

Primjena infracrvene spektroskopije u otkrivanju SARS-CoV-2 virusa

Ćutuk, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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:159:124990>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Petra Čutuk

7743/PT

**PRIMJENA INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U OTKRIVANJU
SARS-CoV-2 VIRUSA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: Doc. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PRIMJENA INFRACRVENE SPEKTROSKOPIJE U OTKRIVANJU SARS-CoV-2 VIRUSA

Petra Ćutuk, 0058214615

Sažetak: Uzimajući u obzir brzo širenje pojedinih virusnih infekcija, poput COVID-19 u protekle dvije godine, razvoj novih, brzih i isplativih tehnika koje olakšavaju detekciju virusa (kao npr. SARS-CoV-2) od iznimne je važnosti ne samo za znanstvenu zajednicu, nego i cijelu svjetsku populaciju. Pristup koji se trenutno koristi uključuje uzimanje obriska respiratornog nazalnog materijala i naknadnu detekciju RNA pomoću RT-PCR tehnike (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) koja ponekad daje lažno-pozitivne rezultate i zahtijeva dulje dijagnostičko vrijeme. Uporabom spektroskopskih metoda, koje se temelje na interakciji uzorka s elektromagnetskim zračenjem omogućena je brža i jednostavnija detekcija virusnih infekcija. Stoga uporaba infracrvene i Raman spektroskopije u dijagnostici virusnih infekcija predstavlja propulzivno znanstveno područje.

U ovom Završnom radu dan je pregled aktualnih metoda za detekciju SARS-CoV-2 virusa te su obrađeni znanstveni radovi vezani za tu tematiku s posebnim osvrtom na upotrebu infracrvene spektroskopije.

Ključne riječi: infracrvena spektroskopija, primjena IR-a, RT-PCR, SARS-CoV-2, virusne infekcije

Rad sadrži: 23 stranice, 9 slika, 1 tablicu, 15 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: 01. srpnja 2021.

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: Food Technology

APPLICATION OF INFRARED SPECTROSCOPY IN THE DETECTION OF SARS-CoV-2 VIRUS

Petra Ćutuk, 0058214615

Abstract: Considering the rapid spread of certain viral infections, such as COVID-19 over the past two years, the development of new, rapid and cost-effective techniques that facilitate virus detection (such as SARS-CoV-2) is extremely important- not only to the scientific community but also to the entire world population. The approach, that is currently used, involves taking a swab of the respiratory nasal material and subsequent RNA detection using RT-PCR technique (*Real Time Polymerase Chain Reaction*) which sometimes gives false-positive results and requires a longer diagnostic time. The use of spectroscopic methods, which are based on the interaction of the sample with electromagnetic radiation, enables faster and simpler detection of viral infections. Therefore, the use of infrared and Raman spectroscopy in the diagnosis of viral infections is a propulsive scientific field.

In this Bachelor Thesis, an overview of current methods for the detection of SARS-CoV-2 virus is given, and scientific papers related to this topic are discussed, with special reference to the use of infrared spectroscopy.

Keywords: application of IR, infrared spectroscopy, RT-PCR technique, SARS-CoV-2, virus infections

Thesis contains: 23 pages, 9 figures, 1 table, 15 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: July 1st 2021

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 Infracrvena spektroskopija	2
2.1.1 Općenito o metodi	2
2.1.2 Podjela infracrvene spektroskopije.....	4
2.2 Virus SARS-Cov-2.....	7
2.2.1 Koronavirusi - SARS-Cov-2.....	7
2.2.2 Otkriće i širenje virusa	10
2.2.3 Metode detekcije virusa	11
2.3 Primjena IR spektroskopije u otkrivanju virusa SARS-CoV-2.....	15
2.3.1 Upotreba spektroskopije za detekciju i praćenje koronavirusa (COVID-19) ...	16
2.3.2 Upotreba FTIR spektroskopije u analizi sline s ciljem otkrivanja virusa SARS-CoV-2.....	17
2.3.3. Brzo otkrivanje infekcije SARS-CoV-2 pomoću ATR-FTIR spektroskopije i algoritma analize	18
3. ZAKLJUČAK	20
4. LITERATURNI IZVORI	21

1. UVOD

Infracrvena spektroskopija (IR, engl. *Infra Red Spectroscopy*) je jedna od instrumentalnih metoda koja služi za karakterizaciju i identifikaciju kemijskih spojeva, odnosno identifikaciju funkcijskih skupina prisutnih u molekuli. Drugim riječima, IR– spektroskopija se bavi infracrvenim dijelom elektromagnetskog spektra i činjenicom da molekule apsorbiraju na specifičnim frekvencijama koje su karakteristika njihove strukture [1].

U protekle dvije godine svijet se bori s pandemijom bolesti COVID-19 (engl. *coronavirus disease 2019*) čiji je uzročnik virus SARS-CoV-2. Budući da još nije pronađen učinkovit lijek za terapiju same virusne bolesti, osnovni način borbe protiv pandemije predstavlja što ranija detekcija zaražene sobe s ciljem sprečavanja daljnjeg širenja bolesti. Za detekciju novog SARS-CoV-2 virusa primjenjuju se molekularne metode (poput RT-PCR testa, brzih ili poc testova...), serološka testiranja (na antitijela za SARS-CoV-2) kao i antigenska testiranja (za detekciju virusnih proteina).

U ovom Završnom radu napravljen je pregled različitih metoda za detekciju SARS-CoV-2 zasnovanih na infracrvenoj spektroskopiji.

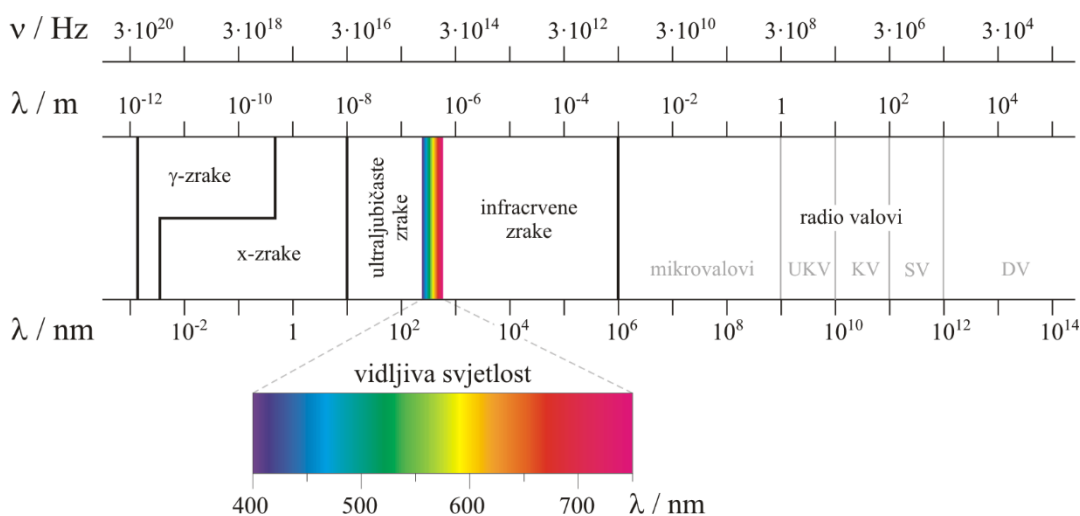
Iako trenutni testovi dobro dijagnosticiraju virusne bolesti, oni su dugotrajni i zahtijevaju intenzivnu pripremu uzorka. Spektroskopske tehnike pružaju brojne prednosti što se tiče brzine, točnosti i relativne isplativosti ne samo u otkrivanju nego i u praćenju bolesti. Budući da su poznate virusne modifikacije tijekom napada na stanice domaćina, upotreba IR spektroskopije omogućava praćenje kemijskih promjena samog virusa (poglavito RNA) prilikom infekcije zaražene osobe čime je omogućena brza identifikacija. U skladu s mogućnosti preciznog određivanja promjena u kemijskoj strukturi uz pomoć spektroskopije, trebalo bi biti moguće otkriti koncentraciju različitih virusnih čestica u slini, urinu, krvi i serumu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Infracrvena spektroskopija

2.1.1 Općenito o metodi

Infracrveno zračenje predstavlja relativno mali dio spektra elektromagnetskog zračenja. Ono se nalazi između ultraljubičastog zračenja koje je veće valne duljine i radiovalova koji su manje valne duljine od infracrvenog zračenja. Kao što se može vidjeti na Slici 1., apsorpcijske vrpce se uobičajeno izražavaju u jedinicama valne duljine [m, nm, μm], a frekvencija elektromagnetskog zračenja se izražava u jedinicama herc [Hz]. Mikroni i mikrometri su jedinice valne duljine čije su brojčane vrijednosti identične [2].

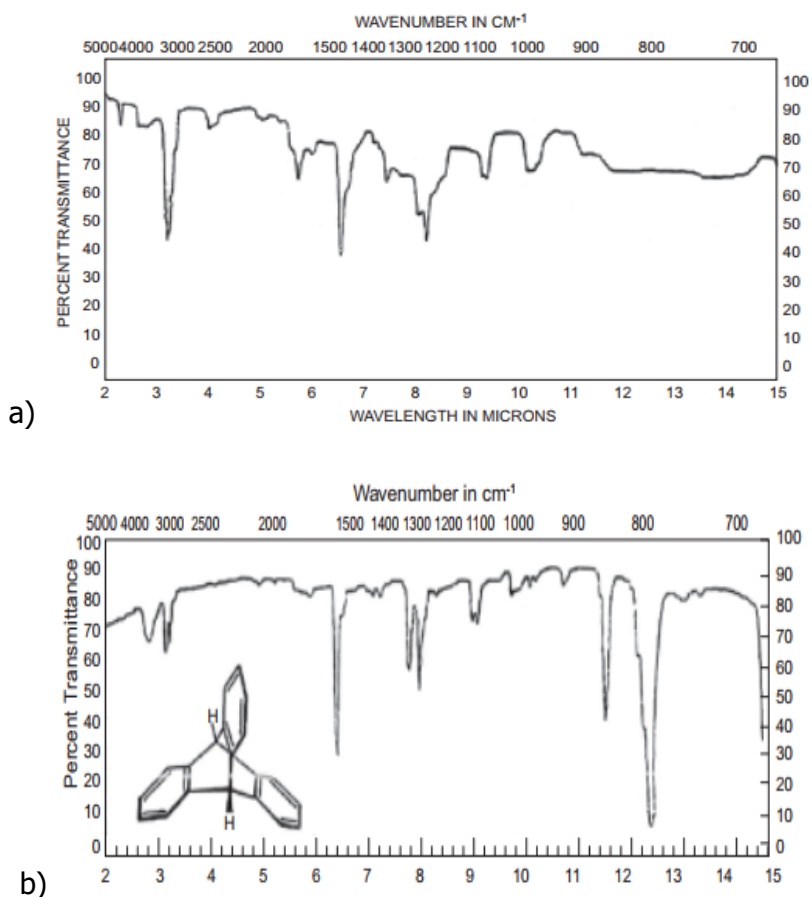


Slika 1. Elektromagnetski spektar zračenja [3].

Infracrveni spektri organskih komponenti su najčešće sastavljeni od više apsorpcijskih vrpca različitog intenziteta i oblika pri čemu se sve uglavnom pojavljuju u području od 2,5-16 μm . To područje infracrvenog spektra je jako važno za organske kemičare i poznato je kao vibracijsko područje. U tom dijelu frekvencija zračenja odgovara energiji frekvencije koju proizvode veze u organskim molekulama tijekom prirodnih vibracija. Manju važnost u organskoj kemiji zauzima blisko infracrveno područje (0,8-2,5 μm), kao i daleko infracrveno područje (16-200 μm). Infracrveni spektrometar služi za mjerenje apsorpcije infracrvenog zračenja u uzorku kao funkcije frekvencije zračenja. Što je veća frekvencija, zračenje ima veću energiju. Kao što je

prethodno navedeno, jedinica za frekvenciju je herc [Hz] koja je ujedno i jedinica za frekvenciju u SI sustavu. Iz toga se može zaključiti da su i intenzitet i područje apsorpcijskih vrpca važni u izvedbi strukturalnih značajki organskih komponenti [2].

Gotovo svaka organska komponenta ima svoj vlastiti infracrveni spektar koji je uobičajeno poznat kao „otisak prsta“ molekule. Ovo svojstvo omogućava identifikaciju organskih komponenti usporedbom spektara. Primjerice, ukoliko se infracrveni spektar nepoznate komponente podudara sa spektrom poznate komponente, može se upotrijebiti kao vjerodostojan dokaz da su dvije komponente identične. Ipak, da bi se dva spektra zaista podudarala, analize moraju biti provedene s komponentama iste čistoće, iz istog uzorka i pod istim uvjetima. U suprotnom neće doći do potpunog podudaranja iako se radi o identičnim molekulama. To se može vidjeti na primjeru tripticena kada se nalazi otopljen u kloroformu (Slika 2., a) i u obliku KBr pastila (peleta) (Slika 2., b) [2].



Slika 2. Infracrveni spektar tripticena: (a) otopljenog u kloroformu i (b) u obliku KBr peleta [2].

2.1.1.1 Vibracijska spektroskopija i osnovne vrste vibracija

Vibracija veza u molekulama inducira apsorpciju u infracrvenoj regiji. Takve apsorpcijske vrpce se koriste u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi, kao i identifikaciji velikog broja molekula. Pripisivanje tih apsorpcijskih vrpca specifičnim kemijskim grupama nam daje povratnu informaciju o nepoznatom uzorku. Po istom principu infracrveno zračenje može potaknuti rotaciju molekula pri čemu nastaju rotacijske vrpce. One se nadovezuju na vibracijske vrpce. Također, takve vrpce se mogu promatrati spektrometrima visoke rezolucije i primjenjivati za plinovite molekule koje pokazuju oštre vrpce [4].

Kemijske veze u molekulama nisu stacionarne i nefleksibilne nego ipak podložne različitim vibracijama. Postoji nekoliko osnovnih tipova vibracijskih veza: (i) rastezne vibracije (simetrične i asimetrične), kao i (ii) vibracije svijanja (u ravnini i izvan ravnine). Rastezne vibracije uključuju kretanje atoma u smjeru veze koja je uspostavljena između njih, a vibracije svijanja (ili deformacijske) uključuju pokretanje atoma koje rezultira promjenom kuta veze između njih [2].

2.1.2 Podjela infracrvene spektroskopije

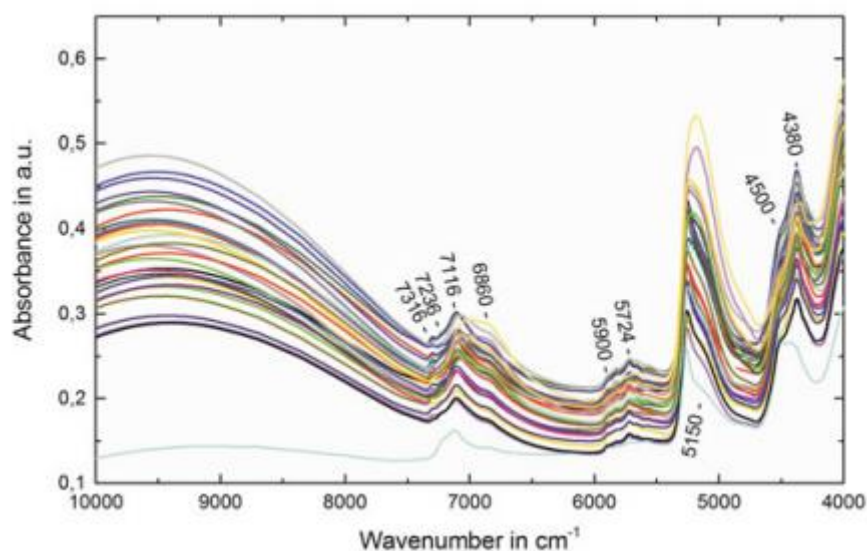
2.1.2.1 Blisko, srednje i daleko infracrveno područje

Infracrvena (IR, engl. *infra-red*) spektroskopija se uobičajeno dijeli u tri regije prema valnoj duljini [4].:

- blisko infracrveno područje (NIR prema engl. *near-infrared*: 750-2500 nm),
- srednje (MIR prema engl. *mid-infrared*: 2500-25 000 nm) i
- daleko infracrveno područje (25-1000 μm).

Razlika između ove tri regije se može mijenjati ovisno o vrsti instrumenta koji se koristi tijekom analiziranja. Druge razlike se temelje na svojstvima zračenja; primjerice, uvriježeno je da NIR obuhvaća područje između 750 i 2500 nm. Međutim, neki definiraju NIR kao područje od 650-2500 nm pri čemu se onda ono djelomično preklapa s područjem crvene svjetlosti vidljivog dijela spektra (400-750 nm). U principu, NIR regija počinje od onog dijela kada ljudsko oko više ne stvara vizualni odgovor. Pri valnoj duljini od 650 nm i više, odgovor ljudskog oka je toliko malen da se taj krajnji dio vidljivog dijela spektra smatra dijelom NIR regije [4].

NIR spektroskopija je spektroskopija u regiji od 700-2500 nm u kojoj se očekuje pojava vrpce koje nastaju zbog prijelaza elektrona kao i vrpce nastalih djelovanjem prizvuka i kombinacijom različitih vibracija. U skladu s tim može se zaključiti da je NIR spektroskopija elektronska, ali i vibracijska spektroskopija budući da se nalazi između UV-Vis (elektronske) spektroskopije i infracrvene (vibracijske) spektroskopije. Na Slici 3. je prikazana kemijska struktura materijala imobiliziranih metalnom afinitetnom kromatografijom, IMAC (engl. *Immobilised metal affinity chromatography*) u NIR području. Spektri s te slike su zanimljivi upravo zbog toga što prikazuju da su u NIR regiji vidljive vrpce koje se pripisuju elektronskom prijelazu, jednako kao i vrpce koje potječu od vibracijskih prijelaza [5].

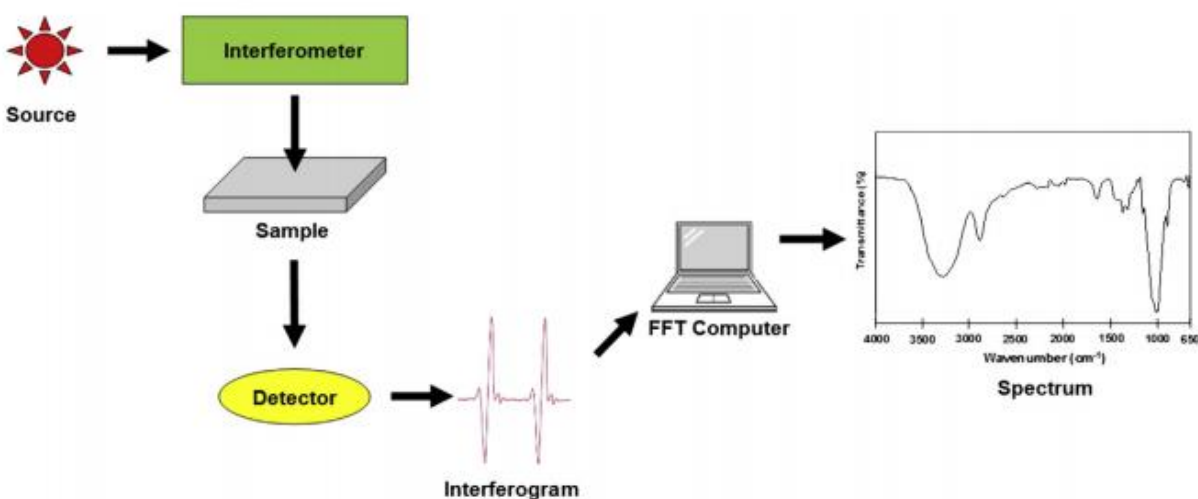


Slika 3. Kemijska struktura materijala imobiliziranog metalnom afinitetnom kromatografijom (IMAC) u NIR području [5].

2.1.2.2 FTIR spektroskopija

FTIR (engl. *fast Fourier transform infrared*) je matematičko-računalni postupak koji obrađuje i vrši prijelaz informacija iz interferograma u standardni infracrveni spektar. FTIR spektroskopija spada u vibracijske spektroskopske tehnike. Na Slici 4. se nalazi shematski prikaz glavnih komponenti jednostavnog FTIR spektrofotometra. Uređaj proizvodi snop infracrvenog zračenja kojeg emitira užareni izvor crnog tijela. Zatim snop prolazi kroz interferometar. Rekombinacija snopova s različitom duljinom putanja stvara u interferometru konstruktivne i

destruktivne smetnje koje se nazivaju interferogram. Snop sada prolazi kroz uzorak koji apsorbira energiju određene frekvencije i ona predstavlja jedinstvenu karakteristiku uzorka u interferogramu. Potom, detektor mjeri specifične energetske signale u interferogramu naspram vremena za sve frekvencije istovremeno. U međuvremenu, snop uspostavlja referencu (pozadinu) za rad instrumenta. Konačno, traženi spektar se dobije nakon što interferogram automatski oduzme taj spektar u pozadini od spektra uzorka pomoću računalnog programa Fourierove transformacije [6].



Slika 4. Osnovni dijelovi Fourier transformirajuće infracrvene spektroskopije (FTIR) [6].

Za razliku od disperzivnih instrumenata, FTIR spektrometar omogućava skeniranje cijelog područja frekvencije spektra u mikrosekundi. Prema tome, Fourier transformirajući infracrveni postupak se može koristiti u istraživanju dinamički promjenjivih sustava poput novijih plinova koji nastaju termalnim raspadom i frakcija koje se eluiraju iz kolone plinskog kromatografa. Brojne prednosti FTIR metode omogućuju joj kombiniranje s drugim uređajima poput termoanalizatora, plinske kromatografije i masene spektrometrije. Informacije i rezultati dobiveni kombinacijom ovakvih sustava su uglavnom puno bolji nego skup informacija nakon korištenja svakog sustava zasebno [2].

2.1.2.3 Raman spektroskopija

Raman spektroskopija, molekularna i kemijska metoda, se koristi u svrhu optičkog istraživanja molekularnih promjena u zaraženim tkivima. Ova se spektroskopija, kao i FTIR, ubraja u vibracijske spektroskopske tehnike koje su relativno jednostavne, reproducibilne, neinvazivne u kontaktu s tkivom i zahtijevaju vrlo male količine uzorka (mikrogrami ili nanogrami) s minimalnom pripremom. Rezultat ovakvih metoda su vibracijski spektri čije su vibracijske vrpce specifične za svaku molekulu i pružaju jedinstvenu informaciju o biokemijskom sastavu. Teoretski gledano, ako je energija upadnog fotona nakon sudara s molekulom nepromijenjena, onda je ona jednaka energiji raspršenog fotona koji nastaje nakon sudara. Ta pojava je poznata kao Rayleighovo ili elastično raspršivanje. Uslijed prijelaza energije s protona na molekulu ili obrnuto, raspršeni proton ima manju ili veću energiju od upadnog protona. Ova pojava se naziva neelastično ili Ramanovo raspršivanje i prvi put ju je opazio Sir C. V. Raman 1928. godine indijski fizičar koji je dvije godine nakon toga dobio Nobelovu nagradu na tom području. Ipak, vrlo mali dio svjetlosti (1 od 10^{10}) je elastično raspršen pri različitoj valnoj duljini u upadnom svjetlu. U slučaju kada proton ima višu frekvenciju i samim time nižu energiju od upadnog svjetla, dolazi do pojave poznate kao Stokes-Raman koja je zapravo nastaje zbog promjene u načinu vibracije molekule u uzorku [7].

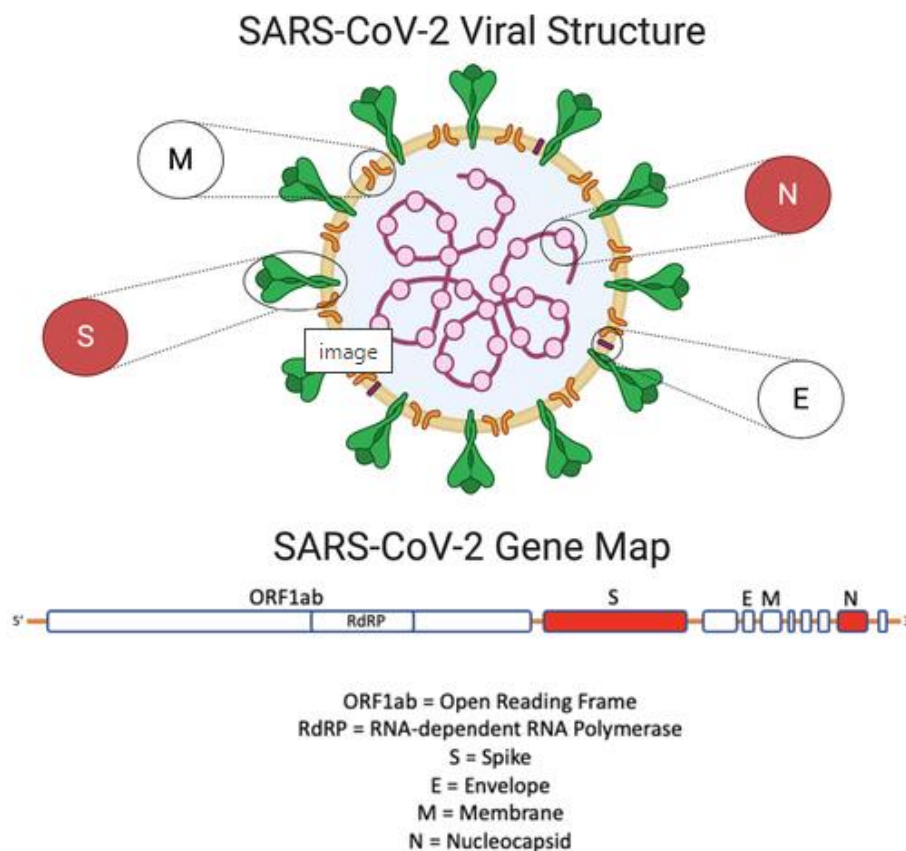
Raman spektri predstavljaju splet jakosti raspršenja kao funkcije razlike u energiji između upadnih i raspršenih fotona. Takvi spektri nastaju prolaskom snopa monokromatskog svjetla kroz uzorak. Povećanje (ili smanjenje) energije fotona je u direktnom odnosu s razlikom u početnoj i konačnoj energiji vibracije molekula u interakciji. Konačne spektre karakteriziraju promjene (inverzija) u valnoj duljini u odnosu na početnu frekvenciju [7].

2.2 Virus SARS-Cov-2

2.2.1 Koronavirusi - SARS-Cov-2

Virusi su najmanji paraziti, veličine u rasponu od 0,02 do 0,3 μm . U potpunosti su ovisni o živoj stanici (bakterijskoj, biljnoj ili životinjskoj) i jedino se unutar nje mogu razmnožavati. Nasljedni materijal virusa čine nukleinske kiseline DNA ili RNA koje okružuje vanjski omotač (proteinski, a ponekad i lipidni). Na gornjem dijelu slike 5. je prikazana građa virusa SARS-CoV-

2. Da bi došlo do virusne infekcije stanice, virus se treba pričvrstiti na stanicu domaćina. Zatim se virusna DNA ili RNA odvaja od vanjskog omotača, ulazi u stanicu domaćina i uz pomoć specifičnih enzima se tu replicira. Stanica domaćina je na taj način najčešće lizirana i propada uslijed čega dolazi do otpuštanja i oslobađanja novih virusnih čestica [8]. U nastavku će više biti govora o velikoj grupi koronavirusa i konkretnije o virusu SARS-CoV-2.



Slika 5. Gornji dio slike prikazuje građu SARS-CoV-2 virusa, a na donjem dijelu slike prikazana je genetička mapa tog virusa [8].

Koronavirusi (CoVs) su velika grupa RNA virusa. Karakteristike njihove građe su: ovojnica na kojoj se nalaze proteinske „bodlje“ koje štite virus, neobično velik RNA genom i jedinstven način replikacije. Koronavirusi spadaju u red *Nidovirales* koji nadalje uključuje porodice: *Coronaviridae*, *Arteriviridae*, *Mesoniviridae* i *Roniviridae*. *Coronaviridae* se dalje dijele na 4 roda: alfa, beta, gama i delta koronavirusa. Virusi su prvotno bili podijeljeni u ove rodove prema serologiji, ali danas se dijele prema filogenetskom grupiranju (slika 5.) [9].

Sve viruse iz reda *Nidovirales* karakterizira ovojnica, te sadrže jako veliki genom za RNA viruse pri čemu je kod nekih od njih identificiran najveći RNA genom građen od 33,5 kilobaza (kb). Zajednička svojstva za red *Nidovirales* su još [9]:

- visoka organiziranost genoma s velikim brojem replikacijskih gena koji prethode strukturnim i pomoćnim genima;
- ekspresija velikog broja nestrukturnih gena zbog ribosomalnog pomaka okvira čitanja;
- nekoliko jedinstvenih ili neobičnih enzimatskih aktivnosti koje kodiraju u višeproteinskom kompleksu replikaza-transkriptazi i
- ekspresija nizvodnih gena sintezom 3' kraja subgenomskih mRNA.

2002. i 2012. godine su otkrivena dva visoko patogena zoonotska (skupina zaraznih bolesti koje su zajedničke ljudima i pojedinim životinjama) koronavirusa: koronavirus teškog akutnog respiratornog sindroma [engl. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus* (SARS-CoV)] te na Bliskom istoku respiratorni koronavirus sindrom [engl. *Middle East Respiratory Syndrome* (MERS-CoV)]. Ti virusi su se pojavili kod ljudi i uzrokovali smrtonosne respiratorne bolesti čime je koronavirus postao nova briga u javnom zdravstvu 21. stoljeća. Potkraj 2019., novi koronavirus, nazvan SARS-CoV-2 se pojavio u Wuhanu, u Kini i uzrokovao epidemiju neobične virusne upale pluća. Zbog svoje visoke zaraznosti, novi koronavirus (uzročnik bolesti COVID-19) se brzo proširio diljem svijeta. Uvjerljivo je nadmašio viruse SARS-CoV i MERS-CoV prema broju zaraženih ljudi i prema prostornom rasponu epidemijskog područja [10].

Koronavirusi sadrže nesegmentirani, RNA genom od ~30 kb. Genom je građen od „kape“ na 5' kraju, te 3' poli-A kraja i ima ulogu mRNA tijekom translacije poliproteina replikaze. Replikacijski gen koji kodira za nestrukturne proteine (engl. *non-structural proteins*, NSPs) zauzima dvije trećine genoma (~20 kb), naspram strukturnih i pomoćnih proteina koji onda zauzimaju 10 kb virusnog genoma. 5' kraj genoma sadrži vodeću sekvencu i nestranslatiranu regiju (engl. *untranslated region*, UTR) koja sadrži višestruke strukture petlje i neophodne su za RNA replikaciju i transkripciju. U skladu s tim, na početku svakog strukturnog ili pomoćnog gena se nalaze transkripcijske regulatorne sekvence koje su potrebne za ekspresiju tih gena. Genom koronavirusa je organiziran redom: 5'-vodeća sekvencija-UTR-replikaza-S („bodlja”)-E (ovojnica)-M (membrana)-N (nukleokapsida)-3'UTR- poli-A – s pomoćnim genima između kojih su

nepravilno smješteni strukturni geni na 3´ kraju genoma (donji dio slike 5.). Pomoćni proteini su gotovo isključivo neesencijalni za replikaciju virusa. Međutim, pokazalo se da neki od njih imaju važnu ulogu u patogenosti virusa [9].

2.2.2 Otkriće i širenje virusa

Kao što sje već prethodno navedeno, 2002. i 2012. godine su otkriveni koronavirusi SARS-CoV i MERS-CoV. Potkraj 2019. godine, nekoliko zdravstvenih ustanova u Wuhanu prijavljuje nekolicinu pacijenata s pneumonijom nepoznatog uzroka. Simptomi pacijenata su bili slični onima kod pacijenata zaraženima SARS-om i MERS-om, a to su upala pluća, povišena temperatura, kašalj te nelagoda u prsima. Neovisni timovi kineskih znanstvenika su metagenomskim sekvencioniranjem RNA i izolacijom virusa iz bronhoalveolarne tekućine identificirali da je uzročnik ove zarazne bolesti betakoronavirus koji se nikada do tada nije pojavio. Zatim je prijavljeno nekoliko obiteljskih zajednica unutar koji se međusobno širila zaraza, a infekcija se pojavila i unutar bolničkih ustanova. Svi ti slučajevi su dokazali da se novi virus prenosi s čovjeka na čovjeka. Virus se masivno širio diljem Kine i potvrđeni broj slučajeva je naglo rastao da bi u drugoj polovici siječnja dnevni broj zaraženih dosegao čak tisuću. 30. siječnja 2021. Svjetska zdravstvena organizacija [engl. *World Health Organization (WHO)*] je izbijanje novog koronavirusa proglasila hitnom situacijom u javnom zdravstvu od međunarodne važnosti. 11. veljače je Međunarodni odbor za taksonomiju virusa imenovao novi virus kao „SARS-CoV-2“ i WHO je bolest nazvala „COVID-19“. Vrhunac epidemijske zaraze u Kini je bio u veljači. U svrhu kontroliranja COVID-19, Kina je uvela stroge mjere u javnom zdravstvu. Wuhan je bio u potpunosti zatvoren 23. siječnja, a sva putovanja i transport su bili blokirani. U sljedećih nekoliko tjedana sve vanjske aktivnosti i okupljanja su zabranjena, a u većini gradova i naselja su zatvorene javne ustanove čime je dnevni broj zaraženih počeo opadati [10].

Unatoč smanjenju broja zaraženih u Kini, krajem veljače je došlo do ubrzanja međunarodnog širenja COVID-19. Sve veći broj zemalja je bilježio veliki broj zaraženih. Visoka stopa infekcije virusa SARS-CoV-2 i mnoštvo međunarodnih putovanja su doprinijeli ubrzanom svjetskom širenju zaraze. Konačno, u ožujku 2020. je WHO svjetsko širenje COVID-19 označio kao pandemiju. Tijekom ožujka je u Kini COVID-19 efikasno kontroliran, no broj zaraženih u Europi, SAD-u i drugim regijama je izuzetno porastao. COVID-19 odbor Centra za sustavnu

znanost i inženjerstvo na Sveučilištu John Hopkins je 11. kolovoza 2020. objavio da je 216 zemalja i regija sa svih šest kontinenata zabilježilo 20 milijuna slučajeva COVIDa-19 i više od 733 tisuće preminulih pacijenata. SAD je bila zemlja s daleko najvećim brojem zaraženih [10].

2.2.3 Metode detekcije virusa

2.2.3.1 RT-PCR test

RT-PCR test (engl. *Real Time Polymerase Chain Reaction*) je molekularna metoda koja se koristi pri dijagnosticiranju COVID-19. Test je pogodan za dijagnosticiranje ljudi koji su trenutno zaraženi virusom SARS-CoV-2, odnosno uzročnikom bolesti COVID-19.

RT-PCR metoda je također poznata kao kvantitativni PCR ili qPCR (engl. *quantitative PCR*). Umnožavanje molekule DNA je moguće trenutno detektirati, dok je PCR u tijeku korištenjem fluorescentnog izvora. On detektira prisutnost/odsutnost nukleinske kiseline, kao i njenu količinu. RT-PCR testiranje je visoko osjetljiva metoda pri čemu je 10 kopija po reakciji razina osjetljivosti s kojom znanstvenici računaju. Međutim, postoji mogućnost dobivanja lažno-negativnih rezultata što za posljedicu može imati pogrešku u detekciji pacijenata zaraženih COVID-19. Prema tome, točan i precizan postupak je ključan za ovaj test. Prema smjernicama za COVID-19 od strane WHO, laboratorijska testiranja su dostupna i istraživanja poboljšanih tehnika su vrlo intenzivna. Najveća mana te metode je dugotrajnost budući da je za analizu prvotno potrebna priprema uzorka [13]. Ipak, PCR test predstavlja „zlatni standard“ u dijagnosticiranju COVIDa-19 jer je najtočniji i najpouzdaniji test.

Postoje tri važna koraka za COVID-19 PCR testiranje [11]: 1) sakupljanje uzorka, 2) ekstrakcija i 3) PCR.

1. Sakupljanje uzorka se obavlja uzimanjem obriska respiratornog nazalnog materijala. Obrisak se sastoji od mekanog vrha na dugom fleksibilnom štapiću kojim se sakuplja uzorak iz nosa. Nakon sakupljanja, štapić se sprema u plastičnu tubu i šalje se u laboratorij.
2. Kada laboratorijski tehničar zaprimi uzorak, primjenjuje proces koji se naziva ekstrakcija. Tim se procesom izolira genetski materijal iz uzorka uključujući genetski materijal bilo kojeg prisutnog virusa.

3. U PCR koraku se koriste posebne PCR kemikalije i PCR uređaj (engl. *thermal cycler*) koji potiče reakciju kojom nastaju milijuni kopija malenog dijela SARS-CoV-2 virusnog genetskog materijala. Tijekom izvedbe procesa, jedna od primijenjenih kemikalija proizvodi fluorescentno svjetlo uslijed prisutnosti virusa u uzorku. Fluorescentno svjetlo je „signal“ kojeg PCR uređaj detektira i posebnim računalnim programom se taj signal interpretira u obliku rezultata pozitivnog testa [11].

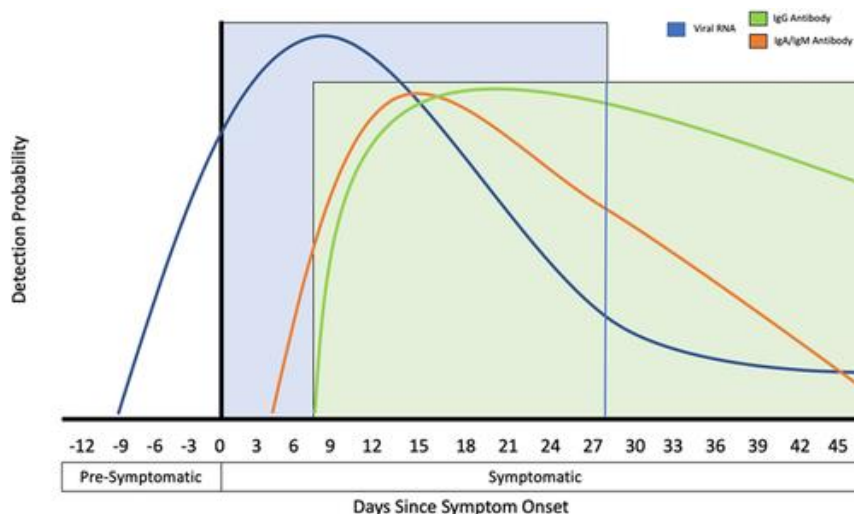
2.2.3.2 Antigenski testovi

Antigenski testovi za SARS-CoV-2 su dijagnostički testovi namijenjeni brzom detekciji virusnih proteina (antigena). Unatoč tome što im je najveća prednost brzina izvedbe, ovakvi testovi često daju netočne rezultate i imaju nižu specifičnost i osjetljivost od PCR testova. Razvoj testova koji su karakteristični za virusne antigene je dugotrajan proces, pa se antigenski testovi podvrgavaju rigoroznim mjerenjima kontrole kvalitete kako bi se osigurala specifičnost i osjetljivost. Premda su antigenski testovi vrlo specifični za viruse, ipak ne mogu detektirati sve infekcije i samim time je veća šansa za lažno-negativan test nego što je to slučaj kod RT-PCR [12].

2.2.3.3 Serološki testovi

Molekularni (npr. RT-PCR), kao i serološki testovi su namijenjeni pacijentima u različitim fazama procesa zaraze. Dok se RT-PCR testovi koriste za detekciju trenutno aktivne infekcije, serološki testovi se koriste za kasnije faze jer se takvim ispitivanjima detektira prisutnost SARS-CoV-2 antitijela koje je proizveo ljudski imunski sustav. Serološko testiranje omogućava razumijevanje načina proizvodnje antitijela za SARS-CoV-2 i takva ispitivanja detektiraju imunoglobuline IgA, IgM, IgG ili ukupna antitijela. U jednom istraživanju prvotnih reakcija pacijenata na COVID-19 je ustanovljeno da se IgA i IgM antitijela mogu identificirati pet dana nakon zaraze, pri čemu su više razine zapažene drugi i treći tjedan nakon zaraze. Druga istraživanja su ustanovila optimalnu količinu IgM antitijela pri kraju prvog tjedna, da bi oni dosegli svoj vrhunac tijekom trećeg tjedna nakon pojave simptoma zbog čega može doći do pojave negativnih rezultata RT-PCR testova tijekom uklanjanja virusa iz organizma (Slika 6.). Još jedno od izvješća je ustanovilo raniju serokonverziju (vrijeme potrebno da netko tko je zaražen virusom

počne proizvoditi antitijela na taj virus) za IgA nego kod IgM ili je detektirana veća razina IgA nego IgM. IgG antitijela je moguće detektirati tek u kasnijoj fazi infekcije 7-14 dana nakon pojave simptoma i razine ostaju relativno visoke tijekom 6 tjedana. Prema ranim podacima jednog malog istraživanja, od 285 pacijenata zaraženih SARS-CoV, svi oni (100% pacijenata) su pozitivno testirani na prisutnost IgG unutar 20 dana nakon pojave simptoma. Serokonverzija IgG i IgM se odvijala istodobno ili uzastupno između trećeg i četvrtog tjedna. Asimptomatski pacijenti serokonvertiraju kasnije tijekom zaraze ili nikako. Dodatne studije su ustanovile da asimptomatski pacijenti imaju značajno dulje trajanje širenja virusa, niže razine IgG, i neutralizirane razine protutijela u serumu u usporedbi sa simptomatskom skupinom. Takvi podaci sugeriraju da asimptomatski pacijenti mogu postići slabiji odgovor protutijela i imunitet im se može smanjiti unutar nekoliko mjeseci od infekcije. Iako ova istraživanja pokazuju promjenjive odgovore antitijela, primijećeno je da se antitijela IgA/IgM razvijaju tijekom ranijih faza pri čemu se IgG antitijela pojavljuju ranije tijekom SARS-CoV-2 infekcije. Ovu povezanost između odgovora antitijela i kliničkih istraživanja je potrebno još utvrditi, a nedavnim istraživanjima je ustanovljeno da se detekcija antitijela može koristiti kao indikator faza napretka COVID-19 u pomoći pri rješavanju bolesti [12].



Slika 6. Vjerojatnost detekcije virusne RNA ili antitijela (IgA, IgG i IgM) na SARS-CoV-2 tijekom zaraze (relativno nakon pojave simptoma). Navedeni su okviri testiranja amplifikacije nukleinske kiseline (RT-PCR, *plavo*) i serološki testovi (antitijela, *zeleno i narančasto*) [12].

Tablica 1. Usporedba *in vitro* SARS-CoV-2 testova čije je odobrenje za hitnu upotrebu izdala US FDA (engl. *U.S. Food and Drug Administration*) [12].

	MOLEKULARNI	ANTIGENSKI	SEROLOŠKI
VRSTA TESTA	Virusni	Virusni	Antitijela
DIJAGNOSTIČKI TEST	Da	Da	Ne
OPIS TESTA	Test amplifikacije nukleinske kiseline za detekciju virusne RNA	Detektira virusne proteine u nosnoj šupljini	Detektira prisutnost antitijela za SARS-CoV-2 (IgA, IgM, i IgG)
MJERILO	Trenutna infekcija SARSom-CoV-2	Trenutna infekcija SARSom-CoV-2	Prethodna izloženost SARSu-CoV-2
TEHNOLOŠKA PLATFORMA	RT-PCR, LAMP, CRISPR	Brzi dijagnostički test	Brzi dijagnostički test, ELISA, CIA
TIP UZORKA	Bris nosa ili grla, slina, bronhoalveolarna tekućina za ispiranje	Bris nosa ili grla	Vađenje krvi (plazma, serum, kompletna krv) ili otisak prsta
OKVIR TESTIRANJA	1-28 dana nakon pojave simptoma, optimalno 3.-12. dan	1-28 dana nakon pojave simptoma, optimalno 3.-12. dan	IgA/IgM: od 5. dana pojave simptoma, optimalno 14.-21. dan; IgG: od 14. dana pojave simptoma pa do 6 tjedana
OKVIRNO VRIJEME DOLASKA REZULTATA	Isti dan ili do tjedan dana (ovisno o lokaciji)	Brzi (poc, engl. <i>point-of-care</i>) testovi (unutar 15 min.)	Isti dan ili 1-3 dana; moguć i brzi test (unutar 15-30 min.)

CIA = engl. *chemiluminescent immunoassay*; CRISPR = engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*; ELISA = engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; LAMP = *loop-mediated isothermal amplification* [12].

2.3 Primjena IR spektroskopije u otkrivanju virusa SARS-CoV-2

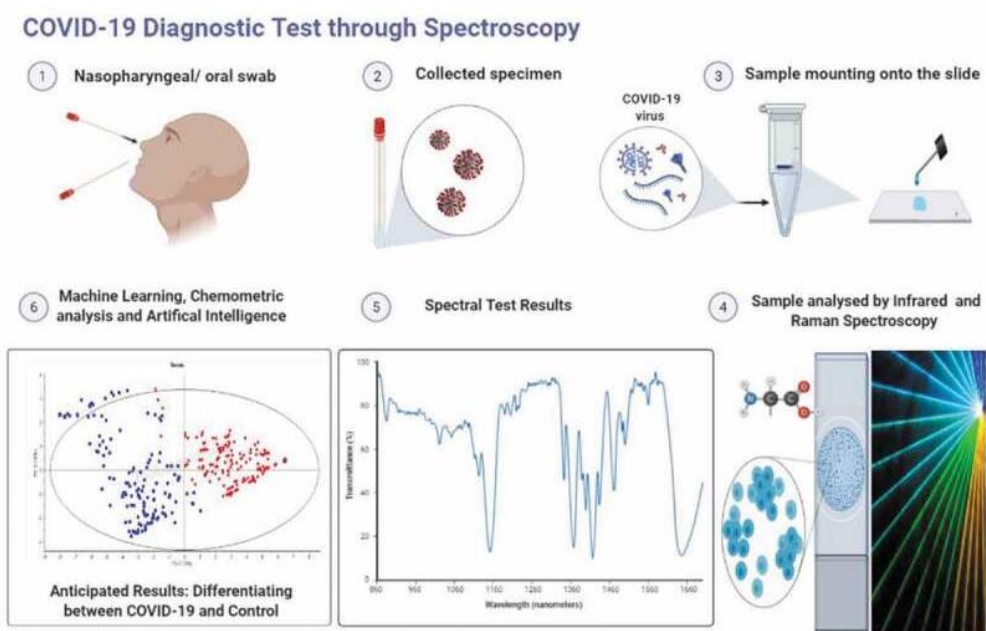
Kao što smo vidjeli u prethodnom poglavlju, navedeni su različiti načini detekcije virusa. Za detekciju novog SARS-CoV-2 virusa primjenjuju se molekularne metode (poput RT-PCR testa, brzih ili poc testova), serološka testiranja (na antitijela za SARS-CoV-2) kao i antigenska testiranja (za detekciju virusnih proteina). U ovom dijelu će biti obrađena još jedna metoda koja je našla svoju primjenu u detekciji koronavirusa. Naime, radi se o infracrvenoj spektroskopiji koja se pokazala kao iznimno korisna metoda za utvrđivanje virusne zaraze. S obzirom na velik broj prethodno navedenih pozitivnih osobina u tehnologiji, spektroskopija ima središnju ulogu kao nova metoda za primjenu u bioinženjerstvu, prirodnim znanostima, a odnedavno i u medicinskom području.

Raman i *infracrvena spektroskopija* mogu biti iznimno korisne pri dijagnosticiranju infekcije. Budući da se pojavilo puno tehnologija koje omogućavaju potrebne informacije o građi bioloških vrsta, logičan je bio i interes za proučavanjem bakterija i virusa pomoću novih metoda i instrumenata. Kao rezultat toga, kompleksni biološki uzorci poput urina, krvi, sline, dojenačkog mlijeka itd., sada se mogu proučavati s visokom učinkovitosti i razlučivosti uz pomoć tehnologija kao što su proton nuklearna magnetska rezonancija (H-NMR, engl. *Proton nuclear magnetic resonance*), RS metoda (engl. *related substances*) i IR (engl. *infra red*) metoda.

Stoga brojni znanstvenici naglašavaju potrebu za razvojem novih, korisnih metoda dijagnosticiranja i izvještavanja o samoj detekciji virusa uz pomoć infracrvene spektroskopije, s naglaskom na ekonomske i društvene prednosti [13]. Takve analitičke metode su tehnike vibracijske spektroskopije koje daju mogućnost uvida u molekularne vibracije kemijske strukture molekula. Bitno je naglasiti da se virusni proteini i antitijela imunskog sustava mogu detektirati u vibracijskom spektru [13]. U nastavku je navedeno nekoliko radova koji to i potvrđuju.

2.3.1 Upotreba spektroskopije za detekciju i praćenje koronavirusa (SARS-CoV-2)

Kombinacija spektroskopskih metoda s različitim pristupima analizi predstavlja zanimljivu i moćnu strategiju za istraživanje biomolekula. U novije vrijeme umjetna inteligencija (koja ima naglašen potencijal prilagodbe duboke neuronske mreže s velikim sposobnostima učenja) mogla bi nakon određenog vremena uvježbavanja poslužiti za trenutno prognoziranje spektara. Efektivnost, osjetljivost, značajnost i druge prethodno spomenute specifičnosti ovih metoda imaju veliki potencijal za usavršavanjem i unapređenjem. Izvedba uređaja i metoda koji se temelje na IR spektroskopiji za detekciju virusa mogu se dodatno razvijati za analize proteina i strukture nukleinskih kiselina na mnogostruke načine. Spektroskopske tehnike imaju neizmjeran potencijal u dijagnosticiranju ljudskih bolesti uključujući bakterijske i virusne infekcije, upalna stanja i različite karcinome kao što je prikazano na shematskom dijagramu na slici 7. [13].



S

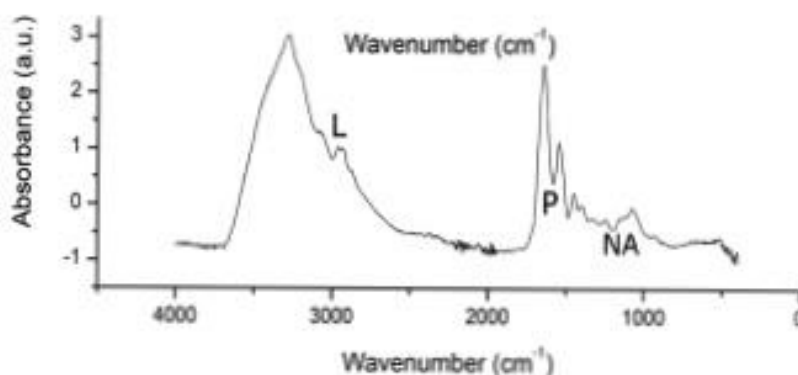
Slika 7. Shematski dijagram vibracijske spektroskopije za virus SARS-CoV-2, COVID-19 [13].

Iako trenutni PCR testovi dobro dijagnosticiraju virusne bolesti, oni su dugotrajni i zahtijevaju intenzivnu pripremu uzorka. Predložene spektroskopske tehnike mogu biti od neizmjerne prednosti što se tiče brzine, točnosti i relativne isplativosti ne samo u otkrivanju nego i u praćenju bolesti. Aspekt praćenja je od presudne važnosti budući da su virusi poznati po

promjenama u RNA u odnosu na okolno okruženje. Upotreba IR spektroskopije u kombinaciji s umjetnom inteligencijom i napredovanjem uređaja bi omogućila praćenje kemijskih puteva u svrhu napredovanja bolesti i identifikacije bilo kakvih promjena u kemijskoj strukturi virusa i bakterija. U skladu s mogućnosti preciznog određivanja promjena u kemijskoj strukturi uz pomoć spektroskopije, trebalo bi biti moguće otkriti koncentraciju različitih infektivnih čestica u slini, urinu, krvi i serumu [13].

2.3.2 Upotreba FTIR spektroskopije u analizi sline s ciljem otkrivanja virusa SARS-CoV-2

Primjenom FTIR spektara moguće je ustanoviti karakteristične promjene u različitim tipovima karcinoma, Parkinsonove bolesti, dijabetesa, kao i drugih bolesti povezanih s virusnim infekcijama. Supti i suradnici su anazom sline zaraženih osoba došli do saznanja da virusna infekcija uglavnom pogađa proteinsku regiju, posebno regiju koja se pripisuje amidima ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$). Spektralne promjene se očituju kao rast ili smanjenje u tom području FTIR spektra (slika 8) [14].



Slika 8. Najvažnije makromolekule u spektru sline: L- lipidi ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$), P- proteini (amidne skupine, $1700-1600$ i $1560-1500\text{ cm}^{-1}$) i NA- nukleinske kiseline ($1200-1000\text{ cm}^{-1}$) [14].

Usprkos navedenim prednostima, potrebno je razmotriti popratne promjene tijekom analize sline uz pomoć FTIR spektroskopije: višak vode, miješanje veza različitih komponenata, te varijacije u razinama apsorbancije/propusnosti. S obzirom da 99% sastava sline čini voda, neophodno je provesti sušenje uzorka kako bi se smanjio utjecaj vodikovih veza na predviđanje

strukture (Slika 8). S tim je povezan i problem miješanja veza koji se javlja s kompleksnošću uzorka. Što je složenija struktura uzorka (proteini, organske molekule i elektroliti u slini), to je složeniji spektar jer je otežano povezivanje pikova s odgovarajućim molekulama. Time se ne ostvaruje odgovarajuća identifikacija molekule ili molekula na koje utječe određena bolest. Unatoč tome, broj veza svake komponente znatno varira ovisno o grupi makromolekula kojoj pripadaju. To omogućava da se određeno područje spektra može pouzdano pripisati skupini makromolekula kojoj pripada. U ovakvim istraživanjima varijabilnost razine apsorpcije /propusnosti ima utjecaj na visinu spektra stoga promjena u ovom faktoru nije nužno indikator prisutnosti bolesti. U ovakvom kontekstu, napredak značajki uređaja može predstavljati potencijalnu opciju za preliminarnu kliničku detekciju uz pomoć FTIR spektra [14].

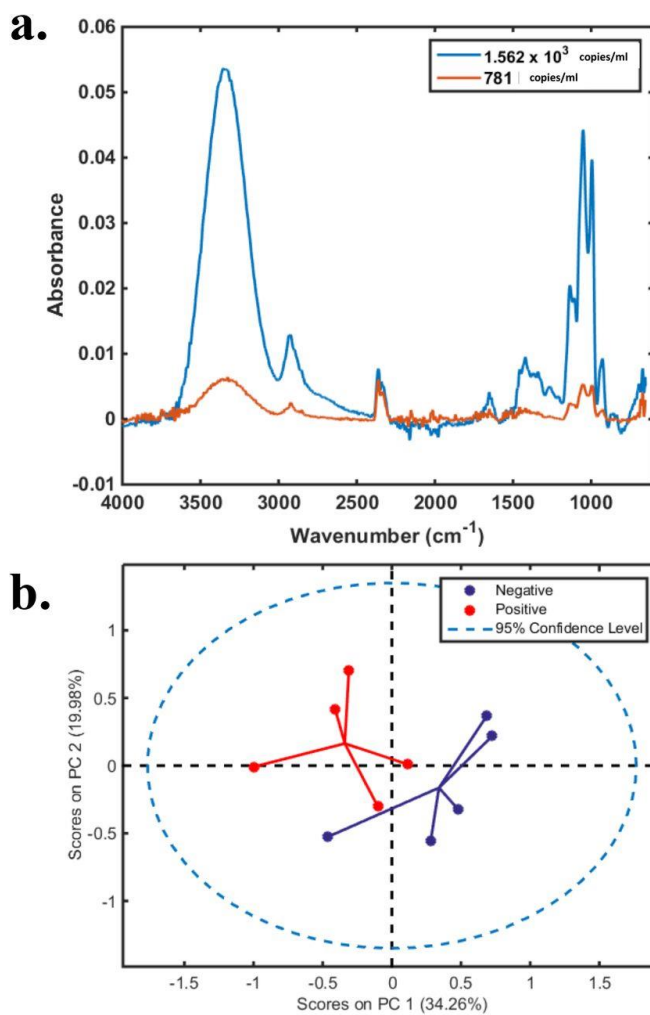
2.3.3. Brzo otkrivanje infekcije SARS-CoV-2 pomoću ATR-FTIR spektroskopije i algoritma analize

Tijekom posljednjih nekoliko godina ATR-FTIR spektroskopija bioloških tekućina se primjenjuje za dijagnosticiranje, prikazivanje i praćenje napretka/regresije različitih bolesti. Spektroskopske tehnike su, kao što je već spominjano, brze, ekonomične i nisu destruktivne što ih čini savršenim kandidatima za kliničku primjenu. U ovom dijelu rada se ATR-FTIR spektroskopija koristi za ispitivanje uzoraka sline s brisova ždrijela sa ili bez sumnje na infekciju SARS-CoV-2.

2.3.3.1 Spektar dobiven od uzorka sline s inaktiviranim virusom SARS-CoV-2

Na Slici 9a. je vidljiv uobičajeni spektar inaktiviranih gama-ozračenih čestica virusa COVID-19 pri 1582 kopije/ml, AT-FTIR spektar s dobrim omjerom signal-šum (SNR ili S/N). Spektar je napravljen s ciljem procijene limita detekcije (engl. *Limit of detection*; LoD) za biospektroskopiju kako bi se utvrdila minimalna koncentracija pri kojoj je moguće detektirati virus IR spektroskopijom. Ispod ove razine je omjer signal-šum slabe razine za detekciju. Ovo upućuje da ATR-FTIR spektroskopija može poslužiti za izvođenje jedinstvenog virusnog otiska prsta čije su spektralne značajke povezane sa čistim virusnim spektrom. Zanimljivo je primijetiti da prevladavaju pikovi koji pripadaju nukleinskim kiselinama, uključujući RNA. Sljedeći uzorci nukleinskih kiselina dobivenih iz sline pripadaju sudionicima koji su ili pozitivni ili negativni na

COVID-19. Jasna segregacija spektralnih točaka je dobivena korištenjem analize glavnih komponentata (PCA metoda) (Slika 9b.) [15].



Slika 9. (a) Spektar čistog virusa u uzorku sline (cijeli virus inaktiviran gamma-zračenjem); (b) Grafički prikaz razdvajanja pozitivnog i negativnog uzorka u RNA ekstrahiranim uzorcima pripremljenima za PCR analizu biospektroskopijom.

3. ZAKLJUČAK

- ✓ Infracrvena spektroskopija (IR, engl. *Infra Red Spectroscopy*) je jedna od instrumentalnih metoda koja služi za karakterizaciju i identifikaciju kemijskih spojeva, odnosno identifikaciju funkcijskih skupina prisutnih u molekuli.
- ✓ Za detekciju novog SARS-CoV-2 virusa primjenjuju se molekularne metode (poput RT-PCR testa, brzih ili poc testova), serološka testiranja (na antitijela za SARS-CoV-2) kao i antigenska testiranja (za detekciju virusnih proteina).
- ✓ Spektroskopske tehnike pružaju brojne prednosti što se tiče brzine, točnosti i relativne isplativosti ne samo u otkrivanju nego i u praćenju bolesti.
- ✓ Budući da su dobro poznate virusne modifikacije tijekom napada na stanice domaćina, upotreba IR spektroskopije omogućava praćenje kemijskih promjena samog virusa (poglavito RNA) prilikom infekcije zaražene osobe čime je omogućena brza identifikacija.

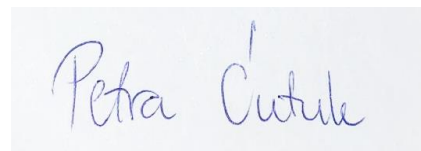
4. LITERATURNI IZVORI

- [1] V. Kovač, Nastavni materijali iz predmeta Instrumentalna analiza, Merlin, 2021.
- [2] James M. Thompson (2018) *Infrared spectroscopy*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. str. 1-10, 16, 89-90.
- [3] Generalić, Eni. "Elektromagnetski spektar." *Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar*. <https://glossary.periodni.com> . Pristupljeno 23.6.2021.
- [4] Da-Wen Sun (2009) *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*, 1. izd., Elsevier. str. 5- 8.
- [5] Yukihiro O., Huck K., Tsuchikawa S., Engelsen S. B. (2020), *Near-Infrared Spectroscopy Theory, Spectral Analysis, Instrumentation, and Applications*, Springer. str. 4-6.
- [6] Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D., & Rahman, M. A. (2017). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *In Membrane Characterization* (pp. 3-29). Elsevier.
- [7] Talari, A. C. S., Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2015). Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied spectroscopy reviews*, **50** (1), 46-111.
- [8] Ivančević, Ž., Rumboldt, Z., Bergovec, M. & Silobrčić, V. (2000) *MSD - priručnik dijagnostike i terapije*. Split, Placwbo.
- [9] Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23.
- [10] Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 1-14.
- [11] Ravi, N., Cortade, D. L., Ng, E., & Wang, S. X. (2020). Diagnostics for SARS-CoV-2 detection: A comprehensive review of the FDA-EUA COVID-19 testing landscape. *Biosensors and Bioelectronics*, **165**, 112454.

- [12] Chau, C. H., Strobe, J. D., & Figg, W. D. (2020). COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, **40** (8), 857-868.
- [13] Khan, R. S., & Rehman, I. U. (2020). Spectroscopy as a tool for detection and monitoring of Coronavirus (COVID-19). *Expert review of molecular diagnostics* **20** (7), 647-649.
- [14] Sánchez-Brito, M., Mata-Miranda, M. M., Martínez-Cuazitl, A., López-Mezquita, D. J., Guerrero-Ruiz, M., & Vázquez-Zapién, G. J. (2021). Saliva analysis using FTIR spectroscopy to detect possible SARS-CoV-2 (COVID-19) virus carriers. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, **42** (1).
- [15] Barauna, V. G., Singh, M. N., Barbosa, L. L., Marcarini, W. D., Vassallo, P. F., Mill, J. G., ... & Martin, F. L. (2021). Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Analytical Chemistry* **93** (5), 2950-2958.

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.

A rectangular box containing a handwritten signature in blue ink. The signature reads "Petra Čutuk".

ime i prezime studenta