

# Etiologija virusnih gastroenteritisa

---

Ševo, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:419119>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-30**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO-LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

**Martina Ševo**

**ETIOLOGIJA VIRUSNIH GASTROENTERITISA**

**Završni rad**

Split, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
Podružnica  
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA  
PRIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
MEDICINSKO-LABORATORIJSKE DIJAGNOSTIKE

**Martina Ševo**

**ETIOLOGIJA VIRUSNIH GASTROENTERITISA  
ETIOLOGY OF VIRAL GASTROENTERITIS**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor  
**doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.**

Split, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

Znanstveno područje: Biomedicina i zdravstvo  
Znanstveno polje: Kliničke medicinske znanosti

Mentor: doc. dr. sc. Merica Carev, dr. med.

### ETIOLOGIJA VIRUSNIH GASTROENTERITISA

Martina Ševo

**Sažetak:** Gastrointestinalni virusi najčešći su uzročnici gastroenteritisa sa simptomima kao što su vodenasti proljev, povraćanje, povišena temperatura, mučnina, opća slabost, abdominalna bol. Uzorak izbora za testiranje je uzorak stolice koji se testira na četiri najčešća uzročnika, a to su rotavirusi, norovirusi, adenovirusi i astrovirusi. Najjednostavniji način testiranja je imunokromatografskim testovima zbog dobivanja brzih rezultata i ekonomske isplativosti. Provjera rezultata može se napraviti osjetljivijim metodama kao što su ELISA, PCR i multipleks molekularni testovi koji će detektirati manje koncentracije uzročnika. Gastrointestinalni virusi uzrokuju gastroenteritise tijekom cijele godine, dok rotavirusi, norovirusi i astrovirusi pretežno u hladnijim periodima godine izazivaju epidemije. Infekcije su prisutne u svim dobnim skupinama, ali posebno u osoba sa oslabljenim imunološkim sustavom gdje izazivaju teže kliničke slike. Liječenje gastroenteritisa je simptomatsko i posebna pažnja se pridaje nadoknadi tekućine i elektrolita. Kao najbolji način prevencije preporuča se redovita dezinfekcija ruku i radnih površina te korištenje sigurne vode i hrane.

**Ključne riječi:** gastrointestinalni virusi, imunokromatografski testovi, ELISA test

**Rad sadrži:** 40 stranica, 14 slika, 4 tablica, 47 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

## BASIC DOCUMENTATION CARD

**BACHELOR  
THESIS**

**University of Split  
University Department for Health Studies  
Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area: Biomedicine and health  
Scientific field: Clinical medical sciences**

**Supervisor: Asst Prof Merica Carev, MD, PhD**

### **ETIOLOGY OF VIRAL GASTROENTERITIS**

Martina Ševo

**Summary:** Gastrointestinal viruses are the most common causes of gastroenteritis with symptoms such as watery diarrhea, vomiting, fever, nausea, weakness in general, abdominal pain. The chosen sample for testing is a stool sample that is tested for the four most common pathogens: rotaviruses, noroviruses, adenoviruses and astroviruses. The most simple way of testing is with immunochromatographic tests due to the quick results and economic profitability. Result check can be done with more sensitive methods such as ELISA, PCR and multiplex molecular tests, that will detect lower concentrations of the causative agent. Gastrointestinal viruses cause gastroenteritis throughout the whole year, while rotaviruses, noroviruses and astroviruses mainly cause epidemics in colder periods of the year. Infections are present in all age groups, but especially in people with a weakened immune system where they cause more severe clinical symptoms. Treatment of gastroenteritis is symptomatic and special attention is paid to fluid and electrolyte replacement. It is recommended that the best way of prevention is regular disinfection of hands and work surfaces and using safe water and food.

**Keywords:** gastrointestinal viruses, immunochromatographic test, ELISA test

**Thesis contains:** 40 pages, 14 figures, 4 tables, 47 references

**Original in:** Croatian

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. VIRUSI.....	1
1.2. GASTROINTESTINALNI VIRUSI .....	2
1.2.1. Norovirusi.....	3
1.2.2. Rotavirusi .....	4
1.2.3. Adenovirusi .....	6
1.2.4. Astrovirusi.....	8
1.2.5. Enterovirusi .....	9
1.2.6. Koronavirusi.....	10
1.2.7. Ostali virusi gastroenteritisa.....	11
1.3. EPIDEMIOLOGIJA GASTROINTESTINALNIH VIRUSA .....	12
1.4. DIJAGNOSTIKA GASTROINTESTINALNIH VIRUSA .....	15
1.4.1. Imunotestovi.....	15
1.4.1.1. <i>Imunokromatografski testovi</i> .....	15
1.4.1.2. <i>ELISA test (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i> .....	17
1.4.2. PCR (polymerase chain reaction) .....	19
1.4.3. Molekularni multipleks testovi.....	20
1.4.4. Elektronska mikroskopija.....	21
2. CILJ RADA.....	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. UZORKOVANJE .....	23
3.2. POSTUPAK IZVEDBE ELISA TESTA.....	24
3.3. POSTUPAK IZVEDBE IMUNOKROMATOGRFSKOG TESTA.....	27
4. REZULTATI .....	29

4.1. Rezultati ELISA testa .....	29
4.2. Rezultati imunokromatografskih testova.....	30
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČAK.....	35
7. LITERATURA.....	36
8. ŽIVOTOPIS .....	40

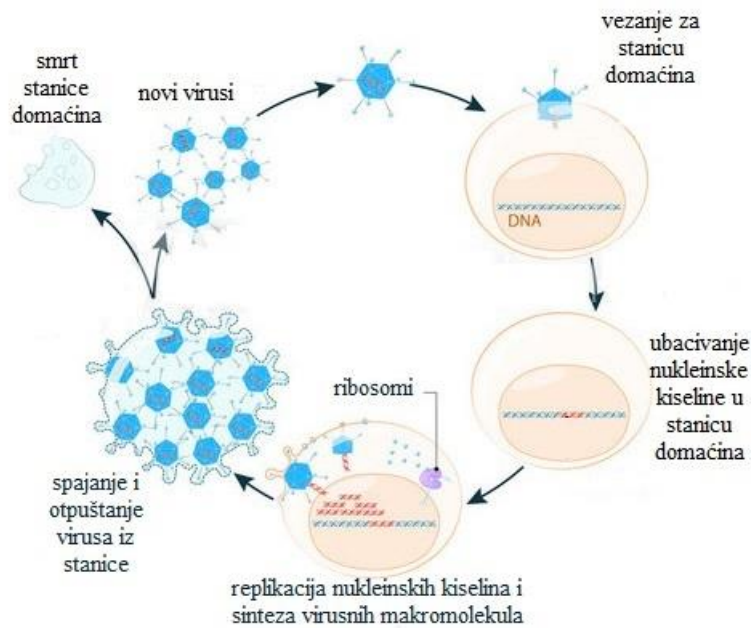
# 1. UVOD

## 1.1. VIRUSI

Virusi su obligatni infektivni intracelularni patogeni koji su neaktivni izvan stanice domaćina. Prosječni promjer virusa je 20 do 300 nm zbog čega je većina virusa vidljiva samo elektronskim mikroskopom. Vrlo su jednostavne građe koja se sastoji od nukleinske kiseline i proteinske kapside, a složeniji virusi imaju dodatne ovojnice. Uloga kapside je zaštititi genetički materijal od isušivanja, temperaturnih promjena, detergenata, kiselina i proteaza. Osim zaštitne uloge kapsida je nositelj virusnih antigena koji se koriste za detekciju virusa. Genski materijal virusa se može sastojati samo od deoksiribonukleinske kiseline (DNA) ili ribonukleinske kiseline (RNA), ne postoje virusi s obje nukleinske kiseline (1,2).

Virusi se ne smatraju normalnim stanovnicima organizma. Kako bi dospjeli u organizam domaćin se mora inficirati izravnim ili neizravnim kontaktom s izvorom zaraze. Izvor zaraze može biti druga osoba, životinje, hrana, voda, itd. Nakon infekcije slijedi umnažanje virusa koje se odvija u dvije faze, ranoj i kasnoj fazi umnažanja (Slika 1.). U ranoj fazi virus prepoznaje stanične receptore te se veže za njih. Nakon vezanja virusna se nukleinska kiselina ubacuje kroz staničnu stijenku u stanicu, a ako imaju ovojnicu ulaze postupkom endocitoze ili fuzijom ovojnice sa stijenkom stanice. Zadnji korak u ranoj fazi je razgradnja kapside kako bi se nukleinska kiselina mogla umnožiti. Kasna faza podrazumijeva umnožavanje nukleinske kiseline i sintezu virusnih makromolekula. Kada se sve potrebne molekule virusa sintetiziraju dolazi do sastavljanja virusa i izlaska virusa iz stanice (Slika 1.) (1).





Slika 1. Ciklus umnažanja virusa

(Izvor: <https://www.istockphoto.com/vector/virus-replication-cycle-gm664748584-121046403>)

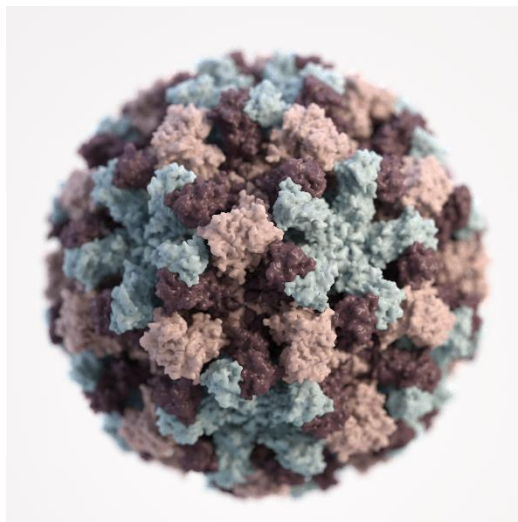
## 1.2. GASTROINTESTINALNI VIRUSI

Virusi koji uzrokuju infekcije u probavnom sustavu spadaju u gastrointestinalne viruse. U gastrointestinalnom sustavu virusi mogu uzrokovati lokalne infekcije ili sustavne bolesti. Lokalne infekcije su uzrokovane prodorom virusa u epitelne stanice crijeva koje koriste za replikaciju. Posljedica replikacije je razaranje epitelnih stanica čime se gube enzimi potrebni za razgradnju hranjivih tvari što dovodi do malapsorpcije. Osim malapsorpcije dolazi i do poremećaja elektrolita te posljedično do acidobazne neravnoteže. Zbog razaranja epitelnih stanica kao najčešća posljedica javlja se proljev koji može dovesti do dehidracije organizma, od ostalih simptoma prisutna je abdominalna bol, povraćanje, mučnina, povišena temperatura, opća slabost i umor. Sustavne bolesti

nastaju širenjem virusa izvan gastrointestinalnog sustava u druge organe, primjeri takvih virusa su virus hepatitisa A i enterovirusi (1,3–5).

### 1.2.1. Norovirusi

Rod *Norovirus* pripada obitelji *Caliciviridae*. Građom svi virusi koji pripadaju ovoj obitelji imaju ikozaedarsku strukturu s 32 udubljenja koja nalikuju na čašice (Slika 2.). Prema udubljenima je rod dobio ime jer *calix* na latinskom znači čašica. Osim karakteristične građe svi imaju jednolančanu pozitivnu RNA što bi značilo da u isto vrijeme RNA služi kao genom i kao mRNA koja se izravno koristi za translaciju. Prema veličini spadaju u male viruse promjera od svega 27-32 nm (6,7).



Slika 2. 3D prikaz norovirusa

(Izvor: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=21350>)

Prvi put su norovirusi opisani 1968. godine u Norwalku, Ohio gdje je izbila epidemija gastroenteritisa. Prema mjestu epidemije virus je nazvan Norwalk virusom. Glavni klinički simptomi koji su bili zabilježeni su mučnina, povraćanje, proljev, abdominalne grčevi i povišena tjelesna temperatura. Među značajkama virus se izdvaja po svojoj postojanosti, može izdržati temperature do 60°C što omogućuje zadržavanje u hrani nakon kuhanja. Osim temperature otporan je i na normalne koncentracije klora u vodi. Zbog svoje izdržljivosti hrana i voda čine glavne izvore virusa uz kontaminirane površine i aerosol tjelesnih tekućina zaražene osobe (8,9).

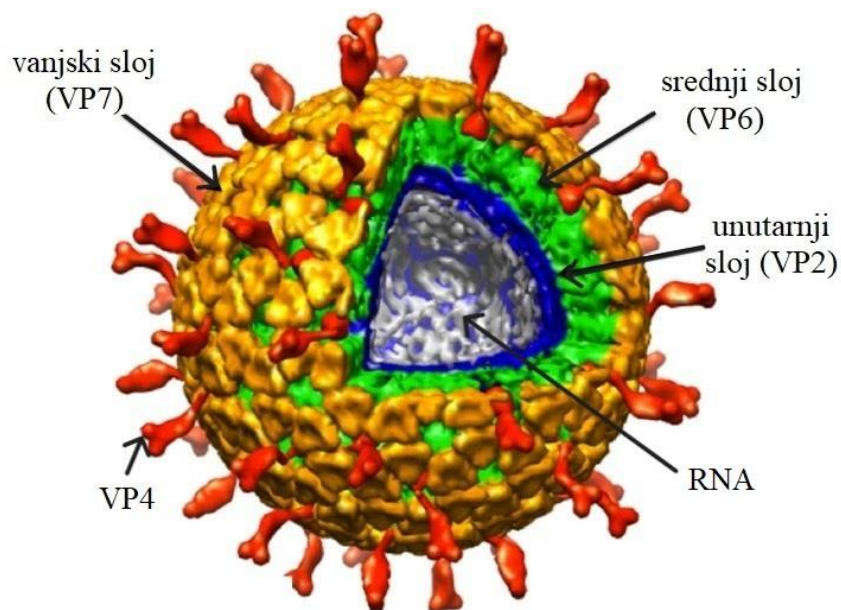
Postoji 10 genogrupa virusa i 45 genotipova. Od genogrupa u čovjeka samo 3 izazivaju gastroenteritise, a to su genogrupe 1, 2 i 4 (GI, GII i GIV). Najčešći uzročnik epidemija je genotip GII.4. Norovirusi su vrlo infektivni, potrebno je 10 virusnih čestica i 24 sata inkubacije kako bi se uzrokovala infekcija. Sama bolest počinje naglo i brzo, a traje kratko, između 12 i 48 sati (9–11).

### **1.2.2. Rotavirusi**

Rod *Rotavirus* čine RNA virusi iz obitelji *Reoviridae* koji izazivaju infekcije kod čovjeka i kod životinja. Životinjski i humani rotavirusi dijele slični genetski materijal tako da je moguć prijenos virusa s životinja na čovjeka i obrnuto. Uzrok takvog ponašanja virusa je velik broj točkastih mutacija zbog čestih pogrešaka RNA polimeraze i rekombinacija gena između humanih i animalnih sojeva. Rod je dobio naziv zbog izgleda kotača pod elektronskim mikroskopom prema latinskoj riječi za kotač, *rota* (1,12).

Rotavirusi imaju ikozaedarsku simetriju i promjera su 60-80 nm. RNA molekula je dvolančane građe i podijeljena je u 11 segmenata. Svaki segmenti kodira po jedan protein, osim zadnjeg koji kodira dva proteina. Sveukupno se kodira 6 strukturnih proteina (VP1-VP4, VP6, VP7) i 6 nestrukturnih proteina (NSP1-NSP6). Kapsida virusa je izgrađena od

tri sloja (Slika 3.). Unutarnji sloj izgrađen je od VP2, srednji od VP6 i vanjski od VP4 i VP7 (6,12).



Slika 3. Prikaz građe rotavirusa

(Izvor: <https://www.magd.cam.ac.uk/sites/default/files/inline-images/Figure%203%20-%20Rotavirus%20particle.jpg> )

Rotavirusi su prema grupnospecifičnom antigenu VP6 koji se nalazi u srednjem sloju kapside razvrstani u 9 grupa od slova A do slova J. Ljudi se inficiraju najčešće s grupom A, a rjeđe s grupama B,C i H. Rotavirusi grupe A mogu se dalje klasificirati uz pomoć tipnospecifičnih antigena VP4 i VP7. VP4 gradi izdanke na kapsidi virusa i prema njihovoj osjetljivosti na proteazu virusi grupe A podijeljeni su u 14 genotipova (P[1]-P[14]). VP7 je glikoprotein koji tvori treći sloj kapside i prema njemu je grupa A podijeljena u 14 serotipova (G1-G14). Najčešći genotip gledano prema VP7 je G1, a prema VP4 je P[8]. Inkubacija virusa traje 1-3 dana nakon čega su prisutni tipični

simptomi kao povišena temperatura, povraćanje, proljev, abdominalni bolovi koji traju 3 do 8 dana (1,9,12,13).

Virusi su stabilni pri visokim temperaturama i kiseloj pH vrijednosti. Inaktivacija virusa se može postići s 70%-tnim etilnim alkoholom. Rotavirusi povećavaju koncentraciju staničnog kalcija koji je potreban za normalno umnožavanje, sastavljanje i infektivnost virusa. Posebno je potreban za glikolizaciju VP7 u vanjskom sloju kapside (4,6).

### 1.2.3. Adenovirusi

Adenovirusi su DNA virusi čijih serotipova je otkriveno približno oko 100 od čega je više od 50 tipova patogeno za čovjeka i svrstani su u rod *Mastadenovirus*. Ostali rodovi izazivaju infekcije kod životinja. Virus osim bolesti gastrointestinalnog sustava uzrokuje bolesti i u respiratornom sustavu, spolno-mokraćnom, mišićno-skeletnom i vidnom sustavu. Adenovirusi se mogu koristiti kao modeli za istraživanje različitih molekularnih i biokemijskih procesa unutar eukariotske stanice te kao vektori u genskoj terapiji (1,9).

DNA molekula unutar virusa je dvolančane i linearne strukture i omogućuje čitanje gena s oba lanca u suprotnim smjerovima, ali u različito vrijeme umnožavanja. Na svakom 5' kraju DNA lanca smješteni su terminalni proteini koji su potrebni za početak umnažanja virusa. Uklanjanjem terminalnih proteina infektivnost se smanjuje 100 puta (14).

Prema veličini su to srednje veliki virusi promjera 70-90 nm, a imaju ikozaedarsku kapsidu bez lipidnih ovojnica. Kapsida se sastoji od 252 podjedinice odnosno kapsomera. Od ukupnog broja kapsomera 240 čine heksoni koji su izgrađeni od 6 protomera i izgrađuju 20 istostraničnih trokutova kapside. Ostatak kapsomera čine 12 pentona koji čine 12 vrhova ikozaedarske kapside. Pentoni su izgrađeni od 5 protomera i mogu se prodijeliti na dva dijela, bazu i nitaste izdanke. Baza pentona ima citotoksični i citopatični

učinak na stanicu, dok izdanci sadrže proteine spajanja koje u dodiru s eritrocitima hemoaglutiniraju. Osim proteina spajanja sadržavaju i tipnospecifične antigene (1,6,12).

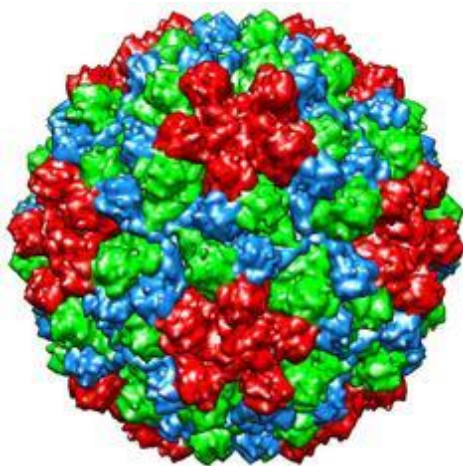
Ljudski adenovirusi su raspoređeni u 7 podskupina od A do G prema podudarnosti u DNA i hemoaglutinacijskim osobinama (Tablica 1.). Najčešći uzročnik gastroenteritisa je podskupina F u kojoj se nalaze serotipovi 40 i 41. Od ostalih serotipova uzročnici gastrointeritisa su 9, 12, 13, 18, 25, 26, 27, 28, 31, 42 i 52 (6,14).

Tablica 1. Podijela adenovirusa (6,12)

<b>PODSKUPINE</b>	<b>SEROTIPOVI</b>	<b>HEMOAGLUTINACIJA</b>	<b>TKIVNI TROPIZAM</b>
<b>A</b>	12,18,31	nema aglutinacije	probavni sustav
<b>B</b>	3,7,11,14,16,21,34, 35,50,55	aglutinacija eritrocita majmuna	dišni i mokraćni sustav
<b>C</b>	1,2,5,6	djelomična aglutinacija eritrocita štakora	dišni sustav
<b>D</b>	8-10,13,15,17,19, 20,22-30,32,33,36- 39,42-49,51,53,54	aglutinacija eritrocita štakora	oči i probavni sustav
<b>E</b>	4	djelomična aglutinacija eritrocita štakora	dišni sustav
<b>F</b>	40,41	djelomična aglutinacija eritrocita štakora	probavni sustav
<b>G</b>	52	neodređeno	probavni sustav

#### 1.2.4. Astrovirusi

Astrovirusi su virusi iz porodice *Astroviridae* koji sadrže jednolančanu pozitivnu RNA. Naziv su dobili prema zvjezdolikoj strukturi pod elektronskim mikroskopom koja nastaje zbog različite količine istaložene boje na površini virusa (Slika 4.). Svi humani astrovirusi smješteni su u rod *Mamastrovirus*. Promjer virusa iznosi od 28 do 30 nm i nemaju ovojnicu (1,9).



Slika 4. 3D prikaz astrovirusa

(Izvor:[https://viperdb.org/Image\\_Details.php?VDB=vip28207&type=chimera&res=3A](https://viperdb.org/Image_Details.php?VDB=vip28207&type=chimera&res=3A))

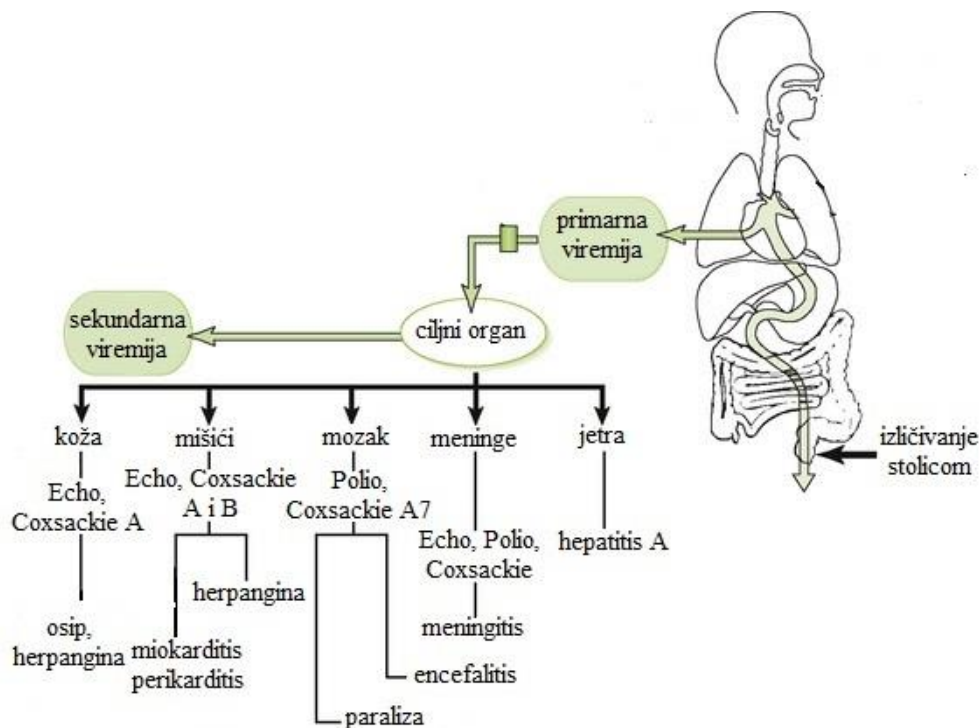
Astrovirusi podijeljeni su u 8 klasičnih serotipova (HAstV-1 do HAstV-8) od kojih je najzastupljeniji HAstV-1. Svi serotipovi virusa izazivaju blagi do teški gastroenteritis koji traje najčešće tri dana, a može biti prisutan i 7 do 14 dana. Otkrivena su i 2 nova serotipa koja se ne uklapaju u klasičnu podjelu, a to su HAstV-VA (Virginija) i HAstV-MLB (Melbourne) koji su dobili naziv po mjestima gdje su pronađeni. Karakteristično za

njih je da izazivaju teže oblike gastroenteritisa, encefalitis i meningitis. Osobina humanih astrovirusa da izaziva infekcije u drugim organima zajednička je s animalnim astrovirusima što može upućivati na mogućnost prijenosa virusa između vrsta (1,15–17).

### 1.2.5. Enterovirusi

Enterovirusi spadaju u obitelj *Picornaviridae*, odnosno kako sam naziv kaže u obitelj malih (latinski *pico*) i RNA virusa. Promjer ikozaedarske kapside iznosi 22-30 nm unutar koje se nalazi jednolančana pozitivna RNA molekula. Sam rod *Enterovirus* sadrži 67 tipova humanog virusa koji su podijeljeni prema svojim osobinama u pet vrsta, a to su *Poliovirus*, *Coxsackievirusi A*, *Coxsackievirusi B*, *Echinovirusi* te novoizdvojeni enterovirusni tipovi. Rod je dobio naziv prema grčkoj riječi *enteron* što znači crijevo zbog sposobnosti virusa da se umnaža u crijevima domaćina. Razlog umnažanja virusa unutar crijeva je otpornost na niski pH u želudcu i alkalno okruženje u dvanaesniku. Osim probavnog sustava kao mjesto ulaska može poslužiti dišni sustav. Nakon početnog umnažanja u gastrointestinalnom ili respiratornom sustavu virus ulazi u krvotok gdje se širi do specifičnih organa kao što su mozak, moždane ovojnice, mišići, koža, jetra uzrokujući sistemske bolesti (Slika 5.) (1,6).





Slika 5. Patogeneza infekcije enterovirusima

(Izvor: <https://www.meddean.luc.edu/lumen/meded/mech/cases/case28/entero.htm>)

### 1.2.6. Koronavirusi

Koronavirusi pripadaju u obitelj *Coronaviridae* u koju spadaju ljudski i životinjski virusi. Naziv dolazi od latinske riječi *corona* što znači kruna zbog izdanaka koji strše iz ovojnice. Zbog ovojnice koju posjeduju spadaju u složene viruse, a izdanci pomažu kod adsorpcije na stanicu domaćina. Genski materijal je jednolančana pozitivna RNA molekula. Promjerom su veličine od 120 do 160 nm. Koronavirusi uzrokuju infekcije respiratornog i gastrointestinalnog sustava. U čovjeka gastrointestinalne simptome kao što su mučnina, povraćanje, proljev mogu uzrokovati svih 7 koronavirusa koji izazivaju infekcije u čovjeka, a to su Humani koronavirus 229E (HCoV-229E), Humani koronavirus OC43 (HCoV-OC43), Koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma

(SARS-CoV), Humani koronavirus NL63 (HCoV-NL63), Humani koronavirus HKU1 (HCoV-HKU1), Bliskoistočni respiratorni sindrom koronavirus (MERS-CoV) i zadnji, novo otkriveni Teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2) (1,18).

### 1.2.7. Ostali virusi gastroenteritisa

Sve veći napredak molekularnih tehnologija kao što su PCR i sekvenciranje doveo je do otkrića novih vrsta virusa.

Novootkriveni RNA virusi obitelji *Picornaviridae* izolirani iz uzorka stolice su *Cosavirus*, *Saffoldvirus*, *Salivirus*. *Cosavirus* je pronađen u uzorku fecesa i brisu ždrijela kod ljudi i svinja. Osim kod pacijenata sa simptomima gastroenteritisa virusi se mogu naći i kod zdravih osoba. *Saffoldvirus* izaziva infekcije u probavnom sustavu, ali može izazvati infekcije i u respiratornom i središnjem živčanom sustavu. Virus je otkriven 2007. godine, a dobio je naziv prema svom otkrivaču Morrisu Saffoldu Jonesu. *Salivirus* otkriven je 2009. godine i sastoji se samo od jedne vrste (*Salivirus A*) s 2 genotipa, *Salivirus A1* i *Salivirus A2*. Akutni gastroenteritis uzrokovan salivirusima je osim kod ljudi zabilježen i kod čimpanza (1,19–22).

U *Parvoviridae* obitelj pripadaju novootkriveni virusi *Bufavirus*, *Bocavirus*, *Tusavirus* i *Cutavirus*. To su virusi s jednolančanom DNA, bez ovojnice i veličine 18-26 nm koji obično nisu patogeni za čovjeka. *Bufavirus* otkriven je 2012. godine u afričkoj državi Burkina Faso prema kojoj je dobio naziv. Genotipski je podijeljen u 3 skupine od kojih je svaka otkrivena iz uzorka stolice. *Bocavirus* je podijeljen u 4 genotipa (HBoV1-HBoV4) od kojih su HBoV 2, 3 i 4 otkriveni u fecesu pacijenata. Monoinfekcije bocavirusima su rijetke, uvijek je prisutan jedan dodatni gastrointestinalni patogen. *Tusavirus* otkriven je u Tunisu u uzorku stolice djeteta. Uspoređivanjem tusavirusa pronađenih kod ljudi i kod životinja utvrđen je visoki stupanj genetske sličnosti što može

upućivati na zoonotsko podrijetlo virusa. *Cutavirus* otkriven je 2016. godine i osim u uzorku stolice može se pronaći i u bioplatima kože i limfnih čvorova (1,23–25).

Rod *Recovirus* je novosvrstani član obitelji *Caliciviridae*. Prvi put je izoliran iz fecesa rezus majmuna u istraživačkom centru za primata u Sveučilištu Tulane po čemu je virus dobio nadimak Tulane virus. Osim kod majmuna virus je pokazao mogućnost izazivanja infekcije u čovjeka. Kao i norovirusi to su mali virus s jednolančanom RNA. Obitelji *Caliciviridae* još pripada i rod *Sapovirus* koji također izazivaju gastroenteritise sa sličnim simptomima kao i rod *Norovirus*, a podijeljeni su u pet serotipova (19,26,27).

### **1.3.EPIDEMIOLOGIJA GASTROINTESTINALNIH VIRUSA**

Gastrointestinalni virusi prenose se fekalno-oralnim putem, najčešće kontaminiranom hranom, vodom, površinama. s osobe na osobu ili aerosolom izlučenih tjelesnih tekućina kao što su feces ili povraćeni sadržaj. Najčešće se epidemije virusa pojavljuju u zatvorenim sredinama u koje ubrajamo vrtiće, škole, staračke domove, bolnice, brodove. Pojedinačni slučajevi pojave virusa su mogući, ali su rijetki (3,9).

Virusi koji uzrokuju gastroenteritise su prisutni tijekom cijele godine dok neki virusi dosežu svoje vrhunce u određenim godišnjim dobima. Primjer takvih virusa su norovirusi, rotavirusi i astrovirusi kod kojih najveći zabilježeni broj zaraženih je tijekom zime. Infekcija norovirusom je zbog sezonske pojave u literaturi opisan kao zimska bolest s povraćanjem. Primjer virusa sa povećanim zabilježenim slučajevima u ljetnim mjesecima su enterovirusi (1,9,28).

Infekcije se javljaju u svim dobnim skupinama, a najčešće u novorođenčadi, male djece, osoba starije životne dobi i imunokompromitiranih osoba. Razlog veće zastupljenosti virusa i teže kliničke slike kod ovih skupina je slabi ili nepostojeći imunitet (3).

Liječenje gastroenteritisa je simptomatsko. Posebnu pažnju treba voditi o nadoknadi izgubljene tekućine i elektrolita povraćanjem ili proljevom kako ne bi došlo do stanja dehidracije i acidoze organizma što za posljedicu može imati nastanak šoka i smrt. Visoki mortalitet zbog akutnih gastroenteritisa poseban je problem u nerazvijenim zemljama zbog loših higijenskih uvjeta i dehidracije (3,9).

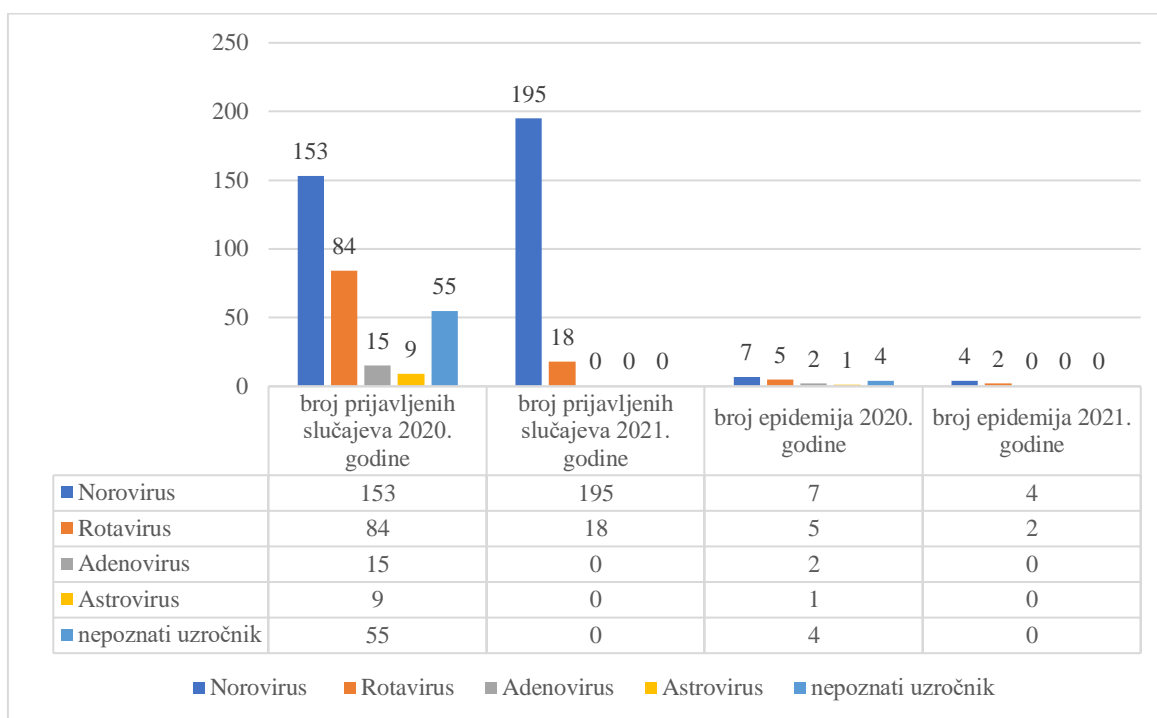
Za prevenciju nastanka infekcija preporuča se redovito pranje ruku te dezinfekcija svih površina koje su se mogle kontaminirati. Zbog prijenosa virusa hranom potrebno je educirati osobe za sigurno rukovanje hranom i provoditi redovite sanitarne inspekcije. Vrlo važno je kvalitetno zbrinjavanje i obrada otpadnih voda te redovito pročišćavanje bazena u kojima se nalazi pitka voda. Jedini virusi za čiju prevenciju postoji cjepivo su rotavirusi. Postoje dvije vrste oralnih cjepiva s živim oslabljenim virusom, *Rotateq*™ i *Rotarix*™ (Slika 6.). *Rotateq*™ je rekombinirano humano-goveđe cjepivo koje se sastoji od goveđeg rotavirusa WC3 koji na sebi sadrži humane glikoproteine VP7 genotipova G1, G2, G3 i G4 te izdanke izgrađene od VP4 genotipa P[8] čime je dobiveno peterovalentno cjepivo. *Rotarix*™ je monovalentno humano cjepivo koje se sastoji od humanog Rotavirusa 89-12 koji na sebi ima genotipove G1 i P[8] (4,9).



Slika 6. *Rotateq*™ i *Rotarix*™ cjepivo

(Izvor: <https://www.portaled.com.br/especialidades-dapediatria/gastroenterologia/rotavirus-aspectos-atuais-e-papel-das-vacinas/attachment/rotateq-e-rotarix-vacinas-contra-o-rotavirus/#> )

Prema podacima iz Hrvatskog zdravstveno-statistički ljetopisa u 2021. godini zabilježene su 4 epidemije norovirusa sa 195 oboljelih i 2 epidemije rotavirusa s 18 oboljelih, ali zbog poteškoća prikupljanja podataka tijekom epidemije COVID-19 virusa podatci nisu potpuni te se brojke ne mogu uzeti u obzir sa sigurnošću. Veći broj virusnih epidemija zabilježen je u 2020. godini kada su osim epidemija norovirusa i rotavirusa zabilježene i epidemije adenovirusa, astrovirusa i epidemije s nepoznatim uzročnikom gastroenteritisa. Prema nacionalnim podacima kao uzrok epidemija prednjači rod *Norovirus* koji u odnosu na ostale viruse ima veći broj prijavljenih zaraženih i veći broj epidemija tijekom godine. Nakon norovirusa poredani prema redoslijedu zastupljenosti su rodovi: *Rotavirus*, *Adenovirus* te *Astrovirus* (Slika 7.) (29,30).



Slika 7. Grafički i tablični prikaz broja prijavljenih slučajeva zaraze i broja epidemija (29,30)

## 1.4. DIJAGNOSTIKA GASTROINTESTINALNIH VIRUSA

Za dijagnostiku gastrointestinalnih virusa uzorak izbora je uzorak stolice, a još se može koristiti rektalni bris. Prednost uzorka stolice nad brisom je veća količina virusa u uzorku što omogućuje lakšu detekciju uzročnika infekcije (31).

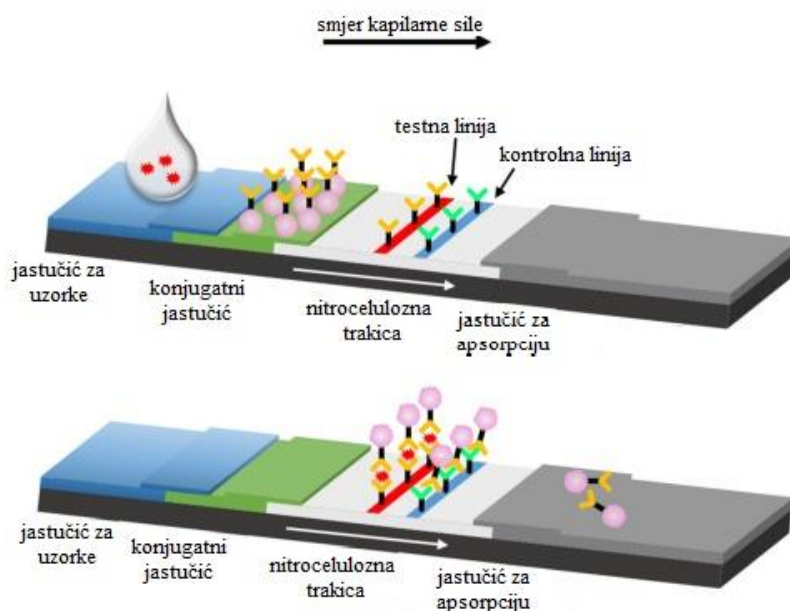
### 1.4.1. Imunotestovi

Imunološki testovi su napravljeni na temelju specifičnog vezanja antitijela i antigena. Antigen je protein koji izaziva imunološki odgovor u organizmu poticanjem proizvodnje antitijela i vezanjem za stvoreno specifično antitijelo. Antitijelo je protein koji ima specifične regije koje omogućuju vezanje za antigen i pokretanje imunosne reakcije. Kod imunotestova možemo detektirati antitijela ili antigene ovisno o vrsti uzorka i reagensu za detekciju koji može sadržavati antitijela ili antigene (32,33).

#### 1.4.1.1. *Imunokromatografski testovi*

Imunokromatografski ili testovi bočnog prolaska su brzi, jednostavni testovi koji omogućuju detekciju željenog analita u roku od nekoliko minuta. Test se sastoji od testne trakice na koju se naslanjaju jastučić za nanošenje uzorka, jastučić koji sadrži konjugat i jastučić za apsorpciju (Slika 8.) (34).

Jastučić za uzorke služi za nanošenje uzorka i ravnomjerno otpuštanje uzorka prema jastučiću koji sadrži konjugat, takav učinak se postiže dodavanjem različitih pufera i proteina. Jastučić može poslužiti i kao filter koji će zadržati nečistoće koje se nalaze u uzorku. Uzorak dolazi do jastučića u kojem se nalazi imobilizirani konjugat koji se veže za antigen iz uzorka, vezanjem nastaje kompleks analit-konjugat. Konjugat se sastoji od antitijela ili antigena na koji je vezana čestica koloidnog zlata ili obojenog lateksa. Kapilarnom silom kompleks analit-konjugat putuje testnom trakicom napravljenom od nitroceluloze na kojoj se nalaze testna i kontrolna linija. Testna i kontrolna linija čine zonu detekcije koja se sastoji od imobiliziranih antitijela ili antigena u liniji. Na zonu detekcije se veže kompleks analit-konjugat. Vezanje kompleksa je popraćeno pojavom vidljive linije na testnoj trakici što predstavlja pozitivan rezultat. Višak reagensa se nakuplja u jastučiću za apsorpciju što onemogućuje vraćanje reagensa i uzorka u zonu detekcije (34–36).



Slika 8. Prikaz imunokromatografskog testa u detekciji antigena

(Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8466143/>)

Imunokromatografski testovi su našli svoju primjenu u raznim područjima zbog svog jednostavnog izvođenja te lakog i brzog očitavanja rezultata bez potrebe za stručnim osposobljavanjem. Zbog svoje praktičnosti i ekonomske isplativosti test je pogodan za brzi probir velikog dijela populacije u epidemijama (34).

Nedostatak testa je što daje samo kvalitativne rezultate koji nam govore je li neki uzročnik prisutan ili ne. Smanjena osjetljivost imunokromatografskog testa može dovesti do lažno negativnih rezultata pa se preporučuje rezultate provjeriti nekom osjetljivijom metodom. Test je namijenjen tekućim uzorcima pa se kruti uzorci trebaju obraditi i prevesti u tekući oblik kako bi se moglo provesti testiranje. Takav postupak oduzima vrijeme, ali i može biti izvor pogreške u izvođenju testa (35,37).

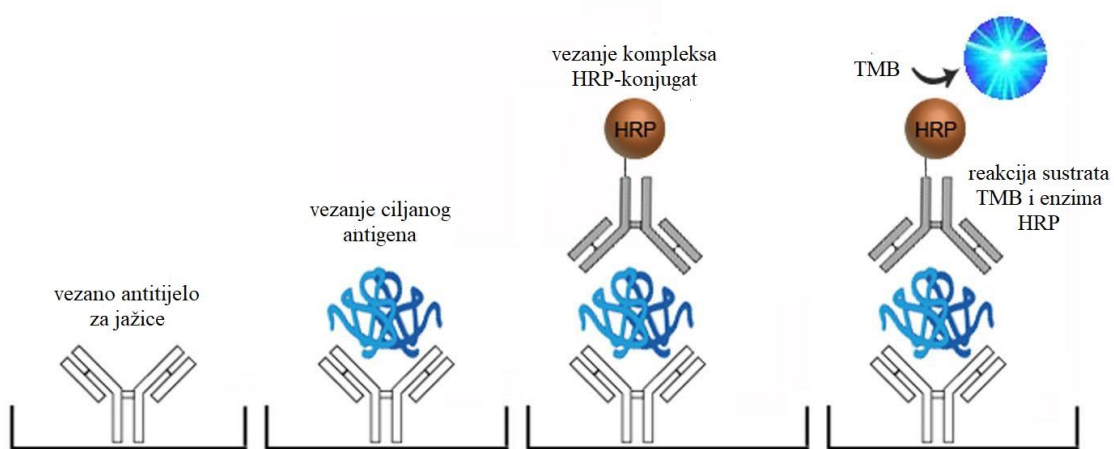
#### *1.4.1.2. ELISA test (Enzyme-linked immunosorbent assay)*

ELISA test se smatra zlatnim standardom među imunitestovima, omogućuje specifičnu i osjetljivu analizu antigena u vrlo malim količinama. Detekcija ciljane molekule je moguća vezanjem detekcijskog antitijela koje je obilježeno uz pomoć enzima ili vezanjem sekundarnog antitijela koje je konjugirano enzimom na detekcijsko antitijelo. Postoji više vrsta testova, tu se ubraja izravna, neizravna, kompetitivna i sendvič ELISA (32,38).

U dijagnostici gastrointestinalnih virusa najčešće se koristi sendvič ELISA koja se izvodi u mikrotitarskoj pločici (Slika 9.). Naziv sendvič slikovito prikazuje vezanje antigena između dvije vrste antitijela. Prvo antitijelo koje hvata antigen je vezano za jažice mikrotitarske pločice. Vezanjem antitijela za jažice sprječava se ispiranje kompleksa antitijelo-antigen puferiranom otopinom deterdženta. Cilj ispiranja između svakog koraka je ukloniti višak nevezanih antitijela i antigena. Konjugat predstavlja detekcijsko antitijelo koje je konjugirano s enzimom HRP (hrenova peroksidaza) i veže



se na kompleks antitijelo-antigen. Dodavanjem supstrata TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) dolazi do reakcije između supstrata i enzima vezanog na antitijelo. Proces je popraćena vidljivom promjenom boje u plavo. Zaustavljanje daljnje reakcije se postiže dodavanjem kiseline što osigurava stabilnost boje za očitavanje rezultata sljedećih 30 minuta (32,33,38–40).



Slika 9. Prikaz sendvič ELISA testa

(Izvor: <https://www.lsbio.com/elisakits/human-ptgs2-cox2-cox-2-sandwich-elisa-elisa-kit-ls-f26732/26732>)

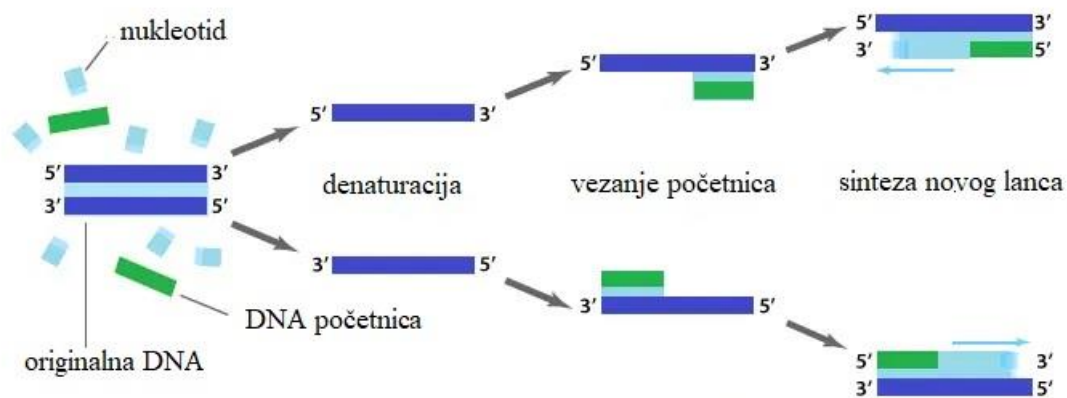
Prednosti ELISA metode su visoka osjetljivost što omogućuje detekciju malih količina uzročnika i velika specifičnost što omogućuje prepoznavanje i razlikovanje različitih molekula. Cijeli postupak testa se može automatizirati što ubrzava rad i smanjuje utjecaj čovjeka u radni proces, a samim time i mogućnost ljudske pogreške (38).

Nedostatci ELISA metode su velika mogućnost lažno pozitivnih i negativnih rezultata zbog interferencije različitih molekula, upotreba skupih i nestabilnih antitijela bez kojih se test ne može odvijati te dugotrajna i složena izvedba testa (38).

### 1.4.2. PCR (lančana reakcija polimeraze)

PCR ili lančana reakcija polimeraze je molekularna metoda kojom se *in vitro* mala količina nukleinske kiseline amplificira kako bi se dobio veliki broj molekula za dokazivanje prisustva uzročnika infekcije. Cijeli postupak se zasniva na tri reakcije koje se ponavljaju u nekoliko ciklusa, a to su denaturacija nukleinske kiseline, hibridizacija početnica i elongacija novog lanca (Slika 10.) (1).

Proces denaturacije odvija se zagrijavanjem na 92-95°C kako bi se odvojile vodikove veze između nukleotida, odnosno lanaca. Smanjenjem temperature na 52°C dolazi do spajanja početnica na odmotani lanac DNA što omogućuje sintezu novog komplementarnog lanca. Sintezi novog lanca osim prisutne početnice zahtjeva DNA polimerazu, nukleotide i temperaturu od 75-80°C (1,41).



Slika 10. Prikaz 3 osnovna koraka PCR reakcije

(Izvor: <https://histogene.co/polymerase-chain-reaction-pcr/> )

Klasični opisani PCR namijenjen je umnožavanju DNA, ali budući da virusi mogu sadržavati RNA potrebno je koristiti RT-PCR (lančanu reakciju polimeraze s reverznom transkripcijom). RT-PCR uz pomoć reverzne transkriptaze pretvara RNA u komplementarnu DNA (cDNA) koja se zatim umnaža postupkom klasičnog PCR-a (1).

U primjeni je i qPCR (kvantitativni PCR) ili još zvan PCR u stvarnom vremenu zbog svoje sposobnosti da mjeri i prikazuje na ekranu u stvarnom vremenu količinu umnožene sekvence kroz cikluse (42).

Prednosti ove metode su visoka specifičnost i osjetljivost što omogućuje brzu detekciju vrlo malih količina nukleinskih kiselina uz pomoć specifičnih početnica za određenu sekvencu. Test je potrebno izvoditi s pozornošću i oprezom zbog mogućnosti kontaminacije koja je česti izvor nevažjećih rezultata. Netočni rezultati mogu biti posljedica i loše dizajniranih početnica koje se ne vežu za ciljane sekvence (41).

### **1.4.3. Molekularni multipleks testovi**

Molekularni multipleks testovi istovremeno detektiraju bakterijske, virusne i parazitske uzročnike gastrointestinalnih infekcija. Primjer takvih testova su *xTAG® GPP (Gastrointestinal Pathogen Panel)*, *FilmArray® Gastrointestinal Panel* i *Verigene Enteric Pathogens Test* (31).

*xTAG® GPP* test može identificirati 9 bakterija, 3 parazita i 3 virusa, a to bi bili rod *Adenovirus*, *Rotavirus* i *Norovirus*. Teste se izvodi u 4 koraka koji se sastoje od pripreme uzorka, amplifikacije genetičkog materijala uz pomoć RT-PCRa, hibridizacije s fluorescentno obilježenim kuglicama koje služe za detekciju uzročnika, detekcija uz pomoć uređaja i obrada podataka. Izvedba testa traje 5 sati, a moguće je odjednom obraditi 24 uzorka što mu daje prednost nad ostalim multipleks testovima (31,43,44).

*FilmArray® Gastrointestinal Panel* ima mogućnost detekcije 23 patogena, 14 bakterija, 4 parazita i 5 virusa. Među virusima koje je moguće detektirati nalaze se rod

*Adenovirus, Astrovirus, Norovirus, Rotavirus, Saprovirus*. Prednost testa je što nije potrebna priprema uzorka i rezultat se dobije u roku 1 sata. Najveći nedostatak metode je što se testira samo jedan po jedan uzorak (43–46).

*Verigene Enteric Pathogens Test* detektira 5 bakterija, 2 shiga toksina i 2 vrste virusa, *Norovirus* i *Rotavirus*. Ovaj test također obrađuje samo jedan po jedan uzorak. Vrijeme obrade jednog uzorka je 2 sata (31,47).

Sveukupno gledano prednost multipleks testova je visoka osjetljivost i specifičnost, te mogućnost u relativno brzom vremenu otkriti više uzročnika infekcije odjednom što s klasičnim metodama nije moguće. Najveći nedostatak ovih testova je skupa oprema i poteškoće kod interpretacije rezultata kod miješanih infekcija (31).

#### **1.4.4. Elektronska mikroskopija**

Elektronski mikroskop je vrsta mikroskopa koji uz pomoć elektronskog snopa koji se ubrzava u elektromagnetskom polju stvara sliku. Prednost elektronskom mikroskopa je veće povećanje i razlučivost u odnosu na svjetlosni mikroskop što omogućuje proučavanje malih čestica kao što su virusi. Virusi se brzo mogu identificirati uz pomoć procesa imunoelektronske mikroskopije u kojem se dodaju antitijela na traženi virus. Ako je virus prisutan antitijela će se vezati na antigene virusa i nastat će nakupine virusa vidljive elektronskim mikroskopom. Veliki nedostatak ove metode je skupa oprema, mali broj educiranih zaposlenika i zahtjevna priprema (1,31).

## **2. CILJ RADA**

Cilj rada je pokazati u uzorku od 20 nasumično odabranih pacijenata s uputnicama za testiranje na gastrointestinalne viruse zastupljenost norovirusa, adenovirusa, rotavirusa i astrovirusa. U radu je napravljena i usporedba dvaju testova na noroviruse, ELISA i imunokromatografski test kako bi se usporedile prednosti i mane metoda.

Rad je izrađen na Odjelu za dijagnostiku infekcija probavnoga sustava Službe za kliničku mikrobiologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. UZORKOVANJE**

Uzorak stolice uzorkuje pacijent prema dobivenim smjernicama od strane laboratorija (Slika 11.). Veliku nuždu pacijent obavlja u noćnu ili bilo kakvu čistu suhu posudu iz koje može žličicom prebaciti dio stolice u transportnu posudu. Potrebno je prebaciti oko 5 ml tekuće stolice, odnosno ako je stolica čvršće konzistencije potrebno je prebaciti uzorak veličine lješnjaka. Preporuča se uzorak uzeti 48-72 sata nakon pojave simptoma tri dana uzastopno kako bi se sa sigurnošću mogao detektirati uzročnik. Vrijeme transporta na sobnoj temperaturi do laboratorija treba biti najviše 2 sata. Ako uzorak nije moguće dostaviti u tom roku pohranjuje se na +4°C u hladnjak, ali ne duže od 24 sata. Uzorci koji će se testirati nakon dužeg perioda se pohranjuju na -20°C . Dostavljeni uzorak se smatra neadekvatnima ako je kontaminiran urinom, sapunom, deterdžentom ili dezinficijensom (28).



Slika 11. Postupak uzorkovanja stolice

(Izvor: <https://kbc-rijeka.hr/wp-content/uploads/2017/06/Kako-se-pripremiti-za-test-na-okultno-krvarenje.pdf>)

### 3.2. POSTUPAK IZVEDBE ELISA TESTA

Test je izveden prema uputama proizvođača za *Thermo Scientific™ IDEIA™ Norovirus Kit*. Unutar jedne kutije za test nalazi se mikrotitar ploča sa lako lomljivim stripovima, diluent (*Sample Diluent*), pozitivna kontrola, diluent za kontrolu (*Control Diluent*), otopina za ispiranje (*Wash Buffer*), supstrat, konjugat i stop otopina (*Stop Solution*) (Slika 12.). Proces testiranja dijeli se na 6 koraka koji obuhvaćaju pripremu uzoraka i mjesta rada, dodavanje konjugata, ispiranje, dodavanje supstrata, zaustavljanje reakcije, očitavanje rezultata (Slika 13.).



Slika 12. Sadržaj Thermo Scientific™ IDEIA™ Norovirus Kita

(izvor: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K604411-2> )

Prije početka rada priprema se radna ploha i reagensi. Radno mjesto se preporuča zaštititi staničevinom kako bi se spriječilo onečišćenje plohe te priprema dezinficijens kako bi se nakon rada očistila ploha i oprema korištena u izvođenju testa ili tijekom rada ako je došlo do prolijevanja uzorka ili reagensa. Od opreme u ovom koraku potrebni su: pipeta od 1000 ml, epruvete za uzorke, negativnu i pozitivnu kontrolu, mikrobiološka eza i vorteks. Reagensi i određeni broj stripova se izvade iz hladnjaka prije izvođenja testa kako bi postigli sobnu temperaturu. Pozitivna kontrola se priprema otapanjem sadržaja bočice s liofiliziranom pozitivnom kontrolom u 1 ml diluenta za kontrolu koji je po sastavu fosfatno puferirana fiziološka otopina koja sadrži antimikrobna sredstva, dok negativnu kontrolu predstavlja 1 ml *Sample diluenta*.

U fazi pripreme uzorka potrebne su zaštitne rukavice zbog sigurnosti zdravstvenog osoblja. Svakom uzorku dodjeljuje se broj koji će biti unesen u radnu listu i označen na epruveti. U epruvetu se pipetira 1 ml *Sample diluenta* te se ezom doda 0,1g krute stolice što odgovara jednoj punoj omći ili 0,1ml tekućeg uzorka. Tako pripremljena smjesa se homogenizira na vorteksu te se centrifugirata 5 minuta na 5000 okretaja po minuti i ostavi da odstoji 10 minuta kako bi se sediment istaložio. Svi postupci nakon pripreme uzorka se izvode bez zaštitnih rukavica.



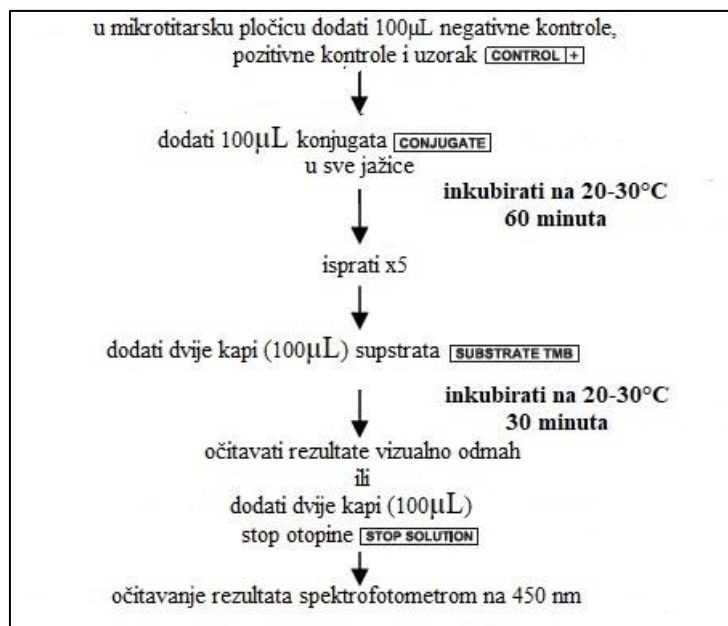
Stripovi se slažu u mikrotitarsku pločicu te se kreće s pipetiranjem kontrola i uzoraka. U prvu jažicu na stripu nanosi se 100  $\mu$ L negativne kontrole, u drugu jažicu 100  $\mu$ L pozitivne kontrola te u ostale po 100  $\mu$ L supernatanta iz prethodno centrifugiranih epruveta. Tijekom pipetiranja potrebno je pipetu s nastavkom držati uspravno i neposredno iznad jažice kako bi se osiguralo da sadržaj u nastavku pipete bude ukapan u jažicu bez dodirivanja ruba ili bez kontaminacije susjednih jažica. U svaku se epruvetu na kraju prve faze postupka dodaje 100  $\mu$ L konjugata koji sadrži poliklonska zečja antitijela i monoklonska mišja antitijela za noroviruse grupe 1 i 2 u puferiranoj otopini koja sadrži antimikrobno sredstvo i plavu boju. Pločica se nježno promiješa i inkubira na sobnoj temperaturi 60 minuta.

Otopina za ispiranje (*Wash*) se priprema razrjeđenjem *Wash Buffera* s destiliranom, deioniziranom destiliranom vodom u omjeru 1:25. Prije početka ispiranja aspirira se sadržaja iz jažica te se doda *Wash*, zatim se takav postupak ponavlja pet puta. Nakon svake aspiracije pločica se istrese s jažicama prema dolje. Postupak ispiranja završava šestom aspiracijom.

Nakon ispiranja u jažice se dodaju 2 kapi ili 100  $\mu$ L supstrata 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB). Pločica se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi. Pojava plave boje u pozitivnoj kontroli i bezbojna negativna kontrola pokazatelj su dobro izvedenog testa. Jažice se isperu nakon inkubacije.

Reakcija se zaustavlja dodavanjem 2 kapi ili 100  $\mu$ L stop otopine (*Stop Solution*) u svaku jažicu pločice.

Očitavanje rezultata vrši se najkasnije unutar 30 minuta fotometrijski. Spektrofotometar treba biti postavljen na 450 nm. Prije očitavanja rezultata pločice očitava se slijepa proba koja je prema uputama proizvođača zrak. Prisustvo stranih tvari i nečisti stripovi dovode do netočnog očitavanja rezultata.



Slika 13. Shematski prikaz postupka izvedbe ELISA test

(Izvor: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K604411-2> )

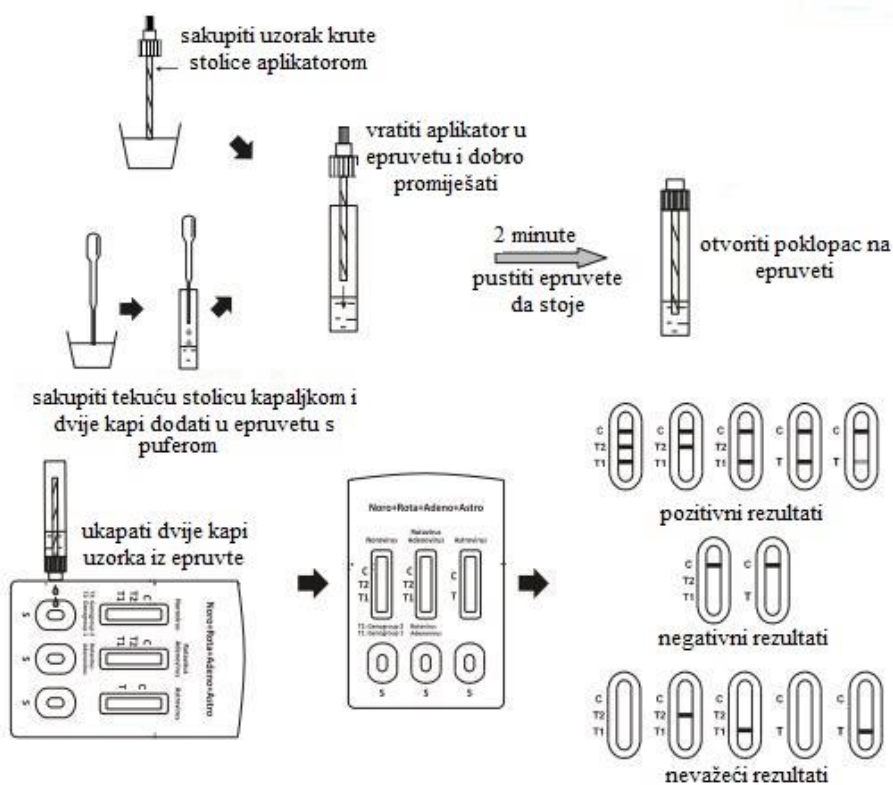
### 3.3. POSTUPAK IZVEDBE IMUNOKROMATOGRFSKOG TESTA

Testiranje je izvedeno prema uputama proizvođača JusChek™ za noroviruse, rotaviruse, adenoviruse i astroviruse kombinirani kasetna brzi test (Slika 14.). Unutar testa nalazi se kasetna za testiranje, epruvetu za prikupljanje uzorka s puferom za ekstrakciju i kapaljka. Kombinirani test sastoji se od dijela za noroviruse koji detektira genogrupe 1 i 2 norovirusa, rotaviruse/adenoviruse i astroviruse.

Uzorak se priprema tako da se pomiješa sa sadržajem epruvete za prikupljanje uzoraka. Kod čvrstih uzoraka aplikator koji se nalazi na poklopcu epruvete se ubode na tri različita mjesta uzorka stolice. Potrebno je približno na aplikatoru pokupiti 50 mg uzorka, uzimanje komada stolice se ne preporuča. Tekući uzorci se prikupljaju uz pomoć

kapaljke, u epruvetu se ukapaju 2 kapi što odgovara približno 50  $\mu$ L. Nakon što se pomiješa uzorak s puferom za ekstrakciju epruveta se snažno promiješa i ostavi da stoji 2 minute.

U označeno mjesto za ukapavanje uzorka na testnoj pločici ukapa se 80  $\mu$ L ekstrahiranog uzorka iz epruvete. Rezultati se očitavaju 15 minuta nakon ukapavanja uzorka, a smatraju se nevažećim nakon 20 minuta. Ako uzorak ne migrira pločicom epruveta se centrifugira i ukapa se 80  $\mu$ L supernatanta. Nakon 15 minuta rezultati se ponovno očitavaju. Rezultati su valjani kada je prisutna kontrolna linija, a bez kontrolne linije rezultati se ne mogu očitati niti smatrati mjerodavnim. Pozitivan rezultat predstavlja prisutna testna i kontrolna linija, a negativan rezultat predstavlja prisustvo samo kontrolne linije.



Slika 14. Postupak izvedbe imunokromatografskog testa

(Izvor: [https://m.setiascientific.com/index.php?ws=showproducts&products\\_id=2841374&cat=Infectious-Disease-Rapid-Test&subcat=JusChek](https://m.setiascientific.com/index.php?ws=showproducts&products_id=2841374&cat=Infectious-Disease-Rapid-Test&subcat=JusChek))

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati ELISA testa

ELISA testom testirano je 20 uzoraka stolice bolesnika kod kojih se sumnjalo na infekciju norovirusom. Spektrofotometar je očitao apsorbance uzoraka i kontrola, prema kojima se gleda valjanost testa i pozitivnost odnosno negativnost uzorka.

Test se smatra valjanim ako je apsorbancia negativne kontrole manja od 0,150, a apsorbancia pozitivne kontrole veća od 0,500. Testom je dobiveno da je pozitivna apsorbancia 0,845 , a negativna 0,043 što test čini valjanim i omogućuje očitavanje rezultata uzoraka.

Prije očitavanja uzoraka potrebno je izračunati *cut off* ili graničnu vrijednost koja predstavlja granicu između pozitivnih i negativnih rezultata. Računa se tako da se apsorbanci negativne kontrole pridoda 0,1. Prema dobivenim rezultatima kontrole dobiveno je da *cut off* iznosi 0,143.

Pozitivnim rezultatima se smatraju rezultati koji su veći od zbroja granične vrijednosti i 0,01, a negativni su svi rezultati koji su manji od vrijednosti dobivene oduzimanjem 0,01 od granične vrijednosti. Svi rezultati koji se nalaze između te dvije vrijednosti se smatraju graničnim i potrebno je ponoviti test s novim uzorkom stolice. Izračunom je dobivena najniža vrijednost pozitivnih rezultata koja iznosi 0,153 i najviša vrijednost negativnih rezultata koja iznosi 0,133. Prema izračunatim granicama ustvrđeno je da je samo jedan uzorak pozitivan na noroviruse, dok je ostalih 19 rezultata bilo negativno (Tablica 2.). Nisu dobiveni rezultati s graničnim vrijednostima.

Tablica 2. Rezultati ELISA testa za *Norovirus*

Broj uzorka	Apsorbanca	Rezultat	Broj uzorka	Apsorbanca	Rezultat
1.	0,046	negativan	11.	0,27	negativan
2.	0,055	negativan	12.	0,042	negativan
3.	0,039	negativan	13.	0,028	negativan
4.	0,048	negativan	14.	0,038	negativan
5.	0,042	negativan	15.	0,036	negativan
6.	0,037	negativan	16.	0,031	negativan
7.	0,047	negativan	17.	0,024	negativan
8.	0,034	negativan	18.	0,028	negativan
9.	0,233	POZITIVAN	19.	0,039	negativan
10.	0,40	negativan	20.	0,025	negativan

#### 4.2. Rezultati imunokromatografskih testova

Testiranjem 20 uzoraka stolice pacijenta dobiveno je da je sveukupno 5 pacijenata bilo negativno na sve testirane viruse, a ostalih 15 je bilo pozitivno na jedan ili više virusa. Testom nije pronađen niti jedan pacijent koji je pozitivan na noroviruse. U Tablici 3. je vidljivo da su među pacijentima najviše rašireni adenovirusi koji su bili pozitivni u 14 pacijenata što čini 70% uzoraka. Sljedeći su rotavirusi koji su zastupljeni u 35% uzoraka. Svi pacijenti osim jednog koji su pozitivni na rotaviruse imaju pozitivan rezultat na adenoviruse. Astrovirusi su testom dokazani kod dva pacijenta.

Tablica 3. Rezultati imunokromatografskog testa na adenoviruse, astroviruse, rotaviruse i noroviruse

BROJ UZORKA	VIRUSI			
	<i>Norovirus</i>	<i>Adenovirus</i>	<i>Rotavirus</i>	<i>Astrovirus</i>
1.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>
2.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	negativan
3.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
4.	negativan	negativan	negativan	negativan
5.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
6.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	negativan
7.	negativan	negativan	negativan	negativan
8.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
9.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
10.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>
11.	negativan	negativan	negativan	negativan
12.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	negativan
13.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
14.	negativan	negativan	negativan	negativan
15.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
16.	negativan	negativan	negativan	negativan
17.	negativan	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan
18.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
19.	negativan	<b>pozitivan</b>	negativan	negativan
20.	negativan	<b>pozitivan</b>	<b>pozitivan</b>	negativan
UKUPNI REZULTAT	0 (0%)	14 (70%)	7 (35%)	2 (10%)

## 5. RASPRAVA

Prema rezultatima imunokromatografskog testiranja zaključeno je da u 20 nasumično odabranih uzoraka stolice redosljed virusa prema zastupljenosti: adenovirusi, rotavirusi, astrovirusi. Zastupljenost virusa se ne poklapa sa redosljedom virusnih uzročnika gastroenteritisa prema posljednjim podacima izdanim u Hrvatskom zdravstvenom-statističkom ljetopisu za 2020. i 2021. godinu prema kojem je redosljed: norovirusi, rotavirusi, adenovirusi te astrovirusi (29,30). Istraživanje je provedeno na relativnom malom broju uzoraka te se ne može vidjeti stvarno stanje u populaciji. Potrebno je provesti studiju na većem broju ispitanika.

Razlog povećanog broja detektiranih adenovirusa može biti moguća pojava epidemije uzrokovane širenjem virusa fekalno-oralnim putem ili kapljično. Osim kao glavni uzročnici, adenovirusi se mogu naći u stolici zbog uzrokovanja asimptomatske infekcije koju pacijent nije primijetio ili zbog dugotrajnog izlučivanja virusa nakon već odavno prošle infekcije. U oba slučaja prisutan je još jedan patogen koji izaziva gastroenteritis. U rezultatima za šest pacijenata je dobiveno da su uz adenoviruse prisutni i rotavirusi što može pokazivati da adenovirusi nisu glavni uzročnici simptoma, nego su popratno uhvaćen ili obrnuto da su rotavirusi popratno uhvaćeni, a adenovirusi uzročnici infekcije (9).

U pet uzoraka virusi nisu dokazani što može ukazivati da uzročnik simptoma nije jedan od četiri testirana virusa, nego možda neki drugi virus koji je rjeđe zastupljen ili bakterija. Postoji mogućnost da je i uzorak stolice nepravilno uzorkovan zbog neznanja pacijenta ili zbog nedovoljno jasnih uputa za sakupljanje uzorka te da zbog toga virus nije moguće dokazati testom. Pacijentima prije uzorkovanja treba osvijestiti važnost procesa prikupljanja uzorka kako bi se kontaminacija s drugim tvarima kao što su deterdženti ili dezinficijensi smanjila što više i kako bi dobili kvalitetan uzorak. Iako pacijent može pravilno prikupiti uzorak negativni rezultat može biti posljedica uzorkovanja nakon razdoblja od 48-72 u kojem se izlučuje najviše virusa. Posebnu pažnju treba posvetiti transportu uzorka koje se mora provesti po zadanim smjernicama kako bi se uzorak što

bolje očuvao. Izvor pogreške u laboratoriju može biti pogrešna identifikacija pacijenta zbog čega je potrebno u svakom koraku rada provjeriti podatke pacijenta kako bi se ovakve greške svele na minimum. Dobra organizacija rada važan je čimbenik koji utječe na smanjenje greški kao što su pogrešna identifikacija i zamjena uzoraka. Ručno izvođenje testa može biti izvor pogreške zbog čega se teži automatizaciji laboratorija kako bi se smanjio ljudski utjecaj na izvođenje testa. Automatizacijom bi se smanjio broj pretraga koje svoje rezultate temelje na subjektivnoj procjeni osoblja u laboratoriju jer rezultati ovise o osobi koja izvodi test (28).

Kod norovirusa svi negativni rezultati mogu biti posljedica niske osjetljivosti testa što onemogućuje detekciju uzročnika u malim količinama. U takvim situacijama potrebno je ponoviti testiranje nekom osjetljivijom metodom što je i napravljeno. Kao druga metoda korišten je ELISA test kojim je dobiveno da je u 20 uzoraka samo jedan uzorak pozitivan na noroviruse. Za razliku od imunokromatografskog testa koji je korišten, ELISA test ima veću osjetljivost što bi značilo da može detektirati manje količine virusnih čestica od imunokromatografskog testa (Tablica 4.). ELISA test može se izvoditi automatizirano što smanjuje mogućnost ljudske pogreške u radu, dok brzi testovi za izvođenje i očitavanje rezultata najčešće oslanjaju na ljudski faktor koji je sklon pogreškama. Velika prednost imunokromatografskih testova je jednostavno izvođenje i brzina dobivanja rezultata što omogućuje obradu velikog broja pacijenata u malo vremena što s ELISA testom nije moguće jer postupak rada sadrži duge inkubacije i ispiranja. Oba testa kao princip rada koriste reakciju antitijela s antigenom koja dovodi do obojene promjene.. ELISA test se odvija u jažici u kojoj se odvija vezanje antitijela i antigena koje je vidljivo promjenom boje u jažicama, dok se višak reagensa se uklanja postupkom ispiranja. U imunokromatografskom testu uzorak se kreće duž membrane, a kao posljedica vezanja nastaje vidljiva crta kao znak pozitivnog rezultata i nije potrebno ispirati uzorak.



Tablica 4. Usporedba imunokromatografskog i ELISA testa

	<b>IMUNOKROMATOGRAFSKI TEST</b>	<b>ELISA TEST</b>
<b>PRINCIP RADA</b>	Reakcija antitijelo-antigen na membrani	Reakcija antitijelo-antigen u jažici
<b>VRIJEME IZVOĐENJA</b>	Rezultati se dobiju u roku od par minuta	Dugotrajno izvođenje testa zbog inkubacija i ispiranja
<b>SLOŽENOST TESTA</b>	Jednostavna izvedba	Složena izvedba
<b>REZULTAT</b>	Nastanak vidljive linije	Promjena boje u jažici
<b>OSJETLJIVOST</b>	Manja osjetljivost	Veća osjetljivost

## 6. ZAKLJUČAK

Gastroenteritisi su aktualni zdravstveni problem koji većinom uzrokuje blage simptome, ali može biti poguban za osjetljive skupine kao što su novorođenčad, djeca, imunokompromitirani bolesnici i osobe starije životne dobi. Studijom je pokazano da su u populaciji prisutna četiri najčešća uzročnika gastroenteritisa: rotavirusi, adenovirusi, norovirusi, astrovirusi. Iznenadjući je udio od 70% adenovirusa u ukupnom broju uzoraka. Potrebno je provesti studiju s većim brojem uzoraka kako bi se pokazalo je li došlo do značajnog povećanja broja infekcija uzrokovanih adenovirusima. Korištenje imunokromatografskih testova pokazao se kao ekonomski isplativi način testiranja velikog broja uzoraka što je prikladno u vrijeme epidemija. Nedostatak testa je nemogućnost detekcije vrlo malih količina virusnih čestica zbog čega se kao dodatni testovi preporučuju ELISA i PCR testovi koji su osjetljiviji. Ishod rezultata osim o osjetljivosti testa ovisi o dobrom uzorkovanju zbog čega bi veliku pažnju trebalo usmjeriti u osvještavanje pacijenata o važnosti kvalitetnog uzorkovanja usmeno ili putem brošura.

## 7. LITERATURA

1. Presečki V. Virologija. (Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu = Manualia Universitatis studiorum Zagrabiensis). Zagreb: Medicinska naklada.; 2002. 343 str. : ilustr.; 25 cm.-
2. Louten J. Virus Structure and Classification. *Essential Human Virology*. 2016;19–29.
3. Stuempfig ND, Seroy J. Viral Gastroenteritis. In: StatPearls [Internet] [Internet]. StatPearls Publishing; 2022 [cited 2023 May 16]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518995/>
4. Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009 May;136(6):1939–51.
5. Viral gastroenteritis: Causes, pathophysiology, immunology, treatment, and epidemiology. In: *Perspectives in Medical Virology* [Internet]. Elsevier; 2003 [cited 2023 May 16]. p. 1–8. (Viral Gastroenteritis; vol. 9). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168706903090013>
6. Kalenić S. Medicinska mikrobiologija. (Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu = Manualia Universitatis studiorum Zagrabiensis). Zagreb: Medicinska naklada.; 2013. XIV, 680 str. : ilustr. u bojama; 28 cm.-.
7. Soldo M. RNA virusi i njihova evolucija [Internet] [info:eu-repo/semantics/bachelorThesis]. University of Zagreb. Faculty of Science. Department of Biology; 2021 [cited 2023 May 18]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:018363>
8. Robilotti E, Deresinski S, Pinsky BA. Norovirus. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jan;28(1):134–64.
9. Brooks GF, Carroll KC, Butel Janet S, Morse SA, Mietzener TA. Jawetz, Melnick, Adelberg Medicinska mikrobiologija: dvadeset šesto američko izdanje/prvo hrvatsko izdanje. 2015 [cited 2023 May 7]; Available from: <https://www.bib.irb.hr/812052>
10. Capece G, Gignac E. Norovirus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 Apr 25]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513265/>
11. Norovirus Klasifikacija virusa | CDC [Internet]. 2022 [cited 2023 May 18]. Available from: <https://www.cdc.gov/norovirus/lab/virus-classification.html>
12. Šimić I, Kovačević A, Krešić N, Škoko I, Konjik V, Jukić Guć J, et al. Molekularne značajke i zoonotski potencijal rotavirusa. *Paediatrica Croatica*. 2019 Jun 20;63(2):63–9.

13. Rod: Rotavirus | ICTV [Internet]. [cited 2023 May 25]. Available from: [https://ictv-global.translate.google.com/report/chapter/sedoreoviridae/sedoreoviridae/rotavirus?\\_x\\_tr\\_sl=en&\\_x\\_tr\\_tl=hr&\\_x\\_tr\\_hl=hr&\\_x\\_tr\\_pto=sc](https://ictv-global.translate.google.com/report/chapter/sedoreoviridae/sedoreoviridae/rotavirus?_x_tr_sl=en&_x_tr_tl=hr&_x_tr_hl=hr&_x_tr_pto=sc)
14. Tabain I. Virološke, kliničke i epidemiološke osobitosti adenovirusnih dišnih infekcija u djece u Zagrebu i okolici [Internet] [info:eu-repo/semantics/doctoralThesis]. University of Zagreb. School of Medicine; 2011 [cited 2023 May 20]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:846771>
15. Moser L, Schultz-Cherry S. Astroviruses. *Encyclopedia of Virology*. 2008;204–10.
16. Cordey S, Vu DL, Schibler M, L’Huillier AG, Brito F, Docquier M, et al. Astrovirus MLB2, a New Gastroenteric Virus Associated with Meningitis and Disseminated Infection. *Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):846–53.
17. Ykema M, Tao YJ. Structural Insights into the Human Astrovirus Capsid. *Viruses*. 2021 May 1;13(5):821.
18. Luo X, Zhou GZ, Zhang Y, Peng LH, Zou LP, Yang YS. Coronaviruses and gastrointestinal diseases. *Mil Med Res*. 2020 Oct 14;7:49.
19. Oude Munnink BB, van der Hoek L. Viruses Causing Gastroenteritis: The Known, The New and Those Beyond. *Viruses*. 2016 Feb 19;8(2):42.
20. Genus: Cosavirus | ICTV [Internet]. [cited 2023 May 30]. Available from: <https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/cosavirus>
21. Tan SZK, Tan MZY, Prabakaran M. Saffold virus, an emerging human cardiovirus. *Rev Med Virol*. 2017 Jan;27(1):e1908.
22. Reuter G, Pankovics P, Boros Á. Saliviruses—the first knowledge about a newly discovered human picornavirus. *Rev Med Virol*. 2017 Jan;27(1).
23. Guido M, Tumolo MR, Verri T, Romano A, Serio F, De Giorgi M, et al. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J Gastroenterol*. 2016 Oct 21;22(39):8684–97.
24. Genus: Protoparvovirus | ICTV [Internet]. [cited 2023 May 30]. Available from: <https://ictv.global/report/chapter/parvoviridae/parvoviridae/protoparvovirus>
25. Reuter G, Pankovics P, László Z, Gáspár G, Hui A, Delwart E, et al. Human-stool-associated tusavirus (Parvoviridae) in domestic goats and sheep. *Arch Virol*. 2022;167(5):1307–10.
26. Gan T, Droit L, Vernon S, Barouch DH, Wang D. Isolation of a rhesus calicivirus that can replicate in human cells. *Virology*. 2023 May 1;582:83–9.

27. Genus: Recovirus | ICTV [Internet]. [cited 2023 May 30]. Available from: <https://ictv.global/report/chapter/caliciviridae/caliciviridae/recovirus>
28. Smjernice za mikrobiološku dijagnostiku infekcija probavnog sustava [Internet]. [cited 2023 May 11]. Available from: [https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:Oz9ia08JjoMJ:scholar.google.com/+Smjernice-za-mikrobiolosku-dijagnostiku-infekcija-probavnog+sustava&hl=hr&as\\_sdt=0,5](https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:Oz9ia08JjoMJ:scholar.google.com/+Smjernice-za-mikrobiolosku-dijagnostiku-infekcija-probavnog+sustava&hl=hr&as_sdt=0,5)
29. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2021. g. [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from: <https://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2021-g/>
30. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2020. – tablični podaci [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from: <https://www.hzjz.hr/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis/hrvatski-zdravstveno-statisticki-ljetopis-za-2020-tablicni-podaci/>
31. Vinjé J. Advances in Laboratory Methods for Detection and Typing of Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015 Feb;53(2):373–81.
32. Alhadj M, Farhana A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/>
33. Petrić J. Imunoenzimske (ELISA) metode u analitici prehrambenih proizvoda [Internet] [info:eu-repo/semantics/bachelorThesis]. University of Zagreb. Faculty of Food Technology and Biotechnology. Department of Food Quality Control. Laboratory for Food Quality Control; 2016 [cited 2023 May 1]. Available from: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:850428>
34. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):111–20.
35. Ince B, Sezgintürk MK. Lateral flow assays for viruses diagnosis: Up-to-date technology and future prospects. *Trends Analyt Chem*. 2022 Dec;157:116725.
36. Boehringer HR, O'Farrell BJ. Lateral Flow Assays in Infectious Disease Diagnosis. *Clin Chem*. 2021 Dec 30;68(1):52–8.
37. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*. 2009 Jan 1;393(2):569–82.
38. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, Phoolcharoen W, Shoyama Y, Tanaka H, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *J Nat Med*. 2018;72(1):32–42.
39. Žugaj M. Dijagnostičke metode u virologiji. 2021 [cited 2023 May 1]; Available from: <https://www.bib.irb.hr/1151108>

40. Costantini V, Grenz L, Fritzinger A, Lewis D, Biggs C, Hale A, et al. Diagnostic Accuracy and Analytical Sensitivity of IDEIA Norovirus Assay for Routine Screening of Human Norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010 Aug;48(8):2770–8.
41. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
42. Peirson SN, Butler JN. Quantitative Polymerase Chain Reaction. In: Circadian Rhythms [Internet]. Humana Press; 2007 [cited 2023 May 10]. p. 349–62. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-257-1\\_25](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-257-1_25)
43. Gray J, Coupland LJ. The increasing application of multiplex nucleic acid detection tests to the diagnosis of syndromic infections. *Epidemiology & Infection*. 2014 Jan;142(1):1–11.
44. Khare R, Espy MJ, Cebelinski E, Boxrud D, Sloan LM, Cunningham SA, et al. Comparative Evaluation of Two Commercial Multiplex Panels for Detection of Gastrointestinal Pathogens by Use of Clinical Stool Specimens. *J Clin Microbiol*. 2014 Oct;52(10):3667–73.
45. The BioFire® FilmArray® Gastrointestinal (GI) Panel [Internet]. BioFire Diagnostics. [cited 2023 May 6]. Available from: <https://www.biofire.com/products/the-filmarray-panels/filmarraygi/>
46. Piralla A, Lunghi G, Ardissino G, Girello A, Premoli M, Bava E, et al. FilmArray™ GI panel performance for the diagnosis of acute gastroenteritis or hemorrhagic diarrhea. *BMC Microbiol*. 2017 May 12;17:111.
47. Kosai K, Suzuki H, Tamai K, Okada Y, Akamatsu N, Ueda A, et al. Multicenter evaluation of Verigene Enteric Pathogens Nucleic Acid Test for detection of gastrointestinal pathogens. *Sci Rep*. 2021 Feb 4;11(1):3033.

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Ševo

Datum i mjesto rođenja: 27. studenog 2001. godine, Split

Adresa: Grabova 12, 21000 Split

E-adresa: martina.sevo1@gmail.com

### Obrazovanje

2008. - 2016. Osnovna škola „Mejaši“ , Split

2016. - 2020. Prirodoslovna škola Split

2020. - 2023. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike

### Radno iskustvo

Srpanj i kolovoz 2022. rad preko Student servira Split u Nastavnom Zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije