

Протокол
за лабораторијску дијагностику код случајева сумње
на инфекцију вирусом SARS-CoV-2

УВОД

Етиолошки агенс епидемије у Вухану, Кина, која се проширила на територију цијеле НР Кине, а затим и Италије и више других земаља глобално, је бетакорона вирус (сродан SARS-CoV и MERS-CoV). Вирус је идентификован секвенцирањем (next generation sequencing) из културе вируса или директно из узорака добијених од пацијената са пнеумонијом.

КОГА ТЕСТИРАТИ?

Лабораторијско испитивање се спроводи код случајева код којих је на основу клиничких и епидемиолошких параметара постављена сумња на инфекцију изазвану новим корона вирусом SARS-CoV-2, а према *слједећој дефиницији случаја*:

Случај сумње на инфекцију вирусом SARS-CoV-2 који захтијева лабораторијско тестирање

А. Пацијент са симптомима акутне респираторне инфекције (температура и најмање један знак/симптом респираторне инфекције као што је нпр. кашаљ, кратак дах)

И

без других симптома који у потпуности објашњавају клиничку слику

И

са историјом путовања или боравка у земљама са присутном локалном трансмисијом вируса, у периоду од 14 дана прије појаве симптома

или

Б. Пацијент са било којом акутном респираторном инфекцијом

И

који је био у контакту¹ са потврђеним или вјероватним случајем обољења од COVID-19 у периоду од 14 дана прије појаве симптома

или

Ц. Пацијент са тешком акутном респираторном инфекцијом (температура и најмање један знак/симптом респираторне инфекције као што је нпр. кашаљ, кратак дах)

И

који захтјева хоспитализацију

И

без других симптома који у потпуности објашњавају клиничку слику.

¹ **Контакт** вјероватног или потврђеног случаја укључује сљедеће:

- Пружање директне његе без одговарајуће личне заштитне опреме обољелом од COVID-19
- Боравак у истом блиском окружењу са обољелим од COVID-19 (укључујући радно мјесто, учионицу, домаћинство, мање скупове)
- Путовање у непосредној близини (1 метар) са обољелим од COVID-19 у било којем превозном средству унутар 14 дана од појаве симптома код случаја који се прати

КАДА СЕ УЗИМАЈУ УЗОРЦИ?

Узорак је потребно узети што прије након постављања сумње на инфекцију, односно чим се за узорковање стекну услови.

ГДЈЕ СЕ СПРОВОДИ УЗОРКОВАЊЕ?

Када је постављена сумња на инфекцију вирусом SARS-CoV-2 (присутни респираторни симптоми и позитивна епидемиолошка анамнеза), узорак се узима у просторијама за изолацију на инфективним клиникама или инфективним одјељењима општих болница, односно јединицама интензивне његе.

Уколико је потребно узети узорак код особе која је без симптома, узимање узорка се обавља у надлежном дому здравља, у просторији за изолацију, или у кућној посјети пацијенту, зависно од капацитета и процјене ситуације од стране надлежног дома здравља.

КО ВРШИ УЗОРКОВАЊЕ?

Узорак узима здравствени радник (доктор медицине/специјалиста одговарајуће гране медицине или медицински /лабораторијски/ санитарни техничар), који је едукован за узимање одговарајућег узорка и правилно коришћење прописане личне заштитне опреме.

МЈЕРЕ ЗАШТИТЕ ОСОБЉА ПРИЛИКОМ УЗИМАЊА УЗОРАКА

Примјењују се стандардне мјере заштите, као и мјере заштите од инфекција које се преносе капљичним путем и мјере заштите од инфекција које се преносе контактом, у складу са Упутством о мјерама превенције и сузбијања ширења новог корона вируса SARS-CoV-2 у здравственим установама, припремљеним од стране Института за јавно здравство Републике Српске.

УЗОРЦИ

Тренутно за потребе надзора се могу узети сљедећи узорци:

1. Назофарингеални и орофарингеални брис, заједно у једном вирусном транспортном медијуму, узети дакронским или најлонским стерилним брисом,

- транспорт на +4°C што прије у лабораторију, уз одговарајућу упутницу и епидемиолошки упитник.

- узорак се до транспорта може чувати на +4°C.

2. Спутум, уколико је обезбјеђено да потиче из доњих респираторних путева. Узорак се прикупља у стерилни контејнер у коме се и транспортује у лабораторију на +4°C што прије након узимања. Узорак се може чувати на +4°C, ако се обезбједи да у лабораторију стигне најкасније 48 сати након узимања.

3. Бронхоалвеоларни лават или ендотрахеални аспират, у стерилном контејнеру. Транспортује се у лабораторију на +4°C што прије након узимања. Узорак се може чувати на +4°C, ако се обезбједи да у лабораторију стигне најкасније 48 сати након узимања.

Тренутно други узорци нису прихватљиви за потребе надзора у Републици Српској.

Према препорукама СЗО, узорци могу бити сљедећи:

1. Респираторни материјал (назофарингеални и орофарингеални брис код амбулантних пацијената и спутум, ако га продукују и/или ендотрахеални аспират или бронхоалвеоларни лават код пацијената са тежом формом болести.

2. Серум за серолошко тестирање, акутни и реконвалесцентни узорак (додатно уз респираторни материјал, може да подржи идентификацију стварног етиолошког узрочника, када серолошки тест буде доступан).

Врста узорка	Материјал за узорковање	Услови транспорта	Вријеме чувања до тестирања	Коментар
Назофарингеални орофарингеални брис	Дакронски или полиестерски брис	4°C	≤5 дана на 4°C >5 дана на -70°C	Назофарингеални и орофарингеални брисеви треба да буду у истој епрувети ради повећања броја вируса.

Бронхоалвеоларна лаважа	Стерилни контејнер са навојним поклопцем	4°C	≤48 сати на 4°C >48 сати на -70°C	Може постојати разблажење патогена, али је и даље користан узорак
Ендотрахеални аспират, назофарингеални аспират или назални испирак	Стерилни контејнер са навојним поклопцем	4°C	≤48 сати на 4°C >48 сати на -70°C	
Спутум	Стерилни контејнер са навојним поклопцем	4°C	≤48 сати на 4°C >48 сати на -70°C	Обезбиједити да је материјал из доњих респираторних путева
Ткиво добијено биопсијом или аутопсијом, из плућа	Стерилни контејнер са навојним поклопцем и физиолошким раствором	4°C	≤24 сати на 4°C >24 сати на -70°C	
Серум (два узорка, акутни и реконвалесцентни и узет 2-4 недеље након акутне фазе)	Епрувета за серум (одрасли: серум издвојен из 3-5 мл пуне крви)	4°C	≤5 дана на 4°C >5 дана на -70°C	Прикупити парне серуме: - акутни – у првој недељи болести - реконвалесцентни – 2-3 недеље касније
Пуна крв	Епрувета	4°C	≤5 дана на 4°C >5 дана на -70°C	За детекцију антигена посебно у првој недељи болести
Урин	Посуда за урин са навојним поклопцем	4°C	≤5 дана на 4°C >5 дана на -70°C	

ПАКОВАЊЕ

Узорак се транспортује у троструком паковању (контејнер или епрувета у пластичној - PVC врећици, у затвореној пластичној посуди која се стави у транспортни термос са ледом).

ТРАНСПОРТ

Транспорт узорка до лабораторије организује епидемиолошка служба надлежног института/регионалног центра, самостално или у сарадњи са другим здравственим установама према Смјерницама за транспорт биолошког материјала (Службени гласник Републике Српске број 111/19).

Прије упућивања узорка у лабораторију, обавезно телефонски обавијестити лабораторију.

Контакт особа у лабораторији Института за јавно здравство Републике Српске је др Пава Димитријевић, број телефона 065 856 618.

Узорак се не може слати преко курирске службе.

ЛАБОРАТОРИЈЕ

Тренутно на територији Републике Српске постоје двије лабораторије које ће имати могућност RT-PCR дијагностике корона вируса SARS-CoV-2, и то:

1. Универзитетско клинички центар Републике Српске, Завод за микробиологију, Бања Лука

На упутници назначити да се тражи: Multiplex RT-PCR на респираторни панел/ RT PCR тест за откривање вируса SARS-CoV-2. Узорци ће се узимати за пацијенте примљене у УКЦ РС.

2. Институт за јавно здравство Републике Српске, Служба за микробиологију, Бања Лука

На упутници назначити да се тражи: RT-RT PCR тест за откривање вируса SARS-CoV-2.

Узорци се шаљу у лабораторију Института за јавно здравство Републике Српске из домова здравља и општих болница Републике Српске.

У току надзора су могуће измјене надлежности наведених лабораторија, као и потпуне промјене протокола.

Без обзира на то у коју се лабораторију узорак шаље, уз упутницу обавезно послати и што детаљније попуњен епидемиолошки упитник.

ТЕСТОВИ

За детекцију нуклеинске киселине вируса SARS-CoV-2 се користе тестови за RT-PCR који су препоручени и обезбијеђени од стране СЗО.

Користе се реагенси за детекцију новог корона вируса по протоколу Њемачке референтне лабораторије, Charite. Према овом се протоколу најприје ради скрининг на присуство Е-гена, те се ако се покаже позитиван ради потврдни тест на RdRP ген.

Лабораторија користи следеће прајмере и пробе: TIB MolBiol MDx_40-0776_10 Sarbeco-E-gene + EAV 7.2.20 и TIB MolBiol Wuhan-R-gene_V200118_09155376001. За екстракцију нуклеинске киселине из узорака се користи QiaAmp Mini Viral RNA Kit, а за припрему мастер микса Invitrogen Superscript III Platinum One Step-Quantitative Kit.

ТУМАЧЕЊЕ РЕЗУЛТАТА

RT-PCR методом се најприје ради скрининг на присуство Е-гена, те уколико се не докаже присуство Е-гена, налаз се класификује као негативан (RT-PCR методом није доказана RNK вируса SARS-CoV-2).

У случају да се детектује присуство Е-гена, ради се потврдни тест на присуство RdRP гена. Уколико се детектује, налаз се класификује као позитиван (RT-PCR методом је доказана RNK вируса SARS-CoV-2).

Позитивни резултати указују на инфекцију вирусом SARS-CoV-2, али не искључују коинфекције са другим патогенима.

Негативни резултати не искључују инфекцију вирусом SARS-CoV-2. Негативни резултати морају се комбиновати са клиничким опажањима, историјом пацијента, ажурним разумевањем вируса SARS-CoV-2, избором врсте узорка као и епидемиолошким информацијама.

СЛАЊЕ УЗОРАКА У КОЛАБОРАТИВНЕ ЦЕНТРЕ СВЈЕТСКЕ ЗДРАВСТВЕНЕ ОРГАНИЗАЦИЈЕ

Институт за јавно здравство је успоставио контакт са колаборативним центром СЗО, Institute of Virology Charite - Universitätsmedizin Берлин, гдје су наши тестирани узорци упућени на провјеру тачности и гдје је наши досадашњи резултати потврђени.

Начин узорковања материјала, као и услови транспорта до референтне лабораторије су исти као и код надзора над gripом, што подразумева употребу транспортног медијума који обезбјеђује референтна лабораторија Института за јавно здравство Републике Српске.