

# Laboratorijska dijagnostika bolesti COVID-19

## Pripremili:

Hrvatsko društvo za kliničku mikrobiologiju Hrvatskog liječničkog zbora

Hrvatsko društvo za infektivne bolesti Hrvatskog liječničkog zbora

9. travnja 2020.

## Uvod

Novi koronavirus (SARS-CoV-19) uzrokuje infekciju dišnih puteva, bolest nazvanu COVID-19 (engl. coronavirus disease 2019) čija težina može varirati od klinički asimptomatske do teške infekcije. Informacije o duljini inkubacije, načinu izlučivanja virusa i kliničkim simptomima se još prikupljaju te će nove spoznaje utjecati i na stavove o primjeni laboratorijske dijagnostike. Ovaj pregled se zasniva na dokumentima Svjetske zdravstvene organizacije i Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti iz ožujka i travnja 2020.g. (1,2).

## Odluka o testiranju

Odluka o testiranju se donosi na osnovi kliničke slike i epidemioloških pokazatelja koji se za Hrvatsku redovito obnavljaju od strane Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo. S obzirom da u Hrvatskoj postoji lokalna transmisija novog koronavirusa, uputno je za vrijeme trajanja epidemije kod svakog bolesnika, koji na pregled liječniku dolazi sa simptomima akutne respiratorne infekcije, učiniti test na COVID-19. Testiranje je ključno u ranom otkrivanju bolesti što utječe na kliničko liječenje i kontrolu širenja virusa.

## Uzorci za testiranje

Osnovni uzorak je nazofaringealni i/ili orofaringealni bris. Upute za uzimanje uzoraka se nalaze na web stranici Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo [https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/03/Uzimanje-uzoraka-na-SARS-CoV-2\\_3103.pdf](https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/03/Uzimanje-uzoraka-na-SARS-CoV-2_3103.pdf)

Kod hospitaliziranih bolesnika mogu se uzimati i uzorci donjeg dišnog sustava (sputum, endotrahealni aspirat, bronhoalveolarni lavat) koji pokazuju veću osjetljivost od uzoraka gornjeg dišnog sustava.

Iznimno mogu se uzimati i drugi uzorci, ali prisutnost virusa u uzorcima izvan dišnog sustava, iako dokazana u pojedinačnim slučajevima (krv, stolica), još je uvijek predmet istraživanja i ne preporuča se u rutinskoj dijagnostici.

Kod preminulih, ako se radi obdukcija, mogu se uzeti uzorci tkiva, prvenstveno pluća.

U svrhu retrospektivne analize mogu se kod bolesnika uzeti parni serumi (u akutnoj i rekonvalescentnoj fazi) za serologiju.

## Transport uzoraka

Uzorci se trebaju dopremiti u laboratorij što prije nakon uzimanja. Uzorke obrisaka obavezno treba staviti u transportni medij (oko 2 ml otopine Hanks ili fiziološke otopine). Sve uzorke treba odmah pohraniti u hladnjak na 2-8°C i dostaviti u laboratorij unutar 24h. Za dužu pohranu uzorak treba spremati na -70°C.

## **LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

### **Testovi amplifikacije nukleinskih kiselina (engl. „nucleic acid amplification tests“, NAAT)**

Molekularni testovi RT-qPCR (engl. „reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction“) dokazuju N, E, S i RdRP gene virusa.

U područjima u kojima novi koronavirus (SARS-CoV-2) još nije u populaciji, prvi pozitivni rezultati moraju se dokazati pozitivnim nalazom barem dvaju ciljnih virusnih gena od kojih barem jedan mora biti specifičan za novi koronavirus (SARS-CoV-2). Alternativno, pozitivan nalaz samo jednog ciljnog gena za betakoronavirus treba biti popraćen sekvenciranjem dijela ili cijelog genoma. Kod diskutabilnih rezultata uzorak treba ponoviti te po potrebi zatražiti potvrdu retestiranjem u referentnom laboratoriju.

U područjima gdje je novi koronavirus (SARS-CoV-2) već rasprostranjen, nalaz se može smatrati pozitivnim već na osnovi dokaza jednog ciljnog gena.

Negativni nalaz ne isključuje dijagnozu bolesti COVID-19. Uzroci zbog kojih nalaz može biti lažno negativan uključuju: lošu kvalitetu uzorka, uzimanje uzorka prerano ili prekasno u tijeku bolesti, neadekvatno pohranjivanje i transport uzorka te tehničke poteškoće u izvođenju testa.

U slučaju negativnog nalaza u uzorcima gornjih dišnih puteva kod bolesnika s visokim indeksom sumnje na bolest COVID-19, test treba ponoviti, po mogućnosti na uzorcima donjih dišnih puteva.

### **Serološka dijagnostika**

Dinamika i značenje specifičnih protutijela se još istražuje, ali za retrospektivnu potvrdu infekcije COVID-19 uzeti treba uzorke seruma na početku bolesti (očekivano je rezultat negativan) i nakon 7-14-21 dana, kada se očekuje pojava specifičnih protutijela IgM, IgA i IgG.

### **Brzi testovi**

Molekularna dijagnostika je zlatni standard u dokazivanju infekcije COVID-19, no zahtjeva dobro opremljen laboratorij i visoko profilirano osoblje što može ograničavati široku primjenu testiranja. Intenzivno se radi na razvoju pouzdanih, brzih testova, jednostavnih za primjenu i prilagođenih pojedinačnom testiranju na automatiziranim molekularnim sustavima, no testovi za takve uređaje trenutno još nisu dostupni na europskom tržištu.

Intenzivno se radi i na razvoju tradicionalnih imunokromatografskih „point-of-care“ testova (ICA POCT). Postoje dvije vrste brzih testova ICA POCT za COVID-19:

- **direktni testovi za određivanje antigena virusa SARS-CoV-2** u respiratornim uzorcima
- **indirektni testovi za određivanje specifičnih protutijela** u serumu (anti-SARS-CoV-2 IgM/IgG pojedinačno ili ukupno)

Treba naglasiti da **testovi koji detektiraju specifična protutijela imaju vrlo ograničenu primjenu za klinički pristup bolesniku** jer postaju pozitivni tek u kasnoj fazi bolesti (obično 10-tak ili više dana nakon pojave simptoma).

Trenutno se na europskom tržištu može naći samo nekoliko brzih testova koji detektiraju antigene i puno veći broj brzih testova za određivanje protutijela. Na stranicama FIND organizacije (<https://www.finddx.org/>) može se naći pregled testova koji zadovoljavaju zakone Europske unije u skladu s Direktivom 98/79/EC o *in vitro* dijagnostici (IVD).

Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti upozorava, međutim, da **nisu svi testovi s oznakom CE i IVD pouzdani za upotrebu u rutinskoj dijagnostici**.

Prema IVD Direktivi 98/79/EC, za postavljanje CE oznake na dijagnostičke uređaje, proizvođač mora specificirati karakteristike uređaja i samostalno deklarirati sukladnost sa sigurnosnim zahtjevima i radnim performansama navedenima u Direktivi. Radna skupina za IVD Europske komisije izmjenjuje iskustva nadležnih tijela država članica te upozorava da iako je većina brzih testova s oznakom CE u skladu sa zakonodavstvom EU-a, postoje uređaji s lažnom dokumentacijom, nepotpunom tehničkom dokumentacijom ili s neutemeljenim tvrdnjama. Neki od takvih proizvoda prodavani su kao navodni proizvodi za samotestiranje i nekoliko država članica ih je zabranilo.

Stoga treba imati na umu da se izvedba brzih dijagnostičkih testova sa CE oznakom, može razlikovati u laboratoriju za rutinsko testiranje u usporedbi sa studijom učinkovitosti samog proizvođača koja je rađena za potrebe CE-označavanja.

U Hrvatskoj se uvođenje rutinskog testiranja za COVID-19 treba usuglasiti s trenutnim zahtjevima Koordinatora dijagnostike za SARS-CoV-2 za područje Republike Hrvatske, Ministarstva zdravstva RH.

## **Literatura**

1. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases. WHO Interim guidance, 19 March 2020
2. European Centre for Disease Prevention and Control. An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU/EEA. 1 April 2020. Stockholm: ECDC; 2020.