

# Usporedba seroloških testova i PCR analize u procjeni zaraženosti Corona virusom

---

**Tokalić, Antonela**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split / Sveučilište u Splitu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:933813>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Antonela Tokalić**

**USPOREDBA SEROLOŠKIH TESTOVA I PCR ANALIZE  
U PROCJENI ZARAŽENOSTI CORONA VIRUSOM**

**Završni rad**

Split, 2021. godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Antonela Tokalić**

**USPOREDBA SEROLOŠKIH TESTOVA I PCR ANALIZE  
U PROCJENI ZARAŽENOSTI CORONA VIRUSOM**

**THE COMPARISON OF SEROLOGICAL TESTS AND  
PCR ANALYSIS IN THE ASSESSMENT OF CORONA  
VIRUS INFECTION**

**Završni rad/ Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Prof.dr.sc. Davorka Sutlović**

Sumentor:

**Doc.dr.sc. Sendi Kuret**

Split, 2021. godina.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
Preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijska dijagnostika

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo  
**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Mentor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović  
**Sumentor:** doc. dr. sc. Sendi Kuret

### USPOREDBA SEROLOŠKIH TESTOVA I PCR ANALIZE U PROCJENI ZARAŽENOSTI CORONA VIRUSOM

Antonela Tokalić, broj indeksa: 0346008719

#### Sažetak

**Cilj:** Cilj ovog rada je prikazati serološke i molekularne testove za dijagnostiku SARS-CoV-2 infekcije te usporediti njihovu osnovnu zadaću, prednosti i nedostatke u procjeni zaraženosti korona virusom.

**Materijal i metode:** Identifikacija SARS-CoV-2 provodi se dvjema metodama: molekularnom - RT-qPCR koja otkriva prisutnost samog virusa i serološkim - testovima koji dokazuju kontakt s virusom otkrivanjem antitijela koja su nastala nakon preboljenja bolesti ili nakon cijepljenja.

Za RT-qPCR metodu materijal za analizu je bris uzet iz nosa ili grla, a za serološko testiranje uzima se uzorak krvi.

**Rezultati:** Pozitivan PCR test znači da osoba koja se testira ima virus koji uzrokuje COVID-19. Pozitivan test na antitijela znači da je osoba koja se testirala u prošlosti vjerojatno zaražena COVID-19 i da su u njezinom imunološkom sustavu nastala antitijela.

**Zaključak:** PCR testovima se identificira prisustvo samog virusa organizmu kako bi se utvrdilo postoji li aktivna infekcija SARSCoV-2. Serološkim testiranjem se utvrđuje postojanje antitijela protiv SARS-CoV-2 u krvi kako bi utvrdila je li netko bio zaražen. S obzirom da PCR i serološko testiranje imaju različite prednosti i ograničenja kada se međusobno uspoređuju, najbolje je korištenje obje metoda u pružanju najboljih rezultata.

**Gljučne riječi:** COVID-19, SARS-CoV-2, korona virus, RT-qPCR, serološki testovi

**Rad sadrži:** 36 stranica, 9 tablica, 11 slika i 26 referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav povjerenstva za obranu:**

Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić  
Doc.dr.sc. Antonela Matana  
Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

**Datum obrane:** 1. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**University Department of Health Studies**  
**Bachelor Study of Medical laboratory diagnostics**

**Scientific area:** Biomedicine and health  
**Scientific field:** Clinical medical sciences

**Supervisor:** prof. dr. sc. Davorka Sutlović  
**Co-supervisor:** doc. dr. sc. Sendi Kuret

### THE COMPARISON OF SEROLOGICAL TESTS AND PCR ANALYSIS IN THE ASSESSMENT OF CORONA VIRUS INFECTION

Antonela Tokalić, index number 0346008719

#### Summary

**Objectives:** The aim of this paper is to present serological and molecular tests for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection and to compare their basic task, advantages and disadvantages in the assessment of coronavirus infection.

**Material and methods:** Identification of SARS-CoV-2 is performed by two methods: molecular - RT-qPCR which detects the presence of the virus itself and serological - tests that prove contact with the virus by detecting antibodies formed after overcoming the disease or after vaccination.

For the RT-qPCR method, the material for analysis is a swab taken from the nose or throat, and for serological testing, a blood sample is taken.

**Results:** A positive PCR test means that the person being tested has the virus that causes COVID-19. A positive antibody test means that the person being tested was likely infected with COVID-19 in the past and that their immune system developed antibodies to try to fight it off

**Conclusion:** PCR tests identify the presence of the virus itself in the body to determine if there is an active SARSCoV-2 infection. Serological testing determines the presence of antibodies against SARS-CoV-2 in the blood to determine if someone is infected.

Since PCR and serological testing have different advantages and limitations when compared with each other, it is best to use both methods in providing the best results

**Key words:** COVID-19, SARS-CoV-2, corona virus, RT-qPCR, serological test

**Thesis contains:** 36 pages, 9 tables, 11 figures and 26 references

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

Doc.dr.sc. Esmā Čečuk-Jeličić  
Doc.dr.sc. Antonela Matana  
Prof.dr.sc. Davorka Sutlović

**Defense date:** July 1<sup>st</sup>, 2021

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1 SARS-CoV-2</b> .....	2
1.1.1 Struktura koronavirusa .....	2
1.1.2. Putevi prijenosa korona virusa .....	3
1.1.3. Kliničke značajke COVID-19 .....	5
<b>1.2. METODE ODREĐIVANJA COVID-19</b> .....	7
1.2.1. Detekcija virusa metodom RT-PCR .....	7
1.2.2. Detekcija virusa serološkim testovima .....	9
<b>2. CILJ RADA</b> .....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	11
3.1.1. Uzorkovanje materijala za PCR metodu .....	12
3.1.2. Uzorkovanje materijala za serološke testove.....	13
<b>3.2. METODE</b> .....	15
3.2.1. RT-qPCR .....	15
3.2.2. SEROLOŠKO TESTIRANJE .....	20
<b>4. REZULTATI</b> .....	22
4.1. LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche).....	22
4.2. LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche).....	23
4.3. SARS-COV-2 IGG II QUANT (Abbott).....	24
<b>5. RASPRAVA</b> .....	25
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	27
<b>7. LITERATURA</b> .....	28
<b>8. ŽIVOTOPIS</b> .....	31

# 1.UVOD

U prosincu 2019. godine u Kini se pojavio novi oblik korona virusa nazvan SARS-CoV-2 (SARS-coronavirus-2), a bolest koju uzrokuje COVID-19.

To je respiratorna bolest koja izaziva simptome poput kašlja i vrućice, teške upale pluća i smrt. Bolest se širila velikom brzinom i zarazila milijune diljem svijeta. Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije do 29. svibnja 2021. bilo je oko 170,2 milijuna ljudi pozitivno na COVID-19 s 3,54 milijuna potvrđenih smrtnih slučajeva i 152,1 milijuna oporavljenih. [1]

Prva sekvenca genoma SARS-CoV-2 je objavljena 11. siječnja 2020. čime su se odredili standardizirani protokoli za laboratorijsku dijagnostiku, koje uključuju preporuke za korištenje odgovarajućih početnica (engl. *primers*) i proba (engl. *probe*) te uvjeti za odvijanje lančane reakcije polimeraze - PCR (engl. *polymerase chain reaction*). To je omogućilo brzo testiranje na COVID-19 i time je započelo korištenje komercijalno dostupnih "brzih testova" . [2]

S druge strane su se počeli koristiti serološki testovi koji su jeftiniji i jednostavniji za primjenu naspram PCR-a što ih čini alternativom ili svojevrsnom nadopunom toj metodi. [3]

Takvi testovi se međusobno razlikuju prvenstveno u metodi određivanja te ciljevima koji se žele time postići: od otkrivanja antigena SARS-CoV-2, ispitivanja antitijela te kombinacije testova antigena i antitijela.

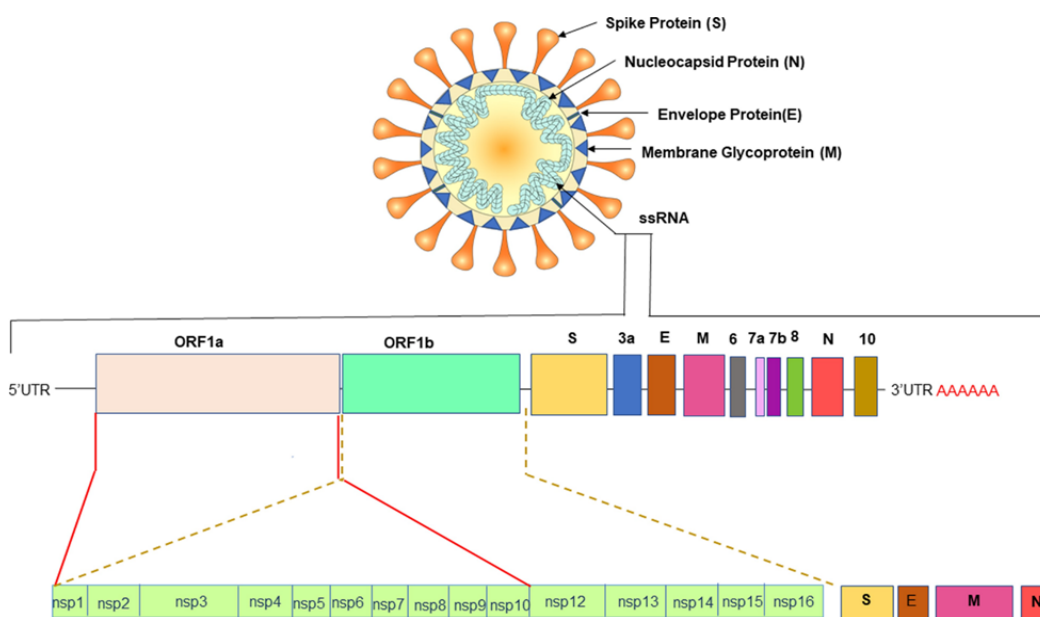
Laboratorijski dijagnostički testovi koriste se u mnoge svrhe: od asimptomatskog probira populacije, ciljanog probira populacije s visokim rizikom zaraze, praćenje kontakata zaraženih osoba, kliničke dijagnoze, praćenja težine bolesti i zaraznosti. [2]

## 1.1 SARS-CoV-2

### 1.1.1 Struktura koronavirusa

Koronavirusi pripadaju potporodici Coronavirinae u obitelji Coronaviridae, a ona sadrži četiri roda: Alphacoronavirus , Betacoronavirus , Gammacoronavirus i Deltacoronavirus.

SARS-CoV-2 je jednolančani pozitivni RNA virus veličine približno 29,9 kB. Nukleokapsidni protein (N) stvara kapsidu izvan genoma, a genom je prekriven ovojnicom povezanom s tri strukturalna proteina: membranskim proteinom (M), proteinom šiljka (engl. spike) (S) i proteinom ovojnice (E). Veličina sekvenciranog genoma SARS-CoV-2 iznosi približno 29,9 kb. Osim četiri strukturalna proteina (S, E, M i N), SARS-CoV-2 sadrži šesnaest nestrukturalnih proteina (nsp1-16) (Slika 1).



**Slika 1.** Struktura korona virusa: SARS coronavirus 2: from genome to infectome  
Meghana Rastogi, Neha Pandey, Astha Shukla & Sunit K. Singh Respiratory Research  
volume 21, Article number: 318 (2020)



Nsp1 posreduje u obradi i replikaciji RNA. Nsp2 modulira signalni put preživljavanja stanice domaćina. Vjeruje se da Nsp3 razdvaja prevedeni protein. Nsp4 sadrži transmembransku domenu 2 (TM2) i modificira ER membrane. Nsp5 sudjeluje tijekom replikacije. Nsp6 je dio transmembranske domene. Prisutnost Nsp7 i Nsp8 značajno povećava kombinaciju nsp12 i RNA predloška-početnica. Nsp9 funkcionira kao protein koji veže ssRNA. Uloga Nsp10 je vezana uz metilaciju kapica virusnih mRNA. Nsp12 sadrži RNA-ovisnu RNA polimerazu (RdRp), koja je jedna od glavnih sastojaka replikacije / transkripcije koronavirusa. Nsp13 se veže s ATP, a domena koja veže cink u nsp13 sudjeluje u procesu replikacije i transkripcije. Nsp14 je lektorska domena egzoribonukleaze. Nsp15 ima endoribonukleaznu aktivnost zajedno s manganom. Nsp16 je 2'-O-riboza metiltransferaza. [4,5]

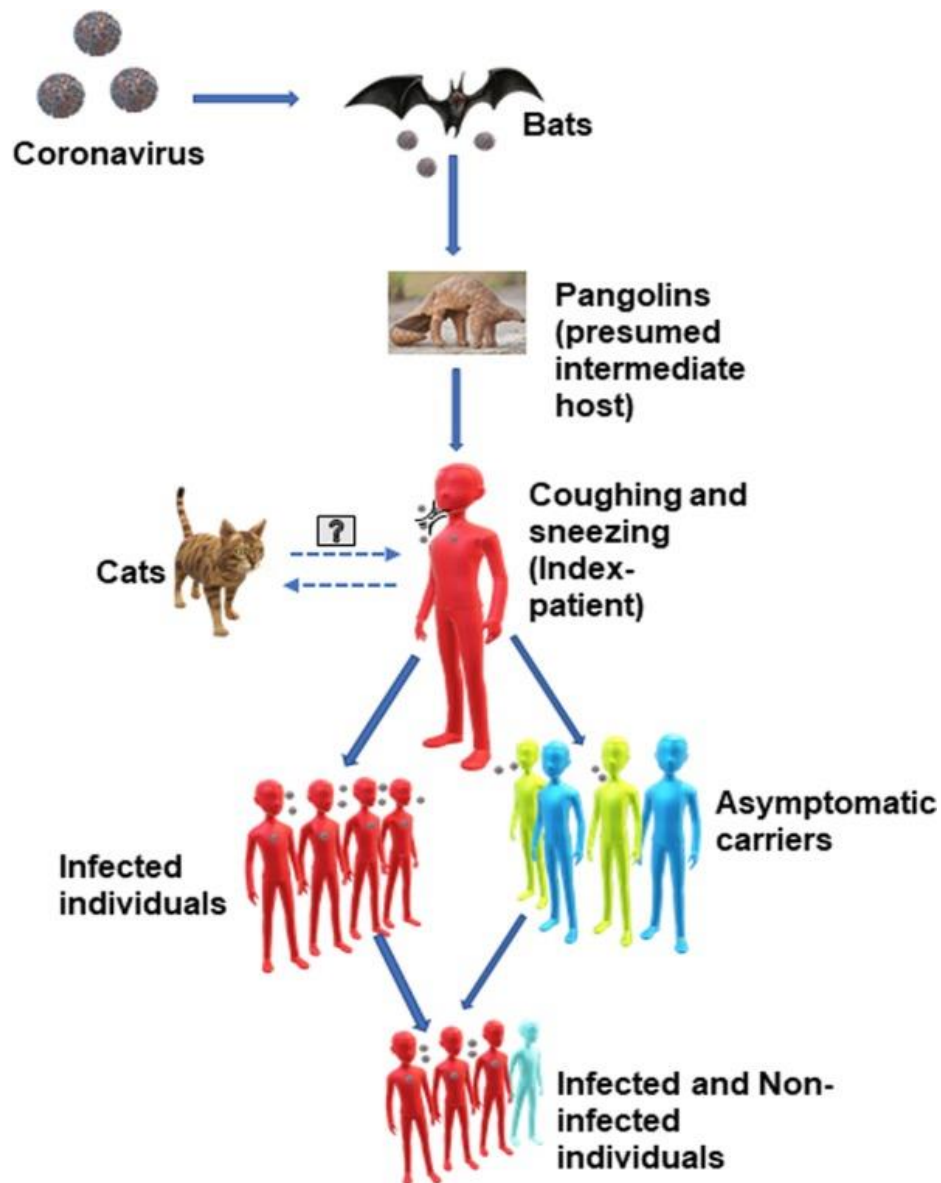
### **1.1.2. Putevi prijenosa korona virusa**

Glavni put širenja SARS-CoV-2 je s čovjeka na čovjeka što se najčešće događa u obitelji, bolnici i raznim okupljanjima. Simptomatski i asimptomatski bolesnici glavni su izvor zaraze. Osim toga, virus se može širiti i posrednim kontaktnim prijenosom, kapljicama koje nastaju tijekom kašljanja i kihanja, a ljudi zatim dotiču sluznicu usta, nosa i očiju uzrokujući infekciju. Istraživanja su pokazala da SARS-CoV-2 nije ograničen samo na respiratorni trakt. Neke studije pokazuju da se virus prenosi i aerosolnim putem.

Tijekom izbijanja COVID-19, istraživala se aerodinamička priroda SARS-CoV-2 mjerenjem virusne RNA u aerosolima u dvije bolnice u Wuhanu, što ukazuje da SARS-CoV-2 ima potencijal širenja kroz aerosole. Nedavna istraživanja pokazuju da bi se SARS-CoV-2 mogao reproducirati i u ljudskim crijevnim organima i crijevnom epitelu. Kao rezultat, SARS-CoV-2 ima potencijal širenja kroz crijevni trakt, a osim toga, urin pacijenta s COVID-19 također sadrži infektivni SARS-CoV-2. [4]

Prema analizi sekvenci, šišmiši su prirodni domaćini SARS-CoV-2 te se virus može prenositi i između životinja. Jedna studija pokazuje da se sekvenca gena beta-korona virusa izolirana iz ljuskavca do 99% podudara s trenutno zaraženim sojem čovjeka. Druga studija pokazuje da SARS-CoV-2 i korona virus iz ljuskavca u Maleziji sadrži visoku genetsku sličnost pri čemu podudarnost gena E iznosi 100 %, gena M 98,6

%, gena N 97,8 % i S gena 90,7%, što bi značilo da postoji vjerojatnost da su ljuskavci intermedijarni domaćini (Slika 2). [4,5]



**Slika 2.** Prijenos korona virusa među različitim organizmima: SARS coronavirus 2: from genome to infectome Meghana Rastogi, Neha Pandey, Astha Shukla & Sunit K. Singh Respiratory Research volume 21, Article number: 318 (2020)

### 1.1.3. Kliničke značajke COVID-19

COVID-19 se najčešće očituje kao vrućica i suhi kašalj. Drugi pokazatelj je bilateralna upala pluća koja se pojavljuje u većinskom dijelu bolesnika. Krvna slika pacijenata pokazuje leukopeniju i limfopeniju. [4]

Prema podacima, razdoblje inkubacije za SARS-COV-2 iznosi prosječno od 7 do 14 dana. Bolest je podijeljena u tri razine po težini simptoma koji se pojavljuju: blagu, tešku i kritičnu Tablica 1. [4,6]

Većina bolesnika ima samo blage simptome i kod njih je brz oporavak. Također su zabilježeni slučajevi asimptomatske infekcije, ali kod većine asimptomatskih bolesnika se bolest nastavila razvijati. [4]

Osim bolesti dišnog sustava, ova virusna infekcija može dovesti do oštećenja miokarda i aritmijskih komplikacija, ali i do neuroloških problema, kao što su mijalgija, glavobolja, vrtoglavica, oslabljena svijest, intrakranijalno krvarenje, pa čak i moždani udar. [4,5]

Također su prijavljeni slučajevi probavnih simptoma i patologije jetre, hiperkoagulabilnost i učestalost pojave tromboze. Kod nekih slučajeva, najčešće onih kritičnih, dolazi do razvoja sindroma respiratornog zatajenja zvanog ARDS (engl. *Acute respiratory distress syndrome*). Uz to je moguće pojavljivanje metaboličke acidoze, septičkog šoka, poremećaja koagulacije i zatajenja većeg broja organa. Prema zabilježenim podacima, oko 26,1% pacijenata primljeno je na JIL zbog komplikacija uzrokovanih COVID-19. [4,5]

Uz pravilnu dijagnozu i liječenje COVID-19, većina pacijenata se brzo oporavi, no starije osobe i pacijenti s osnovnim, teškim, kroničnim bolestima imaju lošiju prognozu koja nažalost uključuje smrtni ishod. [4]

**Tablica 1.** Kliničke manifestacije i tri različite razine COVID-19.

Kliničke manifestacije	vrućica, suhi kašalj, umor, otežano disanje, bolovi u mišićima, zbunjenost, glavobolja, upaljeno grlo, rinoreja, bol u prsima, proljev, mučnina, povraćanje, jeza, stvaranje ispljuvka, hemoptiza, dispneja, anoreksija obostrane upale pluća, bol u prsima, leukopenija, limfopenija, poremećaji mirisa i okusa, više razine citokina u plazmi (IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A i TNF $\alpha$ ) (ICU pacijenti)	
Tri različite razine COVID-19	Blaga	vrućica, kašalj, umor, blaga upala pluća ili njen izostanak
	Ozbiljna	dispneja, zasićenje krvi kisikom $\leq 93\%$ , frekvencija disanja $\geq 30$ / min, parcijalni tlak arterijskog kisika prema udjelu nadahnutog omjera kisika $< 300$ i / ili plućni infiltrati $> 50\%$ u roku od 24 do 48 h, potreban je ICU
	Kritična	sindrom akutnog respiratornog zatajenja (ARDS), respiratorno zatajenje, septički šok i / ili disfunkcija ili zatajenje više organa, teško ispravljiva metabolička acidoza, septički šok, disfunkcija zgrušavanja krvi

Wang MOJ, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Razvoj strukture, biologije i terapije zasnovane na strukturi. Infekt prednjih stanica mikrobiolom . 2020; 10: 587269. Objavljeno 2020. 25. studenoga. Doi: 10.3389 / fcimb.2020.587269

## 1.2. METODE ODREĐIVANJA COVID-19

Identifikacija SARS-CoV-2 provodi se dvjema metodama:

- 1) RT-qPCR kojim se otkriva prisutnost samog virusa
- 2) serološkim testovima kojima se dokazuje kontakt s virusom otkrivanjem protutijela nastala nakon preboljene bolesti ili nakon cijepljenja. [7]

### 1.2.1. Detekcija virusa metodom RT-PCR

RT-qPCR ( engl. *Reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction*) jedna je od najčešće korištenih laboratorijskih metoda za otkrivanje virusa COVID-19 za koju se moraju uzeti uzorci gornjeg respiratornog trakta (nazofaringealni i orofaringealni brisevi). To je vrlo osjetljiva i specifična metoda koja može dati pouzdanu dijagnozu prisutnosti virusne RNA već u roku od tri sata.[8]

Za PCR su potrebne samo male količine DNA kako bi se stvorilo dovoljno kopija za analizu što ovu metodu čini vrlo osjetljivom. Reakcijska smjesa za PCR sadrži sve dijelove potrebne za replikaciju DNA:

- 1) DNA predložak
- 2) Početnice (engl. *primers*)
- 3) Nukleotidi (deoksiribonukleotid trifosfati)
- 4) DNA polimeraza – Taq polimeraza
- 5) Bivalentni ioni (najčešće  $Mg^{2+}$ )

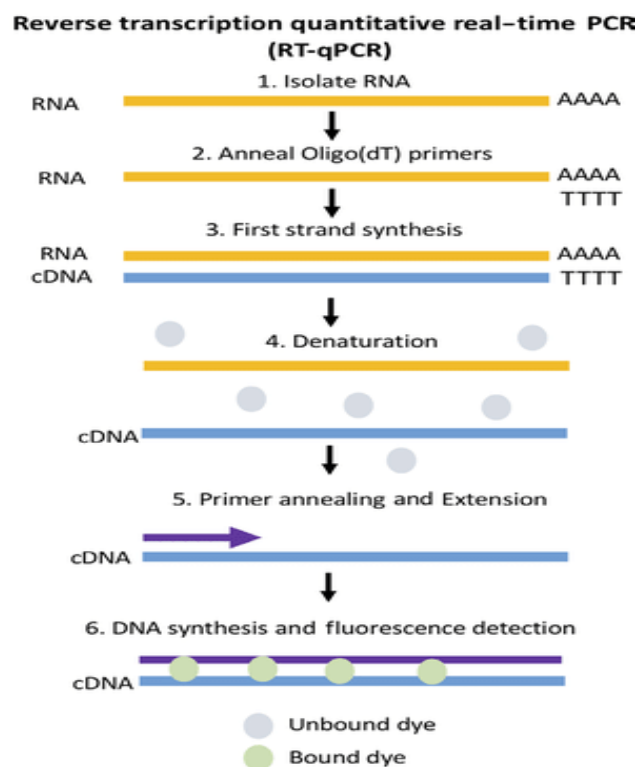
Taq polimeraza je enzim koji povezuje pojedinačne nukleotide kako bi dobili konačan produkt potreban za reakciju PCR-a. Time nukleotidi čine građevne blokove, a razlikujemo četiri baze - adenin, timin, citozin i gvanin (A, T, C, G) - koje se nalaze u DNA. Primeri su kratki oligonukleotidni sljedovi komplementarni ciljanoj DNA koju treba detektirati i umnožiti.

Umnožavanje DNA odvija se u tri osnovna koraka:

- 1) DENATURACIJA DNA (engl. *Denaturation*) predložka odnosno razdvajanje komplementarnih lanaca na 94-96°C
- 2) HIBRIDIZACIJA početnica (engl. *Annealing*) pri čemu dolazi do vezanja početnica na komplementarne sljedove DNA predložka na 40-60°C
- 3) PRODULJIVANJE LANCA (engl. *Elongation*) na temperaturi od 72°C

Ova tri koraka se ciklički ponavljaju 20-40 puta (ovisno o potrebi), a svakim ponavljanjem se broj kopiranih molekula DNA udvostručuje .[9]

RT-qPCR je jedna od verzija PCR metode koja se prvenstveno koristi za mjerenje količine određene RNA Slika 3.



**Slika 3.** RT-qPCR. Adams, Grace. (2020). A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. The Biochemist. 42. 10.1042/BIO20200034.

### 1.2.2. Detekcija virusa serološkim testovima

Serološki testovi pomažu u procjeni udjela pojedinaca koji su prethodno bili zaraženi u populaciji na način da detektiraju prisutnost antitijela (specifični imuni odgovor) na SARS-CoV-2 antigenske proteine. Otkrivanje specifičnih antitijela (IgM, IgA i IgG) se provodi jako brzo, a osim za potvrđivanje infekcije SARS-CoV-2 u bolesnika s PCR-pozitivnim COVID-19, korisno je i kod asimptomatskih infekcija te nedijagnosticiranih bolesnika, za ispitivanje osjetljivosti i otpornosti na ponovnu infekciju. [10,11]

Serološko testiranje se radi iz uzorka krvi, a dostupni su kvantitativni i kvalitativni testovi pri čemu pozitivan rezultat pokazuje da je osoba bila izložena SARS-CoV-2 virusu u prošlosti i definira odgovor domaćina na infekciju. [12,13]

Cilj ljudskih protutijela je uništiti virus na način da prepoznaju protein (S) koji se nalazi na površini virusa, a serološkim testovima se otkrivaju serumska IgM, IgG i IgA protutijela. [11,12]

IgM protutijela su prva protutijela koja se javljaju kao odgovor na virusnu infekciju. Obično se pojavljuju krajem prvog tjedna od početka bolesti, znači tijekom akutne faze, a zatim nestaju. Ubrzo nakon IgM, se javljaju IgG protutijela koja dosežu visoku razinu tijekom akutne faze bolesti, a nakon preboljenja bolesti njihova razina opada na niže vrijednosti te takva ostaju prisutna dulje vrijeme. IgA antitijela pokazuju sličnu pojavnost kao i IgM antitijela. [12]

Drugi protein koji se čini važnim antigenim mjestom za razvoj seroloških testova za otkrivanje COVID-19 je protein N, koji je strukturna komponenta spiralnog nukleokapsida. N protein ima važnu ulogu u virusnoj patogenezi, replikaciji i pakiranju RNA. Protutijela na N protein često se otkrivaju u bolesnika s COVID-19 što sugerira da je protein N jedan od imunodominantnih antigena u ranoj dijagnozi COVID-19. [11]

Ovu metodu je moguće odrediti iz pune krvi (venske ili kapilarne), seruma ili plazme. Reagensi potrebni za reakciju su anti-humani IgM i anti-humani IgG koji se hvataju za antigen SARS-CoV-2 (nukleokapsidni protein) koji se pokušava detektirati. [10]

## **2. CILJ RADA**

Cilj ovog rada je prikazati serološke i molekularne testove za dijagnostiku SARS-CoV-2 infekcije te usporediti njihovu osnovnu zadaću, prednosti i nedostatke u procjeni zaraženosti korona virusom.



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. MATERIJAL

Prije uzorkovanja potrebno je obući zaštitnu opremu koja uključuje: zaštitni ogrtač, rukavice, zaštitnu masku i štitnik za lice te pripremiti pribor za uzorkovanje (Slika 4).

[14]



**Slika 4.** Osobna zaštitna oprema: Francisco M. Marty, M.D., Kaiwen Chen, B.S., and Kelly A. Verrill, R.N. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. The New England Journal of Medicine May 28, 2020 N Engl J Med 2020; 382:e76 DOI: 10.1056/NEJMvcm2010260,

### 3.1.1. Uzorkovanje materijala za PCR metodu

Kod dijagnosticiranja SARS-CoV-2 PCR metodom preporučuje se prikupljanje i ispitivanje uzorka gornjih dišnih putova (nazofaringealni i orofaringealni brisevi). Uzorkovanje može izvesti samo osoba koja je obučena za uzimanje ovih briseva. [15]

U iznimnim situacijama na primjer kod pacijenata koji su pod invazivnom mehaničkom ventilacijom, uzorak aspirata donjeg respiratornog trakta ili bronhoalveolarnog ispirka se može koristiti kao uzorak za testiranje na SARS-CoV-2. [16]

Pribor za uzorkovanje:

1. tanki plastični i vrlo savitljivi štapić s vrhom od sintetičkog materijala koji je hiperadsorptivan
2. epruveta s medijem

Postupak:

1. Na epruvetu s medijem napisati ime i prezime pacijenta i datum rođenja.
2. Izvaditi obris iz pakiranja.
3. Nagnuti glavu pacijenta za 70 stupnjeva unazad.
4. Lagano uvući štapić u nosnicu paralelnu s nepcem (ne prema gore), uz donji nosni hodnik do nazofarinksa dok se ne osjeti otpor (Slika 5.)
5. Zarotirati štapić par puta te ostaviti nekoliko sekundi radi apsorpcije sekreta i stanica.
6. Polako, okretanjem, ukloniti štapić.
7. Otvoriti epruvetu s medijem.
8. Staviti obris u epruvetu i prelomiti ga - tako da vrh bude uronjen u medij.
9. Epruvetu dobro zatvoriti čepom na navoj



**Slika 5.** Uzorkovanje nazofaringealnog brisa: Francisco M. Marty, M.D., Kaiwen Chen, B.S., and Kelly A. Verrill, R.N. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. The New England Journal of Medicine May 28, 2020 N Engl J Med 2020; 382:e76 DOI: 10.1056/NEJMvcem2010260,

### 3.1.2. Uzorkovanje materijala za serološke testove

Serološko testiranje se radi iz uzorka venske krvi uz pomoć imunokromatografskog testa koji određuje prisutnost IgM i IgG protutijela na SARS-CoV-2 virus.

Glavni uzorak za serološku dijagnostiku je serum koji se dobiva iz pune venske krvi. U sterilnu epruvetu u aseptičkim uvjetima treba uzeti 5-10 mL pune krvi:

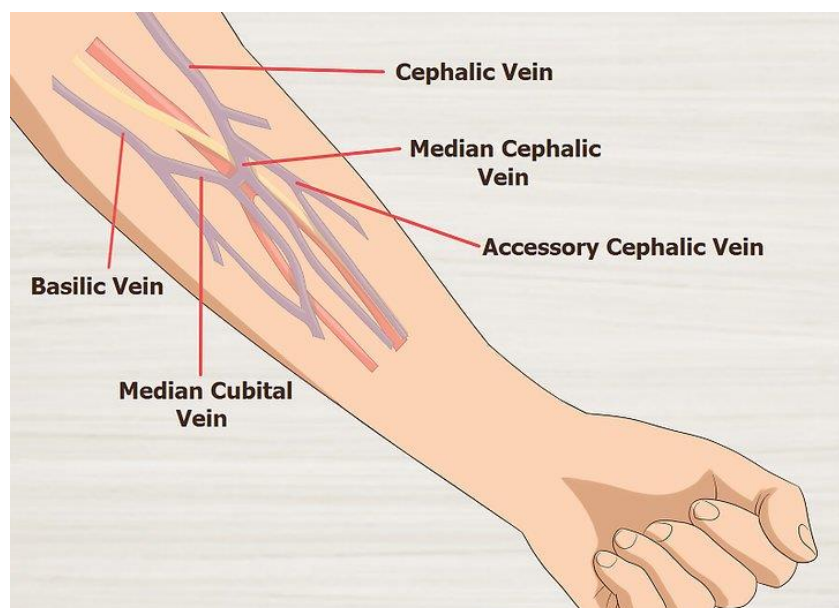
ostaviti na sobnoj temperaturi

centrifugirati (na 3000 rpm / 5-10 minuta)

oprezno odvojiti supernatant u novu praznu epruvetu = SERUM

Postupak:

Najčešće mjesto uboda pri uzrokovanju krvi je površinska, antekubitalna vena. Ukoliko ona nije dostupna, uzorkovanje se može učiniti i iz vena nadlanice Slika 6. [17]



**Slika 6.** Odabir vene za venepunkciju

## 3.2. METODE

### 3.2.1. RT-qPCR

#### 3.2.1.1. IZOLACIJA RNA –( *Viral DNA/RNA Extraction Kits TIANLONG*)

Za određivanje RNA iz seruma ili nekog drugog tekućeg uzorka potrebno je najprije izolirati RNA.

#### Opis i svrha

Za izolaciju se može koristiti komercijalno dostupan kit (Viral DNA/RNA Extraction Kits,) koji omogućava brzu i sigurnu izolaciju kojom se dobije visoko pročišćena nukleinska kiselina u dovoljnoj količini.

Princip kita je u tome da se magnetne kuglice vežu na negativno nabijenu nukleinsku kiselinu, prenose se i oslobađaju putem specijaliziranih magnetskih šipki tijekom procesa ekstrakcije čime se postiže automatizirana ekstrakcija. [18]

#### Sadržaj kita i pohrana

Kit Viral DNA and RNA Extraction Kit– TIANLONG sadrži 4 ekstrakcijske pločice i dostatan je za 64 izolacije . Ekstrakcijske ploče u koje se dodaje uzorak tvornički su napunjene sa svim potrebnim reagensima za izolaciju koja se odvija na aparatu TIANLONG ® GeneRotex96 (Slika 7.) [18]



**Slika 7.** Ekstrakcijske pločice i aparat TIANLONG ® GeneRotex96

## Postupak

Postupak izolacije RNA odvija se u nekoliko koraka:

1. Pločicu za ekstrakciju okretati gore i dolje kako bi se razdvojile i promiješale magnetske kuglice na dnu pločice.
2. Ukloniti aluminijsku foliju s pločice.
3. Dodati 200 ul uzorka i 10 ul EAV kontrole u jažice prvog i sedmog stupca pločice
4. Postaviti pločicu u aparat i pokrenuti program izolacije iz Tablice 2.:

**Tablica 2.** Program izolacije RNA za GeneRotex96:

Stupac	Ime	čekanje (sekunde)	Miješanje (sekunde)	Magnet (sekunde)	Brzina	Volumen ( $\mu$ l)	Stanje grijanja	Temperatura ( $^{\circ}$ C)
1	Liza stanice	0	240	180	3000	825	-	0
2	Pranje 1	0	60	60	2000	700	Ispiranje	100
3	Pranje 2	60	60	60	2000	800	Ispiranje	100
6	otapanje	0	300	120	2500	80	Ispiranje	100
2	Otpuštanje znaca	0	10	0	2500	700	-	0

5. Dobivene izolirane RNA koje se nalaze u šestom i dvanaestom stupcu pločice prebaciti epruvete pohraniti na  $4^{\circ}$ C do 24 h, a za dužu pohranu staviti na  $-20^{\circ}$ C.

### 3.2.1.2. AMPLIFIKACIJA I DETEKCIJA

Kitovi LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche) i LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche) koriste se za RT-qPCR za detekciju COVID-19 infekcije.

#### Opis kitova, sadržaj i pohrana

##### **LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control kit**

Ovim se testom detektira virus SARS-CoV-2 kao i drugi virusi povezani s SARS-om koji su podrijetlom od šišmiša (Sarbecovirus ). Sadrži Fragment dug 76 bp iz konzerviranog područja u genu E označen sa FAM fluorescentnom bojom čija se fluorescencija detektira u kanalu 530 i softverski obrađuje. Kit sadrži reagense za 96 PCR reakcija Tablica 3. [19]

**Tablica 3.** Sadržaj i pohrana kita za E-gen

1 bočica (žuta) liofilizirane početnice i probe za 96 reakcija	Čuvati na 4°C do 25°C Ne zamrzavati liofilizirane reagense
1 bočica (crna) RNA pozitivna kontrola Cp ~ 30	
1 bočica (bijela) EAV ekstrakcijska kontrola	

##### **LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP kit**

Fragment dug 87 bp iz konzerviranog područja gena o RNA-ovisnoj RNA polimerazi (RdRP) otkriva se probama obilježenim s fluorescentnom bojom FAM (530 kanal). Kit sadrži reagense za za 96 PCR reakcija Tablica 4. [20]

**Tablica 4.** Sadržaj i pohrana kita za R-gen

1 bočica (žuta) liofilizirane početnice i probe za 96 reakcija	Čuvati na 4°C do 25°C Ne zamrzavati liofilizirane reagense
1 bočica (crna) pozitivna kontrola Cp ~ 30	

Svaka analiza mora imati pozitivnu i negativnu kontrolu. Pozitivna kontrola (PC) koristi se kao cjelovita pozitivna kontrola procesa kako bi se potvrdilo da se ispitivanje izvodi kako je predviđeno i temelji se na umjetnoj RNA koja pokriva ciljne sekvence ispitivanja genoma SARS-CoV-2. Negativna kontrola (NTC) služi kao kontrola za praćenje kontaminacije PCR reagensa s mogućim pozitivnim uzorcima sa sekvencama SARS-CoV-2 koja bi se mogla dogoditi tijekom postupka PCR-a. NTC se sastoji od vode.[19,20]

Osim navedenih kitova potreban je i dodatni reagens LightCycler® Multiplex RNA Virus Master te slijedeća oprema: jednokratne rukavice od lateksa, pipete, nastavci za pipete, tubice (1,5 ml), vortex miješalica, stolna centrifuga, 0,2 ml PCR pločica, brtveni film, osobna zaštitna oprema i spremnik za infektivni otpad.

## Postupak

Postupak detekcije i amplifikacije E i R gena se odvija u aparatu Roche LightCycler® 480 II Slika 8. Prije započinjanja cijelog postupka, potrebno je unijeti program u aparat pri kojem se odvija reakcija (Tablica 5). Program se sastoji od četiri dijela: reverzna transkripcija virusne RNA, denaturacija, umnažanje i hlađenje.

Tablica 5: Parametri za programiranje Roche LightCycler® 480 II

Program Step:	<i>RT Step</i>	<i>Denaturation</i>	<i>Cycling</i>			<i>Cooling</i>
<b>Parameter</b>						
Analysis Mode	<b>None</b>	None	Quantification mode			None
Cycles	<b>1</b>	1	45			1
Target [°C]	55	95	95	60 *	72	40
Hold [hh:mm:ss]	00:05:00	00:05:00	00:00:05	00:00:15	00:00:15	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] <b>96</b>	4.4	4.4	4.4	2.2	4.4	1.5
Ramp Rate [°C/s] <b>384</b>	4.6	4.6	4.6	2.4	4.6	2.0
Acquisition Mode	None	None	None	<b>Single</b>	None	None



Priprema početnica, proba, pozitivne kontrole i ekstrakcijske kontrole:

Prema uputama proizvođača koje su priložene u kitu razrijede se početnice, probe, pozitivna kontrola i ekstrakcijska kontrola sa PCR vodom iz kita.

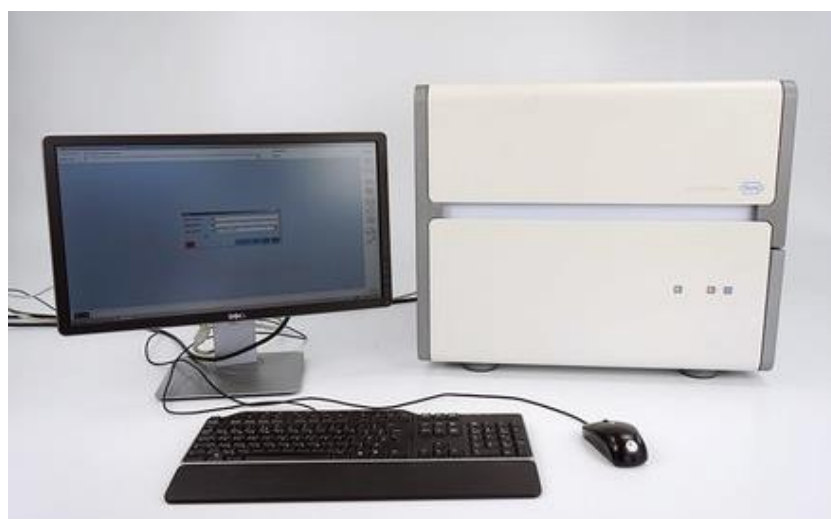
Priprema reakcijske smjese:

Reakcijska smjesa se najprije izračuna na način da se pomnožiti volumen svake pojedine komponente smjese s brojem ( broj uzoraka za analizu + pozitivna kontrola + negativna kontrola + 1) Tablica 6.

Tablica 6. Izračun reakcijske smjese

KOMPONENTE	za 5 µl uzorka	x ( broj uzoraka + pozitivna kontrola + negativna kontrola + 1)
PCR-voda	10.4 µl	
Mješavina početnica i proba	0.5 µl	
Roche Master	4.0 µl	
RT- enzim	0.1 µl	

15 µl reakcijske smjese nanijeti u svaku jažicu PCR pločice, a zatim dodati 5 µl uzorka ili kontrole. Staviti pločicu u aparat i pokrenuti analizu.



Slika 8. Roche LightCycler® 480 II

### **3.2.2. SEROLOŠKO TESTIRANJE**

SARS-COV-2 IG II QUANT(Abbott)

#### Opis i svrha

SARS-CoV IgG II Quant test koristi se kao pomoćna pretraga pri dijagnozi infekcije virusom SARS-CoV zajedno s kliničkom slikom i drugim laboratorijskim testovima.

SARS-CoV-2 IgG II Quant je kemiluminiscentni imunokemijski test za kvalitativno i kvantitativno određivanje IgG antitijela na virus SARS-CoV-2 u humanom serumu i plazmi na analizatoru ARCHITECT i System. [21]

#### Sadržaj kita i pohrana

- Mikročestice - obložene pročišćenim SARS-CoV-2 rekombinantnim antigenom u TRIS puferu sa surfaktantom.
- Konjugat - Antihumani IgG (mišji, monoklonski) konjugat obilježen akridinom u MES puferu sa surfaktantom i proteinskim (goveđim) stabilizatorom.
- Sredstvo za razrjeđivanje - MES pufer s proteinskim (goveđim) stabilizatorima.

Ako se pojavi pogreška kalibracije ili je vrijednost kontrole izvan definiranog raspona, to može ukazivati na propadanje reagensa. Tako dobiveni rezultati testa nisu valjani i uzorke treba ponovno testirati. Ponekad test treba ponovno kalibrirati

#### Postupak

Miješaju se uzorak, paramagnetske mirkočestice obložene SARS-CoV-2 antigenom i tekućina za razrjeđivanje reagensa te se inkubiraju. IgG antitijela na SARS-CoV-2 u uzorku vežu se na mikročestice obložene SARS-CoV-2 antigenom. Smjesa se ispire. Dodaje se akridinom obilježeni anti-humani IgG konjugat kako bi se dobila reakcijska smjesa koja se zatim inkubira. Nakon ciklusa ispiranja, dodaje se predaktivacijska i aktivacijska otopina.

To aktivira kemiluminiscentnu reakciju koja se mjeri i izražava relativnim svjetlosnim jedinicama (RLU engl. relative light unit). Količina IgG antitijela na virus SARS-CoV-2 u uzorku proporcionalna je vrijednosti RLU izmjerenoj optikom analizatora.

U uzorcima ne smije biti mjehurića zraka. Ako ima mjehurića zraka prije testiranja treba ih ukloniti štapićem. Za svaki uzorak treba upotrijebiti novi štapić kako bi se izbjegla križna kontaminacija.

Zamrznute uzorke treba prije miješanja potpuno odmrznuti, dobro promiješati vrtložnom miješalicom (vorteksom) pri maloj brzini miješanja ili okretanjem gore-dolje

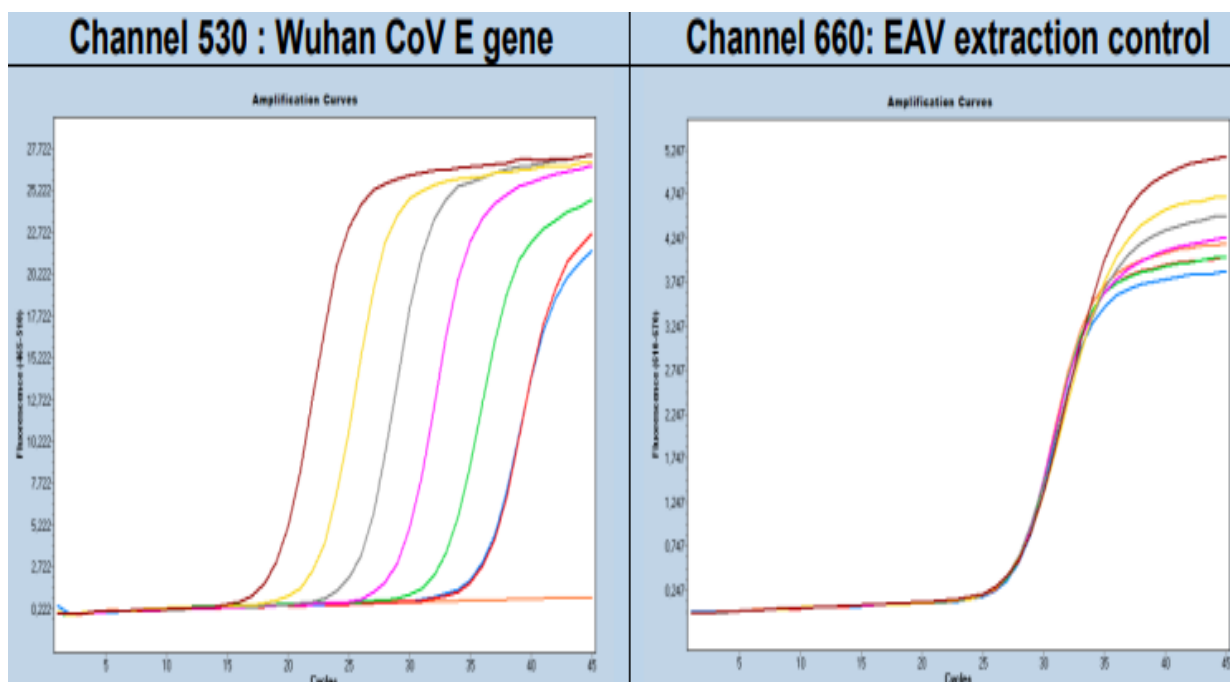
Prije testiranja treba instalirati SARS-CoV-2 IgG II Quant datoteku testa na ARCHITECT i System Slika 9



**Slika 9.** ARCHITECT i System

## 4. REZULTATI

### 4.1. LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche)

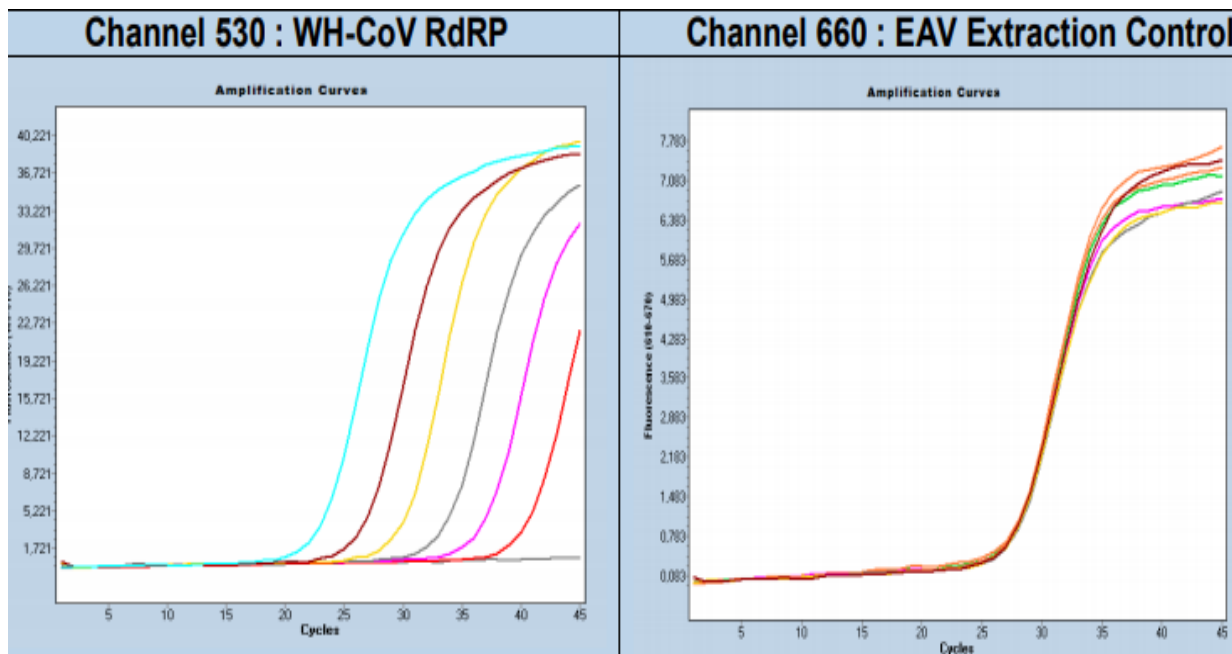


Slika 10. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa

Tablica 7. Prikaz svih mogućih rezultata za E-gen

Channel 530 (sample)	Channel 660 Control Reaction	Channel 530 NTC Control	Result
No amplification	Detectable	Negative	Not detectable
Amplification $C_p < 36^+$	Not relevant	Negative	SarbecoV Positive
No amplification	Not detectable	Not relevant	PCR failure Repeat
Amplification signal	Not relevant	Positive	Contamination Repeat

## 4.2. LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche)



Slika 11. Intenzitet fluorescencije u odnosu na broj ciklusa

Tablica 8. Prikaz svih mogućih rezultata za R-gen

Channel 530 (sample)	Channel 660 Control Reaction	Channel 530 NTC Control	Result
No amplification	Detectable	Negative	Not detectable
Amplification $C_p < 39^+$	Not relevant	Negative	WH-CoV Positive
No amplification	Not detectable	Not relevant	PCR failure Repeat
Amplification signal	Not relevant	Positive	Contamination Repeat

### 4.3. SARS-COV-2 IGG II QUANT (Abbott)

Za točne rezultate uzorci seruma i plazme ne smiju sadržavati fibrin, eritrocite i druge krute čestice

Uzorci s vrijednošću SARS-CoV-2 IgG koja prelazi 40 000,0 AU / ml označeni su kodom "> 40 000,0 AU / mL" i trebaju se razrijediti pomoću protokola za automatsko razrjeđivanje ili ručnim postupkom razrjeđivanja.

#### Protokol automatskog razrjeđivanja

Analizator sam razrjeđuje uzorak u omjeru 1: 2 i automatski izračunava koncentraciju množenjem rezultata s faktorom razrjeđenja.

#### Protokol ručnog razrjeđivanja

Preporučeno razrjeđenje: 1: 2. Treba dodati 75 µl uzorka u 75 µL ARCHITECT.

Kod zadavanja testa, operater mora unijeti faktor ručnog razrjeđivanja uzorka pacijenta ili kontrolnog uzorka. Sustav će koristiti ovaj faktor razrjeđenja i automatski izračunati koncentraciju uzorka te prikazati rezultat. Rezultat mora prije unosa faktora ručnog razrjeđivanja biti  $\geq 22,0$  AU / mL Ako operater ne unese faktor ručnog razrjeđenja, rezultat se mora ručno pomnožiti s odgovarajućim faktorom razrjeđivanja prije ispisa .

Ako je rezultat razrijeđenog uzorka manji od 21,0 AU/mL, ne ispisivati rezultat. Ponoviti test s odgovarajućim razrjeđenjem.

Granična vrijednost (cutoff) je 50.0 AU / mL.

<b><u>AU / mL</u></b>	<b><u>interpretacija</u></b>
-----------------------	------------------------------

<b>&lt; 50.0</b>	<b><i>negativni</i></b>
------------------	-------------------------

<b>&gt; 50.0</b>	<b><i>pozitivni</i></b>
------------------	-------------------------

U dijagnostičke svrhe rezultate ovog testa treba interpretirati zajedno s drugim kliničkim nalazima i dijagnostičkim parametrima.

## 5. RASPRAVA

S obzirom da je cilj ovog rada prikazati i usporediti serološke i molekularne testove za dijagnostiku SARS-CoV-2 infekcije te njihovu osnovnu zadaću, prednosti i nedostatke, u ovom dijelu ćemo to i raspraviti.

U Tablici 8. se nalaze osnovne značajke i razlike između PCR-a i seroloških testova. S obzirom da je cilj ovih metoda različit, u tom smislu se ne mogu usporediti njihove prednosti i nedostaci jer su ovi testovi u ostvarivanju tih ciljeva zasad najbolji. No ipak, metodom RT-qPCR se otkriva prisutnost samog virusa, dok se serološkim testovima dokazuje kontakt s virusom npr. nakon cijepljenja ili preboljenja bolesti što ipak čini jednu od prednosti ovih testova u odnosu na RT-PCR. [8, 22, 23]

Tablica 9. Osnovne razlike između PCR i seroloških testova

Vrsta testa	RT-qPCR	Serološki
Otkrivanje	Otkriva virusni nasljedni materijal (RNK)	Otkriva antitijelo koje tijelo stvara kao odgovor na virus
Vrijeme do dobivanja rezultata	Unutar jednog dana	Unutar sat vremena
Svrha	Otkriva aktivnu i trenutnu infekciju	Otkriva osobe prethodno zaražene SARS-CoV-2, asimptomatske infekcije i daje informaciju o stjecanju imuniteta (preboljenjem bolesti ili cijepljenjem)
Točnost	Jako precizno	Korisno za nadzor i zdravstveno planiranje
Trošak	Skup	Jeftiniji
Rekviziti	Zahtijeva liječnički recept	Ne zahtijeva liječnički recept
Prednosti	Korisno za pojedinačna ispitivanja	Korisno za masovne preglede
Uzorkovanje	Bris nosa ili grla	Krv
Osjetljivost	Vrlo osjetljiva	Korisno za nadzor, a ne za dijagnozu

Za razliku od metode PCR koja može otkriti samo trenutnu infekciju, serološkim testom se može otkriti preboljela, ali i asimptomatska infekcija. Osim toga, može nam dati podatak o razvoju imuniteta stečenim nakon preboljene bolesti ili cijepljenjem protiv SARS-CoV-2. Međutim, serološkim testom se ne pokazuje je li osoba trenutno inficirana, a da još ne pokazuje simptome, pri čemu negativni rezultat ne isključuje mogućnost da nije došlo do infekcije jer mali broj ljudi možda ne razvije dovoljan broj antitijela potreban za detekciju. Štoviše, ovi testovi nisu toliko osjetljivi (točni) kao standardni RT-qPCR testovi koji se koriste za preciznu identifikaciju zaraženih osoba. Kod značajnog broja zaraženih test pokazuje lažno negativan nalaz. To čini veliki problem jer za nekoliko dana će ti ljudi proširiti virus među drugima, misleći da su zdravi. [7,8, 22, 23]

S druge strane, značaj RT-qPCR-a u detekciji SARS-CoV-2 je velik. On nam pokazuje je li osoba inficirana prije same pojave simptoma, informira medicinsko osoblje o mjerama koje treba poduzeti da se spriječi širenje, informira je li osoba infektivna, može li zaražena osoba napustiti samoizolaciju i je li na nekoj površini ima ili je bilo virusa (ali ne i da je virus infektivan). Mane ove metode su mogućnost lažno negativnih nalaza prouzrokovane nedovoljnom količinom RNA, neadekvatno uzetim uzorkom, uzorkovanjem u ranom stadiju bolesti kad još nema dovoljne količine virusa potrebnog za replikaciju. Osim toga, osoba može biti lažno pozitivna u slučaju kad je kod osobe koja je preboljela COVID-19, ali su dijelovi virusne RNA još uvijek prisutni u organizmu. Osim navedenog, mane ove metode, u usporedbi s testovima antigena, su visoki financijski troškovi, dulje vrijeme do izdavanja nalaza (iako, za obe metode je potrebno kratko vrijeme do rezultata) i potreba za visoko profesionalnim osobljem za rukovanje uzorcima. [8, 22, 23, 24, 25]



## 6. ZAKLJUČAK

RT-qPCR. PCR testovi su trenutno najbolji način utvrđivanja prisutnosti SARS-CoV-2 pri čemu pozitivni rezultat znači da je virusni genom definitivno prisutan, međutim ne utvrđuje da li je osoba zarazna ili ne. [8,26]

Serološki testovima se utvrđuje prisustvo specifičnih antitijela na virus SARS-CoV-2 te uz RT-qPCR-u čini osnovni dijagnostički test akutne infekcije. Mnogo su jeftiniji i jednostavniji za primjenu nego PCR testovi. [3, 10]

Serološko testiranje dokazuje kontakt s virusom npr. nakon cijepljenja ili preboljenja bolesti što je jedna od prednosti ovih testova u odnosu na RT-PCR. Mogu identificirati osobe prethodno zaražene SARS-CoV-2 čak i ako nikada nisu bile izložene testiranju za vrijeme akutne faze bolesti.

## 7. LITERATURA

[1] Podaci o broju zaraženih, oboljelih i umrlih osoba od COVID-19. Svjetska zdravstvena organizacija [Internet]. Pristupljeno 29. svibnja 2021.

Dostupno na: <https://covid19.who.int/>

[2] Lai CKC, Lam W. Laboratorijsko ispitivanje za dijagnozu COVID-19. *Biochem Biophys Res Commun* . 2021; 538: 226-230. doi: 10.1016 / j.bbrc.2020.10.069

[3] Lisboa Bastos M , Tavaziva G , Abidi S K , Campbell J R , Haraoui L , Johnston J C i sur. Dijagnostička točnost seroloških testova za covid-19: sustavni pregled i metaanaliza *BMJ* 2020; 370 : m2516 doi: 10.1136 / bmj.m2516

[4] Wang MOJ, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Razvoj strukture, biologije i terapije zasnovane na strukturi. *Infekt prednjih stanica mikrobiolom* . 2020; 10: 587269. Objavljeno 2020. 25. studenoga. Doi: 10.3389 / fcimb.2020.587269

[5] Rastogi, M., Pandey, N., Shukla, A. i sur. SARS koronavirus 2: od genoma do infektoma. *Respir Res* 21, 318 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12931-020-01581-z>

[6] Khan M, Khan H, Khan S, Nawaz M. Epidemiološke i kliničke karakteristike slučajeva koronavirusne bolesti (COVID-19) u klinici za probir tijekom ranog razdoblja izbijanja: studija s jednim centrom. *J Med Microbiol* . 2020; 69 (8): 1114-1123. doi: 10.1099 / jmm.0.001231

[7] Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. Dijagnoza COVID-19 -Pregled postojećih metoda. *Biosens Bioelectron* . 2021; 172: 112752. doi: 10.1016 / j.bios.2020.112752

[8] Taleghani N, Taghipour F. Dijagnoza COVID-19 za suzbijanje pandemije: Pregled stanja tehnike. *Biosens Bioelectron* . 2021; 174: 112830. doi: 10.1016 / j.bios.2020.112830

[9] Garibyan L, Avashia N. Lančana reakcija polimeraze. *J Invest Dermatol* . 2013; 133 (3): 1-4. doi: 10.1038 / jid.2013.1

[10] Dortet L, Emeraud C, Vauloup-Fellous C, i sur. Brzo određivanje antitijela na SARS-CoV-2 pomoću noćnog serološkog testa uz pomoć postelje, točke njege. *Emerg Microbs Infect* . 2020; 9 (1): 2212-2221. doi: 10.1080 / 22221751.2020.1826892

[11] Tang YW, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW. Laboratorijska dijagnostika COVID-19: Aktualna pitanja i izazovi. *J Clin Microbiol* . 2020; 58 (6): e00512-20. Objavljeno 2020. 26. svibnja doi: 10.1128 / JCM.00512-20

[12] Padoan A, Sciacovelli L, Basso D, i sur. Odgovor IgA-Ab na glikoprotein proteina SARS-CoV-2 u bolesnika s COVID-19: Longitudinalna studija. Clin Chim Acta . 2020; 507: 164-166. doi: 10.1016 / j.cca.2020.04.026

[13] Meyer B, Torriani G, Yerly S i sur. Validacija komercijalno dostupnog serološkog imunološkog ispitivanja SARS-CoV-2. Clin Microbiol Infect . 2020; 26 (10): 1386-1394. doi: 10.1016 / j.cmi.2020.06.024

[14] Marty FM, Chen K, Verrill KA. How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. N Engl J Med. 2020 May 28;382(22):e76. doi: 10.1056/NEJMc2010260. Epub 2020 Apr 17. PMID: 32302471.

[15] Uzorkovanje materijala za PCR test. Centers for Disease Control and Prevention. Datum objave: 26. veljače 2021. Pristupljeno 8. lipnja 2021.

Dostupno na: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

[16] Uputa za uzimanje obriska nazofarinksa za testiranje na SARS-CoV-2. Nastavni zavod za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar. Datum objave: 27.04.2020, Pristupljeno 8. lipnja 2021.

Dostupno na: <https://www.stampar.hr/hr/uputa-za-uzimanje-obriska-nazofarinksa-za-testiranje-na-sars-cov-2>

[17] Uzimanje uzoraka za serološku dijagnostiku. Klinika za infektivne bolesti “Dr. Fran Mihaljević” [Internet]. Zavod za kliničku mikrobiologiju. Pristupljeno 9. lipnja 2021.

Dostupno na: <https://bfm.hr/wp-content/uploads/2020/09/Uzimanje-uzoraka-za-serolosku-dijagnostiku.pdf>

[18] Viral DNA/RNA Extraction Kit ( TIANLONG)

[19] LightMix® SarbecoV E-gene plus EAV control (Roche)

[20] LightMix® Modular SARS-CoV-2 (COVID 19) RdRP (Roche)

[21] SARS-COV-2 IG II QUANT(Abbott)

[22] Deeks JJ, Dinnes J, Takwoingi Y, Davenport C, Spijker R, Taylor-Phillips S, i sur. Testovi antitijela za utvrđivanje trenutne i prošle infekcije s SARS-CoV-2. Cochraneova baza podataka sustavnih pregleda 2020, izdanje 6. čl. Broj: CD013652. DOI: 10.1002 / 14651858.CD013652. Pristupljeno 25. lipnja 2021.

[23] Vrste probirnih testova Covid-19. Indus Health Plus, Dostupno na: <https://www.indushealthplus.com/types-of-covid-19-screening-tests.html>

[24] Larremore DB, Wilder B, Lester E, Shehata, S., Burke, JM, Hay, JA i sur. Osjetljivost testa sekundarna je u odnosu na učestalost i vrijeme obrade za probiranje

COVID-19. *Sci Adv* . 2021; 7 (1): eabd5393. Objavljeno 2021. siječnja 1. doi: 10.1126 / sciadv.abd5393

[25] Zhang W, Du RH, Li B, Zheng, XS, Yang, XL, Hu, B. i sur. Molekularno i serološko istraživanje bolesnika zaraženih 2019-nCoV: implikacija višestrukih načina prolijevanja. *Emerg Microbs Infect* . 2020; 9 (1): 386-389. Objavljeno 2020. 17. veljače doi: 10.1080 / 22221751.2020.1729071

[26] Yamayoshi S, Sakai-Tagawa Y, Koga M, Akasaka, O., Nakachi, I., Koh, H, i sur. Usporedba brzih testova na antigen za COVID-19. *Virusi* . 2020; 12 (12): 1420. Objavljeno 2020. 10. prosinca. Doi: 10.3390 / v12121420

## 8. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci

Ime i prezime	Antonela Tokalić
Datum rođenja	04/09/1999
E-mail adresa	antonelatokalic@gmail.com

### Obrazovanje

2006 – 2014 -Osnovna škola „Kraljica Jelena“, Solin

2014 – 2018-Opća gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2018 – 2021-Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Split

### Osobne vještine i kompetencije

Strani jezici:

Osnovno i srednjoškolsko poznavanje engleskog i njemačkog jezika.

Računalne vještine i kompetencije:

Osnove rada na računalu, poznavanje rada u MS Office-u

Druge vještine i kompetencije:

2011 – 2013 Streljačko društvo Dalmacijacement

2013 – 2018 ŽKK Salona