

Brza dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava u djece

Bilandžić, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:694432>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Mia Bilandžić

***Brza dijagnostika virusnih
infekcija dišnog sustava u djece***

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Klinike za dječje bolesti Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Amarele Lukić-Grić, dr.med i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2021/2022.

POPIS I OBJAŠNJENJE KRATICA

ARI - akutna infekcija dišnog sustava (eng. *Acute Respiratory Infection*)

COVID-19 – koronavirusna bolest 2019 (bolest uzrokovana SARS-CoV-2)

AE-KOPB – akutna egzacerbacija kronične opstruktivne plućne bolesti

RSV – respiratorni sincicijski virus

hMPV – humani metapneumovirus

Flu – virus influence

PIV – virus parainfluence

AdV – adenovirus

HRV – humani rinovirus

HboV – humani bokavirus

HcoV – humani koronavirus

SARS – teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*)

MERS – Bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East Respiratory Syndrome*)

NPEV – non-polio enterovirus

BAL – bronhoalveolarni lavat

LA – lateks aglutinacija

POC – na mjestu pružanja njege (engl. *point of care*)

NT – neutralizacijski test

IHA – inhibicija hemaglutinacije

RVK – reakcija vezanja komplementa

PHA – pasivna hemaglutinacija

AGP – aviditet specifičnih IgG-a

WB – Western blot

NPV – negativna prediktivna vrijednost

PPV – pozitivna prediktivna vrijednost

SADRŽAJ

I. Sažetak.....	
II. Summary.....	
1. Uvod.....	1
2. Virusni uzročnici infekcija dišnog sustava.....	3
2.1. Respiratorni sincicijski virus.....	3
2.2. Virusi parainfluence.....	6
2.3. Humani rinovirusi.....	7
2.4. Humani metapneumovirus.....	8
2.5. Adenovirusi.....	9
2.6. Virus influenza.....	11
2.7. Koronavirus.....	14
2.8. Enterovirusi.....	17
2.9. Bokavirus.....	20
3. Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija.....	21
3.1. Izolacija virusa	22
3.2. Serološka dijagnostika.....	25
3.3. Metode brze dijagnostike.....	27
3.3.1. Detekcija antigena.....	27
3.3.2. Molekularne metode	31
4. Zaključak.....	37
5. Zahvale.....	38
6. Literatura.....	49
7. Životopis.....	49

I. Sažetak

Brza dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava u djece

Mia Bilandžić

Akutna respiratorna infekcija najčešća je infektivna bolest u ljudi, a najčešće pogođena dobna skupina su djeca. Sa svojom visokom učestalosti ARI značajno utječu na svakodnevno funkcioniranje društva (izostanak s posla, iz škole, vrtića), ali i zdravstvenog sustava (propisivanje antibiotika, plaćanje bolovanja). Najčešći virusni uzročnici ARI u djece su: respiratorni sincicijski virus, humani metapneumovirus, virus influenza, parainfluenca virusi, adenovirusi, rinovirusi, humani bokavirus, koronavirusi i enterovirusi.

Cilj ovog rada je prikazati pregled osnovnih obilježja najčešćih virusnih uzročnika i dostupne laboratorijske dijagnostike virusnih infekcija uz stavljanje naglaska na metode brze dijagnostike tih virusa.

Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija provodi se metodama izravne i neizravne dijagnostike. Pod neizravne metode podrazumijevamo serologiju koja se u slučaju ARI ne koristi rutinski. Izravne metode podrazumijevaju izolaciju virusa i nekultivacijske metode. Izolacija virusa je pouzdana metoda detekcije virusa, ali zbog svoje složenosti i dugog trajanja također nije pogodna za rutinsku dijagnostiku ARI. Nekultivacijske metode (detekcija antigena i molekularna dijagnostika) ubrajaju se u metode brze dijagnostike. Upotreba metoda brze dijagnostike u svakodnevnom radu kliničara može značajno utjecati na postupanje s pacijentom te dovesti do smanjenja stope propisivanja antibiotika, prepoznavanja cirkulacije virusa unutar populacije i u konačnici do sveukupnog smanjenja troška za zbrinjavanje pacijenta s ARI.

Ključne riječi: virusne infekcije, dišni sustav, djeca, detekcija antigena, molekularne metode

II. Summary

Rapid diagnostics of viral respiratory infections in children

Mia Bilandžić

Acute respiratory infection is the most common infectious disease in humans, and children are the most commonly affected age group. With their high frequency, ARI significantly affect the daily functioning of society (absence from work, school, nursery school), but also the health system (prescription of antibiotics, payment of sick leave). The most common viral agents of ARI in children are: respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, influenza virus, parainfluenza virus, adenovirus, rhinovirus, human bocavirus, coronavirus and enterovirus.

The aim of this thesis is to present an overview of the basic characteristics of the most common viral agents and the available laboratory diagnostics of viral infections, with an emphasis on methods of rapid diagnostics.

Laboratory diagnostics of viral infections can be divided into direct and indirect methods. By indirect methods we mean serology, which is not routinely used in the case of ARI. Direct methods are further divided into virus isolation and non-cultivation methods. Virus isolation is a reliable method of virus detection, but due to its complexity and long duration, it is also not suitable for routine use in diagnosis of ARI. Non-cultivation methods (antigen detection and molecular methods) belong to methods of rapid diagnostics. The usage of rapid diagnostic methods in the daily work of clinicians can significantly influence the treatment of patients and lead to a reduction of antibiotic prescribing rate, early recognition of viral circulation within the population, and ultimately to an overall reduction in the cost of treating a patient with ARI.

Key words: viral infection, respiratory system, children, antigen detection, molecular methods

1. UVOD

Akutna respiratorna infekcija (ARI) najčešća je infektivna bolest u ljudi te važan uzrok mortaliteta u cijelom svijetu. Pogođene su sve dobne skupine, ali vrlo velik udio oboljelih čine djeca (1). Glavne odrednice ARI su izrazito raznolika etiologija i težina kliničke slike, lak način prijenosa (dodirom, kapljičnim putem, aerosolom) te ograničene mogućnosti liječenja i prevencije. U primarnoj zdravstvenoj zaštiti u Hrvatskoj godišnje se registrira oko 2,5 milijuna bolesnika s ARI, a to je oko 30% svih registriranih bolesnika. U ukupnom pobolu populacije predškolske i školske djece udio ARI iznosi 45-50% (2). Ovim podacima nisu pridružena oboljenja uzrokovana koronavirusom povezanim s teškim akutni respiratornim sindromom (COVID-19) koja su za vrijeme trajanja pandemije predstavljala veliki udio morbiditeta populacije. Osnovna podjela ARI temelji se na razlikovanju infekcija gornjeg i donjeg dišnog sustava. Infekcije gornjeg dijela dišnog sustava daleko su češće, ali i blažeg tijeka, posebice ako ne dođe do najčešćih komplikacija kao što su bakterijske superinfekcije koje dovode do sinusitisa i otitisa. Infekcije gornjeg dijela dišnog sustava čine 75% svih ARI, a najčešće se manifestiraju kao prehlada, ali i faringitis, laringitis, laringotraheitis (sindrom krupa), upala srednjeg uha, upala sinusa. U infekcije donjega dijela dišnog sustava ubrajaju se: akutni bronhitis, bronhiolitis, akutna egzacerbacija kroničnog bronhitisa, odnosno kronične opstruktivne plućne bolesti (AE-KOPB) i pneumonija (2). Prihvatljivim se smatra do 5 ARI godišnje za odraslog čovjeka, a za djecu koja borave u kolektivu i do 10 ARI godišnje (2). Iz ovih brojki možemo vidjeti da ARI značajno utječu na svakodnevno funkcioniranje društva (izostanak s posla, iz škole, vrtića), ali i zdravstvenog sustava (propisivanje antibiotika, plaćanje bolovanja). Oko 85% svih ARI uzrokuju virusi, međutim, liječenju ARI pripada više od 70% svih propisanih antibiotika (2). Uz racionalnu primjenu za liječenje isključivo bakterijskih infekcija

antibiotik je siguran i učinkovit lijek. Međutim neopravdana upotreba antibiotika osim što može dovesti do razvoja rezistencije bakterija ima i štetne učinke na zdravlje pacijenta (nuspojave, oštećenje mikrobioma crijeva, infekcija *C. difficile*). Unatoč tome liječnici na primarnoj razini zdravstvene zaštite svakodnevno se nalaze pod velikim pritiskom kada je u pitanju liječenje ARI antibiotikom. Iako u većini slučajeva ARI virusne etiologije u djece imaju benigni tijek posebnu pozornost potrebno je obratiti na kompleksne pacijente s komorbiditetima, novorođenčad, imunodeficijentne pacijente i pojavu ARI na bolničkim odjelima. U takvim slučajevima bolest češće poprima težu kliničku sliku i veća je vjerojatnost razvoja pneumonije, najtežeg oblika ARI. Mogućnosti liječenja virusnih ARI, u većini slučajeva, ograničene su na simptomatsko i potporno liječenje. Najučinkovitiju prevenciju virusnih ARI predstavljala bi profilaksa cjevivom, međutim ono je dostupno isključivo za virus influence i SARS-CoV-2. Opće mjere koje uključuju održavanje fizičke distance, redovito pranje ruku, izolaciju oboljelih i korištenje zaštitne opreme značajne su za prevenciju širenja ovih infekcija. U najvećem broju slučajeva dijagnoza ARI postavlja se isključivo na temelju anamnestičkih podataka i kliničke slike te točna etiologija uglavnom ostane nepoznata. Razlog tome je veliki broj pacijenata i mogućih uzročnika te kompleksnost samog postupka dijagnostike (dugotrajnost, troškovi, opremljenost laboratorija) (3). Među najčešće virusne uzročnike ARI kod djece spadaju: respiratorni sincicijski virus (RSV), humani metapneumovirus (hMPV), virusi influence (Flu), parainfluenca virusi (PIV), adenovirusi (Adv), rinovirusi (HRV), humani bokavirus (HboV), koronavirusi i enterovirusi (4). Bakterije koje mogu uzrokovati infekcije dišnog sustava su: streptokok, stafilokok, hemofilne bakterije, legionele, *Klebsiella pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae*. Gljive (kandide, *Aspergillus spp.*, zigomikote i *Cryptococcus neoformans*) također mogu biti uzročnici infekcija dišnog

sustava (1). Kako bi laboratorijska dijagnostika koristila kliničaru u svakodnevnom radu te imala utjecaj na odluke u postupanju s pacijentom ona mora biti lako dostupna, jednostavna za izvođenje i dati precizan rezultat u relativno kratkom vremenskom periodu. U ovom radu bit će prikazan pregled osnovnih obilježja najčešćih virusnih uzročnika infekcija dišnog sustava u djece i dostupne laboratorijske dijagnostike virusnih infekcija uz naglasak na metode brze dijagnostike tih virusa.

2. VIRUSNI UZROČNICI AKUTNIH RESPIRATORNIH INFEKCIJA U DJECE

2.1. Respiratorni sincicijski virus

Respiratorni sincicijski virus (RSV) pripada porodici *Paramyxoviridae* i rodu *Orthopneumovirus*. Genom virusa sadržan je u jednolančanoj negativnoj RNA uzvojnici, a sam virus je pleomorfne građe. Na površini se nalaze dva proteina: G (vezni) i F (fuzijski). Vezni, odnosno G-protein virus koristi za prijanjanje uz stanicu, a fuzijski protein omogućuje ulazak u stanicu i stvaranje karakterističnog citopatičnog učinka, sincicija (5). Velikim afinitetom se veže za epitelne stanice respiratornog sustava te šireći se među njima uzrokuje fuziju njihovih staničnih membrana. Način prijenosa je kapljični, najčešće rukama sa površina i predmeta kontaminiranih zaraženim sekretom (5).

U djece RSV kao posljedicu primoinfekcije uglavnom uzrokuje infekciju donjeg dišnog sustava kao što je: bronhiolitis, pneumonija, traheobronhitis i sindrom krupa, dok se reinfekcije najčešće manifestiraju kao infekcije gornjeg dijela dišnog sustava i uglavnom su blažeg kliničkog tijeka. Rizične skupine kod kojih se može očekivati teži tijek bolesti su: prematurusi, dojenčad mlađa od 3 mjeseca, djeca i odrasli koji boluju od bilo koje kronične plućne ili srčane bolesti te djeca i odrasli s nekim oblikom

imunodefijencije ili imunokompromitiranosti. U tim skupinama češće su zahvaćeni donji dišni putevi i smrtnost je veća (6).

RSV najznačajni je uzročnik bronhiolitisa u dojenačkoj dobi. Simptomi bronhiolitisa (otežano disanje, produžen ekspirij, hiperinflacija pluća, uvlačenje međurebrenih prostora i tahikardija) obično se javljaju nakon kratkotrajne infekcije gornjeg dijela dišnog sustava (5).

Rezultati jednog istraživanja provedenog u Hrvatskoj na 504 RSV pozitivne djece u periodu od 2012. do 2014. godine pokazali su da je u dobnoj skupini od 0 do 6 mjeseci najčešća klinička prezentacija bila bronhiolitis (65,7%) dok je kod starije djece, od 2 do 5 godina, najčešća klinička prezentacija bila infekcija gornjeg dijela dišnog sustava (55,8%) (7). Čak 40% primoinfekcija kod djece u dobi do jedne godine rezultira bronhiolitisom (8). Smatra se da do 2. godine života 98% djece dođe u kontakt s ovim virusom (9).

Infekcije uzrokovane RSV-om sporadično se mogu pojavljivati u bilo kojem dijelu godine, epidemijski se, međutim, pojavljuju u zimskoj sezoni (uglavnom od studenog do travnja). U Hrvatskoj se veće epidemije javljaju svake 2 godine. Veliku zimsku epidemiju za 14 mjeseci prati mala proljetna, a za 8 mjeseci opet slijedi velika zimska (7).

Prema različitim studijama udio ARI infekcija uzrokovanih RSV-om varira između 17,7% do 37,1% (10-14). Promijenjena dinamika funkcioniranja društva tijekom COVID-19 pandemije imala je utjecaj i na uobičajenu cirkulaciju RSV-a. Prva očekivana sezona RSV-a nakon početka pandemija u prosjeku je kasnila 39 tjedana u 11 zemalja koje su bile dio istraživanja. Uz napomenu da se u nekim zemljama nije niti pojavila (15).

Liječenje ove infekcije uglavnom se sastoji od simptomatskog liječenja. U SAD-u je dozvoljena primjena, sintetičkog nukleozidnog analoga, Ribavirina. U *in vitro* uvjetima je dokazano njegovo djelovanje na RSV, no zbog visoke cijene, opasnosti za osoblje i upitne učinkovitosti nije često u upotrebi (8). Osim općih mjera prevencije u Hrvatskoj postoji i specifični program prevencije RSV infekcije u djece koja spadaju u rizične skupine. Taj specifični program sastoji se od pasivne imunizacije monoklonskim protutijelom, Palivizumabom. Vežući se za F-protein, Palivizumab, sprječava ulazak virusa u stanicu, a time i mogućnost infekcije, ublažuje kliničku sliku te smanjuje broj hospitalizacija. U program prevencije su uključena djeca rođena s manje od 32 tjedna gestacije mlađa od šest mjeseci i djeca s hemodinamski značajnom prirođenom srčanom greškom mlađa od dvije godine. U mjesecima sezone RSV-a (od studenog do ožujka) dijete jednom mjesečno prima Palivizumab osim ako u tome periodu bude hospitalizirano zbog RSV infekcije (5).

Dokaz virusa provodi se metodama izravne virološke dijagnostike (izolacija i detekcija virusa u kliničkom materijalu uzetom aspiracijom nazofaringealnog sekreta, ispirkom nosa ili obriskom nazofarinksa) (5). Zlatni standard je RT-PCR. Brze metode detekcije antigena pružaju rezultate unutar nekoliko minuta. Razvijeni POC testovi koriste metode imunokromatografije i imunoenzimske detekcije antigena (9).

2.2. Virusi parainfluence

Virusi parainfluence (PIV) su RNA virusi koji pripadaju porodici *Paramyxoviridae*. Do sada su opisana četiri serotipa, a označena su brojevima od 1 do 4. PIV-1 i PIV-3 dio su roda *Respirovirus*, PIV-2 i PIV-4 roda *Rubulavirus*. PIV su ovijeni lipoproteinskom ovojnicom podrijetlom od domaćina, a na njoj se nalazi glikoproteinski izdanak

hemaglutinin-neuramidaze (HN), zadužen za prijanjanje virusa za stanicu domaćina, i fuzijski glikoprotein (F) pomoću kojeg nukleokapsida ulazi u stanicu (5).

PIV-1, PIV-2 i PIV-3 najčešće uzrokuju infekcije donjeg dijela dišnog sustava, dok se PIV-4 uglavnom povezuje uz blage oblike infekcije gornjeg dijela dišnog sustava (16). Oko 15% infekcija PIV-om kod djece rezultira zahvaćanjem donjih dišnih puteva. PIV-1 je glavni uzročnik laringotraheobronhitisa, odnosno krupa, u djece. Krup se, osim općim simptomima, očituje kašljem poput laveža psa, promuklošću i inspiratornim stridorom. Za razliku od djece, odrasli infekciju PIV-om mogu prebroditi bez simptoma ili kao blagu upalu gornjih dišnih puteva. Težak oblik bolesti možemo očekivati samo u imunokompromitiranih bolesnika (17).

Virus se širi izravnim kontaktom i kapljičnim putem. Infekcije PIV-1 i PIV-2 se nešto češće pojavljuju u jesen, a PIV-3 tijekom cijele godine (16). Djeca do prve godine najčešće su zaražena serotipom 3, a serotipove 1 i 2 češće nalazimo u dobi od 1 do 5 godina (5). PIV ometa stanični imunosni odgovor kako bi spriječio razvitak trajne imunosti. Zato je reinfekcija u odrasloj dobi uobičajena, ali uglavnom rezultira blažom kliničkom slikom (16). Prema različitim istraživanjima, provedenim u Hrvatskoj, prevalencija PIV-a kao uzročnika ARI među djecom kreće se između 3,3% i 18,4% (10,18,19).

Liječenje je simptomatsko. U slučaju krupa se mogu primijeniti i sustavni kortikosteroidi te inhalacije adrenalina (17). Od mjere prevencije trenutno su moguće samo opće mjere, a one su posebno važne na pedijatrijskim odjelima i drugim zatvorenim dječjim kolektivima (16). Metode detekcije PIV su klasična kultivacija virusa, *shell-vial* kultura i testovi imnuofluorescencije, ali zlatnim standardom smatramo RT-PCR (17).

2.3. Humani rinovirusi

Humani rinovirusi (HRV) članovi su porodice *Picornaviridae*, a pripadaju rodu *Enterovirus*. Kao i ostali članovi porodice *Picornaviridae* to su mali neovijeni RNA virusi. Dijele se u tri vrste: HRV-A, HRV-B i HRV-C. Otporni su na djelovanje lipidnih otapala, većinom su termostabilni i nestabilni u kiseloj sredini (20).

HRV su uzročnici 30-50% prehlada u populaciji. Nakon inkubacije koja traje od 1 do 4 dana nastupa bolest koja se uglavnom očituje šmrcanjem, kihanjem, začepljenjem nosa i grloboljom. Karakterističan je bistar sekret iz nosa koji s napredovanjem bolesti postaje purulentan, ali bez sekundarne bakterijske infekcije (21). Iako je najčešće uzročnik blažih infekcija gornjeg dišnog sustava postoje istraživanja koja ga sve više povezuju i s infekcijama donjeg dišnog sustava (22). U rizične skupine pripadaju djeca, stariji, imunokompromitirani te bolesnici s kroničnim plućnim bolestima (cistična fibroza, KOPB, astma). Kod njih je zabilježeno učestalije zahvaćenje donjeg dišnog sustava kao i egzacerbacije osnovne bolesti.

Uglavnom se prenose izravnim putem, kontakom velikih kapljica sa sluznicom gornjih dišnih puteva i spojnice oka. Prijenos aerosolom je moguć uz velike količine virusa. Među populacijom virus cirkulira tijekom cijele godine uz povećanu incidenciju u ranu jesen i kasno proljeće. Poznato je više od 100 serotipova, a iz godine u godinu se mijenja prevalencija pojedinog serotipa (20). Djeca su najčešće izvor infekcije te su oni ti koji infekciju unose u obitelj. Visoka učestalost rinovirusa kao uzročnika infekcija dokazana je i u nehospitalizirane kao i među hospitaliziranom djecom s udjelom većim od 50% (10, 11, 23).

Najznačajnija metoda detekcije HRV je RT-PCR, a uključen je i u komercijalno dostupne multiplex PCR testove, ali oni ga ne razlikuju od enterovirusa (22). Liječenje je simptomatsko, a glavna metoda prevencije redovito pranje ruku.

2.4. Humani metapneumovirus

Humani metapneumovirus (hMPV) pripada porodici *Paramyxoviridae* te rodu *Metapneumovirus*. To je RNA virus koji je prvi je put izoliran 2001. godine, međutim retrogradno je pokazano da u populaciji cirkulira već 60 godina. Virusne čestice su kuglasta oblika s izdancima dugim 15nm na površini (5).

Kliničke manifestacije uzrokuju spektar bolesti od blagih infekcija gornjeg dišnog sustava do bronhiolitisa i pneumonija koje dovode do potrebe za mehaničkom ventilacijom (24). Kod djece s infekcijom donjeg dijela respiratornog sustava, bilo hospitalizirane bilo zbrinute ambulantno, u 6 do 12% slučajeva hMPV je dokazan kao uzročnik (25). Prema tome, hMPV je važan uzročnik teških respiratornih infekcija, a prema podacima o stopama hospitalizacije djece mlađe od 5 godina, nalazi se odmah nakon RSV-a (26). Čimbenici rizika za teži oblik bolesti su imunokompromitiranost, preternost, gastroezofagealni refluks i kronična srčana ili plućna bolest (24).

hMPV se širi izravnim kontaktom i kapljičnim putem. Osim po srodnosti, građi i kliničkim manifestacijama hMPV je nalik RSV-u i po pojavnosti epidemija. Češće uzrokuje infekcije potkraj zime i u rano proljeće te se dijelomično preklapa sa sezonom RSV-a, obično 1 do 2 mjeseca nakon njega (25). Sva djeca do pete godine života uglavnom dođu u kontakt s ovim virusom. A prema različitim studijama kod djece s bronhiolitom hMPV je dokazan u 4-21% slučajeva (5). Također je odgovoran i za 10% egzacerbacija astme, uglavnom u djece mlađe od 3 godine (24).

Liječenje je uglavnom simptomatsko. Iako se u *in vitro* uvjetima i na životinjskom modelu ribavirin pokazao učinkovit, u kliničkim uvjetima u obzir se uzima samo kod imunokompromitiranih pacijenta s težom kliničkom slikom. Prevencija se sastoji isključivo od općih mjera (pranje ruku, respiratorna izolacija, izbjegavanje izlaganja) (24).

Prisutnost virusa u populaciji je otkrivena s odgodom jer je kultivacija ovog virusa zahtjevna. Zato se prednost daje metodama detekcije antigena i molekularnim metodama (RT-PCR) (5). Serološka dijagnostika koristi se u epidemiološke i istraživačke svrhe (25).

2.5. Adenovirusi

Adenovirusi (AdV) patogeni za čovjeka pripadaju rodu *Mastadenovirus*. Do sada ih je poznato 88 i svrstani su u sedam grupa (A-G) (27). To su srednje veliki DNA virusi sastavljeni od 252 kapsomere koje čine ikozaedralnu kapsidu. Glavninu antigenske strukture čine pentoni, heksoni te vlaknasti izdanci. Antigene pentonskih baza možemo pronaći kod svih članova porodice *Adenoviridae*. Heksoni također sadrže grupno-specifične, ali i tipno-specifične antigene te su odgovorni za stvaranje neutralizirajućih protutijela, dok su vlaknasti izdanci specifični za svakih tip (28).

AdV u ljudski organizam mogu ući kroz usta, nazofarinks i očnu spojnicu, a za njihovo umnožavanje posebno su pogodne epitelne stanice. U njima se odvija litički oblik infekcije u kojem dolazi do smrti stanice i replikacije velikog broja virusnih čestica. Drugi mogući oblik infekcije se obično zbiva u stanicama limfnog tkiva, tako nastaje kronična ili latentna infekcija (28). Tom obliku su osobito sklони AdV grupe C (29). Treći oblik interakcije jest onkogeno transformacija pri čemu se virusna DNA ugrađuje i

replicira sa staničnom. Takva vrsta infekcije još nije zabilježena kod čovjeka, već samo kod glodavaca (28). Iako postoje razvijena parenteralna cjepiva, onkogeni potencijal AdV-a sprječava njihovu širu primjenu (30).

Adenovirusi u djece uzrokuju 5-10% svih respiratornih bolesti (28,29). Klinička manifestacija AdV infekcije respiratornog sustava uključuje cijeli spektar stanja: obična prehlada, febrilni respiratorni katar, nazofaringitis, traheitis, bronhiolitis i pneumonija. Ovisno o staničnom tropizmu, virus može zahvatiti i druge sustave kao što su: oko, gastrointestinalni i mokraćni sustav.

Najčešće se pojavljuju kod djece u vrijeme zime i ranog proljeća, vojnika u vojnim kampovima, a ponekad i kod odraslih i imunokompromitiranih (29). Prenose se aerosolom. Najčešći tipovi adenovirusa koji uzrokuju infekcije dišnog sustava su 1-7. Za djecu najranije dobi najznačajniji su tipovi 1 i 2, a kasnije to postaju 3 i 5 (28). Prema istraživanjima provedenim u Hrvatskoj udio ARI uzrokovanih AdV-om u hospitalizirane djece iznosi oko 20% (10, 18). Pritom je najveći broj slučajeva zabilježen u dobi između 1 i 2 godine s najmanjom učestalošću nakon navršene 5.godine (18). Za razliku od toga, u Kini je AdV kao uzročnik pneumonije kod djece s najvećom incidencijom detektiran upravo nakon 5. godine, a bio je odgovaran za 3,26% pneumonija među ispitanicima (31).

Specifičan lijek za AdV-infekcije trenutno ne postoji. Kao metoda prevencije od 2011. godine ponovno se koriste oralna cjepiva za adenoviruse tipa 4 i 7, koja imaju križnu reaktivnost s tipovima 3 i 14, za cijepljenje vojnih novaka u SAD-u (32).

Za detekciju AdV koristi se kultivacija, molekularne metode i metode detekcije antigena. Zbog svoje osjetljivosti i brzine, u odnosu na druge metode, PCR je metoda

izbora. Kvantitativni PCR je posebno koristan kod zbrinjavanja imunokompromitiranih pacijenata (30).

2.6. Virus influenza

Influenca virus (Flu) pripada porodici *Orthomyxoviridae*, a razlikujemo 3 tipa: Flu A, Flu B, Flu C. Građen je od jednolančne RNA molekule podijeljene u 8 segmenata (osim Flu C koji ima 7). Na površini lipidne ovojnice nalaze se dva, za patogenezu, vrlo značajna glikoproteinska izdanka: hemagutinin (H) i neuramidaza (N). Razdijeljenost genoma omogućuje učestalu pojavu rekombinacija. Manje promjene na razini nekoliko aminokiselina nazivaju se antigensko skretanje (engl. *drift*) i pojavljuju se svake 2 do 3 godine. Ove promjene omogućuju virusu da svake godine uzrokuju manje epidemije gripe jer djelomična imunost već postoji među populacijom. Veće promjene, odnosno virusne antigenske izmjene (engl. *shift*) uključuju promjenu sastava aminokiselina u polipeptidnom lancu. Smatra se da su posljedica rekombinacije humanog i životinjskog soja. Među populacijom ne postoji razvijena imunost na takav korjenito izmijenjen virus te se stoga razvija pandemija (33). Za pandemiju je karakteristično da se pojavljuje izvan uobičajenog sezone, traje više mjeseci, klinička slika je teža, a stopa smrtnosti značajno veća. Antigenske promjene su osobito karakteristične za Flu A, manje su prisutne kod Flu B, a uopće ih nema kod Flu C. Iz toga slijedi da Flu A ima jaču virulenciju od Flu B i C (34).

Inkubacija je vrlo kratka i iznosi svega 1 do 2 dana, a bolesnik je zarazan i dan prije pojave simptoma (34). Kliničku sliku karakterizira izrazito nagla pojava visoke temperature s naglašenim općim simptomima. Redovito je prisutna glavobolja, umor, iscrpljenost, a specifična je i bol u mišićima i zglobovima. Ponekad se mogu pojaviti i

povraćanje i proljev. Febrilna faza traje 3 do 6 dana, a kada se ona počinje smirivati nastupaju respiratorni simptomi (35). Influenca može proći i kao obična prehlada, no tada je uglavnom riječ o osobi koja je na bilo koji način već razvila djelomičnu imunost na taj virus. Komplikacije su brojne, a možemo ih podijeliti na komplikacije u dišnom sustavu i izvan dišnog sustava. Komplikacije u dišnom sustavu su: bakterijska pneumonija, otitis media, sinusitis, egzacerbacija KOPB-a, laringitis, krup, bronhilitis, virusna pneumonija. Izvan dišnog sustava može doći do razvoja miozitisa, encefalopatije, Guillan-Barre sindroma, Reyeov sindroma, mioperikarditisa i reaktivnog artritisa (36).

Imunost je tipospecifična i u najvećoj mjeri ovisi o hemaglutininu i neuraminidazi. Virus se prenosi izravnim kontaktom sa zaraženom osobom, kontaminiranim aerosolom ili preko kontaminiranih površina (37). Više od 90% umrlih od posljedica infekcije virusom influence pripada dobnoj skupini starijih od 65 godina (36). To je zbog toga što su stariji skloniji razvoju bakterijskih komplikacija. Najveća incidencija je među djecom školske dobi (10-40%), a preko njih se širi, unutar obitelji, na odrasle i djecu druge dobi (38). To je zato što su djeca, jednostavno kao posljedica svoje dobi, bila u manjem kontaktu s različitim tipovima ovog virusa u odnosu na odraslu populaciju. Stoga djeca mlađa od 2 godine spadaju u rizičnu skupinu za razvoj težeg oblika bolesti, kao i: imunokompromitirani, trudnice, babinjače, stariji od 65 godina, bolesnici s kroničnim bolestima srca i pluća (34). Prema rezultatima Kale I. udio ARI uzrokovanih Flu-om kod hospitalizirane djece iznosi 7,7%. Pritom je zapaženo da broj oboljelih raste s dobi, a najveća incidencija je zabilježena kod djece starije od 5 godina (10).

Osnovno liječenje je simptomatsko. U slučaju razvoja težeg oblika bolesti ili pojave infekcije kod pacijenta s čimbenicima rizika za razvoj komplikacija može se upotrijebiti specifična antivirusna terapija. Lijekovi izbora su peroralni pripravak oseltamivir i lijek

zanamivir za inhalacijsku primjenu (37). Oni djeluju kao inhibitori neuramidaze te na taj način sprječavaju izlazak virusa iz stanice. Potrebno ih je primijeniti na samom početku bolesti (unutar 48h od početka simptoma) jer oni ne mogu spriječiti kasnije patogenetske mehanizme koji su posljedica imunološkog odgovora domaćina (36). Prirodna imunizacija je posljedica izloženosti virusu stvara dugotrajnu imunost. Cjepiva koja se koriste za prevenciju teškog oblika bolesti i nastanka komplikacija moraju se ponavljati svake godine jer virus učestalo mutira, a imunost koja se razvije brzo nestaje. Cijepljenje se preporuča svim skupinama s izraženim čimbenicima rizika i zdravstvenim djelatnicima (36). Dostupno je cjepivo sastavljeno od dijelova virusne čestice (H i N) najčešće podrijetlom od četiri tipa virusa (2 Flu A i 2 Flu B) (34). Jedina kontraindikacija je preosjetljivost na jaja jer se cjepivo proizvodi na oplođenim jajima. Postoji i živo atenuirano cjepivo rezervirano za dobnu skupinu između 2 i 50 godina, a nalazimo ga u obliku nazalnog spreja (36).

Dijagnoza influence često se postavlja na temelju kliničke slike i epidemiološke situacije (37). Laboratorijsko testiranje je potrebno provesti u slučaju kada rezultati testa utječu na daljnje zbrinjavanje pacijenta (pitanje primjene antiviralnih lijekova) ili imaju epidemiološko značenje (38). Dostupne laboratorijske metode su: brzi antigenski testovi, PCR i izolacija virusa. Brzi antigenski testovi imaju dobru specifičnost, ali nisku osjetljivost, a pozitivna i negativna prediktivna vrijednost testa ovisi o raširenosti virusa unutar populacije (38). Još jedan nedostatak je nemogućnost razlikovanja Flu A i Flu B tipa. Izolacija virusa je dugotrajan postupak te nam stoga konačni rezultati ne pomažu u donošenju odluka o zbrinjavanju pacijenta. Zato je RT-PCR metoda izbora za detekciju virusa influence (34).

2.7. Koronavirus

Porodica *Coronaviridae* dijeli se u četiri roda: α , β , γ i δ . Humani koronavirusi (HCoV) svrstani su u α (HCoV-229E, HCoV-NL63) i β rod (HCoV-HKU1, HCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV, SARS-CoV-2) (39). Genom HCoV-a sadržan je u jednolančanoj RNA koja se nalazi unutar ovojnice. Pet značajnih strukturnih proteina su: protein nukleokapside (N), matriks protein (M), protein ovojnice (E), hemaglutinin esteraza (HE) i glukoprotein korona-izdanka (S). S odnosno engl. *spike* proteini strše s vanjske strane ovojnice i služe za adsorpciju virusa za stanice te su razlog zbog kojeg je ova skupina dobila naziv prema latinskoj riječi *corona* (kruna) (40).

Sezonski koronavirusi uglavnom zahvaćaju gornji dišni sustav i uzrokuju klasičnu kliničku sliku: rinoreja, nazalna kongestija, grlobolja, kašalj i umjereno povišena tjelesna temperatura. Ponekad mogu dovesti i do upale srednjeg uha te egzacerbacije astme. Kod novorođenčadi i imunokompromitiranih pacijenata postoji opasnost i od razvoja bronholitisa, krupa i pneumonije (41).

Tijekom izbijanja epidemija teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) uočeno je da se u djece, mlađe od 12 godina, razvija puno blaži oblik bolesti nego kod odraslih. Uglavnom se prezentiraju vrućicom, kašljem i rinorejom. Za razliku od njih adolescenti su skloniji težem obliku s vrućicom s tresavicama, općom slabošću, glavoboljom, mialgijom i zahvaćanjem donjih dišnih puteva (41). Općenito, klinička slika SARS-a je vrlo variabilna od blage do vrlo teške bolesti s respiratornom insuficijencijom i potrebom za mehaničkom ventilacijom (39).

Bliskoistočni respiratorni sindrom (MERS engl. *Middle East Respiratory Syndrome*) se također prezentira različitim spektrom kliničkih slika. Od blage bolesti uz zahvaćanje samo gornjih dišnih puteva, pogotovo kod djece, do razvoja respiratorne insuficijencije

uz akutno zatajenje bubrega. Smrtnost je značajno veća nego kod drugih tipova koronavirusa (36%), ali potrebno je uzeti u obzir i činjenicu da blagi slučajevi bolesti uglavnom prođu ne detektirani (41,42).

Najčešći simptomi kod djece oboljele od koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19) kao posljedica zaraze SARS-CoV-2 su kašalj, vrućica, grlobolja te rinoreja, hunjavica, nazalna kongestija, povraćanje i proljev (43). Pomalo specifičan znak ove bolesti, iako ne bi trebao biti, postao je gubitak osjeta okusa i njuha. Ugrožene skupine su stariji od 65 godina, pretili, kardiovaskularni bolesnici i imunokompromitirani. U tim skupinama veća je učestalost razvoja težih oblika ove bolesti uz razvoj pneumonije te u konačnici respiratorne insuficijencije i potrebe za intenzivnim liječenjem. Nastavak prisutnosti simptoma i pojava novih simptoma nakon završetka akutne faze bolesti naziva se postcovid sindrom. Najčešće prisutni simptomi su: umor, glavobolja, poremećaji pažnje, opadanje kose, dispneja, mialgija i artralgija. Međutim, lista simptoma koji se pripisuju postcovid sindromu je svaki dan sve duža, a prave posljedice infekcije ovim virusom se tek otkrivaju (44).

SARS se prvi puta pojavio 2002. godine u južnoj Kini te se tijekom idućih mjeseci epidemijski proširio po Kini, ali i izvan nje. Do kraja 2004. godine zabilježeno je 8098 zaraženih osoba od kojih je 774 preminulo što rezultira ukupnom smrtnošću od 9,6% uz znatnu varijaciju stope smrtnosti u ovisnosti o dobnoj skupini. Od 2004. godine nisu zabilježeni novi slučajevi SARS-a (39,41).

Deset godina nakon otkrića SARS-a, u Saudijskoj Arabiji je zabilježen prvi slučaj MERS-a. Smatra se da su glavni izvor zaraze za čovjeka deve (39). Od 2012. do 2019. zabilježeno je ukupno 2468 slučajeva zaraze od čega 851 smrtni slučaj (42).

COVID-19 se prvi puta pojavila 2019. godine u kineskom gradu Wuhanu. Od tamo se pandemijski proširila po čitavom svijetu i dovela do 539 milijuna slučajeva zaraze i 6 milijuna smrtnih slučajeva koji su zabilježeni do 21. lipnja 2022. godine (44).

Način prijenosa ovih virusa je izravnim kontaktom sa zaraženim sekretom ili većim kapljicama aerosola (39). Period inkubacije varira od 2 do 14 dana (41). Četiri najčešće tipa (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HCoV-OC43) uzrokuju 15-30% svih infekcija dišnog sustava te imaju sezonski karakter (45). Vrh njihove pojavnosti je u zimskim i proljetnim mjesecima. Kod djece je najveći broj infekcija ograničen na gornji dišni sustav, a rjeđe je moguće zahvaćanje i donjeg dijela dišnog sustava. Ovisno tipu virusa prevalencija ARI uzrokovanih HCoV-om u hospitalizirane djece u Hrvatskoj iznosila je 1-10%, a najzahvaćenija dobna skupina bila su dojenčad (10).

Osnova liječenja koronavirusnih infekcija su potporne i simptomatske mjere koje u najtežim oblicima uključuju i mehaničku ventilaciju. Kod liječenja SARS-a postoje podaci, koji nisu službeno potvrđeni, o povoljnim ishodima uz korištenje kombinacije kortikosteroida i ribavirina. Visoke doze metilprednizolona koriste se u drugoj fazi bolesti kako bi umanjili imunološki posredovano oštećenje pluća (39). Prema smjernicama za liječenje COVID-19 Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske u liječenju teških oblika se koriste remdesivir i kortikosterodi uz simptomatske mjere koje uključuju: nadomjesnu terapiju kisikom i antitrombotičnu profilaksu. Ostali lijekovi koji se u pojedinim slučajevima mogu koristiti su: tocilizumab, baricitinib te različite kombinacije monoklonskih protutijela (46).

Mjere prevencije uključuju opće mjere: pranje ruku, odgovarajuća respiratorna higijena, održavanje razmaka, dezinfekcija površina s kojima su ljudi često u kontaktu itd. Za svaki otkriveni slučaj SARS-a, MERS-a i COVID-19 potrebno je obavijestiti

nadležnu javnozdravstvenu službu. Tada se provode mjere izolacije i praćenja kontakata (41). Cjepivo je dostupno jedino za SARS-CoV-2 te se u svjetlu pandemije provodi široko cijepljenje pučanstva kako bi se smanjio udio hospitaliziranih pacijenata, ali i umanjilo cirkuliranje virusa unutar populacije. U Hrvatskoj su do sada bila dostupna cjepiva: Pfizer/BioNTech Comirnaty, SII/COVISHIELD AstraZeneca/AZD1222, Janssen/Ad26.COV 2.S (Johnson & Johnson) i Moderna COVID-19 (mRNA 1273). Mehanizam ovih cjepiva temelji se na virusnom vektoru (AstraZeneca, Johnson & Johnson) i mRNA tehnologiji (Moderna, Pfizer) (46).

Izolacija HCoV je moguća u staničnim kulturama, međutim za pojedine tipove je to teže izvesti te je stoga brza i visoko osjetljiva RT-PCR metoda zlatni standard (40). Detekcija SARS-CoV-2 je moguća i brzim imunokromatografskim testovima, ali uz značajno manju osjetljivost.

2.8. Enterovirusi

Enteroviruse svrstavamo u porodicu *Picornaviridae*. Već iz imena porodice vidljivo je da se radi o malim (lat. *pico*) RNA virusima. Prethodna metoda klasifikacije temeljila se na kultivaciji virusa u staničnoj kulturi te serotipizaciji testom neutralizacije i dijelila je enteroviruse na: poliovirus, Coxsackie A, Coxsackie B, echoviruse i novije enteroviruse. Novija podjela dijeli viruse na osnovi genetičke sličnosti, a humani enterovirusi su svrstani u 4 skupine (HEV A, B, C, D) (20). U humane enteroviruse ubraja se više od 110 tipova virusa (47).

Nakon ulaska kroz gornji dio probavnog sustava slijedi primarno umnožavanje virusa u limfnom tkivu ždrijela i crijeva, a nakon toga slijedi daljnje umnožavanje virusa u dubljim cervikalnim i mezenteričnim limfnim čvorovima i prodor virusa u krvotok (20).

Spektar kliničkih prezentacija uzrokovanih enterovirusima je vrlo širok. U tablici 1 su nabrojane kliničke manifestacije kako bi se prikazala njihova raznolikost. Gotovo svi tipovi virusa se mogu povezati s nespecifičnom vrućicom s respiratornim simptomima ili bez njih. To je tzv. *ljetna gripa* koja prolazi bez većih komplikacija. Međutim, 2014. godine vrlo značajnim virusom u spektru respiratornih bolesti se pokazao enterovirus D68 (EV-D68). On uzrokuje egzacerbaciju astme ili pojavu karakterističnog piskanja kod djece koja prije nisu bolovala od astme uz čestu potrebu za hospitalizacijom zaražene djece. Također postoje i slučajevi u kojima je uz neurološke simptome slične onima koje uzrokuje polio virus, dokazan EV-D68 (48).

Infekcije enterovirusima pojavljuju se uglavnom epidemijski tijekom ljeta i jeseni. Najznačajniji put prijenosa je feko-oralni te je stoga i incidencija veća u mjestima s lošijim socioekonomskim prilikama i slabijom higijenom (20). Izuzetak je EV D68 koji se prenosi respiratornim sekretom (48). Novorođenčad se može zaraziti i vertikalnom transmisijom prije, tijekom ili nakon porođaja, putem majčinog mlijeka ili horizontalnom transmisijom kontaktom s medicinskim osobljem i članovima obitelji (49). Enterovirusne infekcije najznačajnije su upravo za djecu. Tri četvrtine oboljelih čine djeca mlađa od 15 godina uz najveću stopu obolijevanja među dojenčadi (47).

Trenutno nije dostupna specifična terapija za enterovirusne bolesti te je liječenje utemeljeno na simptomatskim mjerama. Za intravenskim imunoglobulinima poseže se samo u određenim težim slučajevima: kronični meningoencefalitis u imunokompromitiranih, generalizirana bolest novorođenčadi i te kod imunokompromitiranih sa sumnjom na miokarditis (48).

Tablica 1. Kliničke manifestacije NPEV-a.

Prema: *Begovac J. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Tablica 79-3, Kliničke manifestacije povezane s Coxackie virusima, echovirusima i enterovirusima; str. 589.*

Klinički sindrom
Asimptomatska infekcija
„Ljetna gripa“
Aseptični meningitis
Encefalitis
Paralitička bolest
Mioperikarditis
Pleurodinija
Herpangina
Bolest ustiju, šaka i stopala
Osip
Obična prehlada
Bronhiolitis, pneumonija
Akutni hemoragični konjuktivitis
Generalizirana bolest novorođenčadi

Higijenske mjere koje uključuju pranje ruku (osobito nakon mijenjanja pelena) i respiratorna higijena (EV-D68) su osnova sprječavanja širenja enterovirusnih infekcija unutar kolektiva (20,48).

Enterovirusne infekcije dokazuju se izolacijom virusa i molekularnom dijagnostikom (20).

2.9. Bokavirus

HBoV pripada porodici *Parvoviridae* (50). Humani bokavirus 1 je prvi puta otkriven i prepoznat kao značajan uzročnik respiratornih infekcija 2005. godine u Švedskoj tijekom projekta Tobiasa Allandera i sur. (51). Uz HBoV1 postoje iz HBoV 2-4 koji su

uglavnom pronađeni u uzorcima stolice. Kao i ostali članovi porodice Parvoviridae HBoV je neovijeni virus s jednolančanom DNA (52).

Najčešće kliničke prezentacije infekcije HBoV1 su: pneumonija, bronhiolitis, upala srednjeg uha, obična prehlada ili egzacerbacija astme (50). Često je prisutna vrućica, kašalj, rinoreja i piskanje (52). U literaturi postoji opisano nekoliko slučajeva encefalitisa, hepatitisa i miokarditisa uz detekciju HBoV, međutim njihova izravna poveznaost nikad nije dokazana daljnjim istraživanjima. Rizikni čimbenici za razvoj teže kliničke slike i zahvaćanja donjih dijelova dišnog sustava su: kronična srčana ili plućna bolest u podlozi, preturnost, malignitet, imunosupresija te djeca mlađa od 2 godine (53).

Kao i kod većine respiratornih virusa, prvi kontakt s ovim virusom nastupa u dječjoj dobi. Prema nekim istraživanjima do 6. godine života 80% djece ima razvijena IgG protutijela na HBoV1 (54). Zbog velike incidencije koinfekcije dugo se razmatralo djeluje li HBoV samo kao ko-patogen ili može i samostalno dovesti do razvoja bolesti. Naime, u različitim studijama HBoV je u od 8,2% do 100% slučajeva detektiran kao ko-patogen (55). Međutim, danas je nedvojbeno potvrđeno da HBoV i sam može uzrokovati infekcije gornjeg i donjeg dijela dišnog sustava, pogotovo kod djece (56). Put prijenosa ovog virusa je uglavnom kapljičnim putem preko respiratornog sekreta. Također je moguć i feko-oralni put prijenosa virusa HBoV 2-4 koje uglavnom pronalazimo u stolici (52). Postoje sumnje na njihovu povezanost s gastroenteritisom, ali one nikada nisu potvrđene (52,57). Prema pregledu literature Christensen A. i sur. HBoV1 je detektiran u 0,7-25% slučajeva infekcije gornjeg dišnog sustava i 0,8-23% infekcija donjeg dišnog sustava (53). U istraživanju provedenom u Hrvatskoj, po učestalosti se nalazio na 6. mjestu uz EV (7,2%), a pritom je 69.2% slučajeva pripadalo

dobnoj skupini od 1 do 3 godine. Takvi rezultati se slažu i s analizom pregleda literature Christensen A. i sur.

Specifične terapije kao ni mjera prevencije u slučaju HBoV infekcije nema. Liječenje se sastoji od simptomatskih mjera među kojima, u težim slučajevima bolesti, najvažniju ulogu imaju bronhodilatatori i ostale mjere respiratorne potpore (53).

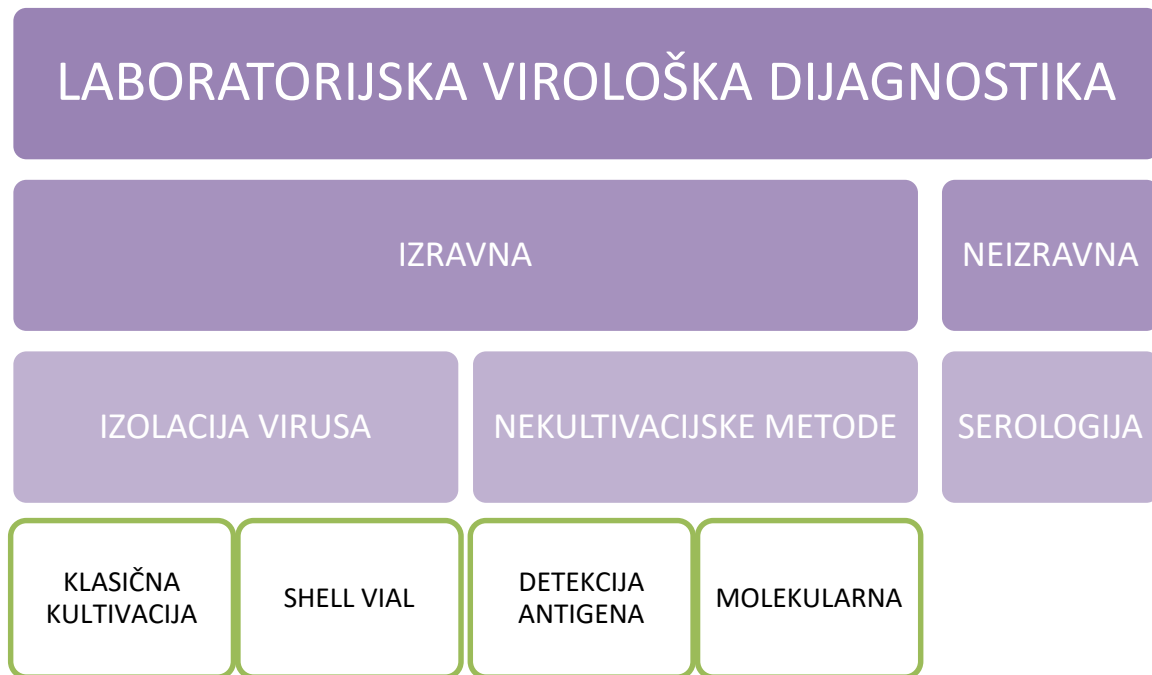
Dijagnostika HBoV temelji se na brzim molekularnim metodam (PCR).

3. LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA VIRUSNIH INFEKCIJA

U laboratorijskoj dijagnostici virusnih infekcija razlikujemo izravne i neizravne metode detekcije virusne infekcije. Izravne metode uključuju kultivaciju virusa i detekciju virusa ili nekog virusnog dijela (antigen, virusna DNA/RNA). Neizravne metode se odnose na detekciju specifičnih protutijela u bolesnikovom serumu koji upućuju na kontakt s određenim virusom. Ova podjela shematski je prikazana na slici 1. Pod metode brze dijagnostike spadaju izravne nekultivacijske metode te će za potrebe ovog rada biti tako obrađene.

Uzorci koji se uzimaju za provođenje dijagnostike, osim uzorka krvi za serološko testiranje, uključuju i obrisak nazofarinksa, obrisak orofarinksa, aspirat nazofarinska, nazalni ispirak i bronhoalveolarni lavat (BAL). Potrebno ih je uzeti tijekom prvih nekoliko dana bolesti jer je tada najveći titar virusa. Nakon uzimanja uzorka pohranjuju se u transportni mediji, koji sprječava isušivanje, uz dodatak antibiotika kako bi se spriječilo prerastanje bakterija u kontaminiranim uzorcima. Većinu uzoraka je moguće čuvati nekoliko dana na temperaturi od 4 do 8 °C. Uzorke koji se neće uspjeti obraditi

u laboratoriju unutar 3 dana od njihovog nastanka potrebno je zamrznuti na temperaturi od -70 °C (58).



Slika 1. Shematski prikaz podjele laboratorijske virusne dijagnostike.

3.1. Izolacija virusa

Virusi su unutarstanični organizmi te su prema tome ovisni o svom domaćinu. Umnožavanje virusa nije moguće bez živih stanica koje ih opskrbljuju energijom i omogućuju sintezu virusnih proteina. Zato su za kultivaciju virusa potrebni biološki sustavi koji će omogućiti umnožavanje virusa. Poznati biološki sustavi su: stanične ili tkivne kulture, oplođena kokošja jaja te pokusne životinje (59).

Klasična stanična kultura može biti: primarna stanična kultura, diploidna stanična kultura i kontinuirana stanična linija. Primarna stanična kultura nastaje iz različitih tkiva ljudi i životinja (59). Takve stanice predstavljaju prvu generaciju stanica osnovnog tkiva, a mogu se subklutivirati samo jednom do dva puta (58). Primjeri takvi staničnih

linija su: stanice bubrega rezus majmuna (RhMK), fibroblasti pilećeg embrija i stanice bubrega ili pluća ljudskog embrija (59). Diploidne stanične linije uglavnom potječu od tkiva fetusa ili novorođenčadi, a mogu se subkultivirati 20 do 50 puta (58). Kontinuirane stanične linije se još nazivaju i heteroploidne. Potječu od tumorskog tkiva (HeLa) ili stanica zaraženih virusom koji ih je transformirao. Imaju neograničen broj subkultivacija (59).

Duljina inkubacije i pojave prvih prepoznatljivih znakova virusne infekcije razlikuju se među virusima. Ukoliko nema specifičnog virusa na kojeg sumnjamo rutinski inkubacija traje 10 do 14 dana (58). Pregledavanjem monosloja stanica pod mikroskopom traga se za promjenama koje su mogle biti posljedica djelovanja virusa. Takve promjene se zajedno nazivaju citopatičnim učinkom (CPU). U neobojenim preparatima uglavnom možemo vidjeti: vakuolizaciju, sincicij, opće morfološke promjene (zaokruživanje stanice, agregacija stanica, smanjivanje stanica), gubitak sposobnosti adherencije na površinu, prisutnost staničnih granulacija (58). Neki virusi (npr. *Influenza virus*, *Parainfluenza virus*, *Togavirusi*, *Mumps virus*) ugrađuju hemaglutinine na površinu stanice koju su zarazili. Hemaglutinini u doticaju s eritrocitima uzrokuju njihovu agregaciju (59). To svojstvo se naziva hemadsorpcija i predstavlja alternativnu metodu dokazivanja prisutnosti virusa u staničnoj kulturi. Rutinski test hemadsorpcije se radi kad se pojavi CPU, a sumnja se na virus s poznatim svojstvom hemadsorpcije ili na kraju inkubacije ako nije prisutan CPU (60). Za dokaz virusa u staničnoj kulturi mogu se koristiti i obilježena protutijela, kao npr. imunofluorescencija (IF) za koju se koriste monoklonska protutijela obilježena fluorescein izotiocijanatom. IF nam omogućuje i precizniju tipizaciju pojedinih virusa (58). Svaki pronađeni CPU ili pozitivan test hemadsorpcije potrebno je potvrditi. Potvrda se izvodi pomoću tipno-specifičnih protutijela koja mogu neutralizirati CPU ili hemadsorpciju.

Iz svega navedenog možemo zaključiti da je za korištenje klasične kultivacije kao dijagnostičke metode potrebno puno vremena, opreme i specijalizirano laboratorijsko osoblje. S druge strane, prednosti ove metode su visoka specifičnost i mogućnost da se detektira virus na koji nismo posumnjali ili nova vrsta virusa.

Danas postoji i skraćena metoda kultivacije, ali s ograničenim spektrom virusa koji se mogu detektirati (61). **Shell vial** metoda (eng. shell- čahura, vial- bočica) naziva se tako jer se provodi u bočicama koje nalikuju na čahure streljiva (62). Nakon inokulacije uzorak se centrifugira. Točan mehanizam nije poznat, ali centrifugiranje potpomaže bolju interakciju virusa i stanice. Inkubacija je skraćena na 1-2 dana, a nakon nje slijedi detekcija virusa pomoću imunoflorescentnih protutijela (61).

Oplođena kokošja jaja danas svoju primjenu uglavnom nalaze za izradu dijagnostičkih virusnih antigena, cjepiva i u istraživanjima. Dijelovi oplođenog jajeta u kojima se virus umnožava su: embrij, korioalantoidna opna, amnionska vrećica, alantoidna šupljina. Njihova primjena u svakodnevne dijagnostičke svrhe zbog kompleksnosti postupka nije uobičajena. U ovom slučaju prisutnost virusa možemo dokazati postojanjem patoloških promjena na korioalantoidnoj opni ili embriju, reakcijom hemaglutinacije i dodavanjem seruma sa specifičnim protutijelima koji prepoznaju određeni virusni antigen (59).

Upotreba pokusnih životinja također je rezervirana samo za istraživačke svrhe (cjepiva, patogeneza virusnih infekcija) te iznimno za dijagnostiku virusnih infekcija koji se umnožavaju samo u životinjama, primjerice *Coxsackie A virus* (59). Uz prisutnost jednostavnijih metoda rad s pokusnim životinjama predstavlja nepotrebno izlaganje riziku stvaranja izvora infekcije za ljude.

3.2. Serološka dijagnostika

Metode serološke dijagnostike, u užem smislu, bazirane su na detekciji specifičnih protutijela u bolesnikovom serumu kao dokazu postojanja kontakta virusa i imunološkog sustava čovjeka. Serološka dijagnostika kod infekcija dišnog sustava nema veliko značenje u rutinskoj dijagnostici jer je 10 do 30% pacijenata u akutnoj fazi bolesti serološki negativno (63). Međutim, detekcija specifičnih protutijela u bolesnikovom serumu može biti korisna kod postavljanja dijagnoze kronične virusne infekcije, praćenje imunološkog statusa pojedinca ili populacije za pojedini virus te za provjeru imunološkog odgovora na cijepljenje (64). Osim toga serološki postupci su značajni kod nadzora imunološkog statusa osjetljivih skupina ili skupina s većim rizikom izloženosti virusu (trudnice, pacijenti kandidati za transplantaciju, zdravstveni i laboratorijski djelatnici) (59). Uzorak za serološku dijagnostiku najčešće je uzorak bolesnikove krvi, a katkada se istodobno može uzeti i uzorak likovra. I uzorka venske krvi, bez dodanog antikoagulansa, izdvaja se serum koji se pohranjuje na temperaturi 4 do 6 °C ili u slučaju pohranjivanja dužeg od nekoliko tjedana na temperaturi od -20 °C (64).

Metode serološke dijagnostike možemo podijeliti u 3 skupine: dokazivanje protutijela inhibicijom neke od funkcija virusa, interakcija antigena i protutijela koja se otkriva pojavama nespecifičnim za virus, izravno dokazivanje interakcije antigena i protutijela (58). **Neutralizacijski test (NT)** i **inhibicija hemaglutinacije (IHA)** su primjeri metode dokazivanja protutijela koja inhibiraju neku od funkcija virusa. NT-om se određuje sposobnost bolesnikova seruma da spriječi umnožavanje virusa u staničnoj kulturi. Razina protutijela se određuje izlaganjem različitih koncentracija bolesnikova seruma jednakoj količini virusa (62). Kod IHA protutijela iz seruma se vežu za virusne čestice i

tako sprječavaju njihovo vezanje za eritrocite i nastanak aglutinacije. Ova je metoda rezervirana za hemaglutinacijske viruse.

U drugu skupinu pripadaju: **reakcija vezanja komplementa (RVK)**, **lateks aglutinacija (LA)**, **pasivna hemaglutinacija (PHA)** i **aviditet specifičnih IgG protutijela (AGP)**. RVK se temelji na dokazu kompleksa antigen-protutijelo pomoću aktiviranog kompleksa (59). Kod LA virusni antigeni su adsorbirani za lateks čestice te uz dodatak uzorka sa specifičnim protutijelima dolazi do nakupljanja čestica koje je vidljivo golim okom. PHA se temelji na jednakom principu kao LA, osim što su u ovom slučaju eritrociti nosači virusnih antigena. AGP nam je osobito značajan kod praćenja imunološkog statusa vezanog uz infekcije uzrokovane citomegalovirusom, virusom Rubella, Varicella zoster virusom i virusom ospica kod trudnica i imunosuprimiranih pacijenata. Određivanjem AGP razlikujemo primarne i sekundarne infekcije (59).

Izravne metode dokazivanja interakcije antigena i protutijela su: **ELISA, IFA i Western blot (WB)**. ELISA i IFA detaljnije su objašnjene u poglavlju Metode brze dijagnostike. U ovom slučaju razlika je samo u tome da su specifična protutijela podrijetlom iz uzorka, a virusni antigen je već vezan za nosač ili je prisutan u staničnoj kulturi. WB je inačica ELISA-e. Protutijela se otkrivaju imunoenzimskom reakcijom, ali tek nakon što su pročišćeni virusni antigeni elektroforetički razdvojeni u poliakrilamidom gelu i preneseni na nitrocelulozni papir (59).

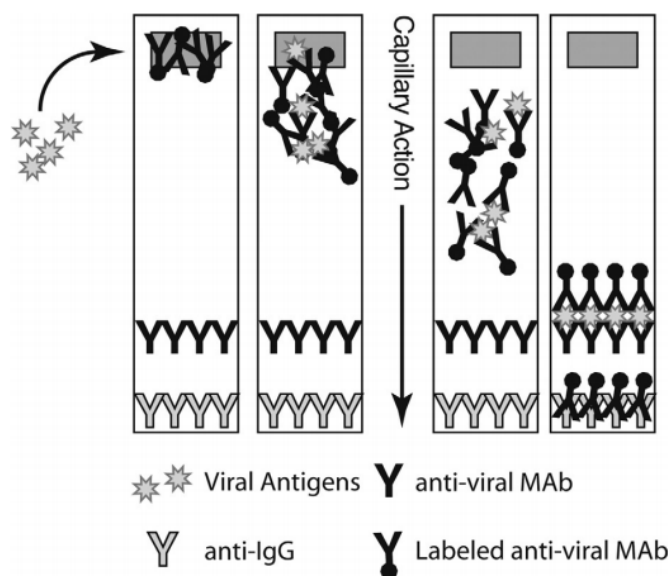
3.3. Metode brze dijagnostike

3.3.1. Detekcija antigena

Detekcija antigena omogućuje brz i izravan dokaz prisutnosti virusa u uzorku. Postoje brojne metode koje se razlikuju prema osjetljivosti, specifičnosti i složenosti izvođenja testa. Među najjednostavnije testove spada **imunokromatografija**. Za njezino izvođenje potrebno je 15-30 minuta, vrlo jednostavna oprema, a sam postupak se sastoji isključivo od nanošenja razrijeđenog uzorka na odgovarajuće mjesto na testnoj pločici i očitavanja rezultata golim okom. Na odgovarajućem mjestu se nalaze specifična obilježena protutijela. U slučaju da je u uzorku prisutan virusni antigen nastat će antigen-protutijelo kompleks. Antigen-protutijelo kompleks ili samo protutijela (u slučaju da virusni antigen nije prisutan u uzorku) putuju duž testne pločice. Kada antigen-protutijelo kompleks dođe u kontakt s antiviralnim monoklonskim protutijelom doći će do promjene boje. Protutijela koja se nisu vezala za antigen reagirat će s anti-IgG protutijelima, koja predstavljaju područje kontrole, te također dovesti do promjene boje (Slika 2). Ukoliko je test pozitivan promjena boje bit će vidljiva na obje lokacija, a ukoliko je negativan samo u području kontrole (62). Prednost ove metode je što se zbog jednostavnosti postupka i opreme može izvoditi izravno na mjestu gdje se pacijentu pruža skrb, odnosno to je POC (point-of-care) test. Također, u vrijeme visoke prevalencije virusa ovaj test ima dobru negativnu prediktivnu vrijednost (NPV). Nedostatak ove metode je mogućnost dokazivanja svega nekoliko patogena (Flu A i B, RSV, AdV i SARS-CoV-2), niska osjetljivost i specifičnost te niska pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) kada virus nije široko proširen u populaciji (61). Kao što je već navedeno, ovom metodom se mogu detektirati samo RSV i Flu A i B, AdV i SARS CoV-2 . Osjetljivost RSV Respi-Strip, Influ A+B Respi-Strip, Adeno Respi-Strip i COVID-19 Ag Respi-Strip testa, prema podacima proizvođača, se kreće između 60 i

94%. Specifičnost varira između 93 i 99%. Međutim, prema rezultatima istraživanja provedenog u 148 ispitanika, u uspoređni s RT-PCR, osjetljivost COVID-19 Ag Respi-Strip testa iznosila je svega 30% (65).

Još jedan jednostavan i brz postupak detekcije antigena je **lateks-aglutinacija (LA)**. Specifična protutijela adsorbiraju se za polistirenske (lateks) čestice (59). Prilikom kontakta protutijela i antigena iz uzorka dolazi do aglutinacije čestica. Osim što ima nisku specifičnost i osjetljivost u odnosu na druge testove, dostupan je samo za detekciju adenovirusa i RSV (66).



Slika 2. Slikoviti prikaz imunokromatografske metode detekcije antigena. Na odgovarajućem mjestu se nalaze specifična obilježena protutijela (Labeled anti-viral MAb). U slučaju da je u uzorku prisutan virusni antigen (Viral Antigens) nastat će antigen-protutijelo kompleks koje će putovati duž testne pločice. Kada antigen-protutijelo kompleks dođe u kontakt s antiviralnim monoklonskim protutijelom (anti-viral MAb) doći će do promjene boje testne trakice. U slučaju da virusni antigen nije prisutan u uzorku samo će obilježena protutijela putovati duž testne pločice. Protutijela bez vezanog antigena reagirat će s anti-IgG protutijelima (anti-IgG), koja predstavljaju

područje kontrole, te također dovesti do promjene boje. Ukoliko je test pozitivan promjena boje bit će vidljiva na oba područja, a ukoliko je negativan samo u području kontrole. Prema: *Peaper DR. 2014.*

Složenijim metodama detekcije antigena pripadaju imunohistokemijski postupci. Oni se međusobno razlikuju prema tome koja vrsta tvari omogućuje očitavanje reakcije između antigena i protutijela. **Izravna** (DFA, eng. *direct immunofluorescent assay*) i **neizravna imunofluorescenca** (IFA, eng. *indirect immunofluorescent assay*) temelje se na činjenici da postoje fluorofori kojima se može obilježiti protutijelo bez ometanja reakcije antigen-protutijelo. Dva najčešće korištena fluorofora su fluorscein isotiocijanat (FITC) i tetrametil rodamine isotiocijanat (TRITC) (66). Sam postupak izravne imunofluorescence sastoji se od nekoliko koraka. U prvom koraku uzorak s virusnim antigenima fiksira se za predmetno stakalce. Zatim se dodaju specifična protutijela obilježena fluorescentnom bojom. Nakon toga potrebno je isprati višak protutijela i uzorak pregledati u snopu ultraljubičastog svjetla pomoću fluorescentnog mikroskopa (59). Kod metode neizravne imunofluorescencije prije obilježenih protutijela prvo se dodaju specifična protutijela, koja uglavnom potječu od kunića, a zatim se dodaju obilježena protutijela koja onda otkrivaju prvi kompleks. Na taj način nastaje jači fluorescentni signal. Važno je da sekundarna protutijela ne budu istog podrijetla kao i primarna (59). Ovom metodom moguće je detektirati AdV, Flu A i B, PIV 1,2,3, RSV i hMPV (61). Osjetljivost DFA i IFA iznosi 90-95% dok je specifičnost uglavnom iznad 95% (67).

Za izvođenje ovih metoda potrebno je specijalizirano osoblje, složena laboratorijska oprema i unaprijed pripremljeni konjugati za svaki pojedini virus međutim to u konačnici rezultira vrlo visokom specifičnošću (61). **Automatizirani imunofluorescentni test** mjeri fluorescentni signal imunokompleksa vezanih na polistirenske čestice. Rezultati su

dostupni u periodu od 20 minuta (za pozitivne rezultate) do 2 sata (za nisko pozitivne ili negativne rezultate). Moguće je detektirati: Flu A i B, PIV 1, 2, i 3, RSV, hMPV, AdV, HCoV OC43, HBoV i SARS-CoV-2 (68).

Protutijela mogu biti obilježena i radionuklidom pa se ta metoda onda naziva **radioimunotest** (RIA od engl. radioimmunoassay). Postupak se razlikuje u tome što uzorak nije fiksiran za predmetno staklance već se antigeni vežu za neobilježena specifična protutijela (66). Također postoji izravna i neizravna inačica ove metode. Nedostaci koji su u velikoj mjeri ograničili upotrebu ove metode su: opasnosti koje nosi rad s radioaktivnim materijalom, kratko vrijeme poluraspada radionuklida i potreba licence regulatornih agencija za rukovanje s radioaktivnim materijalom (66).

U imunoenzimskom testu protutijela su obilježena enzimom koji ulazi u reakciju sa supstratom te dovodi do promjene boje koja onda ukazuje na prisutnost virusnog antigena. Skraćenica za ovaj test je **ELISA**, a dolazi od engleskog naziva *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Najčešće korišteni enzimi su peroksidaza ili alkalna fosfataza (59). Kao i kod RIA neobilježena protutijela, koja će vezati antigen, su adsorbirana na podlogu, a obilježena protutijela dodaju se nakon inkubacije antigena i neobilježenih protutijela. Također postoji izravna i neizravna varijanta ovog testa. Ako se radi o tekućem uzorku rezultat će se očitati spektrofotometrom, a pripravci inficiranih stanica promatrat će se pod svjetlosnim mikroskopom (59). Enzimska aktivnost odgovarat će količini virusnih čestica, a dobiveni rezultat potrebno je usporediti s pozitivnom i negativnom kontrolnom skupinom (66).

3.3.2. Molekularne metode

Molekularne metode podrazumijevaju detekciju virusne nasljedne građe (DNA ili RNA) kao dokaz prisutnosti virusa. Prve takve metode nisu bile osjetljivije od tradicionalne kultivacije ili detekcije antigena, ali su bile značajno skuplje (62). Međutim unapređenjem tehnologije amplifikacije nukleinskih kiselina značajno se povećala brzina izvođenja testa, osjetljivost, specifičnost te je omogućena pouzdanija detekcija virusa koji rastu sporo ili uopće ne rastu u kulturi (63). Danas su prisutni brojni testovi koji koriste amplifikaciju nukleinskih kiselina (NAAT eng. *nucleic acid amplification test*), ali najšire korištena je lančana reakcija polimerazom (PCR eng. *polymerase chain reaction*) (69). Osnova te metode je denaturacija nukleinskih kiselina koja se postiže grijanjem, hibridizacija početnica koju potpomaže hlađenje te ekstenzija početnica pomoću DNA polimeraze. Jedan takav ciklus traje 15 sekundi, a ponavlja se u krug dok se ne stvori dovoljan broj kopija. Od jedne izvorne molekule tijekom jednog sata može nastati više od milijun kopija (59). Umnožena DNA se zatim može detektirati gel elektroforezom, spektrofotometrijski ili pomoću specifičnih proba koje komplementarno vežu na nukleinsku kiselinu (61). Ovako velik broj kopija omogućuje to da sam test nije toliko ovisan o kvaliteti i količini uzorka kao što je to slučaj kod kultivacije ili detekcije antigena (63).

Nedostatak ove metode je potreba za visoko specijaliziranom opremom i educiranim osobljem te moguća kontaminacija. Vrlo visoka osjetljivost ove metode ponekad može biti i nedostatak i dovesti liječnika do nedoumice jer je sposobna detektirati vrlo male količine virusa koje su prisutne kod latentne ili prezistentne infekcije. U slučaju nastanka mutacije na mjestu vezanja početnice virus može ostati ne detektiran (63).

Inačice ove metode su: amplifikacija RNA postupkom reverzne transkripcije (RT-PCR), PCR u realnom vremenu (*Real-time PCR*), lančana reakcija ugniježdene polimeraze (*Nested PCR*), *Multiplex PCR*. **RT-PCR** omogućuje detekciju RNA virusa. Samu RNA molekulu potrebno je prvo pretvoriti u komplementarnu DNA, a to je moguće uz reverznu transkriptazu. Naime, DNA polimeraza dobivena iz bakterije *Thermus thermophilus* uz prisutnost mangana djeluje kao reverzna transkriptaza (59). **Real-time PCR** omogućuje istovremenu amplifikaciju i detekciju novostvorene DNA. To je moguće jer je tehnologija detekcije fluorescentnog signala umetnuta u sam proces amplifikacije pa se sve događa istovremeno ili jedno za drugim. Osim što je cijeli proces značajno skraćen ova metoda smanjuje vjerojatnost kontaminacije i pruža mogućnost kvantifikacije rezultata. Kvantifikacija rezultata je značajna jer nam može pomoći razlikovati akutne infekcije od latentnih (69). **Nested PCR** je metoda koja omogućuje detekciju izrazito malih količina virusa (npr. iz uzorka osušene krvi) i vrlo visoku rezoluciju tijekom detekcije ciljane DNA (69). To je moguće jer se sastoji od dva susljedna ciklusa PCR-a. U drugom ciklusu amplificiraju se produkti prvog ciklusa (59). U **Multiplex PCR** metodi dvije ili više sekvencija DNA amplificira se istodobno (59). Ovakav pristup posebno je koristan kod respiratornih infekcija jer velik broj različitih virusa uzrokuje sličnu kliničku sliku. Osim toga uz multiplex PCR tehnologiju moguće je dokazati i koinfekciju (63).

Molekularne metode dijagnostike s napredovanjem tehnologije se mogu koristiti i kao POC testovi. U takvim dijagnostičkim instrumentima je, u zatvorenim kasetama ili vrećicama, integrirana izolacija i amplifikacija nukleinskih kiselina. Pritom je mogućnost kontaminacije svedena na minimum, a glavni nedostatak je njihova visoka cijena (61). Pregled dostupnih molekularnih POC testove i njihovih karakteristika prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Pregled molekularnih POC testova za dijagnostiku respiratornih virusnih infekcija.

Prema: *Ljubin Sternak, S. Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava. Dostupno na: www.stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak_suvremena_dg.pdf*

Naziv testa	Metoda	Virusi	Trajanje testa [min]	Karakteristike	
				OSJETLJIVOST	SPECIFIČNOST
ID NOW™ Influenza A/B, RSV	LAMP	Flu A/B, RSV, SARS-CoV-2	7-13	92,8-100%	97,4-100%
Xpert® Xpress Flu i Flu/RSV, Xpert® Flu i Flu/RSV XC	Real-time RT-PCR	Flu A/B, RSV	20-75	85,7-100%	95,2-100%
Cobas® Liat Influenza A&B i RSV	Real-time RT-PCR	Flu A/B, RSV	20	94,2-100%	97,1-100%
FilmArray Respiratory panel	Nested PCR i analiza krivulje taljenja	Flu A/B, RSV, AdV, HBoV, HRV/EV, PIV- 1-4	60	66,7-100%	89,1-100%
Simplexa™ Flu A i B+RSV	Real-time RT-PCR	Flu A/B, RSV	60	80,7-100%	100%
Verigene respiratory panel	PCR	Flu A/B, RSV, hMPV, AdV, HRV, PIV 1-4	<120	81,8-100%	97,7-99,9%

U molekularne metode spadaju i izotermalne reakcije, ali one nisu u toliko širokoj uporabi kao PCR (69).

Tablica 3. Sažetak prednosti i nedostataka najznačajnijih laboratorijskih metoda.

Prema: Peaper DR, Landry ML. *Laboratory diagnosis of viral infection. Handb Clin Neurol. 2014.*

		Trajanje	Prednosti
			Nedostaci
Izolacija virusa	Klasična	1-21 dan	Mogućnost detekcije brojnih virusa, mogućnost detekcije novih virusa, bolja osjetljivost od detekcije antigena, razlikuje živi virus od virusnih antigena ili nukleinske kiseline.
			Potrebno je specijalizirano osoblje (CPU), neke viruse nije moguće kultivirati, pitanje sigurnosti radi širenja virusa.
	Shell-vial	1-5 dana	Rezultati uglavnom dostupni za 1-2 dana, potrebno manje specijalizirano osoblje (detekcija IF), miješane stanične kulture omogućuju detekciju više virusa odjednom.
			Detekcija samo ciljanih virusa, manja osjetljivost od klasične kulture.
Detekcija antigena	Imunokromatografija	< 30 min	Jednostavno izvođenje, dobra negativna prediktivna vrijednost uz visoku prevalenciju virusa, POC.
			Značajno manja osjetljivost, moguća detekcija samo nekih virusa, niska pozitivna prediktivna vrijednost uz nisku prevalenciju virusa.

	Imunofluorescencija	1-2h	Brzo dostupni rezultati, dostupno za 8 respiratornih virusa. Za ispravnost rezultata potrebna je preciznost laboratorijskog osoblja i određen broj ciljnih stanica za ispravnost rezultata.
	Automatizirani imunofluorescentni esej	20min-2h	POC, bolja osjetljivost i specifičnost u odnosu na druge metode detekcije antigena. Potrebna specijalizirana i skupa oprema.
	ELISA	< 2h	Mogućnost automatizacije Dostupno za detekciju samo nekih virusa
Molekularne metode	općenito		Najveća osjetljivost. moguća detekcija nekultivabilnih virusa, brže od kulture, sigurnije od kulture (virusne čestice su inaktivirane), mogućnost automatizacije i kvantifikacije. Potrebna specijalizirana oprema i osoblje, mogućnost kontaminacije (lažno pozitivni), detekcija klinički neznčajnih virusa, mutacije virusa mogu dovest do lažno negativnih rezultata.
	PCR i RT-PCR	5-9h	Nema kvantifikacije, visoka mogućnost kontaminacije.
	Real-time PCR	1-5h	Skraćeno trajanje, smanjena mogućnost kontaminacije.
	Nested PCR		Detekcija izrazito malih količina virusa. Visok rizik kontaminacije.

	Multiplex PCR		Analiza za više virusa istovremeno, mogućnost detekcije koinfekcije.

4. ZAKLJUČAK

Infekcije dišnog sustava u djece obilježavaju visoka učestalost, veliki broj različitih uzročnika, nespecifična klinička slika, često propisivanje antibiotika.

Virusi su najčešći uzročnici infekcija dišnog sustava. Klasična virološka dijagnostika koja podrazumijeva kultivaciju virusa, zbog dugotrajnosti i zahtijevnosti postupka, nije prikladna za rutinsku upotrebu u dijagnostici infekcija dišnog sustava.

Kako bi dijagnostika u slučaju virusnih ARI koristila kliničaru u svakodnevnom radu, mora biti lako dostupna, jednostavna za izvođenje i davati precizan rezultat u relativno kratkom vremenskom periodu. Stoga su metode brze virološke dijagnostike (detekcija antigena i molekularne metode) upravo u području respiratornih infekcija izrazito korisne i široko u upotrebi. Metode molekularne dijagnostike zbog visoke osjetljivosti i specifičnosti postaju zlatni standard u dijagnostici virusnih infekcija dišnog sustava. Osjetljivi i specifični testovi detekcije virusa daju brz i precizan rezultat što smanjuje potrebu za drugim dijagnostičkim i terapijskim postupcima, daje uvid u epidemiološku situaciju, značajno je za pravovremenu provedbu mjera prevencije širenja, kako u izvanbolničkom tako i u bolničkom okruženju. Naposljetku, uz otkrivanje novih, do sada neproučenih vrsta virusa, metode brze dijagnostike mogu značajno olakšati epidemiološko praćenje i prepoznavanje posljedica infekcija koje uzrokuju.

5. ZAHVALE

Zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Amareli Lukić-Grić na iskazanoj pomoći pri pisanju ovog diplomskog rada. Koristim ovu priliku kako bih zahvalila i mojoj velikoj obitelji na bezuvjetnoj podršci koju su mi pružili tijekom cijelog mog odrastanja, pa tako i studiranja. Na kraju, posebno hvala suprugu Jošku jer istu takvu podršku pronalazim i u našoj maloj obitelji.

6. LITERATURA

1. Lukić-Grić A, Ljubin-Sternak S. Infekcije dišnog sustava. U: Beader N, Bedenić B, Budimir A, ur. Klinička mikrobiologija – odabrana poglavlja. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 9-27.
2. Kuzman I. Osobitosti akutnih respiratornih infekcija u starije djece i adolescenata. *Medicus*. 2010;19(1_Adolescencija_2):41-50.
3. Kuzman I. Akutna respiratorna bolest. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 106-10.
4. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivković-Jureković I, Čepin-Bogović J, Gagro A, Vraneš J. Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. *J Pathog*. 2016;2016:2168780.
doi:10.1155/2016/2168780
5. Mlinarić-Galinović G, Ljubin-Sternak S. Paramiksovirusi i Pneumovirusi. U: Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 458-72.
6. Roglić S. Respiratorni sincicijski virus. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. *Klinička infektologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 522-4.
7. Tabain I, Vilibić-Čavlek T, Jelić V, Mlinarić-Galinović G. Epidemiološke značajke infekcija respiratornim sincicijskim virusom u Zagrebu tijekom dviju uzastopnih zimskih sezona. *Acta medica Croatica* [Internet]. 2017 [pristupljeno 01.07.2022.];71(2):115-119. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/186104>

8. Schweitzer JW, Justice NA. Respiratory Syncytial Virus Infection. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 1, 2021.
9. Prendergast C, Papenburg J. Rapid antigen-based testing for respiratory syncytial virus: moving diagnostics from bench to bedside?. *Future Microbiol.* 2013;8(4):435-44. doi:10.2217/fmb.13.9
10. Kale I. Etiologija virusnih infekcija dišnog sustava u djece hospitalizirane tijekom jednogodišnjeg razdoblja (2017./2018.) u Klinici za dječje bolesti Zagreb. [Internet] Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2019 [pristupljeno 09.05.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:313800>
11. Schreiner D, Groendahl B, Puppe W, Off HNT, Poplawska K, Knuf M i sur. High antibiotic prescription rates in hospitalized children with human metapneumovirus infection in comparison to RSV infection emphasize the value of point-of-care diagnostics. *Infection.* 2019;47(2):201-7. doi:10.1007/s15010-018-1194-5
12. Constantopoulos AG, Kafetzis DA, Syrogiannopoulos GA, Roilides EJ, Malaka-Zafiriou EE, Sbyrakis SS i sur. Burden of respiratory syncytial viral infections on paediatric hospitals: a two-year prospective epidemiological study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002;21(2):102-7. doi:10.1007/s10096-001-0668-y
13. Rossi GA, Medici MC, Merolla R; Osservatorio VRS Study Group. Incidence of respiratory syncytial virus positivity in young Italian children referred to the emergency departments for lower respiratory tract infection over two consecutive epidemic seasons. *Infection.* 2005;33(1):18-24. doi:10.1007/s15010-005-4010-y

14. Sato M, Saito R, Sakai T, Sano Y, Nishikawa M, Sasaki A i sur. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus infections among children with acute respiratory symptoms in a community over three seasons. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):36-40. doi:10.1128/JCM.43.1.36-40.2005
15. Billard MN, van de Ven PM, Baraldi B, Kragten-Tabatabaie L, Bont LJ, Wildenbeest JG. International changes in respiratory syncytial virus (RSV) epidemiology during the COVID-19 pandemic: Association with school closures [published online ahead of print, 2022 Jun 22]. *Influenza Other Respir Viruses.* 2022;10.1111/irv.12998. doi:10.1111/irv.12998
16. Murray PR, Tenover FC, Whitehead AS. *Paramyxoviruses U: Murray PR, Rosenthal KR, Tenover FC, Whitehead AS, ur. Medical microbiology. 9.izd. Philadelphia. Elsevier; 2016. Str. 475-86.*
17. Roglić S. Virusi parainfluence. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. *Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 519-21.*
18. Mlinarić Galinović G, Šulentić Tomić G, Sim R, Markovinović L, Tešović G, Čepin Bogović J. Akutne dišne infekcije u djece uzrokovane adeno i parainfluenca virusima. *Paediatr Croatica*, 2013, 57: 211-5. 2013
19. Ljubin-Sternak S, Marijan T, Ivkovic-Jurekovic I, Cepin-Bogovic J, Gagro A, Vranes J. Etiology and Clinical Characteristics of Single and Multiple Respiratory Virus Infections Diagnosed in Croatian Children in Two Respiratory Seasons. *Journal of pathogens.* 2016;2016:2168780
20. Lukić-Grić A. Pikornavirusi. U: Kalenić S i sur. *Medicinska mikrobiologija. 2.izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 435-44.*

21. Vukelić D. Uvod u Picornaviridae, Poliovirus, Rhinovirus i Parechovirus. U: Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 580-6.
22. To KKW, Yip CCY, Yuen KY. Rhinovirus - From bench to bedside. J Formos Med Assoc. 2017;116(7):496-504. doi:10.1016/j.jfma.2017.04.009
23. Costa LF, Da Silveira HL, Queiróz DAO, Mantese OC, Yokosawa J. Respiratory virus infections in hospitalized and non-hospitalized children: determinants of severe course of the disease. J Infect Dev Ctries. 2022;16(1):196-205. Published 2022 Jan 31. doi:10.3855/jidc.15117
24. Roglić S. Humani Metapneumovirus. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 525-6.
25. American Academy of Pediatrics. Human Metapneumovirus U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31. izd. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. Str. 561-2.
26. Edwards KM, Zhu Y, Griffin MR, Weinberg GA, Hall CB, Szilagyi PG i sur. Burden of human metapneumovirus infection in young children. N Engl J Med. 2013;368(7):633-43. doi:10.1056/NEJMoa1204630
27. Dhingra A, Hage E, Ganzenmueller T, Böttcher S, Hofmann J, Hamprecht K i sur. Molecular Evolution of Human Adenovirus (HAdV) Species C. Sci Rep. 2019;9(1):1039. Published 2019 Jan 31. doi:10.1038/s41598-018-37249-4
28. Žmak Lj, Mlinarić-Galinović G. Adenovirusi. U: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija, 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 403-9.

29. Miše B. Adenovirusi. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 489-92.
30. American Academy of Pediatrics. Adenovirus Infections U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31. izd. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. Str 206-7.
31. Zou L, Yi L, Yu J, Song Y, Liang L, Guo Q i sur. Adenovirus infection in children hospitalized with pneumonia in Guangzhou, China. *Influenza Other Respir Viruses*. 2021;15(1):27-33. doi:10.1111/irv.12782
32. Lynch JP 3rd, Kajon AE. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(4):586-602. doi:10.1055/s-0036-1584923
33. Mlinarić-Galinović G, Tabain I. Ortomiksovirusi. U: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 451 – 7.
34. Kuzman I. Virusi Influence. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 509-18.
35. Kuzman I. (gost urednik). Influenca – uvijek aktualna bolest. *Medicus* 2011;20:3 – 122.
36. Murray PR, Tenover FC, Whitehead SS, Tenover FC, Tenover FC. Orthomyxoviruses U: Murray PR, Tenover FC, Whitehead SS, ur. Medical microbiology. 9. izd. Philadelphia. Elsevier. 2016. Str. 487-95.
37. Javanian M, Barary M, Ghebrehewet S, Koppolu V, Vasigala V, Ebrahimpour S. A brief review of influenza virus infection. *J Med Virol*. 2021;93(8):4638-4646. doi:10.1002/jmv.26990

38. American Academy of Pediatrics. Influenza U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31. izd. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. Str. 476-89.
39. Puljiz I. Koronavirusi. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 596-605.
40. Mlinarić-Galinović G, Ljubin-Sternak S. Koronavirusi. U: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 445-50.
41. American Academy of Pediatrics. Coronaviruses, Including SARS and MERS. U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31. izd. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. Str. 297-301.
42. World Health Organization [Internet]. [pristupljeno 22.06.2022.] Dostupno na: https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1
43. Patel NA. Pediatric COVID-19: Systematic review of the literature. Am J Otolaryngol. 2020;41(5):102573. doi:10.1016/j.amjoto.2020.102573
44. Anaya JM, Rojas M, Salinas ML, Rodríguez Y, Roa G, Lozano M i sur. Post-COVID syndrome. A case series and comprehensive review. Autoimmun Rev. 2021;20(11):102947. doi:10.1016/j.autrev.2021.102947
45. Audi A, Allbrahim M, Kaddoura M, Hijazi G, Yassine HM, Zaraket H. Seasonality of Respiratory Viral Infections: Will COVID-19 Follow Suit?. Front Public Health. 2020;8:567184. Published 2020 Sep 15. doi:10.3389/fpubh.2020.567184

46. Koronavirus.hr [Internet]. [pristupljeno 22.06.2022.] Dostupno na:
https://www.koronavirus.hr/uploads/Smjernice_za_lijecenje_oboljelih_od_koronavirusne_bolesti_2019_COVID_19_verzija_3_od_21_listopada_2021_godine_c93daab882.pdf
47. Vukelić D. Coxsackievirusi, echovirusi i noviji enterovirusi. U: Begovac J, Baršić B, Kuzman I, Tešović G, Vince A, ur. Klinička infektologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str 587-95.
48. American Academy of Pediatrics. Enterovirus (Nonpoliovirus). U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on Infectious Diseases. 31. izd. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. Str 331-4.
49. Chuang YY, Huang YC. Enteroviral infection in neonates. J Microbiol Immunol Infect. 2019;52(6):851-857. doi:10.1016/j.jmii.2019.08.018
50. Mijač M, Ljubin-Sternak S, Ivković-Jureković I, Tot T, Lukić-Grić A, Kale I i sur. Human Bocavirus in Nasopharyngeal Secretion of Hospitalized Children with Acute Respiratory Tract Infection – First Year Results of a Four-Year Prospective Study. Infektološki glasnik [Internet]. 2018 [pristupljeno 12.05.2022.];38(4):94-102. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/227788>
51. Allander T, Tammi MT, Eriksson M, Bjerkner A, Tiveljung-Lindell A, Andersson B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples [published correction appears in Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Oct 25;102(43):15712]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(36):12891-12896. doi:10.1073/pnas.0504666102
52. American Academy of Pediatrics. Bocavirus. U: Kimberlin DW, Brady MT, Jackson MA, Long SS, ur. Red Book: 2018 Report of the Committee on

- Infectious Diseases. 31st ed. Itasca, IL: American Academy of Pediatrics; 2018. str. 251-2.
53. Christensen A, Kesti O, Elenius V, Eskola AL, Døllner H, Altunbulakli C i suri. Human bocaviruses and paediatric infections. *Lancet Child Adolesc Health*. 2019;3(6):418-26. doi:10.1016/S2352-4642(19)30057-4
54. Kantola K, Hedman L, Tanner L, Simell V, Mäkinen M, Partanen J i sur. B-Cell Responses to Human Bocaviruses 1-4: New Insights from a Childhood Follow-Up Study [published correction appears in *PLoS One*. 2017 Feb 8;12(2):e0172078]. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139096. Published 2015 Sep 29. doi:10.1371/journal.pone.0139096
55. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M i sur. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2016;22(39):8684-8697. doi:10.3748/wjg.v22.i39.8684
56. Ljubin-Sternak S, Meštrović T, Lukšić I, Mijač M and Vraneš J (2021) Seasonal Coronaviruses and Other Neglected Respiratory Viruses: A Global Perspective and a Local Snapshot. *Front. Public Health* 9:691163. doi: 10.3389/fpubh.2021.691163
57. Arthur JL, Higgins GD, Davidson GP, Givney RC, Ratcliff RM. A novel bocavirus associated with acute gastroenteritis in Australian children. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000391. doi:10.1371/journal.ppat.1000391
58. Lelan D, Landry MR. Virus isolation U: Jerome K i sur. *Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. 4.izd. Washington: Taylor & Francis Group; 2010. Str 98-112.

59. Presečki V, Presečki-Stanko A, Lukić-Grić A. Laboratorijska dijagnostika virusnih infekcija U: Kalenić S i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. Str. 362-74.
60. Minnich LL, Ray CG. Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. J Clin Microbiol. 1987 Feb;25(2):421-2. doi: 10.1128/jcm.25.2.421-422.1987.
61. Ljubin Sternak S. Suvremena dijagnostika virusnih infekcija dišnog sustava. Dostupno na: http://www.stampar.hr/sites/default/files/Projekti/ljubin_sternak_-_suvremena_dgpdf [Internet]. 2016
62. Peaper DR, Landry ML. Laboratory diagnosis of viral infection. Handb Clin Neurol. 2014;123:123-47. doi:10.1016/B978-0-444-53488-0.00005-5
63. Amir T, Gubi G, Lobel L. Diagnostics of Viral Respiratory Diseases. U: Marks R, Leslie Lobel L, Alpha Sall A. Viral Diagnostics: Advances and Applications. New York: Pan Stanford Publishing; 2013.
64. Hodinka RL. Serologic Test sin Clinical Virology. U: Jerome K i sur. Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 4. izd. Washington: Taylor & Francis Group; 2010. Str. 133-50.
65. Scohy A, Anantharajah A, Bodéus M, Kabamba-Mukadi B, Verroken A, Rodriguez-Villalobos H. Low performance of rapid antigen detection test as frontline testing for COVID-19 diagnosis. J Clin Virol. 2020;129:104455. doi:10.1016/j.jcv.2020.104455
66. Forghani B. Diagnosis by Viral Antigen Detection. U: Jerome K. ur. Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 4. izd. Washington: Taylor & Francis Group; 2010. Str. 113-32.

67. Atmar LR, Greenberg SB. Respiratory Virus Infections U: Jerome K i sur. Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 4. izd. Washington: Taylor & Francis Group; 2010. Str. 98-112.
68. mariPOC [Internet]. [pristupljeno 3.06.2022.] Dostupno na:
<https://www.arcdia.com/maripoc/tests/respi-tests/>
69. Whiley DM, Sloots TP. Molecular Amplification Methods in Diagnostic Virology. U: Jerome K i sur. Lennette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections. 4. izd. Washington: Taylor & Francis Group; 2010. Str. 19-39.

7. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1997. godine u Zagrebu. Od 2004. do 2012. pohađala sam Osnovnu školu Ivana Cankara u Zagrebu. Od 2012. do 2016. godine nastavila sam svoje srednjoškolsko obrazovanje u zagrebačkoj XV. gimnaziji. Tijekom svog redovitog osnovnoškolskog obrazovanja istovremeno sam pohađala i Osnovnu školu za balet i ritmiku te prva dva razreda srednje škole za suvremeni ples Ana Maletić.

Sudjelovanjem na Natjecanjima učenika i studenata glazbe i plesa tijekom tog perioda osvojila sam jednu II. nagradu na regionalnom te tri I. nagrade na državnim natjecanjima. Nakon upisa XV. gimnazije plesom sam se nastavila baviti rekreativno.

U srednjoj školi sam bila uključena u rad grupe darovitih učenika na području biologije te smo 2015. godine osvojili 3. mjesto na Olimpijadi projekata održivog razvoja (INESPO). Nakon mature 2016. godine upisala sam Medicinski fakultet sveučilišta u Zagrebu. Od 2019. godine uključena sam u rad Studentske linije za rijetke bolesti te smo 2020. godine dobili Rektorovu nagradu za taj projekt. 2022. godine sudjelovala sam na CROSS17 s radom u obliku prikaza slučaja o Juvenilnom dermatomiozitisu s vaskulopatijom. Za vrijeme COVID-19 pandemije sudjelovala sam u volonterskom radu studenata medicine na predtiraži KB Sveti Duh i Klinici za dječje bolesti. Ostatak slobodnog vremena tijekom studiranja u velikoj mjeri sam posvetila svojoj obitelji, a zatim hobiju šivanja na šivaćoj mašini i odrađivanju raznih studentskih poslova.