

Spektroskopska detekcija virusa SARS-CoV-2

Šakić, Mihaela

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:821159>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Mihaela Šakić
0058216896

SPEKTROSKOPSKA DETEKCIJA VIRUSA SARS-CoV-2
ZAVRŠNI RAD

Predmet: Instrumentalna analiza

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Spektroskopska detekcija virusa SARS-CoV-2

Mihaela Šakić, 0058216896

Sažetak: SARS-CoV-2, pripadnik obitelji koronavirusa, pojavio se u prosincu 2019. uzrokujući respiratornu bolest COVID-19, a zbog njegovog iznimno brzog širenja diljem svijeta ubrzo je proglašena pandemija te bolesti. Osim cjepiva i lijekova, znanstvena zajednica započela je intenzivno istraživanje brzih, jeftinih i pouzdanih testova za detekciju virusa. U ovom završnom radu opisane su spektroskopske metode njegove detekcije: spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR), masena spektrometrija (MS) i infracrvena spektroskopija (IR). Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije najpouzdanija je metoda za određivanje kemijske strukture organskih i anorganskih molekula, a zasniva se na rezonanciji jezgara s neparnim atomskim brojem pri čemu se bilježi signal čiji kemijski pomak ovisi o kemijskoj okolini istraživane atomske jezgre, a površina ispod signala odgovara broju kemijski ekvivalentnih jezgri. Masenom spektrometrijom određuje se relativna masa i količina iona nastalih ionizacijom atoma i molekula te raspadom ioniziranih molekula nekog uzorka. Infracrvena spektroskopija je metoda koja koristi infracrveno područje elektromagnetskog spektra za detekciju funkcijskih skupina u spoju.

Ključne riječi: SARS-CoV-2, NMR, MS, IR

Rad sadrži: 27 stranica, 10 slika, 4 tablice, 36 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Datum obrane: 7. rujan 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Spectroscopic detection of SARS-CoV-2 virus

Mihaela Šakić, 0058216896

Abstract: SARS-CoV-2, a member of the coronavirus family, emerged in December 2019 and caused COVID-19 disease. Due to its extremely rapid spread around the world, a pandemic was declared soon after. In addition to vaccines and drugs, the scientific community has begun intensive research into rapid, cheap, and reliable tests to detect the virus. Spectroscopic detection methods are described in this work: Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR), Mass Spectrometry (MS), and Infrared Spectroscopy (IR). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy is the most reliable method for determining the chemical structure of organic and inorganic molecules. It is based on the resonance of nuclei with an odd atomic number, and the chemical shift of the so-obtained signal depends on the chemical environment of the atomic nucleus under study, while the area under the signal corresponds to the number of chemically equivalent nuclei. Mass Spectrometry is used to determine the relative mass and amount of ions formed by the ionization of atoms and molecules and by the decay of ionized molecules in a sample. Infrared Spectroscopy is a method that uses the infrared region of the electromagnetic spectrum to determine the functional groups in a compound.

Keywords: SARS-CoV-2, NMR, MS, IR

Thesis contains: 27 pages, 10 figures, 4 tables, 36 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Full Professor Lidija Barišić

Thesis defended: September 7th, 2022.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. SARS-CoV-2.....	2
2.1.2. Struktura SARS-CoV-2.....	2
2.2. Polimerazna lančana reakcija.....	4
2.3. Spektroskopske metode u detekciji SARS-CoV-2.....	5
2.3.1. Općenito.....	5
2.3.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije.....	6
2.3.3. Masena spektrometrija.....	10
2.3.4. Infracrvena spektroskopija.....	16
3. Zaključak.....	23
4. Literatura.....	24
5. Prilog	

1. Uvod:

Prvi slučaj zaraze virusom SARS-CoV-2 detektiran je u Wuhanu, Kina, u prosincu 2019. Radi se o novom soju respiratornih koronavirusa koji prije nije bio otkriven kod ljudi, a koji se brzo proširio diljem svijeta uzrokujući bolest COVID-19, te je proglašeno stanje pandemije te bolesti koje još uvijek traje. Prema centru za znanost i inženjerstvo na Sveučilištu John Hopkins (2022), od početka pandemije do kolovoza 2022. godine, potvrđeno je skoro 600 milijuna slučajeva zaraze i preko 6 milijuna smrtnih slučajeva globalno te više od milijun slučajeva zaraze i preko 15 000 smrtnih slučajeva u Republici Hrvatskoj.

Koronavirus se relativno brzo i lako prenosi s čovjeka na čovjeka kapljičnim putem prilikom kihanja ili kašljanja ili dodirrom površina na kojima se nalaze kapljice zaražene virusom. Kako bi se spriječilo daljnje širenje virusa potrebno ga je detektirati u ranim stadijima zaraze. Za detekciju se najčešće koristi RT-PCR (eng. *Real Time Polymerase Chain Reaction*), lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja. Iako ova metoda predstavlja „zlatni standard“ u detekciji virusa, moguća je pojava lažno negativnih testova, a sama metoda je dugotrajna i neekonomična. Samim time, pojavila se potreba za otkrivanjem bržih i učinkovitijih metoda za detekciju virusa, među koje se ubrajaju i spektroskopske metode poput spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije, masene spektrometrije i infracrvene spektroskopije, što će biti opisano u ovom radu.

2. Teorijski dio

2.1. SARS-CoV-2

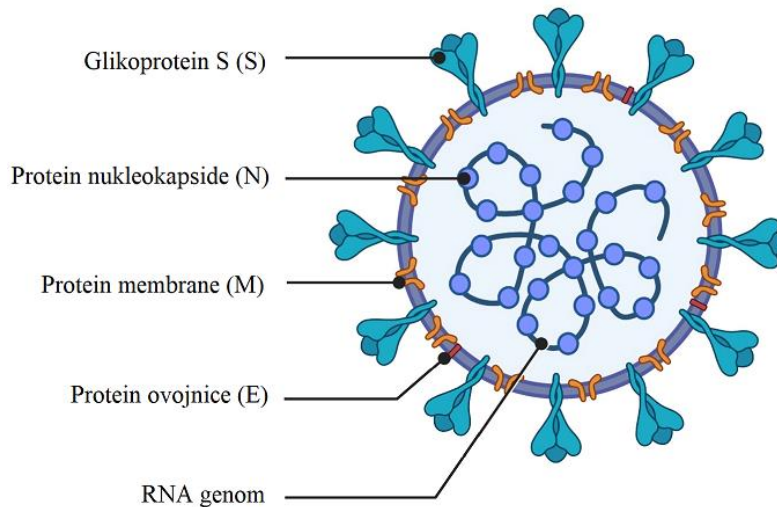
Prema hrvatskoj enciklopediji, virusi su čestice koje uzrokuju zarazne bolesti. Nemaju staničnu građu te predstavljaju komplekse makromolekula nukleinskih kiselina (DNA ili RNA) i proteina. Koronavirusi uzrokuju teški respiratorni sindrom (eng. SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*), a virus SARS-CoV-2 iz obitelji koronavirusa, podobitelji *Betacoronavirusa*, uzrokovao je bolest COVID-19 (Wang i sur., 2020).

Do 60-ih godina prošlog stoljeća vjerovalo se da su koronavirusi isključivo animalni virusi no 1965. zabilježen je prvi slučaj zaraze kod ljudi. Danas je poznato 7 vrsta koronavirusa koji uzrokuju bolesti u čovjeka, a od njih su najznačajniji SARS-CoV (eng. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) i MERS-CoV (eng. *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) (Hasöksüz, Kiliç, Saraç, 2020).

Sekvencioniranjem genoma novog koronavirusa i usporedbom s genomima drugih virusa iz *Betacoronavirus* roda utvrđeno je da pripada SARS-CoV skupini zbog podudarnosti genoma od 79.5%, a najbliži je soju SARS-CoV virusa BatCov RaTG13 sa sličnošću od 96% što upućuje na to da je moguće podrijetlo SARS-CoV-2 iz šišmiša te da je nastao mutacijom virusa koji inače inficira šišmiše (Wang i sur., 2020).

2.1.2. Struktura SARS-CoV-2

Genom koronavirusa je jednolančana, pozitivno orijentirana RNA. Pozitivno orijentirana RNA može se izravno translirati u proteine. U usporedbi s drugim virusima, koronavirusi imaju najdulji genom. Duljina genoma SARS-CoV-2 je otprilike 29.9 kb i sadrži gene za četiri strukturna proteina: glikoprotein (S) koji nalikuje na šiljak (engl. *Spike*), protein membrane (M), protein ovojnice (E) i protein nukleokapside (N) (slika 1), te šesnaest nestrukturnih proteina koji su nazvani nsp1-16. Nestrukturni proteini sudjeluju u replikaciji, procesiranju, transkripciji i translaciji RNA (Wang i sur., 2020).

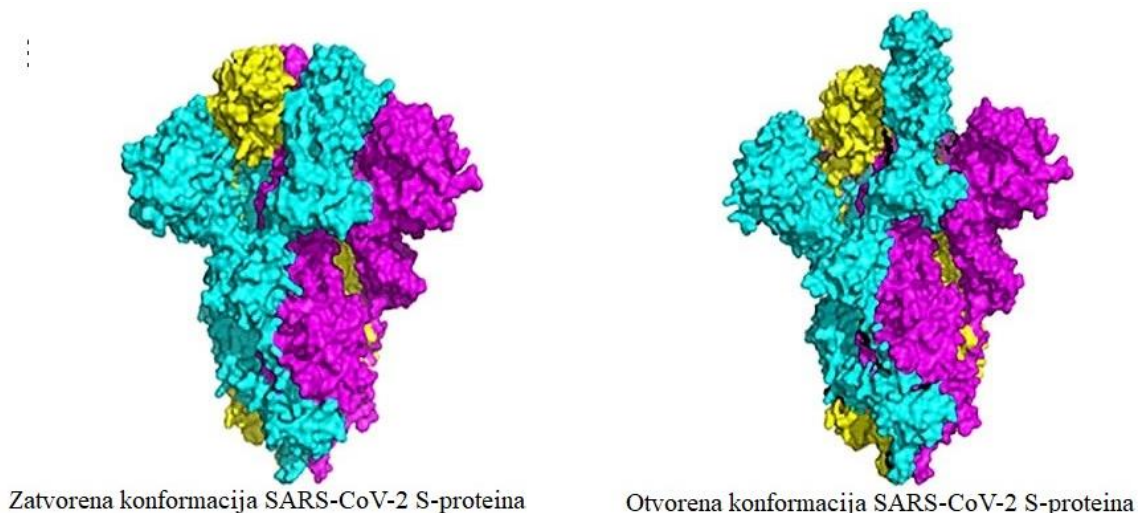


Slika 1. Prikaz strukture virusa SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno iz Biophysical Society, 2020).

Primarna funkcija proteina nukleokapside (N) je vezanje za genom virusa, a samim tim igra ulogu u replikaciji virusa. Protein membrane (M) ključan je za stvaranje novih virusnih čestica, a protein ovojnice (E) sudjeluje u procesu otpuštanja nastalih čestica (Hasöksüz, Kiliç, Saraç, 2020).

S-protein posreduje pri ulasku koronavirusa u stanicu domaćina, a sastoji se od dvije podjedinice, S1 i S2. S1 podjedinica sadrži *N*-terminalnu domenu (eng. *N-terminal domain*, NTD) i domenu za vezanje receptora (eng. *Receptor Binding Domain*, RBD). S2 podjedinica sadržava peptid za fuzioniranje (eng. *Fusion Peptide*, FP), regiju sedmerostrukog ponavljanja 1 (eng. *Heptad Repeat 1*, HR1), središnju uzvojniju (eng. *Central Helix*, CH), domenu za povezivanje (eng. *Connector Domain*, CD), regiju sedmerostrukog ponavljanja 2 (eng. *Heptad Repeat 2*, HR2), transmembransku domenu (eng. *Transmembrane Domain*, TM) i citoplazmatski rep (eng. *Cytoplasmic Tail*, CT). Funkcija ove podjedinice je fuzija membrane virusa i stanice domaćina (Wang i sur., 2020).

RBD prepoznaje angiotenzin-pretvorbeni enzim 2 (eng. *Angiotensin-Converting Enzyme 2*, ACE2) na stanicama domaćina. RBD može zauzimati dvije konformacije (slika 2). Dok otvorena konformacija omogućava fuzioniranje virusne čestice sa stanicom domaćina, u zatvorenoj konformaciji ne dolazi do fuzioniranja stanica (Wang i sur., 2020).



Slika 2. Šiljasti glikoprotein S u zatvorenoj konformaciji (*lijevo*) i otvorenoj konformaciji (*desno*) (preuzeto i prilagođeno iz Wang i sur., 2020).

2.2. Polimerazna lančana reakcija

Polimerazna lančana reakcija (eng. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) metoda je koja omogućava osjetljivo, specifično i reproducibilno umnožavanje molekula nukleinskih kiselina (Arya i sur., 2005). Standardno, PCR metoda provodi se u ciklusima (obično od 25 do 35 ciklusa). Za izvođenje ove metode potrebno je iz uzorka pacijenta (nazofaringealni, orofaringealni, slina) izolirati DNA ili RNA. Na samom početku polimerazne lančane reakcije provodi se početna denaturacija nukleinskih kiselina na 95°C, zatim se temperatura snižava na 50 do 65°C te slijedi komplementarno sparivanje početnica s nukleinskom kiselinom. U sljedećem koraku temperatura se ponovno podiže, ali na 70 do 72°C pri čemu dolazi do sinteze DNA ili RNA i na kraju se provodi završna sinteza DNA ili RNA na istoj temperaturi kroz period od 10 minuta te se ovaj postupak ponavlja 25 do 35 puta. Početnice su oligonukleotidi duljine od 12 do 30 nukleotida koji se komplementarno sparuju lijevo i desno od dijela DNA ili RNA kojeg želimo umnožiti. Za sintezu nukleinske kiseline koristi se termostabilna Taq polimeraza koja podnosi i visoke temperature koje se generiraju tijekom provođenja PCR reakcije (Svetec, 2021).

Real-time kvantitativni PCR (RT-qPCR) metoda je koja se koristi za detekciju i mjerenje povećanja količine DNA ili RNA u svakom ciklusu u stvarnom vremenu. Metoda se bazira na praćenju povećanja fluorescencije tijekom ciklusa PCR-a. Fluorescencija potječe iz početnica koje

su označene radioaktivnim fosforom. Ukoliko je prisutna ciljana sekvenca koju želimo umnožiti, početnice se vežu lijevo i desno od nje te će se sa svakim ciklusom PCR-a povećati broj kopija željene sekvence, a samim time i fluorescentnih početnica. Povećanje fluorescencije se obično detektira tankoslojnom kromatografijom (Arya i sur., 2005).

Pojavom virusa SARS-CoV-2 pojavila se povećana potreba za brzim i pouzdanim metodama detekcije, a PCR metoda se pokazala kao „zlatni standard“ u detekciji jer je karakteriziraju visoka osjetljivost i specifičnost. No, problem s PCR metodom je mogućnost pojave lažno negativnih testova. Na točnost ove metode utječu mutacije genoma virusa kojima se smanjuje vjerojatnost vezanja početnica za određene regije u genomu koje želimo umnožiti. Iako su početnice dizajnirane tako da se vežu za konzervativne regije genoma u kojima se najrjeđe pojavljuju mutacije, varijabilnost u RNA genomu virusa je velika tako da se ne može isključiti prisutnost virusa čak ni s negativnim PCR testom. Osim zbog mutacija, lažno negativni testovi mogu se pojaviti i ukoliko se uzorak ne testira neposredno nakon prikupljanja jer se stajanjem aktiviraju inhibitori umnožavanja koji su prisutni u samom uzorku (Tahamtan i Ardebili, 2020).

RT-PCR metoda nije pogodna za masovno testiranje, pogotovo u slabije razvijenim državama zbog skupocjenih reagenasa koje je potrebno dodati u uzorak prije analize (početnice, Taq polimeraza, nukleotidi), ali i zbog samog vremena trajanja analize uzorka koje može biti od 24 do 48 sati uključujući pripremu uzorka (Dollman, Griffin i Downard 2020). Zbog svih ovih razloga pojavila se potreba za novim, bržim i ekonomičnijim dijagnostičkim metodama koje će omogućiti smanjeno globalno širenje virusa i njegovu kontrolu, a kao obećavajuće pokazale su se spektroskopske metode.

2.3. Spektroskopske metode u detekciji SARS-CoV-2

2.3.1. Općenito

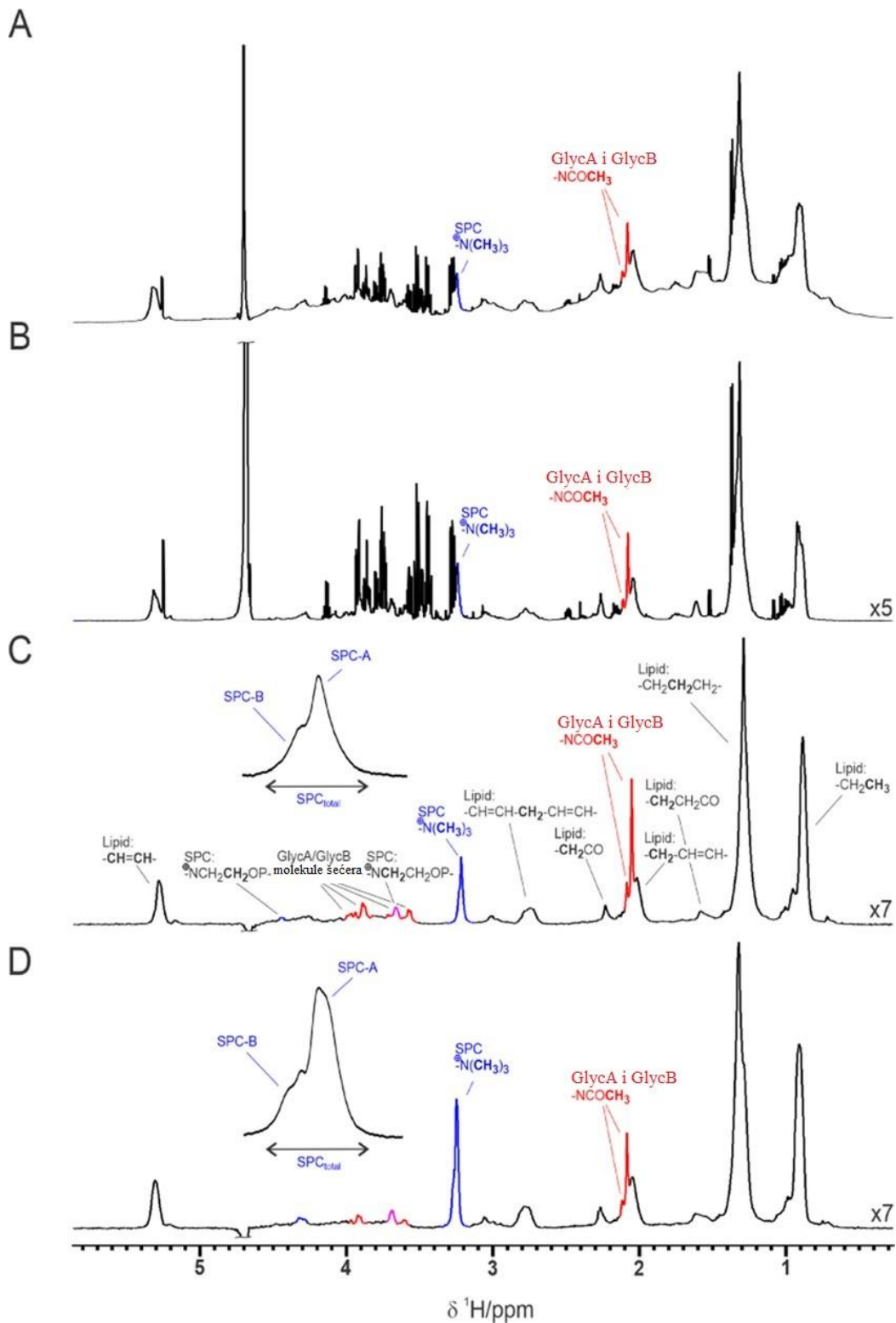
Spektroskopske metode ubrajaju se u analitičke postupke za dobivanje informacija o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju separacije, detekcije i mjerenja energetskih promjena koje se događaju u jezgrama, odnosno elektronskim omotačima atoma ili u molekulama kao rezultat njihove interakcije s elektromagnetskim zračenjem ili s česticama (Horvat, 2015). Iako bi pravilnije bilo koristiti naziv „spektrometrija“ (grana fizike koja proučava fizički sustav promatranjem efekata vezanih uz emisiju i apsorpciju elektromagnetskog zračenja), zbog uvriježenosti naziva spektroskopija kroz rad će se koristiti taj naziv.

2.3.2. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) metoda je za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva. Izvediva je s vrlo malom količinom uzorka koji se pri tom ne oštećuje. NMR se bazira na magnetskim svojstvima jezgara s neparnim atomskim brojem jer takve jezgre imaju nuklearni spin (spin se može vizualizirati kao rotirajuća lopta pozitivnog naboja). Kada se takve jezgre izlože djelovanju vanjskog magnetskog polja, one se orijentiraju u njegovom smjeru, zauzimajući stanje α -spina. Ukoliko se jezgra orijentira suprotno od smjera vanjskog magnetskog polja bit će u manje stabilnom stanju β -spina. Kada se jezgra u stanju α -spina izloži djelovanju radiofrekventnog zračenja čija frekvencija odgovara energetskej razlici između α - i β - spina, dolazi do izvrtanja jezgre iz α - u β - spin, zatim relaksacije i ponovnog usmjeravanja jezgre u smjeru djelovanja vanjskog magnetskog polja pri čemu se emitira elektromagnetski signal kojeg bilježi detektor. Protoni su u različitom kemijskom okruženju različito zaklonjeni, jer elektroni koji se gibaju oko njih stvaraju mala lokalna (inducirana) magnetska polja koja se orijentiraju suprotno u odnosu na vanjsko magnetsko polje, pa se i njihove rezonancije razlikuju (Barišić, 2021).

Lodge i sur. (2021) svojim su istraživanjem pokazali da se primjenom nuklearne magnetske rezonancije na uzorke krvne plazme mogu detektirati molekularne oznake SARS-CoV-2 infekcije. U istraživanju je uspoređena krvna plazma kontrolne skupine zdravih ispitanika s (i) krvnom plazmom ispitanika koji su bili pozitivni na COVID-19, (ii) s krvnom plazmom ispitanika koji su bili negativni na COVID-19, ali su pokazivali simptome respiratorne bolesti te (iii) s krvnom plazmom ispitanika koji su preboljeli COVID-19 i u plazmi su bila prisutna antitijela na COVID-19.

Nakon infekcije SARS-CoV-2 virusom te obolijevanjem od COVIDA-19, dolazi do promjene u nizu metaboličkih biomarkera (lipoproteini, glikoproteini, aminokiseline, lipidi i drugi metaboliti) u krvnoj plazmi, a te promjene se mogu detektirati NMR-om. Razlike u spektrima ispitanika koji su bili COVID-19 pozitivni, negativni ili su u serološkom nalazu pokazali preboljenje bolesti uglavnom su bile vidljive u području signala *N*-acetilnih skupina različitih glikoproteina te supramolekulskih fosfolipida (slika 3). *N*-acetilni signali potječu od α -1-kiselog glikoproteina i drugih glikoproteina (eng. *glycoproteins*; GlycA i GlycB) čija je koncentracija povećana u krvnoj plazmi COVID-19 pozitivnih ispitanika. Supramolekulski fosfolipidni signali (SPC-A i SPC-B) potječu od $^{-+}N-(CH_3)_3$ kolinske skupine iz lizofosfatidilkolina koja je sastavni



Slika 3. (A) ^1H NMR spektar plazme SARS-CoV-2 pozitivnog pacijenta, (B) CPMG (engl. *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*) spektar istog uzorka, (C) DIRE (engl. *Diffusional and Relaxation Editing*)

spektar istog uzorka, (D) DIRE spektar krvne plazme zdravog ispitanika (preuzeto i prilagođeno iz Lodge i sur., 2021).

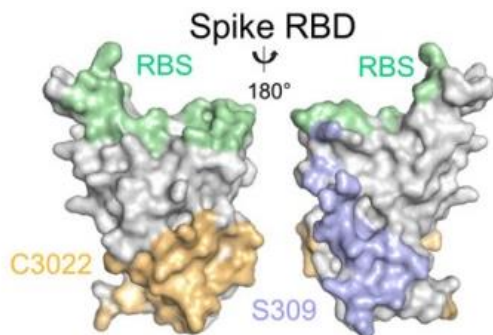
dio glikoproteina u krvnoj plazmi i fosfolipida u lipoproteinskim subfrakcijama visoke gustoće (SPC-A) zajedno sa fosfolipidnom komponentom lipoproteina niske gustoće (SPC-B). Ukupni zbroj integrala površina SPC-A i SPC-B signala bio je snižen kod SARS-CoV-2 pozitivnih ispitanika.

Također, važni su i omjeri $SPC_{ukupno}/GlycA$ signala koji bi mogli biti molekularni markeri za detektiranje SARS-CoV-2 pozitivnih ispitanika jer se omjeri razlikuju između kontrolnih ispitanika i SARS-CoV-2 pozitivnih te između SARS-CoV-2 pozitivnih i negativnih ispitanika (Lodge i sur., 2021). Glavninu GlycA signala čini α -1-kiseli glikoprotein čije su biološke funkcije sprječavanje proliferacije timocita, stimuliranje proliferacije limfocita, transport lijekova i inhibicija zgrušavanja trombocita, no osim njega ostatak signala je sačinjen od konglomerata različitih glikoproteina: α -1 antitripsin, haptoglobin, transferin, α -1-antikimotripsin. U akutnoj fazi upale je zabilježen porast u jačini GlycA signala od dva do pet puta (Lodge i sur., 2021).

U istraživanju koje su proveli Masuda i sur. (2021), također je ispitivana krvna plazma COVID-19 pozitivnih ispitanika i zdravih pojedinaca koji su predstavljali kontrolne ispitanike. Pomoću 1H NMR-a mjerene su razine lipoproteina i niskomolekulskih spojeva kao što su aminokiseline i organske kiseline. Istraživanje je pokazalo da su kontrolnu skupinu karakterizirale više koncentracije HDL kolesterola (eng. *High-Density Lipoprotein*, lipoprotein visoke gustoće), A1 i A2 lipoproteina i HDL fosfolipida dok su skupinu SARS-CoV-2 pozitivnih ispitanika karakterizirale više koncentracije L1-L4 triglicerida, VLDL fosfolipida (eng. *Very Low-Density Lipoproteins*, lipoproteini vrlo niske gustoće) te visoki omjeri B100 i A1 apolipoproteina. U skupini niskomolekulskih spojeva, povišene koncentracije glutamata, laktata, piruvata, formijata i fenilalanina te snižena koncentracija glutamina ukazivale su na zarazu virusom SARS-CoV-2.

Nakon preboljenja bolesti COVID-19, u ljudskom organizmu je moguće detektirati monoklonska antitijela koja su proizvedena djelovanjem imunološkog odgovora organizma na infekciju SARS-CoV-2 virusom. Proizvedena antitijela prepoznaju domenu za vezanje receptora (RBD) na S-proteinu te se vežu na nju i sprječavaju vezanje virusa na ACE-2 receptor na površini stanica (Schoenle i sur., 2021). Proučavanjem perturbacija kemijskih pomaka odgovarajućih signala (eng. *Chemical Shift Perturbations*, CSP) u NMR spektru mogu se pratiti promjene prilikom

vezanja liganda na protein i nadalje se može odrediti lokacija veznog mjesta, afinitet liganda za protein te moguća struktura protein-ligand kompleksa (Williamson, 2013). Još od ranijih istraživanja u kojima su korištene metode rendgenske kristalografije i krioelektronske mikroskopije, otkrivena su tri ključna RBD epitopa: receptorsko vezno mjesto (eng. *Receptor Binding Site*, RBS), CR3022 vezno mjesto i S309 vezno mjesto (slika 4) (Schoenle i sur., 2021).



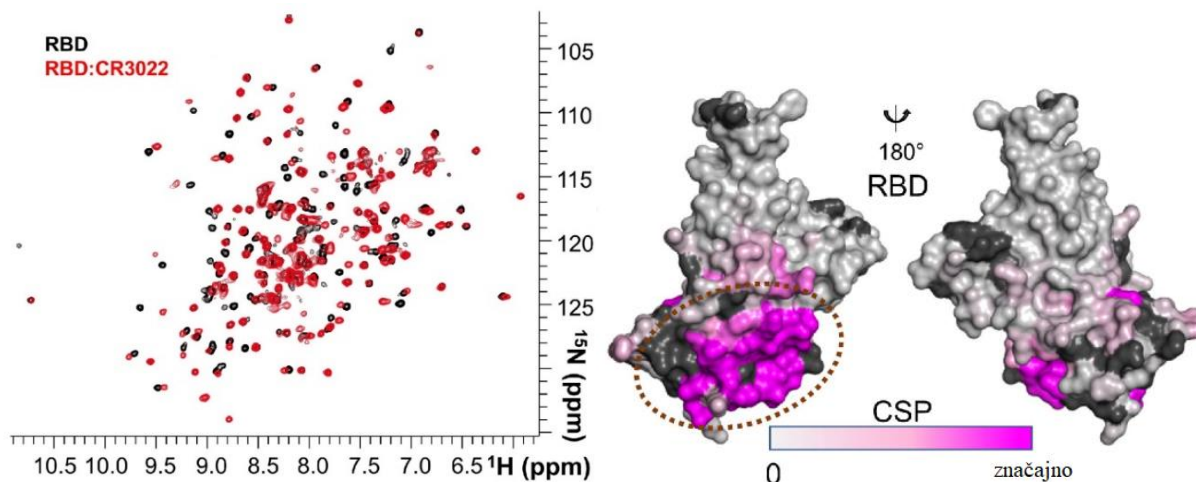
Slika 4. Prikaz epitopa RBS, C3022 i S309 na receptor vezujućoj domeni S-proteina SARS-CoV-2 (preuzeto i prilagođeno iz Schoenle i sur., 2021).

Kako bi se otkrila interakcija između fragmenta nekog antitijela i RBD-a korišten je fragment CR3022 koji potječe od antitijela izoliranog iz pacijenta koji je prebolio COVID-19. U eksperimentu je RBD prethodno označen s ^2H i ^{15}N jezgrama i inkubiran s neoznačenim CR3022 fragmentima te je snimljen 2D [^1H , ^{15}N] TROSY spektar (eng. *Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*) (Schoenle i sur., 2021). Dvodimenzijske metode nuklearne magnetske rezonancije daju spektre koji su definirani dvjema frekvencijama te time daju više informacija o proučavanim molekulama od jednodimenzijskih NMR spektara. Na slici 5 (*lijevo*) prikazan je TROSY spektar te je lako uočljiva razlika između RBD na koji nije vezan CR3022 epitop te RBD na koji je vezan epitop.

Ovi podaci zajedno pokazuju kako je pomoću NMR-a moguće utvrditi i preboljenje bolesti COVID-19 kod pojedinaca kod kojih se sumnja da su bili u kontaktu s virusom. Također postoji mogućnost praćenja promjena u kemijskom pomaku kompleksa epitopa i RBD nakon mutacije virusa (Schoenle i sur., 2021).

U radu Vincenzi i Leone (2021) prikazano je kako se NMR metoda može uspješno koristiti i za detekciju HIV virusa, hepatitisa C, hepatitisa B, Herpes simplex virusa i drugih koronavirusa (MERS, SARS-CoV), a u radu Masuda i sur. (2021) dokazana je osjetljivost NMR metode prema

detekciji SARS-CoV-2 virusa od 100% i specifičnost od 82%. Prosječno vrijeme potrebno za pripremu i analizu uzorka je 28 minuta (Masuda i sur., 2021).



Slika 5. Preklapljeni 2D [^1H , ^{15}N] TROSY spektri (^2H , ^{15}N)- obilježenog SARS-CoV-2 RBD u prisutnosti (crveno) i odsutnosti (crno) CR3022 epitopa (*lijevo*), zabilježene perturbacije kemijskih pomaka na površini RBD prema boji (od svijetlosive na područjima gdje nisu zabilježene promjene kemijskih pomaka prema purpurnoj gdje su zabilježene najznačajnije promjene), područja označena crnom bojom predstavljaju regije s nedodijeljenim aminokiselinama (*desno*) (preuzeto i prilagođeno iz Schoenle i sur., 2021).

2.3.3. Masena spektrometrija

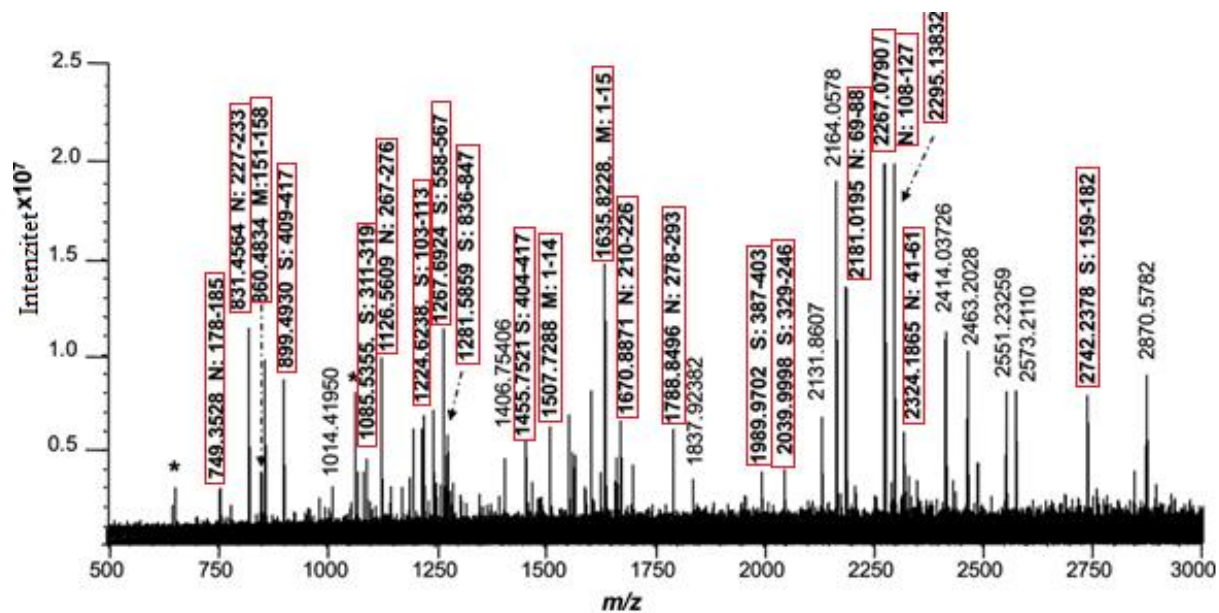
Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika u kojoj se generiraju ioni iz anorganskih ili organskih spojeva, razdvajaju prema njihovim omjerima mase i naboja (m/z) te potom kvalitativno ili kvantitativno određuju (Klarić, 2018). Maseni spektrometar je instrument koji ionizira molekule u visokom vakuumu pretvarajući ih u pozitivne (rijetko negativne) ione. Osim ionizacije, događa se i fragmentacija nastalih iona. Fragmenti mogu biti nabijeni i nenabijeni, a u masenom spektrometru detektiraju se samo pozitivno nabijeni fragmenti. Nastale pozitivno nabijene čestice zatim se ubrzavaju djelovanjem električnog polja u akceleratoru te se usmjeravaju na analizator koji razdvaja ione u prostoru i/ili vremenu. Naposljetku, razdvojeni ioni dolaze u detektor gdje proizvode električni signal koji se može registrirati na računalu i generira se maseni spektar (Đaković, 2021).

Ionizacija molekula može se provesti pomoću više različitih metoda: ionizacijom elektronima (eng. *Electron Ionization*, EI), kemijskom ionizacijom (eng. *Chemical Ionization*, CI), foto-ionizacijom (eng. *Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI), elektroraspršenjem (eng. *Electrospray Ionization*, ESI), matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom (eng. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI), bombardiranje brzim atomima (eng. *Fast Atom Bombardment*, FAB) i brojnim drugima (Đaković, 2021).

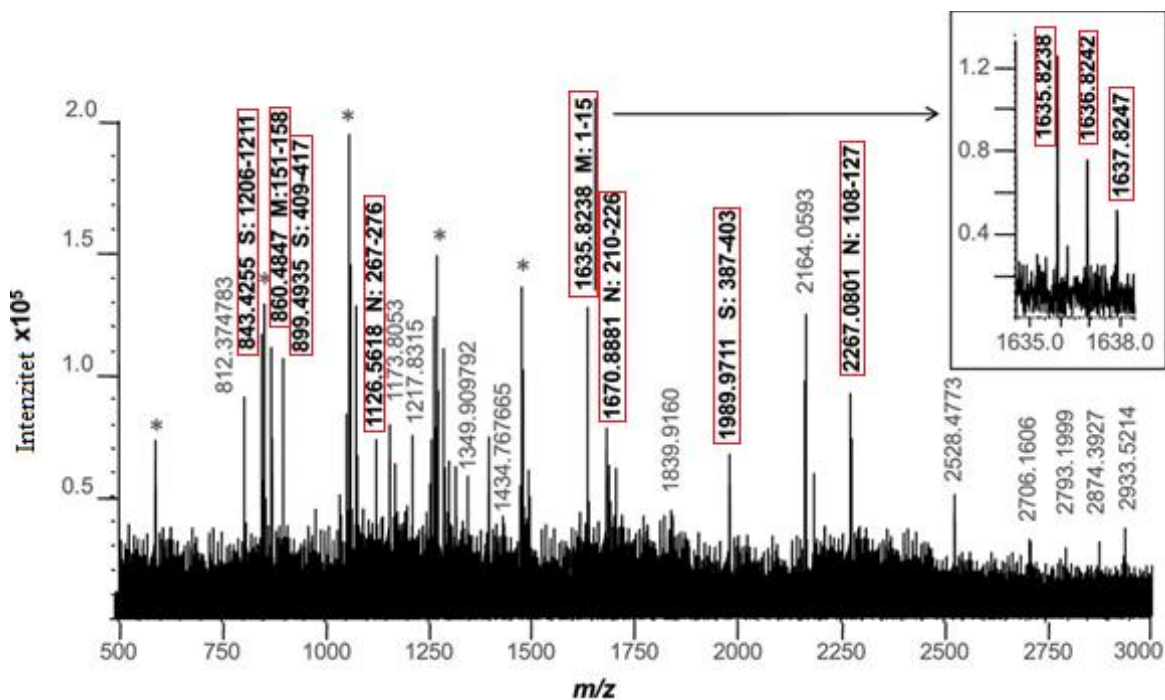
Nakon generiranja iona, potrebno ih je odijeliti prema njihovom omjeru mase i naboja, m/z , u analizatoru masa. U analizatore masa ubrajaju se kvadrupolni analizatori, analizatori s magnetnim sektorom, kvadrupolne stupice za ione, analizatori vremena proleta te Fourier-transformirana MS stupica za ione.

Masenom spektrometrijom moguće je odrediti peptidne ione virusnih proteina. Molekulske mase proteina virusa SARS-CoV-2 su 141.2 kDa (S-protein), 45.6 kDa (N-protein), 25.1 kDa (M-protein) i 8.4 kDa (E-protein). Unutar virusne čestice, M-protein i N-protein nalaze se u najvećem broju kopija, po 2000 i 1000 kopija. S-protein se nalazi u 300 kopija koje su organizirane u 100 trimera na površini virusne čestice, a E-protein se nalazi u samo dvadesetak kopija po čestici. Zahvaljujući većem broju proteinskih kopija u masenom spektru uglavnom se detektiraju signali M-, N-, ili S-proteina, dok se E-protein rjeđe detektira zbog svoje slabe ekspresije. Korištenjem MALDI-MS potvrđen je jedinstveni peptidni otisak SARS-CoV-2 u uzorcima nazofaringealnog brisa i u uzorcima staničnih kultura zaraženih virusom. Uzorcima je prije mjerenja dodan polietilenglikol (PEG), a zatim se dodaje tripsin koji će započeti razgradnju proteina. Uzorci se zatim unose u maseni spektrometar koji generira spektar (Dollman, Griffin i Downard, 2020).

Na masenom spektru uzorka stanične kulture zaražene SARS-CoV-2 virusom, unutar raspona m/z omjera od 500 do 3000 otkriveni peptidi čine 27%, 27% i 12% svih mogućih proteina za nukleokapsidu, membranu ili S-protein što omogućuje nedvosmislenu identifikaciju virusa (slika 6) (Dollman, Griffin i Downard, 2020). Primjerice, neki od najintenzivnijih signala na masenom spektru mogu se pripisati upravo peptidima koji potječu iz SARS-CoV-2 kao što su signal na 1635.8228 m/z koji potječe od M-proteina ili signal na 2267.0790 m/z koji potječe od proteina nukleokapside.



Slika 6. MALDI maseni spektar svih peptidnih iona uzoraka stanične kulture zaražene SARS-CoV-2 virusom. Peptidni ioni koji pripadaju dijelovima proteina nukleokapside (N), membrane (M) i glikoproteina S označeni su crvenom bojom (preuzeto i prilagođeno iz Dollman, Griffin i Downard, 2020).



Slika 7. MALDI maseni spektar uzoraka nazofaringealnog brisa. Prikazani su produkti nakon obrade tripsinom (preuzeto i prilagođeno iz Dollman, Griffin i Downard, 2020).

U tablici 1. pobrojane su domene virusnih proteina koje je moguće detektirati na masenom spektru u rasponu m/z omjera od 500 do 3000 u kojem su i snimljeni maseni spektri.

Tablica 1. Peptidni ioni viralnih proteina, njihove sekvence i domena kojoj pripadaju (Dollman, Griffin i Downard, 2020).

m/z eksperimentalno	m/z teorijski	virusni protein	aminokiselinski ostaci	sekvenca	domena
749.3528	749.3536	N	178-185	GGSQASSR	RNA-vezujuća domena
831.4564	831.4570	N	227-233	LNQLESK	dimerizacijska domena
843.4255	843.4247	S	1206-1211	YEQYIK	uključuje HR2 domenu
860.4834	860.4849	M	151-158	IAGHHLGR	nedefinirano
899.4930	899.4945	S	409-417	QIAPGQTGK	C-terminalna domena S1 podjedinice
1085.5355	1085.5374	S	311-319	GIYQTSNFR	nedefinirano
1126.5609	1126.5640	N	267-276	AYNVTQAFG R	dimerizacijska domena
1244.6238	1224.6259	S	103-113	GWIFGTTLDS K	N-terminalna domena S1 podjedinice
1267.6924	1267.6946	S	558-576 (1)	KFLPFQQFGR	nedefinirano
1281.5859	1281.5892	S	836-847	QYGDCLGDI AAR	fuzijski peptid S2 podjedinice
1455.7521	1455.7550	S	404-417	GDEVQRQIAP GQTGK	C-terminalna domena S1 podjedinice
1507.7288	1507.7308	M	1-14	MADSNGTIT VEELK	površinska viralna regija
1635.8228	1635.8258	M	1-15 (1)	MADSNGTIT VEELKK	površinska viralna regija
1670.8871	1670.8894	N	210-226	MAGNGGDA ALALLLLDR	nedefinirano

1788.8498	1788.8511	N	278-293	GPEQTQGNF GDQELIR	dimerizacijska domena
1989.9702	1989.9738	S	387-403	LNDLCFTNV YADSFVIR	RBD S1 podjedinice
2039.9985	2040.0007	S	329-346	FPNITNLCPF GEVFNATR	RBD S1 podjedinice
2181.0195	2181.0207	N	69-88	GQGVPIINTNS SPDDQIGYY R	RNA-vezujuća domena
2267.0790	2267.0207	N	108-127	WYFYLLGTG PEAGLPYGA NK	N-terminalna domena
2324.1865	2324.1894	N	41-61 (1)	RPQGLPNNT ASWFTALTQ HGK	RNA-vezujuća domena
2742.2378	2742.2425	S	159-182	VYSSANNCT FEYVSQPFL MDLEGK	N-terminalna domena S1 podjedinice

Peptidni ioni na slici 7. imaju manji intenzitet od peptidnih iona na slici 6. jer potječu iz nazofaringealnog brisa gdje je manji viralni titar nego u uzorku stanične kulture. Iz najintenzivnijeg peptidnog signala pri m/z 1635.8238 (M-protein, aminokiselinskih ostataka 1-15) moguće je odrediti najnižu granicu detekcije virusa SARS-CoV-2 masenom spektrometrijom. Napravljeni su uzorci različitih razrjeđenja peptidnog iona iz spomenutog signala te je najmanja masa kod koje je virus detektiran iznosila 0.75 ng (Dollman, Griffin i Downard, 2020).

U istraživanju Renuse i sur. (2021) u uzorcima nazofaringealnog brisa detektirani su peptidi koji potječu od N-proteina SARS-CoV-2 virusa. Uzorci brisa nosa su nakon prikupljanja obrađeni tripsinom kako bi se proteini denaturirali na manje peptide. Metodom su detektirana 42 peptida koji potječu od proteina nukleokapside no za detekciju SARS-CoV-2 u uzorcima pratila se prisutnost dvaju peptida koji su imali najjače signale u masenom spektru, ANYNVTQAFGR ($m/z = 563.7856$) i QQTVTLLPAADLDDFSK ($m/z = 931.4807$). U istraživanju su korišteni uzorci s niskom (25), srednjom (29) i visokom (33) Ct-vrijednosti kako bi se usporedila osjetljivost metode pri različitim virusnim opterećenjima. Općenito, Ct-vrijednost (eng. *Cycle Threshold*) je broj koji pokazuje koliko je ciklusa PCR-a provedeno prije nego što je potvrđena prisutnost virusa

u uzorku. Što je manji Ct znači da je veće virusno opterećenje u uzorku, odnosno veći je broj kopija viralne RNA u uzorku (Rao i sur., 2020). U istraživanju je zaključeno kako je visina pikova oba ispitivana peptida u masenom spektru u korelaciji s virusnim opterećenjem, to jest Ct vrijednošću, u uzorcima. Drugim riječima, što su pikovi na spektru bili viši, to je bilo veće virusno opterećenje te se podaci o visini pika u spektru mogu koristiti i kao izvor informacija o virusnom opterećenju (Renuse i sur., 2021).

Singh i sur. (2020) su svojim istraživanjem pokazali kako je kvadrupolnom masenom spektrometrijom moguće utvrditi lažno negativne RT-PCR testove te otkriti prisutnost peptida karakterističnih za SARS-CoV-2 kod pojedinaca koji su asimptomatski preboljeli COVID-19. U istraživanju su koristili uzorke prikupljene nazofaringealnim i orofaringealnim brisom. Brisovi su otopljeni u viralnom transportnom mediju i inaktivirani inkubacijom s puferom za liziranje (25% gvanidinijev tiocijanat i 5% natrijev dodecil-sulfat) 20 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su zatim dalje pripremljeni prema protokolu opisanom u radu Singh i sur. (2020) i analizirani na Q-TOF masenom spektrometru. Na spektrometru su identificirani peptidi AIVSTIQRKYK i MDGSIIQFPN koji potječu od proteina replikaza poliprotein 1 ab, QIAPGQTGK, LIANQFNSAIGK, AHFPREGVFSNGTHWFVTQR i STNLVKNK koji potječu od S-proteina i ADETQALPQR koji potječe od N-proteina. Sekvence ovih peptida su uspoređene s bazom podataka GISAID u kojoj se nalaze sekvence od preko 54 000 sojeva SARS-CoV-2 te je utvrđeno da su ove sekvence identične u različitim sojevima SARS-CoV-2 virusa i da predstavljaju konzervirane regije. Između ovih peptida, AIVSTIQRKYK i QIAPGQTGK su davali najznačajnije signale na masenim spektrima tako da je njihova prisutnost u spektru korištena kao naznaka pozitivnog testa na COVID-19. Osim ovih peptida, u spektru se pratila prisutnost i koncentracija peptida albumina iz krvnog seruma, AEFAEVSK, koji je bio kontrola količine proteina u uzorku. Ukoliko je zabilježena niska koncentracija proteina u uzorku, ne može se sa sigurnošću potvrditi da je taj test pozitivan ili negativan te je potrebno provesti dodatna ispitivanja ili prikupiti novi uzorak (Singh i sur., 2020).

Mjerenja izvršena masenim spektrometrom uspoređena su s rezultatima dobivenim RT-PCR metodom. Ovom metodom su detektirani pikovi peptida na spektrima pojedinaca koji su preboljeli COVID-19 i imaju negativan RT-PCR test što ukazuje na to da su bili u kontaktu s virusom. Otkriveni su pikovi peptida i u uzorcima pojedinaca koji su pokazivali simptome bolesti COVID-19, ali se RT-PCR test pokazao negativnim. Nakon ponavljanja RT-PCR testa u nekim

slučajevima se ipak pokazalo kako je uzorak bio pozitivan na SARS-CoV-2 što pokazuje kako je metoda masene spektrometrije jako osjetljiva i može se koristiti za dijagnosticiranje COVIDA-19. Ova metoda osim mjerenja same prisutnosti prethodno navedenih peptida mjeri i intenzitet tih peptida u spektru pa ako je utvrđeno da neki uzorak koji je RT-PCR pozitivan ima slab intenzitet u masenom spektru to može ukazivati na lažno pozitivni RT-PCR test (Singh i sur.,2020).

Važno je naglasiti da je za analizu virusom zaraženog uzorka masenom spektrometrijom važno sačuvati netaknute virusne proteine, a potrebno je inaktivirati virusni genetski materijal, to jest RNA da bi virus izgubio svoju virulentnost. Ovaj efekt je moguće postići ozračivanjem uzoraka UV-C zrakama do 15 minuta. Osim inaktivacije virusa, potrebno je iz uzorka ukloniti neželjene tvari kao što su proteini prisutni u ljudskim biološkim sekretima. Taloženje acetonom pri sniženim temperaturama pokazalo se kao posebno učinkovita metoda za odvajanje neželjenih molekula (Iles i sur., 2020). Prije stavljanja uzorka u maseni spektrometar potrebno je denaturirati velike komplekse molekula kako bi se virusni proteini oslobodili i otopili u otapalu za analizu. Za to se obično koriste puferi za denaturiranje koji sadrže tripsin (Iles i sur., 2020; Singh i sur., 2020).

Prednosti masene spektrometrije u detekciji virusa SARS-CoV-2 su jednostavnost uzimanja uzorka, brzina analize i značajno smanjeni troškovi testiranja. Metoda masene spektrometrije može se koristiti u bilo kojem laboratoriju opremljenom s masenim spektrometrom, a upravo trošak njegove nabave čini najveći trošak primjene ove metode. No bez obzira na velike kapitalne troškove, reagensi potrebni za analizu uzorka iznose manje od 1\$ po uzorku, a oprema za uzorkovanje (epruvete za skupljanje uzoraka, injekcije) manje od 5\$. Prema ovim podacima, nakon višegodišnjeg korištenja masenog spektrometra cijena analize po uzorku bi iznosila približno 2\$ (Iles i sur., 2020).

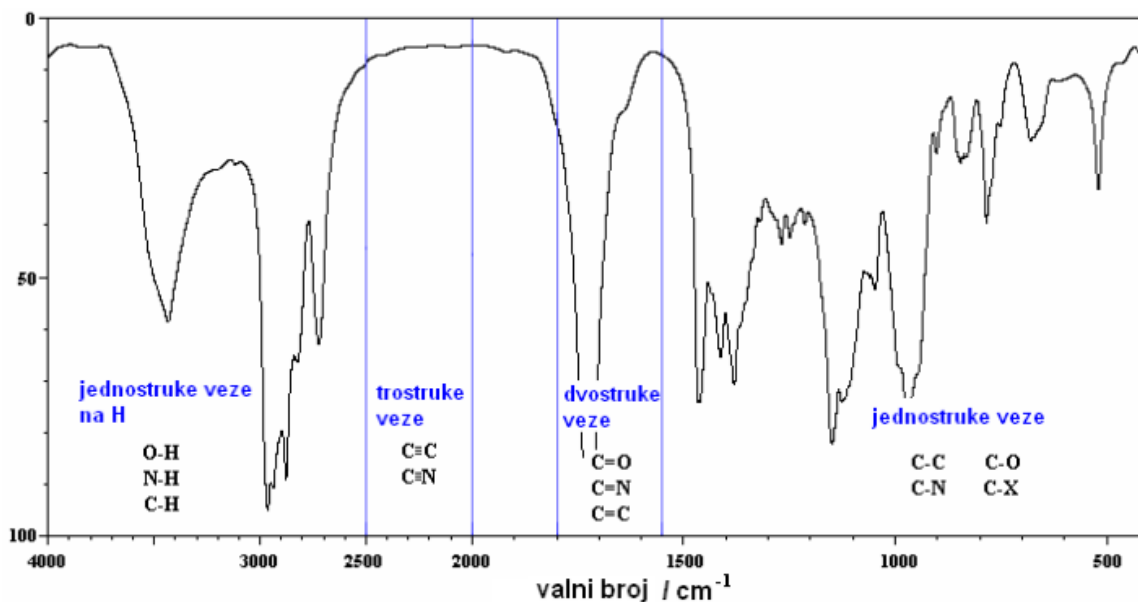
2.3.4. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija (eng. *Infrared Spectroscopy*, IR) metoda je koja koristi infracrveno područje ($800-10^6$ nm) elektromagnetskog spektra za određivanje funkcijskih skupina u organskom spoju. Kovalentne veze u molekulama konstantno vibriraju i ponašaju se poput opruge. Razlikujemo rastezne vibracije koje se događaju uz samu liniju veze uzrokujući promjenu duljine veze i deformacijske vibracije koje se ne događaju uzduž veze, ali uzrokuju promjenu veznog kuta, odnosno svijanje veze. Razlikujemo dvije vrste rasteznih vibracija, simetrične i asimetrične te dvije vrste deformacijskih vibracija, ravninske i neravninske. Svaka se rastezna ili

deformacijska vibracija pojedine kovalentne veze u molekuli događa pri određenoj karakterističnoj frekvenciji. Kada se molekula podvrgne zračenju frekvencije koja točno odgovara frekvenciji jedne od spomenutih vibracija veze, dolazi do apsorpcije energije i veze jače vibriraju. Da bi određena vibracija veze apsorbirala infracrveno zračenje, veza mora biti polarna (imati određeni dipolni moment) (Kovač, 2021). Umjesto valne duljine, u IR-spektroskopiji koristi se valni broj ($\tilde{\nu}$) izražen u cm^{-1} koji predstavlja omjer frekvencije i brzine svjetlosti te je recipročan valnoj duljini. Valni broj je izravno proporcionalan frekvenciji vala, a time i energiji fotona dane frekvencije (Kovač, 2021).

IR-spektroskopija može se koristiti za ispitivanje široke skupine uzoraka, uključujući uzorke u plinovitom, tekućem i krutom stanju, a priprema uzorka će ovisiti o njegovim karakteristikama. Također, važno je voditi računa o valnoj duljini infracrvenog zračenja koju uzorak najbolje apsorbira jer pri toj valnoj duljini uzorak neće transmitirati infracrveno zračenje te ga detektor neće moći registrirati i generirati spektar (Ismail, van de Voort i Sedman, 1997).

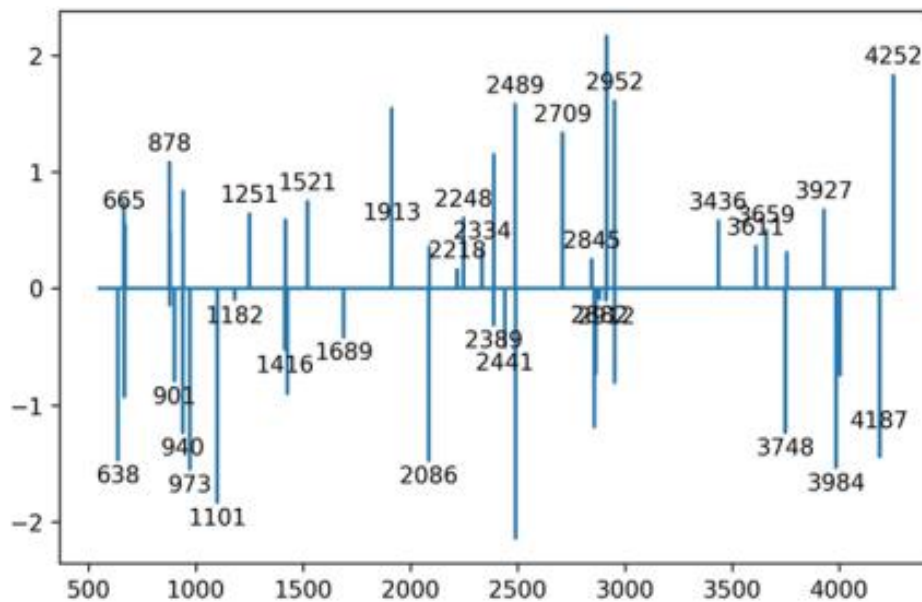
IR-spektri prikazuju ovisnost postotka apsorpcije o valnom broju zračenja. Prema valnim brojevima dijele se na dva područja, područje funkcijskih skupina od 4000 do 1400 cm^{-1} i područje otiska prsta od 1400 do 400 cm^{-1} (Kovač, 2021). Položaj, intenzitet i oblik pojedine vrpce u području funkcijskih skupina karakterističan je za svaku vrstu funkcijske skupine u spoju (slika 8), dok je područje otiska prsta karakteristično za svaki pojedini spoj (Ivić, 2021). Prilikom tumačenja spektra važan je iznos valnog broja, intenzitet i oblik signala.



Slika 8. IR-spektar karakterističnih funkcijskih skupina (Gazivoda Kraljević).

Kitane i sur. (2021) razvili su FTIR metodu za detekciju SARS-CoV-2 u uzorcima ekstrakta RNA. U usporedbi s RT-PCR, ova metoda je puno brža (za detekciju nakon faze ekstrakcije RNA potrebna je 1.5 minuta u usporedbi s dva do četiri sata koliko je potrebno da se obavi PCR analiza), ne zahtijeva primjenu reagensa i stvara se manje biološki opasnog otpada. Ispitivanje ove metode provedeno je u dva dijela; u jednom dijelu ispitala se osjetljivost, specifičnost i točnost, a u drugom se dijelu ispitala minimalna granica detekcije i selektivnost u detekciji u odnosu na 15 drugih respiratornih virusa. Uzorci nazofaringealnog brisa ispitanika (SARS-CoV-2 pozitivni i SARS-CoV-2 negativni) prikupljeni su u sterilne epruvete u kojima se nalazio medij za transport virusa te se pristupilo ekstrakciji RNA pomoću ekstrakcijskog seta. Uzorcima su snimljeni FTIR spektri no bez obrade nisu pokazivali značajne informacije o prisutnosti virusa stoga je izračunata druga derivacija spektara. Također je zapaženo da odabir raspona valnih brojeva pri kojima se snima spektar uzorka igra važnu ulogu u učinkovitosti modela pa ukoliko se područje biološkog otiska prsta od 900 do 1800 cm^{-1} proširi na 600 do 4500 cm^{-1} , točnost metode se poveća do 12.6% (Kitane i sur., 2021).

Analizom dobivenih spektara RNA iz SARS-CoV-2 pozitivnih i negativnih uzoraka uočene su tri domene signala: prva domena u rasponu od 600 do 1350 cm^{-1} , druga od 1500 do 1700 cm^{-1} i treća od 2300 do 3900 cm^{-1} (slika 9, tablica 2).



Slika 9. Prikaz obrađenog FTIR spektra uzorka s naznačenim valnim brojevima pripadajućih funkcijskih skupina (Kitane i sur., 2021).

Tablica 2. Popis valnih brojeva i pripadajućih vibracija funkcijskih skupina (Kitane i sur., 2021).

Valni broj (cm ⁻¹)	Vibracije
638, 665	Gvanin
878	Neravninske vibracije nukleobaza
901, 940	Fosfatna okosnica riboze
973	C-O i C-C riboze
1101	Simetrične vibracije veza P-O-C, RNA ν (C-O) iz riboze
1182	C-O i fosfatne vibracije
1251	P=O, PO ₂ ⁻ asimetrične vibracije
1416	Vibracije rastezanja veza C-N, N-H i C-H
1521	C nukleobaze u ss i ds RNA, sekundarni amid
1689	C ₆ =O ₆ gvanina u ds RNA, primarni amid, C=O gvanina i N-H deformacije, ν asimetrično(C ₂ =O) vibracije u RNA
1913, 2086	Veze drugog reda
2218, 2248, 2334, 2389, 2441, 2489, 2709, 2845, 2882, 2952	Vibracije rastezanja veza C-H i N-H
3611, 3436, 3659, 3748, 3927	Asimetrične vibracije veza N-H i O-H

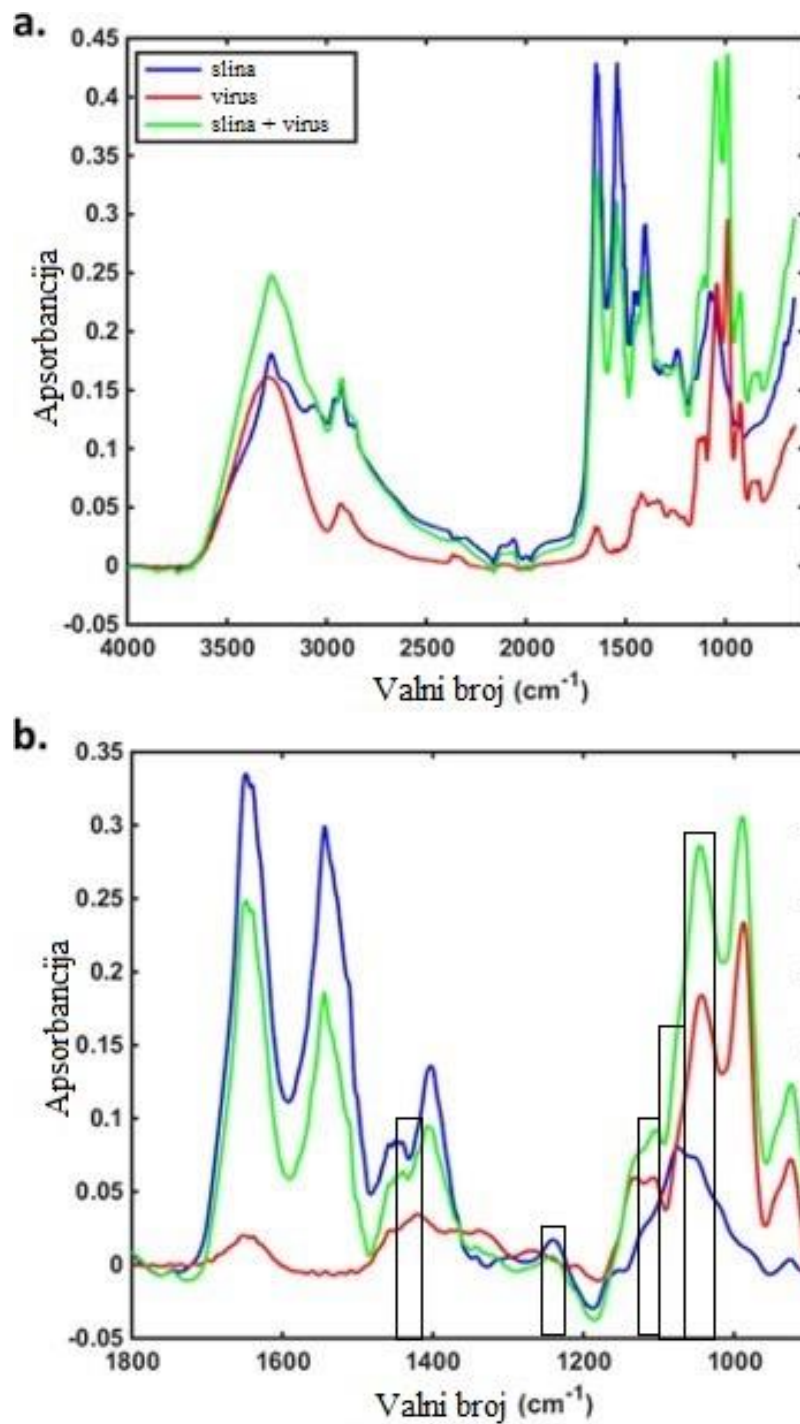
Prva domena je povezana s vibracijama fosfatne okosnice (ν P-O), i sadrži signale na 1000 do 1182 cm⁻¹ koji potječu od simetričnih rasteznih vibracija PO₂⁻ i signale pripisane rasteznim vibracijama ν C-O fosfodiestera i riboze. Područje od 1200 do 1300 cm⁻¹ može se pripisati PO₂⁻ asimetričnim rasteznim vibracijama unutar RNA, a područje od 1500 do 1700 cm⁻¹ RNA nukleobazama no također se poklapa s nizom signala koji se obično pripisuju primarnim i sekundarnim amidima. Područje od 2400 do 3900 cm⁻¹ podudara se s rasteznim vibracijama OH, NH i CH skupina. Zajedno, ovi podaci podudaraju se s tipičnim otiskom RNA molekula u IR spektrima što potvrđuje točnost ove metode (Kitane i sur., 2021).

Kako bi se utvrdila selektivnost ove tehnike prema SARS-CoV-2 u odnosu na druge viruse, ispitivani su uzorci koji su sadržavali cjelokupan genom SARS-CoV-2 i uzorci koji su sadržavali cjelokupan genom humanog bokavirusa, koronavirusa (229E, NL63, OC43, MERS, SARS-CoV),

eneterovirusa 68, humanog influenza virusa (A, B, H3N2), humanog parainfluenza virusa (1 i 4) i rinovirusa 89. Utvrđeno je da ova metoda ima visoku viralnu selektivnost čak i u prisutnosti strukturno vrlo sličnih RNA virusa i da se testiranja podudaraju s rezultatima RT-PCR testova koji su korišteni kao kontrole (Kitane i sur., 2021). Minimalna granica detekcije virusa SARS-CoV-2 u uzorcima RNA ekstrakta ispitana je korištenjem sintetičkih i kliničkih uzoraka različitih koncentracija, od 0,5 do 25 kopija po μl i utvrđeno je kako je minimalna granica detekcije 10 kopija po μl za oba uzorka (Kitane i sur., 2021).

Barauna i sur. (2021) razvili su ATR-FTIR metodu (eng. *Attenuated Total Reflection*, prigušena totalna refleksija) za detekciju prisutnosti SARS-CoV-2 virusa u uzorcima brisa sline. Uzorcima se snimao spektar u rasponu od 4000 do 650 cm^{-1} . Na slici 10. prikazani su spektri uzorka sline, čistog virusa te uzorka sline u koji je dodan virus inaktiviran γ -zračenjem. Virus uzrokuje modifikacije spektra uzorka sline te se vide jasne razlike na spektru, a najviše pri sljedećim valnim brojevima: 1429 cm^{-1} (karakterističan za vibracije veza unutar polisaharida), 1220 cm^{-1} (karakterističan za asimetrične rastezne vibracije PO_2^- u RNA i DNA), 1084 cm^{-1} (karakterističan za asimetrične rastezne vibracije nukleinskih kiselina), 1069 cm^{-1} (karakterističan za C-O rastezne vibracije u ribozi) i 1041 cm^{-1} (karakterističan za PO_2^- rastezne vibracije u nukleinskim kiselinama). Sve apsorpcijske vrpce, osim one pri 1429 cm^{-1} , pojačanog su intenziteta u uzorcima koji su COVID-19 pozitivni te se pretpostavlja da su oni povezani s odgovorom organizma na infekciju virusom, dok je pik na 1429 cm^{-1} povezan sa samim virusom. Apsorpcijske vrpce koje su odgovorne za spektroskopski otisak virusa pripadaju vibracijama veza unutar nukleinskih kiselina, dok vrpce koje pripadaju vibracijama veza unutar primarnih i sekundarnih amida su karakteristični samo za slinu i ne nalaze se u virusu što je zanimljivo jer su amidne grupe prisutne u proteinima te su očekivane i u spektru virusa zbog njegovih dominantnih S-proteina. Analizom ovih apsorpcijskih vrpca moguće je na spektru odrediti u kojim uzorcima je uz slinu prisutan i virus.

U uzorcima sline, prema Wood i sur. (2021) osim pojačanih intenziteta apsorpcijskih vrpca vezanih za vibracije veza u primarnim i sekundarnim amidima može se uočiti i pik tiocijanata na 2059 cm^{-1} .



Slika 10. Spektar uzorka slina, čistog virusa i slina u kojoj je dodan virus: (a) neobrađeni spektar, (b) obrađeni spektar (preuzeto i prilagođeno iz Barauna i sur., 2021).

Prilikom provođenja metode prigušene totalne refleksije (ATR), uzorci se moraju osušiti prije nanošenja na unutarnji refleksijski element kako bi se omogućila maksimalna apsorpcija

zračenja i kako bi se smanjio broj H-O-H vibracija veza u spektru s obzirom da je uzorak sline 99% sačinjen od vode (Sánchez-Brito i sur., 2021). Nakon mjerenja, uzorci se moraju obrisati s unutarnjeg refleksijskog elementa što povećava mogućnost transmisije virusa preko površine ili aerosolom te ovo predstavlja negativne strane ATR metode (Wood i sur., 2021).

Prema istraživanju Wood i sur. (2021) u spektrima uzoraka sline uočeni su pikovi koji se povezuju s viralnim proteinima, lipidima koji okružuju nukleokapsidu te pikovima koji su povezani s vibracijama u RNA i uglavnom odgovaraju valnim brojevima vibracija tih veza po istraživanju Kitane i sur. (2021), no uz njih su uočeni i pikovi koji su povezani uz viralni transportni medij ili medij za fiksaciju uzorka za mjerenje što treba uzeti u obzir pri analizi spektara.

Općenito, metoda infracrvene spektroskopije do sada se pokazala kao korisna u otkrivanju promjena u različitim tipovima raka, Parkinsonove bolesti, dijabetesa (Paluszkiwicz i sur., 2020; Wang i sur., 2020; Scott i sur., 2010), ali i u dijagnozi *Plasmodium sp.* bakterija u krvi ili virusa hepatitisa B i C u krvnom serumu (Heraud i sur., 2019; Roy i sur., 2019).

U usporedbi s RT-qPCR testovima na SARS-CoV-2, infracrvena spektroskopija je pokazala osjetljivost detekcije od prosječno 95% i specifičnost metode od prosječno 89.8% (prema Wood i sur., 2021; Barana i sur., 2021; Kitane i sur., 2021). Za samo mjerenje, uključujući i sušenje uzorka, je potrebno u prosjeku 15 minuta što je u usporedbi sa prosječnih 24 do 48 sati koliko je potrebno za cjelokupno provođenje PCR metode znatno kraće (Sánchez-Brito i sur., 2021).

3. Zaključak

Zbog nekontroliranog i brzog globalnog širenja virusa SARS-CoV-2 pojavila se potreba za brzom i pouzdanom detekcijom virusa. Zbog mana koje prate najčešće korištenu RT-qPCR metodu (dugotrajan postupak i skupi reagensi te mogućnost pojave lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata), bilo je potrebno naći alternativne metode detekcije te su se spektroskopske metode pokazale obećavajućim.

Spektroskopske metode ubrajaju se u metode analitičke kemije i koriste se za dobivanje informacija o kemijskom sastavu i strukturi tvari. U ovom radu opisana je primjena nuklearne magnetske rezonancije, masene spektrometrije i infracrvene spektroskopije u detekciji SARS-CoV-2.

- ✓ U NMR metodi, pojačani intenzitet signala *N*-acetilnih skupina iz različitih glikoproteina, L1-L4 triglicerida, VLDL fosfolipida te omjer B100 i A1 karakterizirali su uzorke COVID-19 pozitivnih ispitanika, dok su pojačani signali supramolekulskih fosfolipida, HDL kolesterola, A1 i A2 lipoproteina i HDL fosfolipida karakterizirali COVID-19 negativne ispitanike.
- ✓ Masenom spektrometrijom moguće je detektirati prisutnost peptidnih iona viralnih proteina koji uglavnom potječu iz M-, N-, ili S-proteina. Također, moguće je pratiti utjecaj Ct-vrijednosti na osjetljivost metode, otkriti lažno negativne RT-qPCR testove te utvrditi utjecaj koncentracije proteina na pouzdanost detekcije.
- ✓ U IR-spektrima prisutnost SARS-CoV-2 u uzorcima očitava se pojavom apsorpcijskih vrpca vibracija veza fosfatne okosnice iz virusne RNA te vibracija RNA nukleobaza. COVID-19 negativni uzorci pokazuju apsorpcijske vrpce vezane uz vibracije veza primarnih i sekundarnih amida koji nisu uočeni u spektrima COVID-19 pozitivnih uzoraka.

4. Literatura

Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. RH (2005) Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **5(2)**: 209-219.

Barauna A. G., Singh M. N., Barbosa L. L., Marcarini W. D., Vassallo P. F., Mill J. G., Ribiero-Rodrigues R., Campos L. C. G., Warnke P. H., Martin F. L. (2021) Ultrarapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Infection Using Simple ATR-FTIR Spectroscopy and an Analysis Algorithm: High Sensitivity and Specificity. *Anal. Chem.* **93**: 2950-2958.

Barišić L. (2021) Nuklearna magnetska rezonancija. Nastavni materijal preuzet s Merlina.

Biophysical Society (2020) Coronavirus Structure, Vaccine and Therapy Development, <<https://www.biophysics.org/blog/coronavirus-structure-vaccine-and-therapy-development>> Pristupljeno 12. Svibnja 2022.

Dollman N. L., Griffin J. H., Downard K. M. (2020) Detection, Mapping, and Proteotyping of SARS-CoV-2 Coronavirus with High Resolution Mass Spectrometry. *ACS Infect Dis.* **6**: 3269-3276.

Đaković S. (2021) Masena spektrometrija. Nastavni materijal preuzet s Merlina.

Gvazivoda Kraljević T., Određivanje struktura organskih spojeva, nastavni materijal, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Hasöksüz M., Kiliç S., Saraç F. (2020) Coronaviruses and SARS-CoV-2. *Turk J Med Sci* **50**: 549-556.

Heraud P., Chatchawal P., Wongwattanakul M., Tippayawat P., Doerig C., Jearanaikoon P., Perez-Guaita D., Wood B. R., Malar. J. (2019) Infrared spectroscopy couples to cloud-based data management as a tool to diagnose malaria: a pilot study in a malaria-endemic country. *Malaria Journal* **18**: 348.

Horvat A. J. M. (2015) O nazivima spektrometrija i spektroskopija. *Kem. Ind.* **64**: 530-531

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2022) Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Pristupljeno 11. svibnja 2022.

Iles R. K., Zmuidinaite R., Iles J. K., Carnell G., Sampson A., Heeney J. L. (2020) Development of a Clinical MALDI-ToF Mass Spectrometry Assay for SARS-CoV-2: Rational Design and Multi-Disciplinary Team Work. *Diagnostic* **10**: 746.

Ismail A. A., van de Voort F. R., Sedman J. (1997) *Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Principles and Applications. Instrumental Methods in Food Analysis*, Elsevier, Amsterdam, str. 93-95.

Ivić P. (2021) *Primjena infracrvene spektroskopije u biotehnologiji i biomedicini (završni rad)*, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

John Hopkins University Medicine (2022), Coronavirus Resource Center <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>> Pristupljeno 21. kolovoza 2022.

Kazazić S., Martinović S. (2003) Kemijska ionizacija u spektrometriji masa. *Kem. Ind.* **53** (6): 265-272.

Kitane D. L., Loukman S., Marchoudi N., Fernandez-Galiana A., El Ansari F. Z., Jouali F., Badir J., Gala J., Bertsimas D., Azami N., Lakbita O., Moudam O., Benhida R., Fekkak J. (2021) A simple and fast spectroscopy-based technique for Covid-19 diagnosis. *Scientific Reports* **11**: 16740.

Klarić D. (2018) *Identifikacija kompleksnih spojeva lantanoida spektrometrijom masa (diplomski rad)*, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kovač M. (2021) *Infracrvena spektroskopija. Nastavni materijal preuzet s Merlina.*

Lodge S., Nitchke P., Kimhofer T., Wist J., Bong S., Loo R. L., Masuda R., Begum S., Richards T., Lindon J. C., Bermel L. W., Reinsperger T., Schaefer H., Spraul M., Holmes E., Nicholson J. K. (2021) Diffusion and Relaxation Edited Proton NMR Spectroscopy of Plasma Reveals a High-Fidelity Supramolecular Biomarker Signature of SARS-CoV-2 Infection. *Anal. Chem.* **93**: 3976-3986.

Masuda R., Lodge S., Nitchke P., Spraul M., Schaefer H., Bong S., Kimhofer T., Hall D., Loo R. L., Bizarguenaga M., Bruzzone C., Gil-Redondo R., Embade N., Mato J. M., Holmes E., Wist J., Millet O., Nicholson J. K. (2021) Integrative Modeling of Plasma Metabolic and Lipoprotein Biomarkers of SARS-CoV-2 Infection in Spanish and Australian COVID-19 Patient Cohorts. *J. Proteome Res.* **20**: 4139-4152.

Paluszkiwicz C., Pięta E., Woźniak M., Piergies N., Koniewska A., Ścierański W., Miołek M., Kwiatek W. M. (2020) Saliva as a first-line diagnostic tool: A spectral challenge for identification of cancer biomarkers. *Journal of Molecular Liquids* **307**: 112961.

Rao S. N., Manissero D., Steele V. R., Pareja J. (2020) A Systematic Review of the Clinical Utility of Cycle Threshold Values in the Context of COVID-19. *Infectious Diseases and Therapy* **9**: 573-586.

Roy S., Perez-Guaita D., Bowden S., Heraud P., Wood B. R. (2019) Spectroscopy goes viral: Diagnosis of hepatitis B and C virus infection from human sera using ATR-FTIR spectroscopy. *Clinical Spectroscopy* **1**: 100001.

Sánchez-Brito M., Mata-Miranda M. M., Martínez-Cuazitl A., López-Mezquita D., Guerrero-Ruiz M., Vázquez-Zapién G. J. (2021) Saliva analysis using FTIR spectroscopy to detect possible SARS-CoV-2 (COVID-19) virus carriers. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica* **42**: 6-9.

Schoenle M. V., Li Y., Yuan M., Clarkson M. W., Wilson I. A., Peti W., Page R. (2021) NMR Based SARS-CoV-2 Antibody Screening. *J. Am. Chem. Soc.* **143**: 7930-7934.

Scott D. A., Renaud D. E., Krishnasamy S., Meriç P., Buduneli N., Çetinkalp Ş., Liu K. Z. (2010) Diabetes-related molecular signatures in infrared spectra of human saliva. *Diabetology & Metabolic Syndrome* **2**: 2-9.

Singh P., Chakraborty R., Marwal R., Radhakrishnan V. S., Bhaskar A. K., Vashisht H., Dhar M. S., Pradhan S., Ranjan G., Imran M., Raj A., Sharma U., Singh P., Lall H., Dutta M., Garg P., Ray A., Dash D., Sivasubbu S., Gogia H., Madan P., Kabra S., Singh S. K., Agrawal A., Rakshit P., Kumar P., Sengupta S. (2020) A rapid and sensitive method to detect SARS-CoV-2 virus using targeted mass-spectrometry. *Journal of Proteins and Proteomics* **11**: 159-165.

Svetec I. K. (2021) Lančana reakcija polimerazom (PCR), Q-PCR i RAPD. Nastavni materijal preuzet s Merlina.

Tahamtan A., Ardebili A. (2020) Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **20(5)**: 453-454.

Vanderboom P. M., Maus A. D., Kemp J. V., Gurtner K. M., Madugundu A. K., Chavan S., Peterson J. A., Madden B. J., Mangalaparathi K. K., Mun D., Singh S., Kipp B. R., Dasari S., Singh

R. J., Grebe S. K., Pandey A. (2021) A mass spectrometry-based targeted assay for detection of SARS-CoV-2 antigen from clinical specimens. *EBioMedicine* **69**: 103465.

Vincenzi M., Leone M. (2020) The Fight against Human Viruses: How NMR Can Help? *Current Medical Chemistry* **28**: 4380-4453.

Wang M., Zhao R., Gao L., Gao X., Wang D., Cao J. (2020) SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**: 587269.

Wang X., Wu Q., Li C., Chou Y., Xu F., Zong L., Ge S. (2020) A study of Parkinson's disease patients' serum using FTIR spectroscopy. *Infrared Physics & Technology* **106**: 103279.

Williamson M. P. (2013) Using chemical shift perturbation to characterize ligand binding. *Elsevier* **73**: 1-16.

Wood B. R., Kochan K., Bedolla D. E., Salazar-Quiroz N., Grimley S. L., Perez-Guaita D., Bker M. J., Vongsvivut J., Tobin M. J., Bambery K. R., Christensen D., Pasricha S., Eden A. K., Mclean A., Roy S., Roberts J., A., Druce J., Williamson D. A., McAuley J., Catton M., Purcell D. F. J., Godfrey D. I., Heraud P. (2021) Infrared Based Saliva Screening Test for COVID-19. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**: 17102-17107

5. Prilog

Tablica 3. Popis kratice aminokiselina.

Aminokiselina	Kratice
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cistein	C
Glutamin	Q
Glicin	G
Glutamat	E
Histidin	H
Izoleucin	I
Leucin	L
Lizin	K
Metionin	M
Fenilalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Treonin	T
Triptofan	W
Tirozin	Y
Valin	V

Tablica 4. Popis kratica korištenih u radu.

ACE2	Angiotensin-Converting Enzyme 2	Angiotenzin-pretvorbeni enzim 2
APPI	Atmospheric Pressure Photoionization	Foto-ionizacija
CD	Connector Domain	Domena za povezivanje
CH	Central Helix	Središnja uzvojnica
CI	Chemical Ionization	Kemijska ionizacija
CT	Cytoplasmic Tail	Citoplazmatski rep
Ct	Cycle threshold	Prag ciklusa
E	Envelope protein	Protein ovojnice
EI	Electron Ionization	Ionizacija elektronima
ESI	Electrospray Ionization	Ionizacija elektroraspršenjem
FAB	Fast Atom Bombarding	Bombardiranje brzim atomima
FP	Fusion Peptide	Peptid za fuzioniranje
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Fourier transformirana infracrvena spektroskopija
GISAID	Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data	Globalna inicijativa za razmjenu podataka o ptičjoj gripi
GlycA	Glycoprotein A	Glikoprotein A
GlycB	Glycoprotein B	Glikoprotein B
HDL	High Density Lipoprotein	Lipoprotein visoke gustoće
HIV	Human Immunodeficiency Virus	Virus humane imunodeficijencije
HR1	Heptad Repeat 1	Regija sedmostrukog ponavljanja 1
HR2	Heptad Repeat 2	Regija sedmostrukog ponavljanja 2
IR	Infrared Spectroscopy	Infracrvena spektroskopija
M	Membrane protein	Protein membrane
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom

MERS-CoV	Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus	Bliskoistočni respiratorni sindrom-koronavirus
MS	Mass Spectrometry	Masena spektrometrija
N	Nucleocapside protein	Protein nukleokapside
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
NTD	N-terminal domain	N-terminalna domena
Q	Quadrupole Analyzer	Kvadrupolni analizator
RBD	Receptor Binding Domain	Domena za vezanje receptora
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction	Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja
S	Spike protein	Glikoprotein S koji nalikuje na šiljak
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome	Teški akutni respiratorni sindrom
SARS-CoV	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus	Teški akutni respiratorni sindrom-konoravirus
SPC-A	Supramolecular Phosphorus A	Supramolekulski fosfolipid A
SPC-B	Supramolecular Phosphorus B	Supramolekulski fosfolipid B
TM	Transmembrane Domain	Transmembranska domena
TROSY	Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy	Spektroskopija optimizirana poprečnom relaksacijom
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein	Lipoprotein jako niske gustoće

Izjava o izvornosti

Ja Mihaela Šakić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Mihaela Šakić

Vlastoručni potpis