

Stopa Sars-Cov-2 pozitivnih slučajeva i distribucija varijanti u Splitsko-dalmatinskoj županiji u vremenu od 3 pandemijske godine

Urlić, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, University Department of Forensic Sciences / Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzične znanosti**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:227:987010>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**

SVEUČILIŠTE
U
SPLITU



SVEUČILIŠNI
ODJEL ZA
FORENZIČNE
ZNANOSTI

Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department for Forensic Sciences](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI

FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

**STOPA SARS-CoV-2 POZITIVNIH SLUČAJEVA I
DISTRIBUCIJA VARIJANTI U SPLITSKO-DALMATINSKOJ
ŽUPANIJI U VREMENU OD 3 PANDEMIJSKE GODINE**

Marta Urlić

Split, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA FORENZIČNE ZNANOSTI
FORENZIČNA KEMIJA I MOLEKULARNA BIOLOGIJA

DIPLOMSKI RAD

STOPA SARS-CoV-2 POZITIVNIH SLUČAJEVA I
DISTRIBUCIJA VARIJANTI U SPLITSKO-DALMATINSKOJ
ŽUPANIJI U VREMENU OD 3 PANDEMIJSKE GODINE

Mentor:

Izv. prof. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med.

Marta Urlić

584/2020

Split, rujan 2023.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. SARS-CoV-2 virus i COVID-19 | 1 |
| 1.2. SARS-CoV-2 genom | 1 |
| 1.3. SARS-CoV-2 mutacije i varijante | 3 |
| 1.4. Prevalencija SARS-CoV-2 varijanti od značaja (VOC) | 4 |
| 1.5. Ključni dijagnostički testovi | 6 |
| 1.5.1. RT-PCR test..... | 7 |
| 1.5.2. Sekvenciranje nove generacije..... | 8 |
| 2. CILJ RADA | 11 |
| 3. IZVORI PODATAKA I METODE | 12 |
| 3.1. Uzorak izbora za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa i njegovo prikupljanje | 12 |
| 3.1.1. Obrisak nazofarinksa na SARS-CoV-2..... | 12 |
| 3.1.2. Obrisak ždrijela na SARS-CoV-2..... | 13 |
| 3.2. Izolacija RNK-a | 14 |
| 3.2.1. Izolacija virusnog RNK-a za dijagnostiku Covid-19 | 14 |
| 3.2.2. Princip rada automatskog izolatora..... | 16 |
| 3.3. Myra BMS | 19 |
| 3.4. PCR Reakcija..... | 20 |
| 3.4.1. 1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit | 22 |
| 3.4.2. Real Time PCR Detection System - Gentier96E | 24 |
| 3.4.3. Interpretacija nalaza | 25 |
| 3.5. Sekvenciranje..... | 27 |
| 3.5.1. Priprema uzoraka za sekvenciranje..... | 28 |
| 4. REZULTATI..... | 30 |
| 5. RASPRAVA | 35 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 37 |
| 7. LITERATURA | 38 |
| 8. SAŽETCI (na hrvatskom i engleskom jeziku)..... | 41 |
| 9. ŽIVOTOPIS | 43 |
| 10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI | 44 |

Diplomski rad je izrađen na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije (NZJZ) te na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti u Splitu pod nadzorom mentorice Izv. prof. prim. dr. sc. Vanje Kaliterna, dr. med., u vremenskom razdoblju od kolovoza 2022. do kolovoza 2023. godine.

Datum predaje diplomskog rada: 6.9.2023.

Datum prihvaćanja rada:

Datum usmenog polaganja:

Povjerenstvo: 1. Izv. prof. prim. dr. sc. Vanja Kaliterna, dr. med.

2. Doc. dr. sc. Ivan Jerković

3. Doc. dr. sc. Snježana Štambuk

1. UVOD

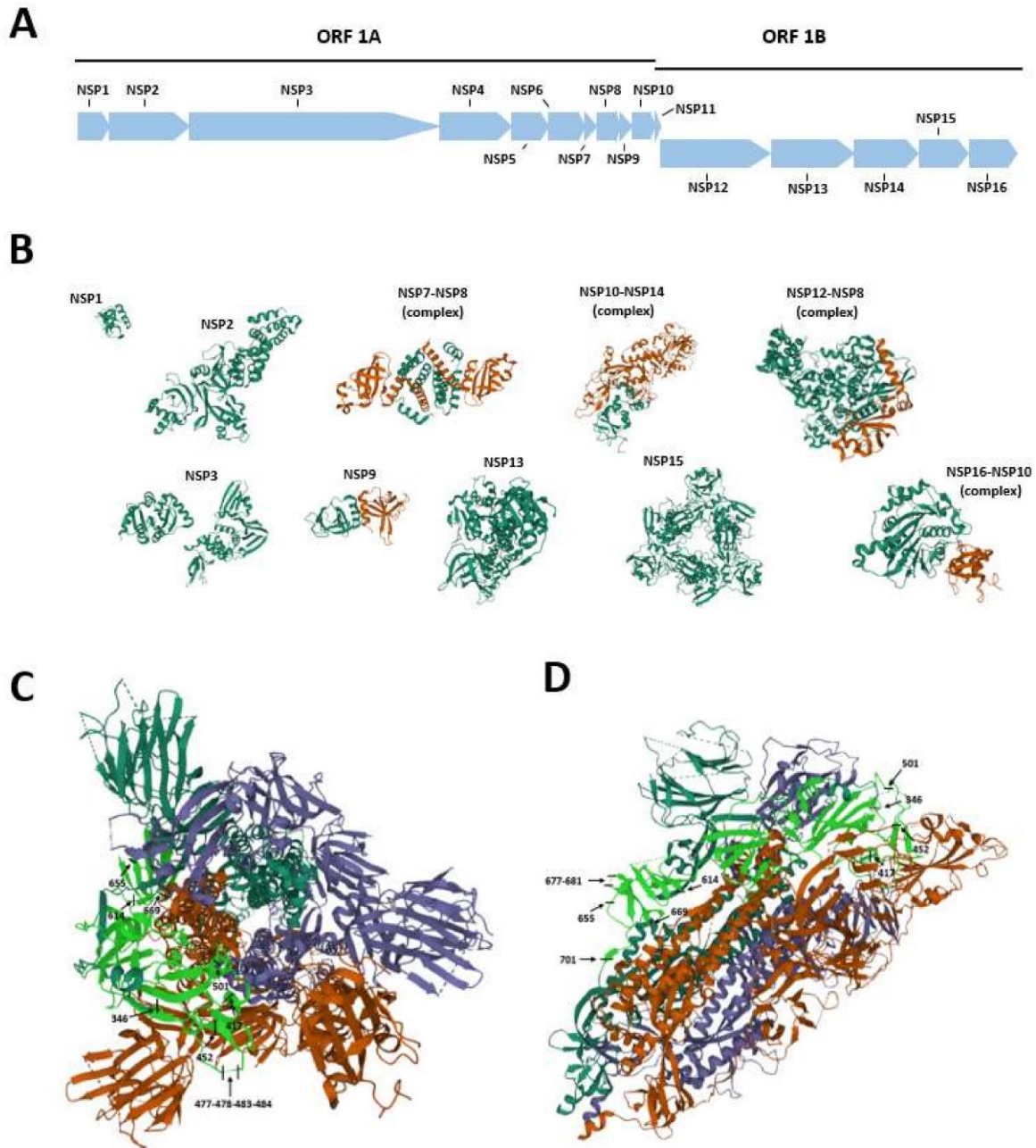
1.1. SARS-CoV-2 virus i COVID-19

Koronavirusi (CoVs) su raznolika skupina jednolančanih RNK virusa koji zahvaćaju brojne kralježnjake. Postoje četiri roda koronavirusa – alfa, beta, gama i delta. Od njih četiri, alfa i beta mogu uzrokovati bolesti ljudi jer imaju sposobnost prelaska sa životinja na ljude. Kao rezultat zoonotske transmisije, u posljednja dva desetljeća, pojavila su se tri patogena soja koronavirusa s visokom smrtnošću. Prva dva, Teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe acute respiratory syndrome*, Sars-CoV-1) te Bliskoistočni respiratorni sindrom (engl. *Middle East respiratory syndrome*, MERS-CoV), pojavila su se 2002. godine i 2012. godine i nisu se proširili svijetom. Novi beta koronavirus, nazvan SARS-CoV-2, pojavio se krajem 2019. godine u provinciji Hubei, u Kini. Ovaj virus uzrokuje koronavirus bolest 2019 (engl. *Coronavirus disease 19*, COVID-19) (1). U prosincu 2019. godine, nekoliko lokalnih zdravstvenih ustanova prijavilo je slučajeve pneumonije nepoznatog uzroka koji su se epidemiološki mogli povezati s ribarnicom u Wuhanu, u Kini. Od tada, bolest se brzo širila unutar Kine, a uskoro i po cijelom svijetu (2). Do 11. veljače 2020. godine potvrđeno je više od 43 000 slučajeva zaraze u 28 država/regija, od kojih je više od 99 % bilo unutar Kine. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 30. siječnja 2020. godine proglasila globalno, javnozdravstveno, hitno stanje od međunarodnog značaja (3), a od 11. ožujka 2020. godine COVID-19 je službeno proglašen pandemijom (1). Do 19.7.2023. potvrđeno je 768 237 788 slučajeva zaraze te 6 951 677 smrtnih slučajeva (4).

1.2. SARS-CoV-2 genom

SARS-CoV-2 genom čini pozitivno nabijena, jednolančana RNK molekula duga 26-32 kilobaza (kb). Organizacija genoma slična je kao i kod drugih koronavirusa. SARS-CoV-2 genom sadrži ukupno 13-15 ORF-ova (engl. *open reading frames*, ORF), od kojih je 12 funkcionalnih, sa 32 – 43 % G – C kombinacijom. Sadrži dvije netranslatirane regije (engl. *untranslated regions*, UTRs.), 5' UTR i 3' UTR, koje imaju ulogu u inter- i intra- molekularnim interakcijama, posredujući *RNK-RNK* interakcije te su zaslužne za povezivanje virusnih proteina s proteinima domaćina. Otprilike se dvije trećine genoma sastoji od dvije preklapajuće ORF regije, nazvane ORF-1a i ORF-1b koje kodiraju za replikaciju poliproteina pp1a i pp1ab. Ovi proteini prolaze kroz autoproteolizu uz pomoć papainske proteinaze (engl. *papain-like protease*, PLpro) i 3C – slične proteinaze (engl. *3C-like protease*, 3CLpro) kako bi formirali

16 nestrukturalnih proteina (engl. *non-structural protein 1-16*, NSP 1-16). NSP -1, -2, -3 , esencijalni za virusnu replikaciju, nastaju djelovanjem PLpro koja razdvaja replikacijski poliprotein na N-terminalu dok NSP4-NSP16 nastaju djelovanjem 3CLpro (slika 1).



Slika 1. Strukturni SARS-CoV- 2 proteini (5)

Nizvodna regija ORF1b sadrži ORF slijedove koji kodiraju četiri glavna strukturalna proteina – membranski (engl. *membrane*, M), protein nukleokapside (engl. *nucleocapsid*, N) glikoprotein izdanaka (engl. *spike*, S) i protein ovojnice (engl. *envelope*, E). Ovi proteini su neophodni za

virusno preživljavanje i replikaciju. Naročito, S, M i E proteini sudjeluju u formiranju virusne ovojnice.

S glikoprotein je tip I membranski glikoprotein i čini virusne izdanke ili peplomere te igra ključnu ulogu kod infekcije i patogeneze SARS-CoV-2 virusom.

M protein je najveći strukturni glikoprotein, a sudjeluje u transportu nutrijenata kroz staničnu membranu te održava formu virusne čestice.

N protein povezuje, stabilizira i štiti virusni genom.

Naposlijetku, E protein je ključan u otpuštanju i sastavljanju za vrijeme virusnog ciklusa. Virusne čestice mogu biti kuglastog ili pleomornog oblika, promjera otprilike 60 – 140 nm (5).

1.3. SARS-CoV-2 mutacije i varijante

Mutacije unutar virusnog genoma imaju značajan utjecaj na dijagnostiku i liječenje infekcije, razvoj cjepiva te njegovu prevenciju. S obzirom na to da je S protein ciljana molekula u dizajniranju cjepiva, mutacije ovog gena u regijama koje dolaze u interakciju sa stanicama domaćina, točnije s ACE-2 (angiotenzin-konvertirajući enzim 2) receptorima, mogu smanjiti učinkovitost cjepiva. Iako SARS-CoV-2 ima malu raznolikost u sekvencijama, genska rekombinacija česta je pojava koja se događa pri replikaciji samog virusa (7).

SARS-CoV-2 varijante se prema SZO klasificiraju u dvije grupe: varijante koje izazivaju zabrinutost ili varijante od značaja (engl. *variants of concern*, VOC) i varijante od interesa (engl. *variants of interest*, VOI). Nekoliko varijanti od značaja su nastale iz originalnog soja koji se javio u Wuhanu na samom početku, u prosincu 2019. godine. Prema Centru za sprječavanje i kontrolu bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention*, CDC), u VOC spadaju one varijante koje povećavaju prenosivost, imaju pojačanu virulenciju i rezistenciju na cjepiva ili stečenu imunost od prijašnje infekcije te imaju sposobnost izbjegavanja detekcije. Svjetska zdravstvena organizacija je prvo odredila četiri varijante od značaja: B.1.1.7, B.1.351, P.1 i B.1.617.2 koje su kasnije prema Grčkom alfabetu nazvane Alfa, Beta, Gama i Delta. Također, osam varijanti od interesa: B.1.427/B.1.429, P.2, B.1.525, P.3, B.1.526, B.1.617, C.37 i B.1.621 su detektirane i označene prema Grčkom alfabetu od Epsilon do Mu (7). U studenom 2021.godine detektirana je varijanta B.1.1.529, nazvana Omicron te je svrstana u varijante od značaja (1).

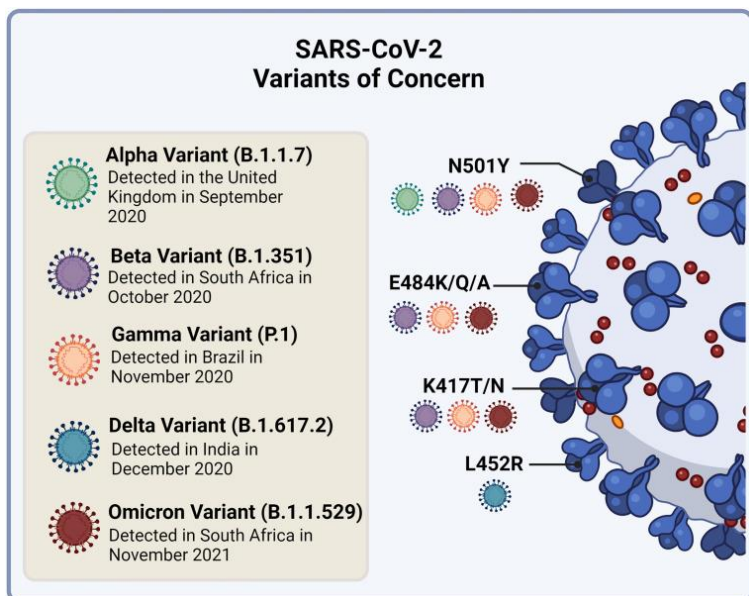
Alfa varijanta (B.1.1.7) je prvi put detektirana krajem rujna 2020. godine i ubrzo je postala prevladavajući soj u Ujedinjenom Kraljevstvu.

Beta (B.1.351) varijanta je otkrivena u listopadu iste godine te je postala predominantan soj i uzrokovala drugi val u Južnoj Africi.

Slično tome, varijanta Gama (P.1.) je detektirana kod četiri državljanina Brazila koji su putovali u Japan u siječnju 2021. godine, a uzrokovala je ponovni porast u broju zaraženih u gradu Manausu, usprkos već visokom postotku oboljelih od COVID-a u državi.

Delta varijanta (B.1.617.2) je prvi put otkrivena u prosincu 2020. godine i zaslužna je za masivan skok broja zaraženih u Indiji.

Kao što je već spomenuto, Omicron (B.1.1529) varijanta je otkrivena u studenom 2021. godine u laboratorijima za genomiku u Južnoj Africi te se ubrzo proširila po cijelom svijetu (slika 2) (1).



Slika 2. SARS-CoV-2 VOC (1)

1.4. Prevalencija SARS-CoV-2 varijanti od značaja (VOC)

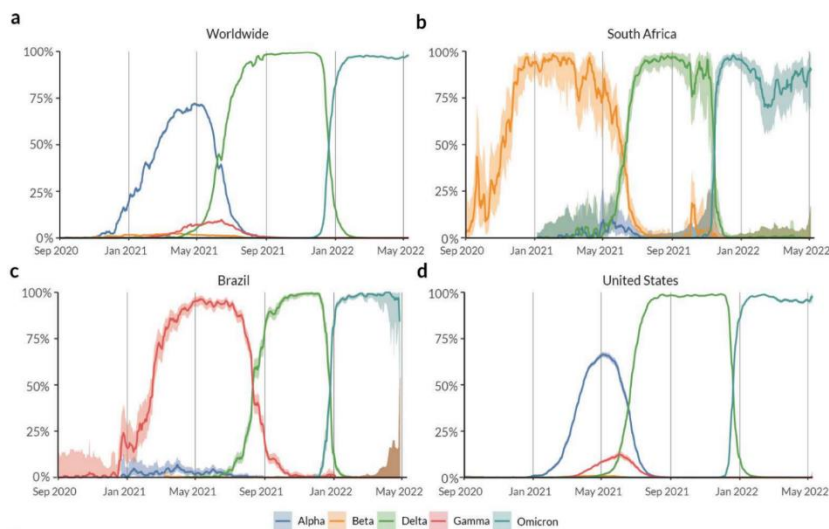
Prvi uzorci Alfa varijante su sekvencirani na jugu Engleske krajem rujna 2020. godine. U Sjedinjenim Američkim Državama se pojavila već krajem studenog iste godine. Alfa varijanta je pokazala da je u SAD-u 40 – 50 % veća sposobnost transmisije virusa u usporedbi s onom u Ujedinjenom Kraljevstvu i Nizozemskoj. U SAD-u, alfa varijanta je uspjela preći do tada prisutne varijante i prevalencija joj je rasla sve do pojave Delta soja u travnju 2021. godine. U

Brazilu, za razliku od SAD-a, alfa varijanta je bila prisutna u puno manjem broju gdje je Gama varijanta dominirala sve do proširenja Delta soja u državi, također u travnju 2021. godine. U Južnoj Africi je najviše bila prisutna Beta varijanta koja se brzo širila sve do pojave Delta soja, dok Alfa varijanta nikad nije postala dominantan soj. Dakle, dok su Beta i Gama varijante uspjele preći Alfa varijantu u Južnoj Africi i Brazilu, Gama soj je dosegao prevalenciju od samo 8 % u SAD-u u svibnju 2020. godine, a Beta je cirkulirala u prevalenciji manjoj od 1 %. Porast pojave jednog soja određen je raznim epidemiološkim faktorima kao što je broj uvođenja novih slučajeva iz inozemstva, kretanja samog stanovništva te unutarnjim biološkim faktorima kao što su sposobnost širenja virusa i izbjegavanje imunskog odgovora. Određene regije u Brazilu su imale skok novozaraženih od 75 % u listopadu 2020. godine što je upućivalo na to da je sposobnost varijante da izbjegne imunski odgovor glavni razlog za toliki porast novih slučajeva Gama varijante u državi. Suprotno tome, u SAD-u taj postotak se kretao između 0,1 % i 16 %. Ono što je bilo zajedničko svim trima državama je da je pojava Delta soja skoro u potpunosti zamijenila do tada cirkulirajuće sojeve, Alfu, Betu i Gamu, u ljeto 2021. godine (8).

Delta varijanta SARS-CoV-2 virusa, prvi put detektirana u Maharashtri, Indijskoj saveznoj državi u prosincu 2020. godine, pokazala je da ima sposobnost širenja 40 – 60 % veću nego Alfa varijanta te da smanjuje učinkovitost cjepiva. Kampanje cijepljenja protiv COVID-19 su započele u prosincu 2020. godine i bez obzira na dobar napredak samih kampanja, Delta soj je na globalnoj razini i dalje buktao. Glavna prednost nad dotadašnjim sojevima mu je bila velika sposobnost širenja koja je pridonijela razvoju genske raznolikosti. Do svibnja 2022. godine poznato je bilo preko 200 podvarijanti Delta soja (8).

Omicron varijanta je prvi put detektirana u studenom 2021. godine u Južnoj Africi i Bocvani. Ovaj soj je bio povezan s rapidnim povratkom velikog broja zaraženih u Afričkoj provinciji Gauteng te je u roku od tri dana od sekvenciranja genoma, prema WHO-u bila uvrštena u varijante od značaja (VOC). Prevalencija soja je brzo rasla te je unutar tri tjedna već bila detektirana u 87 država, a od svibnja 2022. godine, Omicron je u svijetu imao prevalenciju od 95 %. Također se pokazalo da Omicron soj ima pet puta veću sposobnost ponovne zaraze nego kod Delta varijante, ali se količina virusa pokazala nižom. Kako je količina virusa jedan od glavnih faktora koji određuju sposobnost širenja zaraze, ovo je bio razlog da se Omicron varijanta ipak širila manje od Delta varijante, ali je zato sposobnost soja da izbjegne imunski odgovor bila puno veća. Konstantno širenje Omicron varijante je dovelo do toga, da je od svibnja 2022. godine već bilo detektirano preko 100 podvarijanti soja koje su pokazale veliku geografsku raznolikost. Podvarijanta BA.2 je postala dominantan soj u Danskoj i Ujedinjenom

Kraljevstvu. BA.2.12.1 ju je polako počela zamjenjivati u SAD-u, a BA.4 i BA.5 su je potpuno zamijenile u Južnoj Africi. Provođena su *in vitro* istraživanja (testovi neutralizacije) koja su pokazala da te tri podvarijante, BA.2.12.1, BA.4 i BA.5, spretno izbjegavaju antitijela koja su bila prethodno stvorena nakon infekcije s BA.1. varijantom. Ovakva sposobnost izbjegavanja imunskog odgovora kod novih varijanti je glavni razlog zašto je Omicron soj uzrokovao tako veliki porast zaraženih u svijetu (8).



Slika 4. Prevalencija SARS-CoV-2 varijanti (8)

1.5. Ključni dijagnostički testovi

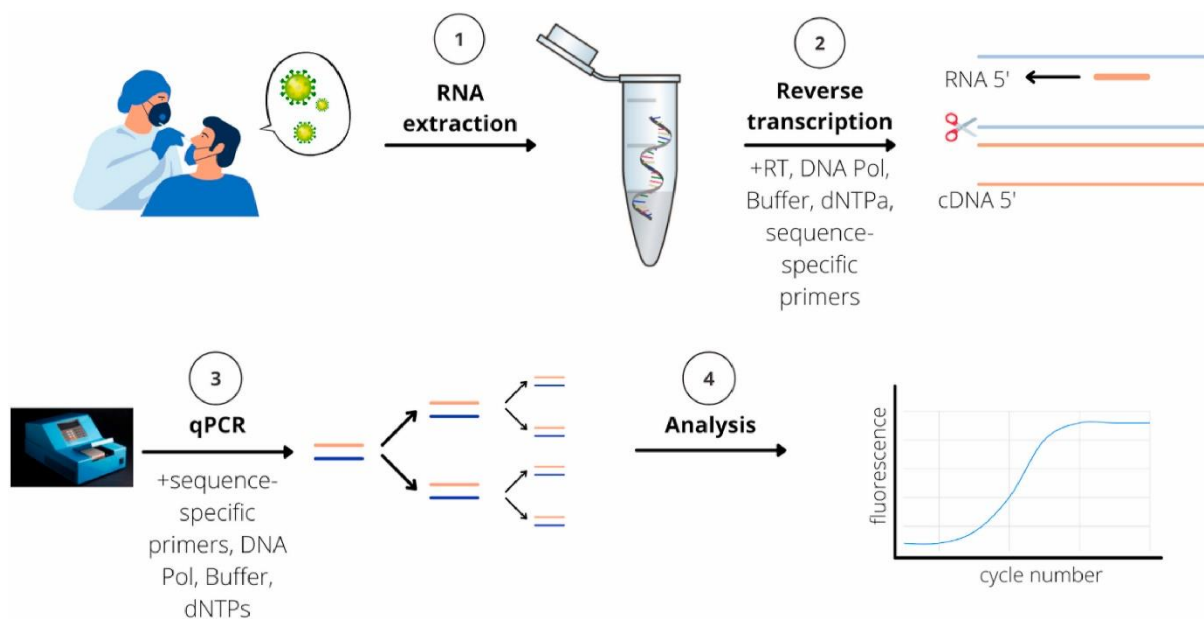
Iznimno puno novih dijagnostičkih testova je razvijeno u svrhu detekcije SARS-CoV-2 virusa, služeći se pri tom najnovijom tehnologijom. Tri vrste testova su relevantne kada se govori o brizi za pacijenta te kontroli pandemije: molekularni testovi, tj. testovi umnažanja nukleinske kiseline koji mogu detektirati virusni RNK (npr. PCR test); antigenski testovi koji detektiraju virusne proteine (npr. nukleokapside ili „spike“ proteine) i serološki testovi koji detektiraju antitijela domaćina kao odgovor na infekciju, cijepljenje ili oboje. Prve dvije vrste testova mogu se upotrebljavati u dijagnostici akutne infekcije, dok se serološkim testovima indirektno dokazuje infekcija 1 do 2 tjedna nakon pojave simptoma i zato se ovim testovima najbolje koristiti u svrhu nadziranja bolesnikova stanja. Iako su osjetljivost i specifičnost bitne značajke testova, postizanje ispravne dijagnoze ovisi o vremenu uzorkovanja u odnosu na stadij infekcije (koliko je dana proteklo od nastupa simptoma), kvaliteti prikupljanja uzoraka, stručnosti kojom se izvodi test te o točnosti interpretacije samih rezultata. Kod molekularnih i antigenskih testova, specifičnost je najveća kada je količina prikupljenog virusa velika, što je najčešće odmah na početku infekcije (9).

1.5.1. RT-PCR test

Detekcija nukleinskih kiselina je trenutno najrasprostranjenija metoda identifikacije infekcije SARS-CoV-2 virusom. Obrisci nazofarinksa se smatraju najpouzdanijim uzorkom kod ovih metoda zato što nude visoku osjetljivost (97 %) u usporedbi s uzorcima kao što je slina (85 %), obrisak nosa (86 %) te obrisak grla (68 %). Također, koncentracija virusa je najveća od 0-4 dana kod simptomatske infekcije, a opada na skoro 54 % od 10 do 14 dana bolesti (10).

Zlatni standard za detekciju SARS-CoV-2 virusa je RT-PCR (engl. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*). PCR metoda je standardna metoda detekcije virusnih nukleinskih kiselina. Izumitelj metode, Kary B. Mullis, je zbog svog velikog otkrića 1993. godine dobio Nobelovu nagradu iz područja kemije. Originalna metoda PCR-a detektira DNK, no ako je potrebno detektirati RNK, treba ga prvo reverznom transkripcijom prepisati u svoj komplementarni DNK (engl. *complementary DNK*, cDNK). PCR metoda koja se danas najčešće upotrebljava je PCR u „realnom vremenu“ (engl. *real time PCR*) koji je kvantitativni PCR, odnosno može se odrediti ciklus u kojem se počela umnažati nukleinska kiselina. Ovom metodom moguće je umnažati i detektirati koncentracijske promjene umnoženih fragmenata u stvarnom vremenu, dok konvencionalni PCR to mjeri na kraju procesa. Za detekciju PCR produkata najčešće su zaslužne fluorescentne boje koje se vežu za DNK molekulu te fluorescentni signali koje proizvode DNK početnice. Foto detektorima se prikupljaju krajnji podaci, tj. rezultati tako da dopuštaju prolaz valovima točno određenih valnih duljina (slika 5).

Lančana reakcija polimerazom temelji se na izmjeni temperatura u tri koraka. Prvi korak je denaturiranje, odnosno razdvajanje dvaju lanaca molekule DNK pri temperaturi od 94 do 96 °C (dolazi do pucanja vodikovih veza između komplementarnih baza). Zatim, u drugom koraku reakcije dolazi do pada temperature na 54 °C koja omogućava dvjema početnicama da se vežu na odgovarajuća mjesta unutar DNK lanaca. U trećem koraku, ponovnim zagrijavanjem reakcije na 72 °C osigurava se maksimalna učinkovitost DNK polimeraze koja služeći se slobodnim nukleotidima stvara novi dvostruki lanac DNK molekule. Ova tri koraka tvore jedan ciklus u PCR reakciji koji se, ovisno vrsti pretrage, ponavlja 20 do 40 puta. U svakom sljedećem ciklusu se eksponencijalno povećava broj kopija DNK. Novo stvorene molekule sudjeluju ravnopravno u daljnjim ciklusima.

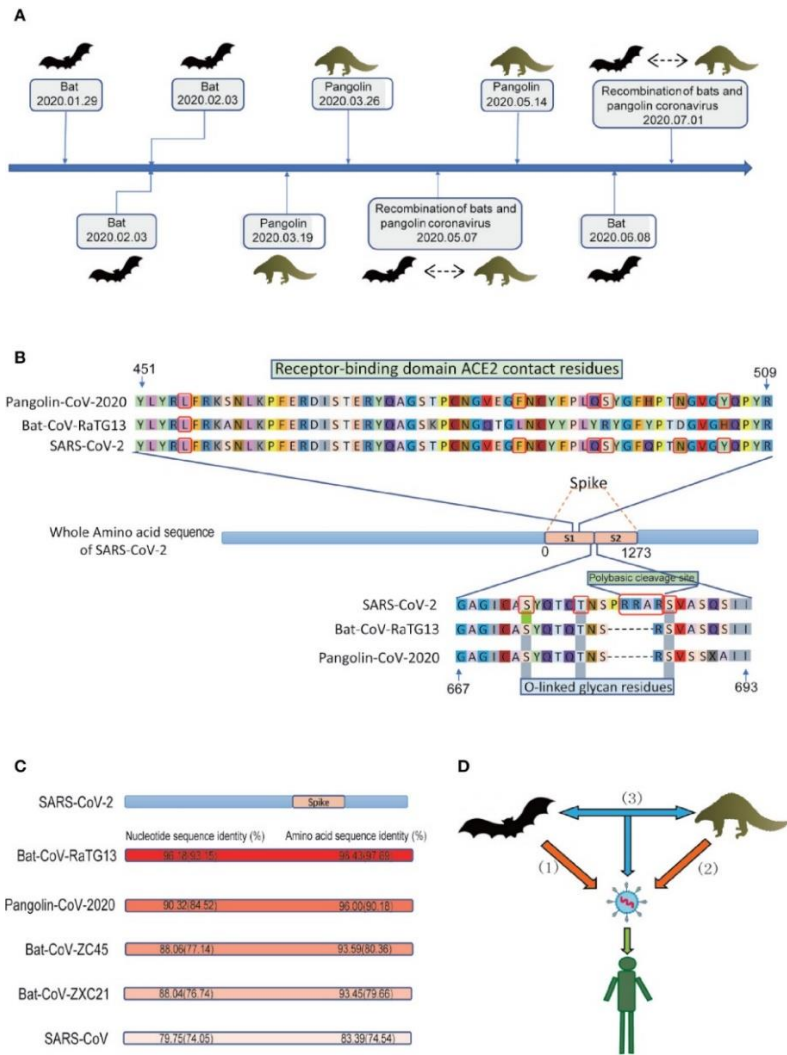


Slika 5. PCR postupak (11)

1.5.2. Sekvenciranje nove generacije

Metoda sekvenciranja nove generacije (engl. *Next-generation sequencing*, NGS,) također je čest odabir kod detekcije virusnih čestica te pomaže u razumijevanju epidemiologije SARS-CoV-2 virusa (10). NGS metoda omogućila je da se otkrije podrijetlo samog virusa te njegov posredni domaćin. SARS-CoV-2 virus je prvi put izoliran kod uličnih prodavača divljih životinja. Zhou et al. su izolirali viruse od sedam pacijenata s teškim oblikom upale pluća i sekvencirali cjelokupni RNK genom jedne vrste šišmiša (lat. *Rhinolophus affinis*). Tom metagenomskom analizom su dokazali da je SARS-CoV-2 virusu najbližiji RaTG13 virus (izoliran kod *Rhinolophus affinis*), s podudarnošću od 96,2 %. Također su u lipnju 2020. godine prijavili vrstu koronavirusa nazvanu RmYN02 (identificiran iz metagenomske analize 227 šišmiša) s 93 %-tnim podudaranjem sa SARS-CoV-2 u cjelokupnom genomu (Slika 6.) (12). Iako je NGS metoda točna i pouzdana, njena praktična primjena je često ograničena zbog visokih cijena i zahtjeva za visokokvalificiranim stručnim kadrom za izvođenje testova. Unatoč tome, sekvenciranje čitavog genoma ostaje i dalje zlatni standard za detekciju novih varijanti diljem svijeta (10). NGS tehnologija je razvijena na prijelazu stoljeća kao naprednija i moćnija metoda sekvenciranja genskog materijala. U Sangerovoj metodi koja se još naziva dideoksi-metoda ili metoda prve generacije, rabi se DNK uzorak, početnica za sekvenciranje, DNK polimeraza, nukleotidi, dideoksinukleotidi i reakcijski pufer. Postave se četiri zasebne reakcije sa radioaktivno obilježenim nukleotidima i dideoksinukleotidima. DNK polimeraza u svakom

koraku produživanja lanca DNK-a dodaje dNTP-ove ili odgovarajući ddNTP. Vežanje dNTP (A, C, G ili T) za 3'- kraj DNK lanca omogućuje daljnje produljenje, no vežanjem ddNTP-ova (ddA, ddC, ddG ili ddT) reakcija se zaustavlja. Sangerovim sekvenciranjem kao krajnji rezultat nastaju lanci odnosno fragmenti različitih duljina koji na 3'- kraju završavaju dideoksinukleotidima. Rezultati se prikazuju elektroforezom, metoda kojom se dobiveni fragmenti razdvajaju na temelju njihovih veličina (12). Danas postoje razne varijacije sekvenciranja genskog materijala kao npr. pirosekvenciranje, sekvenciranje sintezom, sekvenciranje ligacijom, ionsko poluvodičko sekvenciranje i dr. Te metode se razlikuju u svojim tehničkim mehanizmima te imaju različite prednosti i nedostatke, ali se sve temelje na osnovnim definirajućim odlikama u kojem se uzorci razbijaju na fragmente te se svaki umnaža i sekvencira pojedinačno, generirajući pritom milijune malih sekvenci koje kad se spoje tvore jedan genom (13).



Slika 6. Podrijetlo SARS-CoV-2 virusa (12)

Sangerovo sekvenciranje je originalna metoda sekvenciranja zaslužna za dovršavanje Projekta ljudskog genoma ranih 2000-tih godina (13).

2. CILJ RADA

Ciljevi rada bili su:

- Prikazati stopu SARS-CoV-2 pozitivnih slučajeva u Splitsko-dalmatinskoj županiji u trogodišnjem razdoblju pandemije
- Prikazati pojavnost različitih varijanti u Splitsko-dalmatinskoj županiji u razdoblju od tri pandemijske godine

3. IZVORI PODATAKA I METODE

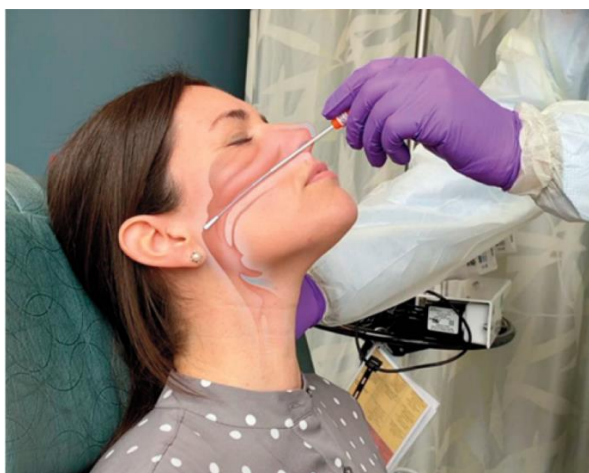
Izvori podataka su rezultati trogodišnjeg (1.4.2020.–31.3.2023.) rutinskog rada Laboratorija za molekularnu dijagnostiku pri Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije te rezultati sekvenciranja dijela uzoraka koje se rade u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, Zagreb (HZJZ) i u Europskom centru za sprječavanje i kontrolu bolesti (engl. *European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC*).

3.1. Uzorak izbora za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa i njegovo prikupljanje

Uzorci koji se prikupljaju za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa su uzorci gornjih dišnih puteva: obrisak nazofarinksa i obrisak ždrijela. Prije samog uzorkovanja, zdravstveni djelatnici su dužni obući zaštitnu odjeću i obuću, zaštitne rukavice, zaštitni vizir za lice te pripremiti materijal za uzorkovanje. Svi zdravstveni radnici moraju biti educirani o pravilnom prikupljanju, čuvanju i transportu infektivnog materijala, te u svakom trenutku postupati u skladu sa standardnim operativnim postupcima (SOP-ovima).

3.1.1. Obrisak nazofarinksa na SARS-CoV-2

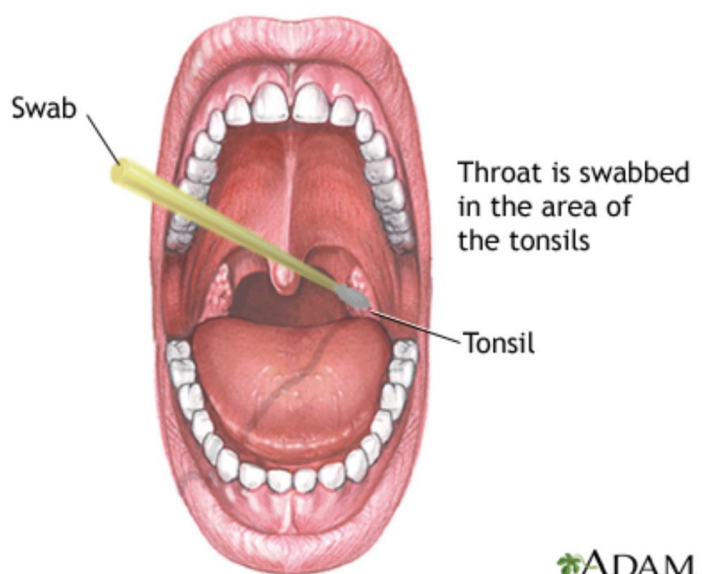
Kod uzorkovanja rabi se tanki pamučni štapić koji se uvodi prvo u jednu nosnicu horizontalno, uz donji nosni hodnik sve do stražnje stijenke nazofarinksa, zarotira se nekoliko puta te se izvlači nakon pet sekundi (slika 7). Isti postupak se ponavlja za drugu nosnicu. Nakon uzorkovanja bris se uranja u epruvetu s Hanks medijem na koju se napiše ime, prezime te datum i godina rođenja pacijenta (14).



Slika 7. Pravilno uzimanje uzorka obriska nazofarinksa (15)

3.1.2. Obrisak ždrijela na SARS-CoV-2

Obrisak ždrijela se uzima pamučnim štapićem na način da se pobriše stražnja stijenka orofarinksa, oba nepčana luka te područje tonzila, pazeći pritom da se ne dodiruje jezik i bukalna sluznica (slika 8). Štapić se uranja u istu epruvetu s Hanks medijem, zajedno s brisom iz nazofarinksa (16).



Slika 8. Pravilno uzimanje uzorka obriska ždrijela (17)

3.2. Izolacija RNK-a

S obzirom na to da se DNK/RNK molekula unutar stanice ne nalazi u čistom obliku, nego je udružena s brojnim molekulama kao što su proteini, masti, enzimi i druge nečistoće potrebno ju je najprije izolirati. Takav, ekstrahirani DNK/RNK je visoke čistoće i stabilnosti i može se rabiti u daljnjim postupcima analize (PCR, NGS). Postoje razne metode izolacije nukleinskih kiselina kao npr. izolacija organskim otapalima, Chelex metoda, Qiagen metoda, izolacija uz pomoć magnetnih čestica i ostalo. Može se raditi ručna izolacija ili automatizirana izolacija.

3.2.1. Izolacija virusnog RNK-a za dijagnostiku Covid-19

U Laboratoriju za molekularnu dijagnostiku NZJZ-a, rabi se TIANLONG® Virusni DNK i RNK ekstrakcijski kit T050H i GeneRotex 96 automatski izolator.



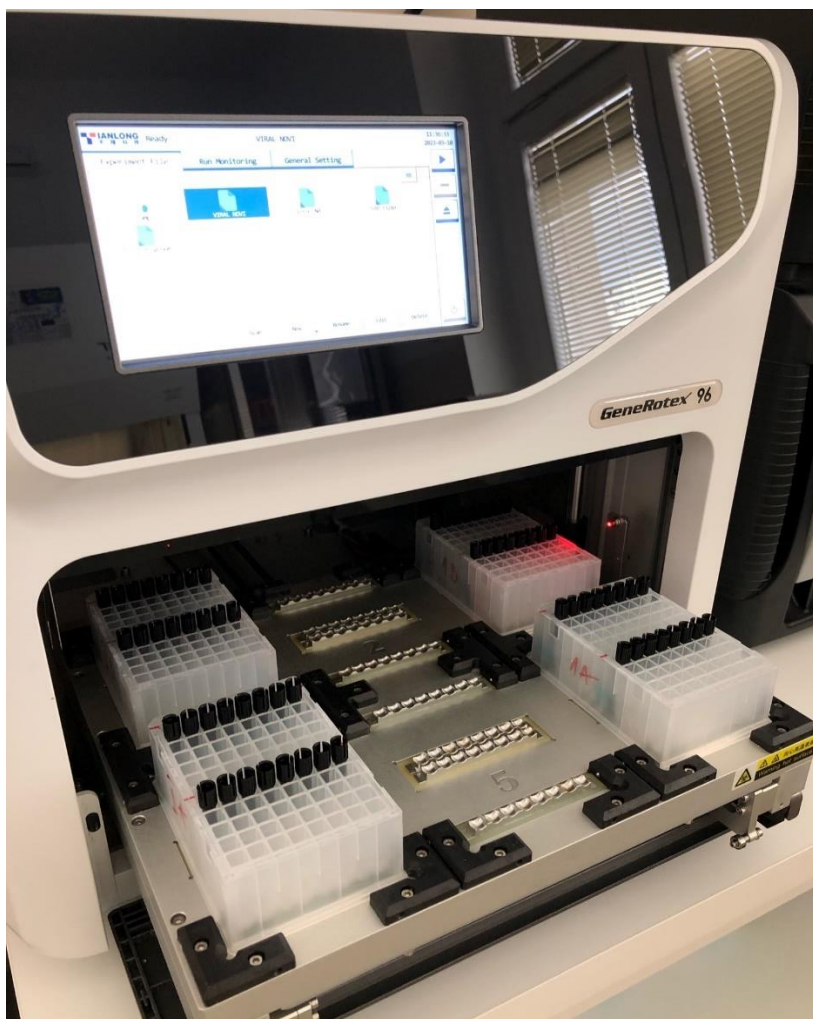
Slika 9. TIANLONG® Kit za izolaciju (izvor: NZJZ Split)



Slika 10. Automatski izolator GeneRotex 96 (izvor: NZJZ)

Kit za ekstrakciju virusnog RNK je namijenjen brznoj izolaciji virusnog RNK iz uzoraka briseva. Ektrahirani RNK je visoke čistoće i stabilnosti i može se upotrebljavati u raznim rutinskim operacijama kao što je digestija enzimima, PCR, NGS, Hibridizacija, Southern blott i drugi postupci. Ovaj ekstrakcijski kit ima sposobnost izolacije više od 100 kopija virusnog RNK po mL. Kit se čuva na sobnoj temperaturi u hladnoj, suhoj prostoriji. Treba se držati u dobro ventiliranom prostoru, izvan dosega topline, iskri i otvorenog plamena. Kit se mora upotrebljavati u kombinaciji s TIANLONG® automatiziranim izolatorom nukleinskih kiselina (GeneRotex96). Uređaj se dezinficira UV svjetlom prije svake uporabe. Automatski ekstraktor omogućuje izolaciju nukleinskih kiselina korištenjem magnetnih kuglica. Uz pomoć magnetnih šipki premješta magnetne kuglice, na koje se prethodno vezala nukleinska kiselina, u različite jažice.

Ove ekstraktore karakterizira visoka automatizacija, brzina izolacije, ujednačeni rezultati i jednostavnost rukovanja. GeneRotex96 ima magnetnu glavu koja sadrži niz od 96 magnetnih šipki i na taj način omogućuje 96 istovremenih izolacija. Postupak izolacije traje 16 minuta (18).



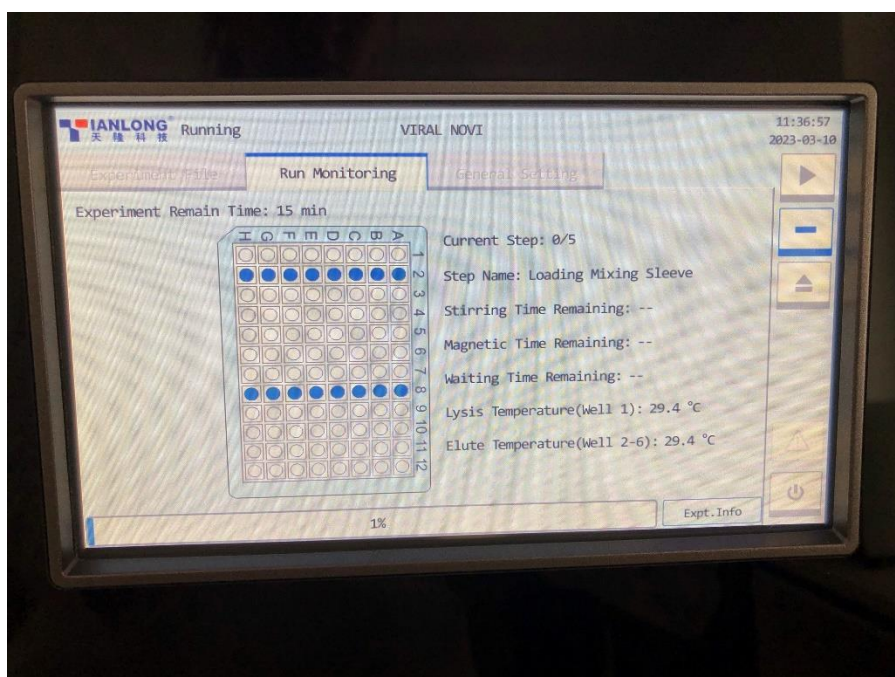
Slika 11. Pločice za izolaciju s uzorcima unutar automatskog izolatora GeneRotex 96 (izvor: NZJZ)

3.2.2. Princip rada automatskog izolatora

Unutar svakog ekstrakcijskog kita nalaze se četiri pločice za izolaciju. Svaka pločica se sastoji od 12 stupaca po osam jažica. U svakom stupcu se odvija različita radnja za vrijeme samog procesa. Prije početka rada, pločica se lagano preokrene nekoliko puta kako bi se magnetne kuglice resuspendirale te se skine zaštitna plastična folija. Nakon toga skida se aluminijska folija pazeći pritom da tekućine koje se nalaze u jažicama ne prskaju. Polovica pločice (stupci od 1-6) služi za obradu osam uzoraka pacijenata (uzorci se redom unose u osam jažica prvog stupca). Druga polovica pločice (stupci od 7-12) služi za obradu drugih osam uzoraka pacijenata. Uzorci pacijenata se prenose u praznih osam jažica 7. stupca. U stupcima 2-5 i 8-11 nalaze se različiti reagensi potrebni za izolaciju. U stupcima 6 i 12 nalazi se elucijski pufer u koji aparat prenosi čistu izolirani RNK (18).

3.2.2.1. Postupak

Za svakog pacijenta u odgovarajući jažicu, stupac 1 i/ili 7 dodaje se po 200 μ L uzorka tj. Hanks medija u kojem se nalaze bris ždrijela i nazofarinksa pacijenta, u svaku jažicu stupca po jedan pacijent. U stupac 2 i 8 stavljaju se plastični nastavci te se cijela pločica pravilno postavlja na označene pozicije unutar GeneRotex96 automatskog ekstraktora. Na ekranu aparata odabire se odgovarajući program za izolaciju virusnog RNK.



Slika 12. Koraci automatske izolacije na uređaju GeneRotex 96 (izvor: NZJZ)

Magnetne šipke ulaze u stupce broj dva i osam koje sadrže plastične nastavke, po osam nastavaka u svakom stupcu za osam različitih uzoraka, skupljaju magnetne kuglice i premještaju ih u stupce broj 1 i 7 gdje se nalazi uzorak. Brzim i opetovanim miješanjem reagensa i magnetnih kuglica osigurava se njihovo potpuno spajanje. Dolazi do lize stanice i adsorpcije nukleinske kiseline. Slijedi ispiranje koje se odvija u stupcima broj 3 i 4, odnosno 9 i 10 na drugoj polovici pločice. Zadnji korak je eluiranje nukleinske kiseline visoke čistoće i stabilnosti. Isprana nukleinska kiselina za svakog pacijenta prenosi se u odgovarajuće jažice, u stupce broj 6 i 12 koji sadrže elucijski pufer. Na ovaj način se dobije čisti eluat nukleinske kiseline za 8 pacijenata u šestom stupcu i za 8 pacijenata u dvanaestom stupcu (tablica 1) (18).

Tablica 1. Postupak automatske izolacije GeneRotex 96 izolatora nukleinskih kiselina (izvor: uputa za rad TIANLONG ® virusni DNK i RNK ekstrakcijski kit)

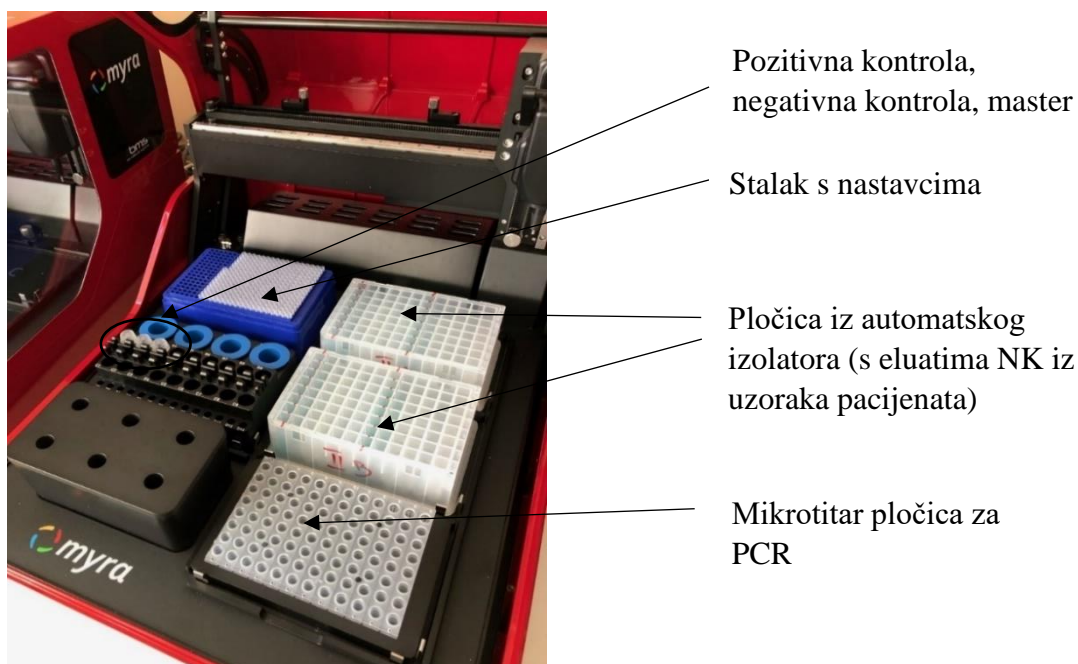
| KORAK | NAZIV | STUPAC | MIJEŠANJE (min:s) | MAGNETI (min:s) | PAUZA (min:s) | BRZINA (rpm) | VOLUMEN (µL) | KONTROLA TEMPERATURE (°C) |
|-------|------------------------------|--------|----------------------|--------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|
| 1 | Uklanjanje magnetnih kuglica | 2 | 00:10 | 00:10 | 00:00 | 2500 | 300 | 0 |
| 2 | Liza stanica | 1 | 03:00 | 00:45 | 00:00 | 2500 | 750 | 120 |
| 3 | Ispiranje 1 | 3 | 01:00 | 00:20 | 00:00 | 3000 | 700 | 120 |
| 4 | Ispiranje 2 | 4 | 01:00 | 00:20 | 01:00 | 3000 | 800 | 120 |
| 5 | Elucija | 6 | 02:00 | 00:30 | 00:00 | 2500 | 80 | 120 |

3.3. Myra BMS

Myra je kompaktan i lagan sustav za rukovanje visoke preciznosti. Služi za automatsko pipetiranje uzoraka i reagensa na mikrotitar pločicu koja se potom postavlja u PCR uređaj. Prvi je sustav rukovanja tekućinom koji ima „sposobnost vida“ tj. ima integriranu kameru koja omogućava automatiziranu i jednostavniju kalibraciju te ima sposobnost traženja pogrešaka kao npr. nedostatak pločice ili epruvete. Također ima senzor za određivanje razine tekućine na temelju tlaka. Ovaj robotski sustav je jednostavno rješenje za standardne laboratorijske metode kao što su PCR, NGS itd (19).

Na točno određena mjesta unutar Myra BMS aparata postavi se:

- Čista PCR mikrotitar pločica s 96 jažica
- Pozitivna i negativna kontrola
- Master Mix (reakcijska smjesa za PCR: početnice, Taq-polimeraza i slobodne baze)
- Pločica s izolatima (iz automatskog izolatora)
- Stalak s nastavcima



Slika 13. Myra BMS s postavljenim reagensima, nastavcima, pločicama za izolaciju i PCR pločicom (izvor: NZJZ)

Unutar programa zadaju se upute odakle će i na koje mjesto robotska ruka prebacivati određene reagense i uzorke. Master mix se pipetira u svaku jažicu PCR pločice u kojoj bi se trebala odviti reakcija (po 15 μ L). Pozitivna i negativna kontrola idu na prvo i drugo mjesto unutar PCR

pločice (po 5 μ L). Ostala 94 mjesta mikrotitar pločice namijenjena su za uzorke tj. izolate. Čiste nukleinske kiseline robot pipetira po 20 μ L tekućine (5 μ L izolata + 15 μ L master mixa) za svakog pacijenta pojedinačno u odgovarajuću jažicu, redom na mjesta od 3-96 kako je prethodno programiran.

Po završetku pipetiranja preko PCR pločice se ručno zalijepi prozirna folija kako pri visokim temperaturama za vrijeme izvođenja PCR reakcije ne bi došlo do isparavanja tekućine i na taj način utjecalo na krajnje rezultate.

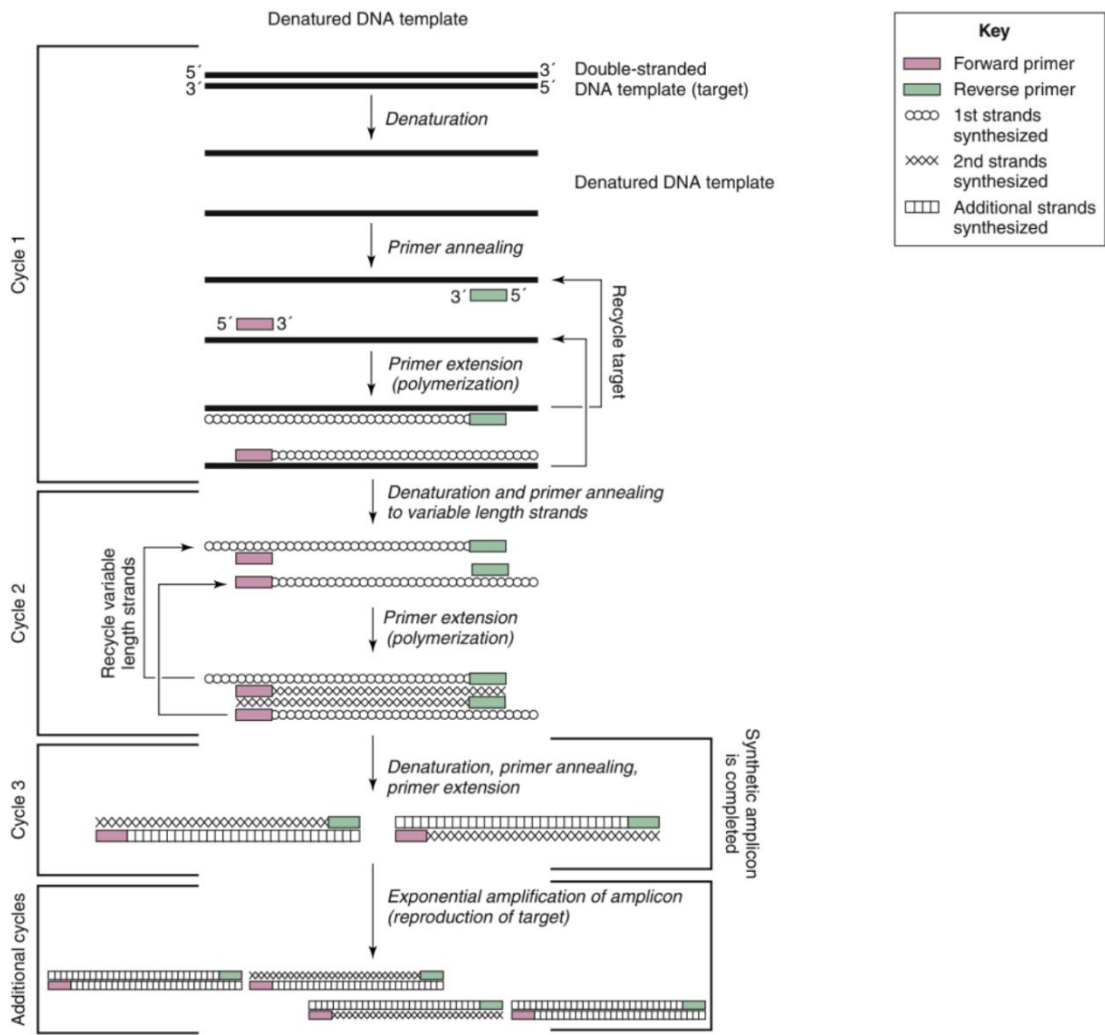
3.4. PCR Reakcija

Lančana reakcija polimerazom (PCR, engl. *Polymerase Chain Reaction*) je tehnika umnažanja DNK molekule. Metoda PCR-a se sastoji do triju glavnih koraka koji čine jedan ciklus:

- Denaturacija (engl. *denaturation*)
- Hibridizacija (engl. *annealing*)
- Produljenje lanaca (engl. *elongation*)

Da bi se uspješno odvijala sva tri koraka ove molekularne metode, potrebno je nekoliko glavnih sastavnica:

- Izolirana DNK molekula
- Set DNK početnica – uzvodna i nizvodna
- Slobodni nukleotidi (adenin, gvanin, citozin i timin)
- DNK polimeraza
- Puffer



Slika 14. Ciklusi PCR reakcije (20)

3.4.1. 1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit

1copy™ COVID-19 qPCR 4plex je multipleks qPCR kit koji omogućuje istodobnu detekciju tri ciljna gena i to unutar 50 minuta. Ovim reagensom detektira se RdRp gen, E gen i N gen u svrhu dijagnosticiranja virusa SARS-CoV-2 iz raznih uzoraka (obrisaka nazofarinksa, nosa, grla te aspirata/lavata nazofarinksa ili aspirata nosa). S obzirom na to da SARS-CoV-2 genom čini jednolančana RNK molekula treba ju prvo reverznom transkripcijom prepisati u njenu komplementarnu DNK tj. cDNK molekulu. Namijenjen je uporabi samo kvalificiranom osoblju kliničkih laboratorija koje je obučeno i upoznato s tehnikama RT-PCR te *in vitro* dijagnostičkim postupcima (21).

Sadržaj kita:

1. Master mix
2. Primer mix
3. Pozitivna kontrola
4. DEPC DW (sterilna voda bez nukleaza) – služi kao negativna kontrola



Slika 15. 1copy™ COVID-19 qPCR 4plex Kit (21)

Priprema za PCR:

Tablica 2. Komponente PCR reagensa

| Komponente smjese | 1 reakcija |
|-------------------|------------|
| Master mix | 10 μ l |
| Primer mix | 1 μ l |
| DEPC DW | 4 μ l |

Ukupni volumen pripremljenog reagensa (reakcijska smjesa, engl. *master mix*) iznosi 15 μ l. Stavljaju se u one jažice PCR pločice u kojima će se odvijati reakcija. Potom se u tako pripremljene jažice dodaje redom: po 5 μ l pozitivne kontrole, 5 μ l čiste vode te redom po 5 μ l izoliranog RNK-a pacijenata. Zadnji korak je postavljanje pločice u PCR uređaj (21).

3.4.2. Real Time PCR Detection System - Gentier96E

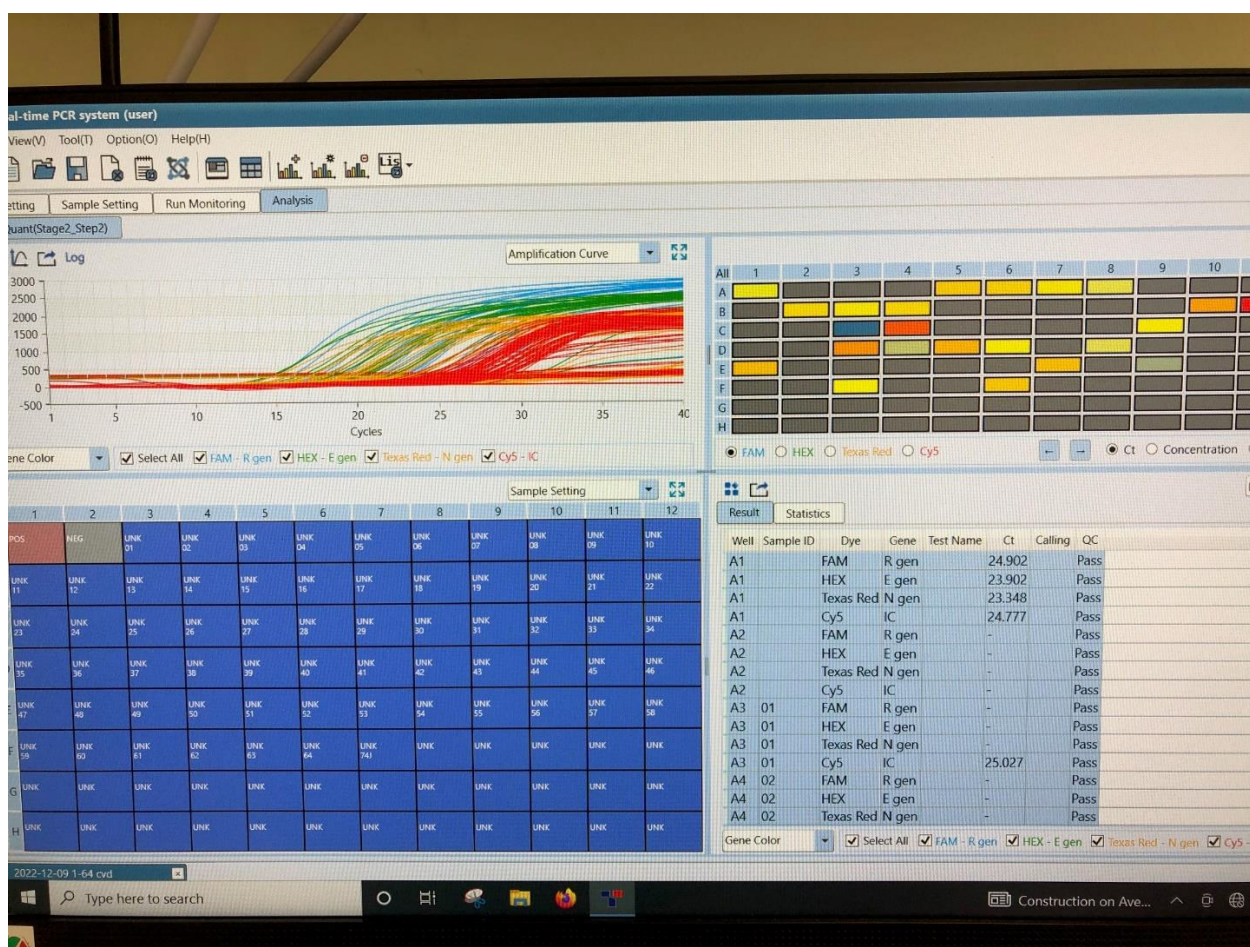
Gentier 96E je RT-PCR detekcijski sustav koji ima razne pogodnosti kao što je jednostavnost rukovanja uređajem, efikasni sistem reguliranja temperature, snažni, ali jednostavni softver za analizu i dr. Ovim uređajem istovremeno se amplificiraju i detektiraju nukleinske kiseline 3 ciljna gena te interne kontrole. Detekcijom interne kontrole potvrđuje se kvaliteta i uspješnost svakog prijašnjeg koraka (prikupljanje uzoraka, izolacija RNK-a te amplifikacija).

Na pripremljenu PCR pločicu (sadrži 15 μ l reagensa + 5 μ l izoliranog RNK-a) se nalijepi prozirna folija te se pločica vodoravno stavlja u PCR uređaj u kojem će se odvijati reakcija (slika 17). Nakon 60 minuta završava PCR reakcija i rezultati su spremni za interpretaciju (22).



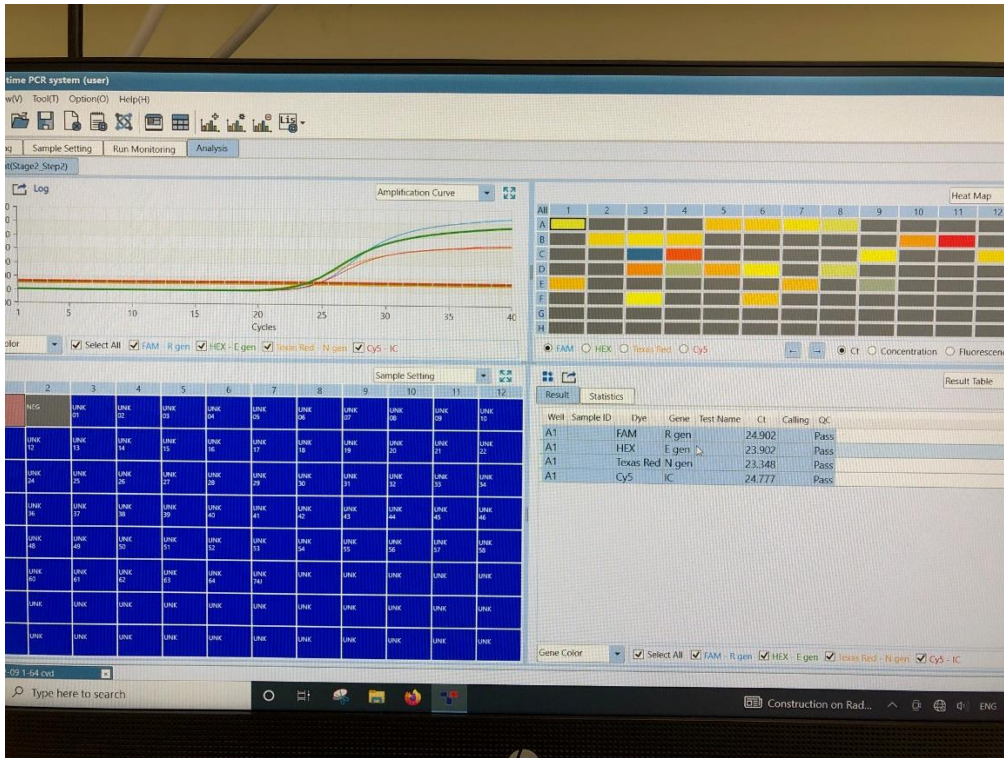
Slika 16. PCR pločica unutar PCR uređaja Gentier 96E (izvor: NZJZ)

3.4.3. Interpretacija nalaza



Slika 17. Izgled konačnih rezultata na PCR uređaju Gentier 96E (izvor: NZJZ)

Rezultati dobiveni analizom na Gentier 96E uređaju interpretiraju se kao pozitivni, negativni ili neodredivi. Da bi uzorak bio validan, mora sadržavati internu kontrolu kao potvrdu uspješnog uzorkovanja, izolacije i PCR reakcije. Pozitivan rezultat na SARS-CoV-2 virus rezultati mora imati pravilne krivulje tri gena – E, R i N gen (slika 17).



Slika 18. Interpretacija pozitivnog rezultata na SARS-CoV-2 na uređaju Gentier 96E (izvor: NZJZ)

3.5. Sekvenciranje

Od 1.6.2021. u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije, nasumično se odabiralo (osim u slučajevima ciljanog odabira zbog kliničke slike, putovanja u inozemstvo itd.), alikvotiralo i pakiralo pozitivne eluate te ih se slalo u Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ), Zagreb na sekvenciranje. Odjel za izravnu virološku dijagnostiku zaprimao je SARS-CoV-2 pozitivne eluate te su ih sekvencirali po preporukama ECDC-a. Svi rezultati SARS-CoV-2 sekvenciranja prijavljuju se u ECDC i unose u internacionalnu bazu podataka (*Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data- GISAID*).

Sekvenciranjem SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka uspješno se određuju varijante i podvarijante samog virusa. Svjetska zdravstvena organizacija prati one varijante čije promjene u genomu utječu na širenje virusa i na kliničku sliku kod pacijenata kao i one varijante koje uspješno izbjegavaju imunosti odgovor, nose povećan rizik od oboljenja i koje mogu negativno utjecati na epidemiološku situaciju (23).



Slika 19. Eppendorf tubica u koju se spremaju eluati NK pozitivnih uzoraka za slanja na sekvenciranje (izvor: NZJZ)

Iz nasumično odabranih eluata odvaja se po 30 μ l izoliranog RNK u sterilne eppendorf tubice, označene odgovarajućim laboratorijskim brojem (slika 19). Potrebni podaci o pacijentu se upisuju u za to predviđenu tablicu. Sukladno uputama HZJZ-a, svi pozitivni uzorci čija je CT vrijednost bila između 18 i 30 slali su se nerazrijeđeni. Oni uzorci čija je CT vrijednost bila niža od 18 morali su se razrjeđivati u PCR čistoj vodi.

3.5.1. Priprema uzoraka za sekvenciranje

POSTUPAK:

1. Izolirani RNK se prevodi u komplementarni DNK (cDNK) – PCR metodom
2. Priprema DNK zbirki uporabom Illumina DNK prep kit-a (slika 20):
 - Konstruirana i pročišćava DNK zbirke uz pomoć zrnaca
 - cijepanje DNK na fragmente i njihovo označavanje
3. Amplifikacija DNK fragmenata – PCR metodom
4. Pročišćavanje umnoženih DNK fragmenata
5. Kvantifikacija i normalizacija DNK zbirke na koncentraciju od 4 nM
6. Denaturacija zbirke
7. Dilucija denaturiranih DNK zbirke do željene koncentracije
8. Sekvenciranje na Illumina® NextSeq™ system (slika 21) (24).



Slika 20. Illumina DNK prep kit (25)



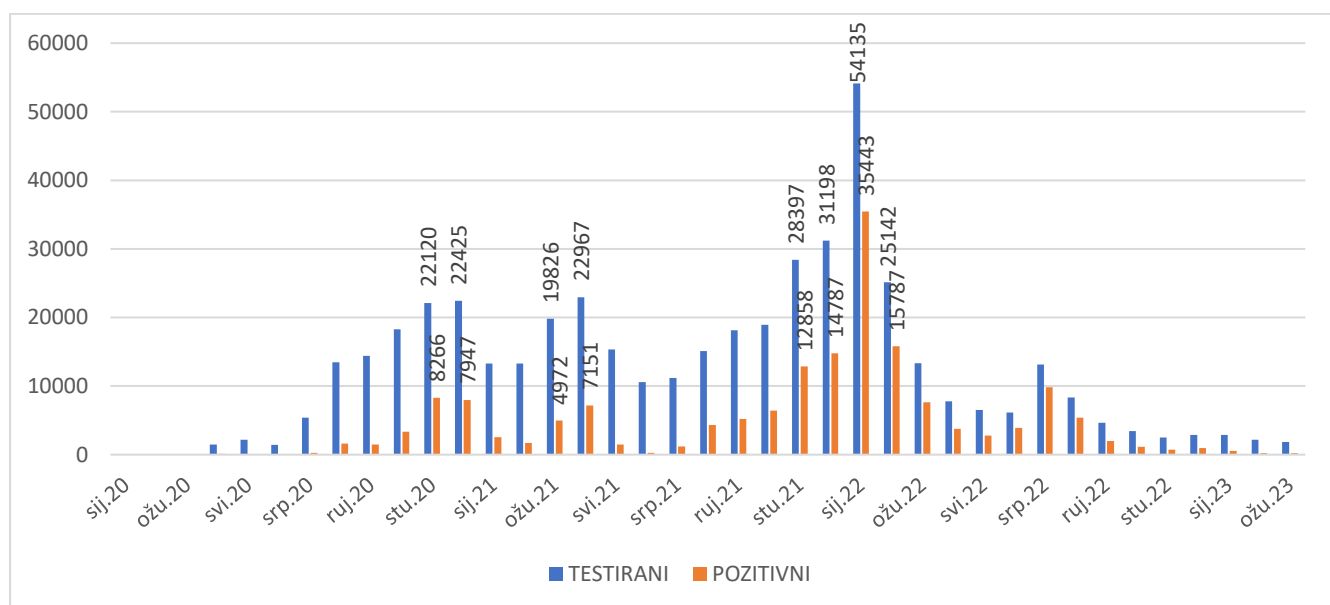
Slika 21. Illumina NextSeq 550 System (26)

4. REZULTATI

U razdoblju od 1.4.2020 do 31.3.2023. godine u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo Splitsko-dalmatinske županije testirano je 474 189 pacijenata na SARS-CoV-2 virus metodom PCR-a. Od ukupnog broja testiranih, 176 245 (37,2 %) je bilo pozitivnih na SARS-CoV-2, dok je 297 944 bilo negativno (62,8 %).

U razdoblju prve dvije pandemijske godine (od 1.4.2020. do 31.3.2022.) postotak pozitivnih od ukupnog broja testiranih iznosio je 35,1 % (144 830 pozitivnih/411 993 testiranih), dok je u trećoj pandemijskoj godini (period od 1.4.2022. – 31.3.2023.) postotak pozitivnih rezultata iznosio 51 % (31 415 pozitivnih/62 196 testiranih) (tablica 3).

Najviše testiranih osoba bilo je u siječnju 2022. godine, ukupno 54 135 od kojih je 35 443 (65,5 %) imalo pozitivan PCR rezultat na SARS-CoV-2 (slika 22).

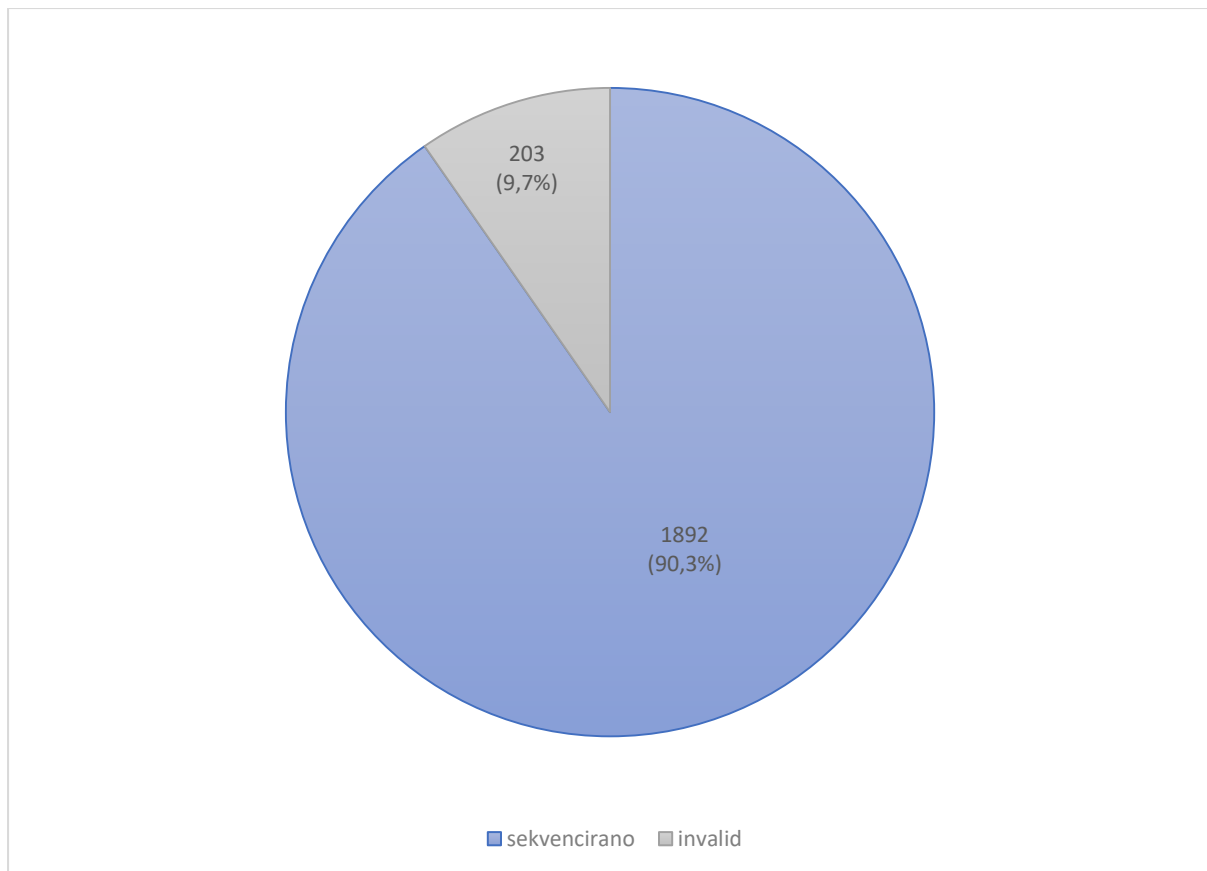


Slika 22. Rezultati testiranja na virus SARS-CoV-2 u NZJZ SDŽ u razdoblju od tri godine - raspodjela po mjesecima (1.4.2020 – 31.3.2023.) (N=474 189)

Tablica 3. Raspodjela pozitivnih i negativnih rezultata po mjesecima u tri pandemijske godine (1.4.2020. – 31.3.2023.) (N=474 189)

| Vremensko razdoblje | Pozitivni | Negativni | Ukupno | Postotak pozitivnih |
|----------------------------|------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| 4/20 | 141 | 1 353 | 1 494 | 9,4 % |
| 5/20 | 90 | 2 083 | 2 173 | 4,1 % |
| 6/20 | 31 | 1 380 | 1 411 | 2,2 % |
| 7/20 | 253 | 5 153 | 5 406 | 4,7 % |
| 8/20 | 1 590 | 11 867 | 13 457 | 11,8 % |
| 9/20 | 1 451 | 12 953 | 14 404 | 10,1 % |
| 10/20 | 3 351 | 14 942 | 18 293 | 18,3 % |
| 11/20 | 8 266 | 13 854 | 22 120 | 37,4 % |
| 12/20 | 7 947 | 14 478 | 22 425 | 35,4 % |
| 1/21. | 2 561 | 10 730 | 13 291 | 19,3 % |
| 2/21. | 1 702 | 11 559 | 13 261 | 12,8 % |
| 3/21. | 4 972 | 14 854 | 19 826 | 25,1 % |
| 4/21. | 7 151 | 15 816 | 22 967 | 31,1 % |
| 5/21. | 1 452 | 13 870 | 15 322 | 9,5 % |
| 6/21. | 241 | 10 332 | 10 573 | 2,3 % |
| 7/21. | 1 209 | 9 990 | 11 199 | 10,8 % |
| 8/21. | 4 327 | 10 770 | 15 097 | 28,7 % |
| 9/21. | 5 184 | 12 940 | 18 124 | 28,6 % |
| 10/21. | 6 418 | 12 522 | 18 940 | 33,9 % |
| 11/21. | 12 858 | 15 539 | 28 397 | 45,3 % |
| 12/21. | 14 787 | 16 411 | 31 198 | 47,4 % |
| 1/22. | 35 443 | 18 692 | 54 135 | 65,5 % |
| 2/22. | 15 787 | 9 355 | 25 142 | 62,8 % |
| 3/22. | 7 618 | 5 720 | 13 338 | 57,1 % |
| 4/22. | 3 771 | 3 995 | 7 766 | 48,6 % |
| 5/22. | 2 765 | 3 754 | 6 519 | 42,4 % |
| 6/22. | 3 886 | 2 236 | 6 122 | 63,5 % |
| 7/22. | 9 818 | 3 340 | 13 158 | 74,6 % |
| 8/22. | 5 413 | 2 922 | 8 335 | 64,9 % |
| 9/22. | 1 982 | 2 676 | 4 658 | 42,6 % |
| 10/22. | 1 143 | 2 282 | 3 425 | 33,4 % |
| 11/22. | 711 | 1 780 | 2 491 | 28,5 % |
| 12/22. | 982 | 1 871 | 2 853 | 34,4 % |
| 1/23. | 549 | 2 333 | 2 882 | 19,0 % |
| 2/23. | 206 | 1 954 | 2 160 | 9,5 % |
| 3/23. | 189 | 1 638 | 1 827 | 10,3 % |
| Ukupno | 176 245 | 297 944 | 474 189 | 37,2 % |

U vremenskom razdoblju od 1.6.2021. do 10.2.2023., u HZJZ Zagreb, poslano je 2095 pozitivnih uzoraka. Od ukupnog broja poslanih uzoraka, uspješno sekvenciranih je bilo 1892 (slika 23).



Slika 23. Rezultati sekvenciranja pozitivnih uzoraka na SARS-CoV-2 virus iz SDŽ u razdoblju od 1.6.2021. do 10.2.2023. godine (N=474 189)

U razdoblju od 1.6.2021. do 10.2.2023. godine, 2095 SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka je poslano na sekvenciranje od kojih za njih 203 (9,7 %) nije bilo moguće napraviti sekvenciranje.

Rezultati sekvenciranja virusa SARS-CoV-2 u NZJZ SDŽ (tablica 4) su pokazali da je u navedenom razdoblju promatranja najzastupljenija bila varijanta Omicron (55,5 %) dok je najmanje slučajeva bilo Gamma varijante (0,2 %).

Tablica 4. Rezultati sekvenciranja u razdoblju od 1.6.2021. – 10.2.2023. (N=474 189)

| VARIJANTA | BROJ UZORAKA | POSTOTAK |
|------------------|---------------------|-----------------|
| GAMA | 4 | 0,2 % |
| ALFA | 34 | 1,8 % |
| DELTA | 804 | 42,5 % |
| OMICRON | 1 050 | 55,5 % |
| UKUPNO | 1 892 | 100 % |

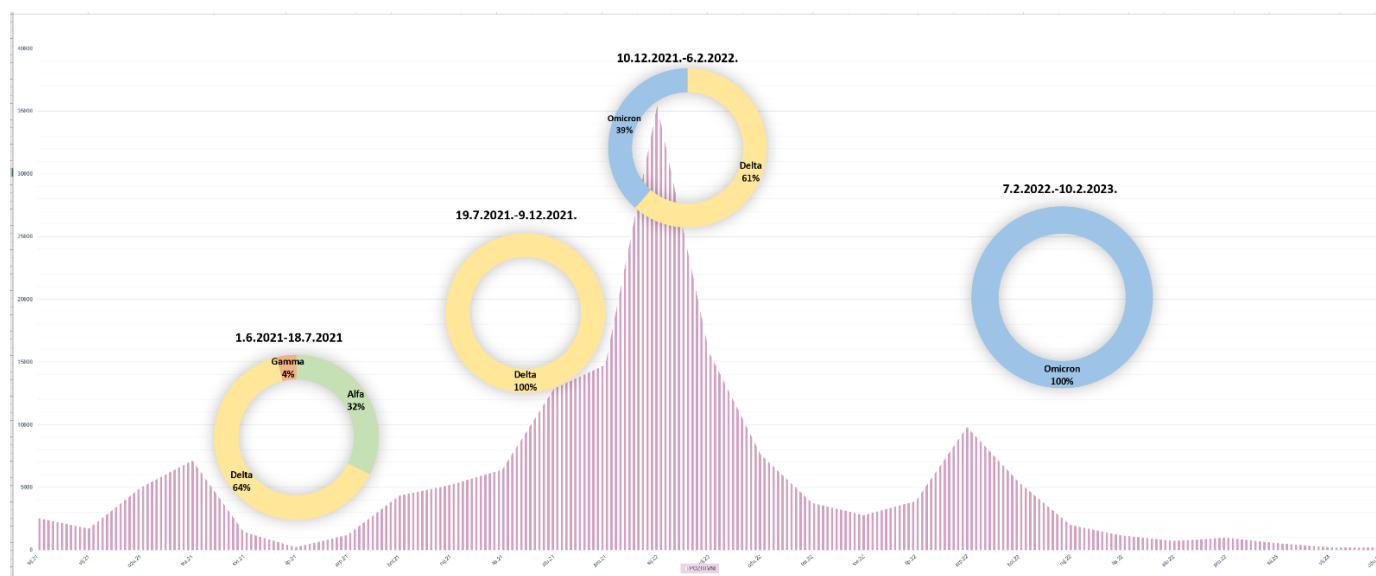
Od ukupnog broja sekvenciranih uzoraka (1 892), njih 1 050 (55,5 %) slučajeva utvrđena je Omicron varijanta, 804 (42,5 %) Delta varijanta, 34 (1,8 %) Alfa varijanta (34) te svega 4 (0,2 %) Gama varijanta (slika 25).

U razdoblju od 1.6.2021. do 18.7.2021. godine, ukupno je sekvencirano 105 SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka. Prema rezultatima sekvenciranja, u ispitivanom razdoblju, najzastupljenija varijanta SARS-CoV-2 virusa bila je Delta varijanta, u 67 slučajeva (63,8 %). Alfa varijanta bila je zastupljena u 34 slučaja (32,4 %), dok je Gamma varijante bila utvrđena u samo 4 uzorka (3,8 %).

U razdoblju od 19.7.2021 do 9.12.2021. sekvencirano je 346 uzoraka, a svi su bili Delta soj (100 %)

U razdoblju od 10.12.2021. do 6.2.2022. godine broj sekvenciranih uzoraka bio je 636 od kojih je 391 uzorak bio Delta soj (61,5 %), a ostalih 245 uzoraka je bilo Omicron soj (38,5 %).

U vremenu od 7.2.2022. – 10.2.2023 sveukupan broj sekvenciranih bio je 805 sa 100 % zastupljenosti Omicron soja (slika 26).



Slika 26. Prikaz varijanti virusa SARS-CoV-2 po mjesecima, u razdoblju od 1.6.2021. – 10.2.2023. godine u SDŽ (N=474 189)

5. RASPRAVA

Nacionalni krizni stožer i Krizni stožer Ministarstva zdravstva je dana 25.2.2020. godine objavio da je u Hrvatskoj, u gradu Zagrebu, dijagnosticiran prvi slučaj bolesti COVID-19, uzrokovan infekcijom SARS-CoV-2 virusom. Oboljela osoba bio je mlađi muškarac u dobi od 25 godina koji je 20.2.2020. doputovao iz grada Milana (pokrajina Lombardija) u Italiji, koji je bio zahvaćen epidemijom SARS-CoV-2 virusom od 21.2.2020. godine (27). Do srpnja 2023. godine u Hrvatskoj je bilo zabilježeno 1 274 068 pozitivnih slučajeva, od kojih se 1 255 638 osoba oporavilo od bolesti, a umrla je 18 281 osoba. Najveći broj zabilježenih pozitivnih slučajeva imao je grad Zagreb (289 767) kao glavni grad Hrvatske s najvećim brojem stanovnika (806 341 – prema posljednjem popisu stanovništva). Na drugom i trećem mjestu nalazile su se Splitsko-dalmatinska županija i Primorsko-goranska županija s 176 245 i 122 068 pozitivnih slučajeva kao dvije velike turističke regije u Hrvatskoj. Županija s najmanje zabilježenih pozitivnih slučajeva je bila Ličko-senjska (11 613) koja je ujedno županija s najmanjim brojem stanovnika u Republici Hrvatskoj (28).

Prema podacima svjetske zdravstvene organizacije, od početka pandemije do danas, u svijetu je potvrđeno 768 237 788 slučajeva zaraze SARS-CoV-2 virusom. Najviše zabilježenih slučajeva je bilo u Europi (275 760 968), a najmanje u Africi (9 543 552). Od ukupno zabilježenih pozitivnih slučajeva u Europi, u Hrvatskoj je bilo 0,5 % pozitivnih slučajeva. Država s najviše zabilježenih pozitivnih slučajeva je SAD (103 436 829), što čini 13,5 % ukupnog broja zaraženih u svijetu (29).

Prema našem istraživanju, U Splitsko-dalmatinskoj županiji ukupno je testirano u NZJZ SDŽ 474 189 pacijenata od koji je 176 245 (37,2 %) bilo pozitivno na virus SARS-CoV-2. U razdoblju od 1.6.2021. godine u NZJZ započelo se sa sekvenciranjem SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka. Od ukupnog broja sekvenciranih uzoraka (1892) najviše je zabilježeno slučajeva varijante Omicron (55,5 %). Na drugom mjestu se nalazi Delta soj (42,5 %), na trećem Alfa (1,8 %) i na posljednjem Gama (0,2 %).

NZJZ SDŽ je sa sekvenciranjem započeo tek u lipnju 2021. godine. Prvi rezultati sekvenciranja SARS-CoV-2 pozitivnih uzoraka pokazali su da su u razdoblju od 1.6.2021. – 12.7.2021. u Splitsko-dalmatinskoj županiji bile prisutne tri varijante SARS-CoV-2 virusa. Najzastupljenija je bila Delta varijanta u postotku od 63,8 %, nakon nje Alfa soj s 32,4 % te naposljetku Gama soj sa zastupljenošću od 3,8 %. Prema istraživanju Chakraborty et al. za to vrijeme Delta varijanta se proširila gotovo 100 % u SAD-u, Njemačkoj i Irskoj. U Ujedinjenom Kraljevstvu

je u tom razdoblju Delta varijanta bila raširena 80 % i više. U Ujedinjenom Kraljevstvu, prije pojave Delta varijante, najzastupljenija je bila Alfa varijanta. Rezultati istraživanja su pokazali da je u razdoblju od 8.3.2021. - 22.3.2021. godine broj slučajeva Alfa varijante iznosio 34 495 dok je Delta varijante bilo u samo pet slučajeva. U SDŽ je od 19.7.2021. – 10.12.2021. godine Delta varijanta bila prisutna u 100 % slučajeva (346 uzoraka) dok je u Ujedinjenom Kraljevstvu, od 18.10.2021. – 1.11.2021., bilo 49 725 slučajeva Delta varijante, a samo jedan slučaj Alfa varijante te pet slučajeva ostalih varijanti. Od 19.7.2021. godine u SDŽ nije bila sekvencirana Alfa varijanta.

Za razliku od Ujedinjenog Kraljevstva gdje je u ožujku 2021. godine dominirala Alfa varijanta, u Brazilu je najzastupljenija bila Gamma varijanta. U razdoblju od dva tjedna istraživanje je pokazalo da je od 1796 uzoraka 1531 bila Gamma varijanta (85,2 %). Od početka sekvenciranja do 10.02.2023. u SDŽ zabilježena su samo četiri slučajeva Gamma varijante (30). Nakon 12.7.2021. godine u SDŽ više nije bio zabilježen niti jedan slučaj Gama varijante.

U Splitsko-dalmatinskoj županiji, varijanta B.1.1.529 tj. Omicron varijanta, prvi se put pojavila 10.12.2021. godine (datum testiranja osobe na SARS-CoV-2 virus, na Nastavnom zavodu za javno zdravstvo SDŽ) dok je prvi zabilježeni slučaj u svijetu prijavljen Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji 24.11.2021., a pojavio se u Južnoj Africi (31). U narednih godinu dana (od 7.2.2022. do 10.2.2023.) u Splitsko-dalmatinskoj županiji zabilježeni su samo slučajevi Omicron varijante (ukupno 805 uzoraka).

6. ZAKLJUČCI

1. U trogodišnjem razdoblju pandemije (1.4.2020.–31.3.2023.) testirano je ukupno 474 189 pacijenata na virus SARS-CoV-2 metodom PCR-a. Od ukupnog broja testiranih, u Splitsko-dalmatinskoj županiji bilo je 176 245 (37,2 %) pacijenata s pozitivnim rezultatom, dok je 297 944 testiranih bilo negativno (62,8 %).
2. Najviše testiranih osoba bilo je u siječnju 2022. godine, ukupno 54 135 od kojih je 35 443 (65,5 %) imalo pozitivan PCR rezultat na SARS-CoV-2
3. U razdoblju od 1.6.2021. do 10.2.2023. sekvencirano je ukupno 1 892 uzorka. U 1 050 (55,5 %) slučajeva utvrđena je Omicron varijanta, u 804 (42,5 %) Delta varijanta, u 34 (1,8 %) Alfa varijanta (34) te u svega 4 (0,2 %) uzorka Gama varijanta.
4. Na kraju razdoblja sekvenciranja od 7.2.2022. – 10.2.2023 sveukupan broj sekvenciranih uzoraka bio je 805 sa 100 % zastupljenosti Omicron soja.

7. LITERATURA

1. Mistry P, Barmania F, Mellet J, Peta K, Strydom A, Viljoen IM, James W, Gordon S, Pepper MS. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity. *Front Immunol.* 2022 Jan 3;12:809244. doi: 10.3389/fimmu.2021.809244. PMID: 35046961; PMCID: PMC8761766.
2. Wu, D., Wu, T., Liu, Q., & Yang, Z. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. *International journal of infectious diseases, 94*, 44-48.
3. Lai CC, Shih TP, Ko WC, Tang HJ, Hsueh PR. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2020 Mar;55(3):105924. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105924. Epub 2020 Feb 17. PMID: 32081636; PMCID: PMC7127800.
4. <https://covid19.who.int/> 20.7.2023.
5. Rotondo JC, Martini F, Maritati M, Mazziotta C, Di Mauro G, Lanzillotti C, Barp N, Gallerani A, Tognon M, Contini C. SARS-CoV-2 Infection: New Molecular, Phylogenetic, and Pathogenetic Insights. Efficacy of Current Vaccines and the Potential Risk of Variants. *Viruses.* 2021 Aug 25;13(9):1687. doi: 10.3390/v13091687. PMID: 34578269; PMCID: PMC8473168.
6. AlMalki FA, Albukhaty S, Alyamani AA, Khalaf MN, Thomas S. The relevant information about the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) using the five-question approach (when, where, what, why, and how) and its impact on the environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2022 Feb 17:1–25. doi: 10.1007/s11356-022-18868-x. Epub ahead of print. PMID: 35175517; PMCID: PMC8852932.
7. Salimi-Jeda A, Abbassi S, Mousavizadeh A, Esghaie M, Bokharaei-Salim F, Jeddi F, Shafaati M, Abdoli A. SARS-CoV-2: Current trends in emerging variants, pathogenesis, immune responses, potential therapeutic, and vaccine development strategies. *Int Immunopharmacol.* 2021 Dec;101(Pt A):108232. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108232. Epub 2021 Oct 16. PMID: 34673335; PMCID: PMC8519814.
8. Hughes, L., Gangavarapu, K., Latif, A. A., Mullen, J., Alkuzweny, M., Hufbauer, E., & Andersen, K. (2022). Outbreak. info genomic reports: scalable and dynamic surveillance of SARS-CoV-2 variants and mutations. *Research square*, rs-3.

9. Peeling RW, Heymann DL, Teo YY, Garcia PJ. Diagnostics for COVID-19: moving from pandemic response to control. *Lancet*. 2022 Feb 19;399(10326):757-768. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02346-1. Epub 2021 Dec 20. PMID: 34942102; PMCID: PMC8687671.
10. Fernandes, Q., Inchakalody, V. P., Merhi, M., Mestiri, S., Taib, N., Moustafa Abo El-Ella, D., & Dermime, S. (2022). Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Annals of medicine*, 54(1), 524-540.
11. Filchakova, O., Dossym, D., Ilyas, A., Kuanysheva, T., Abdizhamil, A., & Bukasov, R. (2022). Review of COVID-19 testing and diagnostic methods. *Talanta*, 123409.
12. Chen X, Kang Y, Luo J, Pang K, Xu X, Wu J, Li X, Jin S. Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 11;11:632490. doi: 10.3389/fcimb.2021.632490. PMID: 33777844; PMCID: PMC7991797.
13. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, Rojiani AM, Kolhe R. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*. 2021 Jul 30;43(2):845-867. doi: 10.3390/cimb43020061. PMID: 34449545; PMCID: PMC8929009.
14. Chen X, Kang Y, Luo J, Pang K, Xu X, Wu J, Li X, Jin S. Next-Generation Sequencing Reveals the Progression of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Mar 11;11:632490. doi: 10.3389/fcimb.2021.632490. PMID: 33777844; PMCID: PMC7991797.
15. <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/06/UPUTE-BAKTERIOLOSKE.pdf>, 23.2.2023.
16. Marty, F. M., Chen, K., & Verrill, K. A. (2020). How to obtain a nasopharyngeal swab specimen. *The New England journal of medicine*, 382(22), e76-e76.
17. <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2022/06/BRIS-ZDRIJELA.pdf>, 23.2.2023.
18. Tianlong (2021), GeneRotex 96/48 Nucleic Acid Extractor, Kina, Tianlong, 2021, str.1-4
19. <https://biomolecularsystems.com/myra/>, 16.9.2023.
20. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNK u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008

21. <https://clinomicseurope.com/products-and-services/1drop/1copy-covid-19-qpcr-4plex-kit/>, 16.9.2023
22. <https://www.medtl.net/products/gentier-96e-real-time-pcr-system.html>, 16.9.2023
23. <https://www.hzjz.hr/sluzba-gospodarstveni-pravni-opci-poslovi/izvjestaj-sars-cov2-covid-19-sekvenciranja-od-10-04-do-07-05-2023/> , 6.6.2023
24. <https://www.protocols.io/view/illumina-nextera-DNK-flex-library-construction-and-5qpvo5499l4o/v1?step=125>, 8.6.2023.
25. <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/illumina-DNK-prep.html>, 6.6.2023.
26. <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nex>, 8.6.2023.
27. <https://www.hzjz.hr/priopcenja-mediji/covid-19-priopcenje-prvog-slucaja/>, 24.7.2023.
28. <https://www.koronavirus.hr/zupanije/>, 24.7.2023.
29. <https://covid19.who.int/>, 24.7.2023.
30. Chakraborty C, Sharma AR, Bhattacharya M, Agoramoorthy G, Lee SS. A Paradigm Shift in the Combination Changes of SARS-CoV-2 Variants and Increased Spread of Delta Variant (B.1.617.2) across the World. *Aging Dis.* 2022 Jun 1;13(3):927-942. doi: 10.14336/AD.2021.1117. PMID: 35656100; PMCID: PMC9116911.
31. [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern), 24.7.2023.

8. SAŽETCI (na hrvatskom i engleskom jeziku)

Stopa SARS-CoV-2 pozitivnih slučajeva i distribucija varijanti u Splitsko-dalmatinskoj županiji u vremenu od 3 pandemijske godine

Cilj: Prikazati stopu SARS-CoV-2 pozitivnih slučajeva, pojavnost različitih varijanti i metode i postupke korištene u dijagnostici i detekciji virusa.

Metode: Zlatni standard za detekciju SARS-CoV-2 virusa je RealTime PCR metoda gdje se kao uzorak rabi obrisak nazofarinksa i obrisak ždrijela. Za dokazivanje varijante samog virusa upotrebljava se metoda sekvenciranja nove generacije.

Rezultati: U razdoblju od 3 godine, u NZJZ SDŽ, od ukupnog broja testiranih (474 189), 176 245 (33,7 %) je bilo pozitivno na virus SARS-CoV-2. Od ukupnog broja sekvenciranih uzoraka (1 892), 1050 (55,5 %) je bila Omicron varijanta.

Zaključci: SARS-CoV-2 uzrokuje bolest COVID-19 koja je zbog svog izrazito brzog širenja među populacijom proglašena pandemijom. Zbog čestih mutacija unutar virusnog genoma nerijetka je pojava novih varijanti virusa koje uvelike utječu na dijagnostiku i širenje bolesti, njeno liječenje te razvoj cjepiva. Kraj epidemije COVIDA-19 u Hrvatskoj službeno je proglašen 11.5.2023. godine.

Ključne riječi: SARS-CoV-2 virus, varijante, RealTime PCR, Sekvenciranje nove generacije.

SARS-CoV-2 positivity rate and variant distribution among patients in South Croatia, 3-year pandemic period analysis

Objectives: To show the rate of SARS-CoV-2 positive cases, the incidence of different variants and the methods used for diagnostics and detection of the virus.

Methods: The golden standard for the detection of SARS-CoV-2 virus is RealTime PCR where a nasopharyngeal and pharyngeal swab is used as a sample. Next generation sequencing is the method used to detect variants of SARS-CoV-2 virus.

Results: During a period of 3 years, a total of 474 189 samples were tested at the Institute of Public Health of Split and Dalmatia county, of which 474 189 (33.7 %) were tested positive. Of the total number of sequenced samples (1 892), 1 050 (55.5 %) was the Omicron variant.

Conclusions: SARS-CoV-2 virus causes a disease called COVID-19 which has been declared a pandemic because of its rapid spread among the population. Due to often mutations in the viral genome, new variants of the virus emerge that have a major effect on the diagnostics and spread of the disease, its treatment and vaccine development. In Croatia, the end of the epidemic has been officially declared on 11th of May 2023.

Key words: SARS-CoV-2 virus, variants, RealTime PCR, Next generation sequencing

9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Marta Urlić

Datum i mjesto rođenja: 16.1.1997. godine, Split, Republika Hrvatska

OBRAZOVANJE:

2003. – 2011. – Osnovna škola Bol, Split

2011. – 2015. – I Gimnazija Split

2016. – 2019. – Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, preddiplomski sveučilišni studij medicinsko – laboratorijske dijagnostike

2020. – 2023. – Sveučilišni odjel za forenzične znanosti, diplomski sveučilišni studij forenzične kemije i molekularne biologije

10. IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

(PRILOG 3)

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Sveučilišni odjel za forenzične znanosti

Izjava o akademskoj čestitosti

Ja, Marta Urlič, izjavljujem da je moj diplomski rad pod naslovom Stopa SARS-CoV-2 pozitivnih slučajeva i distribucija varijanti u Splitsko-dalmatinskoj županiji u vremenu od 3 pandemijske godine

rezultat mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Nijedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan bez citiranja i ne krši ičija autorska prava.

Izjavljujem da nijedan dio ovoga rada nije iskorišten u ijednom drugom radu pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj, obrazovnoj ili inoj ustanovi.

Sadržaj mojega rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Split, 05.08.2023.

Potpis studenta/studentice:

