

# Prevalencija SARS-CoV-2 varijanti od interesa u COVID-19 pacijenata liječenih u terciarnom bolničkom centru

---

Loparić, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:663677>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**LAURA LOPARIĆ**

**PREVALENCIJA SARS-CoV-2  
VARIJANTI OD INTERESA U COVID-19  
PACIJENATA LIJEČENIH U  
TERCIJARNOM BOLNIČKOM CENTRU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**LAURA LOPARIĆ**

**PREVALENCIJA SARS-CoV-2  
VARIJANTI OD INTERESA U COVID-19  
PACIJENATA LIJEČENIH U  
TERCIJARNOM BOLNIČKOM CENTRU**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2022.**

## ZAHVALE

*Zahvaljujem mentoru izv.prof.dr.sc.Domagoju Drenjančeviću, dr. med. spec. kliničke mikrobiologije na prihvaćanju mentorstva, uloženom trudu, izdvojenom vremenu i savjetima za vrijeme pisanja ovog diplomskog rada.*

*Posebno hvala prof. dr. sc. Ani Budimir, dr. med., spec. medicinske mikrobiologije s parazitologijom, Predstojnici Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb što mi je omogućila provedbu istraživanja na Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju, na savjetima i odgovorima na moja pitanja, kojih je bilo puno.*

*Hvala mojim dragim kolegama s Odjela za molekularnu mikrobiologiju na pomoći pri prikupljanju uzoraka potrebnih za provedbu istraživanja .*

*Dragim prijateljima, veliko hvala na pružanju podrške kada mi je trebala.*

*Mojem Romanu, hvala što si mi oslonac. Hvala za razumijevanje, potporu, ljubav, vjeru u mene i motivaciju da iskoristim sav svoj potencijal.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, roditeljima, baki Barici i Emi. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi, strpljenju, odricanju i svemu što ste mi pružili.*

Rad je ostvaren u Kliničkom zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Mentor rada: izv.prof.dr.sc.Domagoj Drenjančević, dr. med. spec. kliničke mikrobiologije

Rad ima: 27 listova, 6 tablica i 2 slike.

## SADRŽAJ

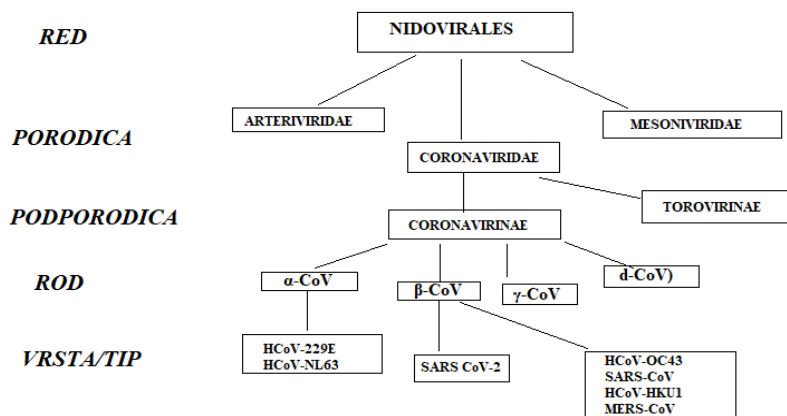
1. UVOD .....	1
1.1. Klasifikacija i građa koronavirusa .....	1
1.2. Umnažanje i prijenos virusa .....	2
1.3. Varijante SARS-CoV-2 .....	3
1.4. Patogeneza i klinička slika .....	4
1.5. Laboratorijska dijagnostika .....	5
2. CILJEVI RADA .....	7
3. MATERIJALI I METODE .....	8
3.1. Ustroj studije .....	8
3.2. Ispitanici .....	8
3.3. Metode .....	8
3.4. Statističke metode .....	9
4. REZULTATI .....	10
5. RASPRAVA .....	16
6. ZAKLJUČCI .....	19
7. SAŽETAK .....	20
8. SUMMARY .....	21
LITERATURA .....	23
ŽIVOTOPIS .....	27

## 1. UVOD

Koronavirusi su prvi put izolirani iz pilića 1937. godine, sfernog su oblika, pleomorfni, ovijeni. Naziv su dobili po svojem izgledu poput krune, a nju čine batićasti izdanci koji strše iz virusne ovojnice. Prvi otkriveni humani koronavirusi bili su uzročnici prehlade HCoV-229E i HCoV-OC43 (1). 2002. godine pojavio se SARS-CoV, virus koji uzrokuje Teški akutni respiratorni sindrom (SARS, prema engl. *Severe acute respiratory syndrome*), a 2012. godine MERS, uzročnik Bliskoistočnog respiratornog sindroma (MERS, prema engl. *Middle East Respiratory Syndrome*). U prosincu 2019. godine primijećen je velik broj pneumonija nepoznate etiologije u gradu Wuhan u Kini, izoliran je virus, te je sekvenciranjem virusnog genoma ustanovljeno da se radi o koronavirusu srodnom SARS-CoV. U veljači 2020. Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, prema engl. *World Health Organization*) imenovala je pneumoniju uzrokovanu novim koronavirusom Koronavirus bolest 2019 (engl. *Coronavirus Disease 2019- COVID-19*), a Međunarodni odbor za klasifikaciju virusa (ICTV, prema engl. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) objavio da je novi koronavirus nazvan SARS-CoV-2 (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), iako nije potomak SARS-CoV (2).

### 1.1. Klasifikacija i građa koronavirusa

Humani koronavirusi spadaju u carstvo *Riboviria*, red *Nidovirales*, porodica *Coronaviridae*. Potporodice su *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Prema genetičkim i antigenskim obilježjima koronavirusi su organizirani u četiri roda- *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus*. SARS-CoV-2 spada u rod *Betacoronavirusa* (Slika 1).



Slika 1. Klasifikacija koronavirusa; izvor: izradila autorica

Koronavirusi su vrlo raznolika skupina ovijenih jednolančanih RNA virusa (+ssRNA, prema engl. *Single-stranded RNA*). Organizacija SARS-CoV-2 slična je onoj kod drugih CoV-a i sastoji se uglavnom od otvorenih okvira za čitanje (engl. *open reading frame (ORF)*). Oko 67% genoma SARS-CoV-2 je ORF1ab. On kodira sintezu poliproteina u inficiranoj stanici. Ribonukleoprotein ima promjer od 10 do 20 nm i sadržava 4 do 6 strukturnih proteina. Neki od njih su: protein nukleokapside (N), matriks-protein (M), protein ovojnice (E), glikoprotein korona- izdanka (S-spike) (1). SARS-CoV-2 sadrži sva četiri navedena strukturna proteina i 16 nestrukturnih proteina. M, E i S su glikoproteini koji formiraju virusnu ovojnicu. Glikozilacija S proteina štiti specifične epitope na površini virusa od napada antitijela domaćina (3).

### 1.2. Umnažanje i prijenos virusa

Virus se veže za staničnu membranu interakcijom S (spike) proteina koronavirusa s receptorom na staničnoj membrani. Ti receptori su poznati za većinu koronavirusa i uključuju aminopeptidazu N za CoV-229E (ACE2, prema engl. *angiotensin-converting enzyme 2*) za SARS-CoV, SARS-CoV-2 i CoV-NL63, dipeptidil-peptidaza 4 (DPP4) za MERS-CoV. Ekspresija i tkivna distribucija ulaznih receptora posljedično utječu na tropizam i patogenost virusa (4). Virus ulazi u citoplazmu endocitozom, fuzijom virusne ovojnice i citoplazmatske



membrane. Nakon ulaska u stanicu virusna RNA se translatira i nastaje poliprotein. O RNA ovisna polimeraza rabi pozitivni lanac virusne RNA kao kalup za sintezu genoma. Replikacija se odvija u citoplazmi gdje se N-protein i novonastala virusna RNA udružuju i formiraju spiralnu nukleokapsidu. S-protein i M-protein se glikoziliraju, ali se M-protein ne prenosi dalje u staničnu membranu. Virusi dozrijevaju pupajući na endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu, te se oslobađaju fuzijom stanične membrane i vezikula s glatkom stijenkom u kojem se nalaze virusi (1).

SARS-CoV-2 se prenosi pretežno aerosolom kratkog dometa u zraku, te izravnim ili neizravnim kontaktom sa zaraznim respiratornim kapljicama. Koncentracija respiratornih kapljica i aerosola u zraku koji nose SARS-CoV-2 je obrnuto proporcionalna udaljenosti od Covid pozitivnog pacijenta. Kontakt s površinama koje se često dodiruju, zajedničkim predmetima i hranom kontaminiranim zaraznim respiratornim kapljicama vjerojatno predstavljaju drugi put prijenosa SARS-CoV-2 (5). Ostali putevi prijenosa uključuju fekalno-oralni put i kontakt s različitim tjelesnim tekućinama, kao što su urin, suze i majčino mlijeko (6).

### 1.3. Varijante SARS-CoV-2

Varijante (tj. virusne varijacije) nastaju kroz nukleotidne promjene koje se prirodno pojavljuju u virusnom genomu tijekom replikacije, pri čemu se te promjene događaju višom stopom u RNA virusima nego u DNA virusima (7).

WHO klasificira varijante SARS-CoV-2 u dvije vrste: varijante koje izazivaju zabrinutost (VOC, prema engl. *variants of concern*) i varijante od interesa (VOI, prema engl. *variants of interest*). Nekoliko VOC-eva proizašlo je iz izvornog soja divljeg tipa izoliranog u Wuhanu otkako je epidemija prvi put započela u prosincu 2019. VOC se smatraju varijante koje imaju povećanu prenosivost, povećanu virulenciju, otpornost na cjepivo ili stečeni imunitet od prethodne infekcije, te imaju sposobnost izbjeci dijagnostičku detekciju (8).

Alfa varijanta (B.1.1.7) prvi put je otkrivena krajem rujna 2020. i brzo je postala prevladavajući soj u Ujedinjenom Kraljevstvu (9). Beta (B.1.351) varijanta, prvi put otkrivena u listopadu 2020., postala je dominantni soj što je rezultiralo drugim valom u Južnoj Africi (10). U prosincu 2020. otkrivena je delta varijanta SARS-CoV-2 i uzrokovala drugi veliki val

pandemije u Indiji (11). Omicron varijanta (B.1.1.529) SARS-CoV-2 se iznimno kratkom roku proširila po cijelom svijetu i postala dominantna varijanta SARS-CoV-2, te je proglašena VOC-om od strane WHO (12). Prva poznata potvrđena infekcija B.1.1.529 („Omicron varijanta“) bila je iz uzorka prikupljenog 9. studenog 2021. u Južnoj Africi. Primijećeno je da rutinski testovi lančane reakcije polimerazom (PCR, prema engl. *polymerase chain reaction*) na SARS-CoV-2 nisu uspjeli otkriti S gen, ključnu metu u mnogim uzorcima virusa. Omicron varijanta ima više od 30 mutacija koji utječu na njegovu infektivnost i transmisiju, te nije izravan „potomak“ delta soja, nego se razvijao paralelno. Smatra se kako je nagli porast infekcija Omicron varijantom posljedica njegove sposobnosti da zarazi pacijente koji su prethodno preboljeli delta varijantu ili su cijepljeni (13). Omicron varijanta sastoji se od dvije glavne podvarijante, BA.1 i BA.2. BA.1 podvarijanta je češće otkrivena u početku, međutim, BA.2 s vremenom zamjenjuje BA.1 kao dominantnu podvarijantu epidemije u sve više zemalja (14).

#### 1.4. Patogeneza i klinička slika

Patogeneza COVID-19 je složena, ali se može opisati korištenjem tipičnih modela za tri glavna patološka procesa povezana s upalom – lokalne manifestacije klasične opće (kanonske) upale, akutne sistemske upale i kronične sistemske upale niskog intenziteta (15).

Koronavirusne infekcije zahvaćaju uglavnom respiratorni, nekad gastrointestinalni i rijetko živčani sustav čovjeka. Virus inficira cilijarne epitelne stanice u nazofarinksu, koje se oštećuju replikacijom virusa što potiče stvaranje kemokina i interleukina. To dovodi do pojave simptoma sličnih prehladi. Virus perzistira u dišnom sustavu 2 do 3 tjedna (1).

Zajedničko obilježje sva tri dobro poznata  $\beta$ -CoV, odnosno SARS-CoV-1 (uzročnik SARS-a), MERS-CoV i SARS-CoV-2, je da se mogu replicirati u donjim dišnim putevima i uzrokovati fatalne pneumonije (16). Vjerojatnost smrtnog ishoda naglo raste s razvojem sindroma akutnog respiratornog distresa (ARDS, prema engl. *Acute respiratory distress syndrome*) (17). U ovom slučaju širenje virusa u tijelu, hipoksija, ulazak produkata raspadanja tkiva u krvotok, patološka hiperaktivacija T stanica i makrofaga te intravaskularna aktivacija leukocita, sustava komplementa i hemostaze dovode do niza reanimacijskih sindroma koji su

patogenetski povezani sa sistemskom upalom (18). Čimbenici rizika za tešku bolest uključuju dob >50 godina i komorbiditet kao što su kardiovaskularna bolest, dijabetes i hepatitis (1).

Virus SARS-CoV-2 znatno je manje smrtonosan od SARS-CoV-1 ili MERS-CoV, ali se prenosi puno lakše i brže. Dugo razdoblje inkubacije i prisutnost asimptomatskih varijanti COVID-19, kao i visoka razina zaraznosti i prenosivosti, čine identifikaciju, praćenje i eliminaciju ove bolesti izazovnim (19).

Razdoblje inkubacije COVID-19 traje od tri do 14 dana i ovisi o imunološkom statusu (20). Tipični simptomi COVID-19 uključuju umor, groznicu, suhi kašalj, malaksalost, upalu grla, gubitak okusa i/ili mirisa, a u nekim slučajevima i kratkoću daha, proljev i karakteristične znakove virusne upale pluća (21).

Laboratorijski nalazi u COVID bolesti su limfopenija i povišene aminotransferaze (oštećenje jetre) (1).

### 1.5. Laboratorijska dijagnostika

Vrsta tehnologije na kojoj se temelji test ima značajan utjecaj na dijagnostičku izvedbu testa, uključujući osjetljivost, specifičnost, dinamički raspon, reproduktivnost, potrošnju reagensa, opremu, cijenu, propusnost i jednostavnost upotrebe (22). Uspješna identifikacija SARS-CoV-2 pripisuje se tehnologiji metagenomskog sekvenciranja sljedeće generacije (mNGS, prema engl. *Metagenomic Next Generation Sequencing*) (23). Testiranje nukleinske kiseline SARS-CoV-2 omogućuje rano otkrivanje pacijenata s COVID-19, dok se akutni i oporavljeni pacijenti mogu otkriti testovima na antitijela (24).

Molekularni testovi detektiraju prisutnost specifičnog genetskog materijala (npr. virusne RNA) u biološkom uzorku. U molekularne testove ubrajamo sekvenciranje sljedeće generacije (NGS, prema engl. *Next-generation sequencing*), lančanu reakciju polimeraze reverzne transkripcije (RT-PCR, prema engl. *reverse transcription–polymerase chain reaction*).

NGS je genomski tehnologija koja omogućuje istovremeno sekvenciranje tisuća do milijardi fragmenata nukleinskih kiselina i može identificirati genetski materijal iz potpuno različitih kraljevstava organizama (25). SARS-CoV-2 je najprije izoliran kao nepoznat virus u pet

pacijenata s COVID-19, a zatim je identificiran u dva bolesnika s COVID-19 korištenjem metagenomskog NGS-a (mNGS) (26).

Koristeći RT-PCR, virusna RNA može se reverzno transkriptirati u komplementarnu DNA koja se zatim umnožava korištenjem primera koji okružuju DNA sekvencu od interesa. Dijagnostički postupak RT-PCR-om brz i ima visoku specifičnost i jednostavnu kvantifikaciju; smatra se zlatnim standardom u dijagnostici SARS-CoV-2 (27). Postoji mogućnost pojave lažno negativnih rezultata ako je broj kopija virusa premali da bi se mogao kvantificirati. Broj kopija virusa varira ovisno o pacijentu, vrsti uzorka (npr. nos, grlo ili sputum), načinu uzorkovanja i danu nakon infekcije .

Imunološki testovi omogućuju otkrivanje SARS-CoV-2 antitijela, što pomaže u identificiranju prethodne infekcije i imuniteta, što je važno za epidemiološke studije i studije cjepiva, stalni nadzor i procjenu rizika zdravstvenih radnika. Nedavne studije pokazuju da SARS-CoV-2 IgM antitijela počinju ~7 dana nakon pojave simptoma i dostižu vrhunac 28. dana, dok IgG počinju ~10 dana nakon infekcije i dostižu vrhunac 49. dana (28). Ovi testovi uključuju enzimski imunološki sorbentni test (ELISA, prema engl. *enzyme-linked immune sorbent assay*), kemiluminiscencijski enzimski imunološki test (CLIA, prema engl. *chemiluminescence enzyme immunoassay*) i imunokromatografski test lateralnog protoka (LFIA, prema engl. *lateral flow immunochromatographic assay*). (29)

## 2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Pregled prevalencije različitih varijanti SARS CoV-2 u periodu od listopada 2021. do kraja travnja 2022. godine
2. Usporedba prevalencije varijanti SARS CoV-2 između pacijenata liječenih na COVID odjelu, ostalih bolničkih odjela, pacijenata zaprimljenih na hitni prijem i vanjskih pacijenata.
3. Usporedba rezultata dobivenih PCR testiranjem sa rezultatima dobivenim sekvenciranjem genoma virusa SARS CoV-2.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. *Ustroj studije*

Ova studija ustrojena je kao presječna studija (30).

#### 3.2. *Ispitanici*

U svrhu istraživanja pretražen je Bolnički informacijski sustav (BIS) Kliničkog bolničkog centra Zagreb radi izdvajanja pacijenata s pozitivnim nalazom PCR testa na SARS CoV-2 u periodu od listopada 2021. do svibnja 2022. godine. Korišteni su izolati pozitivnih obrisaka nazofarinksa vanjskih i bolničkih pacijenata testiranih u KBC Zagreb uzetih standardnom metodom sa Cp vrijednostima E gena, ORF1ab gena i N gena ispod 30,00. Ukupno je sakupljeno 372 uzoraka u periodu od listopada 2021. godine do svibnja 2022. godine.

#### 3.3. *Metode*

Uzorci briseva nazofarinksa i orofarinksa uzeti su standardnim metodama. Bris nazofarinska uzima se tankim plastičnim i vrlo savitljivim štapićem s vrhom od sintetičkog materijala, koji je hiperadsorptivan - tzv. „flocked“ obrisak, a bris orofarinksa debljim brisom. Brisevi su do obrade pohranjeni u sterilnu fiziološku otopinu.

Uzorci su rutinski obrađeni i testirani metodama molekularne mikrobiologije, RT-PCR za utvrđivanje prisutnosti SARS-CoV-2 virusnog genoma u uzorcima obrisaka nazofarinksa i orofarinksa. Virusna RNA dobivena je automatiziranom izolacijom na uređaju Genrui (Genrui Biotech Inc.) uz korištenje izolacijskog Kit-a, model NE-02A. Regije od interesa umnožene su RT-qPCR testom na uređaju Aria MX (Agilent Technologies) uz reagense za detekciju

ANDiS FAST SARS-CoV-2- qPCR Detection Kit, test na tri sekvence: E gen, ORF1ab gen i N gen.

Nakon utvrđenog pozitiviteta, po 30  $\mu$ L izolata virusne RNA uzoraka koji imaju cp vrijednost E gena, ORF1ab gena i N gena manje od 30, poslano je na Hrvatski zavod za javno zdravstvo (HZJZ) koji prikuplja takve uzorke iz cijele Republike Hrvatske te šalje na sekvenciranje u laboratorije koje je Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC, prema engl. *European Centre for Disease Prevention and Control*) za to zadužio. Sekvenciranje je odrađeno na instrumentu Illumina Genome Analyzer i analizirano na BioIT platformi.

Osim sekvenciranja, 197 uzoraka testirano je PCR Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII testom (Seegene) koji detektira tri mutacije specifične za Omicron varijantu: N501Y, HV69/70 del, E484A te RdRp gen na uređaju BIORAD; C1000 ThermalCycler (CFX96 Real-Time System). Rezultati sekvenciranja uspoređeni su sa rezultatima PCR testiranja.

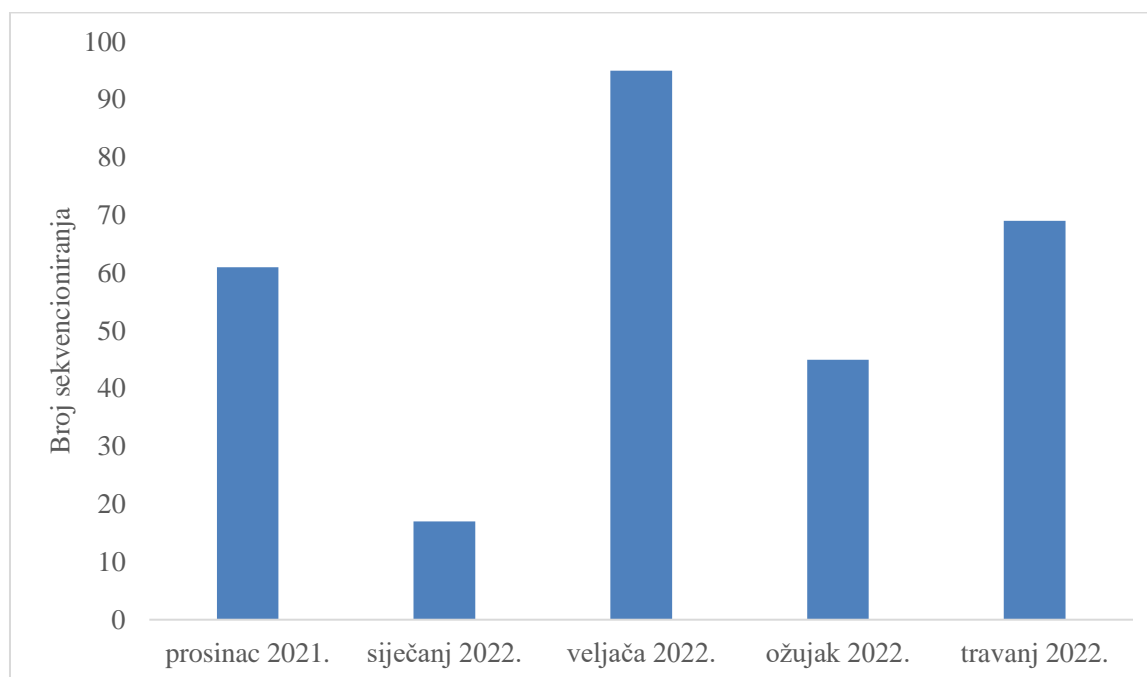
#### 3.4. Statističke metode

Kategorički podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Za testiranje razlika u kategoričkim podacima koristio se  $\chi^2$  test, a za testiranje podudaranja rezultata sekvenciranja genoma virusa SARS CoV-2 i PCR testiranja Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII testom koristio se McNemar – Bowkerov test. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom, a zbog razdiobe koja ne slijedi normalnu, podaci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Za testiranje razlika kontinuiranih varijabli koristili smo Kruskal Wallisov test. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na Alpha = 0,05. Za analizu podataka korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.100 (*MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022*).

#### 4. REZULTATI

Tijekom listopada 2021. godine ukupno je sekvencirano 85 genoma virusa SARS CoV-2, i svi su Delta varijanta. S obzirom na spol 37 (43,5 %) bolesnika je muškog, a 48 (56,5 %) ženskog spola. Medijan dobi bolesnika je 43 godine (interkvartilnog raspona od 29 do 65 godina) u rasponu od par mjeseci do 93 godine.

U razdoblju od prosinca 2021. do travnja 2022. godine ukupno je sekvencirano 287 genoma virusa SARS CoV-2. Najviše tijekom veljače 2022. godine, 95 (33,1 %), a najmanje, 17 (5,9 %) tijekom siječnja 2022. godine (Slika 2).



Slika 2. Broj sekvencioniranja genoma virusa SARS CoV-2 u razdoblju od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine

U tom razdoblju ukupno je sekvencirano 29 (10,1 %) genoma virusa SARS CoV-2 varijanta Delta, 173 (60,3 %) varijanta Omicron BA.1, i 85 (29,6 %) varijanta Omicron BA.2.



Značajno je veća učestalost varijante Omicron BA.2 tijekom ožujka i travnja 2022. godine, tijekom veljače 2022. učestalija je varijanta Omicron BA.1, a značajnije više je varijante Delta u prosincu 2021. godine ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 1).

Tablica 1. Rezultati sekvenciranja u odnosu na promatrano razdoblje

	Broj (%) varijanti prema sekvenciranju				P*
	Delta	Omicron BA.1	Omicron BA.2	Ukupno	
prosinc 2021.	27 (93)	34 (20)	0	61 (21)	
siječanj 2022.	1 (3)	16 (9)	0	17 (6)	
veljača 2022.	1 (3)	78 (45)	16 (19)	95 (33)	<b>&lt; 0,001</b>
ožujak 2022.	0	26 (15)	19 (22)	45 (16)	
travanj 2022.	0	19 (11)	50 (58,8)	69 (24)	
Ukupno	29 (100)	173 (100)	85 (100)	287 (100)	

\* $\chi^2$  test

Najviše je vanjskih bolesnika, njih 150 (52,3 %), primljenih kroz hitni prijem je 73 (25,4 %), s COVID odjela je 38 (13,2 %) bolesnika, a 26 (9,1 %) bolesnika je s drugih odjela.

Tijekom prosinca 2021. značajno je više bolesnika primljeno kroz hitni prijem ili su vanjski, u veljači i travnju značajno je više vanjskih bolesnika i bolesnika s drugih odjela, dok je tijekom ožujka značajno više bolesnika s COVID odjela ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela bolesnika prema odjelu s kojeg su upućeni u promatranom razdoblju

	Broj (%) bolesnika u odnosu na odjel s kojeg su upućeni				Ukupno	P*
	COVID odjel	Hitni prijem	Vanjski bolesnici	Drugi odjeli		
prosinac 2021.	2 (5)	21 (29)	38 (25)	0	61 (21)	
siječanj 2022.	0	3 (4)	14 (9)	0	17 (6)	
veljača 2022.	15 (39)	21 (29)	44 (29)	15 (58)	95 (33)	<b>&lt; 0,001</b>
ožujak 2022.	11 (29)	8 (11)	24 (16)	2 (8)	45 (16)	
travanj 2022.	10 (26,3)	20 (27,4)	30 (20)	9 (34,6)	69 (24)	
Ukupno	38 (100)	73 (100)	150 (100)	26 (100)	287 (100)	

\* $\chi^2$  test

Od ukupno 29 (10 %) bolesnika s Delta varijantom, značajnije više ih je s hitnog prijema, Omicron BA.1 je zastupljeniji na COVID odjelima, a Omicron BA.2 bilježi se značajnije kod vanjskih bolesnika i bolesnika s drugih odjela ( $\chi^2$  test, P = 0,001) (Tablica 3).

Tablica 3. Raspodjela bolesnika prema odjelu s kojeg su upućeni i rezultatima sekvenciranja

	Broj (%) bolesnika u odnosu na odjel s kojeg su upućeni					P*
	COVID odjel	Hitni prijem	Vanjski bolesnici	Drugi odjeli	Ukupno	
Delta	3 (8)	14 (19)	12 (8)	0	29 (10)	
Omicron BA.1	31 (82)	43 (59)	82 (55)	17 (65)	173 (60)	<b>0,001</b>
Omicron BA.2	4 (11)	16 (22)	56 (37)	9 (35)	85 (30)	
Ukupno	38 (100)	73 (100)	150 (100)	26 (100)	287 (100)	

\* $\chi^2$  test

Tijekom razdoblja od prosinca 2021. do svibnja 2022. godine, od ukupno 287 bolesnika 122 (42,5 %) su bolesnici muškog, a 165 (57,5 %) su bolesnika ženskog spola.

Nema značajnih razlika u raspodjeli bolesnika prema spolu i promatranom razdoblju (Tablica 4).

Tablica 4. Raspodjela bolesnika prema spolu u promatranom razdoblju

	Broj (%) bolesnika u odnosu na spol			P*
	Muškarci	Žene	Ukupno	
prosinac 2021.	18 (15)	43 (26)	61 (21)	
siječanj 2022.	7 (6)	10 (6)	17 (6)	
veljača 2022.	46 (38)	49 (30)	95 (33)	0,20
ožujak 2022.	19 (16)	26 (16)	45 (16)	
travanj 2022.	32 (26,2)	37 (22,4)	69 (24)	
Ukupno	122 (100)	165 (100)	287 (100)	

\* $\chi^2$  test

Medijan dobi ispitanika u tom razdoblju je 51 godina (interkvartilnog raspona od 32 do 69 godina), bez značajne razlike po mjesecima (Tablica 5).

Tablica 5. Dob bolesnika u promatranom razdoblju

	Medijan	P*
	(interkvartilni raspon) dobi	
prosinac 2021.	40 (27 – 58)	
siječanj 2022.	34 (26 – 65)	
veljača 2022.	56 (33 – 75)	0,08
ožujak 2022.	57 (32 – 67)	
travanj 2022.	55 (36 – 69)	

\*Kruskal Wallis test

Osim sekvenciranjem, u promatranom razdoblju kod 197 (68,6 %) bolesnika napravljeno je PCR testiranje Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII testom.

S obzirom na rezultate testiranja s 37 (18,8 %) slučajeva je zastupljena varijanta Delta, sa 116 (58,9 %) slučajeva Omicron BA.1, a varijanta Omicron BA.2 s 44 (22,3 %) slučaja.

Značajna je razlika u podudaranju rezultata PCR testiranja i sekvenciranja genoma virusa SARS CoV-2. Po sekvenciranju je Delta varijanta zastupljena samo s jednim bolesnikom (0,5 %), dok ih je prema PCR testiranju 37 (18,8 %).

Omicron BA.2 prema sekvenciranju je zastupljen sa 79 (40,1 %) slučajeva, a po PCR testiranju s 44 (22,3 %) bolesnika. Nešto je bolje podudaranje samo u slučaju Omicron BA.1 varijate (Mc Nemar – Bowkerov test,  $P < 0,001$ ) (Tablica 6).

Tablica 6. Podudaranje rezultata sekvenciranja genoma virusa SARS CoV-2 i PCR testiranja Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII testom

		Broj (%) sojeva prema sekvenciranju				P*
		Delta	Omicron BA.1	Omicron BA.2	Ukupno	
PCR testiranje	Delta	1	1	35	37 (18,8)	<b>&lt; 0,001</b>
	Omicron BA.1	0	116	0	116 (58,9)	
	Omicron BA.2	0	0	44	44 (22,3)	
Ukupno		1 (0,5)	117 (59,4)	79 (40,1)	197 (100)	

\*Mc Nemar – Bowkerov test

## 5. RASPRAVA

Bitan razlog zbog kojeg koronavirus SARS-CoV-2 uzrokuje veliku zabrinutost za javno zdravlje je kontinuirano pojavljivanje mutacija u genomu, koje prate nastanak i širenje novih varijanti. Potencijalni problem koji proizlazi iz toga je smanjena djelotvornost postojećih cjepiva te mogućnost ponovne zaraze pacijenata koji su prethodno preboljeli COVID 19. Svjetska zdravstvena organizacija dijeli nove varijante SARS-CoV-2 na varijante od interesa (VOI) i varijante koje izazivaju zabrinutost (VOC). Prema WHO-u, varijanta od interesa (VOI) je ona koja ima genetska ili biološka svojstva koja zahtijevaju daljnju procjenu, dok je varijanta zabrinutosti (VOC) varijanta koja nosi neke specifične značajke koje pridonose izazivanju široko rasprostranjene zabrinutosti, koje u osnovi obuhvaćaju povećan rizik od prenosivosti (tj. virulencije), razvoja teže bolesti (tj. patogenosti) ili narušavanja učinkovitosti dijagnostičkih, preventivnih i terapijskih opcija (osobito ispadanje gena i imunološki bijeg) (31). Trenutna VOC prema WHO je Omicron varijanta, i ona uključuje BA.1 i BA.2 cirkulirajuće rekombinantne oblike. Prijašnje VOC bile su: Alfa, Beta, Gama i Delta.

U ovom radu proučavano je kako se prevalencija varijanti mijenja kroz period od listopada 2021. do kraja travnja 2022., bez podataka iz studenog 2021. Ukupno su obrađena 372 uzorka. Svi uzorci testirani u listopadu metodom NGS na sustavu Illumina utvrđeno je da su Delta varijanta, što odgovara literaturnim podacima. Delta varijanta proglašena je VOC u lipnju 2021. godine, te je bila dominantna varijanta u svijetu do studenog 2021. godine.

Krajem studenog 2021. godine u Južnoafričkoj republici otkrivena je nova varijanta SARS-CoV-2 koja je imenovana Omicron i uskoro proglašena VOC. Već se u prosincu Omicron BA.1 varijanta pojavljuje među pacijentima testiranim u KBC Zagreb i ubrzo postaje prevladavajući soj. Najviše podataka prikupljeno je u veljači 2022. godine, što prati epidemiološke trendove i tzv. „peti val koronavirusa“. Razlog tome je velika virulentnost ove varijante i sposobnost virusa da zarazi pacijente koji su prethodno preboljeli COVID 19 ili su cijepljeni. U tom periodu zabilježen je povećan broj testiranja i pozitivnih nalaza. Pojavljuje se Omicron BA.2 varijanta, dok Delta varijanta gotovo potpuno iščezava. Tijekom ožujka i travnja prikupljeno je manje podataka, a dominantna varijanta je Omicron BA.2. BA.2 se razlikuje od BA.1 po svom genetskom slijedu, uključujući neke razlike u aminokiselinama u S

proteinu i drugim proteinima (32). Ova podvarijanta se također naziva "stealth" varijantom jer ima genetske mutacije zbog kojih je teže razlikovati od varijante Delta putem PCR-a (33). Podaci prikupljeni u ovom istraživanju, a dobiveni sekvenciranjem genom SARS-CoV-2 prate i potvrđuju svjetske epidemiološke trendove kretanja varijanti SARS-CoV-2.

Podaci korišteni u ovoj studiji prikupljeni su od vanjskih pacijenata, pacijenata zaprimljenih kroz Objedinjeni hitni bolnički prijem (OHBP), pacijenata na COVID odjelu, te ležećih pacijenata s ostalih odjela. Najviše je podataka prikupljeno od vanjskih pacijenata i pacijenata primljenih kroz OHBP. Radi se uglavnom o pacijentima čiji simptomi ukazuju na akutni COVID 19. Prevalencija Delta varijante najveća je u pacijenata primljenih preko OHBP, dok je Omicron BA.1 dominantan kod vanjskih pacijenata. Iako je Omicron varijanta virulentnija, ona uzrokuje lakše simptome od Delte, što ide u prilog rezultatima. Pretpostavka je da pacijenti koji su se javili na Hitni prijem imaju jače simptome COVID bolesti od vanjskih pacijenata. U ožujku 2022. zabilježen je najveći broj uzoraka s COVID odjela, što možemo povezati s povećanim brojem SARS-CoV-2 pozitivnih pacijenata u periodu „petog vala koronavirusa“. Ukoliko je velik ukupan broj pozitivnih uzoraka, zaključujemo da će biti veći broj težih slučajeva koji zahtijevaju hospitalizaciju na COVID odjel. Dominantna varijanta među pacijentima s COVID odjela je Omicron BA.1, ista koja je bila dominantna u svijetu u periodu kad je prikupljen najveći broj uzoraka briseva pacijenata s COVID odjela. Medijan dobi svih pacijenata je 51 godina. Bitan čimbenik rizika za razvoj teške COVID 19 bolesti je dob veća od 50 godina, što je slučaj u većine pacijenata na COVID odjelu. Također, u tih pacijenata često su prisutni i drugi komorbiditeti, kao što su šećerna bolest, hipertenzija, pretilost i to sve pogoduje razvoju težeg oblika bolesti. Pacijenti s ostalih odjela uglavnom su bili asimptomatski ili su razvili simptome tijekom boravka u bolnici, te su, ovisno o kliničkoj slici i dijagnozi kasnije prebačeni na COVID odjel. Prevalencija varijanti SARS-CoV-2 među pacijentima testiranim u KBC Zagreb je smisljena i u skladu s dosadašnjim spoznajama o težini simptoma svojstvenu za određenu varijantu, ali potrebna je detaljnija analiza anamneze, kliničke slike i komorbiditeta pacijenata.

Osim sekvenciranja, dio podataka obrađen je PCR testiranjem Novaplex SARS-CoV-2 Variants VII testom koji detektira mutacije 69/70del, E484A, N501Y i RdRP gen. Radi se o 197 podataka od veljače do kraja travnja 2022. Primijećena je razlika u rezultatima sekvenciranja i PCR testiranja. Omicron BA.1 varijanta bilježi najveću sličnost u rezultatima, dok je najveća razlika u rezultatima Delta varijante, PCR testiranjem mnogo je više nalaza Delta varijante. Velik je broj uzoraka koji su sekvenciranjem proglašeni Omicron BA.2

varijantom, dok su na PCR testu ispali Delta. Međutim, to ima smisla jer Omicron BA.2 varijanta ima genske mutacije radi kojih se teško razlikuje od Delte, te je radi PCR testiranjem moguće dobiti pogrešan nalaz. Detekcija varijanti od interesa PCR testom brža je, povoljnija i lakše dostupna metoda, međutim manje je pouzdana i predstavlja rizik od pogrešne identifikacije varijante SARS-CoV-2. Iako PCR testiranje može dati okvirnu sliku o epidemiološkom kretanju varijanti virusa, konačnu i sigurnu potvrdu dobivamo sekvenciranjem genoma.



## 6. ZAKLJUČCI

Iz istraživanja provedenog u sklopu ovog rada proizlazi:

- Prevalencija SARS-CoV-2 varijanti od interesa među pacijentima testiranim u KBC Zagreb prati i potvrđuje svjetske epidemiološke trendove.
- Iako je prevalencija varijanti među pacijentima smisljena i u skladu sa dosadašnjim saznanjima, za donošenje zaključaka o povezanosti težine bolesti i određene varijante potrebno je detaljnije analizirati anamneze, kliničke slike, komorbiditete i cijepljeni status.
- RT-PCR testiranje brži je i lakše dostupan način identifikacije varijanti SARS-CoV-2, međutim, za konačnu potvrdu pouzdanije je sekvenciranje genoma.

## 7. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Koronavirus SARS-CoV-2 predstavlja veliki javnozdravstveni problem iz više razloga, a jedan od njih su konstante mutacije virusnog genoma i posljedično pojavljivanje novih varijanti. U periodu u kojem je rađeno ovo istraživanje dominantna varijanta u svijetu postao je Omicron. U ovom radu istražili smo prevalenciju varijanti od interesa kod pacijenata testiranih u KBC-Zagreb, usporedili odnos varijanti između vanjskih, hitnih i bolničkih pacijenata, te pacijenata liječenih na COVID odjelu, te usporedili rezultate RT-PCR testiranja sa rezultatima sekvenciranja genoma SARS-CoV-2 u svrhu identifikacije varijanti.

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao presječna studija.

**Ispitanici i metode:** Korišteni su uzorci pacijenata testiranih u KBC Zagreb rutinskom obradom, RT-PCR testiranjem na E gen, N gen i ORF1ab gen. Nakon utvrđenog pozitiviteta, dio uzoraka je poslan na sekvenciranje genoma, a dio je ponovno testiran drugim RT-PCR testom u svrhu identifikacije varijanti. Dobiveni rezultati su uspoređeni, te je istražena prevalencija SARS-CoV-2 varijanti među pacijentima.

**Rezultati:** Rezultati istraživanja pokazali su da je dominantna SARS-CoV-2 varijanta u listopadu bila Delta, a u narednim mjesecima, do kraja travnja 2022. ova varijanta gotovo je potpuno nestala iz populacije pacijenata, te je Omicron varijanta postala dominantna. U početku je to bila BA.1 varijanta, no kasnije je zamijenjena BA.2 varijantom. Najviše je testirano vanjskih pacijenata, u kojih je najčešća varijanta bila BA.2, dok je u pacijenata primljenih preko hitnog prijema najzastupljenija Delta varijanta. Uzorci pacijenata s COVID i ostalih odjela najčešće su identificirani kao Omicron (BA.1 i BA.2). Usporedba rezultata sekvenciranja i RT-PCR testiranja pokazala je značajnu razliku u podudaranju.

**Zaključci:** Podaci dobiveni u ovom istraživanju pokazuju da prevalencija SARS-CoV-2 varijanti kod pacijenata testiranih u KBC Zagreb prati svjetske epidemiološke trendove, te da konačnu potvrdu dobivamo sekvenciranjem genoma.

**Ključne riječi:** Omicron; prevalencija; RT-PCR; SARS-CoV-2; sekvenciranje genoma

## 8. SUMMARY

### PREVALENCE OF SARS-COV-2 VARIANTS OF INTEREST IN COVID-19 PATIENTS IN TERTIARY HOSPITAL CENTRE

**Objectives:** The SARS-CoV-2 coronavirus is a major public health problem for a number of reasons, one of which is the constant mutation of the viral genome and the consequent emergence of new variants. In the period in which this research was done, Omicron became the dominant variant in the world. In this study, we researched the prevalence of variants of interest in patients tested at University hospital centre Zagreb, compared the relationship between variants between patients who are not hospitalized, emergency and hospital patients, and patients treated in the COVID department, and compared RT-PCR testing results with SARS-CoV-2 genome sequencing results for the purpose of identifying variants.

**Study Design:** The study was organized as a cross-sectional study.

**Patients and Methods:** Samples of patients tested at University hospital centre Zagreb by routine processing, RT-PCR testing for E gene, N gene and ORF1ab gene was used. After the positivity was determined, part of the samples was sent for genome sequencing, and part was retested by another RT-PCR test to identify variants. The obtained results were compared, and the prevalence of SARS-CoV-2 variants among patients was investigated.

**Results:** The results of the research showed that the dominant SARS-CoV-2 variant in October was Delta, and in the following months, by the end of April 2022, this variant almost completely disappeared from the patient population, and the Omicron variant became dominant. It was initially a BA.1 variant but was later replaced by a BA.2 variant. Patients who are not hospitalized were tested the most, in whom the most common variant was BA.2, while in patients admitted via emergency department, the Delta variant was the most common. Samples of patients treated in COVID department and other departments were most commonly identified as Omicron (BA.1 and BA.2). Comparison of sequencing results and RT-PCR testing showed a significant difference in matching.

**Conclusion:** The data obtained in this study show that the prevalence of SARS-CoV-2 variants in patients tested at the University Hospital Center Zagreb follows global epidemiological trends, and that the final confirmation is obtained by genome sequencing.

**Key words:** Omicron; prevalence; RT-PCR; SARS-CoV-2; genome sequencing

**LITERATURA**

1. Kalenić S, Abram M, Batinić D, Beader, N, Bedenić B; Bošnjak Z i sur. Medicinska mikrobiologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
2. Malik YA. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays J Pathol.* 2020;42(1):3-11.
3. Zawilska JB, Lagodzinski A, Berezinska M. COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J Physiol Pharmacol.* 2021;72(4):479-501.
4. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021;19(3):155-70.
5. To KK, Sridhar S, Chiu KH, Hung DL, Li X, Hung IF, i sur. Lessons learned 1 year after SARS-CoV-2 emergence leading to COVID-19 pandemic. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):507-35
6. Xiao F, Sun J, Xu Y, Li F, Huang X, Li H, i sur. Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(8):1920-2.
7. Lauring AS, Hodcroft EB. Genetic Variants of SARS-CoV-2-What Do They Mean. *JAMA.* 2021;325(6):529-31.
8. Centers for Disease Control and Prevention. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia, United States of America: Centers for Disease Control and Prevention; (2021). Dostupno na adresi:<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>. Datum pristupa: 17.05.2022.
9. Volz E, Mishra S, Chand M, Barrett JC, Johnson R, Geidelberg L, i sur. Assessing transmissibility of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in England. *Nature.* 2021;593(7858):266-9.

10. Tegally H, Wilkinson E, Giovanetti M, Iranzadeh A, Fonseca V, Giandhari J, i sur. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. *Nature*. 2021;592(7854):438-43.
11. Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, i sur. SARS-CoV-2 Spike Mutations, L452R, T478K, E484Q and P681R, in the Second Wave of COVID-19 in Maharashtra, India. *Microorganisms*. 2021;9(7):1542.
12. World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. (2021). Dostupno na adresi: [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). Datum pristupa: 27.05.2022.
13. Mancuso M, Eikenberry SE, Gumel AB. Will vaccine-derived protective immunity curtail COVID-19 variants in the US? *Infect Dis Model*. 2021;6:1110-34.
14. Ou J, Lan W, Wu X, Zhao T, Duan B, Yang P, i sur. Tracking SARS-CoV-2 Omicron diverse spike gene mutations identifies multiple inter-variant recombination events. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):138.
15. Gusev E, Sarapultsev A, Hu D, Chereshev V. Problems of Pathogenesis and Pathogenetic Therapy of COVID-19 from the Perspective of the General Theory of Pathological Systems (General Pathological Processes). *Int J Mol Sci*. 2021;22(14):7582.
16. Awadasseid A, Wu Y, Tanaka Y, Zhang W. Initial success in the identification and management of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) indicates human-to-human transmission in Wuhan, China. *Int J Biol Sci*. 2020;16(11):1846-1860.
17. Grasselli G, Tonetti T, Protti A, Langer T, Girardis M, Bellani G, i sur. Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *Lancet Respir Med*. 2020;8(12):1201-1208.
18. Asakura H, Ogawa H. COVID-19-associated coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Int J Hematol*. 2021;113(1):45-57.
19. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, i sur. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579(7798):265-9.
20. Acter T, Uddin N, Das J, Akhter A, Choudhury TR, Kim S. Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease

- 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency. *Sci Total Environ.* 2020;730:138996.
21. Kaul D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus - Molecular biology, epidemiology and clinical implications. *Curr Med Res Pract.* 2020;10(2):54-64.
22. Stevenson M, Metry A, Messenger M. Modelling of hypothetical SARS-CoV-2 point-of-care tests on admission to hospital from A&E: rapid cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess.* 2021;25(21):1-68.
23. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, i sur. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-3.
24. Sharfstein JM, Becker SJ, Mello MM. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA.* 2020;323(15):1437-8.
25. Levy SE, Myers RM. Advancements in next-generation sequencing. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2016;17(1):95-115.
26. Chen L, Liu W, Zhang Q, Xu K, Ye G, Wu W, i sur. RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):313-9.
27. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, i sur. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020;25(3):2000045.
28. Okba NMA, Müller MA, Li W, Wang C, GeurtsvanKessel CH, Corman VM, i sur. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020;26(7):1478-88.
29. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, Nguyen THO, Chromikova V, McMahon M, i sur. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat Med.* 2020;26(7):1033-6.
30. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izdanje, Zagreb: Medicinska naklada;2008.
31. World Health Organization. Tracking SARS-CoV-2 variants. Dostupno na adresi: <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>. Datum pristupa: 28.05.2022.

32. World Health Organization. Statement on Omicron Sublineage. Dostupno na adresi:  
<https://www.who.int/news/item/22-02-2022-statement-on-omicron-sublineage-ba.2>.  
Datum pristupa: 28.05.2022.
33. Seegene technologies; The BA.2 Omicron Variant: Here's What You Should Know.  
Dostupno na adresi: <https://seegenetech.com/the-ba-2-omicron-variant-heres-what-you-should-know/>. Datum pristupa: 29.05.2022.



## ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Laura Loparić

Datum i mjesto rođenja: 03.07.1993., Zagreb

Adresa i mjesto stanovanja: Trg sv. Ane 25, 49253 Lobor

Mobitel: 0997460543

Adresa e-pošte: llopavic@gmail.com

Zaposlenje:

2018.-danas KBC Zagreb, Klinički zavod za kliničku i molekularnu mikrobiologiju

Obrazovanje:

2020. – 2022. Medicinski fakultet u Osijeku – Diplomski sveučilišni studij

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2015. – 2018. Zdravstveno veleučilište Zagreb – Preddiplomski stručni studij

Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2008. – 2012. Opća gimnazija, Srednja škola Zlatar