Molekularna dijagnostika virusa SARS-CoV-2

Huzjak, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:700298

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klara Huzjak

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA VIRUSA SARS-CoV-2

Završni rad

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Klara Huzjak

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA VIRUSA *SARS-CoV-2*

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF *SARS-CoV-2* VIRUS

ZAVRŠNI RAD/ BACHELOR'S THESIS

Mentor:
Doc.prim.dr.sc. Vanja Kaliterna, dr.med.
spec. medicinske mikrobiologije

Split, 2022.

Ime i prezime studenta Sveučilišnog odjela zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu:

Klara Huzjak

Studijski program: Medicinsko laboratorijska dijagnostika

JMBAG: 0066293806

IZJAVA

Kojom izjavljujem da sam završni rad s naslovom Molekularna dijagnostika virusa SARS-CoV-2 izradio/la samostalno pod mentorstvom doc.prim dr. sc. Vanje Kaliterne, dr.med.spec. medicinske mikrobiologije.

U radu sam primijenio/la metodologiju znanstveno istraživačkog rada i koristio literaturukoja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo/la u završnom radu na uobičajen, standardan način citirao/la sam i povezao s korištenim bibliografskim jedinicama.

Rad je pisan u duhu hrvatskoga jezika.

Popunjeni obrasci služe kao temelj za elektroničku obradu podataka radi ostvarivanja prava vezanih za obranu završnog/diplomskog rada, a na osnovu Pravilnika o izradi i obrani završnog i diplomskog rada na sveučilišnim preddiplomskim i diplomskim studijima. Svojim potpisom student daje privolu (ili suglasnost) Sveučilišnom odjelu zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu za prikupljanje i obradu svojih podataka samo za navedenu svrhu.

Student:_____

(potpis)

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. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med. spec. medicinske mikrobiologije

Molekularna dijagnostika virusa SARS-CoV-2
Klara Huzjak, 311242

Sažetak:

Cilj rada: Cilj ovog rada bio je teorijski prikazati i razjasniti karakteristike i građu virusa SARS-CoV-2, opisati trenutno dostupne dijagnostičke metode za analizu virusa i prikazati najbolju dijagnostičku tehniku, RT-PCR molekularnu metodu.
Materijali i metode: U ovom radu opisan je postupak molekularne metode dijagnostike SARS-CoV-2 dijagnostike na BIO-RAD CFX96 RT- PCR uređaju uz korištenje reagensa LiliF Master Mix kit za pripremu reakcijske smjese, koji se koriste u Nastavnomzavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije
Rezultati: Svi uzorci moraju imati detektiranu IPC (Internu kontrolu) koja dokazuje da je postupak obrade uzorka dobro napravljen, te se može pristupiti interpretaciji nalaza. Pozitivan nalaz na virus SARS-CoV-2 označava prisutnost tri detektibilna gena: E,RdRp i N, dok za negativan rezultat geni nisu eksprimirani.
Zaključak: Najbrža, najosjetljivija i najisplativija dijagnostička metoda za detekciju i kvantifikaciju novonastalog virusa jest RT-PCR.

Ključne riječi: COVID-19, RT-PCR, SARS-CoV-2

Rad sadrži: 43 stranica, 18 slika, 35 literaturnih referenci

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR'S THESIS

University of Split
University Department for Health Studies
Medical laboratory diagnostics

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

Supervisor: doc. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med specialist of clinical microbiology

Molecular diagnosis of the SARS-CoV-2 virus
Klara Huzjak, 311242

Summary:

Objectives: The aim of this study was to theoretically present and clarify the characteristics and structureof the SARS-CoV-2 virus, to describe the currently available diagnostic methods for the analysis of the virus and to present the best diagnostic technique, the RT-PCR molecular method.
Methods: This manuscript describes the procedure of the molecular method for SARS-CoV-2 detection on the BIO-RAD CFX96 RT-PCR instrument using LiliF Master Mix kit reagents for the preparation of the reaction mixture, which are used at the Teaching Public Health Institute of Split-Dalmatia County.
Results: All samples must have a detected IPC (Internal Control), which proves that the sample processing procedure was done well, and the interpretation of test results can be accessed. A positive test for SARS-CoV-2 virus indicates the presence of three detectable genes: E, RdRp and N, while for a negative result the genes are not expressed.
Conclusion: The fastest, most sensitive and most cost-effective diagnostic method for the detection and quantification of newly emerging SARS-CoV-2 virus is RT-PCR.

Keywords: COVID-19, RT-PCR, SARS-CoV-2

Thesis contains: 43 pages, 18 pictures, 35 literature references

Original in: Croatian

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1 VIRUS SARS-CoV 2 2
1.2 PATOGENEZA I KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE VIRUSOM SARS-CoV 2 4
1.3 EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE UZROKOVANE VIRUSOM SARS-CoV 2 6
1.4. DIJAGNOSTIČKE METODE VIRUSA SARS-CoV 2 8
1.5. LIJEČENJE BOLESTI UZROKOVANE VIRUSOM SARS-CoV-2 9
2. CILJ RADA 14
3. METODE 15
3.1. PREDANALITIKA 15
3.2. BRZI ANTIGENSKI TEST 17
3.3. LAMP TEHNOLOGIJA 18
3.4. CRISPR TEHNOLOGIJA 19
3.5. REAKCIJA LANČANE POLIMERAZE REVERZNE TRANSKRIPCIJE 21
4. ZAKLJUČAK 30
5. LITERATURA 31
6. SAŽETAK 35
7. SUMMARY 36
8. ŽIVOTOPIS 37

1. UVOD

Virusi su infektivni agensi građeni od jedne ili nekoliko molekula ribonukleinske kiseline ili deoksiribonukleinske kiseline, okruženih ovojnicom kapsidom, građenom od jednog ili više proteina(1).

Koronavirusi raznolika su obitelj virusa jednolančanog RNK lanca obavijenog pozitivnom ovojnicom. Oni napadaju čovjeka, ostale sisavce te pripadnike ptičjih vrsta (2).

Taksonomskom hijerarhijom, koronavirusi spadaju u carstvo *Ribovirinae,* razred *Negarnaviricota,* red *Nidovirales*, porodicu *Coronaviridae* (3) .

Daljnjom taksonomskom klasifikacijom porodica *Coronaviridae* se grana na potporodicu Orthocoronavirinae koju sačinjavaju četiri roda: *alphacoronavirinae, betacoronavirinae, gammacoronavirinae i deltacoronavirinae* (2).

Rod *betacoronavirinae* čine pet vrsta unutar kojih je vrsta *Sarbecovirus* u koji spadaju podvrste SARS-CoV i SARS-CoV-2 (3).

Povijest koronavirusa seže od 1931. godine kada je u pripadnicima ptičjih vrsta otkriven ptičji infektivni bronhitis virus (IBV – Infektivni bronhitis virus). Nakon narednog vremenskog perioda, u godinama 1966. i 1967. prvi su puta otkriveni humani koronavirusi, sojevi HCoV-229E i HCoV-OC43 (2).

Prvo izbijanje epidemije koronavirusom započelo je u studenome 2002. godine u Foshanu, u Kini kao teški akutni respiratorni sindrom koronavirus ili SARS-CoV (eng. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*), koji se kasnije pretvorio u globalnu infekciju godine 2003. uzrokujući stopu smrtnosti od 10%. Nakon punog desetljeća, 2012. godine druga HCoV (eng. *Human coronavirus*) pandemija uzrokovana je Srednjoistočnim respiratornim sindromom ili MERS-CoV (eng. *Middle East Respiratory Syndrome*) s epicentrom u gradu Jeddah u Saudijskoj Arabiji, s globalnom stopom smrtnosti od 35% (3).

Datuma 11.03.2020. godine Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) proglasila je postojanje nove pandemije bolesti koronavirusa-19 (*eng. COVID-19*) uzrokovane teškim akutnim respiratornim sindromom koronavirusa2, odnosno SARS-CoV 2 (4).

1.1 VIRUS SARS-CoV 2

SARS-CoV-2 pozitivan je pleomorfni jednolančani RNK virus veličine genoma 29,891 kb upakiran u kružnu proteinsku ovojnicu koja sadržava šiljaste nastavke površinskih glikoproteina (5).

Vanjska površina koronavirusa SARS-CoV 2 sastoji se od četiri strukturna proteina: glikoproteina (S) nalika na šiljak (engl. *spike*), proteina membrane (M), proteina ovojnice (E) i nukleokapsidnog proteina (N) oko kojeg je upakirana genomska RNK virusa.

S protein Klasa 1 je transmembranskog trimeričnog proteina koji ekstenzivno strši iz ovojnice virusa, veličine je oko 180 kDa s glavnom ulogom posredovanja u interakciji virusa s receptorima na površini stanice domaćina i njihovoj posljedičnoj fuziji (6).

Protein S sadrži receptor vezujuću domenu (*eng. Receptor binding domain – RBD*), najvarijabilniju strukturu u koronavirusima. U koronavirusima otkrivene su dvije vrste šiljastog (S) proteina. Trimerični S protein koji je prisutan u svim koronavirusima, te hemaglutinin esteraza (HE) pronađenu u specifičnim koronavirusima, a koja provodi aktivnost acetil-esteraze, te je nedavno otkrivena i njezina katalitička uloga u invaziji virusa kroz membranu stanice kao i u patogenezi.

E protein, odnosno protein ovojnice s jednim rasponom, mali je polipeptid veličine genoma između 8.4-12 kDa, a koji se sastoji od dvije različite domene: hidrofobne transmembranske domene te nabijenog citoplazmatskog repa. E protein potpomaže izlučivanje zrelih viriona iz stanica domaćina, uz druge funkcije kao što je aktivnost ionskih kanala, E protein inhibira odgovor stanice domaćina i implicira patogenezu u stanici domaćina putem virusa (3).

Membranski glikoprotein ili protein M, najzastupljeniji je element strukture koronavirusa. Interakcije proteina M s proteinima S i E zaslužne su za karakterističan oblik ovojnice viriona (7).

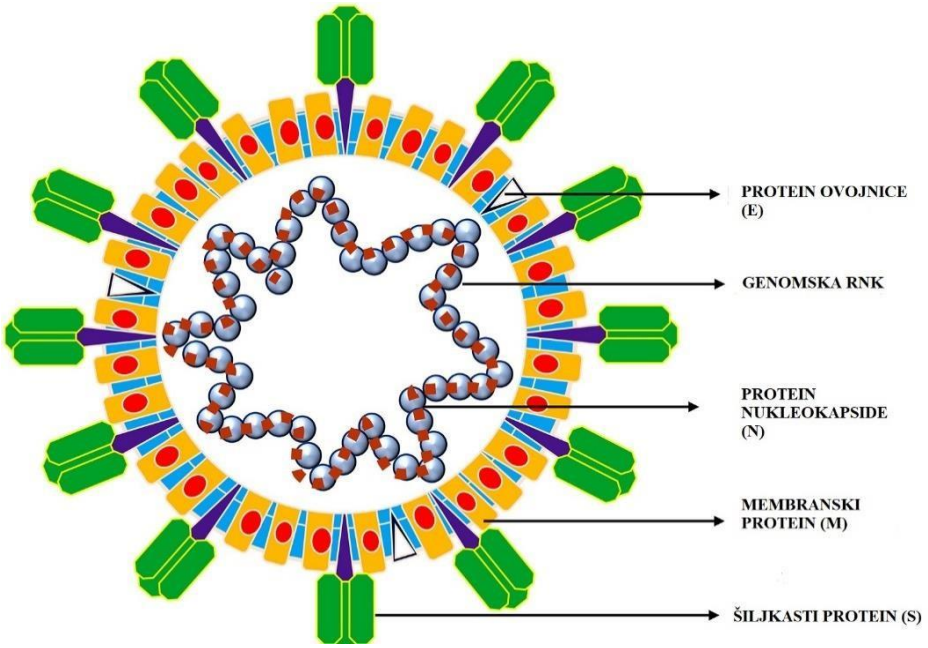
M protein je membranski protein koji se proteže u više raspona, karakteriziraju ga tri transmembranske domene sa C-terminalnim krajem prema unutra i N-terminalnim krajem prema van, dok je kraj treće regije amfipatske prirode (7).

Kroz različite protein - protein interakcije, M protein igra glavnu ulogu u sastavljanju virusa i njegovoj unutarnjoj homeostazi. Također je poznato da proteini koronavirusa M mogu stupiti u interakciju s RNK koja kodira informacije o signalima pakiranja genoma. Ovi podaci podupiru njihovu središnju ulogu u sastavljanju virionskih čestica. Kao jedan od glavnih proteina koronavirusa, pretpostavlja se da M protein sudjeluje i u regulaciji replikacije i pakiranja RNK u zrele virusne čestice (7).

N protein ili nukleokapsida, veličine je genoma između 43 do 50 kDa, te se sastoji od tri glavne regije (*eng. N-arm, CL(Central-Linker) and C-tail*) sa sličnosti sekvence aminokiselina N proteina SARS-

CoV i SARS-CoV 2 od približno 90%. Funkcija N proteina uključuje replikaciju i održavanje kompleksa ribonukleoproteina (RNP). Štoviše, također je objavljeno da su N proteini uključeni u interakcije domaćin - virus. Oni reguliraju stanični ciklus domaćina uključujući apoptozu kako bi olakšali umnožavanje i širenje virusa (7).

N protein također bitno pomaže u pakiranju genomske RNK tijekom sastavljanja virusnih čestica (3).



Slika 1 Shematski prikaz stukture virusa SARS-CoV 2 i njegovih proteina (preuzeto i prilagođeno sa: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134820303336)

1.2 PATOGENEZA I KLINIČKA SLIKA INFEKCIJE VIRUSOM SARS-CoV 2

Bolest Koronavirus –19, odnosno COVID-19 uzrokovana je virusom SARS-CoV 2, potencijalnim uzročnikom visoke stope smrtnosti na Zemlji (8).

Općenito, ljudskoj populaciji nedostaje imunološke jakosti protiv koronavirusa i stoga je ono osjetljivije na nove infekcije CoV-om kao što je SARS-CoV-2. Budući da imunološki odgovor protiv SARS-CoV-2 nije u potpunosti istražen, nedavna su istraživanja oslanjala na prethodna izvješća o drugim koronavirusima, posebice o SARS-CoV-u i MERS-CoV-u kako bi se čovječanstvo borilo protiv novonastalog patogena (3).

COVID-19 je bolest s proteinskim manifestacijama, u rasponu od respiratornih do gastrointestinalnih do sistemskih simptoma. Iako je primarno mjesto infekcije SARS-CoV-2 respiratorni trakt, prisutnost simptoma koji utječu na druge organske sustave zajedno sa *in vitro* dokazima o infektivnosti SARS-CoV-2 u nizu drugih tkiva, sugerira da se infekcija SARS-CoV-2 može proširiti izvan dišnog sustava (9).

Respiratorni i gastrointestinalni sustavi primarna su staništa čovjekove mikrobiote, pa samim time i poprište za infekciju virusa SARS-CoV 2, uzročnika bolesti COVID-19 (10). Ulazak SARS-CoV-2 u ljudske stanice posredovan je enzimom koji konvertira angiotenzin-2 (ACE2) receptor stanične površine, koji se veže na domenu koja veže receptor (RBD) proteina SARS-CoV-2 na šiljak (S). Nakon vezanja ACE2, cijepanje virusnog šiljastog proteina (S) od strane proteaza poput transmembranske serinske proteaze 2 (TMPRSS2) ili katepsina B ili L (CTS-B ili L) ili FURIN-a smatra se bitnim korakom za djelovanje na membrani stanice domaćina, fuzije i virusne infekcije (11).

Najčešći simptomi COVID-19 bolesti su groznica i suhi kašalj. Većina bolesnika imala je obostranu upalu pluća. Bolest COVID-19 je podijeljena u tri razine prema težini bolesti: blagu, tešku i kritičnu. Zabilježeni su i slučajevi asimptomatskih infekcija,ali većina asimptomatskih pacijenata je ipak razvila bolest za nekoliko dana. Simptomi infekcije COVID-19 pojavljuju se nakon razdoblja inkubacije od otprilike 5,2 dana. Razdoblje od pojave simptoma COVID-19 do smrti kretalo se od 6 do 41 dan s medijanom od 14 dana. To razdoblje ovisi o dobi bolesnika i statusu imunološkog sustava pacijenta. Najčešći simptomi na početku bolesti COVID-19 su vrućica, kašalj i umor, dok ostali simptomi uključuju pojačano stvaranje sputuma, glavobolju, hemoptizu, proljev, dispneju i limfopeniju (8).

Osim bolesti dišnog sustava, bolest COVID-19 može dovesti do ozljede miokarda i aritmičkih komplikacija, neuroloških komplikacija kao što su mijalgija, glavobolja, vrtoglavica, poremećaj svijesti, intrakranijalno krvarenje, pa čak i moždani udar. Zabilježeni su i probavni simptomi i ozljede jetre, hiperkoagulabilnost i trombotičke komplikacije (10).

Dosadašnja su istraživanja pokazala da je otprilike 60% SARS pozitivnih pacijenata razvilo bolest jetre s RT-PCR detekcijom pozitivnog nalaza na SARS-CoV u jetrenom tkivu. Slično SARS-CoV bolesti, nalazi u pozitivnih pacijenata oboljelih od SARS-CoV- 2 bolesti pokazali su korelaciju virusne infekcije SARS-CoV-2 bolesti sa hepatičkim oštećenjem. Prema zadnjim objavljenim podacima, udio COVID-19 oboljelih osoba sa različitim stupnjem jetrenog oštećenja procijenjena je između 58-78% (12).

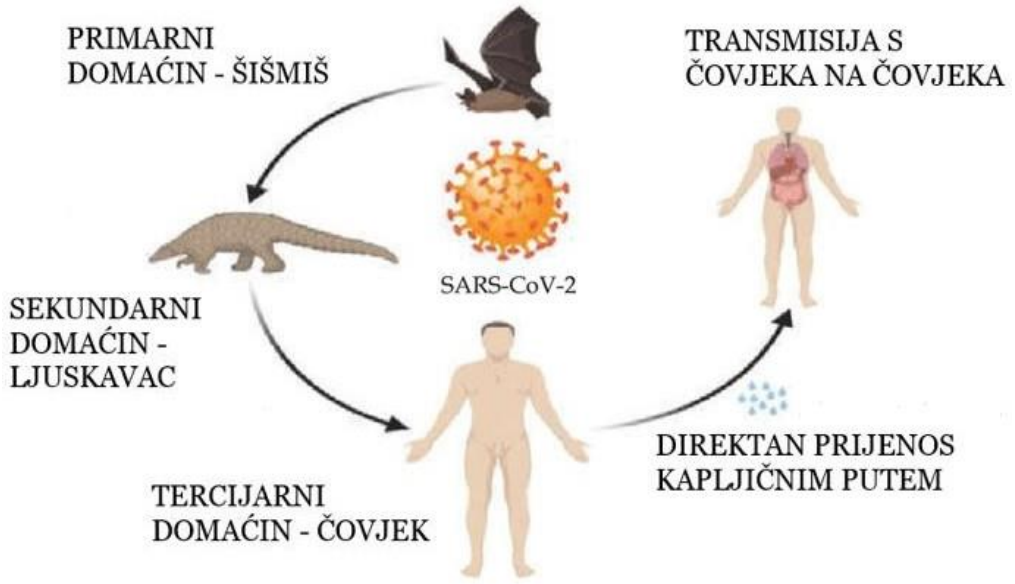
Bolesnici zaraženi COVID-19 bolešću pokazali su veći broj leukocita, abnormalne respiratorne nalaze i povećane razine proupalnih citokina u plazmi. Jedno od izvješća o slučaju COVID-19 pokazalo je da je pacijent pet dana imao kašalj, grubo disanje oba pluća i tjelesnu temperaturu od 39,0 °C. Pacijentov sputum pokazao je pozitivne rezultate lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR) koji su potvrdili infekciju COVID-19. Laboratorijske su pretrage pokazale leukopeniju s brojem leukocita od 2,91 × 10^9 stanica/L od kojih su 70,0% bili neutrofili. Dodatno, zabilježena je vrijednost od 16,16 mg/L krvi C-reaktivnog proteina što je iznad normalnog raspona (0-10 mg/L). Također je uočena visoka brzina sedimentacije eritrocita i D-dimera. Glavna patogeneza infekcije COVID-19 kao virusa dišnog sustava bila je teška upala pluća (8).

1.3 EPIDEMIOLOGIJA INFEKCIJE UZROKOVANE VIRUSOM SARS-CoV 2

Datuma 11.03.2020. Svjetska Zdravstvena Organizacija proglasila je postojanje nove svjetske pandemija bolesti Koronavirusa-19 ili COVID-19 uzrokovane Teškim akutnim respiratornim sindromom –SARS-om (eng. *Severe Acute Respiratory Syndrome*) (13).

Epidemija COVID-19 bolesti vlada u više od 227 zemalja od začetka infekcije u Wuhanu u Kini s početkom od 2019. godine, precizno na tržnici hrane na kojoj se prodaju žive životinjske vrste (13).

Smatra se da su prirodni rezervoar SARS-CoV-2 virusa šišmiši roda *Rhinolophus* zbog sličnosti genoma sa virusom u 96%. Filogenetskom analizom identificirani je i mogući sekundarni domaćin virusa SARS-CoV-2, Pangolin, odnosno Ljuskavac, sisavac iz reda *Pholidota*, iako premalo dokaza o intermedijarnom domaćinu kao i visokoj patogenosti virusa u inficiranim Pangolinima prevladava mišljenja da su Ljuskavci sekundarni rezervoar koronavirusa SARS-CoV-2. Tercijarni rezervoar je zaraženi čovjek. SARS-CoV-2 prenosi se putem kontaminiranih predmeta i kapljica tijekom bliskog nezaštićenog kontakta između zaraženih i nezaraženih. Simptomatski i asimptomatski bolesnici su glavni izvor infekcije. Virus se također može širiti neizravnim kontaktom. Kapljice koje sadrže virus zagađuju ruke, ljudi tada dolaze u kontakt sa sluznicom usta, nosa i očiju, uzrokujući infekciju (8).



Slika 2 Shematski prikaz tri rezervoara SARS-CoV-2 domaćina i transmisija s čovjeka na čovjeka (preuzeto i dorađeno iz: https://www.researchgate.net/figure/Depicts-the-transmission-cycle-of-SARS-CoV-2-from-bats-to-humans-via-Pangolins-The_fig1_346719377)

Prema najnovijim podacima Svjetske Zdravstvene Organizacije od 21. lipnja 2022. godine potvrđeno je 536.590.224 slučajeva bolesti COVID-19, uključujući 6.316.655 smrtnih slučajeva. Do 21.lipnja 2022. ukupno je administrirano 11.912.594.538 doza cjepiva. U Republici Hrvatskoj je od 3.siječnja 2020. do 20. lipnja 2022. potvrđeno 1.141.919 slučajeva COVID-19 s 16.030 smrtnih slučajeva. A od 5. lipnja 2022. godine administrirano je ukupno 5.253.373 doze cjepiva (14).

Svi virusi, uključujući i SARS-CoV-2 evoluiraju kroz određeno vremensko razdoblje. Stopa mutacija za SARS-CoV-2 iznosila je otprilike dvije mutacije mjesečno, a smatralo se da se varijante s kliničkim implikacijama nisu mogle pojaviti tako sporom brzinom unutar kratkog razdoblja, međutim, kronično izlučivanje virusa u okruženju imunokompromitiranih osoba proizvodi viruse s višestrukim mutacijama, uključujući u S proteinu. U ranoj fazi pandemije postalo je jasno da će evolucija virusa biti problem. U veljači 2020. godine mutacija D614G unutar RBD proteina S otkrivena je u Europi, a varijante koje nose mutaciju D614G brzo su postale dominantni virusni sojevi diljem svijeta. Od pojave varijante D614G, nekoliko glavnih varijanti s dodatnim infektivnim i kliničkim implikacije su identificirane širom svijeta (15).

Radna skupina SZO-a za razvoj virusa preporučila je korištenje slova grčke abecede za imenovanje varijanti SARS-CoV-2. Klasifikacija varijanti SARS-CoV-2 uključuje varijante od interesa (eng. *variants of interest,* VOI),varijante koje izazivaju zabrinutost (*eng.variants of concern, VOC*) i varijante pod nadzorom (*eng. Variants under monotoring, VUM*) (15).

Od 30. kolovoza 2021. SZO je odredila četiri varijante koje izazivaju zabrinutost (alfa, beta, gama i delta).

Trenutačno se teški akutni respiratorni sindrom koronavirus 2 (SARS-CoV-2) proširio diljem svijeta kao *Omicron* varijanta. Ova varijanta je jako mutirani virus i Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) označila ju je kao varijantu koja izaziva zabrinutost, te ju je 26. studenog 2021. proglasila VOC-om (16).

1.4. DIJAGNOSTIČKE METODE VIRUSA SARS-CoV 2

Rapidno širenje pandemije COVID-19 posljedično je uzrokovalo brzu detekciju i identifikaciju virusa i oboljelih od istog. Trenutačni zlatni standard za dijagnostiku COVID-19 bolesti, RT-PCR, uvelike ovisi o detekciji virusnog genetičkog materijala (RNK) uzorkovanog iz uzorka nazofaringealnog obriska ili sputuma. Za detekciju virusa u ranoj fazi infekcije potrebna je tehnologija koja je sposobna amplificirati detektibilnu količinu genetičkog materijala dovoljnu za prepoznavanje virusa u dovoljno razmjernim razinama za dijagnostiku (17).

Kako bi se otkrili noviji mutirani virusi, neophodno je primijeniti sekvenciranje nove generacije (*eng*. *New Generation Seqencing*) za identifikaciju virusnog genoma sa specifičnim mutacijama. Trenutno je tehnika "sekvenciranja sintezom" (od strane IlluminaInc. San Diego, CA, SAD) i "sekvenciranje dugog čitanja" (od Oxford Nanopore Technology, Oxford, UK) u upotrebi za identifikaciju virusnih genoma na razini rezolucije s jednom bazom (17).

RT-PCR je najčešće korištena metoda za detekciju virusnih patogena, uključujući virus SARS-CoV-2. Međutim, s obzirom na trenutne izazove s RT-PCR-om, alternativne tehnike koje uključuju CRISPR-Cas metodu i izotermalno pojačanje (RT-LAMP) se istražuju.

CRISPR, dobro poznat kao alat za uređivanje gena, koristi se za brzo otkrivanje virusnih patogena kao *POC— Point Of Care* uređaj. Dijagnostika temeljena na CRISPR-u (CRISPR-Dx) korištena je za otkrivanje virusa. Glavna je karakteristika za detekciju virus SARS-CoV-2 brza analiza na temelju lateralnog protoka (SARS-CoV-2 *DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter* (DETECTR)). Testom se može otkriti virus iz uzoraka respiratornog obriska s osjetljivošću koja je usporediva sa SARS-CoV-2 testom u stvarnom vremenu (RT-PCR) za 30-40 min (18).

Osim molekularne dijagnostike, još jedan dijagnostički pristup za SARS-CoV-2 ima za cilj otkrivanje antitijela koja proizvodi imunološki sustav bolesnika protiv virusa. Iako su serološki testovi brži, njihova je upotreba za dijagnostiku ograničena činjenicom da obično traje nekoliko dana pa do dva tjedna nakon što dođe do infekcije kako bi se antitijela mogla otkriti. Stoga testiranje temeljeno na antitijelima nije pouzdana metoda za dijagnosticiranje COVID-19; međutim, oni mogu biti korisni za populacijsko testiranje, odnosno koriste se za procjenu udjela populacije s imunitetom (ako su antitijela biljeg imuniteta) i identificiranje osjetljivih pojedinaca. Takve informacije također mogu biti korisne za mjere javnog zdravlja, uključujući protokole povratka na posao i socijalnu segregaciju osjetljivih pojedinaca (17).

1.5. LIJEČENJE BOLESTI UZROKOVANE VIRUSOM SARS-CoV-2

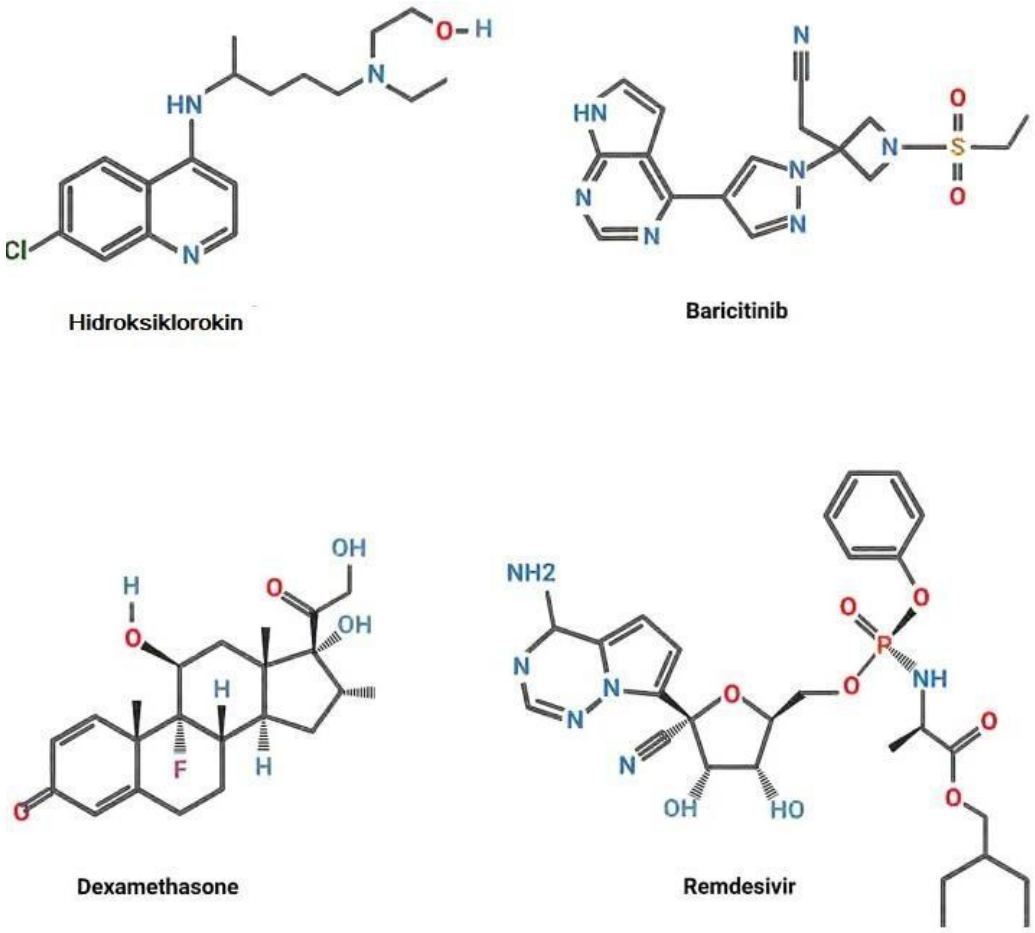
Od početka pandemije, višestruki antivirusni lijekovi, antibiotici, antimalarici, te imunomodulatorni lijekovi bili su predviđeni za učinkovitu obranu protiv SARS-CoV-2 virusa. Međutim, prepoznavanje agenasa koji su neučinkoviti je od najveće važnosti, tako da je primjereno, pravilno i sigurno liječenje neophodno za daljnju terapiju. Preporučeni terapeutski agensi/potencijalni tretmani uključuju: Remdesivir, Baricitinib, Dekstrametazon i Hidroksiklorokin.

Remdesivir je analog adenozina koji se metabolizira do njegovog aktivnog metabolita, remdesivir trifosfata. Remdesivir trifosfat je strukturni analog adenozin trifosfata (ATP) i natječe se s prirodnim supstratom za ugradnju RNA polimeraze u nastajuću virusnu RNK, što rezultira odgođenim prekidom lanca tijekom replikacije i posljedično inhibicijom virusne replikacije. Jedna od najnovijih i najvećih studija koja opisuje učinkovitost remdesivira u infekciji SARS-CoV-2 izvještava da unatoč svojoj uvjetnoj preporuci, remdesivir još uvijek može biti učinkovit u postizanju ranog kliničkog poboljšanja. Smanjuje smrtnost u ranoj fazi i potrebu za suplementacijom kisika s visokim protokom i invazivnom mehaničkom ventilacijom među hospitaliziranim pacijentima s COVID-19 (19).

Baricitinib je selektivni inhibitor janus aktivirane kinaze 1 (JAK1) i janus aktivirane kinaze 2 (JAK2), od kojih dvije posreduju u signaliziranju citokina i faktora rasta uključenih u hematopoezu, upalu i imunološki odgovor. Modulira unutarstaničnu signalizaciju djelomično inhibirajući enzimsku aktivnost JAK1 i JAK2, smanjujući tako fosforilaciju i aktivaciju STAT proteina. Baricitinib inhibira indukciju IL-6 na način ovisan o dozi, a istovremeno smanjuje koncentraciju C-reaktivnog proteina (CRP) u serumu. Povoljan učinak baricitiniba testiran je u bolesnika s COVID-19 s umjerenom upalom pluća (19).

Deksametazon je sintetski glukokortikoid, fluorirani derivat prednizona koji ima snažno i dugotrajno protuupalno i imunosupresivno djelovanje. Mehanizam djelovanja temelji se na smanjenju nakupljenih leukocita i njihovoj adheziji na endotel. Štoviše, deksametazon inhibira fagocitozu i razgradnju lizosoma, smanjuje broj limfocita, eozinofila, monocita i blokira lučenje histamina i leukotriena ovisno o IgE. Konačno, inhibira sintezu i otpuštanje citokina, uključujući interferon γ, TNF-α, GM-CSF i interleukine IL-1, IL-2, IL-3 i IL-6. Inhibiranjem aktivnosti fosfolipaze A2 putem lipokortina, sprječava oslobađanje arahidonske kiseline, smanjujući tako medijatore upale kao što su leukotrieni i prostaglandini (19).

Hidroksiklorokin je antimalarijski lijek, potencijalni blokator sazrijevanja virusa. Tijekom prvih dana pandemije COVID-19 mnogi znanstvenici a i liječnici su polagali nadu u hidroksiklorokin (HCQ) i druge antimalarijski lijekovi. Iako uz nuspojave kao što su srčane aritmije i produljenje QT vala, HCQ se i dalje koristi kao profilaksa u blažim kliničkim slučajevima (19).



Slika 3 Strukturni prikaz predloženih lijekova za liječenje infekcije uzrokovane SARS-CoV-2 virusom, dorađeno i preuzato sa: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8654464/figure/fig0010/

Nadalje, SARS-CoV-2 monoklonska antitijela, vrsta su farmakološke terapije. Većina antivirusnih monoklonskih antitijela (mAt) u razvoju cilja na površinski šiljasti protein SARS-CoV-2. Trenutačno su *Regeneron Pharmaceuticals REGEN-COV* (Casirivimab s Imdevimab), *Eli Lilly* (Bamlanivimab i Etesevimab) i *Vir Biotechnology/GlaxoSmithKline* (Sotrovimab) odobreni za hitnu upotrebu od strane Američke agencije za hranu i lijekove (*eng. FDA*) za liječenje blagih do umjerenih pacijenata oboljelih od bolesti COVID-19, a koji nisu hospitalizirani (20).

REGEN-COV (Casirivimab s Imdevimabom) sadrži dva različita monoklonska antitijela koja se vežu na jedinstvene epitope šiljastog proteina RBD SARS-CoV-2. Bamlanivimab (također poznat kao LY-CoV555 i LY3819253) je neutralizirajuće monoklonsko protutijelo koje cilja na RBD S proteina SARS-CoV-2. Etesevimab (također poznat kao LY-CoV016 i LY3832479) je još jedno neutralizirajuće monoklonsko protutijelo koje se veže na drugačiji, ali preklapajući epitop u RBD proteina S SARS-CoV-2 . Sotrovimab je monoklonsko protutijelo u jednoj dozi koje cilja na šiljasti protein SARSCoV-2, čime se blokira pričvršćivanje virusa i ulazak u ljudske stanice (20).

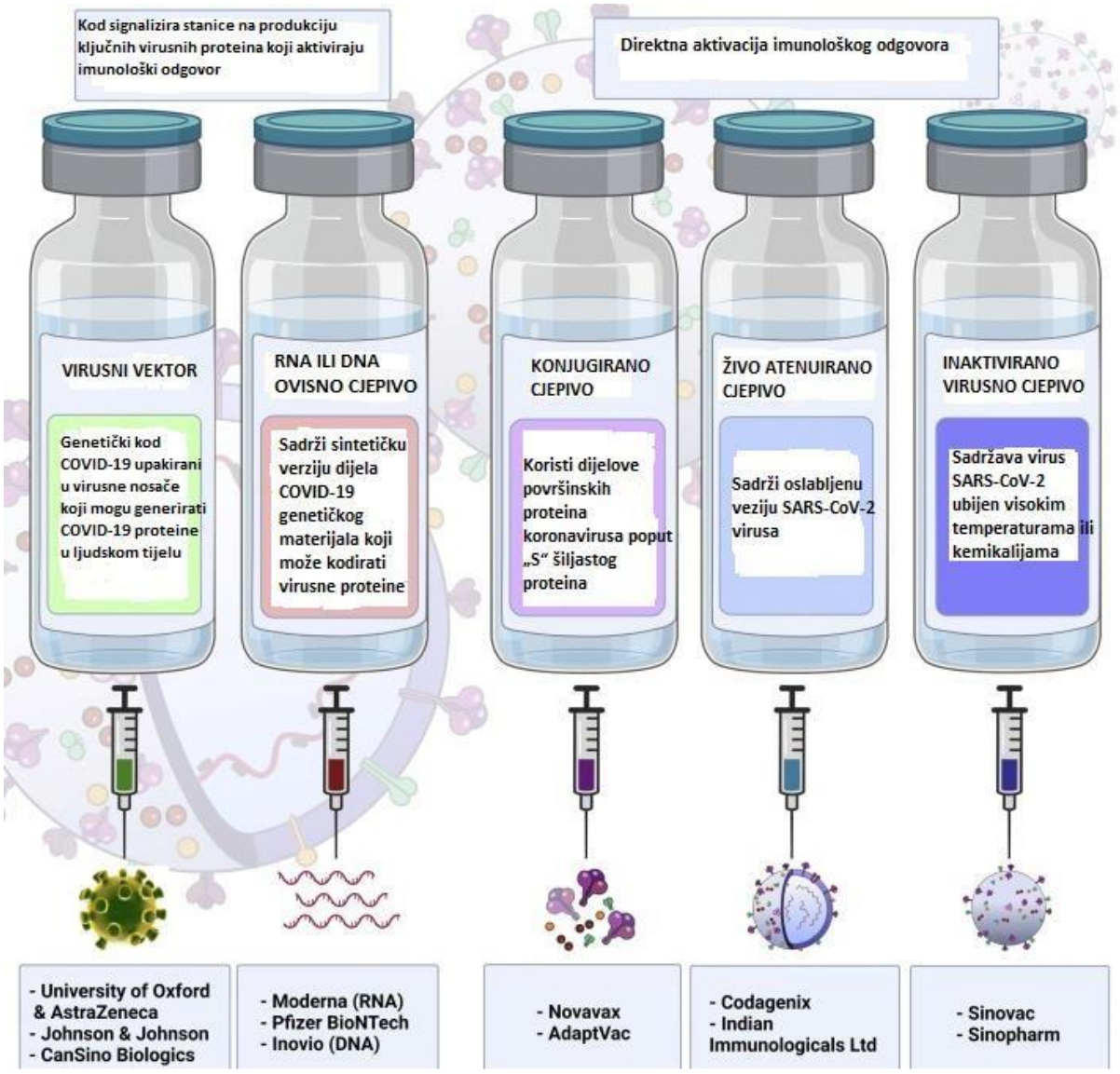
Terapija konvalescentnom plazmom (*eng.CPT*) je pasivni imunizacijski pristup u liječenju zaraznih bolesti plazmom s visokim titrom protutuijela koja bi u načelu mogla zaustaviti napredovanje bolesti. S obzirom na nedostatak učinkovite terapijske strategije protiv SARS-CoV-2, CPT može biti ključno sredstvo za liječenje pacijenata oboljelih od COVID-19. Nedavnim revidiranjem Američka agencija za hranu i lijekove ograničila je odobrenje rekonvalescentne plazme visokog titra samo za hospitaliziranih pacijenata u ranoj fazi bolesti COVID-19 (20).

Teško zatajenje dišnog sustava zbog bolesti koronavirusa 2019 (COVID-19) upala pluća, odnosno pneumonija koja ne reagira na neinvazivnu respiratornu potporu zahtijeva mehaničku ventilaciju. COVID-19 pneumonija je patofiziološki entitet različit od klasičnog ARDS-a (*eng. Acute respiratory distress syndrome*) i zahtijeva drugačije upravljanje ventilacijom. Iako mehanička ventilacija može biti spasonosna terapija, može uzrokovati daljnje ozljede pluća ako tlak i protok dišnih puteva i njihovo vrijeme nisu prilagođeni mehanici dišnog sustava pojedinog pacijenta (21).

Cijepljenje je jedna od najučinkovitijih preventivnih mjera zaštite pojedinca i cijele populacije od infektivnih bolesti.

Visoka stopa virulencije, kao i brzina širenja pandemije među populacijom posljedično je uzrokovalo i ubrzani razvoj pasivne imunizacije čovjeka nad virusom. Razvojem nove tehnologije rezultiralo je razvojem više vrsta cjepiva kao zaštite od virusa SARS-CoV-2. Iako cjepivo nije isključiva zaštita od patogena, ono se pokazalo kao učinkovita preventivna mjera od težih posljedica na organizam uzrokovanih virusom (22).

Trenutno je na Svijetu raspoloživo pet vrsta različitih cjepiva koja različitim mehanizmom signaliziraju virusne proteine na aktivaciju imunološkog sustava u čovjeka. RNK I DNK ovisno cjepivo, virusni vektor, konjugirano cjepivo, živo atenuirano cjepivo i inaktivirano virusno cjepivo (19).



Slika 4 Shematski prikaz dostupnih cjepiva protiv SARS-CoV-2 infekcije. Preuzeto i dorađeno sa:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8654464/figure/fig0015/

Cjepivo koje sadrži oslabljeni virus može se primijeniti intranazalnim putem u obliku spreja, a cjepiva koja koriste oslabljeni virus na temelju oslabljene verzije virusa gripe prilagođene su virusu COVID-19. Cjepivo *CoronaVac* nudi 100% učinkovitost za izbjegavanje ozbiljne bolesti, 78% za sprječavanje blažih slučajeva i 50,38% manji rizik od obolijevanja. Sredstvo za imunizaciju također je pokazalo dobre rezultate protiv Delta varijante koronavirusa u laboratoriju (22).

INO-4800 je plazmidno DNA cjepivo koje je razvila tvrtka *Inovio Pharmaceuticals* (*Plymouth Meeting, PA, SAD*) za pretklinička ispitivanja u okviru modela COVID-19. Ovo DNA cjepivo koje kodira S protein isporučeno je elektroporacijom (22).

Moderna (*SAD*) razvila je mRNA (mRNA-1273) cjepivo inkapsulirano lipidnim nanočesticama (LNP); mRNA kodira glikoprotein S-2P antigena, koji je S2 podjedinica s dvije uzastopne supstitucije prolina na aminokiselinskim pozicijama 986 i 987. Cjepivo mRNA-1273 inducira anti-SARS-CoV-2 imunološki odgovor u prvoj dozi, a neutralizirajuća antitijela su povećana nakon druge primjene cjepiva. Odrasla populacija (iznad 18 godina) dobiva dozu cjepiva mRNK COVID-19 (npr. *Moderna ili Pfizer–BioNTech*) najmanje 5 mjeseci nakon posljednje doze cjepiva u rasporedu (22).

Cjepiva temeljena na virusnim vektorima korištena su u genskoj terapiji uključuju replicirajuće virusne vektore i virusne vektore koji se ne repliciraju. Humani adenovirus tip 26 i 5–Sputnik V Cjepivo Sputnik V temelji se na dva adenovirusna vektora: AD 26 i AD5. Razvio ga je Nacionalni centar za epidemiologiju i mikrobiologiju Gamaleya (Rusija). Sekvence koje kodiraju šiljasti protein SARS-CoV-2 umetnute su u svaki vektor; antigenski sastav AD 26 (prva doza, 0,5 mL) razlikuje se od antigenskog sastava AD 5 (druga doza, 0,5 mL) danog 21 dan kasnije (22).

Rekombinantni SARS-CoV-2 šiljasti protein proizveden u genetski modificiranim stanicama kukaca Sf9 korišten je kao cjepivo koje je razvio *Novavax* (*SAD*). Formulacija nanočestica s dodatkom Matrix-M1 na bazi saponina ugrađena je u modificirani protein ovog NVX-CoV2373 cjepiva. Primjena cjepiva sastoji se od dvije doze u intervalu od 21 dan. Idealna temperatura skladištenja je od 2 do 8 °C tijekom šest mjeseci, a cjepivo se može čuvati na −20 °C dvije godine. Ima učinkovitost od oko 86% protiv britanske varijante i 55% protiv južnoafričke varijante (22).

2. CILJ RADA

Rad je napravljeni u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, u Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku.

Ciljevi ovog rada su bili:

- Teorijski prikazati molekularnu građu, patogenezu, epidemiološke karakteristike i metode liječenja infekcije uzrokovane virusom SARS-cov-2
- Prikazati i detaljno objasniti trenutno dostupne dijagnostičke metode korištene za identifikaciju virusa i bolesti COVID-19 uzrokovane virusom SARS-COV-2
- Opisati i razjasniti dijagnostičku metodu koja se smatra zlatnim standardom u dijagnostici virusa SARS-Cov-2

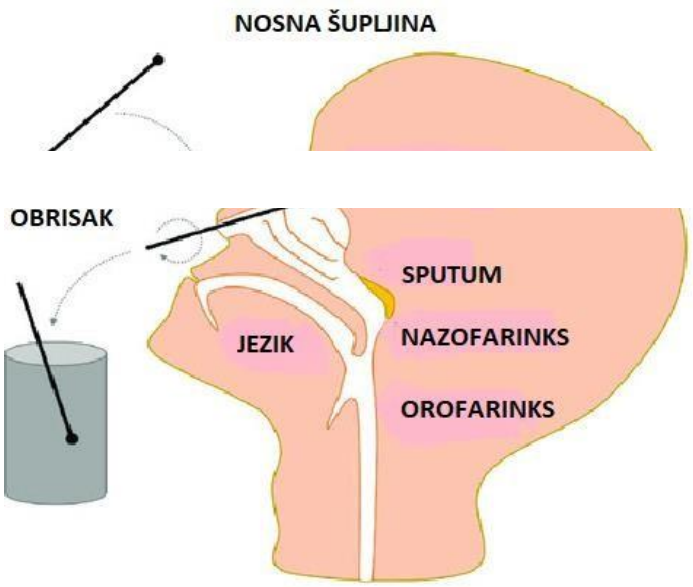
3. METODE

3.1. PREDANALITIKA

Prema smjernicama Europskog centra za sprečavanje i kontrolu bolesti (eng. *European Centre for Disease and Control* – ECDC) optimalni uzorak za detekciju trenutne infekcije uzrokovane virusom SARS-CoV-2 uzima se iz gornjeg respiratornog trakta, odnosno uzima se nazofaringealni obrisak, orofaringealni obrisak, nazofaringealni aspirat ili nazalni ispirak. U slučajevima kada je pacijent hospitaliziran ili je pod tretmanom intenzivne njege, alternativni uzorci mogu biti iz donjeg respiratornog trakta, odnosno koriste se uzorci bronhoalveolarne lavaže (BAL), endotrahealni aspirat ili ispljuvak sputuma. Također, slina se smatra prihvatljivim uzorkom kod testiranja na virus SARS-CoV-2 (23).

Svjetska zdravstvena organizacija u naputku za laboratorijsko testiranje virusa SARS-CoV-2 u zaraženim ljudima, sugerirala je i na druge, alternativne vrste uzoraka pogodnih za detekciju virusa. Sakupljeni uzorci stolice, urina i krvi smatraju se pogodnim materijalom za dijagnostiku iako trajanje i učestalost izlučivanja virusa SARS-CoV-2 u stolici i urinu nije dovoljno poznato. U slučaju pacijenata koji su preminuli, u obzir se uzima obdukcijski materijal uključujući plućno tkivo. U preživjelih bolesnika, upareni serum (akutni i rekonvalescentni) može biti koristan za retrospektivno definiranje slučajeva kada serološki testovi postanu dostupni (*24*).

Također, SZO navodi određene upute laboratorijima za pohranu uzoraka nakon uzorkovanja. Uzorciza otkrivanje virusa trebaju stići u laboratorij što je prije moguće nakon prikupljanja. Ispravno rukovanje uzorcima tijekom transporta je od krucijalne važnosti. Uzorci koji se ne mogu odmah dostaviti u laboratorij, mogu se pohraniti i otpremiti na 2-8 °C. Kada je vjerojatno da će doći do kašnjenja u dolasku uzoraka u laboratorij, strogo se preporučuje korištenje medija za prijenos virusa. Uzorci se mogu zamrznuti na – 20 °C ili idealno -70 °C i otpremiti na suhom ledu ako se očekuju daljnja odgađanja. Također je važno napomenuti da je potrebno izbjegavati ponovno zamrzavanje i odmrzavanje uzoraka (*24*).



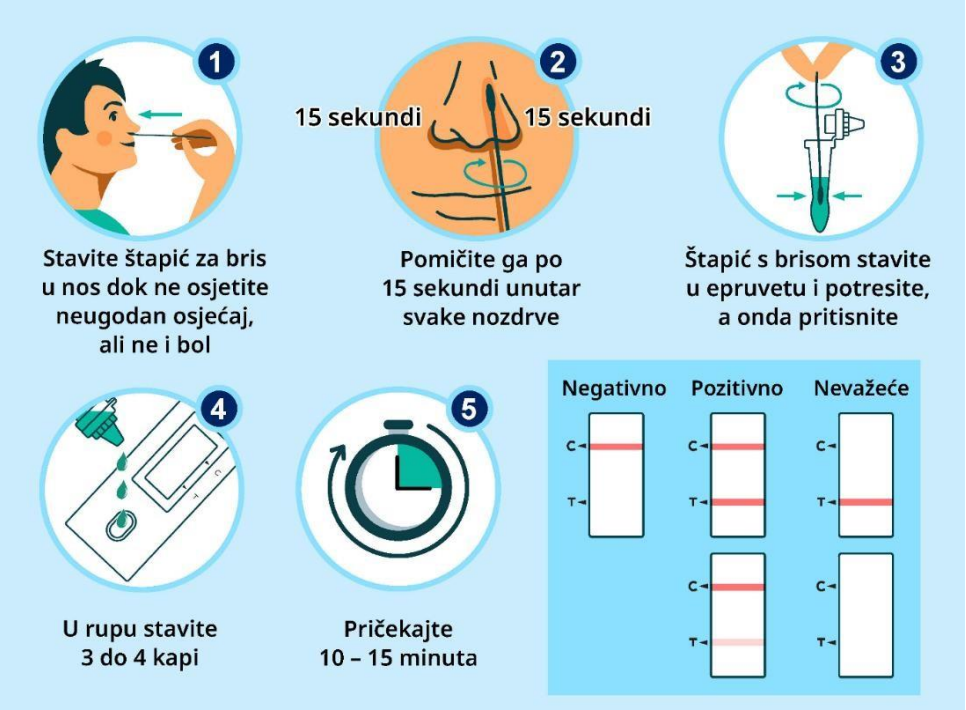
Slika 5 Shematski prikaz prikupljanja uzoraka iz gornjeg dišnog sustava. (preuzeto i dorađeno iz https://novel-coronavirus.onlinelibrary.wiley.com/novel-coronavirus-outbreak-oct-16)

3.2. BRZI ANTIGENSKI TEST

Komercijalni kitovi za brzi antigenski test (*eng. Rapid antigen tests*) pojavili su se kao važan alternativni alat za pomoću kliničkoj dijagnozi COVID-19. Brzi se antigenski test temelji na imunokromatografiji, koja koristi antitijela impregnirana na nitroceluloznim membranama, a koja stupaju u interakciju sa specifičnim antigenima iz uzorka pacijenta (25).

Interakcija antigen - protutijelo može se vizualizirati ručno ili korištenjem imunofluorescentnog strojnog čitača. Za dijagnozu COVID-19, ciljni antigen je često virusni nukleokapsidni protein (N). Slična strategija korištena je za brzo dijagnosticiranje HIV-a, malarije, gripe i drugih bolesti. To je relativno jeftin i jednostavan test s brzim rezultatima koji se može koristiti za testiranje na licu mjesta (25).

Slika 6 Upute za primjenu brzog antigenskog testa. (preuzeto i uređeno iz https://hrsale.2021cheapstore.ru/content?c=brzi%20antigen%20test&id=14)

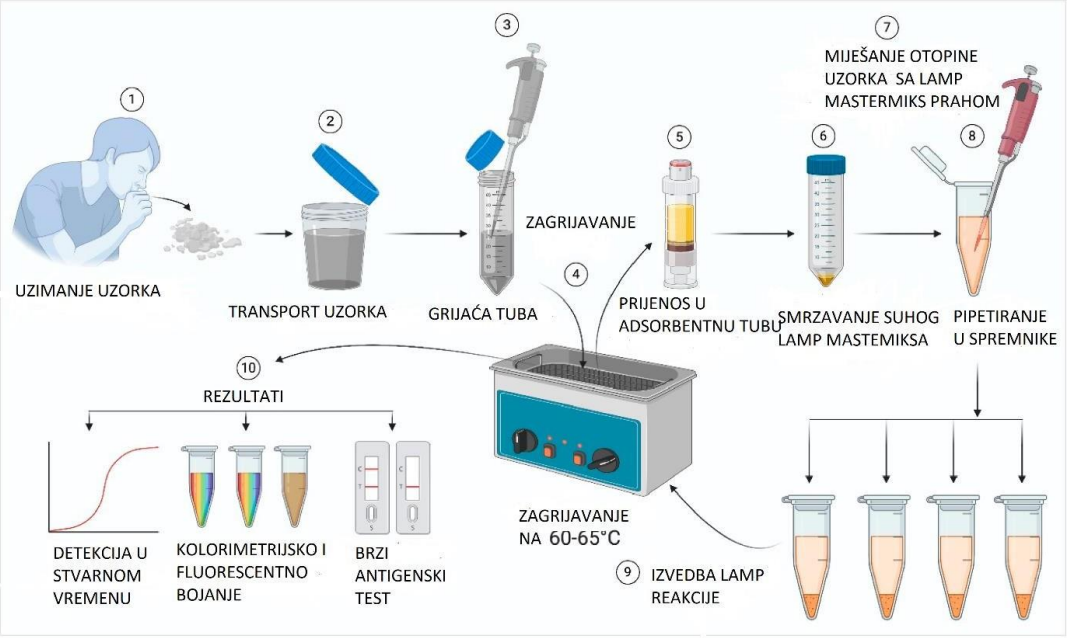


3.3. LAMP TEHOLOGIJA

Petljom posredovano izotermalno umnažanje (*engl., Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP*) brzi je, osjetljivi, specifičan i financijski isplativi test za dijagnostiku virusa SARS-CoV-2. Ovisno o uzorku, LAMP reakcija može biti izvedena u jednom ili u dva koraka. Reakcija izotermalne amplifikacije posredovane jednom korakom petlje sposobna je detektirati čak samo nekoliko kopija ciljnih sekvenci nukleinskih kiselina u izotermnim uvjetima (obično 60–65 °C) uz pomoć posebno dizajniranihskupova početnica. Detekcija RNK virusa zahtijeva dodatni enzim reverzne transkriptaze i ova metodau dva koraka se naziva reverzna transkriptaza LAMP (RT-LAMP) (26).

RT-LAMP tehnika može se izvesti u uvjetima niskih resursa te jednostavnim zagrijavanjem uzoraka i reagensa u jednoj reakcijskoj epruveti. Cijena LAMP-a po testu također je znatno niža od ostalih dostupnih molekularnih testova. Stoga se mnogi znanstvenici i istraživači usredotočuju na optimizaciju i modifikacije RT-LAMP metodologije kako bi ona odgovarala zahtjevima dijagnostike COVID-19 u laboratorijima s ograničenim resursima u zemljama u razvoju, gdje nekontrolirano i neotkriveno širenje COVID-19 može rezultirati nepredvidivim ishodom (26).

Glavne komponente LAMP reagensa sastoje se od seta soli, nukleotida, DNK polimeraze (koja katalizira sintezu komplementarnih lanaca s aktivnošću istiskivanja lanaca) i četiri do šest početnica uključujući dvije početnice petlje (petlja F i petlja B), naprijed i unatrag unutarnje početnice (FIP i BIP, redom) i dvije vanjske početnice (F3 i B3). Za detekciju RNK virusa potreban je i toplinski stabilni enzim reverzne transkriptaze kao dodatna komponenta (26).



Slika 7 Koraci u obradi uzorka za LAMP reakciju, obrada u vodenoj kupelji i detekcija amplikona (preuzeto i dorađeno iz:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7464797/pdf/biology-09-00182.pdf)

3.4. CRISPR TEHNOLOGIJA

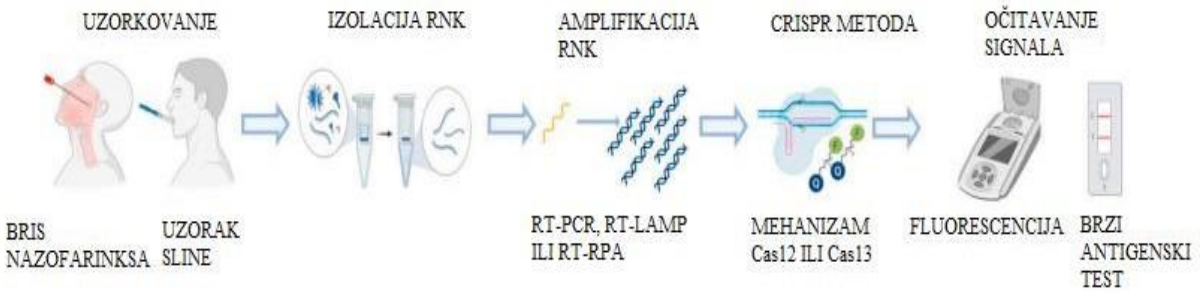
Kratka razdvojena grupirana palindromska ponavljanja (*eng., Clustered Regulary InterspacedShort Palindromic Repeats – CRISPR*) naziv je za novu tehnologiju uređivanja gena, trenutno korištenu za rapidnu detekciju virusa SARS-CoV-2.

CRISPR i njegov pridruženi proteinski sustav, Cas, sastoje se od alata za uređivanje genoma koji može istovremeno ciljati više genomskih lokusa. Ovaj *in vivo* alat za uređivanje intenzivno se koristi za proučavanje funkcije gena i izvođenje genomske manipulacije. Trenutno se koristi Cas sustav za detekciju koronavirusa (27).

Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking (*SHERLOCK*) koristi molekulu CRISPR za detekciju genetskog potpisa SARS-CoV-2 u brisevima nosa, nazofaringealnim i orofaringealnim brisevima ili uzorcima bronhoalveolarne lavaže (BAL). (Datta et al., 2021) U ovoj je tehnici protein Cas13 korišten za detekciju amplificiranog produkta gena S ili ORF1a/b virusa SARS-CoV-2. Aktivnost Cas13 proteina se koristi za rezanje RNK reporterskih oznaka,koje zatim oslobađaju fluorescentni signal (18).

Druga CRISPR tehnika, *SARS-CoV-2 DNA Endonuclease Targeted CRISPR Trans Reporter* (*DETECTR*), temelji se na očitavanju signala na brzom antigenskom testu. Test kombinira izotermalnu primjenu posredovanu petljom reverzne transkripcije (RT-LAMP), detekciju temeljenu na CRISPR-Cas12 i očitavanje na traci bočnog protoka, odnosno brzom antigenskomtestu (18).

Testovi temeljeni na CRISPR-u su upotreba liofiliziranih reagensa i mogućnosti izvođenja testova izravno na neobrađenim uzorcima.



Slika 8 Shematski prikaz dijagnostičkog procesa CRISPR tehnologije od uzorkovanja do očitavanja signala (Preuzeto i dorađeno sa: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33497879/)

Nedavno je izumljena nova verzija CRISPR tehnologije, modificirana verzija SHERLOCK-a, nazvana *SHERLOCKv2*. Ovaj višestruki CRISPRS-Cas13 test može otkriti četiri cilja u jednoj reakciji. To se postiže korištenjem različitih preferencija cijepanja različitih Cas13 enzima na homopolimernim reporterima. Multipleksirani testovi mogu biti korisni za identifikaciju potencijalnih lažno negativnih rezultata testa (18).

Ovi testovi su jednostavniji, jeftiniji i imaju kraće vrijeme obrade. Potrebna je integracija CRISPR testova s pripremom uzorka u automatiziranom POC (*eng. Point of Care*) formatu kojikoristi liofilizirane reagense, što će uvelike poboljšati kliničku korisnost CRISPR-a za pandemiju COVID-19 kao alternative RT-PCR-u (18).

3.5. REAKCIJA LANČANE POLIMERAZE REVERZNE TRANSKRIPCIJE

Reakcija lančane polimeraze reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (rRT – PCR) tip je amplifikacijskog testa nukleinskih kiselina (*eng., NAAT – Nucleic Acid Amplification test*). (Rai et al., n.d.) . rRT – PCR smatra se zlatnim standardom u detekciji virusa SARS-CoV-2, a temelji se na tome da se genetski materijal prvo ekstrahira iz uzoraka pacijenata, te se potom koristi reverzna transkriptaza za izradu komplementarnog DNK lanca iz virusne RNK. Selektivno umnažanje ciljne nukleinske kiselineiz uzorka postiže se dizajniranjem prednjih i obrnutih početnica specifičnih za ciljne strane interesnih regija (*eng. Regions of interest, ROI*) koje su jedinstvene za genom SARS-CoV-2: otvoreni okvir za čitanje replikaze (ORF1a/b),šiljkasti protein (S), protein ovojnice (E), membranski protein (M) i protein nukleokapside (N) (28).

Ciljni gen SARS-CoV-2 rRT-PCR uvelike varira. Smjernice u vezi s ciljnim genima za otkrivanje SARS-CoV-2 razlikuju se diljem svijeta. S pojavom virusa SARS-CoV-2, Svjetska zdravstvena organizacija preporučila je protokole usmjerene na E gen za probir i RdRp gen za potvrdno testiranje. Među ciljnim genima razvijenih SARS-CoV-2 rRT-PCR testova, N gen je najčešće odabran ciljni gen osim ORF1a/b, dok je S gen najrjeđe odabran ciljni gen (29).

RT-PCR općenito uključuje četiri koraka:

1. lizu SARS-CoV-2 u uzorku,

2. pročišćavanje virusne RNK,

3. reverznu transkripciju u komplementarnu DNK (cDNK) i pojačanje specifičnih regija cDNK,

4. optičku detekciju umnožene cDNA.

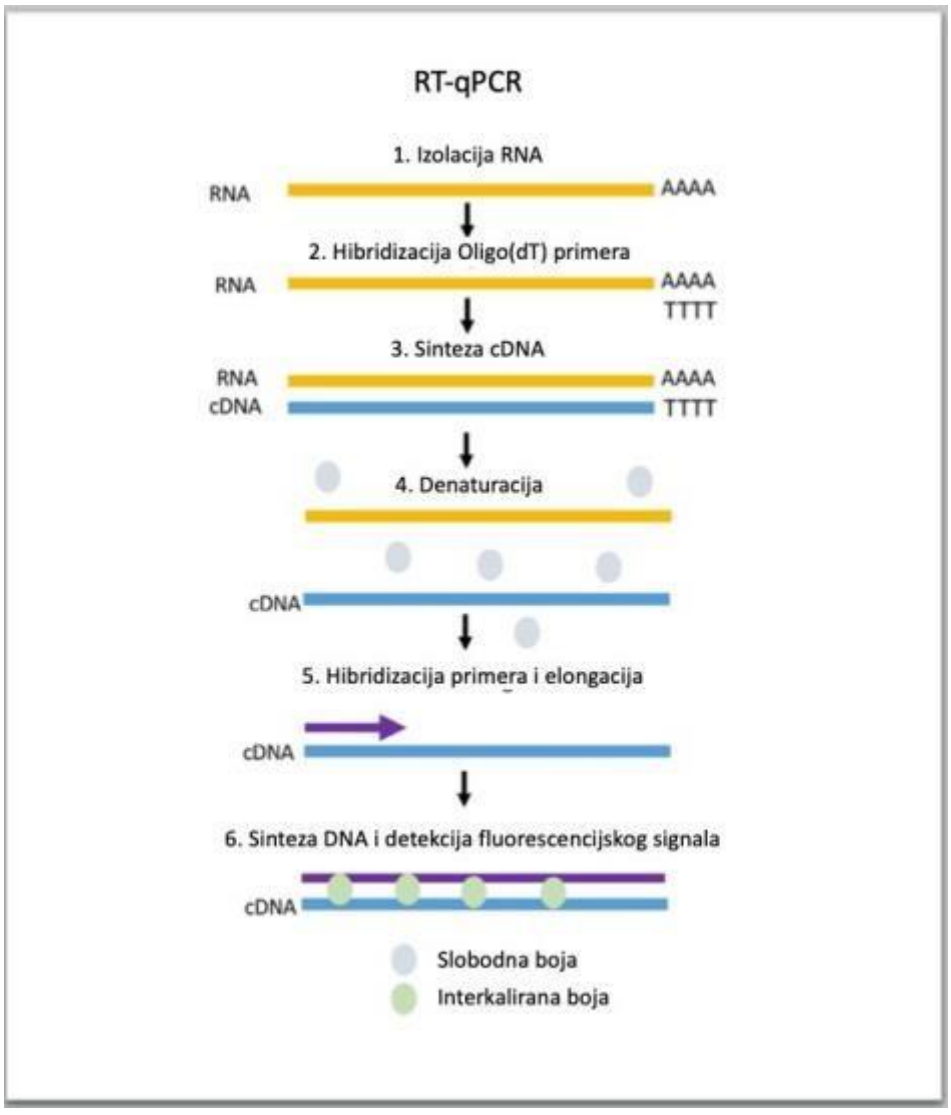
Razvoj RT-PCR testova za novi virus kao što je SARS-CoV-2 uključuje sekvenciranje genoma i dizajn početnica i sondi. Razvijen je niz RT-PCR testova koji koristerazličite setove početnica/sondi. Takvi testovi koriste različite skupove početnica/sondi koji ciljaju različite regije genoma SARS-CoV-2 (18).

RT-PCR je vrlo osjetljiv i može detektirati infekciju na minimalnim razinama patogena prisutnog u uzorku pacijenta. To je tehnika temeljena na nukleinskoj kiselini koja se koristi za pojačavanje ciljnog gena/nukleotida prisutnog u uzorku, što pomaže u otkrivanju specifičnog patogena i njegovom razlikovanju od drugih srodnih patogena. Obično postoje dva moguća načina izvođenja RT-PCR-a, uključujući analizu u jednom ili dva koraka. Test u jednom koraku konsolidira reverznu transkripciju i PCR amplifikaciju u jednoj epruveti, čime proces otkrivanja postaje brz i ponovljiv; međutim, ovaj test daje nižu ciljnu generaciju amplikona. U slučaju testa u dva koraka, reakcije se provode uzastopno u dvije odvojene epruvete, što ga čini vremenski zahtjevnim, ali osjetljivim testom u usporedbi s formatom testa u jednom koraku (30).

Osjetljivost i specifičnost RT-qPCR-a uvelike se oslanja na stručnost pojedinca koji provodi analizu i

kvalitetu RNK uzoraka prikupljenih iz donjeg i gornjeg dišnog puta. RT-qPCR uzorkovanje oslanja se na briseve orofarinksa (OFB), slinu ili nazofaringealne briseve (NFB) za potvrdno otkrivanje koronavirusa, a rezultati su potvrdili bolju točnost s uzorcima NPS u usporedbi s OPS ili slinom.

Većina zaraženih pojedinaca ostaje asimpatomatska tijekom razdoblja inkubacije virusa. Nakon što virus izađe iz razdoblja inkubacije, prikupljanje uzorka i obrada ključni su jer će osjetljivost RT-qPCR-a ovisiti o količini virusa. Granica detekcije (LoD), definirana kao najniža ciljna količina koju bilo koji analitički test može otkriti, mehanizam je za procjenu učinkovitost kitova za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa (27).

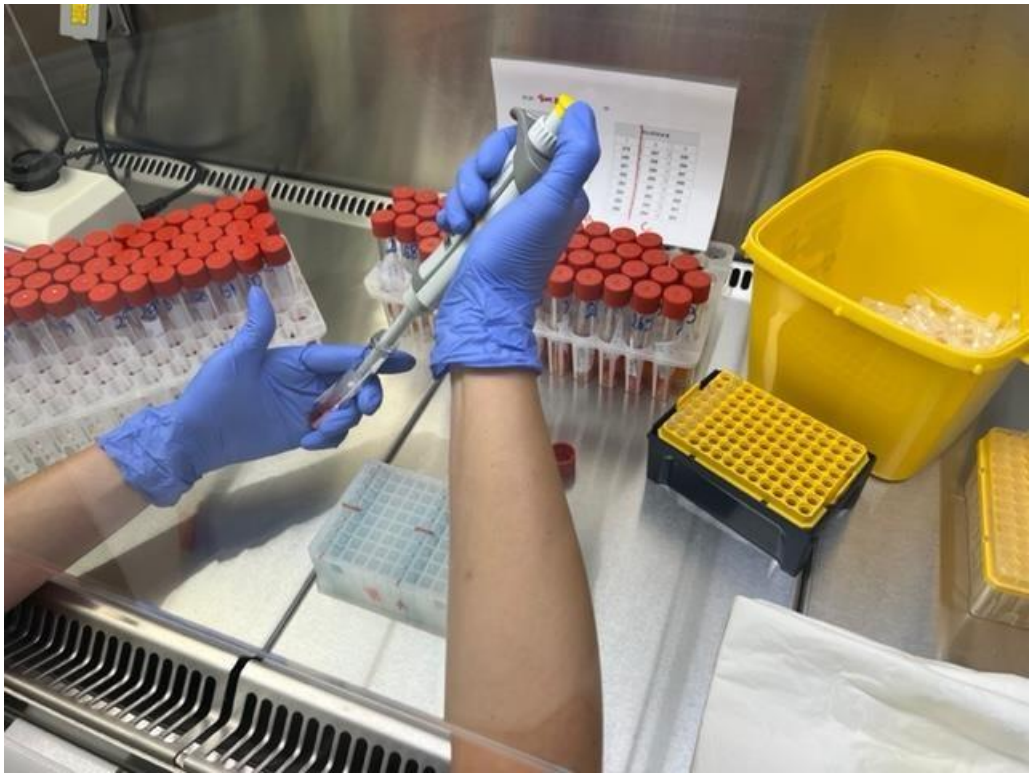


Slika 9 Shematski prikaz koraka RT-qPCR reakcije (Preuzeto sa prezentacije: Principi kvantitativne analize genetičkih varijanti Kvantitativni PCR (QPCR), Doc. dr. sc. Marina Degoricija)

Lančana reakcija polimerazom molekularna je metoda koja omogućava umnažanje male količine DNK predloška u količine koje su dostatne za dijagnostičku detekciju, u pet koraka.

Nakon uzorkovanja, prvi sljedeći korak za obradu PCR reakcije je **izolacija RNK**. Izolacija se temelji na principu da se manualnim radom u jažice namijenjene za to ispipetira 200µL uzorka u digestoru te se pohranjeni uzorci stavljaju u uređaj *GeneRotex 96* na vremensko razdoblje između 15-30 minuta.

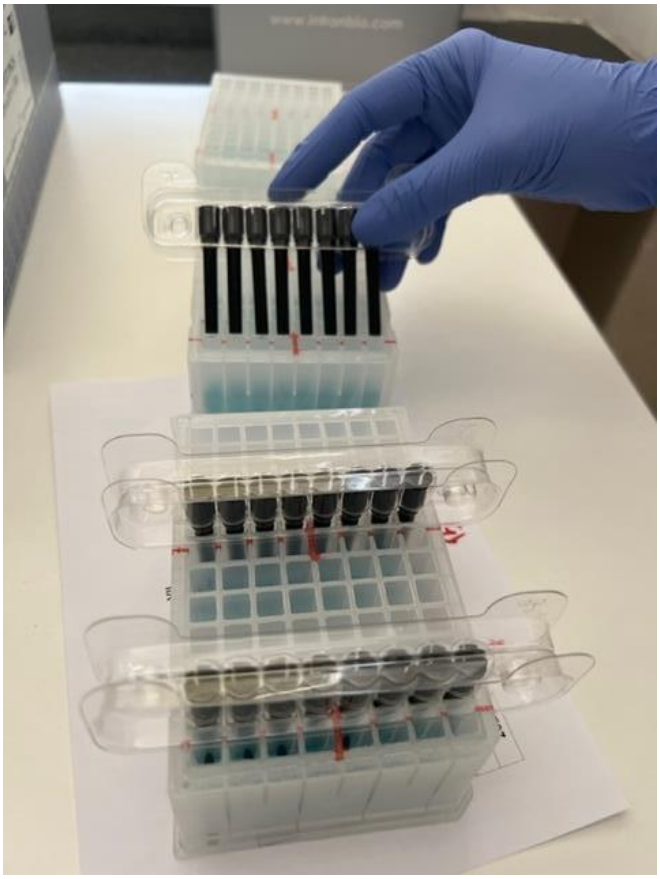
GeneRotex 96 potpuno je automatiziran ekstraktor, odnosno izolator nukleinskih kiselina. Radi na principu takvom da se magnetska šipka umeće u jažicu koja sadrži uzorke, zaštićena rukavcem za miješanje. Navlaka za miješanje brzo i opetovano miješa tekućinu kako bi se osiguralo potpuno miješanje tekućine i magnetskih kuglica. Nakon stanične lize, nukleinske adsorpcije, ispiranja i eluiranja, dobiva se kiselina visoke čistoće. *GeneRotex 96* opremljen magnetskom glavom koja sadrži niz od 96 magnetskih štapića, što mu omogućuje istodobnu obradu 96 uzoraka (31).



Slika 10 Pipetiranje 200uL uzorka u jažice (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)



Slika 11 Sigurnosni kabinet za pripremu uzoraka (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)



Slika 13 Umetanje nastavaka za brzu izolaciju u jažice (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)



Slika 12 GeneRotex 96 automatizirani izolator nukleinskih kiselina (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)

Nakon izolacije RNK, sljedeći korak je **apliciranje RT-PCR master miksa automatiziranim robotom** Myra bms. Postupak se sastoji od koraka:

- Pripreme reagensa za izvođenje testa zajedno sa pozitivnom i negativnom kontorolom
- Pripreme tuba za svaki Master Miks regens i kontrole
- Računalne naredbe i programiranja robotu Myra bms za pipetiranje i kalibraciju na točnim pozicijama
- Pipetiranje reakcijske smjese u mikrotitarsku pločicu



Slika 15 Robot za rukovanje tekućinom, myra bms (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)



Slika 14 LiliF COVID-19 Multi RT-PCR kit (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)

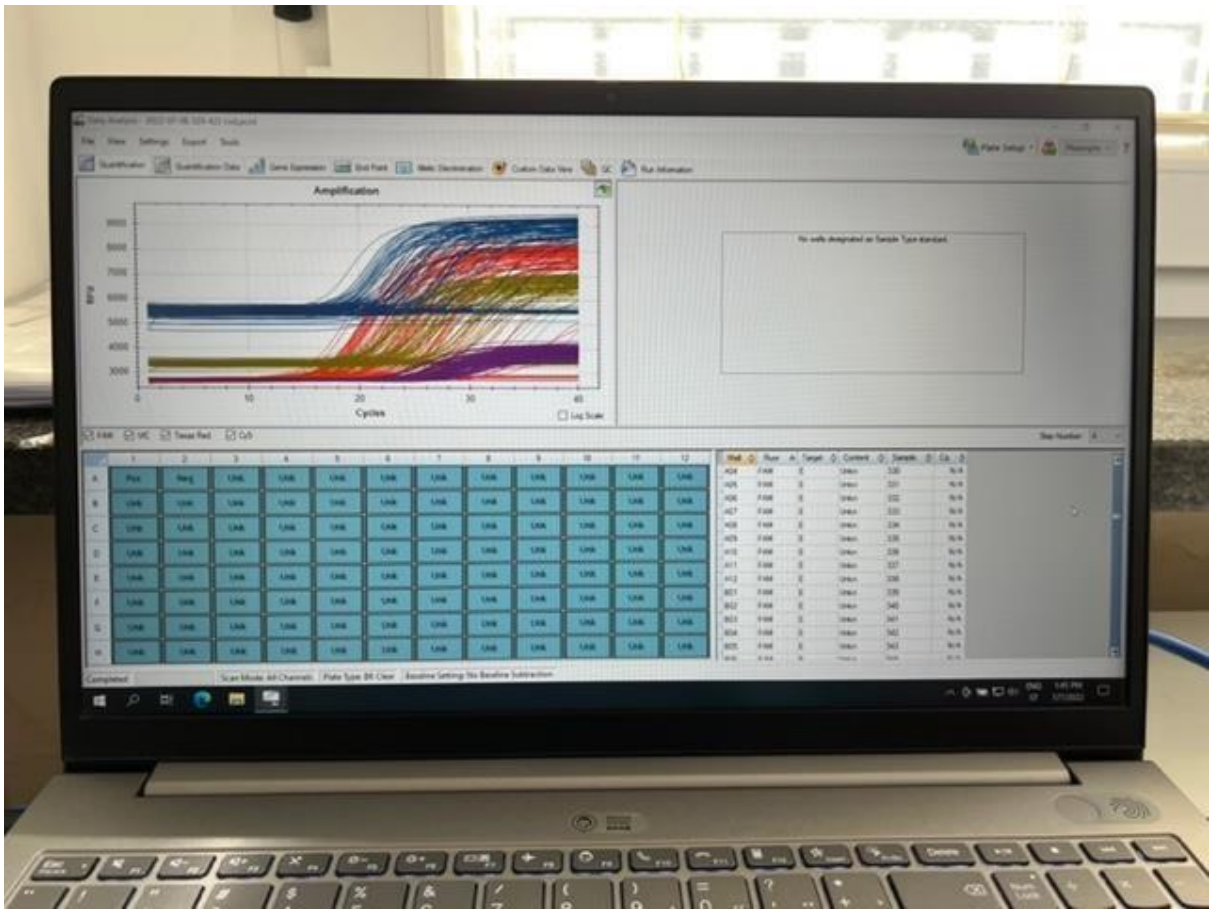
Završni korak prije same interpretacije nalaza jest **upis podataka i postava jažice u RT-PCR uređaj** BIO-RAD CFX96 toplinski ciklus C1000.

CFX96 Touch Real-Time PCR sustav je fleksibilan i precizan PCR instrument u stvarnom vremenu. Njegova nenadmašna izvedba termalnog ciklusa i inovativni optički dizajn proizvode točne i pouzdane podatke. Snažan i intuitivan softver ubrzava svaki korak PCR istraživanja u stvarnom vremenu, skraćujući vrijeme između početka i dobivanja rezultata (32).

RT-PCR uređaj *CFX96 BIO-RAD* sposoban je detektirati i kvantificirati četiri cilja istovremeno. E gen označen FAM bojom, N gen označeni bojom Texas Red, RdRp gen označen bojom VIC te Endogenu internu kontrolu IPC = GADPH koja je uključena u komplet za provjeru uzorkovanja i izolacije virusne RNA označene bojom Cy5. Korištene boje su fluorofori, kemijski spojevi koji mogu emitirati apsorbiranu svjetlost kada su u pobuđenom stanju.

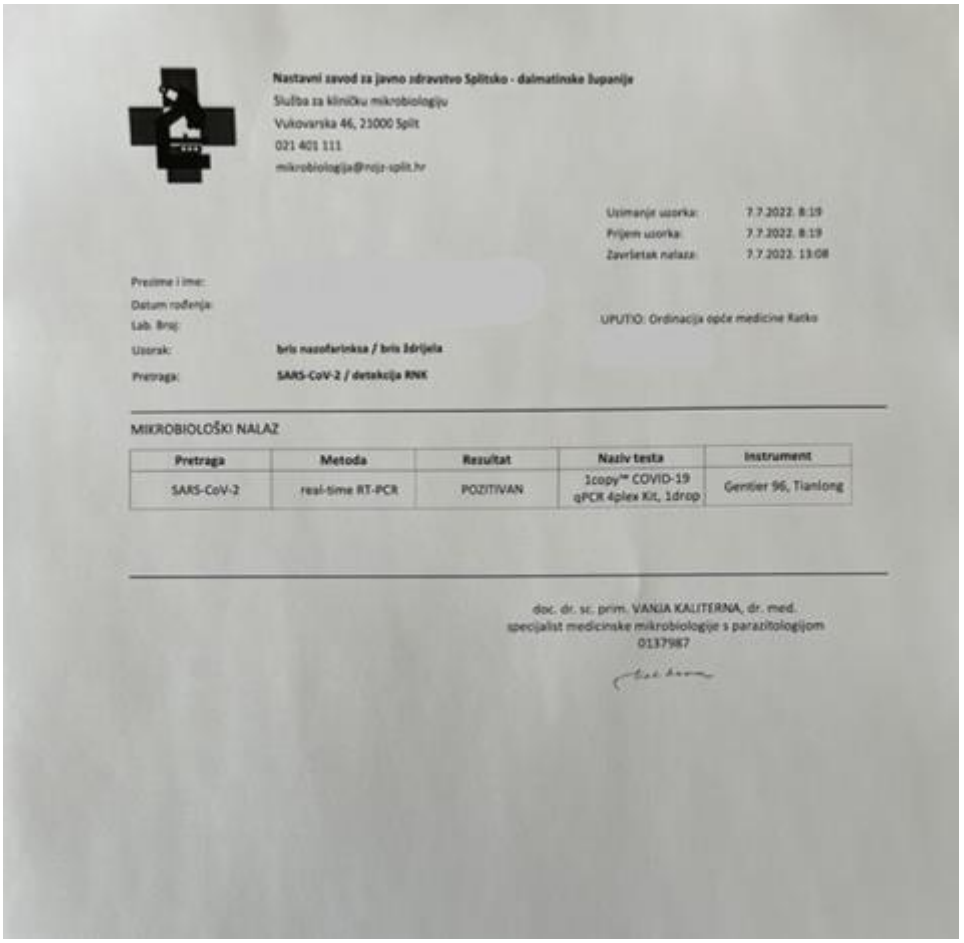


Slika 16 Uređaj BIO-RAD CFX96 (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ,2022.)



Slika 17 Prikaz amplifikacijske krivulje umnoženih uzoraka na uređaju BIO-RAD CFX96 (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ, 2022.)

Po završetku laboratorijske obrade na infekciju uzrokovanu virusom SARS-CoV-2, posljednji korak je izdavanje nalaza. Prema računalnim podacima prikazanih *RT-PCR CFX96* uređajem izdaje se nalaz sukladno dobivenim podacima. Ukoliko su sva četiri gena pozitivna izdaje se pozitivan na SARS-CoV-2 rezultat, ako su samo dva gena pozitivna, liječnik odlučuje o fazi infekcije i određuje je li nalaz pozitivan ili negativan, a ako niti jedan gen nije pozitivan, izdaje se nalaz negativan na virus SARS-CoV-2.



Nastavni zavod za javno zdravstvo Splitsko - dalmatinske županije
Služba za kliničku mikrobiologiju
Vukovarska 46, 21000 Split
021 401 111
mikrobiologija@nzjz-split.hr

Uzimanje uzorka: 7.7.2022. 8:19
Prijem uzorka: 7.7.2022. 8:19
Završetak nalaza: 7.7.2022. 13:08

Prezime i ime:
Datum rođenja:
Lab. Broj:
Uzorak: **bris nazofarinksa / bris ždrijela**
Pretraga: **SARS-CoV-2 / detekcija RNK**

UPUTIO: Ordinacija opće medicine Katko

MIKROBIOLOŠKI NALAZ

Pretraga	Metoda	Rezultat	Naziv testa	Instrument
SARS-CoV-2	real-time RT-PCR	POZITIVAN	1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit, 1drop	Gentier 96, Tianlong

doc. dr. sc. prim. VANJA KALITERNA, dr. med.
specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom
0137987

Slika 18 Prikaz gotovog nalaza, pozitivnog na virus SARS-CoV-2 (Nastavni zavod za javno zdravstvo SDŽ.2022.)

4. ZAKLJUČAK

Bolest COVID-19 uzrokovana je novim patogenim virusom nazvanim SARS-CoV-2 prvo otkrivenim 2019. godine u Kini u gradu Wuhanu. Brzom evolucijom virusa javile su se i nove mutirane vrste nazvane prema slovima grčkog alfabeta: *alfa, beta, gamma, delta i omicron*. Ovisno o mutiranom soju virusa razlikovali su se i simptomi.

Glavne kliničke manifestacije infekcije uzrokovane virusom SARS-CoV-2 spadaju u simptome respiratornog sustava. Uz respiratorne simptome kao što su suhi kašalj, upala pluća i sinusitis, uočeni sui gastrointestinalni i sistemski simptomi.

Unatoč brojnim istraživačkim radovima o novom virusu, podataka o SARS-CoV-2 još uvijek nema dovoljno za točne informacije o porijeklu virusa, načinu transmisije i štete koje radi na čovjeka.

Identifikacija SARS-CoV-2 pomoću tehnika sekvenciranja bila je veliki napredak jer je njegova identifikacija omogućila znanstvenicima da napreduju u dijagnostici i terapijskim studijama. Sekvenciranjem pozitivnih uzoraka olakšala se daljnja dijagnostika mutiranih sojeva virusa.

Kao i kod drugih respiratornih virusa, glavni test za dijagnostiku COVID-19 bolesti je detekcija SARS-CoV-2 u respiratornim uzorcima pomoću testova amplifikacije nukleinske kiseline, uglavnom uz pomoć lančane reakcije polimeraze reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (rRT-PCR). RT-PCR smatra se „zlatnim standardom“ u otkrivanju novonastalog virusa.

Uz amplifikacijske testove, napretkom tehnologije proizašle su i nove metode detekcije i identifikacije uzročnika bolesti COVID-19. Za detekciju virusnog antigena koriste se komercijalni, brzi antigenski testovi, dok se ispitivanjem jakosti imunološkog odgovora od infektivnog agensa bavi serologija. Jeftini brzi testovi cilj su svakog laboratorija, a posebno u zemljama u razvoju gdje se najviše koriste LAMP tehnologija, odnosno RT-LAMP i CRISPR tehnologija, odnosno SHERLOCK i DETECTR.

Unatoč različitim izazovima, razni, trenutno dostupni, ali inovi dijagnostički alati će i dalje igrati ključnu i komplementarnu ulogu u upravljanju različitim stadijima pandemije COVID-19 koja traje još i danas.

5. LITERATURA

1. Presečki V. Virologija, Zagreb: Medicinska naklada, 1994.
2. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Nat Rev Microbiol. 2021 Mar;19(3):155-170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6. Epub 2020 Oct 28. PMID: 33116300; PMCID: PMC7592455.
3. Kirtipal N, Bharadwaj S, Kang SG. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. Infect Genet Evol. 2020 Nov;85:104502. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32798769; PMCID: PMC7425554.
4. Vacaflores Salinas A, Ashavaid T, Payne DA, Linder MW, Baluchova K, Pan S, Huggett J, Ahmad-Nejad P; IFCC Committee for Molecular Diagnostics C-MD. Molecular diagnostics of SARS-CoV-2: Findings of an international survey. Clin Chim Acta. 2022 Jun 1;531:237-242. doi: 10.1016/j.cca.2022.04.007. Epub 2022 Apr 9. PMID: 35413298; PMCID: PMC8994408.
5. Shah M, Woo HG. Molecular Perspectives of SARS-CoV-2: Pathology, Immune Evasion, and Therapeutic Interventions. Mol Cells. 2021 Jun 30;44(6):408-421. doi: 10.14348/molcells.2021.0026. PMID: 34059561; PMCID: PMC8245319.
6. Kadam SB, Sukhramani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. J Basic Microbiol. 2021 Mar;61(3):180- 202. doi: 10.1002/jobm.202000537. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33460172; PMCID: PMC8013332.
7. Hatmal MM, Alshaer W, Al-Hatamleh MAI, Hatmal M, Smadi O, Taha MO, Oweida AJ, Boer JC, Mohamud R, Plebanski M. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2. Cells. 2020 Dec 8;9(12):2638. doi: 10.3390/cells9122638. PMID: 33302501; PMCID: PMC7763676.
8. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease(COVID-19) outbreak. J Autoimmun. 2020 May;109:102433. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102433. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32113704; PMCID: PMC7127067.

9. Wang B, Zhang L, Wang Y, Dai T, Qin Z, Zhou F, Zhang L. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: potential mechanisms and therapeutic interventions. Signal Transduct Target Ther. 2022 Apr 29;7(1):143. doi: 10.1038/s41392-022-00986-0. PMID: 35487886; PMCID: PMC9052735.
10. Lei HY, Ding YH, Nie K, Dong YM, Xu JH, Yang ML, Liu MQ, Wei L, Nasser MI, Xu LY, Zhu P, Zhao MY. Potential effects of SARS-CoV-2 on the gastrointestinal tract and liver. Biomed Pharmacother. 2021 Jan;133:111064. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111064. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33378966; PMCID: PMC7700011.
11. Natarajan A, Zlitni S, Brooks EF, Vance SE, Dahlen A, Hedlin H, Park RM, Han A, Schmidtke DT, Verma R, Jacobson KB, Parsonnet J, Bonilla HF, Singh U, Pinsky BA, Andrews JR, Jagannathan P, Bhatt AS. Gastrointestinal symptoms and fecal shedding ofSARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection. Med (N Y). 2022 Jun 10;3(6):371-387.e9. doi: 10.1016/j.medj.2022.04.001. Epub 2022 Apr 13. PMID:35434682; PMCID: PMC9005383.
12. Kumar A, Prasoon P, Kumari C, Pareek V, Faiq MA, Narayan RK, Kulandhasamy M, Kant K. SARS-CoV-2-specific virulence factors in COVID-19. J Med Virol. 2021 Mar;93(3):1343-1350. doi: 10.1002/jmv.26615. Epub 2020 Nov 1. PMID: 33085084.
13. Singh J, Pandit P, McArthur AG, Banerjee A, Mossman K. Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants. Virol J. 2021 Aug 13;18(1):166. doi: 10.1186/s12985-021-01633-w. PMID: 34389034; PMCID: PMC8361246.
14. https://covid19.who.int
15. Choi JY, Smith DM. SARS-CoV-2 Variants of Concern. Yonsei Med J. 2021 Nov;62(11):961-968. doi: 10.3349/ymj.2021.62.11.961. PMID: 34672129; PMCID: PMC8542474.
16. Araf Y, Akter F, Tang YD, Fatemi R, Parvez MSA, Zheng C, Hossain MG. Omicron variantof SARS-CoV-2: Genomics, transmissibility, and responses to current COVID-19

vaccines. J Med Virol. 2022 May;94(5):1825-1832. doi: 10.1002/jmv.27588. Epub 2022Jan 23. PMID: 35023191; PMCID: PMC9015557.

17. Uddin M, Mustafa F, Rizvi TA, Loney T, Suwaidi HA, Al-Marzouqi AHH, Eldin AK, Alsabeeha N, Adrian TE, Stefanini C, Nowotny N, Alsheikh-Ali A, Senok AC. SARS-CoV-2/COVID-19: Viral Genomics, Epidemiology, Vaccines, and Therapeutic Interventions. Viruses. 2020 May 10;12(5):526. doi: 10.3390/v12050526. PMID: 32397688; PMCID: PMC7290442.
18. Jayamohan H, Lambert CJ, Sant HJ, Jafek A, Patel D, Feng H, Beeman M, Mahmood T, Nze U, Gale BK. SARS-CoV-2 pandemic: a review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages andlimitations. Anal Bioanal Chem. 2021 Jan;413(1):49-71. doi: 10.1007/s00216-020-02958-1. Epub 2020 Oct 18. PMID: 33073312; PMCID: PMC7568947.
19. Drożdżal S, Rosik J, Lechowicz K, Machaj F, Szostak B, Przybyciński J, Lorzadeh S, KotfisK, Ghavami S, Łos MJ. An update on drugs with therapeutic potential for SARS-CoV-2 (COVID-19) treatment. Drug Resist Updat. 2021 Dec;59:100794. doi: 10.1016/j.drup.2021.100794. Epub 2021 Dec 9. PMID: 34991982; PMCID: PMC8654464.
20. Raman R, Patel KJ, Ranjan K. COVID-19: Unmasking Emerging SARS-CoV-2 Variants, Vaccines and Therapeutic Strategies. Biomolecules. 2021 Jul 6;11(7):993. doi: 10.3390/biom11070993. PMID: 34356617; PMCID: PMC8301790.
21. Cronin JN, Camporota L, Formenti F. Mechanical ventilation in COVID-19: A physiological perspective. Exp Physiol. 2022 Jul;107(7):683-693. doi: 10.1113/EP089400.Epub 2021 Sep 27. PMID: 34541721; PMCID: PMC8667647.
22. Simões RSQ, Rodríguez-Lázaro D. Classical and Next-Generation Vaccine Platforms to SARS-CoV-2: Biotechnological Strategies and Genomic Variants. Int J Environ Res PublicHealth. 2022 Feb 18;19(4):2392. doi: 10.3390/ijerph19042392. PMID: 35206580; PMCID:PMC8877900.
23. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Methods-for-the-detection-and-characterisation-of-SARS-CoV-2-variants-first-update.pdf
24. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331501/WHO-COVID-19-laboratory-2020.5-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
25. Khalid MF, Selvam K, Jeffry AJN, Salmi MF, Najib MA, Norhayati MN, Aziah I. Performance of Rapid Antigen Tests for COVID-19 Diagnosis: A Systematic Review and

Meta-Analysis. Diagnostics (Basel). 2022 Jan 4;12(1):110. doi: 10.3390/diagnostics12010110. PMID: 35054277; PMCID: PMC8774565.

26. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. Biology (Basel). 2020 Jul 22;9(8):182. doi: 10.3390/biology9080182. PMID: 32707972; PMCID: PMC7464797.
27. Datta M, Singh DD, Naqvi AR. Molecular Diagnostic Tools for the Detection of SARS- CoV-2. Int Rev Immunol. 2021;40(1-2):143-156. doi: 10.1080/08830185.2020.1871477. Epub 2021 Jan 13. PMID: 33439059.
28. Chau CH, Strope JD, Figg WD. COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. Pharmacotherapy. 2020 Aug;40(8):857-868. doi: 10.1002/phar.2439. PMID: 32643218; PMCID: PMC7361586.
29. Kim HN, Yoon SY, Lim CS, Yoon J. Comparison of three molecular diagnostic assays forSARS-CoV-2 detection: Evaluation of analytical sensitivity and clinical performance. J Clin Lab Anal. 2022 Feb;36(2):e24242. doi: 10.1002/jcla.24242. Epub 2022 Jan 12. PMID:35019184; PMCID: PMC8842162.
30. Islam KU, Iqbal J. An Update on Molecular Diagnostics for COVID-19. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Nov 10;10:560616. doi: 10.3389/fcimb.2020.560616. PMID: 33244462; PMCID: PMC7683783.
31. https://img.waimaoniu.net/2458/Service%20Manual%20for%20Tianlong%20Nucleic%20Acid%20Extraction%20System%20-GeneRotex%2096.pdf
32. https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6093.pdf

6. SAŽETAK

Molekularna dijagnostika virusa SARS-CoV-2

Uvod: Koronavirusi jednolačani su pozitivno nabijeni RNK virusi genomske veličine od 29,891 kb upakirani u kružnu proteinsku ovojnicu građenu u obliku krune. Proteinsku ovojnicu čine proteini S, E, M i N. Prema patogenosti koronavirusi spadaju u skupinu virusa koja napada dišni sustav u čovjeka sa glavnim kliničkim manifestacijama poput suhog kašlja, pneumonije i zaduhe. Bolest uzrokovana SARS-CoV-2 virusom naziva se Koronavirus-19 ili COVID-19. Prema težini bolesti infekcija uzrokovana virusom SARS-CoV-2 dijeli se na blagu, tešku i kroničnu bolest. 11.03.2022. Svjetska Zdravstvena Organizacija proglasila je postojanje treće pandemije koronavirusima, druge po redu koja uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom, a pandemija traje i danas. U ovom radu prikazane su trenutno dostupne metode u dijagnostici virusa SARS-CoV-2: LAMP test, CRISPR test, brzi antigenski test, serološka metoda testiranja te trenutačni „zlatni standard“ Reakcija lančane polimeraze reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (rRT – PCR)

Ciljevi: Ciljevi ovog rada bili su teorijski prikazati građu uzročnika bolesti COVID-19, patogenezu i epidemiologiju bolesti te trenutne dostupne metode liječenja i dijagnostičkih tehnika

Metode: Glavna tehnika za detekciju i kvantifikaciju virusa SARS-CoV-2 i njegovih mutiranih sojeva jest Reakcija lančane polimeraze reverzne transkripcije u stvarnom vremenu (rRT – PCR) koja koristi obrisak gornjeg dišnog sustava (nazofaringealni, orofaringealni bris, nazalni obrisak ili uzorak sline) kao uzorak za laboratorijsku dijagnostiku.

Zaključak: Bolest COVID-19 uzrokovana patogenom SARS-CoV-2 trenutačna je pandemija u Svijetu. Kako bi se brzina virulencije patogena i brzina transmisije među čovjekom što brže reducirala potrebna je brza i učinkovita laboratorijska dijagnostika i učinkovita farmakološka terapija. Od trenutno dostupnih dijagnostičkih metoda u detekciji infektivnog agensa SARS-CoV-2 virusa najboljom se smatra RT-qPCR, a dok je za otkrivanje novih sojeva veličanstveno otkriće sekvenciranje genoma koronavirusa.

7. SUMMARY

Molecular diagnostics of the SARS-CoV-2 virus

Introduction: Single-stranded coronaviruses are positively charged RNA viruses with a genome size of 29,891 kb packed in a circular crown-shaped protein envelope. The protein envelope consists of proteins S, E, M and N. According to their pathogenicity, coronaviruses belong to a group of viruses that attack the respiratory system in humans with the main clinical manifestations such as dry cough, pneumonia and shortness of breath. The disease caused by the SARS-CoV-2 virus is called Coronavirus-19 or COVID-19. According to the severity of the disease, the infection caused by the SARS-CoV-2 virus is divided into mild, severe and chronic disease. 11.03.2022. The World Health Organization declared the existence of the third coronavirus pandemic, the second in order to cause severe acute respiratory syndrome, and the pandemic continues today. This paper presents the currently available methods in the diagnosis of the SARS-CoV-2 virus: LAMP test, CRISPR test, rapid antigen test, serological testing method and the current "gold standard" Reverse transcription polymerase chain reaction in real time (rRT - PCR).

Objectives: The objectives of this paper were to theoretically present the structure of the causative agent of the disease COVID-19, the pathogenesis and epidemiology of the disease, as well as the currently available treatment methods and diagnostic techniques.

Methods: The main technique for the detection and quantification of the SARS-CoV-2 virus and its mutated strains is the real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (rRT-PCR), which uses a swab of the upper respiratory system (nasopharyngeal, oropharyngeal swab, nasal swab or saliva sample). as a sample for laboratory diagnostics.

Conclusion: The disease COVID-19 caused by the pathogen SARS-CoV-2 is currently a pandemic in the world. In order to reduce the speed of pathogen virulence and the speed of transmission between humans as quickly as possible, fast and efficient laboratory diagnostics and effective pharmacological therapy are needed. Of the currently available diagnostic methods for the detection of the infectious agent SARS-CoV-2 virus, RT-qPCR is considered the best, while the sequencing of the coronavirus genome is a magnificent discovery for the detection of new strains.

8. ŽIVOTOPIS

Opći podaci:

Ime i prezime: Klara Huzjak

Datum i mjesto rođenja: 05.12.1998., Varaždin, Republika Hrvatska

Državljanstvo: Hrvatsko

Adresa stanovanja: Ive Režeka 8., 42000 Varaždin

Kontakt: klara.huzjak1@gmail.com

Obrazovanje:

2005. – 2013. III. Osnovna škola Varaždin

2013. – 2017. Prva privatna gimnazija s pravom javnosti Varaždin

2017. – 2022. Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike, Split

Strani jezici i ostalo:

Engleski jezik: B2 razina

Francuski jezik: A2 razina

Talijanski jezik: A1 razina

Aktivno služenje MS Office-om

Vozačka dozvola kategorije B2

Sviranje glazbenih instrumenata: klavir i oboa