciju virusnih antigena i specifičnih antitijela nastalih kao posljedica zaraze te daju brze rezultate. Razlikuju se precipitacijske serološke metode, kao jednostruka i dvostruka radijalna difuzija, imunohistološke metode koje detektiraju antigene u inficiranim tkivima, često korištene imunoenzimatske tehnike, poput ELISA-testa, te mnoge druge.

Potrebno je dobro razumijevanje tehnika kako bi se osigurala pravilna i pouzdana dijagnostika virusnih bolesti. što je preduvjet za adekvatno i pravovremeno liječenje.

Ključne riječi: Virusni, molekularne dijagnostičke metode, serološke dijagnostičke metode, mikroskopija, lančana reakcija polimerazom, hibridizacija *in situ*, Southernova metoda otiska, northernaska metoda otiska, westernska metoda otiska, test ELISA, enzimatski imunotest, inhibicija hemaglutinacije, imunoprecipitacijske metode, imunofluorescencija

7 SUMMARY

Viruses have important role in nature because they infect different hosts. Since they are obligatory intracellular parasites, they cause various diseases and stimulate changes in living cells that can also play an important role in evolution.

Considering there are many different types of viruses with different structures and biological characteristics, a large number of diagnostic tests are required for their successful diagnostic. Not all approaches are applicable to all viral diseases, so it is important to know which method to choose and when to apply it. Viral nucleic acids or proteins can be detected by molecular methods. They are specific and sensitive, which means that virus presence can be detected in a sample with its' very low concentration. Molecular methods are usually based on the amplification of parts of the viral genome by different types of polymerase chain reactions, electrophoretic analysis of the obtained DNA or viral protein molecules, and detection of the viral genome using hybridization techniques.

On the other hand, serological methods, based on the reaction of antigens and antibodies, are used to detect virus antigens and specific antibodies generated as a result of infection and give rapid results. There are different serological methods, such precipitation techniques, as single and double radial diffusion, immunohistological methods that detect antigen in infected tissues, frequently used immunoenzyme assays such as ELISA and many other.

It is necessary to have a good understanding of each method to ensure the accurate and reliable application of diagnostic methods, which is prerequisite for adequate and timely medical treatment.

Key words: viruses, molecular diagnostic methods, serology, microscopy, PCR, hybridization *in situ*, Southern blot, northern blot, western blot, ELISA, enzyme immunoassay, hemagglutination inhibition assay, DRID, SRID, immunofluorescence

8 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.8.1999. u Sisku. Završila sam smjer opća gimnazija u Srednjoj školi Glina 2018. godine. Trenutno sam treća godina preddiplomskog studija biologije. Budući da živim u maloj sredini i roditelji mi se bave poljoprivredom, uvijek sam bila okružena prirodom te me jako interesirala. To je jedan od razloga zašto sam upisala ovaj smjer. Nadalje, aktivno se bavim sportom od malih nogu počevši s mažoret plesom, a trenutno igram odbojku za HAOK Dubrava. Također, imam šest mjeseci radnog iskustva u LIDL i Office shoes trgovini.