

# Utvrđivanje delecije H69/V70 u SARS-CoV-2 virusu upotrebom TaqPath reagensa

---

**Novosel, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:774936>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Lucija Novosel**

**Utvrdjivanje delecije H69/V70 u SARS-CoV-2  
virusu upotrebom TaqPath reagensa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija s hematologijom, Sveučilišta u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Marije Grdić Rajković i doc. dr. sc. Ivane Čelap. Diplomski rad izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu i u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice.

*Zahvaljujem se svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Mariji Grdić Rajković i doc. dr. sc. Ivani Čelap na uloženom trudu i pomoći prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na podršci tijekom studiranja.*

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Početak pandemije</b> .....	1
<b>1.2. Koronavirusi</b> .....	1
<b>1.3. Simptomi</b> .....	3
<b>1.4. Transmisija virusa i obrana organizma</b> .....	3
<b>1.5. Dijagnoza</b> .....	4
<b>1.5.1. Prijeanalitička faza</b> .....	5
<b>1.5.2. Analitička faza</b> .....	5
<b>1.5.3. Poslijeanalitička faza</b> .....	5
<b>1.6. Hematološki i biokemijski parametri</b> .....	6
<b>1.7. Liječenje</b> .....	7
<b>1.8. Lančana reakcija polimeraze</b> .....	7
<b>1.8.1. PCR metoda u stvarnom vremenu</b> .....	9
<b>1.8.2. RT-PCR</b> .....	10
<b>1.9. DNA sekvenciranje</b> .....	11
<b>1.9.1. Sekvenciranje nove generacije</b> .....	12
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	14
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
<b>3.1. Prikupljanje uzoraka</b> .....	15
<b>3.2. Izolacija RNA</b> .....	15
<b>3.2.1. Postupak ekstrakcije</b> .....	16
<b>3.2.1.1. Digestija s proteinazom K</b> .....	16
<b>3.2.1.2. Ispiranje kuglica</b> .....	16
<b>3.2.1.3. Elucija</b> .....	17
<b>3.3. RT-PCR</b> .....	17
<b>3.3.1. Priprema uzoraka</b> .....	18
<b>3.3.2. Provođenje reakcije</b> .....	20
<b>3.3.3. Očitavanje rezultata RT-PCR-a</b> .....	20
<b>3.4. Sekvenciranje</b> .....	25

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	26
<b>4.1. Mutacije virusa</b> .....	26
4.1.1. VOC.....	27
4.1.2. VUM.....	27
4.1.3. VOI.....	23
<b>4.2. Utjecaj mutacija na rezultate PCR testiranja</b> .....	29
<b>4.2.1. Utjecaj mutacija kod Omicron sojeva virusa na rezultate PCR</b> <b>testiranja</b> .....	29
<b>4.3. Rezultati provedene analize</b> .....	30
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	35
<b>6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA</b> .....	36
<b>7. LITERATURA</b> .....	38
<b>8. SAŽETAK / SUMMARY</b> .....	40
8.1. Sažetak.....	40
8.2. Summary.....	41
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	42
<b>TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# 1. UVOD

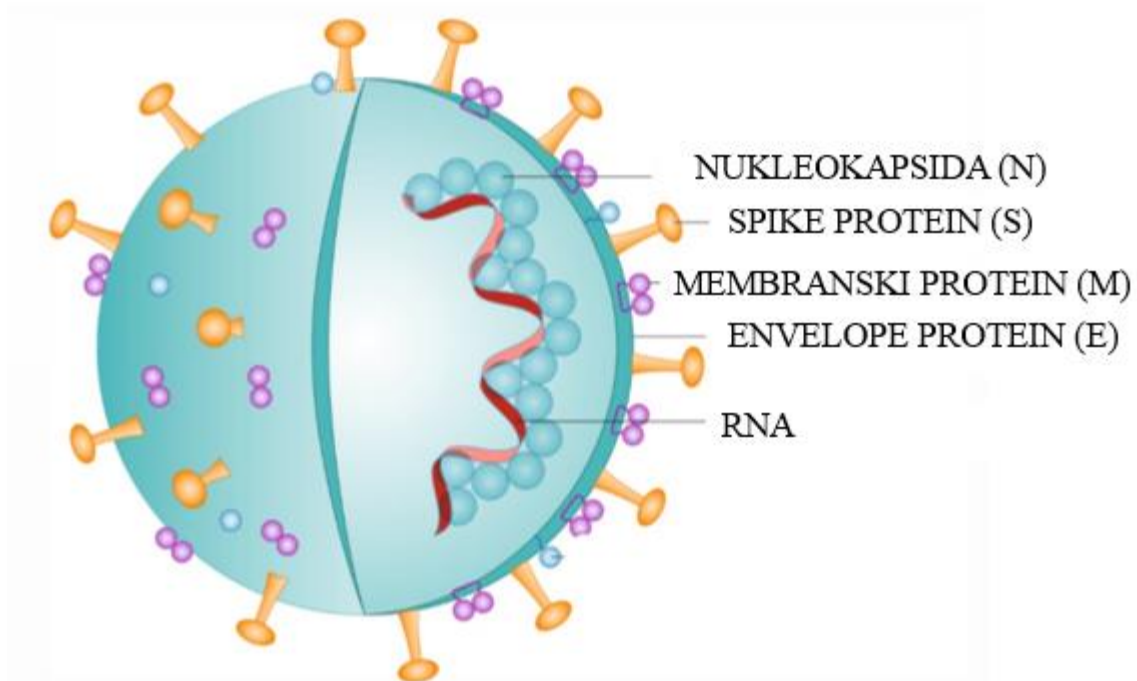
## 1.1. Početak pandemije

Novi  $\beta$ -koronavirus punog imena SARS-CoV-2 (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2) pojavio se u Kini krajem 2019. godine i uzrokovao globalnu pandemiju poznatu pod nazivom COVID-19. 7. siječnja 2020. godine Kineski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. China Centers for Disease Control and Prevention) objavio je izbijanje epidemije uzrokovane koronavirusom u Wuhanu u Kini, a Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization – WHO) proglasila je pandemiju te izbijanje novog virusa označila kao izvanrednu situaciju u javnom zdravstvu od međunarodne važnosti (engl. Public Health Emergency of International Concern – PHEIC) (Shi i sur., 2020; Dodig i sur., 2020).

## 1.2. Koronavirusi

Koronavirusi su odgovorni za respiratorne, enteralne, hepatičke i neurološke bolesti, a pripadaju porodici Coronaviridae i redu Nidovirales. Ova porodica ima dvije potporodice, a to su: Coronavirinae i Torovirinae. Coronavirinae možemo podijeliti u četiri kategorije:  $\alpha$ -koronavirusi među koje spadaju HCoV-229E i HCoV-NL63,  $\beta$ -koronavirusi koji uključuju HCoV-OC43, MERS-CoV, SARS-CoV i SARS-CoV-2,  $\gamma$ -koronavirusi koji inficiraju ptice i kitove te  $\delta$ -koronavirusi koji uzrokuju bolesti kod ptica i svinja (Sheikhzadeh i sur., 2020; Wang i sur., 2021).

Kad se jednom nađe u domaćinu, koronavirus se prilagođava novom okolišu uz pomoć velike mogućnosti mutacije i rekombinacije. SARS-CoV-2 je linearni jednolančani RNA virus. Cijeli viralni genom sadrži otprilike 29903 nukleotida. Dvije trećine genetske strukture čine geni odgovorni za kodiranje RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp), materijali za sintezu RNA, dva velika nestrukturna poliproteina koji nisu uključeni u odgovor naspram domaćina te otvoreni okviri čitanja (engl. open reading frames ORF1a-ORF1b). Ostatak RNA kodira za strukturne proteine poznate kao spike (S), envelope (E), membrane (M), nucleocapside (N) i ostale pomoćničke proteine koji su esencijalni za proizvodnju strukturnih komponenti virusa odgovornih za infekciju. S glikoprotein veže virus za membranu stanice domaćina te na taj način omogućuje ulazak virusa u stanicu (Aftzal, 2020.; Miao i sur., 2021).



Slika 1.: Građa virusa SARS-CoV-2 (slika preuzeta s: [www.nature.com](http://www.nature.com) i prilagođena)

Virus koristi enzimski receptor angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. *Angiotensin converting enzyme 2* – ACE2) koji konvertira angiotenzin 1 u angiotenzin 2 koji ima vazokonstriksijski učinak. Taj enzim je važna komponenta renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (engl. *Renin-angiotensin-aldosterone system* – RAAS), a nalazimo ga u pneumocitima tipa 2 i cilijarnim bronhijalnim epitelnim stanicama najviše u plućima, srcu, bubrezima i crijevima pa su zato ti organi najpodložniji infekciji. Domena koja veže receptor (engl. *Receptor-binding domain* – RBD) odgovorna je za vezanje virusa na ACE2 i fuziju membrane. N protein je s druge strane zadužen za replikaciju virusa u stanici domaćina (Sheikhzadeh i sur., 2020; Knežević Praveček i sur., 2020).

### **1.3. Simptomi**

U većini slučajeva oboljeli razviju prve simptome pet dana nakon infekcije. Period inkubacije varira od 1 pa sve do 28 dana, ali u prosjeku je to od 3 do 7 dana. Najčešći simptomi koji ukazuju na infekciju COVID-19 su umor, bol u mišićima, suhi kašalj, groznica, kratak dah, dispneja, dijareja, povraćanje, grlobolja i glavobolja (Elibol, 2021). Do sad se pokazalo da mlađa populacija oboljelih ima slabije izražene simptome te da kod njih virus uglavnom pogađa gornje dišne puteve. Starost i komorbiditeti kao što su dijabetes, kardiovaskularne bolesti, bubrežne bolesti, koagulopatija ili kronične bolesti dišnih puteva nepovoljno utječu na imunski odgovor pa se zbog toga kod takvih pacijenata očekuje izraženiji razvoj simptoma. Također infekcija može biti i asimptomatska pogotovo kod mlađih pacijenata (Shi i sur., 2020; Dodig i sur., 2020).

### **1.4. Transmisija virusa i obrana organizma**

SARS-CoV-2 je respiratorni virus pa je stoga glavni put transmisije putem respiratornih kapljica različitih veličina koje se oslobađaju kad zaražena osoba kašlje, kiše ili govori. Osim toga virus je detektiran u stolici i mokraći pa postoji i rizik od fekalno-oralne transmisije. Vjerojatnost prijenosa se smanjuje fizičkim distanciranjem i nošenjem maski kao i povećanom ventilacijom (Shi i sur., 2020).

Smatra se da za uspješnu obranu od virusa ljudski organizam mora biti dobrog općeg zdravlja i imati genetičku podlogu koja omogućuje aktivaciju specifične antiviralne obrane, a to se najviše odnosi na HLA (engl. *Human leukocyte antigen* – HLA). HLA imaju važnu ulogu u aktivaciji stanica prirodnih ubojica (engl. *natural killer cells* – NK cells) i T limfocita. Na razvoj težeg oblika bolesti utječe manjak HLA polimorfa koji imaju važnu ulogu u uklanjanju različitih virusa putem stanične imunosti. Osim toga, za razvoj težih simptoma odgovorni su citokinska oluja i nakupljanje hijaluronana. Kod težih oblika bolesti dolazi do velikog povećanja razina citokina kao što su interleukin-1 (IL-1) i faktor nekroze tumora (engl. *Tumor necrosis factor* - TNF) koji u plućima induciraju enzim hijaluronan sintetazu-2 (HAS2) što posljedično dovodi do akumulacije hijaluronana i fibrotičkih procesa u plućima (Dodig i sur., 2020; Hu i sur., 2021).



## 1.5. Dijagnoza

Za ranu dijagnozu COVID-19 ključno je rano, točno i pouzdano otkrivanje virusa u uzorcima dišnog sustava kako bi se na vrijeme krenulo s valjanom terapijom i spriječilo razvoj težih oblika bolesti. Laboratorijska dijagnostika uključuje tri faze (prijeanalitičku, analitičku i poslijeanalitičku) pri čemu je za svaku od njih bitno maksimalno smanjiti potencijalne pogreške. Osoblje u laboratoriju se mora strogo pridržavati dobre laboratorijske prakse s obzirom da se radi o infektivnom materijalu. To prvenstveno uključuje zaštitnu odjeću, rukavice i naočale kao i uporabu dezinficijensa. S obzirom da se radi o novom virusu, neophodno je korištenje poznatih dezinficijensa koji su se pokazali dobrim u borbi s ostalim koronavirusima, a to su 62-71% etanol, 0.5% hidrogen peroksid, kvaterni amonijevi spojevi i fenolni spojevi (Dodig i sur., 2020).

Za dijagnostiku SARS-CoV-2 koriste se dvije metode: molekularna analiza odnosno detekcija viralnih nukleinskih kiselina u uzorcima dišnog sustava lančana reakcija polimerazom s reverznom transkripcijom (engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR) u stvarnom vremenu i serološka analiza odnosno detekcija specifičnih protutijela u serumu (Dodig i sur., 2020).

Kod većine pacijenta infekcija uključuje period inkubacije, ranu fazu (od 2 do 6 dana), progresivnu fazu (od 7 do 19 dana) i fazu oporavka (od 10 do 33 dana). Viralne nukleinske kiseline mogu se detektirati već između 5. i 7. dana infekcije, a najvišu razinu (otprilike  $10^4$ - $10^7$  kopija/ml) postižu na kraju rane odnosno početkom progresivne faze. RBD, S i N proteini su glavni antigeni koji potiču proizvodnju protutijela (Shi i sur., 2020).

Imunoglobulin A (IgA) je glavni imunoglobulin za mukoznu obranu protiv virusa, imunoglobulin M (IgM) je najvažniji u akutnoj fazi upale, a imunoglobulin G (IgG) važan je na kraju infekcije te je znak preboljele infekcije. IgA se uobičajeno javlja oko 5. dana infekcije dok se IgG i IgM javljaju između 12. i 14. dana. Po završetku infekcije razine IgA i IgM se smanjuju, a razina IgG perzistira. Razine imunoglobulina ukazuju na humoralnu obranu protiv virusa i koriste se kao indikator statusa infekcije (Sheikhzadeh i sur., 2020).

### **1.5.1. Prijeanalitička faza**

Najčešće se za otkrivanje infekcije koriste uzorci iz gornjih dišnih puteva (nazofaringealni ili orofaringealni obrisak). Kod bolesnika s ozbiljnijom i težom kliničkom slikom mogu se koristiti i uzorci sputuma, endotrahealni i bronhoalveolarni ispirak. Kod preminulih bolesnika uzima se i uzorak plućnog tkiva. Obrisci nazofarinksa i orofarinksa se uzimaju pomoću štapića izrađenih od sintetičkih materijala te se pohranjuju u viralni transportni medij ili fiziološku otopinu. Nakon uzorkovanja uzorci se moraju skladištiti na temperaturi od 2 do 8°C ili u kratkom roku transportirati do laboratorija. Nazofaringealni i orofaringealni uzorci mogu biti pohranjeni na temperaturi hladnjaka maksimalno pet dana, a sputum i bronhoalveolarni ispirak dva dana. Postmortalni uzorci se mogu čuvati maksimalno 24 sata. Za dugoročnu pohranu preporučuju se izvršiti izolaciju viralne RNA te ju skladištiti zamrzavanjem na -70°C, ali u tom slučaju treba izbjegavati višestruko zamrzavanje i odmrzavanje (Dodig i sur., 2020).

### **1.5.2. Analitička faza**

Detekcija virusa uključuje izolaciju virusne RNA, prijepis u cDNA te PCR amplifikaciju tj. umnožavanje i potvrdu da se radi o virusnim nukleinskim kiselinama. Trenutno se za dokazivanje virusne infekcije koriste geni N, E, S i RdRP. Osoba koja provodi analizu treba biti dobro upoznata i imati iskustva s PCR metodom, a laboratorij u kojem se analiza provodi mora biti akreditiran za PCR tehnologiju (Dodig i sur., 2020).

### **1.5.3. Poslijeanalitička faza**

Za detekciju virusa bitno je i odakle dolazi potencijalno zaražena osoba odnosno je li u njenom okruženju zabilježeno značajnije širenje virusa. Ako je, dovoljno će biti da se RT-PCR-om utvrdi prisutnost samo jednog gena da bismo mogli reći da je osoba inficirana. Isto tako mogući su i "lažno negativni" rezultati. Do njih može doći zbog lošeg uzorkovanja, nepravilnog skladištenja ili transporta uzoraka te ako uzorak uzimamo na samom početku ili kraju infekcije. Ukoliko se prvom RT-PCR analizom ne utvrdi prisutnost virusa, kod osobe za koju postoje velike sumnje da je inficirana, provodi se i druga analiza. Do "lažno pozitivnih" rezultata može

doći zbog kontaminacije koju možemo izbjeći pravilnim rukovanjem i skladištenjem uzoraka te provođenjem RT-PCR analize prema standardima (Dodig i sur., 2020).

## **1.6. Hematološki i biokemijski parametri**

Kod COVID-19 pacijenata zabilježene su različite vrijednosti hematoloških i biokemijskih parametara ovisno o jačini i početku infekcije. Prema dosadašnjim podacima na početku infekcije obično dolazi do smanjenja razine leukocita praćene limfocitopenijom tj. smanjenjem broja limfocita, povećanja razine monocita i povećane aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze (LDH) koji je indikator ozljede pluća kao i enzima aminotransferaze (AST) ili alanin aminotransferaze (ALT) koji su indikatori ozljeda jetre ili drugih organa. Nespecifični upalni markeri kao što su C reaktivni protein (CRP), feritin, IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$  također su povišeni (Dodig i sur., 2020).

Ukoliko na početku bolesti dođe do značajnije limfocitopenije, to je obično negativan prognostički faktor. Kod pacijenata s ozbiljnijim simptomima javlja se neutrofilija odnosno povećanje razine neutrofilnih granulocita dok istovremeno dolazi do smanjenja broja limfocita. Također su povećane razine uree, kreatinina i amilaze (Dodig i sur., 2020).

Nakon početnog oštećenja organa kod nekih pacijenata dolazi do pretjeranog stvaranja proupalnih citokina što dovodi do prevelike aktivacije makrofaga i stanja poznatog kao citokinska oluja koje pak posljedično uzrokuje akutnu ozljedu pluća i akutni respiratorni distress sindrom (engl. *Acute respiratory distress syndrome* – ARDS) (Meyer i sur., 2021).

## 1.7. Liječenje

U liječenju COVID-19 koriste se antivirusni lijekovi, protutitijela, antikoagulansi, antifibrotici i imunomodulatori. Ozbiljnije simptome koji zahtijevaju intenzivnu njegu razvije u prosjeku 5% oboljelih od COVID-19 od kojih je 20% hospitaliziranih. Više od 75% hospitaliziranih bolesnika treba dodatnu terapiju kisikom. Pacijenti koji razviju teže simptome kao što su akutna respiratorna insuficijencija ili ARDS liječe se prema smjernicama utemeljenim na dokazima. Novija istraživanja pokazuju da terapija deksametonom smanjuje smrtnost bolesnika kojima je potreban dodatan kisik (Wiersinga WJ i sur., 2020).

Učinkovito cjepivo vrlo je bitno za smanjenje širenja SARS-CoV-2. Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency* – EMA) odobrila je nekoliko cjepiva za primjenu u zemljama Europske unije, a to su: Comirnaty (BioNTech and Pfizer), COVID-19 Vaccine Valneva, Nuvaxovid (Novavax), Spikevax (Moderna), Vaxzevria (AstraZeneca) i Jcovden (Janssen) ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

## 1.8. Lančana reakcija polimeraze

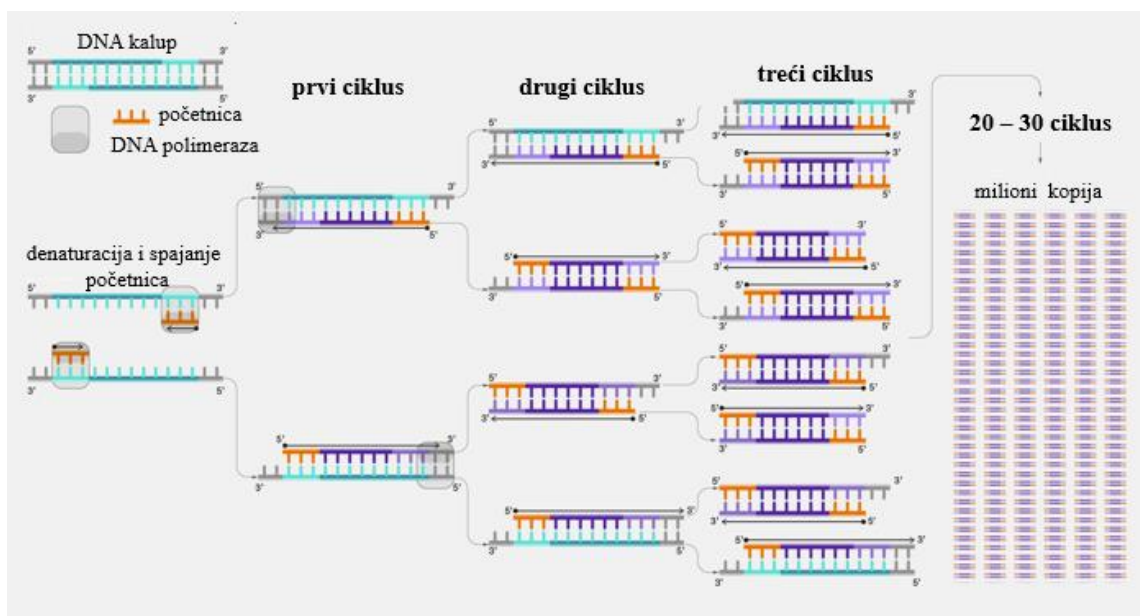
Lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction* – PCR) je metoda koja se koristi u molekularnoj biologiji za umnažanje dijelova DNA uz pomoć enzima DNA polimeraze. PCR je prvi put opisao Kary Mullis 1985. godine zajedno sa svojim suradnicima iz Cetus korporacije, a prvi slijed DNA na kojem je ova metoda uspješno primijenjena bio je ljudski gen za beta globulin. Ubrzo je stekla veliku popularnost i postala jedna od najčešće biranih metoda umnažanja gena zbog tog što je brza i jednostavna, zahtjeva malu količinu uzorka (0.1 – 0.5 µg DNA ili RNA) i omogućuje stvaranje od  $10^6$  do  $10^9$  kopija uzorka (Ramesh i sur., 1992).

Taq DNA polimeraza izolirana je iz termostabilne bakterije *Thermus aquaticus* koja pripada termofilnoj obitelji eubakterija *Archaeobacteria*. To je prva izolirana i dosad najbolje istražena DNA polimeraza te se koristi u većini rutinskih reakcija. Specifična aktivnost komercijalno dostupnih Taq polimeraza je oko 80000 jedinica/mg enzima (Bhadra i sur., 2020).

Glavne komponente PCR-a su enzim termostabilna DNA polimeraza, sintetski oligonukleotidi koji služe kao početnice, deoksinukleozid trifosfati (dNTP-ovi) nužni za građu

produkata, divalentni kationi važni za aktivnost enzima ( $Mg^{2+}$  ili rjeđe  $Mn^{2+}$ ), pufer za održavanje pH (najčešće Tris-Cl pufer) i DNA kalup koji želimo umnožiti. Kalup se dodaje u jednolančanom ili dvolančanom obliku neovisno o veličini. Dvolančani DNA kalupi se denaturiraju na temperaturi koja je određena njihovim sastavom baza, odnosno G-C nukleotidnih parova. Što je veći udio G-C, potrebna je viša temperatura za pucanje veza između parova (Ramesh i sur., 1992).

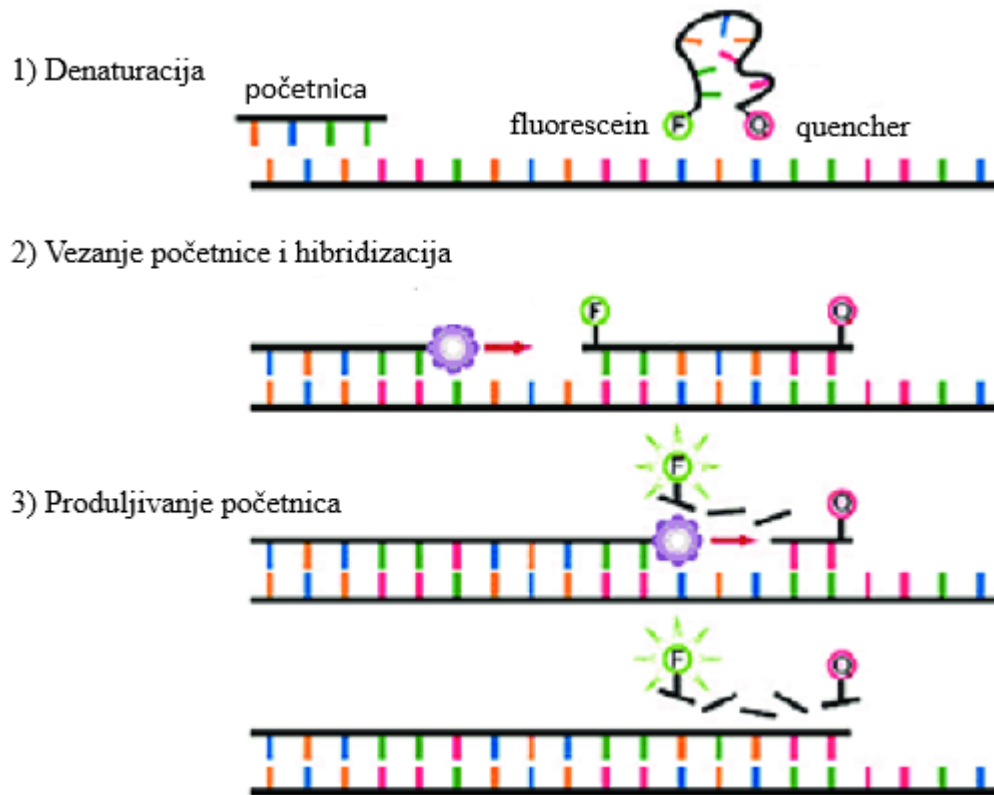
PCR ciklus sastoji se od 3 dijela: denaturacija DNA kalupa, spajanje početnica s kalupom i i produljivanje početnica polimerazom. Ove se faze odvijaju na različitim temperaturama i izmjenjuju sve dok su prisutne sve komponente u dovoljnoj količini. Denaturacija se najčešće izvodi na temperaturi od 94 do 95°C što je najviša temperatura koju enzim podnosi. Za uspješno spajanje početnice s kalupom ključna je optimalna temperatura koja je najčešće nekoliko stupnjeva niža od temperature taljenja (od 37 do 72°C). Ukoliko je ona previsoka početnice slabo prijanjaju i prinos produkata je malen. Preniska temperatura uzrokuje nespecifično spajanje početnica i umnažanje neželjenih dijelova DNA. Produljivanje početnica se vrši na temperaturi određenoj polimerazom koja se koristi u reakcijskoj smjesi. Kod Taq polimeraze ta temperatura je između 72 i 78°C Na kraju svakog ciklusa novosintetizirani produkt služi kao kalup za sljedeću reakciju što dovodi do eksponencijalnog umnažanja početnog materijala (Ramesh i sur., 1992).



Slika 2.: Shematski prikaz PCR (slika preuzeta s: [www.genome.gov](http://www.genome.gov) i prilagođena)

### 1.8.1. PCR metoda u stvarnom vremenu

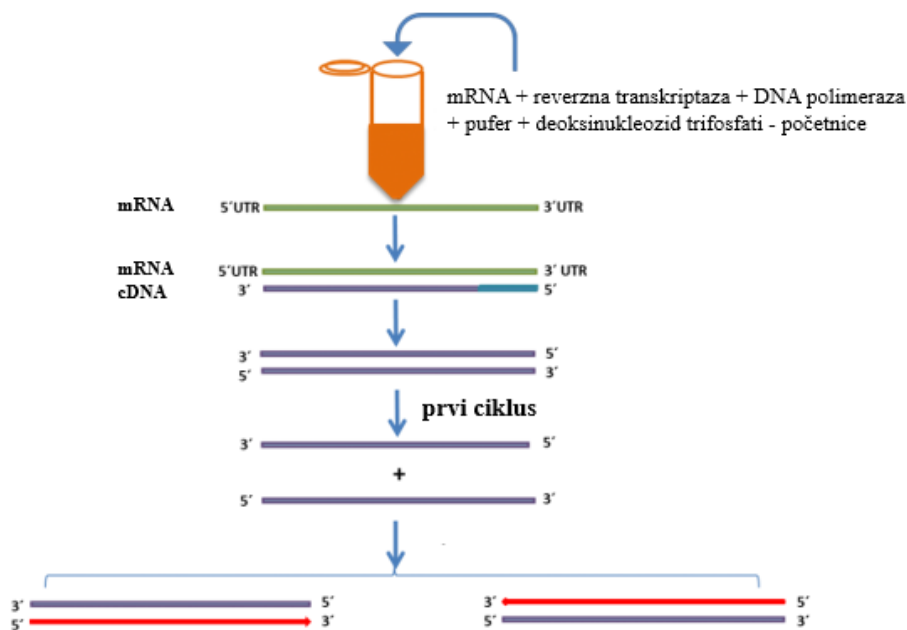
Kod klasične PCR metode detekcija umnoženog materijala vrši se nakon provedenih svih ciklusa. PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) je metoda kod koje je omogućeno praćenje umnažanja za vrijeme trajanja same reakcije pomoću fluorescentno označenih proba. TaqMan tehnologija za detekciju PCR produkta koristi oligonukleotid kod kojeg je na 5' kraju vezani reporter odnosno izvor fluorescentne svjetlosti, a na 3' kraju prigušivač fluorescencije, tj. quencher – skupina koja gasi fluorescenciju. Između reportera i prigušivača nalazi se sekvenca nukleotida koja se nakon denaturacije DNA veže na specifičan dio kalupa. Taq polimeraza svojom 3'-5' polimeraznom aktivnošću dodaje na 3' kraju početnica nukleotide koji su komplementarni slijedu DNA kalupa. Dolaskom Taq polimeraze do vezane probe dolazi do njezinog cijepanja 5'-3' egzozonukleaznom aktivnošću enzima što rezultira udaljavanjem prigušivača i reportera što rezultira emitiranjem fluorescencije (Čačev i Kapitanović, 2007).



Slika 3.: TaqMan PCR tehnologija (slika preuzeta s: [www.gibthai.com](http://www.gibthai.com) i prilagođena)

## 1.8.2. RT-PCR

U RT-PCR (engl. *Reverse transcription polymerase chain reaction* – RT-PCR) kao kalup koristimo jednolančanu molekulu RNA. Ova metoda ima dodatni korak u odnosu na standardni PCR. RNA molekulu je potrebno prevesti u komplementarnu DNA (cDNA). To je moguće uz enzim reverznu transkriptazu (engl. reverse transcriptase – RT) poznatu i pod imenom RNA – ovisna DNA polimeraza. Nakon toga započinje klasičan ciklus PCR reakcija te novonastala cDNA postaje kalup za amplifikaciju. Ova metoda omogućuje da se detektira mali broj molekula RNA pa je zato vrlo osjetljiva i ima važnu ulogu u dijagnostici genetskih bolesti, neoplastičnih bolesti kao i dokazivanju RNA virusa kao što su SARS-CoV-2, virus hepatitisa C, HIV ili virusi influence A (Farkas i Holland, 2009).

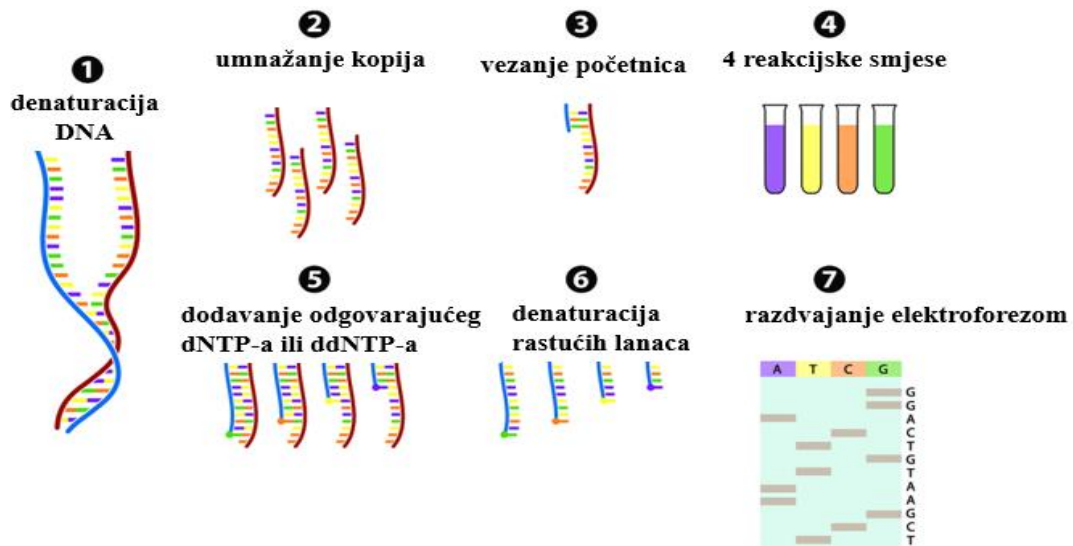


Slika 4.: Shematski prikaz RT-PCR (slika preuzeta s: [www.genaxxon.com](http://www.genaxxon.com) i prilagođena)

## 1.9. DNA sekvenciranje

U sekvenciranje DNA ubraja se svaka metoda koja omogućuje određivanje točnog slijeda nukleotida u molekuli DNA. Fred Sanger 1953. odredio je sekvencu inzulina te time označio prvo sekvenciranje biološke molekule. Danas postoje brojne metode sekvenciranja DNA koje se međusobno razlikuju prema različitim svojstvima kao što su načelo sekvenciranja, način pripreme uzorka, dužina trajanja, točnost, brzina, a podijeljene su prema generacijama (Shendure i sur., 2017).

U prvu generaciju spadaju sekvenciranje sintezom (Sangerova dideoksi-metoda) i sekvenciranje cijepanjem (Maxam-Gilbertovo sekvenciranje). Za dideoksi-metodu potrebni su DNA uzorak, početnica za sekvenciranje, DNA polimeraza, deoksinukleotidi (dNTP), dideoksinukleotidi (ddNTP) i reakcijski pufer. Koriste se četiri reakcijske smjese s radioaktivno obilježenim dNTP i ddNTP. DNA polimeraza u svakoj reakciji dodaje 3' – kraju lanca DNA odgovarajući dNTP ili ddNTP. ddNTP molekule nemaju hidroksilnu skupinu na trećem ugljikovom atomu riboze pa se nakon njihovog vezanja daljnje produljenje lanca zaustavlja. Na taj način se dobiju fragmenti lanca DNA različitih duljina koji završavaju molekulom ddNTP te se potom razdvajaju elektroforezom s obzirom na njihovu veličinu.



Slika 3.: Shematski prikaz Sangerove dideoksi metode (slika preuzeta s:

<https://www.researchgate.net> i prilagođena)



Sangerova metoda je nakon nekog vremena poboljšana pa je tako umjesto obilježavanja radioaktivnim izotopima uvedeno fluorimetrijsko određivanje, a umjesto elektroforeze na poliakrilamidnom gelu, kapilarna elektroforeza. Te promjene su dovele do razvoja automatiziranih uređaja za DNA sekvenciranje što je ubrzalo vrijeme i smanjilo troškove sekvenciranja (Štimac i Martinković, 2021).

### **1.9.1. Sekvenciranje nove generacije**

Sangerovo sekvenciranje omogućilo je potpuno sekvenciranje ljudskog genoma i postavilo temelj za razvoj tehnologija sekvenciranja druge, treće i četvrte generacija koje se zajedničkim imenom nazivaju sekvenciranja novih generacija (engl. *next generation sequencing* – NGS). NGS uključuje različite metode sekvenciranja u kojima se milijuni predložaka istovremeno sekvenciraju u jednoj reakciji, brzina postupka je veća u odnosu na prvu generaciju, troškovi su niži, a prepoznavanje izlazne sekvence je moguće bez upotrebe elektroforeze (Low i Tammi, 2017).

Glavno obilježje NGS su relativno kratka očitavanja te računalno sastavljanje sekvence pa su zbog toga razvijeni programi za sastavljanje genoma. Načela sekvenciranja kratkih očitavanja (engl. *short-read sequencing*) možemo podijeliti na sekvenciranja ligacijom (engl. *sequencing by ligation* – SBL) i sekvenciranja sintezom (engl. *sequencing by synthesis* – SBS). U SBS tehnologiju spada pirosekvenciranje koje se temelji na otpuštanju molekule pirofosfata (PPi) svaki put kada DNA polimeraza produži DNA lanac. Svaka molekula PPi pokreće niz reakcija te se ne poslijetku bilježi svjetlosna energija odnosno broj fotona koji odgovara broju nastalih PPi. Sekvenciranje reverzibilnom terminacijom spada u SBL tehnologiju. Ova metoda se temelji na sekvenciranju DNA fragmenata kemijskom sintezom slično kao kod Sangerovog sekvenciranja, samo što je u ovom slučaju blokada DNA polimerizacije reverzibilna. Terminalni nukleotidi obilježeni su fluorescentnom bojom pa omogućuju prepoznavanje pojedinih baza nakon dodavanja u lance DNA (Štimac i Martinković, 2021).

Tehnologija sekvenciranja treće generacije omogućila je duga očitavanja (engl. *long-read sequencing*) koja čine i do nekoliko kilobaza. Prva takva tehnika bila je sekvenciranje molekula u stvarnom vremenu (engl. *single-molecule real-time sequencing* – SMRT) koje se temelji na pristupu sekvenciranja sintezom, ali se umjesto cijelih nukleotidnih baza obilježava samo njihov fosfatni kraj i reakcija se odvija u nanofotonskim komorama za vizualizaciju. Iduća tehnika treće generacije je jednomolekularno sekvenciranje u stvarnom vremenu (engl. *true single-molecule sequencing* – tSMS). Ova tehnika se također temelji na sekvenciranju sintezom, a prednost tSMS-a je to što ne zahtijeva PCR amplifikaciju čime su izbjegnuti otkloni zbog gvanin-citozinskog sadržaja koji su primijećeni u drugim tehnikama (Štimac i Martinković, 2021).

Jednomolekularno sekvenciranje nanoporama je tehnologija sekvenciranja četvrte generacije. Prednost primjene nanopora su jako duga očitavanja (engl. *ultra-long sequencing*) bez obilježavanja. Nanosenzori tvore kanal koji omogućuje otkrivanje svakog nukleotida prisutnog u DNA lancu. Tehnika se temelji na prolasku kroz pore u membrani koja odvaja zasebne komore. Postoje dvije vrste nanopora za sekvenciranje DNA: biološke i čvrste. Detekcija je moguća zbog razlike potencijala koja nastaje kada nabijena molekula DNA prođe kroz nanopore u membrani (Štimac i Martinković, 2021).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

SARS-CoV-2 virus podložan je mutacijama. Prisutnost mutacija može prouzročiti probleme u njegovom otkrivanju i dijagnostici. Kako će pojedina mutacija utjecati na rezultate korištenih testova ovisi o nekoliko čimbenika: dizajnu testa, sekvenci virusa koja je mutirala, prevalenciji virusa u populaciji.

Soj virusa Omicron B.1.1529. pojavio se u Americi te je proglašen zabrinjavajućom varijantom virusa (engl. *Variants of concern* – VOC) 30. studenog 2021. U Omicron sojevima je zabilježeno više mutacija u odnosu na prethodne sojeve, a mutacije su najčešće na S genu. Delecija aminokiselina H69 i V70 na S genu je česta, a zbog nedostatka navedenih aminokiselina, dolazi do negativnih rezultata za S gen prilikom testiranja s testovima koji koriste S gen za detekciju SARS-CoV-2 virusa.

Cilj ovog diplomskog rada je usporediti rezultate RT-PCR testiranja upotrebom komercijalnog test paketa kojim se dokazuje prisutnost virusa na temelju dokazivanja tri testna gena (ORF1ab, N i S) s rezultatima sekvenciranja u uzorcima kod kojih RT-PCR nije dokazao prisutnost S gena.

Ciljevi istraživanja:

- Provesti RT-PCR testiranje 30 obrisaka nazofarinksa
- Sekvenciranjem utvrditi soj virusa
- Utvrditi je li u uzorcima kod kojih nije dokazana prisutnost S gena prisutna delecija H69 i V70

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

#### **3.1. Prikupljanje uzoraka**

Prije uzorkovanja potrebno je osigurati da osoba koja uzima uzorak ima zaštitnu opremu koja uključuje rukavice, zaštitni ogrtač, FFP2 ili FFP3 zaštitnu masku i zaštitne naočale te po potrebi kaljače, vizir i kapu za glavu ukoliko su dostupni. Pacijent ne bi trebao jesti, piti, pušiti niti prati zube najmanje 30 minuta prije uzimanja brisa. Idealno bi bilo da se usta isperu vodom 30 minuta ranije ukoliko se radi o orofaringealnom brisu. Kod uzimanja nazofaringealnog brisa potrebno je bris uvesti duboko u nosnicu i ostaviti u mjestu nekoliko sekundi, rotirati po površini sluznice te izvući bez doticanja kože nosa. Uzima se uzorak iz obje nosnice. Orofaringealni bris se uzima s obje tonzile i sa stražnjeg zida ždrijela. Nakon uzimanja uzorka bris se uranja u epruvetu koja sadrži medij za transport virusa, a zaštitna oprema skida i odlaže na za to propisan način.

#### **3.2. Izolacija RNA**

Za izolaciju molekule RNA iz uzoraka korišten je MagMAX Viral/Pathogen II Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD) koji omogućava brzu izolaciju nukleinskih kiselina (RNA ili DNA) iz medija za transport virusa ili uzorka sline. Izolacija se vrši pomoću magnetnih kuglica koje vežu negativno nabijenu RNA. U ovom slučaju korišteni su nazofaringealni i orofaringealni brisevi prikupljeni iz gornjeg respiratornog trakta pacijenta kod kojih je postojala sumnja da su inficirani SARS-CoV-2 virusom. Izolirane nukleinske kiseline su visoko pročišćene te se mogu koristiti za brojne metode u dijagnostici kao što su sekvenciranje ili PCR.

Prije samog postupka izolacije potrebno je pripremiti otopinu 80% etanola koristeći vodu molekularne čistoće koja ne sadrži nukleaze. Voda ne smije sadržavati navedene enzime jer bi moglo doći do razgradnje RNA, ali ne smije biti tretirana DEPC tehnologijom jer bi to moglo inhibirati druge enzimske reakcije. Za uzorak od 200  $\mu$ L potrebno je 0,75 mL otopine 80% etanola. Uvijek se priprema 10% više otopine nego što bi trebalo biti iskorišteno s obzirom na broj uzoraka za izolaciju.

### **3.2.1. Postupak ekstrakcije**

Molekule RNA izoliraju se s pomoću kuglica za vezanje te je potrebno pripremiti njihovu mješavinu (engl. *Binding bead mix*). Kuglice za vezanje se homogeniziraju miješanjem na vorteksu, mješavina ukupnog volumena 275  $\mu\text{L}$  priprema se dodavanjem 10  $\mu\text{L}$  kuglica za vezanje i 265  $\mu\text{L}$  otopine za pripremu mješavine. To je količina potrebna za ekstrakciju jednog uzorka pa je, ovisno o broju uzoraka, potrebno prilagoditi ukupnu količinu. Treba uzeti u obzir i slijepu probu. Mješavina kuglica za vezanje je viskozna pa je potreban poseban oprez prilikom pipetiranja da se osigura propisana količina. Za svaki uzorak se koristi novi nastavak za pipetu kako ne bi došlo do varijacija u volumenu zbog velike viskoznosti. Mješavinu treba promiješati prije svakog dodavanja da se kuglice jednoliko rasporede u sve uzorke.

#### **3.2.1.1. Digestija s proteinazom K**

U svaku jažicu na KingFisher™ 96 Deep-Well Plate ploči (Thermo Fisher Scientific, SAD) dodaje se 275  $\mu\text{L}$  mješavine kuglica, 200  $\mu\text{L}$  uzorka i 5  $\mu\text{L}$  proteinaze K. Prilikom dodavanja proteinaze K potrebno je obratiti pažnju na to da se vrh pipete ne gurne u donji sloj kako se oni međusobno ne bi izmiješali. Sve navedeno dodaje se i u slijepu probu, a umjesto uzorka dodaje se 200  $\mu\text{L}$  vode bez nukleaza. Ploča s jažicama se zatvori uz pomoć MicroAmp™ Clear Adhesive Film (Thermo Fisher Scientific, SAD) te potom miješa na 1,050 rpm kroz 2 minute. Ploča se inkubira na 65°C tijekom 5 minuta i ponovno miješanje na 1,050 rpm kroz 5 minuta. Ploča s jažicama stavlja se na magnetni stalak na 10 minuta kako bi se prikupile sve magnetne kuglice.

#### **3.2.1.2. Ispiranje kuglica**

Treba imati na umu da se u otopini za ispiranje mogu razviti bijele ili smeđe čestice koje neće utjecati na krajnji rezultat. Ploča s uzorcima ostaje na magnetnom stalku, poklopac se pažljivo ukloni te se odvoji supernatant iz svake jažice pri čemu je potrebno paziti da se ne pomaknu kuglice. Ploča se uklanja s magnetnog stalka, dodaje se 500  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje u svaki uzorak, poklopac se zatvori i miješa 1 minutu na 1,050 rpm. Uzorci se vraćaju na magnetni

stalak 2 minute odnosno dok se ne prikupe sve kuglice. Nakon toga se navedeni koraci ponavljaju dva puta, ali se umjesto otopine za ispiranje koristi 80% otopina etanola. Prvi put se svakom uzorku dodaje 500  $\mu$ L otopine, a drugi put 250  $\mu$ L. Kuglice je zatim potrebno osušiti miješanjem na 1,050 rpm 2 minute bez poklopca.

### **3.2.1.3. Eluacija**

50  $\mu$ L eluacijskog pufera dodaje se u svaki uzorak koji se zatvori pomoću MicroAmp™ Clear Adhesive Filma (Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorci se miješaju 5 minuta na 1,050 rpm, inkubiraju na temperaturu od 65°C 10 minuta. Uzorci se ponovno miješaju 5 minuta na 1,050 rpm i stavljaju na magnet 3 minute odnosno dok se ne razbistre kako bi se mogle prikupiti kuglice. Eluati se pažljivo prenesu na novu ploču s jažicama i zatvore pomoću MicroAmp™ Clear Adhesive Filma (Thermo Fisher Scientific, SAD) u što kraćem vremenu kako bi se izbjegla evaporacija.

Cijeli postupak se odvija na automatiziranom sustavu za ekstrakciju nukleinskih kiselina, King Fisher Flex (Thermo Fisher Scientific, SAD).

## **3.3. RT-PCR**

Za kvalitativnu analizu prethodno izoliranih uzoraka RNA koristi se TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koristi se metoda RT-PCR u stvarnom vremenu što znači da se prati amplifikacija DNA tijekom PCR metode, a ne prethodno amplificirane molekule. Amplifikacija se provodi na uređaju Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Instrument (Thermo Fisher Scientific, SAD). Utvrđuje se prisutnost jednog od sljedećih gena: ORF1ab, N protein i S protein pomoću fluorescencije, a dobiveni podaci se analiziraju i interpretiraju uz pomoć programa Applied Biosystems™ COVID-19 Interpretive Software (Thermo Fisher Scientific, SAD).

### 3.3.1. Priprema uzoraka

Prije upotrebe reagense je potrebno otopiti na ledu, promiješati na vorteks miješalici te kratkim centrifugiranjem spustiti.

Priprema pozitivne kontrole:

2  $\mu\text{L}$  TaqPath™ COVID-19 Control kontrole (Thermo Fisher Scientific, SAD) koja sadrži  $1 \times 10^4$  kopija/ $\mu\text{L}$  razrjeđuje se s 98  $\mu\text{L}$  Control Dilution Buffer otopine (Thermo Fisher Scientific, SAD) u epruveti za mikrocentrifugu kako bi se pripremila radna koncentracija od 25 kopija/ $\mu\text{L}$ . Nakon pripreme kontrolni uzorak je potrebno dobro promiješati na vorteksu te kratkim centrifugiranjem spustiti na dno epruvete. U idućem koraku u novoj epruveti za mikrocentrifugiranje dodaje se 87.5  $\mu\text{L}$  TaqPath™ COVID-19 Control Dilution Buffer (proizvođač Thermo Fisher Scientific, SAD) otopine i 12.5  $\mu\text{L}$  prethodno razrijeđene kontrolne otopine.

Priprema reakcijske smjese prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. : Volumeni komponenata reakcijske smjese

SASTOJAK	VOLUMEN ZA 1 RNA UZORAK	VOLUMEN ZA n RNA UZORAKA I 2 KONTROLE
TaqPath™ 1-Step Multiplex Master Mix (No ROX™) (4X)	6.25 $\mu\text{L}$	6.875 x (n + 2) $\mu\text{L}$
COVID-19 Real Time PCR Assay Multiplex	1.25 $\mu\text{L}$	1.375 x (n + 2) $\mu\text{L}$
voda bez nukleaza	7.50 $\mu\text{L}$	8.25 x (n + 2) $\mu\text{L}$
ukupni volumen reakcijske smjese	15.0 $\mu\text{L}$	-

15.0  $\mu\text{L}$  pripremljene reakcijske smjese dodaje se u svaku jažicu. Ploča s jažicama kratko se vorteksira te kratkim centrifugiranjem reakcijska smjesa spušta se na dno jažice. U jažice se dodaju uzorci RNA, kontrolna otopina ili slijepa proba prema Tablici 2.

Tablica 2.: Volumeni komponenata smjese za PCR

SASTOJAK	VOLUMEN		
	RNA uzorak	kontrolna otopina	slijepa proba
reakijska smjesa	15.0 $\mu\text{L}$	15.0 $\mu\text{L}$	15.0 $\mu\text{L}$
izolirani uzorak RNA	10.0 $\mu\text{L}$	-	
pozitivna kontrola (razrijeđena TaqPath™ COVID-19 Control otopina)	-	2.0 $\mu\text{L}$	-
voda bez nukleaza	-	8.0 $\mu\text{L}$	-
slijepa proba (tretirana kao izolirani uzorak)	-	-	10.0 $\mu\text{L}$
ukupni volumen	25.0 $\mu\text{L}$	25.0 $\mu\text{L}$	25.0 $\mu\text{L}$

Ploča s jažicama se čvrsto zatvori uz pomoć MicroAmp™ Optical Adhesive pokrova (proizvođač Thermo Fisher Scientific, SAD) kako ne bi došlo do kontaminacije i miješanja sadržaja između jažica tijekom provođenja PCR reakcije te se stavlja na vorteks mješalicu gdje se miješa na najvećoj brzini 10 – 30 sekundi. Nakon miješanja slijedi centrifugiranje 1 – 2 minute na  $\geq 650$  RCF da bi se uklonili mjehurići i tekući dio skupio na dnu jažica.



### 3.3.2. Provođenje reakcije

RT-PCR reakcija provodi se na se na Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real Time PCR instrumentu (Thermo Fisher Scientific, SAD). Temperatura, trajanje i broj ciklusa pojedinog koraka prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3.: Temperature, trajanje i broj PCR ciklusa

KORAK	NAZIV	TEMPERATURA	VRIJEME	BROJ CIKLUSA
1.	<b>UNG inkubacija</b>	25°C	2 minute	1
2.	<b>reverzna transkripcija</b>	53°C	10 minute	1
3.	<b>aktivacija</b>	95°C	2 minute	1
4.	<b>denaturacija</b>	95°C	3 sekunde	40
5.	<b>produljivanje početnica</b>	60°C	30 sekundi	

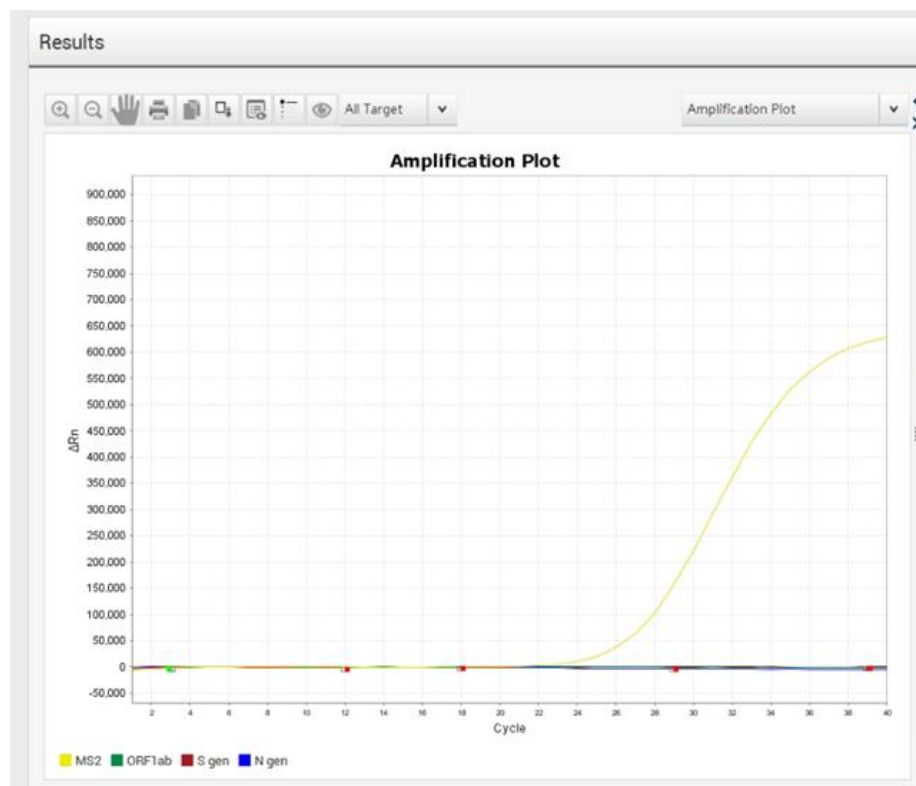
### 3.3.3. Očitavanje rezultara RT-PCR-a

Rezultati RT-PCR-a mogu se očitati pomoću softvera za očitavanje rezultata, koji u svakom uzorku očitava Ct vrijednosti za svaki ispitivani gen te pomoću algoritma koji sadržava sve kombinacije pozitivnih i negativnih očitavanja prenosi kvalitativni rezultat (kao pozitivan ili negativan) u laboratorijski informacijski sustav iz kojega se potom izdaje nalaz.

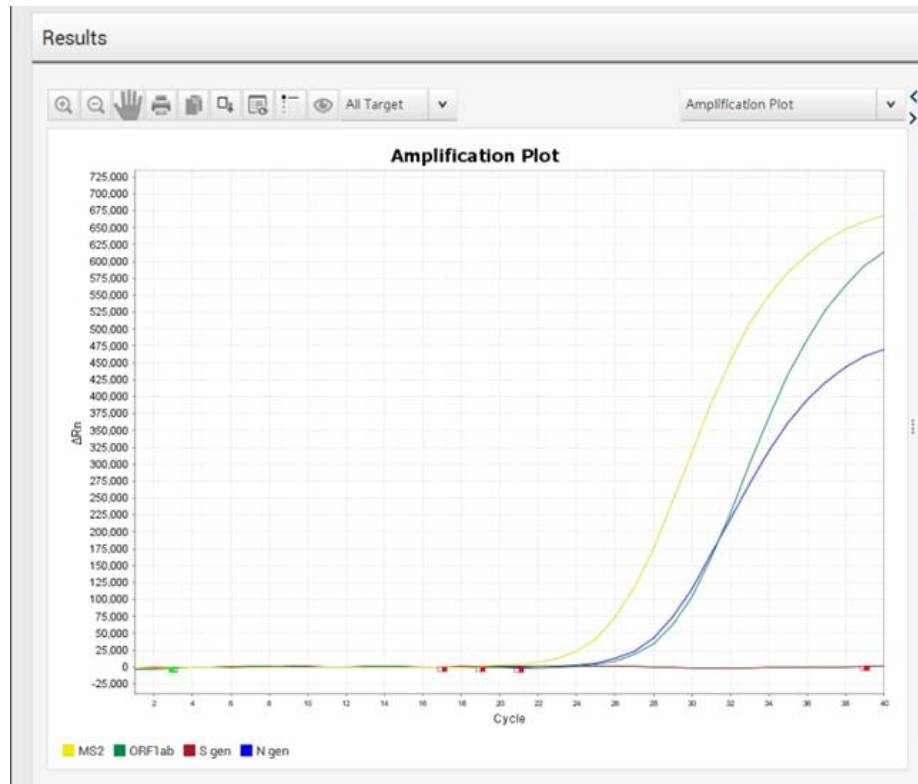
Osim pomoću softvera za analizu, rezultati se mogu očitavati i manualno na sljedeći način:

1. obilježi se jažica u kojoj se nalazi negativna kontrola te se očitava rezultat - sva tri ispitivana gena moraju biti negativna ( $Ct > 37$ ), interna kontrola mora biti pozitivna ( $Ct \leq 32$ )

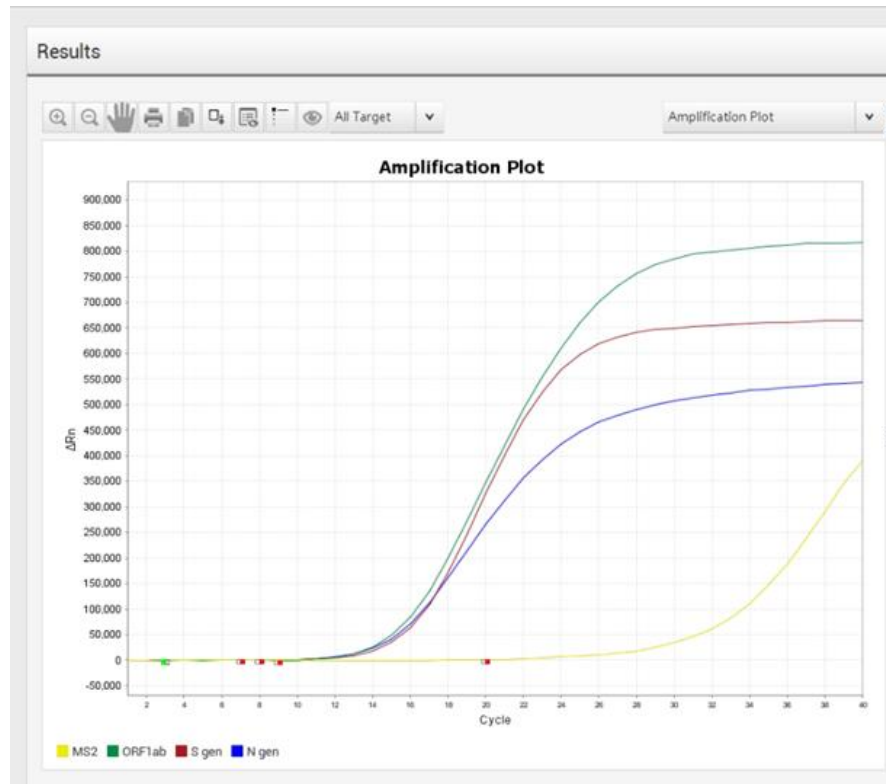
2. obilježi se jažica u kojoj se nalazi pozitivna kontrola te se očita rezultat - sva tri gena moraju biti pozitivna do 37 ciklusa umnažanja ( $Ct \leq 37$ ), interna kontrola mora biti negativna ( $Ct > 37$ ). Po potrebi se može namjestiti prag (engl. threshold) pozadinske fluorescencije da bi se preciznije očitali ciklusi umnažanja ( $Ct$  vrijednosti) uzoraka pacijenata.
3. obilježe se jažice s pozitivnom kontrolom i s uzorcima pacijenata te se očitaju rezultati pacijenata:
  - pozitivan rezultat (dokazano prisustvo virusa SARS-CoV-2) - 2 od 3 ispitivana gena moraju biti pozitivna do 37 ciklusa umnažanja ( $Ct \leq 37$ ), a interna kontrola mora biti pozitivna ( $Ct \leq 32$ ) osim u izrazito pozitivnim uzorcima kada može biti negativna zbog kompetitivnog vezanja proba i početnica za virusnu cDNA
  - negativan rezultat (nije dokazano prisustvo virusa SARS-CoV-2) - nema umnažanja niti jednog od ispitivanih gena ( $Ct > 37$ ), a interna kontrola mora biti umnožena ( $Ct \leq 32$ )



Slika 4.: Rezultati RT-PCR-a uzorka negativnog na SARS-CoV-2 (nije detektirano umnažanje niti jednog od tri ispitivana gena (ORF1ab, S i N)). MS2 (žuto) je interna kontrola koja mora biti pozitivna u svakom uzorku jer nam ukazuje na kvalitetu PCR reakcije.



Slika 5.: Rezultati RT-PCR-a u pozitivnom uzorku kod kojeg je detektirano umnažanje ORF1ab i N gena, dok nije detektirano umnažanje S gena. MS2 (žuto) je interna kontrola koja mora biti pozitivna u svakom uzorku jer nam ukazuje na kvalitetu PCR reakcije.



Slika 6.: Rezultati RT-PCR-a uzorka pozitivnog na SARS-CoV-2 kod kojeg je detektirano umnažanje sva tri ispitivana gena (ORF1ab, S i N). MS2 (žuto) je interna kontrola koja mora biti pozitivna u svakom uzorku, a izuzetak mogu biti uzorci kod kojih je prisutno visoko virusno opterećenje zbog potrošnje proba i početnica u reakcijskoj smjesi na virusnu cDNA.

### **3.4. Sekvenciranje**

Uzorci kod kojih je RT-PCR metodom utvrđena prisutnost SARS-CoV-2 virusa detekcijom na sekvenci ORF1ab i N genu, a bez detekcije S gena skladišteni su na -70°C do slanja na sekvenciranje. Sekvenciranje je provedeno u suradnji s Hrvatskim zavodom za javno zdravstvo uz logističku i financijsku podršku Europskog centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. European Center for Disease Control and Prevention – ECDC), Agencije Europske unije. Cijelogenomsko sekvenciranje (engl. Whole genom sequencing – WGS) provedeno je NGS metodom u laboratoriju Eurofins Genomic Europe.

Svaki uzorak RNA bio je popraćen podacima o mjestu gdje je bolesnik testiran u svrhu dokazivanja proširenosti određene varijante u kojem ciklusu umnažanja je detektirana prisutnost virusa da bi se mogla utvrditi kvaliteta i količina ulaznog materijala tj. RNA za sekvenciranje.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Mutacije virusa

SARS-CoV-2 virus je, kao i većina ostalih virusa, podložan mutacijama koje mogu u većoj ili manjoj mjeri utjecati na neke njegove osobine kao što su moć širenja, jačina simptoma koje uzrokuje kod pacijenata, način na koji reagira na cjepivo i lijekove i slično. Mutacija je promjena u genetskom slijedu SARS-CoV-2 virusa u odnosu na referentni slijed. Kao referentni slijed uzima se Wuhan-Hu1 koji je prvi identificiran ili USA-WA1/2020 koji je prvi identificiran u Americi ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

WHO je u suradnji sa svojim partnerima predložila da se za imenovanje i nomenklaturu novih sojeva virusa koristi PANGO nomenklatura (engl. *Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak nomenclature*) prema kojoj se novi sojevi virusa imenuju jedinstvenom kombinacijom slova i brojeva. WHO također dodjeljuje imena novim varijantama virusa koristeći grčki alfabet (npr. delta ili omikron). Bitno je naglasiti da više PANGO sojeva virusa (npr. BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 i BA.5) čine jednu varijantu (u ovom slučaju omikron).

Različite varijante i sojevi virusa imaju različita obilježja te su prema tome podijeljeni u tri kategorije: zabrinjavajuće varijante (engl. *Variants of concern* – VOC), varijante od interesa (engl. *Variants of interest* – VOI) i varijante koje se prate (engl. *Variants under monitoring* – VUM).

#### 4.1.1. VOC

U VOC kategoriju svrstavaju se sojevi virusa kod kojih je zabilježena povećana transmisija i virulencija u odnosu na referentnu sekvencu. Dosadašnji sojevi svrstani u VOC kategoriju prikazani su u Tablici 4.

Tablica 4.: VOC sojevi virusa

WHO oznaka	PANGO oznaka	najraniji dokumentirani uzorci
<b>Alpha</b>	B.1.1.7	UK, rujan 2020.
<b>Beta</b>	B.1.351	južna Afrika, svibanj 2020.
<b>Gamma</b>	P.1	Brazil, studeni 2020.
<b>Delta</b>	B.1.617.2	Indija, listopad 2020.
<b>Omicron</b>	B.1.1.529	više zemalja, studeni 2021.

#### 4.1.2. VUM

U ovu kategoriju spadaju sojevi s mutacijama za koje se pretpostavlja da bi mogle predstavljati rizik u budućnosti, ali nema dovoljno dokaza pa zahtijevaju pojačano praćenje. Soj se može reklasificirati odnosno izgubiti VUM oznaku ukoliko zadovolji barem jedan od sljedećih kriterija: (1) više ne cirkulira na globalnim razinama, (2) cirkulira dulje vrijeme, ali nema utjecaj na ukupnu epidemiološku situaciju, (3) znanstveni dokazi ukazuju na to da soj nema nikakva zabrinjavajuća svojstva. Tablica 5. prikazuje sojeve svrstane pod VUM oznaku.



Tablica 5.: VUM sojevi virusa (podaci se odnose na 12. listopad 2022.).

WHO oznaka	PANGO oznaka	najraniji dokumentirani uzorci
<b>Omicron</b>	BA.5	07. 02. 2022,
	BA.2.75	31. 12. 2021.
	BJ.1	06. 09. 2021.
	BA.4.6	20. 07. 2020.
	XBB	13. 08. 2022.
	BA.2.3.20	15. 08. 2022.

#### 4.1.3. VOI

VOI oznaka dodjeljuje se sojevima s genetskim promjenama za koje se zna da utječu na transmisiju, imunološka, dijagnostička ili terapijska svojstva virusa te je zabilježena značajna prevalencija. 12. listopada 2022. niti jedan soj ne nosi oznaku VOI ([www.who.int](http://www.who.int)).

## **4.2. Utjecaj mutacija na rezultate PCR testiranja**

Prisutnost mutacija u genomu SARS-CoV-2 virusa može utjecati na rezultate molekularnih i seroloških testiranja. Utjecaj mutacije ovisi o nekoliko faktora: dizajnu testa, sekvenci virusa koja je mutirala, prevalenciji virusa u populaciji. Zbog toga je Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *The United States Food and Drug Administration* – FDA) donijela odluku kojom zahtijeva od proizvođača setova za testiranje da uz njih prilože i procijene utjecaja određenih mutacija na izvedbu i rezultate njihovih testova. Šanse da će rezultati testiranja biti lažno negativni su veće kod setova za testiranje koji otkrivaju prisutnost virusa na temelju jednog gena u odnosu na one kod kojih se ista utvrđuje na temelju više gena.

### **4.2.1. Utjecaj mutacija kod Omicron sojeva virusa na rezultate PCR testiranja**

Soj virusa Omicron B.1.1.529. pojavio se u US te proglašen VOC varijantom 30. studenog 2021. Od tada su Omicron sojevi dominantni u svijetu, a kod njih je zabilježeno i više mutacija u odnosu na prethodne sojeve i to najčešće ne S genu. Delecija aminokiselina H69 i V70 na S genu postala je sve češća, a pokazalo se da sojevi s takvom mutacijom imaju veću moć transmisije te veću virulentnost u odnosu na ostale sojeve. Zbog nedostatka navedenih aminokiselina, dolazi do lažno negativnih rezultata za S gen prilikom testiranja. FDA je prema tome testove podijelila u dvije kategorije: one kod kojih se očekuje prepoznavanje virusa bez obzira na mutaciju i one kod kojih se očekuju negativni rezultati bez obzira na prisutnost virusa ([www.fda.gov](http://www.fda.gov)).

### 4.3. Rezultati provedene analize

Za potrebe ovog rada provedeno je RT-PCR testiranje za 30 uzoraka koji su potom poslani na sekvenciranje kako bi se odredilo o kojem se soju virusa radi. Dobivena Ct vrijednost za svaki testirani gen i rezultati sekvenciranja prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6.: Rezultati RT-PCR testiranja i sekvenciranja

redni broj	Datum	šifra uzorka	testirani geni (Ct vrijednost)			Sekvenciranje (varijanta)	mutacija del 69/70
			ORF1ab	N	S		
1.	27.2.2021	40219	19	19	neg	Alpha (B.1.1.7)	DA
2.	27.2.2021	40220	25	26	neg	Alpha (B.1.1.7)	DA
3.	6.7.2021	78384	21	21	21	Delta (B.1.617.2)	NE
4.	6.7.2021	78905	10	9	10	Delta (B.1.617.2)	NE
5.	12.8.2021	79226	26	26	26	Delta (B.1.617.2)	NE
6.	28.12.2021	117373	23	22	23	Delta (B.1.617.2)	NE
7.	28.12.2021	117374	20	20	20	Delta (B.1.617.2)	NE
8.	17.11.2021	103860	14	10	14	Delta (B.1.617.2)	NE
9.	17.11.2021	103864	18	18	18	Delta (B.1.617.2)	NE
10.	17.11.2021	103883	20	20	20	Delta (B.1.617.2)	NE

<b>11.</b>	28.12.2021	117305	23	23	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>12.</b>	28.12.2021	117735	25	25	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>13.</b>	28.12.2021	118022	21	21	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>14.</b>	29.12.2021	118264	22	22	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>15.</b>	29.12.2021	118267	21	20	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>16.</b>	29.12.2021	118359	14	12	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>17.</b>	31.12.2021	119899	21	21	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>18.</b>	31.12.2021	119989	21	20	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>19.</b>	31.3.2022	147667	23	23	23	Omicron (BA.2)	NE
<b>20.</b>	31.3.2022	147668	20	20	20	Omicron (BA.2)	NE
<b>21.</b>	31.3.2022	147669	20	19	neg	Omicron (BA.1.1)	DA
<b>22.</b>	31.3.2022	147671	23	23	23	Omicron (BA.2)	NE
<b>23.</b>	31.3.2022	147677	20	20	neg	Omicron (BA.1)	DA
<b>24.</b>	31.3.2022	147676	15	15	16	Omicron (BA.2)	NE
<b>25.</b>	31.3.2022	147680	13	14	13	Omicron (BA.2)	NE

<b>26.</b>	31.3.2022	147684	18	18	18	Omicron (BA.2)	NE
<b>27.</b>	31.3.2022	147689	19	19	19	Omicron (BA.2.3)	NE
<b>28.</b>	31.3.2022	147692	20	20	neg	Omicron (BA.1.21)	DA
<b>29.</b>	31.3.2022	147703	20	20	20	Omicron (BA.2.3)	NE
<b>30.</b>	31.3.2022	147701	28	28	neg	Omicron (BA.1.1)	DA

Iz dobivenih rezultata je vidljivo da prilikom RT-PCR testiranja ne dolazi do umnažanja S gena kod uzoraka koji sadrže soj virusa s delecijom H69/V70 na S genu. Prema tome S gen nije detektiran kod tih uzoraka. Sekvenciranjem je utvrđeno da ti uzorci sadrže sojeve Alpha (B.1.1.7), Omicron (BA.1), Omicron (BA.1.1) i Omicron (BA.1.21). S obzirom na to da se ovim testom utvrđuje prisutnost više gena, negativni rezultati za S gen ne znače odsustvo virusa, pa se prema tome ovaj test može koristiti za prepoznavanje virusa bez obzira na mutaciju. Dobiveno 100% slaganje između rezultata sekvenciranja i korištenog TaqPath reagensa prikazano je u Tablici 7.

Tablica 7.: Prikaz slaganja dobivenih rezultata

<b>Taqpath</b>	<b>Sekvenciranje</b>	
	del 69/70 - dokazana	del 69/70 - nije dokazana
<b>S gen (detektiran)</b>	<b>0</b>	<b>16</b>
<b>S gen (nedetektiran)</b>	<b>14</b>	<b>0</b>

# SARS-CoV-2 Surveillance Report

Research Use Only (RUO)

23 March, 2021

*This report is not a diagnostic / clinical report and is intended for Research Use Only!*

Sample ID: **HRV000\_1220**  
Eurofins Project ID: **CO-00078**  
Date of Processing: **23 March, 2021**  
Version: v1.1

## Results

SARS-CoV-2 Detected: **Yes**  
SARS-CoV-2 Genome Coverage: **99.7%**  
SARS-CoV-2 Sequencing Coverage: **Sufficient**  
SARS-CoV-2 Consensus Sequence: **Available**  
SARS-CoV-2 Lineage Classification\*: **B.1.1.7**  
Virulence Associated Variants: **17/17 reported B.1.1.7 SNPs detected**

\* Lineage classification is determined by using Pangolin 2.0 version **2021-02-21**

The following mutations are detected in comparison to the reference genome of SARS-CoV-2 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/MN908947>). Please note that low confidence mutations with <80% frequency should be verified by an independent method.

Discovered mutations for the sample HRV000_1220				
GENE	MUTATION	AMINO ACID CHANGE	COVERAGE	FREQUENCY
.	C241T	.	344	100%
orf1ab	C913T	S216S	1052	99.9%
orf1ab	C1191T	P309L	1299	99.85%
orf1ab	T2752C	T829T	1868	99.84%
orf1ab	C3037T	F924F	1128	100%
orf1ab	C3267T	T1001I	1182	98.65%
orf1ab	C4897T	F1544F	2429	96.01%
orf1ab	C5388A	A1708D	1358	98.97%
orf1ab	C5986T	F1907F	1142	99.04%
orf1ab	T6954C	I2230T	1095	100%
orf1ab	C8067T	T2601I	1214	98.51%
orf1ab	C8160T	T2632I	1356	99.85%
orf1ab	GTCTGGTTTT11288G	S3675_F3677del	963	96.36%
orf1ab	T11296G	F3677L	945	100%
orf1ab	C14408T	P4715L	914	100%
orf1ab	C14676T	P4804P	1417	99.22%
orf1ab	C15279T	H5005H	1049	98.76%

GENE	MUTATION	AMINO ACID CHANGE	COVERAGE	FREQUENCY
orf1ab	T16176C	T5304T	1030	98.25%
orf1ab	C19602T	N6446N	545	92.66%
S	C21721T	D53D	892	76.57%
S	ATACATG21765A	H69_V70del	989	97.88%
S	TTTA21991T	Y144del	814	89.56%
S	A23063T	N501Y	891	99.89%
S	C23271A	A570D	1616	99.38%
S	A23403G	D614G	1494	99.87%
S	C23604A	P681H	1210	99.92%
S	C23709T	T716I	1122	100%
S	T24506G	S982A	876	98.4%
S	G24914C	D1118H	1256	100%
ORF8	C27972T	Q27*	1275	99.92%
ORF8	G28048T	R52I	1200	99.83%
ORF8	A28111G	Y73C	1084	99.45%
.	TA28271T	.	881	94.89%
N	G28280C	D3H	842	100%
N	A28281T	D3V	840	99.88%
N	T28282A	D3E	835	100%
N	C28310T	P13S	859	99.42%
N	G28881A	R203K	1985	99.95%
N	G28882A	R203R	1984	99.95%
N	G28883C	G204R	2009	99.9%
N	C28977T	S235F	2058	99.85%

- GENE column represents the annotated genes in SARS-CoV-2 genome.
- MUTATION column represents the reference nucleotide changes observed at genome level.
- AMINO ACID CHANGE column represents the amino acid change at the protein/gene level.
- COVERAGE column represents the number of reads supporting the observed mutation.
- FREQUENCY column represents the frequency of the observed mutation in the sample.

Genome Coverage analysis of SARS-CoV-2 was performed to check the presence of the virus by inspecting the base coverage of the complete genome of the reference SARS-CoV-2 virus using the sequencing reads generated from the extracted RNA of the sample. The following figure represents the recovered SARS-CoV-2 genome from the sample.

SARS-CoV-2 genome positions in base pairs are represented on X-Axis whereas the coverage depth is plotted on Y-axis. The Amino acid change of the observed mutations are annotated on the respective genes and positions. The colored panel near the X-axis represents the annotated genes and the locations in reference SARS-CoV-2 genome.

## Methods

Sequencing data were analysed using an in-house developed pipeline. Briefly, primers used in amplicon generation were scanned and removed from the sequencing reads, followed by removal of low-quality bases (<Q30) and reads shorter than fifty nucleotides in length. The remaining high quality reads were aligned to the SARS-CoV-2 reference genome (isolate Wuhan-Hu-1, MN908947) using the BWA-MEM

(v0.7.17-r1188) algorithm (Li and Durbin 2009). Read alignments were further refined by keeping only full-length primary alignments followed by removing redundant alignments using gencore algorithm (Chen et al. 2019). High quality cleaned read alignments were then used to generate a final consensus sequence using consensusfixer (v0.4) algorithm (Toepfer, github) with at least 15 supporting reads at each position. Base positions which showed less than 15x coverage were filled with N's. The consensus sequence was used to determine the SARS-CoV-2 lineage information using pangolin 2.0 (github), which uses a multinomial logistic regression model trained against lineage information based on GISAID data. Single nucleotide variations (SNPs) and small insertions & deletions (InDels) were detected by inspecting the read alignments using VarScan (v2.4.4) program (Koboldt et al. 2012).

## Citations

- Li H, Durbin R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* (2009) 25: 1754-60.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y. et al. Gencore: an efficient tool to generate consensus reads for error suppressing and duplicate removing of NGS data. *BMC Bioinformatics* 20, 606 (2019) doi:10.1186/s12859-019-3280-9
- Toepfer A. <https://github.com/cbg-ethz/consensusfixer>
- Pangolin <https://github.com/ce-pangolin/pangolin>
- GISAID <https://www.gisaid.org/>
- Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, et al. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22(3):568-576. doi:10.1101/gr.129684.111

## DISCLAIMER

This service is intended to generate a consensus SARS-CoV-2 sequence, to detect mutations compared to the SARS-CoV-2 reference genome (MN908947) and to perform a lineage classification. The services provided by Eurofins and the results of those services are intended for research use only and should NOT be used in clinical setups.

(c) 2021 Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH • Jakob-Stadler-Platz 7 • 78467 Konstanz • Germany

Slika 7.: Primjer izvještaja sekvenciranja s popisom pronađenih mutacija

Sekvenciranjem je utvrđeno da je delecija H69/V70 prisutna u uzorcima koji su prikupljeni u veljači 2021. godine te da oni sadrže Alpha varijantu virusa koja je u tom razdoblju bila prevladavajuća. Delta varijanta se pojavila nešto kasnije što je vidljivo prema datumima sekvenciranja uzoraka koji sadrže tu varijantu (uzorci prikupljeni između srpnja i prosinca 2021.). Kod Delta varijante nije prisutna delecija H69/V70 i rezultati testiranja za S gen su opet bili pozitivni nakon perioda u kojem su zbog prevladavajuće Alpha varijante bili negativni. Zaključno, u svakom sljedećem periodu pri sumnji na pojavu nove varijante SARS-CoV-2 kod koje je poznato nosi li deleciju H69/V70, korištenjem ispitivanog komercijalnog kita možemo s velikom vjerojatnošću pretpostaviti da se u populaciji pojavila i širi nova varijanta virusa kao što je bio slučaj s pojavom varijante Omicron (BA.1) u prosincu 2021. godine i varijante BA.2 u ožujku 2022.

## 5. ZAKLJUČCI

- Virus SARS-CoV-2 podložan je brojnim mutacijama koje utječu na rezultate testiranja
- Neke mutacije mogu uzrokovati lažno negativne rezultate jer zbog mutacija na određenim dijelovima gena oni ne budu prepoznati pa je zbog toga sigurnije koristiti setove za testiranje koji detektiraju više virusnih gena
- Delecija H69/V70 na S genu je mutacija koja onemogućuje njegovu identifikaciju
- Korištenjem TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR reagensa možemo s vrlo visokom vjerojatnošću utvrditi deleciju H69/V70 kod sojeva koji ju nose, što može poslužiti kao brza orijentacija je li se u populaciji pojavila nova mutacija, ako je prethodno bila prevladavajuća varijanta koja nije bila nositelj ove mutacije



## 6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ACE2 – angiotenzin konvertirajući enzim 2 (engl. Angiotensin converting enzyme 2)

ALT – alanin aminotransferaza (engl. Alanine aminotransferase)

ARDS - akutni respiratorni distress sindrom (engl. Acute respiratory distress syndrome)

AST – aspartat aminotransferaza (engl. Aspartate aminotransferase)

CRP – C-reaktivni protein (engl. c-reactive protein)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

dNTP – deoksinukleozid trifosfat (engl. Deoxynucleoside triphosphate)

ddNTP – dideoksinukleozid trifosfat (engl. Dideoxynucleoside triphosphate)

ECDC – Europski centar za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. European Center for Disease Control and Prevention)

EMA - Europska agencija za lijekove (engl. European Medicines Agency)

FDA – Američka Agencija za hranu i lijekove (engl. The United States Food and Drug Administration)

HAS2 –hijaluronan sintetaza-2 (engl. Hyaluronan synthase-2)

HLA – humani leukocitni antigen (engl. Human leukocyte antigen)

IL-1 – interleukin-1

LDH – laktat dehidrogenaza (engl. Lactate Dehydrogenase)

NGS – sekvenciranje novih generacija (engl. Next generation sequencing)

NK cells – prirodne stanice ubojice (engl. natural killer cells)

PANGO - (engl. Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak nomenclature)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase chain reaction)

PHEIC – izvanredna situacija u javnom zdravstvu od međunarodne važnosti (engl. Public Health Emergency of International Concern)

PPi – pirofosfat (engl. Pyrophosphate)

RAAS – renin-angiotenzin-aldosteronski sustav (engl. Renin-angiotensin-aldosterone system)

RBD – domena koja veže receptor (engl. Receptor-binding domain)

RdRp – RNA-ovisna RNA polimeraza

RNA – ribonukleinska kiselina (engl. Ribonucleic acid)

RT – reverzna transkriptaza (engl. Reverse transcriptase)

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze s reverznom transkripcijom (engl. Reverse transcription polymerase chain reaction)

SBL - sekvenciranje ligacijom (engl. sequencing by ligation)

SBS - sekvenciranje sintezom (engl. sequencing by synthesis)

TNF – faktor nekroze tumora (engl. Tumor necrosis factor)

VOC – zabrinjavajuće varijante SARS-CoV-2 virusa (engl. Variants of concern)

VOI – varijante SARS-CoV-2 virusa od interesa (engl. Variants of interest)

VUM – varijante SARS-CoV-2 virusa koje se prate (engl. Variants under monitoring)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. World Health Organization)

WGS – cijelogenomsko sekvenciranje (engl. Whole genom sequencing)

## 7. LITERATURA

Afzal, A., 2020. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *Journal of Advanced Research*.

Bhadra, S., Maranhao, A.C., Paik, I., and Ellington, A.D., 2020. One-Enzyme Reverse Transcription qPCR Using Taq DNA Polymerase. *Biochemistry* 59, str. 4638–4645

COVID-19 vaccines, 2022., <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/covid-19-vaccines> , pristupljeno 15. 07. 2022.

Čačev T., Kapitanović S. (2007) Određivanje genotipova polimorfizama u jednoj bazi (SNP) metodom TaqMan real-time PCR. U: *Metode u molekularnoj biologiji*. Zagreb, Institut Ruđer Bošković, str. 389-391.

Dodig, S., Čepelak, I., Dodig, D. Č., & Laškaj, R., 2020. SARS-CoV-2 – A new challenge for laboratory medicine. *Biochemia Medica*.

Elibol, E., 2021. Otolaryngological symptoms in COVID-19. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 278, str. 1233–1236

Farkas, D. H., & Holland, C. A. (2009). Chapter 3 - Overview of Molecular Diagnostic Techniques and Instrumentation A2 - Tubbs, Raymond R. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology: A Volume in the Series Foundations in Diagnostic Pathology*, str. 19-32

Hu, B., Huang, S., Yin, L., 2021. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*.

Knežević Praveček, M., Kljaić Bukvić, B., i Miškić, B. (2020). 'Uloga inhibitora renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava u patogenezi koronavirusne bolesti (COVID-19)', *Liječnički vjesnik*, 142(11-12), str. 405-409.

Low, L., Tammi, M.T., 2017. Introduction to Next Generation Sequencing Technologies, in: *Bioinformatics*. WORLD SCIENTIFIC, str. 1–21

Miao, Z., Tidu, A., Eriani, G., & Martin, F, 2021. Secondary structure of the SARS-CoV-2 5'-UTR. *RNA Biology* 18, 447–456.

Meyer, N.J., Gattinoni, L., Calfee, C.S., 2021. Acute respiratory distress syndrome. *The Lancet*.

Naming SARS-CoV-2 variants, 2022., <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants> , pristupljeno 14. 10. 2022.

Ramesh, R., Munshi, A., Panda, S.K., 1992. Polymerase chain reaction. *The National medical journal of India*.

SARS-CoV-2 Viral Mutations: Impact on COVID-19 Tests, 2022. <https://www.fda.gov/medical-devices/coronavirus-covid-19-and-medical-devices/sars-cov-2-viral-mutations-impact-covid-19-tests> , pristupljeno: 14.10.2022.

S Shi, J., Han, D., Zhang, R., Li, J., & Zhang, R., 2020. Molecular and Serological Assays for SARS-CoV-2: Insights from Genome and Clinical Characteristics. *Clinical chemistry*.

Sheikhzadeh, E., Eissa, S., Ismail, A., & Zourob, M., 2020. Diagnostic techniques for COVID-19 and new developments. *Talanta*.

hendure, J., Balasubramanian, S., Church, G. M., Gilbert, W., Rogers, J., Schloss, J. A., & Waterston, R. H., 2017. DNA sequencing at 40: Past, present and future. *Nature* 550.

Štimac, I., i Martinković, F. (2021). 'Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija', *Hrvatski veterinarski vjesnik*, 29(3)

Wang, C., Konecki, D.M., Marciano, D.C., Govindarajan, H., Williams, A.M.,

Wastuwidyaningtyas, B., Bourquard, T., Katsonis, P., and Lichtarge, O, 2021. Identification of evolutionarily stable functional and immunogenic sites across the SARS-CoV-2 proteome and greater coronavirus family. *Bioinformatics* 37, str. 4033–4040.

Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC, 2020. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association* 324, str. 782-793.

## 8. SAŽETAK

### 8.1. Sažetak

Virus SARS-CoV-2 velikom se brzinom proširio cijelim svijetom 2020. godine te uzrokovao globalnu pandemiju. Podložan je brojnim mutacijama koje na različite načine utječu na njegova svojstva kao i na rezultate molekularne analize RT-PCR kojom se potvrđuje infekcija ovim virusom. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti rezultate RT-PCR testiranja uzoraka nazofaringealnih briseva na prisutnost virusa SARS-CoV-2 korištenjem komercijalnog test paketa koji detektira prisutnost više virusnih gena (ORF1ab, N i S protein) s rezultatima sekvenciranja različitih uzoraka kod kojih je RT-PCR metodom dokazana i kod kojih nije dokazana prisutnost S gena. Za provođenje testiranja korišten je TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit, a sekvenciranje je provedeno NGS metodom u laboratoriju Eurofins Genomics Europe. Rezultati su potvrdili postojanje delecije H69/V70 kod svih uzoraka kod kojih RT-PCR metodom nije detektiran S gen. Utvrđeno je da postojanje delecije H69/V70 na S genu onemogućuje njegovu detekciju. S obzirom na to da se određuje prisutnost druga dva gena, lažno negativni rezultati za S gen ne znače odsustvo virusa nego ukazuju na potencijalno prisustvo ove mutacije u soju virusa koji kruži u populaciji.

## 8.2. Summary

The SARS-CoV-2 virus spread rapidly throughout the world and caused a global pandemic in 2020. The virus is susceptible to numerous mutations that affect its properties in different ways. Mutations also affect the results of the RT-PCR molecular analysis which is used to confirm virus infection. The aim of this study was to compare RT-PCR results of nasopharyngeal swab samples which were analyzed to detect the presence of the SARS-CoV-2 virus using a commercial test package that detects the presence of several viral genes (ORF1ab, N and S protein) with different sequencing results of samples where the presence of S protein was confirmed and samples where the presence of S protein was not confirmed using RT-PCR. The TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit was used for testing and the sequencing was performed using the NGS method in the Eurofins Genomics Europe laboratory. The results confirmed deletion H69/V70 in every sample where the S gene was not detected using RT-PCR. It was found that H69/V70 S gene deletion prevents S gene to be detected while PCR testing. False-negative results for S gene presence should not indicate the absence of the virus because there are two other genes whose presence is detected. But negative S gene results can indicate the potential presence of this virus mutation and its spreading through population.

## **9. Životopis**

Lucija Novosel rođena je 15.12.1998. u Virovitici. Pohađala je Osnovnu školu Petra Preradovića u Pitomači. 2013. godine je upisala Gimnaziju Petra Preradovića u Virovitici koju je završila 2017. godine. Iste te godine upisuje farmaciju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Utvrđivanje delecije H69/V70 u SARS-CoV-2 virusu upotrebom TaqPath reagensa

Lucija Novosel

### SAŽETAK

Virus SARS-CoV-2 velikom se brzinom proširio cijelim svijetom 2020. godine te uzrokovao globalnu pandemiju. Podložan je brojnim mutacijama koje na različite načine utječu na njegova svojstva kao i na rezultate molekularne analize RT-PCR kojom se potvrđuje infekcija ovim virusom. Cilj ovog diplomskog rada bio je usporediti rezultate RT-PCR testiranja uzoraka nazofaringealnih briseva na prisutnost virusa SARS-CoV-2 korištenjem komercijalnog test paketa koji detektira prisutnost više virusnih gena (ORF1ab, N i S protein) s rezultatima sekvenciranja različitih uzoraka kod kojih je RT-PCR metodom dokazana i kod kojih nije dokazana prisutnost S gena. Za provođenje testiranja korišten je TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit, a sekvenciranje je provedeno NGS metodom u laboratoriju Eurofins Genomics Europe. Rezultati su potvrdili postojanje delecije H69/V70 kod svih uzoraka kod kojih RT-PCR metodom nije detektiran S gen. Utvrđeno je da postojanje delecije H69/V70 na S genu onemogućuje njegovu detekciju. S obzirom na to da se određuje prisutnost druga dva gena, lažno negativni rezultati za S gen ne znače odsustvo virusa nego ukazuju na potencijalno prisustvo ove mutacije u soju virusa koji kruži u populaciji.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 7 grafičkih prikaza, 7 tablica i 21 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, virus, delecija H69/V70, RT-PCR, sekvenciranje nove generacije

Mentor: **Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*  
**Dr. sc. Ivana Čelap**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*



Ocjenjivači: **Dr. sc. Dubravka Vitali Čepo**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: studeni, 2022.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Medical Biochemistry and Haematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Determination of H69/V70 deletion in SARS-CoV-2 virus using TaqPath reagents

Lucija Novosel

#### SUMMARY

The SARS-CoV-2 virus spread rapidly throughout the world and caused a global pandemic in 2020. The virus is susceptible to numerous mutations that affect to its properties in different ways. Mutations also affect to the results of the RT-PCR molecular analysis which is used to confirm virus infection. The aim of this study was to compare RT-PCR results of nasopharyngeal swab samples which were analyzed to detect the presence of the SARS-CoV-2 virus using a commercial test package that detects the presence of several viral genes (ORF1ab, N and S protein) with different sequencing results of samples where the presence of S protein was confirmed and samples where the presence of S protein was not confirmed using RT-PCR. The TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit was used for testing and the sequencing was performed using the NGS method in the Eurofins Genomics Europe laboratory. The results confirmed deletion H69/V70 in every sample where the S gene was not detected using RT-PCR. It was found that H69/V70 S gene deletion prevents S gene to be detected while PCR testing. False-negative results for S gene presence should not indicate the absence of the virus because there are two other genes which presence is detected. But negative S gene results can indicate the potential presence of this virus mutation and its spreading through population.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 7 figures, 7 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: SARS-CoV-2, virus, deletion H69/V70, RT-PCR, next generation sequencing

Mentor: **Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Ivana Čelap, PhD**, *Assistant Professor*, Department of Clinical Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Reviewers: **Dubravka Vitali Čepo, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November, 2022.