



Učešće na konferenciji je dijelom podržao
Projekat jačanja sestrinstva u Bosni i
Hercegovini sredstvima Vlade Švicarske.

Više o projektu možete saznati na:

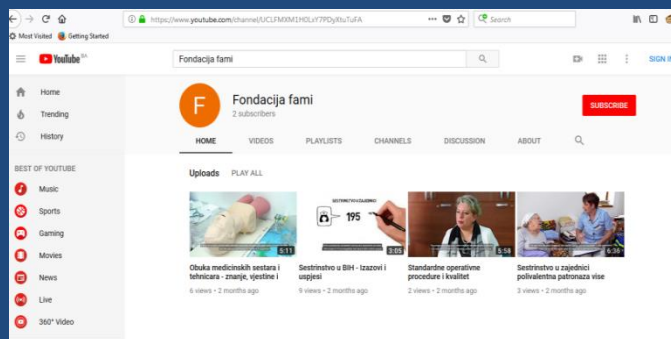
Web stranici:

www.fondacijafami.org



YouTube kanalu:

www.youtube.com/playlist?list=UULFMXM1H0LxY7PDyXtuTuFA



Fejsbuk stranici:

facebook.com/FondacijafamiBiH



Brzi dijagnostički test za detekciju SARS-CoV-2 antigena u nazofaringealnom sekretu

Željko Vuković

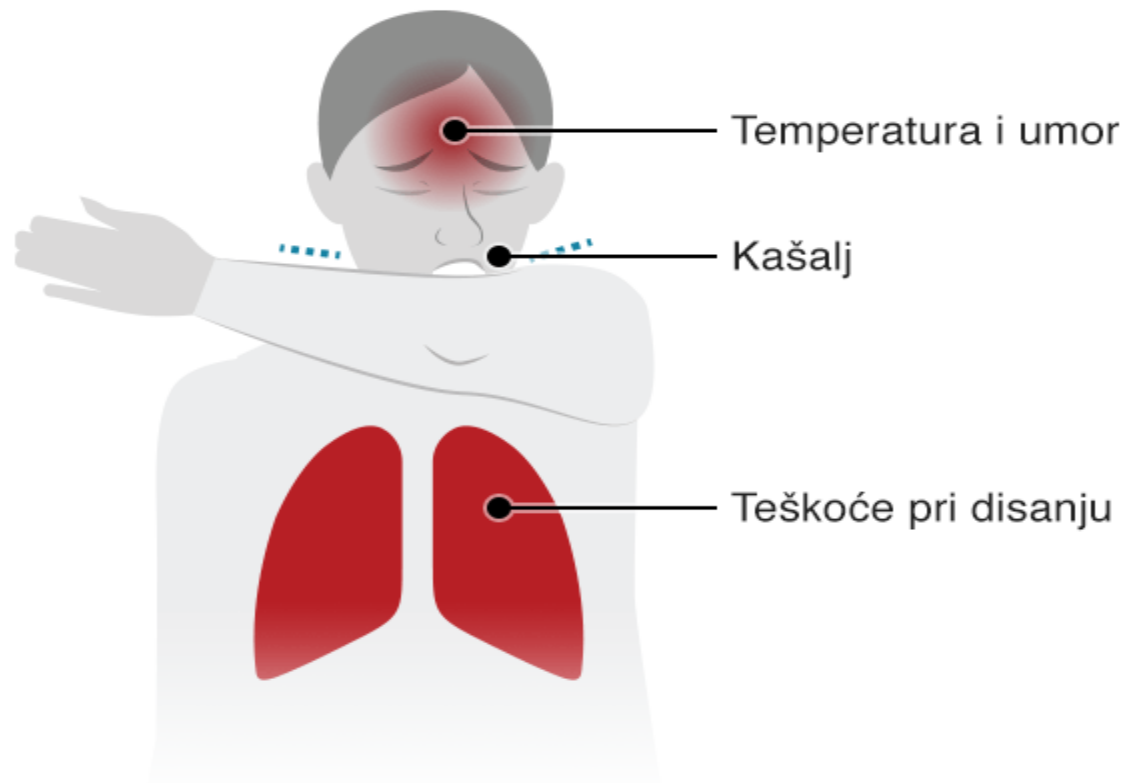
Univerzitetska bolnica Foča
Bosna i Hercegovina

Teški akutni respiratorni sindrom Corona virus odgovoran je za bolest Covid -19 prvi put se pojavio u decembru 2019.godne.uKini.

Od marta 2020 godine proširio se širom svijeta sa velikim brojem smrtnih slučajeva.

Covid 19 je zarazna bolest izazvana novim koronavirusom.

Korona virus: glavni simptomi



Kako se Covid 19 prenosi / širi?

Bolest se može prenjeti sa čovjeka na čovjeka, putem malih kapljica iz nosa i usta koja se šire kada osoba kašlje ili kiše.

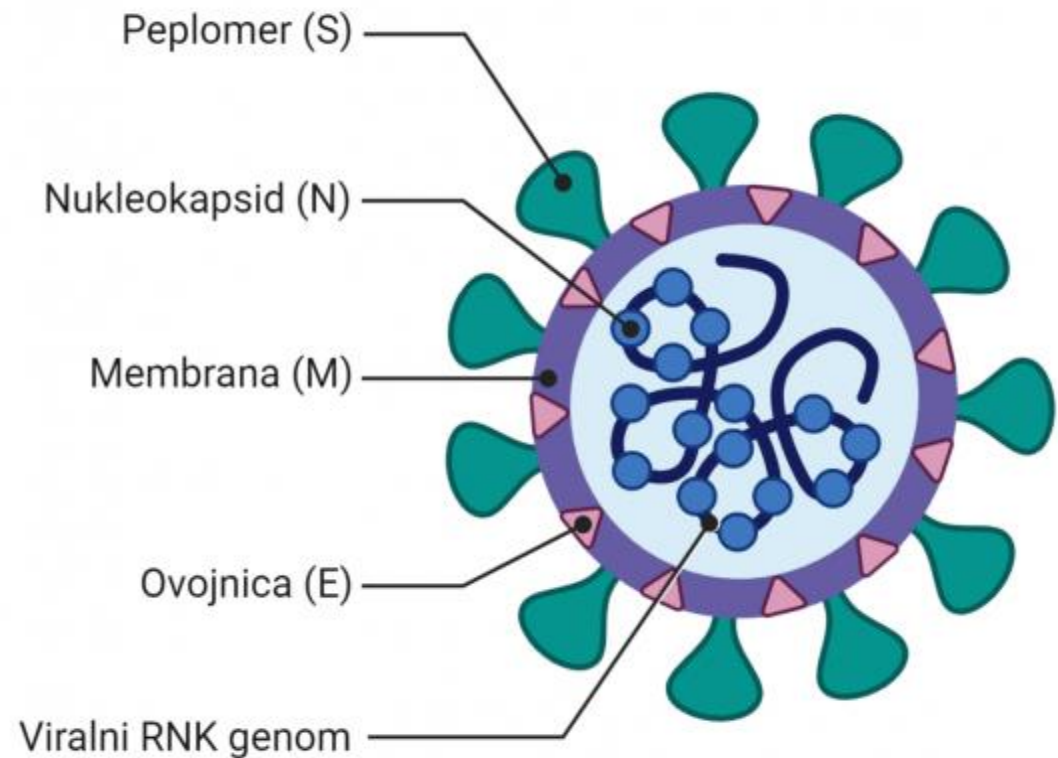
Te kapljice se spustaju na objekte i površine oko osobe.

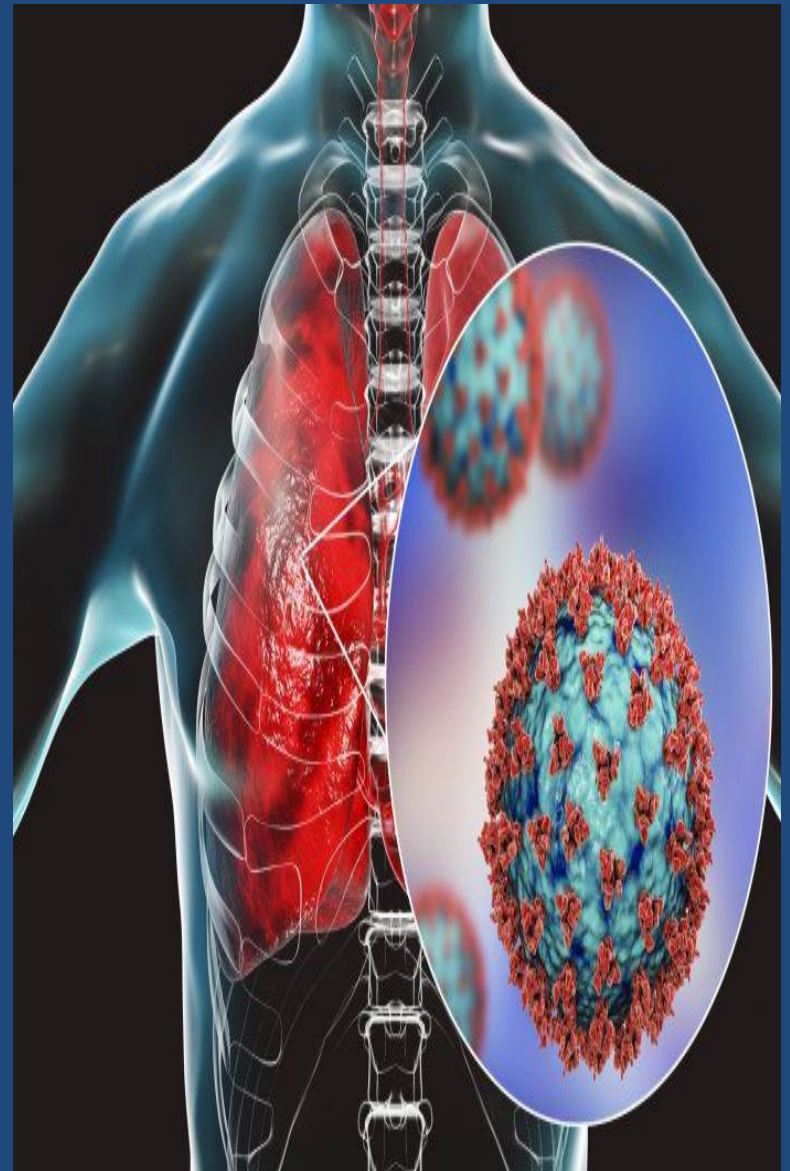
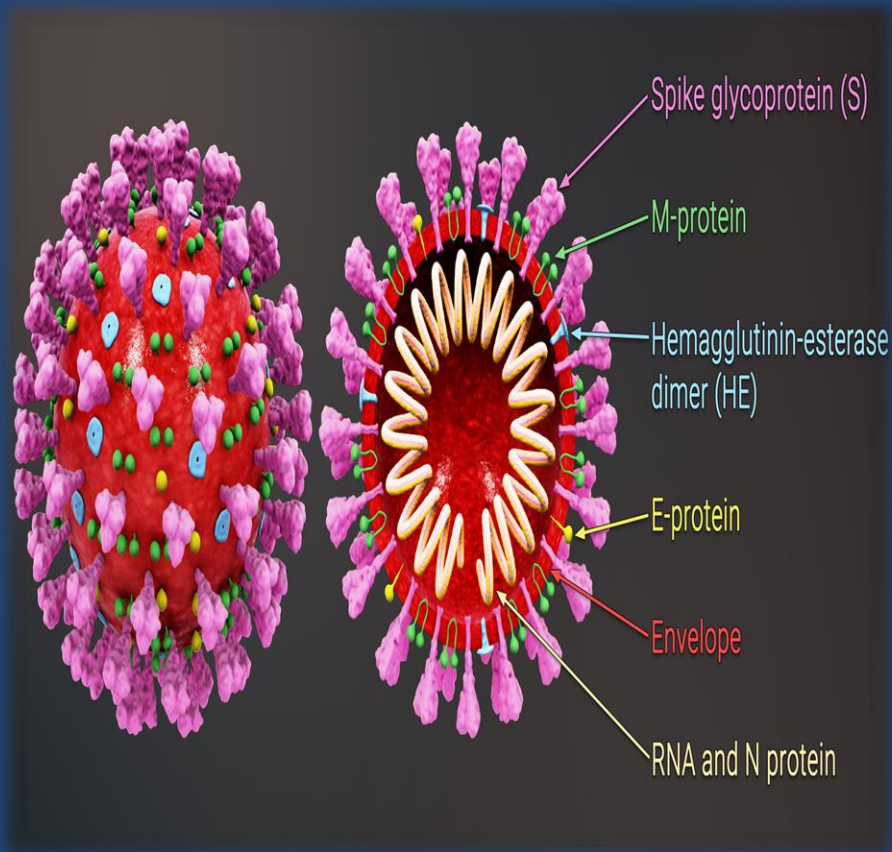
Drugi ljudi mogu dobiti Covid 19 tako što će rukama dodirivati te objekte i površine.

Ljudi se mogu zaraziti u slučaju da udahnu kapljice koje zaražena osoba koja ima Covid 19 izabacuje priikom kašljanja ili kihanja.



Struktura koronavirusa





Šta je SARS-CoV-2 antigen?

SARS-CoV-2 antigen je protein jezgra koronavirusa, koji čini 90% ukupnih proteina koje proizvodi virus u toku svog razmnožavanja, na sluzokoži disajnih organa.

Test za detekciju SARS-CoV-2 antigena napravljen je tako da direktno detektuju upravo proteine jezgra virusa, koji se nalaze na sluzokoži disajnih organa.

Antigenski test je **imunološki test** baziran na reakciji antitjelo - antigen kojim se u respiratornom uzorku može otkriti prisustvo određenog porjekla koji je sastavni dio čestice SARS-COV 2.

Antigenski test za SARS CoV 2 je **manje senzitivan** u odnosu na RT PCR test, ali ima **sličnu visoku specifičnost** kao RT PCR.

WHO i ECDS preporučuju upotrebu antigen testova koji imaju najmanje senzitivnosti $>80\%$ i specifičnost $>97\%$

Trenutno antigenski testovi su jedina vrsta testova koja bi mogla da posluži kao alternativa PCR testovima.

Oni su pored PCR jedini klinički relevantni.

Kao i PCR testovi antigenski testovi se rade iz brisa nosnog ždrijela i oni određuju prisustvo proteina koj su specifični za virus.

PCR testovi detektuju nukleinsku kiselinu i imaju veću osjetljivost.

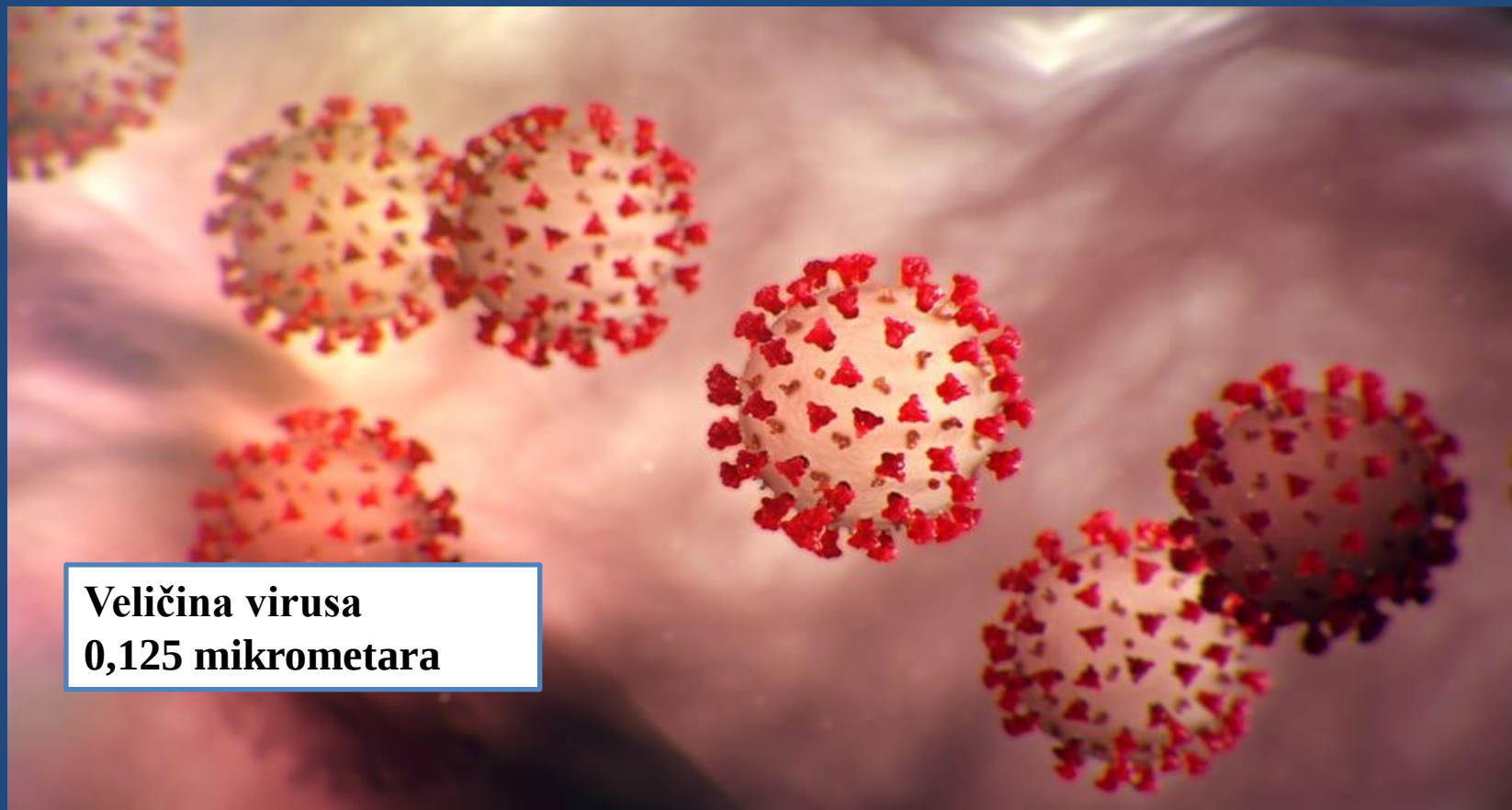
PCR testovi mogu da otkriju 100 virusnih čestica u jednom mililitru tečnosti

Antigenskim testom možete da otkrijete 1.650 virusnih čestica u istoj toj količini.

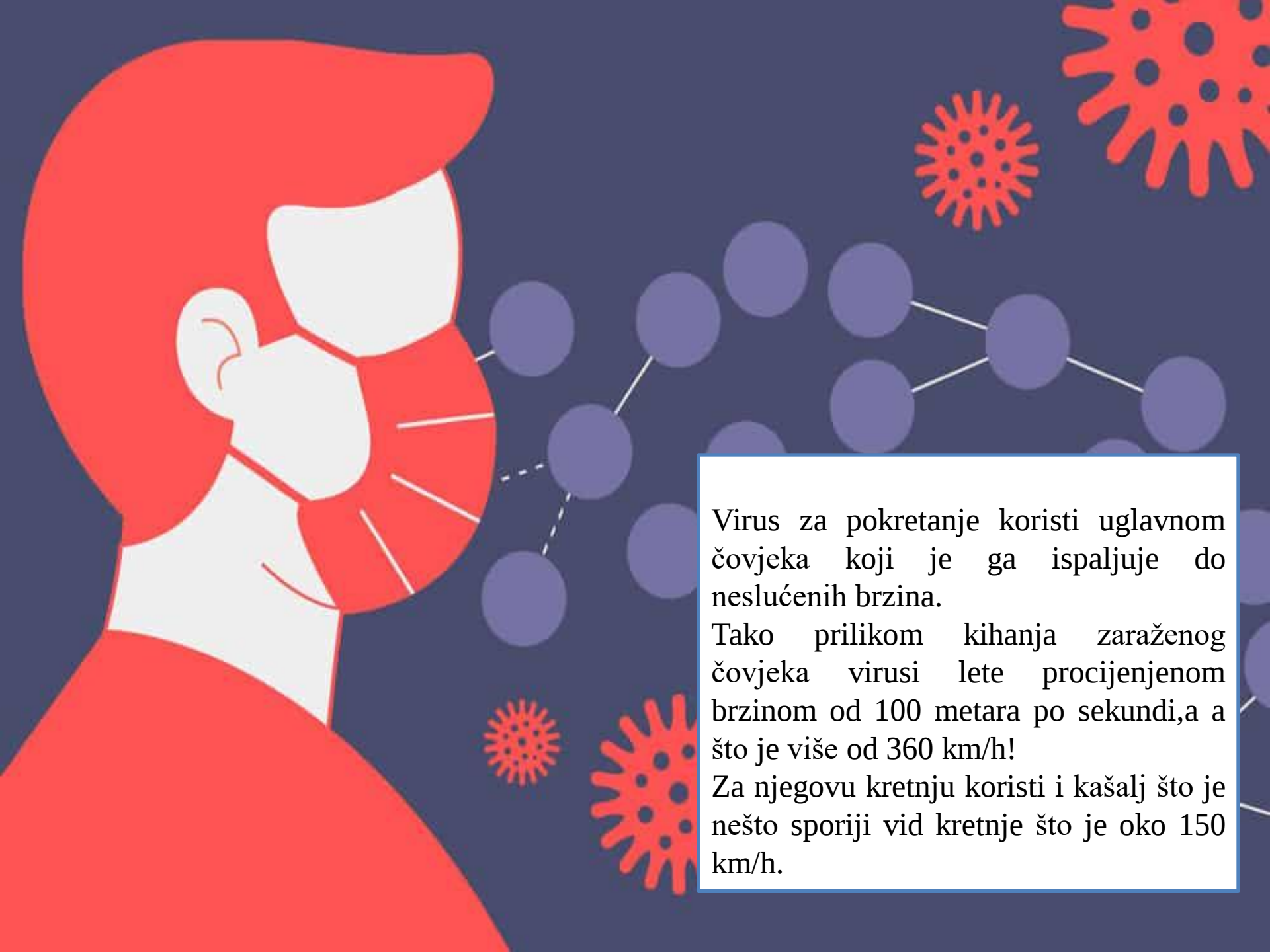
To znači da antigenski testovi imaju manju senzitivnost u odnosu na PCR odnosno da je potrebno da inficirana osoba ima već količinu virusa u sebi da bi antigenski test pokazao da je zaražena

S tim da kod zaraženog, već dan dva nakon inficiranja, postoji i milion virusnih čestica, pa je ova senzitivnost od 1600-1700 čestica po mililitru sasvim prihvatljiva.

Nijedan test nema apsolutnu osjetljivost, odnosno da je senzitivost PCR testova između 90-95%, a senzitivnost antigenskih testova ide do 85%.
To znači da 85% ljudi koji su inficirani biti detektovani ovim testom.



**Veličina virusa
0,125 mikrometara**



Virus za pokretanje koristi uglavnom čovjeka koji je ga ispaljuje do neslučenih brzina.

Tako prilikom kihanja zaraženog čovjeka virusi lete procijenjenom brzinom od 100 metara po sekundi, a što je više od 360 km/h!

Za njegovu kretanju koristi i kašalj što je nešto sporiji vid kretanja što je oko 150 km/h.



Nakon samog kihanja ili kašlja
prema istraživanju naučnika,
čestice virusa u zraku ostaju
najmanje 3 sata, dok na
površinama poput plastike,
nehrđajućeg čelika ili kartona
ostaju puno duže.

Plastika i nehrđajući čelik:
čestice su ostale tri dana

Karton: jedan dan

Bakar: četiri sata

Cilj rada

Cilj ovog rada bio je ispitati validnost brzog SARS-CoV -2 testa u dijagnostici virusa korona.

Ispitanici su pacijenti sa simptomima ili bez simptoma javljeni na testiranje u JZU Univerzitetsku bolnicu Foča u periodu mart 2020- do decembar 2020.

Kako se izvodi test na SARS-CoV-2 antigen?

Odgovarajući uzorak za ovu analizu je bris iz nazofarinksa (nosnog dela ždrela).

NPS uzorke koji se testiraju, treba uzeti i rukovati sa njima, standardnim metodama za prikupljanje nazofaringelanih briseva.

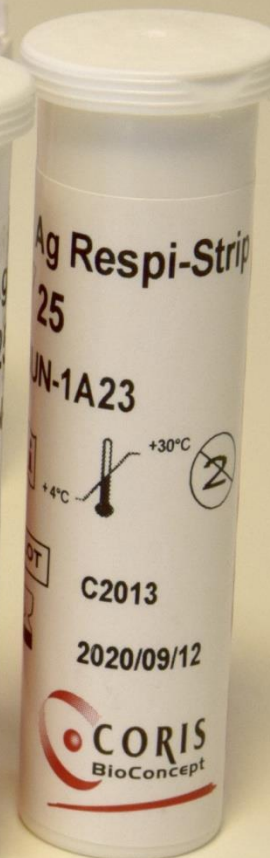
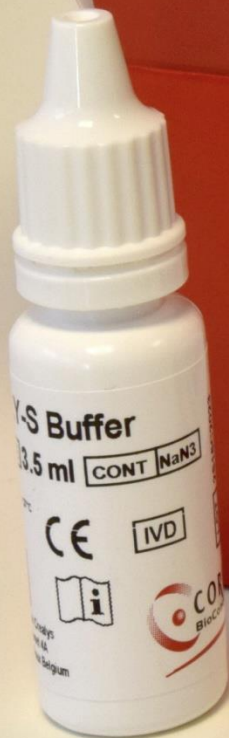
Rastvor mora biti tečan da bih obezbjedio migraciju na testu.

Uzorak mora biti testiran što prije je moguće posle uzimanja uzorka, čak iako je čuvan na temperaturi 2-8°C, jer svako odlaganje može dovesti do lažno negativnih rezultata.

Materijal i metode

Reagensi i materijali

- Kvalitativni test covid 19 Ag Respi- Strip Coris Bio-Concept Belgium :
- Trake u bočici sa deksikantom pakovanje 25-50 komada
- Lys puffer za rastvaranje (6 ili 15 ml)
Fiziološki rastvor puferovan do pH 7.5 koji sadrži Tris, EDTA, NaN_3 <0,1%, deterdžent i blokirajuće proteine
- brisevi,
- plastične epruvete sa zatvaračma za jednokratnu upotrebu,
- zip plastične zatvorene vrećice.



Princip testa

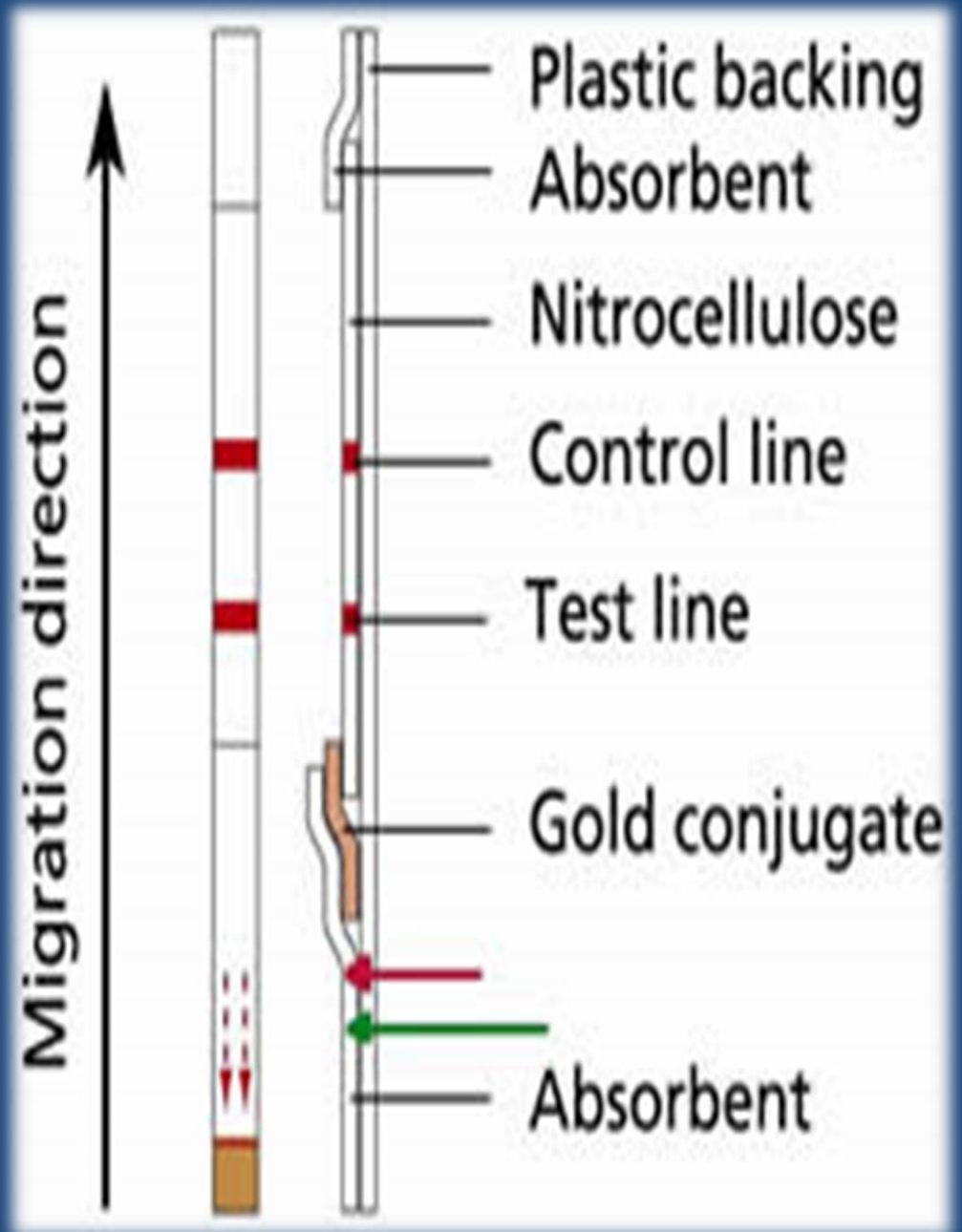
Ovaj test je spreman za upotrebu i zasnovan je na tehnologiji membrane sa nano česticama koloidniog zlata.

Nitrocelulozna membrana je senzibilisana monoklonskim antitijelima usmjerenim protiv SARS-CoV-2 visoko očuvanog nukleoproteinskog antigena.

Drugo monoklonsko antitijelo je konjugovano sa nanočesticama koloidnog zlata.

Konjugat je vezan za membranu .

Kada NPS
(nazofaringealni sekret)
ili rastvor izdvojen iz
kulture ćelija dođe u
kontakt sa trakom,
rastvoreni konjugat se
kreće sa uzorkom na
traci pasivnom
difuzijom tako da
konjugat i uzorak
dolaze u kontakt sa anti
SARS antitjelom
vezanim za
nitroceluloznu traku.

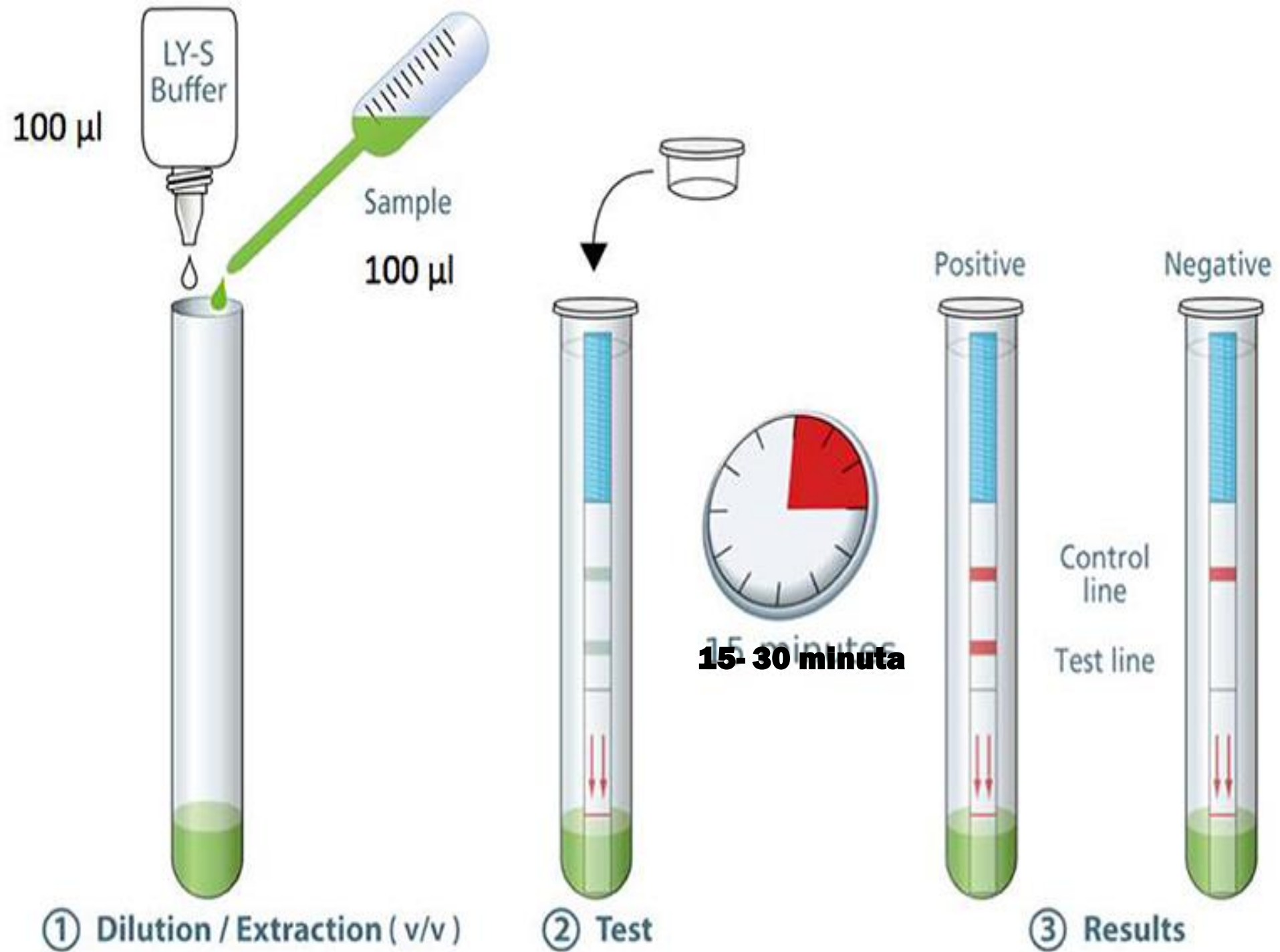


Princip testa

Ukoliko uzorak sadrži SARS CoV 2 konjugat SARS –cOv kompleks će ostati vezan za anti SARS CoV-2 antitjelo vezano na nitroceluloznoj traci.

Rezultat je vidljiv u okviru maksimalno 30 minuta u formi crvene linije (test) koji se razvija na traci.

Rastvor nastavlja da migrira sve do kontrolnog reagensa koji vezuje kontrolni konjugat, tako stvarajući drugu crvenu liniju (kontrola).



Interpretacija rezultata

NEGATIVAN TEST REZULTAT:

Crevenkasto–ljubičasta linija se pojavljuje na mjestu kontrolne linije (C) gornja linija.

POZITIVAN TEST REZULTAT:

Pojavljuje se crvenkasto-ljubičasta linija na mjestu (T).Intenzitet linije varira u zavisnosti od količine antigena pronađenih u uzorku.

Svaka crvenkasto ljubičasta linija . Čak i slaba treba se smatrati pozitivnim uzorkom, čak i prije inkubacije od 30 minuta.

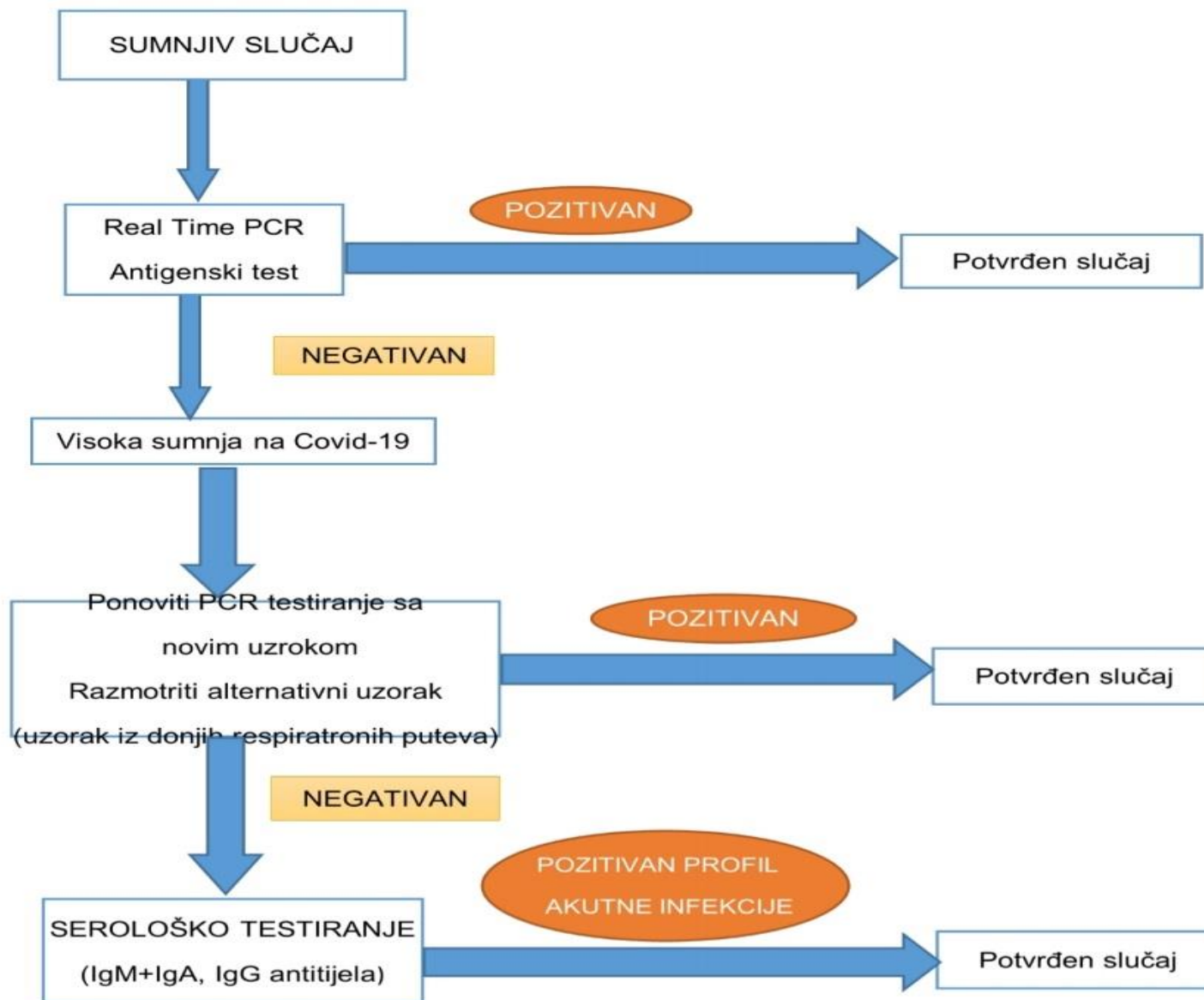
NEVAŽEĆI REZULTAT TESTA:

Kontrolna linija pokazuje da se migracija dogodila do vrha trake.

Traka bez linije nakon 30 minuta smatra se nevažećom.



Algoritam testiranja Covid 19



Specijalne mjere opreza

Sve operacije povezane sa upotrebom testa moraju se izvoditi u skladu sa dobrom laboratorijskom praksom

Svi reagensi su za in vitro dijagnostičku upotrebu

Spriječiti dodirivanje nitrocelulozne trake prstima

Nositi rukavice, masku, FFP2 ili FFP3, laboratorijske naočare.

ODLAGANJE OTPADA

Rukavice briseve i zatvorene epruvete sa uzorcima odložiti u skladu sa GLP i regulativom biološke bezbjednost

ČUVANJE

Čuvanje na temperaturi 4-30C

Rezultati

Testovi su bili najtačniji kada su se koristili u prvom danu nakon što su se simptomi razvili (u prosjeku je 78% potvrđenih slučajeva imalo pozitivne testove na antigen).

Kod osoba koje nisu imale Covid-19, antigenski testovi ispravno su isključili infekciju u 99,5% slučajeva.

Rezultati

1000 ljudi sa simptomima je uradilo test na antigen

50 % njih (5%) imalo je Covid 19 (**pozitivno**)

53 osobe imale pozitivan rezultat na testu

od toga 9 osoba (17%) ne bih imalo Covid 19 (**lažno pozitivno**)

Rezultati

947 osoba imalo bi negativan rezultat na testu Covid 19.

Od toga 6 ljudi (0,6%) je imalo Covid 19 (lažno negativno)

KONTROLA KVALITETA /QUALITY CONTROL

Coris Bio Concept q RT-PCR	POZITIVAN	NEGATIVAN	UKUPNO
POZITIVAN	18	0	18
NEGATIVAN	12	69	81
UKUPNO	30	69	99

Osjetljivost: 60% (40.7 do 76,8%

Prag osjetljivosti: 85,7%

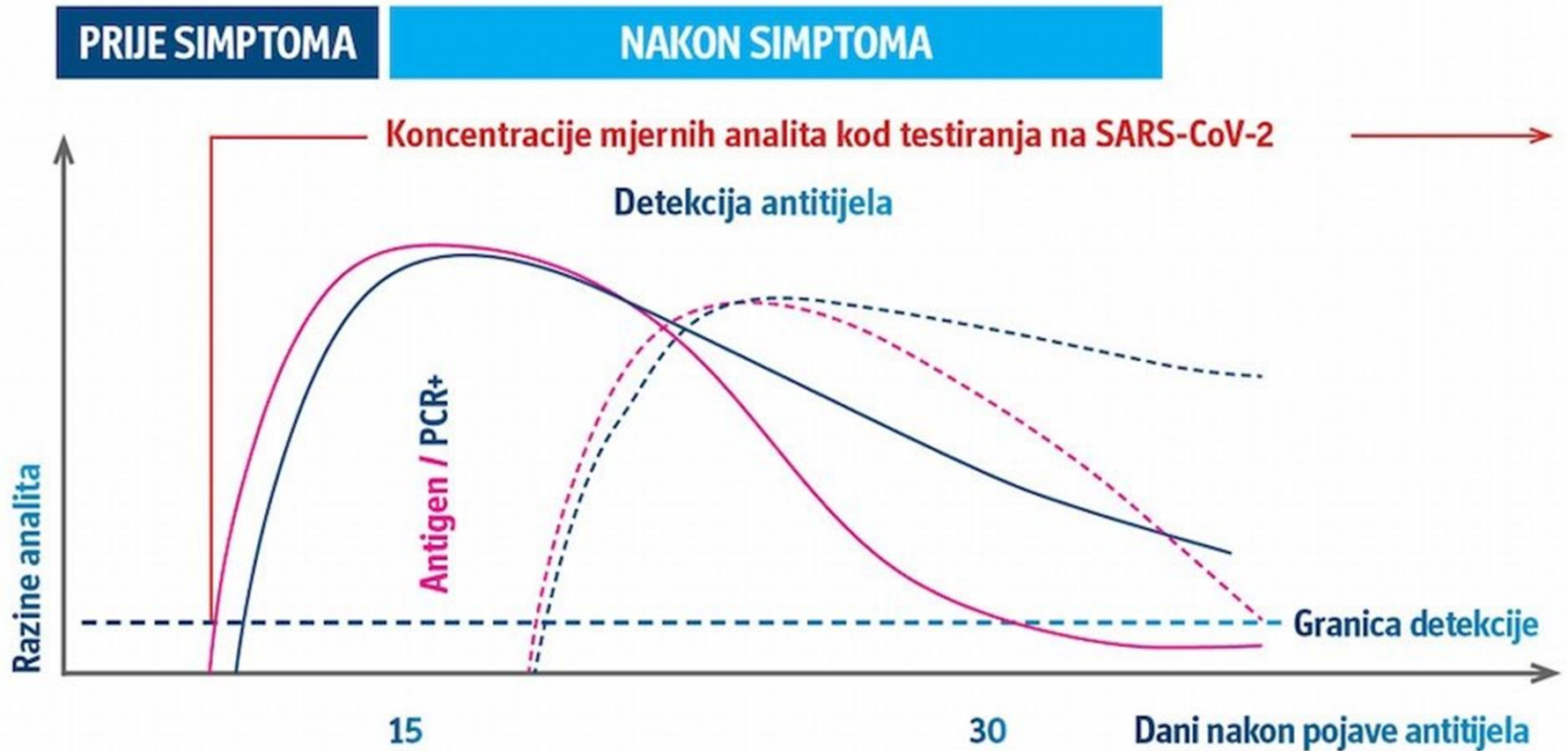
Specifičnost: 100% (93-100%)

Pozitivna prediktivna vrijednost: 100%
(78,1 do 100%)

Negativna prediktivna vrijednost: 82,2%
(75,2m

Poklapanje: 87,9% (87/99)

Rezultati



Dijagram promjene koncentracije antigena i antitijela u krvi

RAZLIKE IZMEĐU MOLEKULARNOG I ANTIGENSKOG TESTA

	Molekularni test (RT-PCR)	Antigenski test
Namjena	detekcija trenutne infekcije	detekcija trenutne infekcije
Analit	virusna RNA	virusni antigeni
Uzorak	bris nazofarinksa/nosa, ispljuvak, slina	bris nazofarinksa/nosa
Osjetljivost	visoka	umjerena
Specifičnost	visoka	visoka
Složenost testa	varijabilna	jednostavan za izvesti
<i>Point-of-care</i>	većina ne	da
TAT	15 min do 2 dana	15 min
Cijena testa	umjerena	niska

Point-of-care – pretraga uz bolesnika; TAT (engl. *Turnaround time*) – vrijeme do izdavanja nalaza

Testovi kod SARS-CoV-2 infekcije

Vrsta testa	Princip	Rezultat	Uzorak	Vrijeme testiranja	Namjena
Real Time-PCR	Detekcija virusnog genoma	NEGATIVAN POZITIVAN NEODREĐEN	Uzorci iz gornjih i donjih respiratornih putova (Najčešće bris nazofarinksa)	1-7 dana od pojave simptoma. Najbolje oko 5 dana.	Potvrda SARS-CoV slučaja Dijagnostika akutne SARS-CoV-2 infekcije
Antigenski test	Detekcija virusnih proteina	NEGATIVAN POZITIVAN	Bris nazofarinksa	U prvih 5 dana od pojave simptoma	Potvrda SARS-CoV slučaja Dijagnostika akutne SARS-CoV-2 infekcije
Serološki test	Detekcija specifičnih SARS-CoV-2 antitijela	NEGATIVAN POZITIVAN GRANIČAN	Serum, plazma, krv	Bilo kad 2—4 tjedna od pojave simptoma	Dijagnostika ranije infekcije (izloženosti SARS-CoV-2 virusu). Epidemiološka istraživanja Dijagnostika akutne infekcije kao suplementarni test

Zaključak

Antigenski testovi dovoljno su precizni da mogu zamijeniti RT-PCR kada se koriste kod pacijenata sa simptomima.

Antigenski testovi su veoma korisni kod izbijanja epidemije, ili za odabir simptomatskih bolesnika čija bi se dijagnoza potvrdila PCR testiranjem, odnosno za provođenje mjera samoizolacije i praćenja kontakata i smanjenje opterećenja rada u laboratoriju.

Svjetska zdravstvena organizacija je 11. septembra 2020. objavila smjernice o detekciji antigena.

Njihova preporuka je da se brzi testovi na antigene mogu koristiti za dijagnostiku infekcije SARS CoV 2 gdje RT-PCR nije dostupna ili za skraćivanje vremena rezultata kada je to klinički potrebno.

Takođe sugerišu da se test može koristiti za praćenje kontakata i testiranje asimptomatskih slučajeva, ali upozoravaju na smanjenu osjetljivost.

Ponovljene testove, ili još bolje potvrdno testiranje RT-PCR negativnih rezultata, treba uraditi kad god je to moguće.

Navode i da se negativni testovi na antigen ne mogu koristiti kao osnova za karantin.

Prema smjernicama WHO antige testovi se ne preporučuju okruženjima ili poulacijama sa malim brojem pacijenata.

Oni navode specifične scenarije kada se brzi test na antigen ne može koristiti:

Pojedinci sa simptomima (osim ako je osoba kontakt sa potvrđenim slučajem)

Kada je broj zaraženih nizak

Na aerodromima i graničnim prelazima

Za skrining pre davanja krvi.

.

HVALA NA PAŽNJI