

Uloga PCR tehnologije u detekciji Covid-19 infekcije

Turkalj, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:353178>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

IVA TURKALJ

**ULOGA PCR TEHNOLOGIJE U DETEKCIJI COVID-19
INFEKCIJE**

Završni rad

Split, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

IVA TURKALJ

ULOGA PCR TEHNOLOGIJE U DETEKCIJI COVID-19

INFEKCIJE

THE ROLE OF PCR TECHNOLOGY IN COVID-19

DETECTION

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Doc.dr.sc. Sendi Kuret

Split, 2021. godina

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

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

Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović
Sumentor: doc. dr. sc. Sendi Kuret

ULOGA PCR TEHNOLOGIJE U DETEKCIJI COVID-19 INFEKCIJE

Iva Turkalj, broj indeksa: 0346008766

Sažetak

Cilj: Istražiti ulogu PCR tehnologije pri dijagnostici COVID-19 infekcije.

Materijal i metode: Opisan je postupak izvođenja PCR-a od izolacije RNA do detekcije i amplifikacije virusa na dva aparata kao i postupak i svrha brzog PCR testiranja. Također, opisani su prikladni materijali za postupak RT-PCR-a i brzog PCR testa.

Rezultati: PCR produkt nastaje eksponencijalno. Potrebno je nekoliko ciklusa da bi se umnožilo dovoljno DNA kopija, krivulja odnosa intenziteta fluorescencije prema broju ciklusa pokazuje sigmoidalni oblik. U kasnim ciklusima supstrati reakcije su potrošeni i PCR produkt se više ne udvostručuje, krivulja prelazi u ravan oblik. Važna je Ct vrijednost koja je obrnuto proporcionalna količini virusa prisutnoj u uzorku.

Zaključak: Obje metode, RT-PCR i brzi PCR test, imaju visoku osjetljivost i specifičnost kod pozitivnih rezultata no RT-PCR ima manju stopu lažno negativnih rezultata.

Ključne riječi: koronavirus, SARS-CoV-2, Covid-19, Rt-qPCR

Rad sadrži: 39 stranica, 5 tablica, 17 slika i 34 referenCE

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

Doc.dr.sc. Esma Čečuk-Jeličić
Doc.dr.sc. Antonela Matana
Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Datum obrane: 01. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
University Department of Health Studies
Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics

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

Supervisor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović
Co-supervisor: doc. dr. sc. Sendi Kuret

THE ROLE OF PCR TECHNOLOGY IN COVID-19 DETECTION

Iva Turkalj, index number: 0346008766

Summary

Objectives: To investigate the role of PCR technology in the diagnosis of COVID-19 infection.

Material and methods: The procedure for performing PCR from RNA isolation to virus detection and amplification is described as well as the procedure and purpose of rapid PCR testing. Suitable materials for RT-PCR and rapid PCR testing are also described.

Results: PCR product is formed exponentially. It takes several cycles to replicate enough DNA copies, the fluorescence intensity-to number ratio curve shows the sigmoidal shape. In the late cycles the reaction substrates are consumed and the PCR product no longer doubles, the curve turns into a flat shape. Ct value, which is inversely proportional to the amount of virus present in the sample, is also important.

Conclusion: Both methods have high sensitivity and specificity in positive results but RT-PCR has lower rate of false negative results.

Key words: coronavirus, SARS-Cov-2, Covid-19. Rt-qPCR

Thesis contains: 39 pages, 5 tables, 17 figures and 34 references

Original in: Croatian

Defense committee:

Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić
Doc.dr.sc. Antonela Matana
Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

Defense date: July 1st 2021.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1 VIRUS.....	1
1.1.1 GRAĐA VIRUSA	1
1.1.2 REPLIKACIJA VIRUSA.....	2
1.1.3 PRIJENOS VIRUSA	3
1.1.4 PODJELA PREMA VRSTI NUKLEINSKE KISELINE	3
1.1.5 KORONAVIRUS (CORONAVIRIDAE).....	4
1.1.6 SARS-COV-2.....	7
1.2 PCR-DIJAGNOSTIKA COVID-19 INFEKCIJE.....	8
1.2.1 PCR.....	8
1.2.2 RT-PCR	10
2 CILJ RADA.....	12
3 MATERIJALI I METODE	13
3.1 MATERIJAL	13
3.2 METODE.....	14
3.2.1 RT-qPCR	14
3.2.2 BRZI PCR TEST	22
4 REZULTATI.....	24
5 RASPRAVA.....	29
6 ZAKLJUČAK	30
7 LITERATURA.....	31
8 ŽIVOTOPIS	34

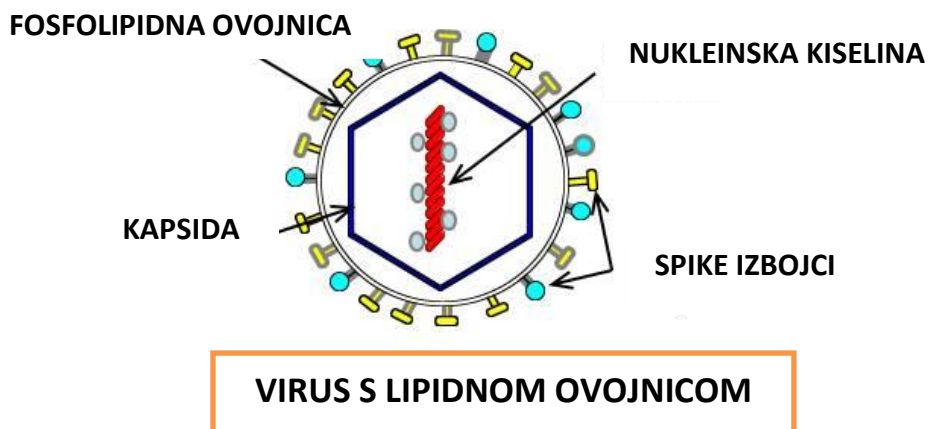
1.UVOD

1.1 VIRUS

Virusi (lat. *virus*:- otrov) su obligatni unutarstanični organizmi odnosno organizmi koji ne mogu preživjeti ukoliko se ne nastane u živoj stanici. Virusi napadaju životinje, biljke, ljude i bakterije te izazivaju ponekad i po život opasne infekcije. [1]

1.1.1 GRAĐA VIRUSA

Virion je čestica virusa koja se sastoji od vanjske proteinske ljuske (kapside) i nukleinske kiseline (bilo ribonukleinske ili deoksiribonukleinske kiseline - RNA ili DNA) pa se prema tome dijele na RNA i DNA viruse. Jezgra daje infektivnost, a kapsida daje specifičnost virusu. Virioni nastaju spajanjem od novo sintetiziranih komponenata unutar stanice domaćina. Kapsida obavića DNA ili RNA i štiti ju od djelovanja staničnih enzima u domaćinu čiji je cilj uništiti virus. Kapside mogu biti u dva glavna oblika, ikosaedričnom i spiralnom, različite veličine i složenosti Također, postoje virusi obavijeni lipidnom ovojnicom te virusi bez lipidne ovojnice. Virusi s lipidnom ovojnicom imaju na površini prisutne glikoproteinske izdanke čija je važna uloga pričvršćivanje na stanicu Slika 1. [1]



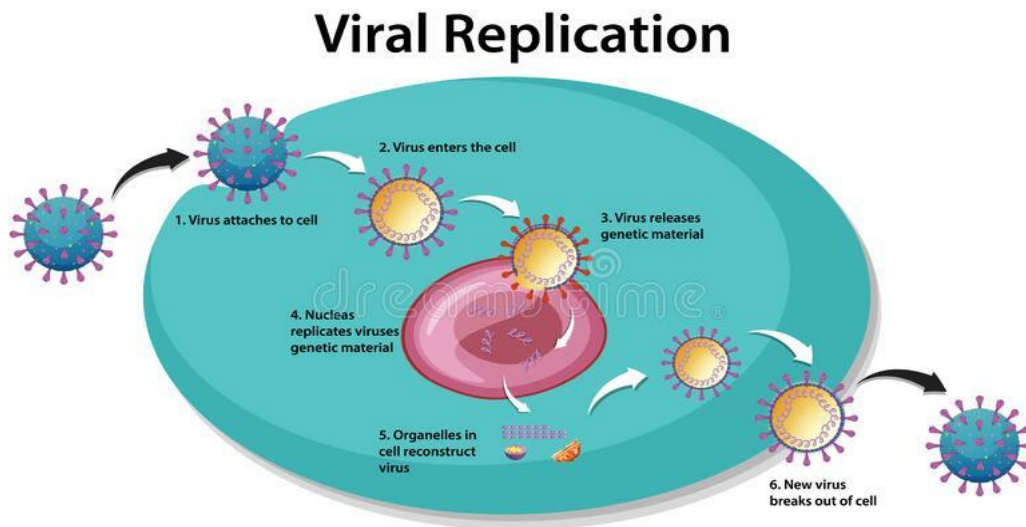
SLIKA 1. Građa virusa [2]

1.1.2 REPLIKACIJA VIRUSA

Replikacija virusa započinje ulaskom virusa u stanicu domaćina. Virus se procesom adsorpcije veže na površinu stanice domaćina. Prilikom adsorpcije važni su virusni proteini koji se nalaze na kapsidi ili glikoproteinski izdanci koji strše iz lipidne ovojnice.

U idućoj fazi virus prodire u stanicu, a to je moguće postići različitim mehanizmima poput spajanja lipidne ovojnice s citoplazmatskom ovojnicom stanice domaćina, endocitozom ili jednostavno umetanjem nukleinske kiseline u citoplazmu domaćina.

Nakon prodiranja u stanicu dolazi do razgradnje kapside i oslobađanja virusnog genoma na mjestu umnožavanja gdje započinje replikacija i infektivni proces Slika 2.[3].



SLIKA 2. Replikacija virusa [4]

1.1.3 PRIJENOS VIRUSA

Virusi se mogu prenositi na čovjeka izravnim i neizravnim putem. Izravni put uključuje kontakt kožom ili sluznicom, putem kapljica te vertikalnim prijenosom poput transplacentarnog širenja ili dojenjem. Neizravni put širenja uključuje prijenos virusa putem dodira s predmetima na kojima se nalaze virusne čestice, krvi, urina, stolice, vode te aerosola. [5]

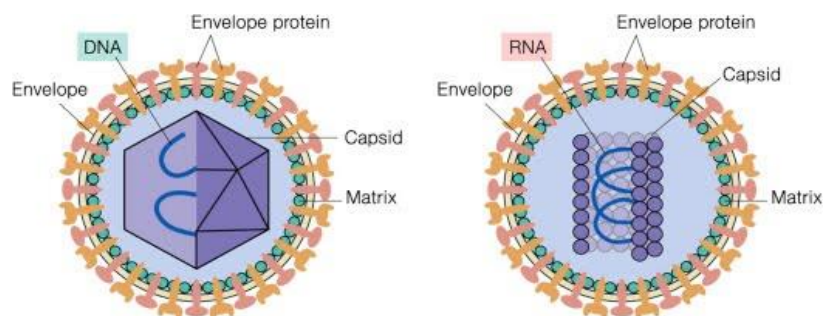
1.1.4 PODJELA PREMA VRSTI NUKLEINSKE KISELINE

1.1.4.1 a) DNA VIRUSI

DNA virusi mogu imati jednolančanu ili dvolančanu DNA koja može biti kružna ili linearna. Mogu izazvati po život opasne infekcije u čovjeka ili mogu dovesti do trajne prisutnosti virusa u organizmu te dugoročnom oslabljenju imunološkog sustava. Većina DNA virusa sama sudjeluje u kodiranju enzima DNA polimeraze dok manji dio koristi enzime domaćina. DNA polimeraza je važan enzim u replikaciji genoma virusa. [1,6]

1.1.4.2 b) RNA VIRUSI

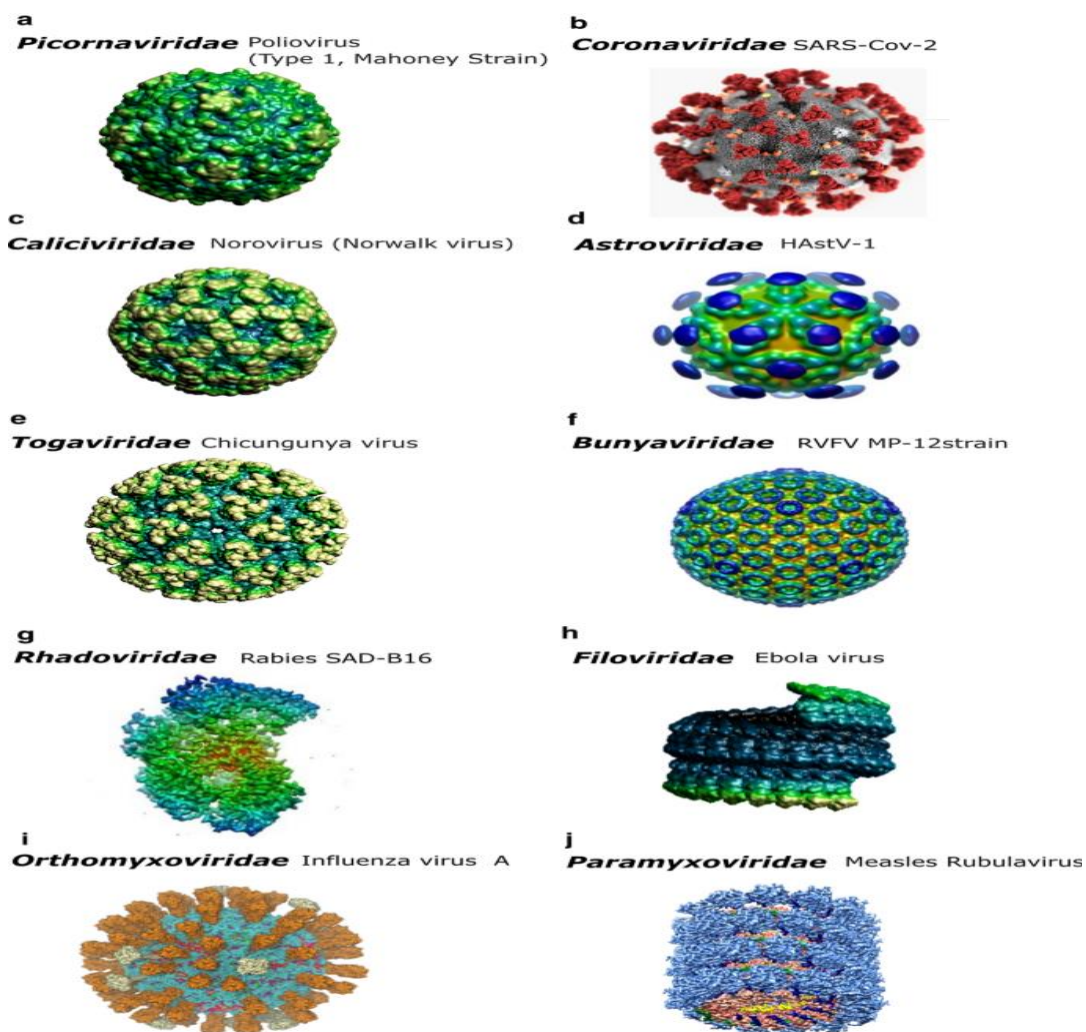
RNA virusi imaju jednolančanu i linearnu RNA te više podliježu mutacijama od DNA virusa. Slika 3. [1,7,8]



SLIKA 3. Građa DNA i RNA virusa [9]

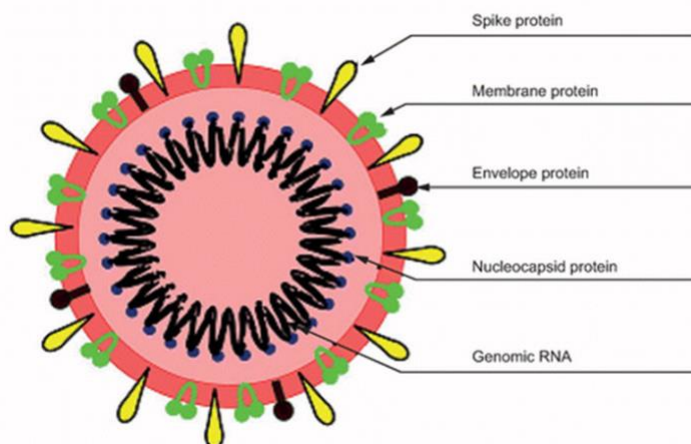
1.1.5 KORONAVIRUS (CORONAVIRIDAE)

Koronavirus pripada skupini najvećih humanih RNA virusa Slika 4. Porodica koronavirusa obuhvaća red Nidovirales, a on se sastoji od četiri roda: alfa, beta, gama i delta koronavirusi. Kada se misli na koronavirusne infekcije koje zahvaćaju ljude, misli se prvenstveno na koronavirusse alfa i beta roda. [10]



SLIKA 4. Glavne skupine humanih RNA virusa [7]

Koronavirus je virus koji ima jednolančanu RNA. Obavijen je ovojnicom koja je izvedena iz stanice domaćina u kojoj se virus nastanio i sadrži glikoproteinske šiljke Slika 5.



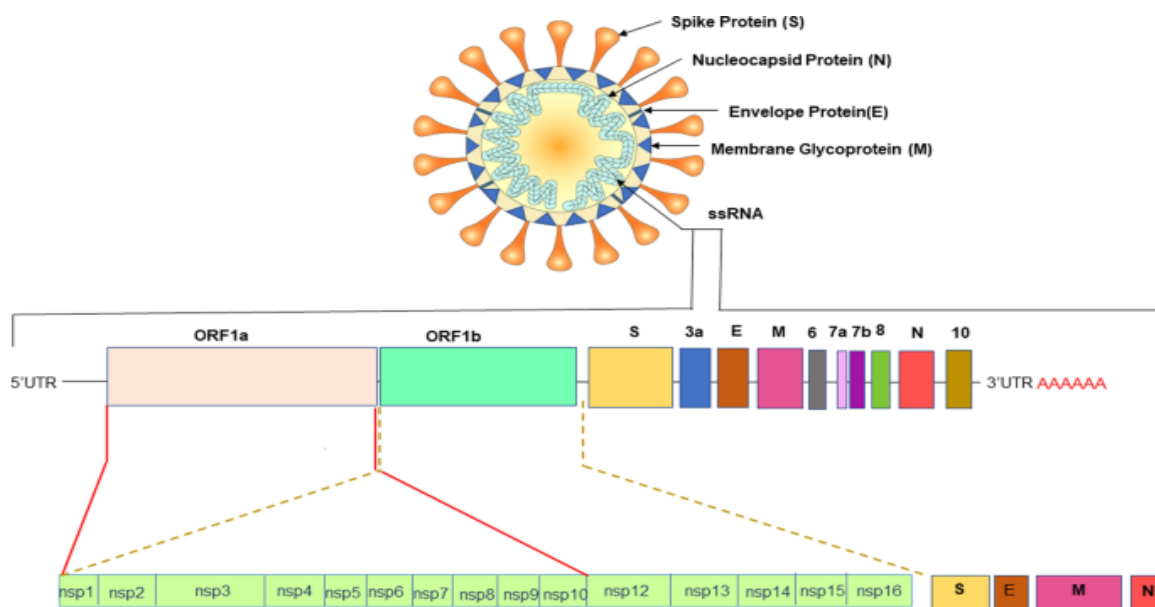
SLIKA 5. Građa koronavirusa [15]

Nukleokapside koronavirusa ne moraju imati enzime za inicijaciju infekcije upravo zato jer su pozitivno jednolančane, za razliku od negativno jednolančanih koji ne kodiraju mRNA te zato sadrže proteine koji posjeduju enzimsku aktivnost. Replikacija genoma koronavirusa se odvija u citoplazmi stanice domaćina. [10,11]

Koronavirusi sadrže pet strukturnih proteina: spike (S), membranski (M), protein u ovojnici (E), protein u nukleokapsidi (N) i protein hemaglutinin esteraze (HE). Protein S (spike) najveći je od pet proteina. Obično se pojavljuje u obliku S1 i S2 domene radi djelovanja proteaze stanice domaćina. Proteaza je enzim koji cijepa protein na navedene dvije domene. S1 domena je važna prilikom vezanja receptora, a S2 domena daje strukturnu stabilnost proteinu. Protein M je nešto manji od proteina S te ga ima izrazito puno u virionu u obliku dimera. Važan je u održavanju zakrivljenosti membrane i vezanju za nukleokapsidu. Proteina E nema puno, ali se smatra da je izrazito važan u vezanju i otpuštanju virusa kao i da pokazuje aktivnost ionskih kanala. Protein N je dio nukleokapside te sadrži N i C

terminalne domene. Svaka od domena ima mogućnost vezanja za RNA. Protein N zajedno s proteinom M važan je u sklapanju genoma u virusne čestice. HE protein je pronađen samo kod beta skupine koronavirusa. Vežanjem za sijaličnu kiselinu i uz esteraznu aktivnost olakšava ulazak virusa u stanicu domaćina uz pomoć proteina S. Ovaj protein je također važan u širenju virusa kroz mukožu.

Koronavirus sadržava gene ORF1a/b, ORF3a, ORF6, ORF7a/b, ORF8 i ORF10 koji kodiraju proteine uključujući RNA polimerazu Slika 6. [10,12]



SLIKA 6. Genom i virion koronavirusa [18]

1.1.6 SARS-COV-2

SARS-CoV pripada skupini koronavirusa (coronaviridae) te je prvi iz te skupine virusa koji je prešao s životinja na čovjeka i izazvao epidemiju. [13] Epidemija SARS-a pojavila se krajem 2002. godine u Kini kada su kod oboljelih ljudi primijećeni karakteristični simptomi poput temperature, atipične upale pluća, suhog kašlja, bolova u mišićima i umora. Mjesto replikacije virusa u čovjeka je donji respiratorni sustav te se zato virus brzo širi s čovjeka na čovjeka kapljičnim putem. Virus napada epitelne stanice pluća, dendritične stanice i makrofage koji proizvode citokine pa zbog toga dolazi do povećanog broja citokina kod osoba kod kojih je potvrđena infekcija. [10,14] Veliki problem u borbi sa SARS-om bio je dug period inkubacije koji je iznosio od 7 do 14 dana te je to otežavalo sprječavanje širenja virusa. SARS nije dobio razmjere pandemije te je kraj epidemije proglašen 2004. godine. [14]

Epidemija SARS-CoV-2 izbila je u prosincu 2019. kad su zabilježeni prvi slučajevi atipične upale pluća, prijavljeni u Wuhanu u Kini. Svjetska zdravstvena organizacija je proglasila pandemiju u ožujku 2020. godine. Radi brzog širenja virusa i potvrđenih slučajeva diljem cijelog svijeta. U većini zemalja nastupila je karantena no unatoč restriktivnim mjerama virus se i dalje širi. Preporuke su da se održava fizička distanca smanje okupljanja, peru i dezinficiraju ruke te nosi zaštitna maska da se spriječi kapljično širenje virusa. Tipični simptomi za SARS-CoV-2 su kratak dah, temperatura, mijalgija, povraćanje, proljev te gubitak mirisa i okusa. [16]

SARS-CoV-2 širi se brže od SARS-CoV-a radi strukturnih razlika u proteinu S. Interakcija proteina S i receptora kojeg on koristi važna je za virusnu specifičnost. Većina koronavirusa koristi peptidaze kao stanični receptor. Koronavirusi iz skupine alfa koriste aminopeptidaze kao receptor dok SARS-CoV-2 iz skupine beta koristi ACE2 kao receptor za vezanje za stanicu. Nakon vezanja za stanicu virus ulazi u citosol koristeći katepsin i transmembransku proteazu, serin 2 (TM-PRSS2). Ove su proteaze važne jer sudjeluju u podjeli proteina u dvije domene S1 i S2. koja se događa u endosomima. [10]

Protein S SARS-CoV-a u velikoj većini ostaje ne razdijeljen radi manjka furinske strane razdijeljenja. Upravo se furinska strana razdijeljenja (FCS) koja je pronađena kod

SARS-CoV-2 i ostalih koronavirusa skupine beta, smatra glavnim razlogom bržeg širenja za razliku od SARS-CoV-a. Furin je bjelančevina koja se u velikoj mjeri nalazi u plućima te upravo to omogućava ekspresiju površinskog glikoproteina virusa SARS-Cov-2 u plućima i brže širenje. Kod SARS-CoV-2 je pronađeno i dodatnih 12 nukleotida te je to još jedna strukturna razlika u odnosu na SARS-CoV. [10, 17]

Smatra se da rano zbrinjavanje pacijenata pridonosi boljem ishodu infekcije i manjoj mogućnosti nastanka citokinske oluje te sindroma sustavnog upalnog odgovora (SIRS). [12]

1.2 PCR-DIJAGNOSTIKA COVID-19 INFEKCIJE

Dijagnoza COVID-19 postavlja se na temelju detektiranja virusne RNA u biološkim uzorcima. Osoba koja se smatra pozitivnom na SARS-Cov-2 mora imati laboratorijski utvrđen pozitivan nalaz unatoč tome ima li simptome ili nema.[12]

1.2.1 PCR

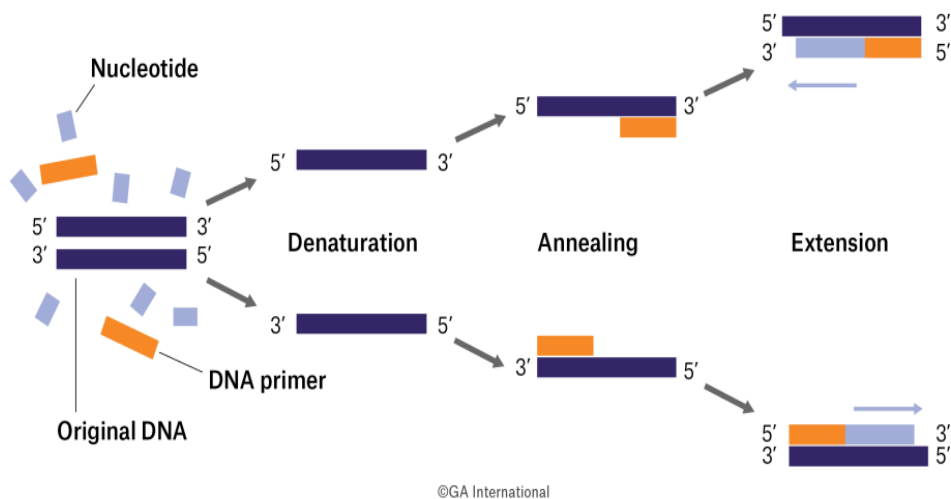
PCR (engl. *polymerase chain reaction*) je metoda lančane reakcije polimerazom. Koristi se za dobivanje velikog broja kopija određenog dijela DNA kako bi se taj dio mogao koristiti za sekvenciranje, gel elektroforezu ili za razne druge eksperimente. odnosno tehnika koja je široko rasprostranjena u raznim granama medicine [19]

Enzim koji se koristi kod PCR-a je Taq polimeraza, specifična DNA polimeraza izolirana iz bakterije *Thermus Aquaticus*. Uloga Taq polimeraze je stvaranje novih dijelova DNA koristeći postojeće kao predložak. Bakterija *Thermus Aquaticus* je termostabilna bakterija kojoj odgovaraju visoke temperature pa je zato Taq polimeraza pogodna za PCR pošto se umnažanje dijelova DNA odvija na visokim temperaturama. [19]

PCR se odvija u tri faze:

1. **Denaturacija** se odvija na temperaturi od 96°C koja omogućava razdvajanje dvolančane DNA u jedan lanac.
2. **Vežanje** se odvija na temperaturi od 55-65°C koja je pogodna za vežanje početnica na jednolančanu DNA.
3. **Produljenje lanca** se odvija na temperaturi od 72°C kako bi Taq polimeraza produljila početnice i sintetizirala novi lanac Slika 7.

Ovaj se ciklus obično odvija 25 do 35 puta, ovisno o duljini DNA. Vizualizacija DNA nakon PCR-a obično se provodi gel elektroforezom, koja se bazira na provlačenju fragmenata DNA kroz gel koristeći električnu struju pa se fragmenti razdvajaju na osnovu veličine.[19]



SLIKA 7. Faze PCR-a [20]

1.2.2 RT-PCR

RT-qPCR (engl. „reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction“) je metoda kod koje reverzna transkripcija omogućuje upotrebu RNA kao predloška za stvaranje komplementarne DNA (cDNA). Korištenjem enzima reverzne transkriptaze stvara se jednolančana kopija cDNA koja se onda može umnažati DNA polimerazom i nastaje dvolančana DNA. PCR u stvarnom vremenu, omogućuje praćenje količine nastalog proizvoda u stvarnom vremenu i omogućuje kvantificiranje određene DNA.

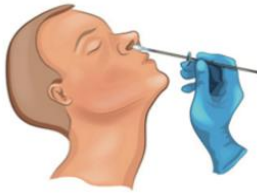
Ova metoda je visoko specifična i smatra se zlatnim standardom u dijagnostici COVID-19. Nukleinska kiselina se amplificira koristeći uzorke dobivene iz respiratornog sustava. Unatoč visokoj specifičnosti, mogući su lažno pozitivni ili negativni rezultati radi mutiranja virusa, radi inhibicije PCR-om ili radi kontaminacije. Također, SARS-CoV-2 je, kao i ostali RNA virusi, sklon inhibiciji i degradaciji pa je i to jedan od razloga mogućih lažnih rezultata. Važno je pravilno sakupljanje uzorka jer rezultat testa ovisi o količini virusa prisutnog u uzorku odnosno o fazi bolesti kroz koju pacijent prolazi. [16]

RT-PCR koristi strukturne proteine i gene SARS-CoV-2 kao mete detekcije. Najosjetljiviji za detekciju su proteini S, E i N, geni ORF1a i ORF1b te RNA polimeraza. Upravo su geni ORF1a i ORF1b te RNA polimeraza specifični samo za SARS-CoV-2 te dokazivanje njihove prisutnosti upućuje na pozitivan rezultat testa. [16]

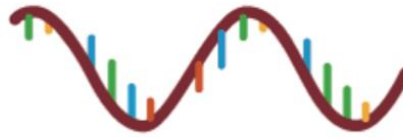
Tipične faze detekcije virusa su RNA izolacija, purifikacija, reverzna transkripcija u cDNA, amplifikacija cDNA i detekcija fluorescentnog signala RT-PCR uređajem. Svjetska zdravstvena organizacija potvrdila je tijekom izvođenja PCR-a koji uključuje amplifikaciju E proteina i RNA polimeraze ovisne o RNA te kao potvrdu amplifikaciju N gena. Ovaj se tijekom izvođenja RT-PCR-a koristi u Europi prilikom dijagnostike COVID-19 Slika 8. [12,21]

Za RT-PCR je potrebna čista, kvalitetna i nerazgrađena RNA. RNA dobivena iz masnog tkiva ili tkiva bogatog kolagenom obično je manje kvalitetna. [22]

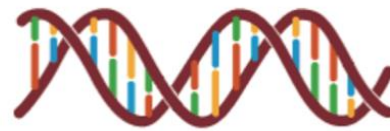
a) sample collection



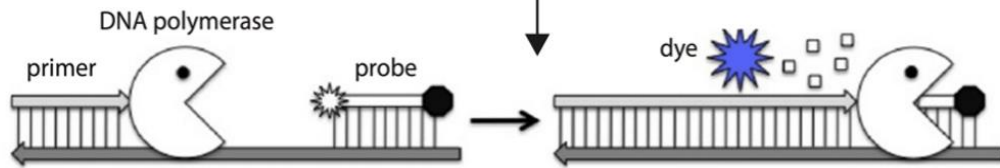
b) RNA extraction



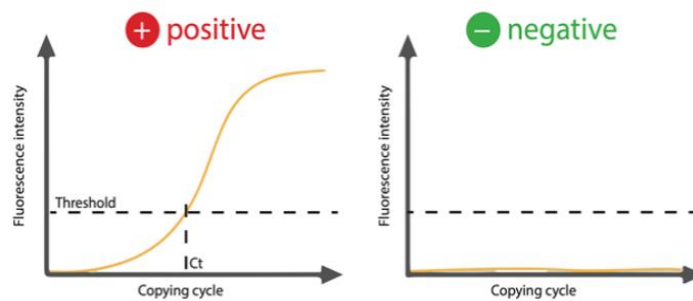
c) Reverse transcription



d) RT-PCR amplification



e) Results



SLIKA 8.Princip rada RT-qPCR-a [21]

2 CILJ RADA

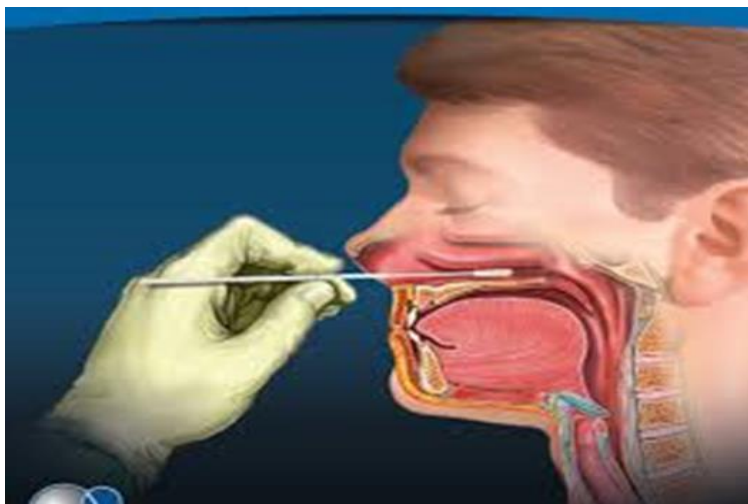
Cilj ovog rada je opisati PCR tehnologiju te pojasniti njenu ulogu u dijagnostici COVID-19 infekcije.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJAL

Uzorci prikladni za testiranje COVID-19 su uzorci uzeti iz gornjeg respiratornog trakta poput nazofaringealnih i orofaringealnih briseva. Slika 9.

Nakon uzorkovanja, uzorak se mora uroniti u sterilnu epruvetu s medijem i pohraniti na temperaturi 2-4°C manje od 4 dana ili duži period na -70°C. [12]



Slika 9. [23]

3.2 METODE

3.2.1 RT-qPCR

3.2.1.1 IZOLACIJA RNA-Viral DNA/RNA Extraction Kits

Opis i svrha

Komplet je namijenjen za brzu izolaciju virusne RNA / DNA iz seruma i drugih tekućih uzoraka. Moguće je istovremeno obraditi veliki broj uzoraka.

Izolirane nukleinske kiseline su visoko pročišćene i u dostatnoj količini te se mogu široko koristiti u područjima dijagnostike.

Magnetne kuglice vežu negativno nabijenu nukleinsku kiselinu, prenose se i oslobađaju putem specijaliziranih magnetskih šipki tijekom procesa ekstrakcije čime se postiže automatizirana ekstrakcija. [24]

Sadržaj kita i pohrana

Kit *Viral DNA and RNA Extraction Kit*– *TIANLONG* sadrži 4 ekstrakcijske pločice i dostatan je za 64 izolacije . Ekstrakcijske ploče u koje se dodaje uzorak tvornički su napunjene sa svim potrebnim reagensima za izolaciju Slika 10. [25]



Slika 10.[25]

Postupak

Izolacije RNA uz korištenje kita *Viral DNA and RNA Extraction Kit– TIANLONG* odvija se u aparatu GeneRotex96 Nucleic Acid Extraction System TIANLONG Slika 11.[26]



Slika 11. [26]

Izvaditi plastičnu pločicu iz kutije kita i okrenuti gore-dolje kako bi se magnetske kuglice razdvojile. Skinuti aluminijsku foliju s gornje strane pločice i pritom paziti da ne dođe do prskanja radi kontaminacije [24]

Dodati 200 μ l uzorka u prvi i sedmi stupac pločice prema donjoj shemi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Sample1							9				
B	2							10				
C	3							11				
D	4							12				
E	5							13				
F	6							14				
G	7							15				
H	8							16				

Izolacija virusne RNA u aparatu odvija se prema sljedećem programu u Tablici 1:

Tablica 1. Program automatske izolacije

Stupac	Ime	čekanje (sekunde)	Miješanje (sekunde)	Magnet (sekunde)	Brzina	Volumen (μ l)	Stanje grijanja	Temperatura ($^{\circ}$ C)
1	Liza stanice	0	240	180	3000	825	-	0
2	Pranje 1	0	60	60	2000	700	Ispiranje	100
3	Pranje 2	60	60	60	2000	800	Ispiranje	100
6	otapanje	0	300	120	2500	80	Ispiranje	100
2	Otpuštanje zrnaca	0	10	0	2500	700	-	0

Nakon što je program gotov izolirane nukleinske kiseline nalaze se u šestom i dvanaestom stupcu pločice. Mogu se pohraniti na 4° C do 24h, a za dužu pohranu smrzavaju se na -20° C.

[24]

3.2.1.2 AMPLIFIKACIJA I DETEKCIJA

Za amplifikaciju i detekciju virusnog genoma koristi se -LightMix® SarbecoV E-geneplus EAV control(Roche) i- LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche)

Opis i svrha

LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche)

Fragment dugačak 76 bp iz konzerviranog područja u genu E otkriva se probama obilježenim s fluorescentnom bojom FAM (530 kanal). Ovim se testom detektira virus SARS-CoV-2 kao i drugi virusi povezani s SARS-om koji su podrijetlom od šišmiša (Sarbecovirus). Lažno negativni rezultati u ispitivanju patogena mogu biti posljedica prisutnosti inhibitora, razgrađenog ciljanog materijala ili neuspješne ekstrakcije nukleinskih kiselina stoga se u ovom kitu nalazi ekstrakcijska kontrola EAV koja je obilježena fluorescentnom bojom Atto647 (660 kanal). [27]

LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche)

Fragment dug 87 bp iz konzerviranog područja gena o RNA-ovisnoj RNA polimerazi (RdRP) otkriva se probama obilježenim s fluorescentnom bojom FAM (530 kanal). [28]

Kontrole koje se koriste u analizi:

- Pozitivna kontrola (PC) koristi se kao cjelovita pozitivna kontrola procesa kako bi se potvrdilo da se ispitivanje izvodi kako je predviđeno, temelji se na umjetnoj RNA koja pokriva ciljne sekvence ispitivanja genoma SARS-CoV-2.
- Negativna kontrola (NTC) služi kao kontrola za praćenje kontaminacije PCR reagensa smogućim pozitivnim uzorcima sa sekvencama SARS-CoV-2 koja bi se mogla dogoditi tijekom postupka PCR-a. NTC se sastoji od vode. [27,28]

Sadržaj kita i pohrana

Oba kita sadrže dovoljnu količinu sljedećih reagensa koji su potrebni da bi se izvelo 96 reakcija :

Sadržaj E kita:

- liofilizirane početnice i probe (bočica sa žutim čepom)
- pozitivna kontrola (PC) (bočica sa crnim čepom)
- ekstrakcijska kontrola (bočica sa bijelim čepom)

Sadržaj R kita:

- liofilizirane početnice i probe (bočica sa žutim čepom)
- pozitivna kontrola (PC) (bočica sa crnim čepom)

Dodatni reagens koji je potreban je LightCycler® Multiplex RNA Virus Master koji sadrži (enzim reverznu transkriptazu, dNTP-ove, pufer, MgCl₂, PCR-voda). [27,28]

Kitovi su stabilni godinu dana nakon proizvodnje (potrebno ih je čuvati od 4°C do 25°C u mraku). Otopljeni reagensi stabilni su dva tjedna ako se čuvaju zaštićeni od svjetlosti i na temperaturi od 2° C do 8°C. Otopljeni reagens može se duže čuvati ako se smrzne na temperaturu od -15 ° C do -25 ° C. Višestruki ciklusi smrzavanja i otapanja se moraju izbjegavati jer time se smanjuje intezitet fluorescencije. Otopljene pozitivne kontrole moraju se uvijek čuvati zamrznute. [27,28]

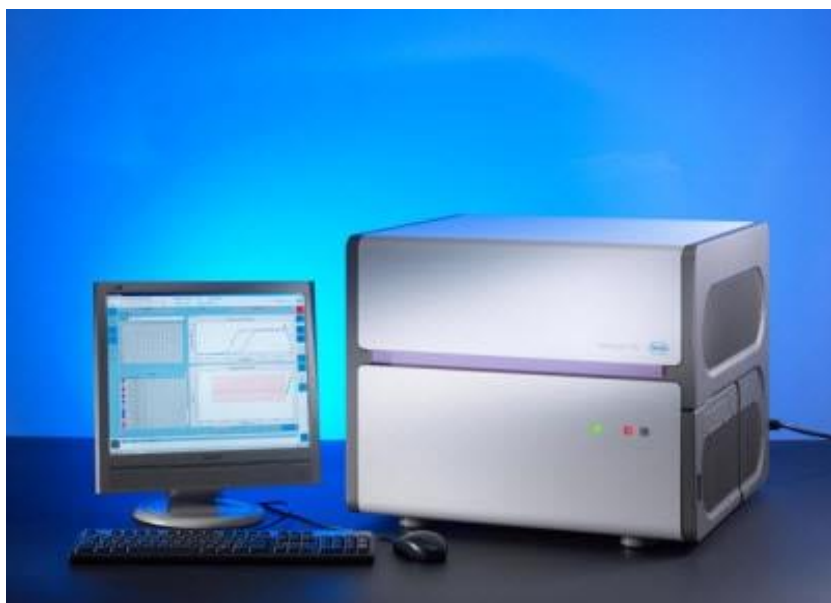
Dodatno potrebni materijal i oprema

- jednokratne rukavice od lateksa
- pipete
- nastavci za pipete
- tubice (1,5 ml)

- vortex mješalica
- stolna centrifuga
- 0,2 ml PCR pločica i brtveni film
- osobna zaštitna oprema
- spremnik za infektivni otpad

Postupak

Postupak detekcije i amplifikacije E i R gena se odvija u aparatu Roche LightCycler® 480 II Slika 12. Prije započinjanja cijelog postupka, potrebno je unijeti parametre pri kojima se odvija reakcija prikazane u Tablici 2. [27,28]



Slika 12. [29]

Protokol se sastoji od četiri koraka:

1. Reverzna transkripcija virusne RNA
2. Denaturacija
3. Umnažanje
4. Hlađenje

Tablica 2. parametri za programiranje

Program Step:	<i>RT Step</i>	<i>Denaturation</i>	<i>Cycling</i>			<i>Cooling</i>
Parameter						
Analysis Mode	<i>None</i>	None	Quantification mode			None
Cycles	1	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60 *	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	Single	None	None

a) Priprema početnica i proba:

U bočicusa žutim poklopcem koja sadrži početnice i probe dodati 50 µl PCR-vode, vorteksirati i centrifugirati. Potrebno je upotrijebiti 0,5 µl reagensa za PCR reakciju od 20 µl.

b) Priprema pozitivne kontrole:

Dodati 160 µl 10 mM Tris pufera bez RNaze / DNaze, pH8 - 8,5 u bočicu s crnim čepom . Pomiješati pipetiranjem gore-dolje 10 puta. Otopljenu kontrolu čuvati na -20°C. Korištenje Trisa povećava stabilnost otopine. [27,28]

c) Priprema ekstrakcijske kontrole:

Dodati 1200 μl 10 mM Tris pufera bez RNaze / DNaze, pH 8 - 8,5 u bočicu s bijelim čepom. Pomiješati pipetiranjem gore-dolje 10 puta. Otopljenu kontrolu čuvati na -20°C . [27,28]

d) Priprema reakcijskog miksa:

Reakcijska smjesa se pripremi prema izračunu prikazanom u tablici 3:

Tablica 3. Izračun sadržaja reakcijske smjese

KOMPONENTE	za 5 μl uzorka	
PCR-voda	10.4 μl	x (broj uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola + 1)
Mješavina početnica i proba	0.5 μl	
Roche Master	4.0 μl	
RT- enzim	0.1 μl	

Prema izračunu staviti komponente u hladnu tubicu, lagano promiješati i prebaciti 15 μl svaku jažicu PCR pločice i dodati 5 μl uzorka ili kontrole u točno određene jažice. Zalijepiti pločicu i centrifugirati.

Staviti pločicu u aparat i pokrenuti program. [27,28]

3.2.2 BRZI PCR TEST

VitaPCR SARS-CoV-2 Gen 2 Assay (Credo Diagnostics Biomedical)

VitaPCR SARS-CoV-2 test dizajniran je za specifično otkrivanje SARS-CoV-2 RNA. Analiza testa odvija se na VitaPCR aparatu Slika 13.



Slika 13.[30]

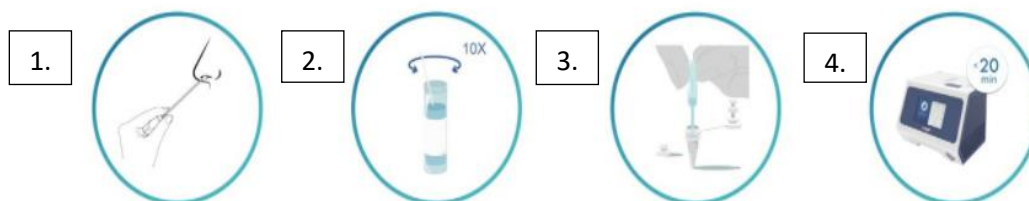
To je brzi molekularni in vitro dijagnostički test koji koristi tehnologiju RT-qPCR za kvalitativnu detekciju virusne RNA SARS-CoV-2 direktno iz nazofaringealnih ili orofaringealnih briseva.

Cilj detekcije SARS-CoV-2 RNA nalazi se u regiji nukleokapsidnog (N) gena virusa. Test ima i dodatne početnice za otkrivanje humanog beta-globina (HBB), koji se koristi kao kontrola adekvatnosti uzorka, tj. za praćenje eventualne prisutnosti čimbenika inhibicije u PCR-u postupku.

Priprema uzorka ne zahtijeva više od dvije minute i to je razlog njegove praktičnosti. Dobro uspostavljena tehnika liofilizacije omogućuje da se test čuva na sobnoj temperaturi (25 °C) tijekom jedne godine. [31]

Postupak:

1. Uzeti obris nazofarinksa sa štapićem
2. Uroniti štapić sa brisom u bočicu sa puferom, promiješati 15-ak puta , izvaditi štapić, zatvoriti bočicu i lagano rotirati 10-ak puta gore-dolje.
3. 30 μ L pufer otopine lizata prebaciti u tubicu koja sadrži liofilizirane PCR reagense, repipetirati i paziti da ne nastanu mjehurići.
4. Staviti tubicu u aparat i pokrenuti analizu Slika 14.



Slika 14.[30]

Tijekom cijelog reakcijskog procesa moguće je vizualizirati krivulje napretka PCR-a u stvarnom vremenu za ciljne gene slične SARS-CoV-2 i SARS-CoV-2, kao i za unutarnju kontrolu. [31]

4 REZULTATI

U ovom poglavlju je prikaz i pojašnjenje svih rezultata koji se mogu dobiti s prethodno navedenim testovima za detekciju COVID-19 infekcije

PCR produkt nastaje eksponencijalno. Potrebno je nekoliko ciklusa da bi se umnožilo dovoljno DNA kopija, krivulja odnosa intenziteta fluorescencije prema broju ciklusa pokazuje sigmoidalni oblik. U kasnim ciklusima supstrati reakcije su potrošeni PCRprodukt se više ne udvostručuje, krivulja prelazi u ravan oblik.

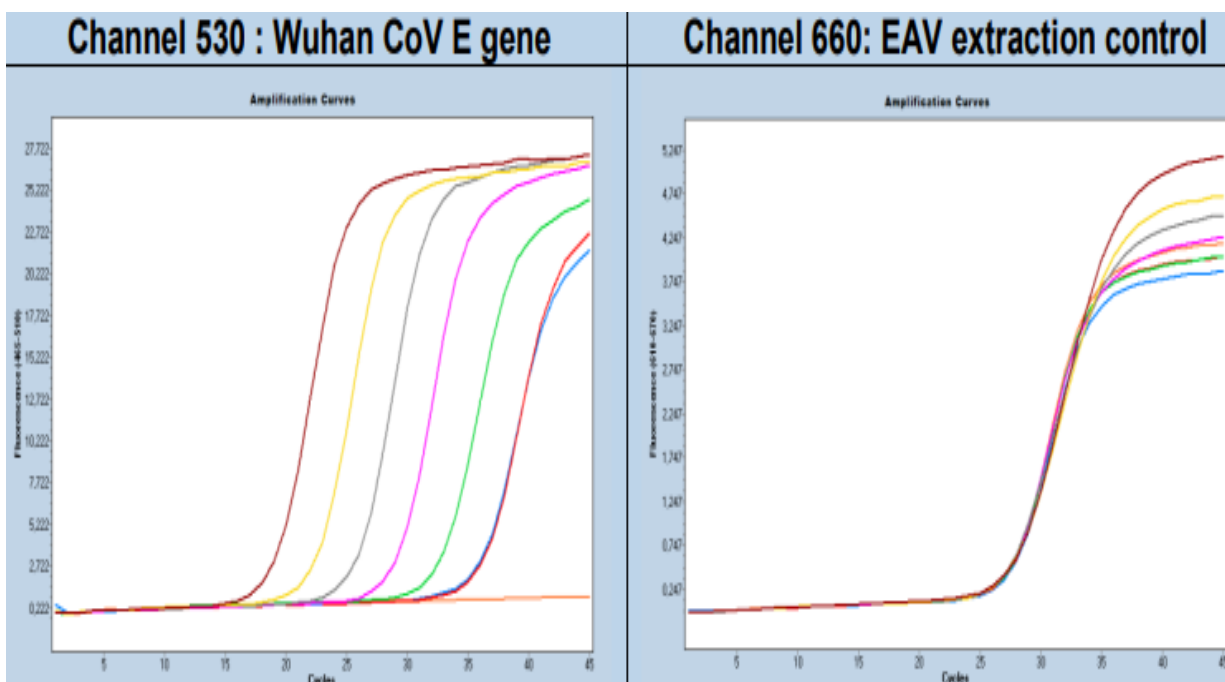
Točka na krivulji kada se intenzitet fluorescencije naglo povećava nekoliko standardnih devijacija iznad bazne linije, naziva se granični ciklus (engl. *threshold cycle-Ct*). Ct opisuje broj ciklusa u kojima je izveden real time PCR, prije nego što se mjeri fluorescencija. Taj proces traje duže, što je manje genoma virusa na početku PCR-a. Visoka CT vrijednost stoga ukazuje na nisko virusno opterećenje uzorka.

Na apscisi elektroferograma se prikazuje broj ciklusa, a na ordinati intenzitet fluorescencije.

Na lijevom elektroferogramu koji se dobije obradom florescencije (detekcija na kanalu 530) pomoću softverskog programa, različitim bojama prikazani su pojedini ispitivani uzorci. Na desnom elektroferogramu (detekcija na kanalu 660) je prikazana ekstrakcijska kontrola svakog pojedinačnog uzorka. Svaka pojedinačna analiza mora imati pozitivnu i negativnu kontrolu Slika 15, Slika 16.

U tablicama su prikazani svi mogući rezultati koji se mogu očitati u kanalima 530 i 660 i prema očitanoj kombinaciji se određuje konačni rezultatu ka kombinacije u kanalima 530 (Tablica 4. i 5.)

-1. LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche)

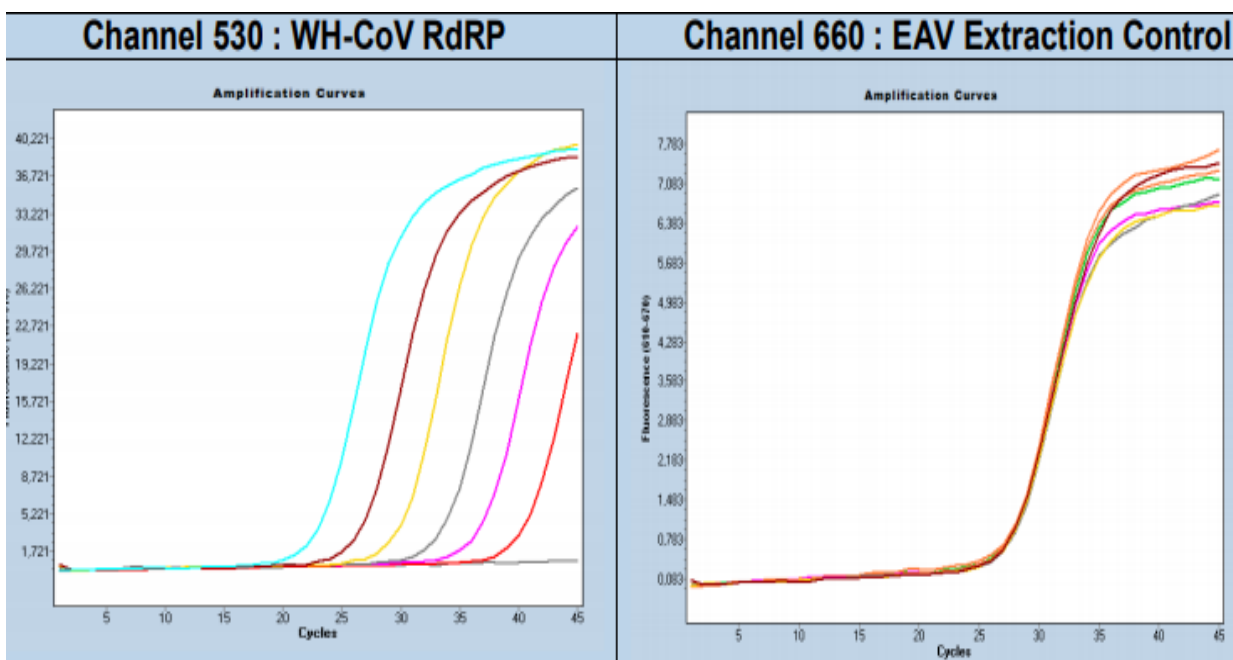


Slika 15. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa

Tablica4. Prikaz svih mogućih rezultata za E-gen

Channel 530 (sample)	Channel 660 Control Reaction	Channel 530 NTC Control	Result
No amplification	Detectable	Negative	Not detectable
Amplification Cp < 36⁺	Not relevant	Negative	SarbecoV Positive
No amplification	Not detectable	Not relevant	PCR failure Repeat
Amplification signal	Not relevant	Positive	Contamination Repeat

2. LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche)



Slika 16. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa

Tablica 5. Prikaz svih mogućih rezultata za R-gen

Channel 530 (sample)	Channel 660 Control Reaction	Channel 530 NTC Control	Result
No amplification	Detectable	Negative	Not detectable
Amplification Cp < 39 ⁺	Not relevant	Negative	WH-CoV Positive
No amplification	Not detectable	Not relevant	PCR failure Repeat
Amplification signal	Not relevant	Positive	Contamination Repeat

3. VitaPCR SARS-CoV-2 Gen 2 Assay (Credo Diagnostics Biomedical)

Na apscisi je prikazan broj ciklusa, a na ordinati intenzitet fluorescencije.

Žutom bojom označen je uzorak, a zelenom interna kontrola. Na dnu ekrana se prikazuje i Ct vrijednost za pozitivan uzorak i internu kontrolu Slika17.



Slika 17. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa

Prije tumačenja rezultata moraju se provjeriti sve kontrole koje su uključene prilikom izvođenja analize. Ako pozitivne ili negativne kontrole nisu valjane, rezultati se ne mogu interpretirati i svi uzorci se trebaju ponovno testirati nakon što se utvrdi i ukloni uzrok nevaljanosti kontrola.

Ct vrijednost prikazuje broj ciklusa potrebnih dok fluorescencijski signal ne prijeđe prag, odnosno dok ne postane mjerljiv. Ct vrijednost je obrnuto proporcionalna količini virusa (ako je Ct vrijednost veća, količina virusa prisutna u uzorku je mala i obrnuto). Međutim, ta vrijednost ne mora uvijek odražavati pravo stanje jer mala količina virusa može biti prisutna zbog nepravilno uzetog uzorka, načina na koji je uzet uzorak, načina transporta

i pohrane uzorka. Također, ovisi i o fazi bolesti. Na samom početku infekcije, Ct vrijednost bit će visoka, odnosno smatrat će se da osoba nije zarazna, dok će joj se možda već kroz nekoliko dana Ct vrijednost smanjiti i osoba će postati vrlo zarazna. [32]

5 RASPRAVA

Molekularnim i dijagnostičkim testovima za dijagnostiku COVID-19 infekcije smatraju se, dakle, RT-PCR i brzi PCR test.

RT-PCR ima visoku specifičnost i osjetljivost što znači da će pacijenti kod kojih je prisutan virus SARS-CoV-2 biti određeni kao pozitivni, dok će pacijenti kod kojih nije prisutan virus biti određeni kao negativni s velikim postotkom točnosti. Velika prednost RT-PCR testova je u tome što su uzorci za testiranje nazofaringealni i orofaringealni brisevičije uzorkovanje nisu invazivne metode pa ne zahtijevaju posebnu pripremu pacijenta i ne uzimaju više od nekoliko sekundi zauzorkovanje [33,34]

No, unatoč pozitivnim stranama RT-PCR testiranja postoje i one negativne koje je također potrebno spomenuti. Rezultati RT-PCR testiranja se uglavnom čekaju oko jedan dan, što je negativno za osobu koja je možda razvila simptome i još uvijek ne zna uzrok simptoma, te nemogućnost prepoznavanja pacijenata koji su preboljeli infekciju. Nadalje, prisutni su lažno negativni rezultati, odnosno osobe kod kojih je prisutan virus označene su kao negativne što nije dobro jer se te osobe dalje neće izolirati i širit će virus među populacijom.[33,34]

Za razliku od klasičnog RT-PCR-a kojem treba ponekad nekoliko dana do izdavanja rezultata, rezultati brzog PCR-a budu već kroz 30 minuta i to je njegova najveća prednost. Nadalje, visoko je specifičan i osjetljiv za pozitivne rezultate odnosno s velikom točnošću detektira virus kod osoba kod kojih je stvarno prisutan. [33,34]

Negativne strane brzog PCR-a su što je stopa lažno negativnih rezultata veća od RT-PCR-a. Neke studije govore da ta stopa iznosi čak 50 % te nije toliko pouzdan u kasnijoj fazi bolesti. Nadalje, pacijenti najčešće moraju putovati do bolnice kako bi odradili brzi PCR jer on najčešće nije dostupan za izvođenje u manje opremljenim ustanovama. Kao i kod RT-PCR-a, uzimanje briseva nije ugodno iskustvo, naročito za djecu. [33,34]

6 ZAKLJUČAK

Unatoč prednostima i nedostacima RT-PCR-a i brzog PCR-a, obje metode se svakodnevno koriste pri dijagnostici COVID-19 infekcije. RT-PCR je možda radi svoje veće specifičnosti i osjetljivosti, te manje stope lažno negativnih rezultata bolja opcija, no ukoliko je potrebna brza dijagnostika pristupit će se brzom PCR-u te nastaviti s RT-PCR-om ukoliko rezultat bude negativan kako bi se negativan rezultat potvrdio.

7 LITERATURA

1. Pellett PE, Mitra S, Holland TC. Basics of virology. *Handb Clin Neurol*. 2014; 123: 45–66.
2. British Society for Immunology. Viruses: Introduction dostupno na: <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/viruses-introduction> pristupljeno: 15.05.2021.
3. Presečki V. Stomatološka mikrobiologija. Medicinska naklada; 2009
4. Viral replication dostupno na: <https://www.dreamstime.com/illustration/viral-replication.html> pristupljeno: 29.05.2021.
5. Respiratorni virusi dostupno na: https://bfm.hr/wp-content/uploads/2020/09/21_vrusi-SVE_VMS2012.pdf pristupljeno: 29.05.2021.
6. Ma Z, Ni G, Damania B. Innate Sensing of DNA Virus Genomes. *Annu Rev Virol*. 2018 Sep 29;5(1):341-362.
7. Villa TG, Abril AG, Sánchez S, Miguel Td, Sánchez-Pérez A. Animal and human RNA viruses: genetic variability and ability to overcome vaccines. *Arch Microbiol*. 2021 Mar;203(2):443-464
8. Jordan PC, Stevens SK, Deval J. Nucleosides for the treatment of respiratory RNA virus infections. *Antivir Chem Chemother*. Jan-Dec 2018;26:2040206618764483.
9. DNA i RNA virusi dostupno na: <https://quantumofjk.blogspot.com/2020/03/da-li-virusi-spadaju-u-ziva-bica.html> pristupljeno: 31.05.2021.
10. Rabaan AA, Al-Ahmed SH, Haque S, Sah R, Tiwari R, Malik YS, Dhama K, et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview. *Infez Med*. 2020 Ahead Of Print Jun 1;28(2):174-184.
11. James H. Strauss, Ellen G. Strauss. *Viruses and Human Disease* 2nd ed. Elsevier Inc.; 2008.
12. Lippi G, Mattiuzzi C, Bovo C, Plebani M. Current laboratory diagnostics of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Acta BioMed*. 2020 May 11;91(2):137-145.
13. Poon LLM, Wong OK, Chan KH, Luk W, Yuen KY, Peiris JSM, et al. Rapid diagnosis of a coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome (SARS). *Clin Chem*. 2003 Jun;49(6 Pt 1):953-5.

14. Bermingham A, Heinen P, Iturriza-Go'mara M, Gray J, Appleton H, Zambon MC. Laboratory diagnosis of SARS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2004 Jul 29;359(1447):1083-9.
15. Haque SKM, Ashwaq O, Sarief A, Mohamed AKAJ. A comprehensive review about SARS-CoV-2. *Future Virol.* 2020 Sep;15(9):625-648.
16. Wu SY, Yau HS, Yu MY, Tsang HF, Chi Chan LW, Cho WCS, et al. The diagnostic methods in the COVID-19 pandemic, today and in the future. *Expert Rev Mol Diagn.* 2020 Sep;20(9):985-993.
17. Coutard B, Valle C, de Lamballerie X, Canard B, Seidah NG, Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742
18. Rastogi M, Pandey N, Shukla A, Singh SK. SARS coronavirus 2: from genome to infectome. *Respir Res.* 2020 Dec 1;21(1):318.
19. Khan Academy. Polymerase chain reaction (PCR) dostupno na: <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr> pristupljeno: 25.06.2021.
20. Alexander Goldberg, Ph.D. A Brief History of PCR and Its Derivatives dostupno na: <https://blog.labtag.com/a-brief-history-of-pcr-and-its-derivatives/> pristupljeno: 25.06.2021.
21. RT PCR dostupno na: <https://www.globalbiotechinsights.com/articles/20247/the-worldwide-test-for-covid-19> pristupljeno: 29.05.2021.
22. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3 pages 87 - 112 in: A-Z of quantitative PCR (Editor: S.A. Bustin). International University Line (IUL) La Jolla, CA, USA; 2004.
23. Uzimanje nazofaringealnog brisa. Dostupno na: www.szpz.info Pristupljeno: 19.06.2021.
24. Viral DNA and RNA Extraction Kit Instruction Manual
25. Tianlong extraction kit. Dostupno na: <https://www.pyfa.co.id/product/pcr-extraction-kit/> Pristupljeno: 19.06.2021.
26. GeneRotex 96. Dostupno na: http://en.medtl.com/prod_view.aspx?nid=3&typeid=69&id=215 Pristupljeno: 19.06.2021.
27. LightMix® Mo. Dostupno dular SARS and Wuhan CoV E-gene. Instruction Manual
28. LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-gene. Instruction Manual

29. LightCycler 480 Dostupno na:

https://lifescience.roche.com/global_en/articles/lightcycler-480-system-technology.html Pristupljeno: 19.06.2021.

30. VitaPCR Sars-CoV-2 Gen 2 Assay Dostupno na:

<https://www.intermed.be/en/professional-products/laboratory-diagnostics/serology-amp-virology/rapid-test/vitapcr-credo-diagnostics.html>

Pristupljeno: 19.06.2021.

31. Performances of the VitaPCR™ SARS-CoV-2 Assay during the second wave of the COVID-19 epidemic in France. Frédéric Fitoussi, Raphaël Dupont, Serge Tonen-Wolyec, Laurent Bélec.

32. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. JAMA. 2020;323(22):2249-2251.

33. Which COVID test is best? Pros and cons of coronavirus detection methods Dostupno na: <https://utswmed.org/medblog/covid19-testing-methods/> Pristupljeno: 18.06.2021.

34. Pros and Cons of the Common Types of COVID-19 Tests Dostupno na: <https://www.biospace.com/article/pros-and-cons-of-the-common-types-of-covid-19-tests/> Pristupljeno: 18.06.2021.

8 ŽIVOTOPIS

OPĆI PODATCI:

Ime i prezime: Iva Turkalj

Datum rođenja: 01.09.1999.

Broj mobilnog telefona: 099 416 1630

E-mail adresa: iva.turkalj845@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2006. - 2014. Osnovna škola Maria Martinolića, Mali Lošinj

2014.-2018. Srednja škola Ambroza Haračića – Opća gimnazija, Mali Lošinj

2018.-2021. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

STRANI JEZICI:

Engleski jezik

OSTALE AKTIVNOSTI:

2006. – 2018. Lošinjske mažoretkinje

2009. - 2017. Tenis klub „Lošinj – Jadranka“