

Primjena spektrofotometrijskih metoda pri detekciji virusnih infekcija

Zovko, Ljiljana

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:857958>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Ljiljana Zovko

7612/BT

Primjena spektrofotometrijskih metoda pri detekciji virusnih infekcija

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIMJENA SPEKTROFOTOMETRIJSKIH METODA PRI DETEKCIJI VIRUSNIH INFEKCIJA

Ljiljana Zovko, 0058212652

Sažetak: Virusne infekcije pratile su ljudsku populaciju kroz povijest, a problem sprječavanja širenja zaraze aktualan je i danas. Jedini način rješavanja problema je brza identifikacija i detekcija uzročnika infekcije, ukoliko lijek ili cjepivo za infekciju ne postoje. Viruse je moguće detektirati molekularnim, biokemijskim, imunološkim i spektroskopskim metodama. Najčešće korištene metode su PCR i ELISA. Spektroskopske metode su nedestruktivne, brze i jednostavne, a temelje se na interakciji uzorka s elektromagnetskim zračenjem. Koriste se za određivanje strukture, mase ili položaja funkcionalnih grupa u molekuli. Korištenjem spektroskopskih metoda moguće je detektirati promjene u biološkim uzorcima uzrokovane prisutnošću virusa.

Ključne riječi: virusna infekcija, metode detekcije, spektrofotometrijske metode

Rad sadrži: 24 stranice, 10 slika, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 15. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food technology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory of Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

APPLICATION OF SPECTROPHOTOMETRIC METHODS IN DETECTION OF VIRAL INFECTIONS

Ljiljana Zovko,0058212652

Abstract: Viral infections have traced the human population throughout history. The problem of preventing the spread of the infection remains today. The only way to solve the problem is to quickly identify and detect the cause of the infection. Viruses can be detected by molecular, biochemical, immunological and spectroscopic methods. The most commonly used methods are PCR and ELISA. Spectroscopic methods are non-destructive, fast and simple. They are based on the interaction of the sample with electromagnetic radiation. They are used to determine the structure, mass or position of functional groups in a molecule. Using spectroscopic methods, it is possible to detect changes in biological samples caused by the presence of a virus.

Keywords: viral infection, detection methods, spectrophotometric methods

Thesis contains: 24 pages, 10 figures, 48 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Ph. D. Monika Kovačević, Assistant Professor

Defence date: September 15th 2020

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. VIRUSI.....	2
2.1.1. Građa virusa.....	3
2.1.2. Otkriće virusa.....	4
2.1.3. Povijesni pregled važnijih virusnih infekcija.....	5
2.1.4. Problemi današnjice s virusnim infekcijama.....	7
2.2. METODE DETEKCIJE.....	8
2.2.1. PCR metoda.....	9
2.2.2. LAMP metoda.....	10
2.2.3. RCA metoda.....	10
2.2.4. Imunotestovi.....	10
2.2.4.1. ELISA.....	10
2.2.4.2. Imunoblot.....	11
2.2.5. Hibridizacija nukleinskih kiselina.....	12
2.3. SPEKTROSKOPSKE METODE.....	12
2.3.1. NMR.....	12
2.3.2. IR spektrometrija.....	13
2.3.3. UV/Vis spektrometrija.....	13
2.3.4. Masena spektrometrija.....	13
2.3.5. Kirooptičke metode.....	14
2.4. PRIMJENA SPEKTOSKOPSKIH METODA PRI DETEKCIJI VIRUSA.....	14
2.4.1. Primjena NMR spektroskopije za detekciju virusa.....	15
2.4.2. Primjena IR spektroskopije za detekciju virusa.....	15
2.4.3. Primjena UV-zračenja za detekciju virusa.....	16
2.4.4. Primjena cirkularnog dikroizma za detekciju virusa.....	17
2.4.5. Primjena masene spektrometrije za detekciju virusa.....	17
3. ZAKLJUČAK.....	19
4. LITERATURNI IZVORI.....	20

1. UVOD

Virusi su česti uzročnici bolesti viših organizama, zahvaljujući brzoj sposobnosti prilagodbe stanici domaćina. Širenje zaraze koje je uzrokovano virusnim infekcijama gotovo je nemoguće spriječiti, osobito u novije vrijeme kada je fluktuacija ljudi i dobara sve veća. U vrijeme epidemije ili pandemije, poput one koja je obilježila 2020.godinu, a koja je uzrokovana novootkrivenim virusom Covid-19, od velike je važnosti otkriti brze i uspješne metode detekcije uzročnika bolesti. Brzo širenje zaraze u svjetskim razmjerima utječe na opterećenje zdravstvenog sustava pojedinih država što posljedično dovodi do neadekvatne zdravstvene skrbi za oboljele od virusnih infekcija i većeg broja smrtnih ishoda. Osim zdravstvenog aspekta, bitno je napomenuti da pandemija uzrokovana virusom utječe na socioekonomske i psihološke aspekte društva.

Stoga je od iznimne važnosti u uvjetima epidemije ili pandemije, koje su uzrokovane različitim i novim vrstama virusa, brzo otkriti uzročnika te naći dovoljno brzu i isplativu metodu za detekciju virusa. Na taj način je moguće pratiti broj oboljelih te utjecati na kretanje pandemije u pozitivnom smjeru.

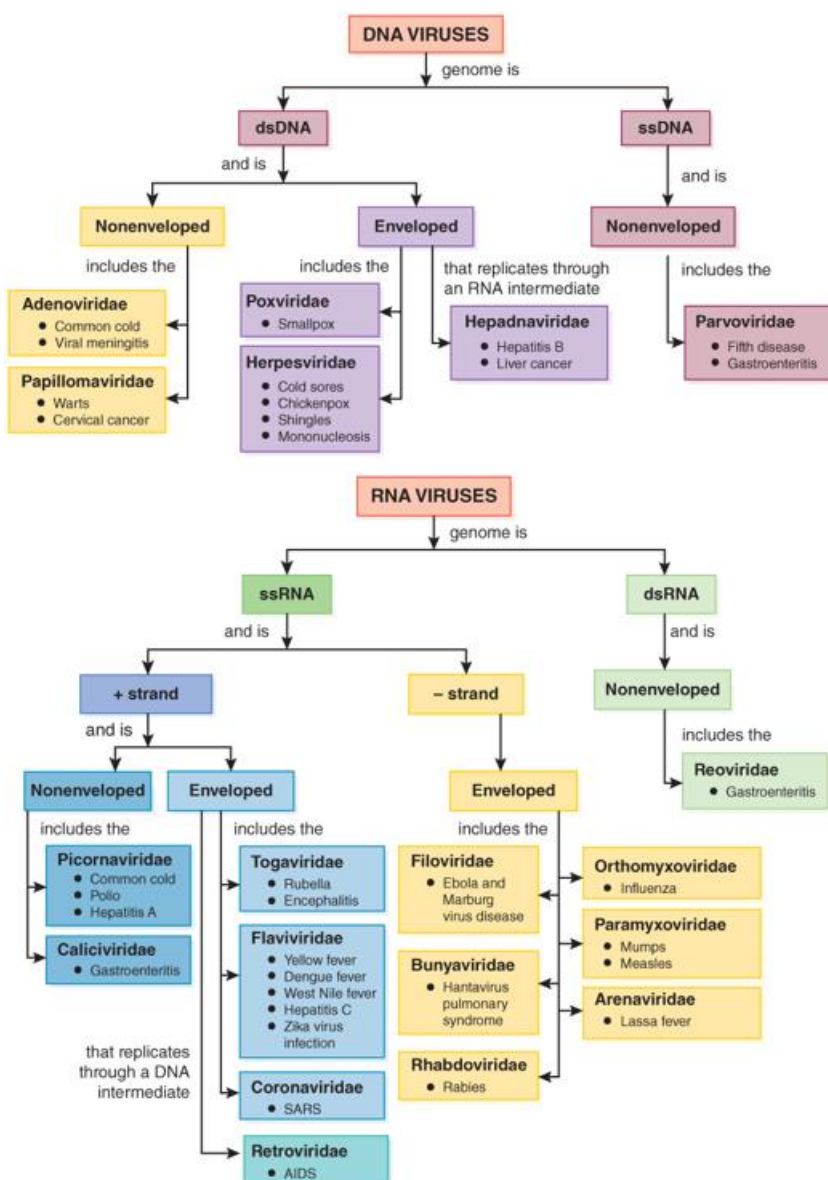
Najčešće korištene metode za identificiranje virusa su serološke metode koje se temelje na detekciji antitijela nastalih u borbi protiv stranog tijela (patogenog mikroorganizma). Spektroskopske metode, utemeljene na interakciji uzorka s elektromagnetskim zračenjem, brže su i jednostavnije.

Cilj ovog Završnog rada bio je pregledom znanstvene literature, opisati virusne infekcije kroz povijest te naglasiti važnost njihove rane i brze detekcije. Prikazane su pojedine metode detekcije virusa, pri čemu je poseban naglasak stavljen na njihove prednosti i nedostatke.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VIRUSI

Virusi su uzročnici različitih zaraznih bolesti u organizmima. Djeluju kao stanični paraziti, budući da se umnožavaju samo u živoj stanici, te su stoga predmet istraživanja molekularne biologije. Poput viših organizama, razvrstani su u porodice, rodove i vrste, pri čemu se klasifikacija virusa temelji na filogenetskoj srodnosti (slika 1). [1]

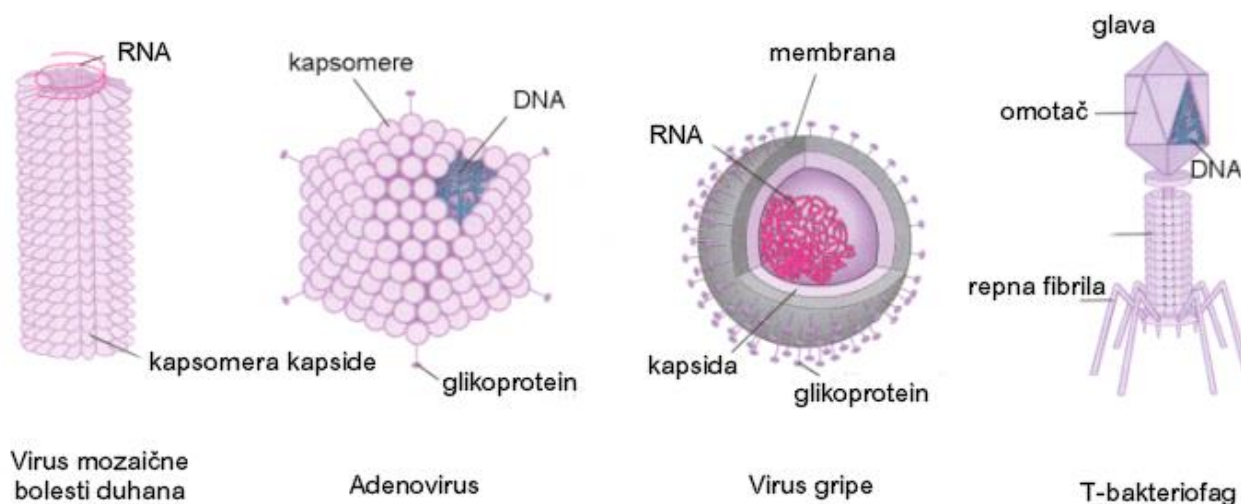


Slika 1. Dijagram klasifikacije virusa [2]

Laboratorijski uzgoj vrši se u staničnim kulturama (stanice nekog tkiva uzgojene *in vitro*), pokusnim životinjama (ranija upotreba), kao i u oplodjenim kokošjim jajima (brži, lakši i jeftiniji postupak). Virusi se uzgajaju u svrhu identifikacije samog virusa, proizvodnje antigena te za proizvodnju cjepiva. [1]

2.1.1. Građa virusa

Virusi se ne nazivaju organizmima jer ne posjeduju staničnu građu svojstvenu višim organizmima. Njihovu građu čini kompleks makromolekula (slika 2). Nukleinsku kiselinu čini jednolančana ili dvolančana DNA ili RNA molekula. Kapsida je proteinska ovojnica koja obavlja nukleinsku kiselinu i štiti je od djelovanja staničnih nukleaza te osigurava čvrstu strukturu virusne čestice. Nukleinska kiselina i kapsida tvore nukleokapsidu. Ovojnica virusa potječe uglavnom od citoplazmatske membrane u kojoj se virus umnožio. Iz ovojnice strše glikoproteinski izdanci koji služe vezivanju za stanične receptore. [1]

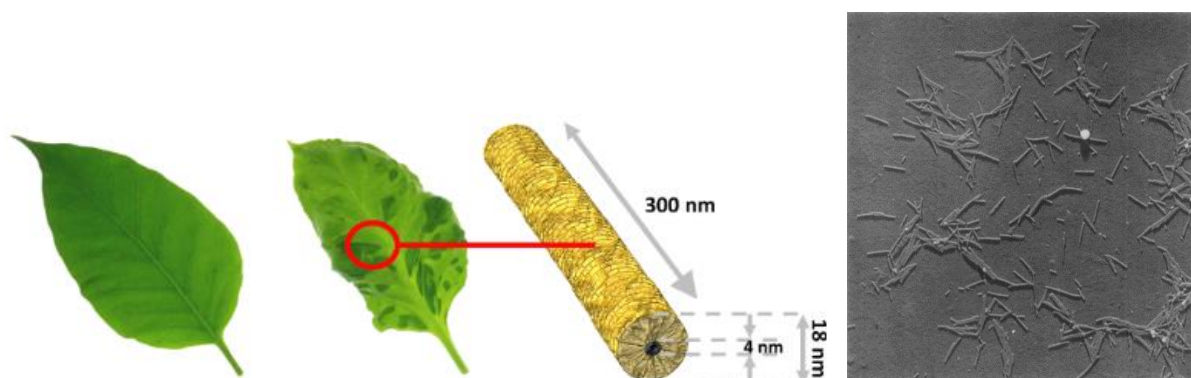


Slika 2. Građa virusa [3]

2.1.2. Otkriće virusa

Tijekom povijesti, riječ „virus“ dobivala je različita značenja. U rimsko doba virusom se smatrala svaka otrovna tvar, dok je u 18. stoljeću to bio naziv za iscjedak iz čira. U 19. stoljeću virus postaje naziv za sve infektivne čestice, a tijekom 20. stoljeća virus postaje nazivom za sve uzročnike bolesti nevidljive golim okom. [4]

1892. godine dolazi do značajnog otkrića na području mikrobiologije. Naime, ruski student biologije Dmitrij Ivanovski tražio je uzročnika mozaične bolesti duhana (slika 3) i otkrio da je nepoznati uzročnik manji od svake bakterije te da nije vidljiv svjetlosnim mikroskopom. Ivanovski je smatrao da uzročnik mogu biti i bakterijski toksini. Prvi koji je dokazao postojanja virusa kao uzročnika istraživane bolesti bio je Martinus Beijerinck 1897. godine. Nakon što je stavio zaraženi list duhana i filtrirani sok zaraženog lista na agarSKU podlogu, uzročnik je difundirao kroz agar što ga je navelo na zaključak da je uzročnik bolesti topljiv u vodi.

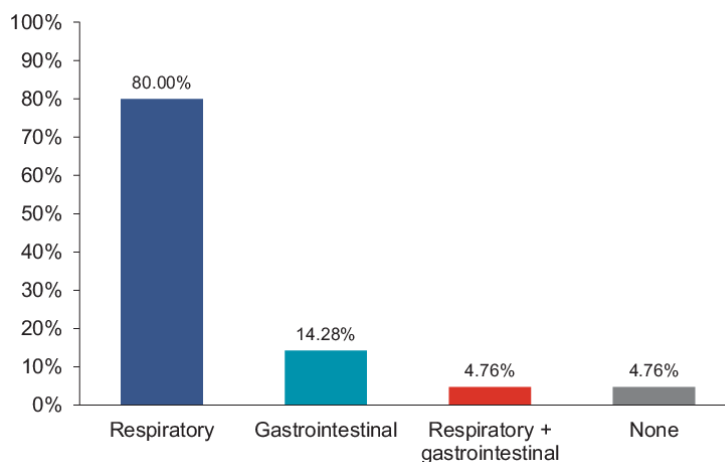


Slika 3. Građa virusa mozaične bolesti duhana [5, 6]

Drugo bitno otkriće bilo je da se virus umnožava samo u stanicama koje su u fazi diobe. Beijerinck je istraživao i prijenos provodnim sustavom, kao i infektivnost pri različitim uvjetima. Sva ta istraživanja virusa mozaične bolesti duhana TMV (engl. *tobacco mosaic virus*) pridonijela su općem znanju na području virologije. Tijekom idućih istraživanja, došlo je do spoznaje o maloj količini fosfora u sastavu TMV virusa, a tek kasnije je otkriveno da fosfor potječe iz nukleinske kiseline. Virusi od tada više nisu smatrani proteinskim strukturama, nego nukleoproteinima. [7]

2.1.3. Povijesni pregled važnijih virusnih infekcija

U današnje vrijeme, virusi uzrokuju različite vrste infekcija (respiratorne, gastrointestinalne ili kombinaciju respiratorne/gastrointestinalne). Na grafu (slika 4) prikazana je podjela virusnih infekcija, pri čemu je vidljivo da je više od 80% infekcija uzrokovanih virusima upravo respiratornog tipa.



Slika 4. Zastupljenost pojedinih virusnih infekcija u populaciji [8]

2.1.3.1. Peloponeška pošast

Prvi povijesni podaci o virusnoj pandemiji su vezani za Peloponešku pošast. Grčki povjesničar Tukidid, koji je i sam prebolio bolest, ostavio je detaljan opis razdoblja pandemije. [9] Simptome bolesti opisao je ovako: *(Ljude je) spopala silna vrućina u glavi, crvenilo očiju i vatruština, a unutra je ždrijelo i jezik odmah podbijala krv, i širili su neobičan i smrdljiv zadah. Nisu se mogli smiriti, i besanica ih je neprestano mučila. Većina je umirala deveti ili sedmi dan od unutarnje vrućine, premda su još imali snage.(...).* [10]

Grčka, rimska i perzijska vojska kasnije su bolest iskoristile kao moćno oružje u borbi protiv neprijatelja. [11]

2.1.3.2. Španjolska gripa

Nakon virusnih infekcija koje su harale tijekom starog i srednjeg vijeka, u novom vijeku dolazi „majka svih pandemija“. Španjolska gripa bila je prisutna tijekom 1. svjetskog rata. Ime je

dobila zbog političkih okolnosti, a ne zbog mjesta nastanka. Uzročnik Španjolske gripe bio je virus H1N1. U trajanju od pune dvije godine, njezino širenje nastojalo se spriječiti nošenjem maski, zabranom okupljanja, ali i nekim narodnim lijekovima. [12] Unatoč tomu, broj zaraženih narastao je do 500 000 000 diljem svijeta, a stopa smrtnosti iznosila je 10-20%. Španjolska gripa usmrtila je više mladih i zdravih osoba, nego starijih i nemoćnih. Uzrok tomu je citokinska oluja, naziv za fenomen koji opisuje razaranje pluća uslijed iznimno jakog imunološkog odgovora zaražene osobe. Simptomi uslijed zaraze bili su slični simptomima jake prehlade, ali ubrzo bi nastupilo nakupljanje želatinozne mase u plućima koja bi dovodila do gušenja, uz ljubičaste mrlje po koži. [13]

2.1.3.3. Hepatitis

Još jedna od virusnih infekcija zastupljena kroz povijest jest hepatitis. Uzrokuju ih virusi hepatitisa A, B, C, D i E. Virusni hepatitisi rasprostranjeni su diljem svijeta, zahvaćaju oko 400 000 000 ljudi te usmrte oko 1,4 milijuna ljudi godišnje. Najviše su rašireni virusi A, B i C.

Hepatitis A se još naziva bolešću prljavih ruku ili zaraznom žuticom. Uzrokuje akutnu bolest jetre, a uglavnom se liječi kroz nekoliko tjedana. Cjepivo za hepatitis A preporučuje se prilikom odlaska u nerazvijene zemlje koje su podložnije širenju infekcije. [14]

Hepatitis B se prenosi krvlju ili tjelesnim tekućinama, jednako kao i HIV. Djeca su puno podložnija razvoju kroničnog oblika bolesti, ciroze jetre i raka jetre, dok liječenje kod odraslih traje oko godinu dana. Bolest se u potpunosti sprječava cijepljenjem.

Virus hepatitis C uzrokuje akutnu ili kroničnu upalu jetre. Oko 71 milijun ljudi boluje od kroničnog oblika hepatitisa C. Virus se prenosi isključivo kontaktom sa zaraženom krvlju, ali ne i tjelesnim tekućinama kao što je slučaj kod hepatitisa B. [15]

2.1.3.4. Virus svinjske gripe

Virus H1N1 ili virus svinjske gripe pojavio se 2009.godine u Meksiku. Riječ je o virusnoj infekciji respiratornog sustava svinja, uzrokovanom virusom tipa A koji često modificira. Kod svinja je smrtnost mala., a bolest se kod ljudi javila najprije kod farmera koji su bili u izravnom kontaktu s oboljelim svinjama. Simptomi bolesti uključivali su uz respiratorne probleme, glavobolju, mučninu i povraćanje. Bolest se prenosi kapljičnim putem, kao i direktnim i indirektnim kontaktom

s predmetima svježe zagađenim izlučevinama iz grla ili nosa. Uz pojačanu higijenu, jedina dostatna prevencija jest cjepivo. [16]

2.1.3.5. Virus ptičje gripe

Još jedna podvrsta gripe jest ptičja gripa uzrokovana virusom gripe podtipa A. Prirodni domaćin virusa su ptice selice. Prvi slučaj prijenosa bolesti s ptice na čovjeka zabilježen je 1997.godine u Hong Kongu. Bolest se na čovjeka prenosi direktnim ili indirektnim kontaktom sa zaraženom peradi. Inkubacija traje 2-8 dana nakon čega se pojavljuju respiratorni problemi, blažeg ili težeg oblika ovisno o podtipu virusa. Zaraza se može liječiti lijekovima za običnu gripu. [17]

2.1.3.6. SARS

2003.godine pojavila se epidemija izazvana SARS koronavirusom. Virus je prvi put kod čovjeka identificiran 2002.godine u Guangdongu. Brzom širenju zaraze pogodovala je proslava kineskih novogodišnjih blagdana. [18] SARS koronavirus izvorno je životinjski virus infektivan za ljudsku populaciju. Sposobnost mijenjanja domaćina, znači i brzu modifikaciju virusa što predstavlja izazov za razvoj antiviralne terapije, a samim time i za suzbijanje širenja zaraze. [19]

2.1.3.7. Koronavirus

SARS-CoV-2 uzročnik je bolesti koja se pojavila u prosincu 2019.godine u kineskom gradu Wuhanu. Bolest se ubrzo proširila ostatkom svijeta., a podaci o broju oboljelih i stopi smrtnosti iz dana u dan se mijenjaju. Sekvencioniranjem virusnog genoma pronađeno je 75-80 % podudarnosti sa SARS-CoV iz 2003.godine. [20]

2.1.4. Problemi današnjice s virusnim infekcijama

Na sami spomen širenja virusne infekcije, otvara se pitanje o mogućnosti korištenja virusa u svrhu bioterorizma. Bioterorizam je izazivanje smrti ljudi, biljaka ili životinja ispuštanjem virusa, bakterija ili toksičnih agenasa među ciljanu populaciju. Biološki agensi privlačni su teroristima zbog brzog širenja među stanovništvom, kao i zbog izazivanja panike. [21] Jedan od virusa istraživanih kao biološko oružje jest i virus hemoragijske groznice. [11] U tu skupinu virusa ubraja se i virus ebole čija smrtnost iznosi 50-90%. Smrt je izazvana hipovolemičkim šokom (poremećaj zgrušavanja krvi), uz gastrointestinalne manifestacije. [22]

Virusne pandemije ostavljaju velike posljedice na društvena i gospodarska zbivanja. Suzbijanje bolesti, ali i straha od same bolesti, moguće je jedino uz identifikaciju virusa, pravovremenu detekciju i dostatne mjere. Metode za detekciju virusa opisane su u idućim poglavljima.

2.2. METODE DETEKCIJE

Detekcija virusa mora biti brza i točna. Najprije se prikuplja klinički materijal, zatim se provodi virološka obrada istog, a nakon toga važna je pravilna interpretacija nalaza pretrage.

Prva faza je faza prikupljanja, a ona ovisi o tipu uzorka. Ukoliko je uzorak u potpunosti čist, ne treba ići dalje na procesiranje. Iz plinskih uzoraka, potrebno je izdvojiti virusne čestice te ih otopiti u tekućini. Tekuće uzorke potrebno je koncentrirati. Dvije osnovne metode za pročišćavanje i koncentriranje su filtracija i centrifugiranje. Virusne čestice su koncentrirane u manjem volumenu i odvojene od većih čestica, nakon čega je uzorak spreman za idući korak (taj korak može se provoditi u više faza). Posljednja faza uključuje konačno pročišćavanje, brojanje pojedinačnih virusnih čestica te određivanje veličine čestica. [11]

Unatoč neprekidnom razvoju novih i složenijih metoda za identifikaciju, vrlo malo ih je usvojeno za stalnu upotrebu. Kako bismo mogli razumjeti zašto je to tako, potrebno je poznavati pouzdane metode u virusnoj dijagnostici.

Virusi se mogu detektirati:

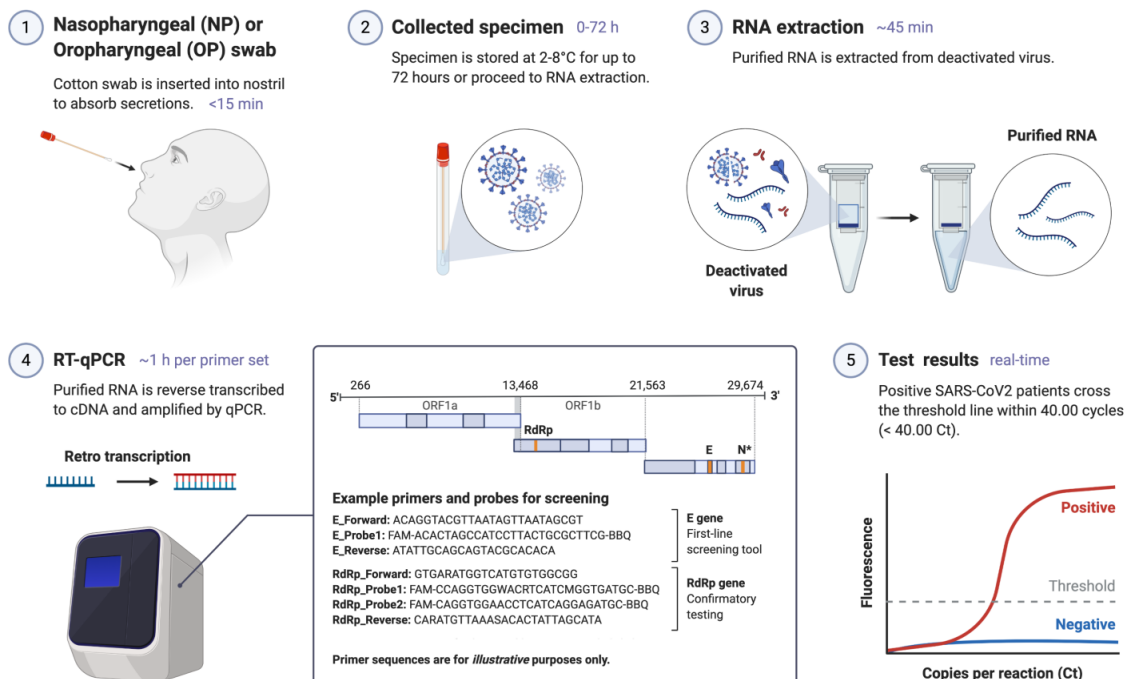
- molekularnim metodama kao što je PCR, LAMP,
- amplifikacijom kotrljajućeg kruga karakterističnom za DNA viruse,
- amplifikacijom potaknutom transkripcijom za RNA viruse;
- imunološkim metodama kao što je ELISA i imunoblot te
- biokemijskim metodama kao što je hibridizacija nukleinskih kiselina. [23]

Molekularni testovi najviše se koriste za novootkrivene viruse. Dvije najuspješnije metode u virusnoj dijagnostici su: imunoenzimski test ELISA i metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. [24]

2.2.1. PCR metoda

Metoda lančane reakcije polimerazom, tzv. PCR metoda (engl. *Polymerase Chain Reaction*) omogućava eksponencijalno umnožavanje ciljanog dijela DNA. Pokazala se najspecifičnijom i najosjetljivijom za molekularno-genetičke analize. Ovom metodom moguće je ostvariti umnožavanje jako malih dijelova DNA. Također, PCR se može koristiti za različite uzorke (krv, parafinirana tkiva, izmet...) (slika 5). Prednost metode je brzina, no nedostaci ove metode su lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Lažno pozitivni rezultati mogu nastati uslijed kontaminacije prilikom prikupljanja uzorka, obrade uzorka ili pak nespecifičnog povezivanja početnice i ciljane molekule DNA. Lažno negativni rezultati mogu nastati zbog: nehomogene distribucije patogena u uzorku, razgradnje viralnog genetskog materijala prilikom skladištenja te zbog iznimno male količine patogena koja je ispod granice detekcije. [25] Vjerodostojnost rezultata također ovisi o vremenu testiranja tj. o vremenu inkubacije virusa (virus se ne može detektirati odmah nakon infekcije tj. prije pojave simptoma). Neki vrlo osjetljivi testovi mogu detektirati svega jednu kopiju genoma u 100 stanica, što ne predstavlja opasnost za organizam domaćina, a daje pozitivan test o infekciji organizma.[26]

COVID-19 Molecular Diagnostic Test through RT-PCR



Slika 5. Dijagnostički PCR test [27]

2.2.2. LAMP metoda

Petljom posredovano izotermalno umnažanje (LAMP, engl. *Loop-mediated isothermal amplification*) je metoda za detekciju i kvantifikaciju virusa koja se temelji na umnažanju nukleinskih kiselina. LAMP je izuzetno specifična metoda jer koristi 6 različitih početnica tj. prepoznaje 6 različitih dijelova ciljane DNA. To je ujedno i nedostatak jer zahtjeva složenu pripremu. Metoda nije skupa i rezultati su dostupni unutar jednog sata. Prednost metode je što može detektirati i DNA i RNA molekule. Nisu potrebni koraci pročišćavanja kao kod PCR metode jer druge molekule ne ometaju provođenje postupka. Razmatra se upotreba LAMP metode za detekciju koronavirusa. [28]

2.2.3 RCA metoda

Amplifikacija kotrljajućeg kruga (RCA, engl. *Rolling circle replication*) je izotermni enzimski postupak pomoću DNA ili RNA polimeraze. Na kratkoj DNA ili RNA početnici sintetizira se dugi lanac nukleinske kiseline, a kao kalup za sintezu služi kružna DNA molekula. Glavna prednost RCA metode je što se može provoditi u izotermnim uvjetima s minimalno reagenasa što smanjuje mogućnost pojave lažno pozitivnih rezultata. Uzorci mogu biti i u tekućoj i u čvrstoj fazi. RCA je osjetljivija i ekonomičnija od ostalih metoda temeljenih na PCR-u. Ipak, još nije razvijena kao kvantitativna metoda. [29] Glavni nedostatak RCA metode jest složena izvedba, kao i nemogućnost povećavanja duljine umnožene DNA. Također, problem predstavlja prvi korak postupka. Naime, iako je najveći dio postupka moguće izvesti pri sobnoj temperaturi, za stvaranje jednolančanog lanca potrebno je osigurati temperaturu denaturacije.[30]

2.2.4. Imunotestovi

Imunotestovi su analitičke metode utemeljene na antitijelima za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Temelje se na specifičnoj reakciji antitijelo-antigen te se stoga često koriste u dijagnostici i farmakokinetici. [31]

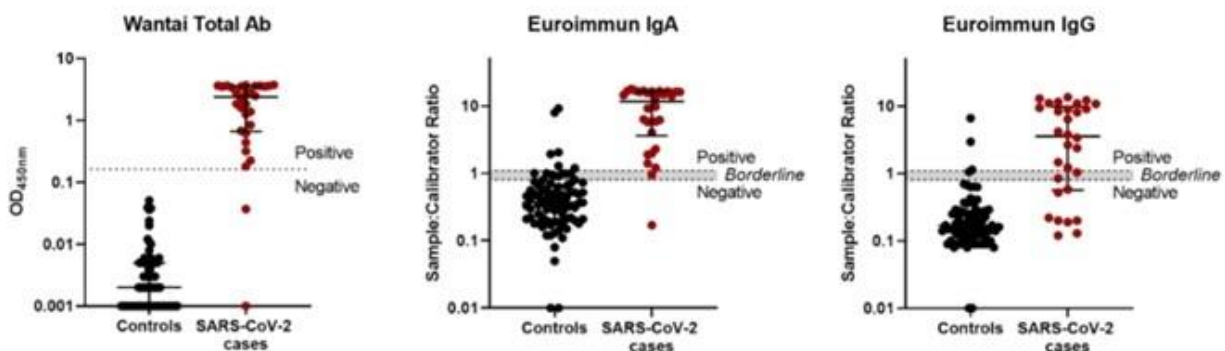
2.2.4.1. ELISA

Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA, engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) je metoda koja se temelji kemijskoj reakciji između beta stanica leukocita i antigena. Elisa omogućuje visoko osjetljivu kvalitativnu i kvantitativnu analizu antigena uključujući proteine, peptide,

nukleinske kiseline, hormone, herbicide i biljne sekundarne metabolite. [32]Postoji više vrsta ELISA metode: direktna, sendvič i konkurentna.[31]

Kod direktne ELISA metode antigen ili antitijelo su imobilizirani na krutoj površini. Na krutu površinu nanese su i drugi proteini kako bi se spriječilo nespecifično vezanje. Direktna metoda najviše se koristi za kvalitativne analize. [32]

"Sendvič" ELISA metoda mjeri količinu antigena između dva sloja antitijela na principu hvatanja i detekcije antitijela. Prednost te metode je što uzorak ne mora biti čist prije analize. Konkurentna ELISA metoda uključuje imobilizaciju antigena na krutoj fazi (slika 6). Metoda je jednostavna za izvođenje, te nisu potrebni postupci prethodne obrade. Prednost ove metode je što je ekološki prihvatljiva i relativno jeftina, a glavni nedostatak je nestabilnost antigena (zahtijeva skladištenje pri niskim temperaturama). Također, postoji velika vjerojatnost pojave lažno negativnih ili lažno pozitivnih rezultata.[31]



Slika 6. ELISA test SARS-Cov-2 [33]

2.2.4.2. Imunoblot

Imunoblot (Western blot) je metoda za identifikaciju specifičnih proteina u složenim smjesama proteina. Postupak se provodi u tri koraka. Započinje gel elektroforezom, nakon čega slijedi prijenos proteina na membranu, a postupak se završava imunodetekcijom proteina na membrani. Western blot je izrazito osjetljiva metoda (moguće je detektirati 0.9 ng proteina u uzorku). Također, metoda je veoma specifična zbog provođenja gel elektroforeze koja proteine razdvaja po veličini i konformaciji, kao i zbog specifične reakcije antitijelo-antigen. Nedostatak

metode su lažno pozitivni i lažno negativni rezultati. Lažno pozitivni rezultati nastaju kada antitijelo reagira s nekim drugim, nespecifičnim proteinom. Lažno negativni rezultati nastaju ukoliko prijenos proteina na membranu nije trajao dovoljno dugo pa stoga ne dolazi do prijenosa velikih proteina. Metoda je tehnički izuzetno zahtjevna i skupa. [34]

2.2.5. Hibridizacija nukleinskih kiselina

Hibridizacija nukleinskih kiselina je metoda koja se temelji na komplementarnosti dviju jednolančanih nukleinskih kiselina. Njihovim specifičnim vezanjem nastaje dvolančana nukleinska kiselina (dupleks ili hibrid). Ovom metodom mogu se detektirati i infektivne i neinfektivne čestice. Zbog toga je nedostatak u odnosu na druge metode manjak osjetljivosti. [35]

2.3. SPEKTROSKOPSKE METODE

Spektroskopske metode su metode instrumentalne analize za određivanje kemijske strukture ispitivanog uzorka koristeći elektromagnetsko zračenje valnih duljina ultraljubičastog i infracrvenog zračenja, mikrovalova i x zraka. [36]

2.3.1. NMR

Nuklearna magnetska rezonancija je najuspješnija metoda za određivanje kemijske strukture organskih i anorganskih spojeva jer daje specifično uređenje vodikovih i ugljikovih atoma u molekuli. [36] Ova jednostavna i brza spektroskopska metoda uključuje energijske promjene atomskih jezgara. Za detekciju energijskih promjena potrebno je magnetsko polje. Jezgra koja ima neparan broj protona odnosno neutrona ili neparan broj protona i neutrona (maseni broj) može proizvesti signal magnetske rezonancije. Vrtanja pozitivnog naboja inducira magnetsko polje tj. magnetski moment jezgre. Jezgre atoma analiziranog uzorka smještene u snažnom magnetskom polju apsorbiraju elektromagnetsko zračenje pri čemu jezgre izvrću svoj spin, a apsorbirana energija se mjeri NMR spektrometrom. NMR se koristi u medicinskoj dijagnostici, za kliničke pretrage i praćenje metaboličkih procesa, u prehrambenoj tehnologiji i biotehnologiji, u poljoprivredi i kemijskoj industriji. Glavni nedostatak metode jest skupa oprema. [37]

2.3.2. IR spektrometrija

IR spektroskopija je nedestruktivna metoda koja se koristi za određivanje funkcijskih skupina u organskim spojevima, ali i za analizu polimera, poliatomnih anorganskih molekula i organometalnih spojeva. Svaka molekula ima karakteristične vibracije (ovisno o čvrstoćama veza i masama dijelova molekula koje vibriraju) zbog kojih emitiraju infracrveno zračenje. Apsorpcijom infracrvenog zračenja, molekule jače vibriraju. Budući da svaka molekula ima različit infracrveni spektar, moguće je identificirati molekulu. IR spektar najčešće se dobiva mjerenjem apsorpcije IR zračenja. Može se podijeliti u dva područja: područje funkcionalnih skupina i područje otiska prsta. Najviše informacija bitnih za identifikaciju dobije se iz područja funkcionalnih skupina (IR zračenje koje apsorbiraju polarne kovalentne veze). [37]

2.3.3. UV/Vis spektrometrija

UV/Vis spektroskopija je metoda koja daje informaciju o prisutnom π -konjugiranom elektronskom sustavu molekule. Konjugirani sustav znači niz jednostrukih i dvostrukih veza. UV/Vis zračenje uzrokuje prijelaz valentnih elektrona u više nepopunjene orbitale. Tri su vrste elektronskih prijelaza: prijelazi koji uključuju p , s i n elektrone, prijelazi koji uključuju elektronski prijelaz naboja te prijelazi koji uključuju d i f elektrone. Različite molekule apsorbiraju zračenje različitih valnih duljina. Broj apsorpcijskih vrpca odgovara strukturnim skupinama u molekuli. Spektrofotometrom bilježi se apsorbirano zračenje, a analiza spektra elektromagnetskog zračenja obavlja se pomoću detektora. Zbog nepravilno dizajnirane opreme, može doći do nepreciznih rezultata. [37]

2.3.4. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija je kvalitativna i kvantitativna metoda kojom se analiziraju molekule na temelju omjera mase i naboja. Za izvedbu je potreban potpuno čist uzorak. Struktura molekula određuje se promatranjem fragmentacije molekula. Osim strukture, ovom metodom može se odrediti i molarna masa molekule kao i fizikalna i kemijska svojstva promatrane tvari. Prvi korak ove metode jest ionizacija molekule. Nakon toga slijedi razdvajanje molekula u analizatoru na osnovu njihovih masa u vremenu i/ili prostoru dok je posljednji korak detekcija prema omjeru mase i naboja. Molekule se mogu ionizirati elektroraspršenjem, ionskim raspršenjem te termoraspršenjem. Također, ionizacija se može vršiti metodom MALDI (matricom potpomognuta

ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem). Za razdvajanje molekula mogu se koristiti: analizator mase s magnetskim sektorom, kvadrupolni analizator mase, stupica za ione i analizator mase vremena leta. U spektru masa signal najvećeg intenziteta naziva se osnovni signal i odgovara najstabilnijem ionu. Molekulskoj masi analizirane molekule odgovara signal molekulskog iona (signal s najvećom vrijednošću omjera mase i naboja). [37]

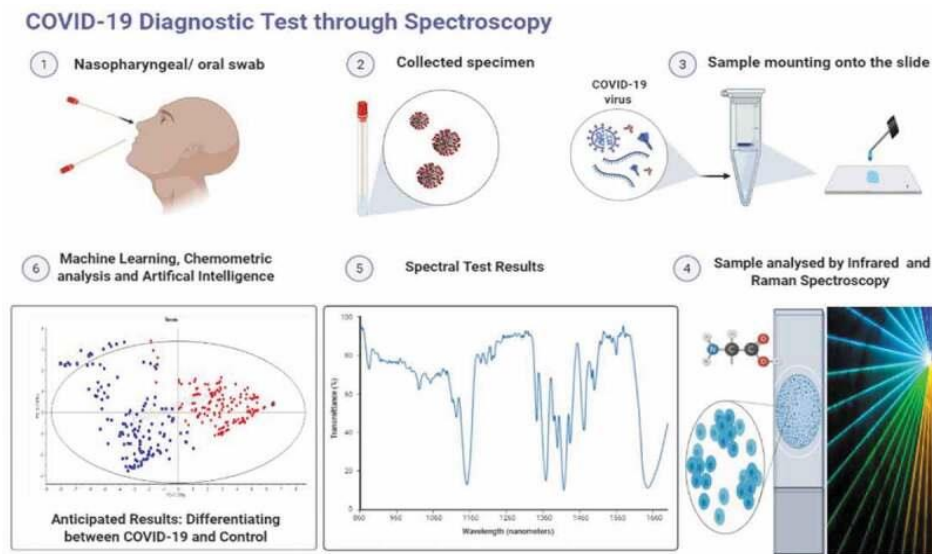
2.3.5. Kirooptičke metode

Kirooptičke metode su mjerenja koja se koriste za kiralne molekule (one koje zakreću ravninu polariziranog svjetla). Takve molekule ne posjeduju niti jedan element simetrije, nisu identične svojoj zrcalnoj slici. U kirooptičke metode ubraja se cirkularni dikroizam (CD) i optička rotacijska disperzija (ORD). CD spektroskopija (cirkularni dikroizam) koristi se za identifikaciju i određivanje konfiguracije kiralnih spojeva. Ovom metodom mogu se pratiti strukturne promjene i odrediti sekundarna struktura proteina. Kirooptička svojstva pojavljuju se zbog interakcija kiralnog medija i polariziranog svjetla. Spektrom disperzije optičke rotacije prikazuje se ovisnost indeksa loma lijevog i desnog enantiomera. CD i ORD spektri daju iste informacije, ali interpretacija CD spektra je nešto jednostavnija. Kirooptičke metode koriste se za istraživanje kiralnih molekula svih vrsta, ali najviše pri istraživanju proteina. Metode su isključivo kvalitativne. [37]

2.4. PRIMJENA SPEKTOSKOPSKIH METODA PRI DETEKCIJI VIRUSA

Spektroskopske metode sve se više upotrebljavaju za detekciju uzročnika bolesti i praćenje razvoja bolesti. Složeni biološki uzorci kao što je krv, urin, majčino mlijeko mogu se analizirati pomoću vrlo učinkovitih i osjetljivih tehnika kao što je nuklearna magnetska rezonancija, infracrvena spektroskopija, UV/Vis spektroskopija...Navedene analitičke metode temelje se na molekulskim vibracijama.

Virusni protein ili proteini antitijela koji nastaju kao odgovor imunološkog sustava mogu se detektirati u vibracijskom spektru. Virusni su podložni modifikacijama tj. promjeni genetskog materijala uslijed promjene okoline, te se pomoću spektroskopskih metoda mogu identificirati sve promjene u kemijskoj strukturi virusa. Moguće je otkriti koncentraciju različitih infektivnih čestica u mokraći, slini, krvi ili serumu. [38] Spektroskopske metode koriste se i pri otkrivanju lijeka za novu bolest izazvanu novim virusom Covid-19 (slika 7).



Slika 7. Shematski dijagram vibracijske spektroskopije za SARS-Cov-2, Covid 19 [38]

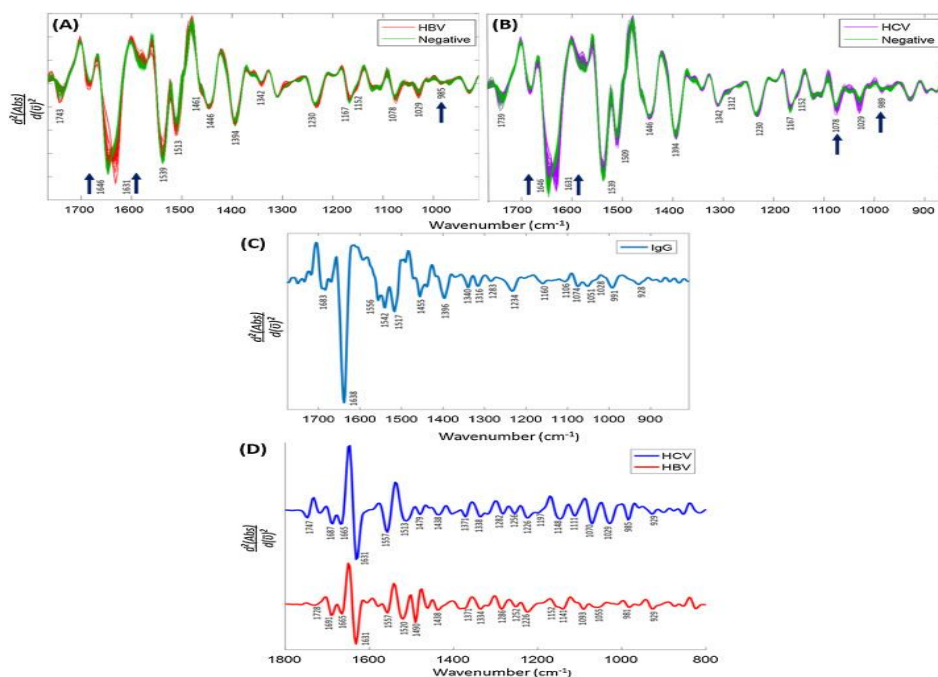
2.4.1. Primjena NMR spektroskopije za detekciju virusa

Nuklearna magnetska rezonancija koristi se za detekciju virusnih čestica. Ova metoda nije u potpunosti pouzdana kada su u pitanju velike biološke molekule jer su signali tih molekula široki da bi se mogli jasno uočiti u spektru. Kako bi se izbjegao taj problem pri detekciji virusa, proučavaju se strukture malih proteinskih podjedinica ili izoliranih proteinskih domena većih proteina (pristup „odozdo prema gore“). NMR se najviše koristi u detekciji retrovirusa npr. virus HIV-a. [39] Metoda je upotrebljiva za detekciju i ostalih virusa. Primjer je proučavanje asimptomatske infekcije hepatitisom C u dječjoj dobi, pri čemu se metoda dokazala kao odličan dijagnostički alat. [40]

2.4.2. Primjena IR spektroskopije za detekciju virusa

U virologiji najviše se koristi NIR područje infracrvenog zračenja, tj. područje optičkog prozora (valna duljina 650 nm-1000nm). Velika je apsorpcija hemoglobina i vode van tog područja što ometa provođenje ostalih spektroskopskih metoda. NIR metoda je neinvazivna i brza. Potrebno je manje od 1 minute kako bi se utvrdila vrijednost antigena. Također, može se odjednom analizirati više komponenti. [41]

Oslabljena totalna refleksija Fourierova infracrvena spektroskopija (FT-IR) je jedna od često upotrebljivih spektroskopskih tehnika. Djeluje u srednjem infracrvenom području. Metoda je brza, osjetljiva i veoma specifična pri kvantizaciji viralnih patogena. Prednost metode je niska cijena i automatska analiza bez prethodne pripreme uzorka. Nedostatak ove metode može biti preklapanje signala jer stanica domaćina i virusna čestica mogu sadržavati iste proteine. Ovom metodom detektirani su virusi hepatitisa B i C, a metoda se koristi i za suzbijanje širenja globalne pandemije virusa Covid-19 (slika 8).[42]



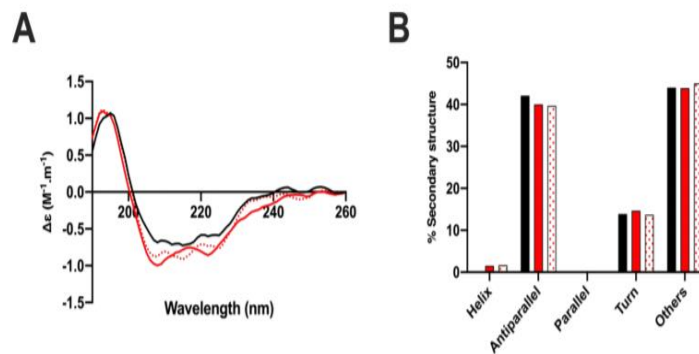
Slika 8. ATR-FTIR spektar: A) HBV negativni uzorci, B) HCV negativni uzorci
C) IgG, D) kontrola [43]

2.4.3. Primjena UV-zračenja za detekciju virusa

Virusne čestice mogu se detektirati pomoću UV zračenja. Koncentracija se određuje pomoću mjerenja optičke gustoće na 260 nm i 280 nm. Nukleinske kiseline pokazuju maksimum apsorpcije na 260 nm, a proteini na 280 nm. [44] Istraživanje učinkovitosti metode provedeno je i na novootkrivenom virusu Covid-19. Za provođenje postupka potrebna je noćna optička oprema i UV lampa. Virusne kolonije postanu vidljive na stotrukum povećanju. Također, UV zračenje služi za detekciju virusa u već dezinficiranim prostorijama. [45]

2.4.4. Primjena cirkularnog dikroizma za detekciju virusa

Cirkularni dikroizam (CD) je metoda koja se koristi u virologiji za proučavanje interakcija viralnih proteina s drugim biomolekulama (ako vezanje liganda uzrokuje promjenu u sekundarnoj ili tercijarnoj strukturi viralnih proteina, promjena se može detektirati metodom cirkularnog dikroizma). Promjene u strukturi proteina kapside upućuju na mutacije virusa koje je bitno detektirati zbog razvoja antiviralne terapije. Također, ovom metodom moguće je pratiti promjenu stabilnosti virusnih proteina pri kemijskim ili termičkim uvjetima koji uzrokuju denaturaciju (slika 9). [46]

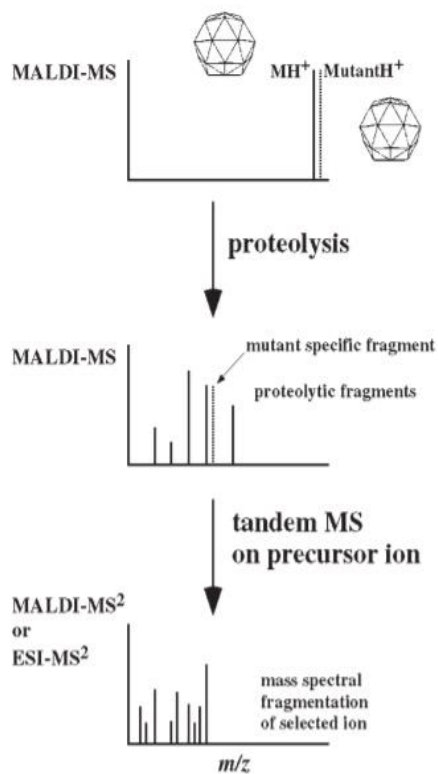


Slika 9. Strukturne promjene SARS-Cov-2 u prisutnosti heparina detektirane CD spektroskopijom [47]

2.4.5. Primjena masene spektrometrije za detekciju virusa

Masena spektrometrija postala je važna tehnika u strukturalnoj virologiji. MS spektrometrija daje informaciju o masi virusnih čestica. Važna je za detekciju promjene konformacije virusne kapside te za otkrivanje interakcija između virusnih čestica i virusnih proteina te drugih biomolekula. Postupak se provodi pri neutralnom pH i u otopinama veće ionske jakosti. Otopine manje ionske jakosti imaju dva tehnička nedostatka: slabi signali u MS spektru i veliki omjeri mase i naboja. Prisutnost soli uzrokuje široke signale u MS spektru iz kojih se masa ne može jasno očitati. Ovom metodom moguće je proučavati stabilnost virusne kapside koja ovisi o koncentraciji proteina, redoks uvjetima, prisutnosti disulfidnih mostova, viralnoj nukleinskoj kiselini itd. Virusna

kapsida štiti virusni genetski materijal, stoga njeno razaranje uzrokuje razaranje same virusne čestice. Takva istraživanja važna su za razvoj antiviralne terapije. [46]



Slika 10. Postupak otkrivanja virusnih mutacija. Mutacije su otkrivene usporedbom spektra masa dvaju proteolitičkih fragmenata [48]

3. ZAKLJUČAK

U ovom radu dan je pregled dostupnih metoda za utvrđivanje prisutnosti virusnih čestica u uzorku:

- PCR metoda je brza, a ujedno se pokazala najosjetljivijom metodom za molekularno-genetičke analize. Glavni nedostatak metode je mogućnost pojave lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata.
- LAMP metoda je brza i može se provoditi bez prethodnog koraka pročišćavanja uzorka. Nedostatak metode je složena priprema uzevši u obzir korištenje 6 različitih početnica za visoku specifičnost.
- RCA metoda je ekonomičnija od ostalih metoda utemeljenih na PCR reakciji te se može provoditi u izotermnim uvjetima uz minimalno reagenasa. Temeljni nedostatak je složena izvedba.
- ELISA je imunotest koji omogućuju osjetljivu kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Problem predstavlja nestabilnost antigena korištenih u analizi.
- Imunoblot je veoma specifična metoda, ali je skupa i tehnički zahtjevna.
- Hibridizacijom nukleinskih kiselina moguća je detekcija infektivnih i neinfektivnih čestica. Nedostatak u odnosu na ostale metode je manjak osjetljivosti.
- NMR metoda je najuspješnija metoda za otkrivanje strukture spojeva. Metoda zahtjeva skupu opremu.
- IR spektroskopija je nedestruktivna i točna metoda. Osnovni nedostatak je manjak podataka o masi molekule i položaju pojedinih funkcionalnih grupa.
- UV/Vis metoda je jednostavna za izvedbu, ali ponekad može biti neprecizna.
- Masena spektroskopija je brza metoda koja daje podatak o masi molekule. Zahtjeva potpuno čist uzorak.
- CD spektroskopska metoda je brza i visoko specifična za kiralne molekule. Ne daje strukturne podatke te omogućava samo kvalitativnu analizu.

4. POPIS LITERATURE

- [1] Hrvatska enciklopedija, <<https://www.enciklopedija.hr>> Pristupljeno 25.kolovoza 2020.
- [2] Quizlet, <<https://quizlet.com/278593290/chapter-15-dnarna-viruses-classification-diagram/>> Pristupljeno 8.rujna 2020.
- [3] Mrežni udžbenik iz genetike, <<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl13.html>> Pristupljeno 8.rujna 2020
- [4] Juretić N. (2002) Osnove biljne virologije, 1. izd., Školska knjiga, Zagreb
- [5] Koch C., Eber F. J., Azucena C., Alexander F., Walheim S., Schimmel T., Bittner A. M., Jeske H., Gliemann H., Eiben S., Geiger F. C., Wege C. (2016) Novel roles for well-known players: from tobacco mosaic virus pests to enzymatically active assemblies. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **7**: 613–629
- [6] Hildebrandt A.C. (2012) Tobacco Mosaic Virus in Plant Tissue Culture. *Tissue Culture, Methods and Applications* 549-558.
- [7] Gorišek M. (2009) Virus mozaika duhana-nekad i sad. Seminarski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- [8] Toma D., Gozar L., Suteu C. C., Fagarasan A. (2019) Predictors for In-hospital Mortality in Pediatric Patients with Acute Myocarditis – a Retrospective Study. *Journal Of Cardiovascular Emergencies* **5 (4)**: 140-147
- [9] Lovrić I. (2017) Peloponeski rat. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu.
- [10] Tukidid (2009) Povijest Peloponeskog rata, Matica hrvatska. str 49.-52.
- [11] Wick C.H. (2015) Integrated Virus Detection, Taylor & Francis Group, an Informa business. str. 3., str. 10-12
- [12] Povijest. hr, Španjolska gripa strahovita epidemija koja je odnijela više života od prvog svjetskog rata, <<https://povijest.hr/drustvo/spanjolska-gripa-strahovita-epidemija-koja-je-odnijela-vise-zivota-od-prvog-svjetskog-rata/>> Pristupljeno 26.kolovoza 2020.

- [13] HRT vijesti (2020), Hina, Španjolska gripa, nekad prava pošast - danas gotovo zaboravljena, <<https://vijesti.hrt.hr/593833/spanjolska-gripa-nekad-prava-posast-danas-gotovo-zaboravljena>> Pristupljeno 26.kolovoza 2020.
- [14] Magni.M.V. (2008) Detection of Bacteria, Viruses,Parasites and Fungi, Springer. str. 239-275.
- [15] Hrvatski zavod za javno zdravstvo (2017), Virusni hepatitis, <<https://www.hzjz.hr/aktualnosti/virusni-hepatitisi/>> Pristupljeno 27. kolovoza 2020.
- [16] Vaše zdravlje (2009), Pandemijska A(H1N1)V 2009 gripa, <<https://www.vasezdravlje.com/bolesti-i-stanja/pandemijska-ah1n1v-2009-gripa>> Pristupljeno 28. kolovoza 2020.
- [17] Pliva zdravlje (2016), Ptičja gripa, <<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/29111/Pticja-gripa.html>>Pristupljeno 28. kolovoza 2020.
- [18] World Health Organization, SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), <<https://www.who.int/ith/diseases/sars/en/>> Pristupljeno 28. kolovoza 2020.
- [19] Zhong N. S., Zheng B. J., Li Y. M., Poon, Xie Z. H. Chan K. H., Li P. H., Tan S. Y.,Chang Q., Xie J. P., Liu X. Q., Xu J., Li D. X., Yuen K. Y., Peiris, Guan Y. (2003) Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, *Lancet* **362(9393)**:1353-1358.
- [20] Perlman S. (2020), Another Decade, Another Coronavirus, *The New England Journal of Medicine*, **382**:760-762
- [21] Hrgovčić A. (2011), Bioterorizam-nekad i danas. Seminarski rad, Sveučilište u Zagrebu.
- [22] Pliva zdravlje (2014), Ebola, <<https://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/25922/Ebola.html>> Pristupljeno 27. kolovoza 2020.

- [23] Martin R. R., Tzanetakis E. I. (2015) Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology* **105** (6): 716-727.
- [24] Boonham N., Kreuze J., Winter S., Vlught R., Bergervoet J., Tomlinson J., Mumford R. (2014) Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus research* **186**: 20-31
- [25] Yang S., Rothman R.E. (2004). PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *The Lancet: Infectious diseases*. **4** (6): 337-48
- [26] Favrot, C., (2015), Polymerase chain reaction: Advantages and drawbacks, Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich
- [27] Covid-19 Testing project (2020), <<https://covidtestingproject.org/faq.html>> Pristupljeno 28.kolovoza 2020.
- [28] Kashir J., Yaginuiddin A., (2020), Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Journal Medicine Hypotheses* **141**: 109786.
- [29] Wang B., Potter S. J., Lin Y., Cunningham A. L., Dwyer D. E., Su Y., Hou Y., Ma X., Saksena K. N. (2005) Rapid and Sensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Rolling Circle Amplification. *American Society for Microbiology Journals* **43** (5): 2339-2344
- [30] Barton L., DNA Amplification: A Comparison of Different Methods, Pristupljeno 28. kolovoza 2020.
- [31] UNIZG, <[https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/6. Metode II.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/6.Metode%20II.pdf)> Pristupljeno 27. kolovoza 2020. Pristupljeno 30.kolovoza 2020.
- [32] Sakamoto S., Putalun W., Vimolmangkang S., Phoolcharoen W., Shoyama Y., Tanaka H., Morimoto S. (2017) Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines* **72**(1): 32–42
- [33] News Medical Life Science,
<<https://www.newsmedical.net/whitepaper/20200616/Overview-of-ELISA-Testing-for-COVID-19-Antibodies.aspx>> Pristupljeno 30.kolovoza 2020.

- [34] Chakavarti D., Gallagher S., (2008), Immunoblot Analysis. *Journal of visualized experiments* **(16)**: 759-759
- [35] Landry M. L.(1990) Nucleic Acid Hybridization in Viral Diagnosis. *Clinical Biochemistry* Volume 23, Issue 4, August 1990, str. 267-277
- [36] Kovač V. (2019) Uvod u spektroskopske i kromatografske metode analize, Predavanja iz kolegija Instrumentalna analiza, Sveučilište u Zagrebu
- [37] Kraljević G. T., Određivanje struktura organskih spojeva, nastavni rad, Sveučilište u Zagrebu
- [38] Khan S. R., Rehman U. I. (2020) Spectroscopy as a tool for detection and monitoring of Coronavirus (COVID-19). *Expert review of molecular diagnostics* str. 1–3
- [39] Neira L. J. (2013) Nuclear magnetic resonance spectroscopy to study virus structure, National Library of Medicine. *Sub-cellular biochemistry* **68**:145-176
- [40] Santos M. C. D., Morais C. L. M., Nascimento Y. M., Araujo M. G., Lima K. M. G. (2017) Spectroscopy with computational analysis in virological studies: A decade (2006-2016), *Trends in Analytical Chemistry* **68**:177-202
- [41] Sakudo A., Suganuma Y., Kobayashi T., Onodera T., Ikuta K. (2006) Near-infrared spectroscopy: Promising diagnostic tool for viral infections. *Biochemical and biophysical research communications* **341(2)**: 279–284
- [42] Santos M. C. D., Morais C. L. M., Lima K. M. G. (2020) ATR-FTIR spectroscopy for virus identification: A powerful alternative. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, vol. Pre-press, no. Pre-press, str. 1-16.
- [43] Roy S., Perez-Guaita D., Bowden S., Herauda P., Wooda B.(2019) Spectroscopy goes viral: Diagnosis of hepatitis B and C virus infection from human sera using ATR-FTIR spectroscopy. *Clinical Spectroscopy* Volume 1, 2019, 100001.
- [44] Stoler D. L., Nelson L. M. (1995) 3 - Nucleic Acid Blotting Techniques for Virus Detection. *Molecular Methods for Virus Detection* 1995, str. 39-74
- [45] Shahid H. (2020) Ultraviolet Index for Coronavirus Treatment and Detection. University of Engineering and Technology, Lahore, Pakistan.

[46] Neira J. L. (2013) Fluorescence, circular dichroism and mass spectrometry as tools to study virus structure. *Sub-cellular biochemistry* **68**: 177-202

[47] Mycroft-West C. J., Su D., Pagani I., Rudd T. R., Elli S., Guimond S. E., Miller G., Meneghetti M. C. Z., Nader H. B., Li Y., Nunes Q. M., Procter P., Mancini N., Clementi M., Bisio A., Forsyth N. R., Turnbull J. E., Guerrini M., Fernig D. G., Vicenzi E., Yates E. A., Lima M. A., Skidmore M. A (2020) Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the surface protein (spike) S1 receptor binding domain with heparin. *bioRxiv* 1-12

[48] Trauger S. A., Junker T., Siuzdak G. (2003) Investigating Viral Proteins and Intact Viruses with Mass Spectrometry. *Topics in Current Chemistry* **225**: 265–288

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Lilijana Lovko

ime i prezime studenta