

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu:

**Kratke preporuke za rad u medicinsko biokemijskim laboratorijima za vrijeme
pandemije COVID-19**

Ivana Baršić Lapić^{1,2}, Jasna Leniček Krleža^{1,3}, Ivana Čelap^{1,4}, Renata Laškaj^{1,5}

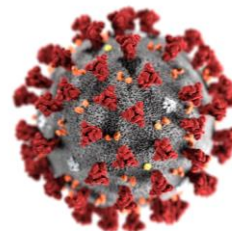
¹Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu, Povjerenstvo za
znanstveno - stručni razvoj, Radna grupa za COVID-19

²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb

³Klinika za dječje bolesti Zagreb, Odjel za medicinsku biokemiju i hematologiju,
Zagreb

⁴Klinički zavod za kemiju, KBC Sestre milosrdnice, Zagreb

⁵Klinika za infektivne bolesti Dr. Fran Mihaljević, Odjel za kliničku biokemiju,
hematologiju i koagulaciju s citologijom, Zagreb



SADRŽAJ

SAŽETAK

UVOD

PODRUČJE PRIMJENE

OSOBNNA ZAŠTITNA OPREMA

PREPORUKE

Preporuka 1. Dostava i primitak uzoraka sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19

Preporuka 2. Prijeanalitička faza laboratorijskog rada

Preporuka 3. Analitička faza laboratorijskog rada

Preporuka 4. Dodatna ispitivanja

Preporuka 5. Pohrana uzoraka

Preporuka 6. Zbrinjavanje otpada

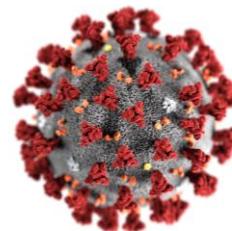
Preporuka 7. Korištenje uređaja za pretrage uz bolesnika (POCT dijagnostika)

DOSTAVA I PRIMITAK BRISEVA ZA TESTIRANJE NA COVID-19

SEROLOŠKI TESTOVI ZA COVID-19

DODATAK Podaci o zastupljenosti SARS CoV-2 virusa u humanim uzorcima koji se analiziraju u laboratoriju

LITERATURA



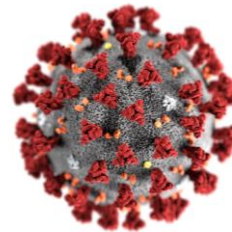
SAŽETAK

U uvjetima strogih preventivnih mjera tijekom pandemije COVID-19, Radna grupa za COVID-19 Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu na temelju dostupne stručne literature i dokumenata Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo napisala je kratke preporuke za rutinski rad unutar medicinsko biokemijskih laboratorija (MBL). Preporuke imaju za cilj pomoći laboratorijskom osoblju u postupanju s uzorcima sa sumnjom na COVID-19 ili potvrđenom dijagnozom COVID-19.

UVOD

COVID -19 (*Corona Virus Disease* iz 2019.) je bolest uzrokovana novim SARS CoV-2 virusom koji se lako širi među osobama svih dobnih skupina oba spola te je u nekoliko mjeseci broj zaraženih u cijelom svijetu porastao toliko da je 11.ožujka 2020. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) proglasila pandemiju COVID-19.

U novonastaloj situaciji kada se o brzini i načinu širenja bolesti, simptomima, težini i ishodu bolesti zna vrlo malo, nove spoznaje dolaze na dnevnoj bazi, a istraživanja o mogućnostima liječenja te cjepivu zahtijevaju vrijeme, nužno je postaviti pravila koja će preventivno što učinkovitije usporiti širenje bolesti. Na toj osnovi cijeli svijet donosi stroge preventivne mjere kako bi se ublažio rast epidemiološke krivulje i umanjio udar

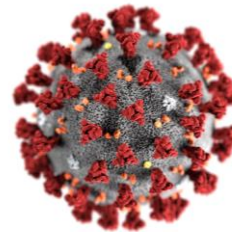


na zdravstveni sustav kojeg ovaj novi virus može nadvladati i u najrazvijenijim zemljama svijeta.

Hrvatski Nacionalni stožer za borbu protiv COVID-19 (HNS COVID-19) propisao je stroge preventivne mjere, a svaka zdravstvena ustanova u Republici Hrvatskoj (RH) u skladu s tim i na temelju svojih mogućnosti i djelokruga rada pisanim Protokolima ustrojava rad u uvjetima COVID-19 pandemije.

Pisani protokoli unutar pojedinih zdravstvenih ustanova vrlo malo govore o postupanju unutar medicinsko biokemijskih laboratorija (MBL) koji se u svom rutinskom radu susreću i s bolesnicima sa sumnjom na COVID-19 ili potvrđenom dijagnozom COVID-19 kao i sa različitim uzorcima ovih bolesnika (krv, serum, mokraćna, stolica, likvor), ali i potrebom zbrinjavanja bolesnika s drugim bolestima (bolesnici s akutnim bolestima i hitnim stanjima te bolesnici s kroničnim bolestima).

Ove preporuke imaju za cilj dati kratke upute za postupanje u rutinskom radu MBL. Napisane su prvenstveno za laboratorijsko osoblje temeljem dostupne stručne literature i spoznaja o novom korona virusu te su usklađene s preporukama HNS COVID-19 i posebitostima uvjeta u kojem zdravstveni sustav RH radi i djeluje. Važno je napomenuti da i u situaciji kada se počnu postupno ukidati restriktivne mjere, život i rad ljudi više neće biti isti. Mnoge mjere će vrijediti sve dok ovaj novi virus ne bude pod kontrolom (primjena cjepiva, liječenje) ili jednostavno nestane. U tu svrhu, formirana je Radna grupa za COVID-19 Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu koja je napisala ove kratke preporuke za rad u MBL u RH. U

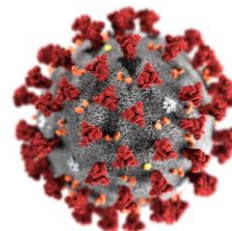


uvjetima COVID-19 pandemije cijeli zdravstveni sustav u RH je podijeljen na „COVID-19“ i „ne-COVID-19“.

Cjelokupni zdravstveni sustav odgađa sve preglede i dijagnostičko terapijske postupke koji nisu akutni i hitni kao i preglede kroničnih bolesnika koji ne zahtijevaju neodgodivo liječenje i dijagnostiku. Na toj je osnovi i rad laboratorija unutar ustanova na svim razinama zdravstvene zaštite prilagođen potrebama tih ustanova. Pojedine zdravstvene ustanove unutar bolničkog sustava organizirane su za isključivo COVID-19 bolesnike, druge bolničke i specijalizirane ustanove kao i hitna medicina su unutar svojih kapaciteta nužno podijeljene na izolirane kapacitete za „ne-COVID-19“ i „COVID-19“ bolesnike koji uključuju i suspektne COVID-19 bolesnike.

Poznato je da postoje i bolesnici koji nemaju simptome, a mogu biti pozitivni na COVID-19 pa je nužno nošenje osobne zaštite (vidi poglavlje „Osobna zaštitna oprema“) kod svakog uzorkovanja krvi kao imperativ u zaštiti laboratorijskog osoblja i bolesnika.

Dječja populacija prema dosadašnjim spoznajama u velikoj mjeri može imati slabo izražene simptome ili su bez simptoma, a istovremeno su COVID-19 pozitivni te lako mogu proći primarnu trijažu kao „ne-COVID-19“. Drugi problem je u pratnji roditelja/skrbnika koji također moraju biti trijažirani na COVID-19 ili ne-COVID-19. Uzorkovanje krvi i preuzimanje uzoraka djece uvijek treba promatrati kao „suspektne COVID-19“ bolesnike, dok su postupci s uzorcima djece unutar laboratorija isti kao i za sve druge uzorke podijeljene na „COVID-19“ i „ne-COVID-19“ opisane u ovim preporukama.



Prema dostupnim literaturnim podacima novorođenčad majki pozitivnih na COVID-19 može biti također pozitivna iako put vertikalnog prijenosa zaraze još uvijek nije jasan u potpunosti. Svi zabilježeni slučajevi novorođenčadi su se potpuno oporavili.

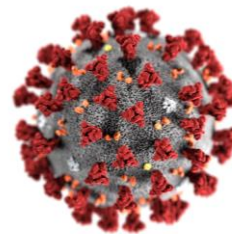
PODRUČJE PRIMJENE

Preporuke su namijenjene za sve medicinsko biokemijske laboratorije koji primaju uzorke bolesnika sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19. U preporukama se ne opisuje postupak molekularne dijagnostike COVID-19 s obzirom da o tom dijelu postoje jasno pisani protokoli.

OSOBNJA ZAŠTITNA OPREMA

Prilikom rukovanja s potencijalno infektivnim uzorcima važno je primjenjivati opće mjere zaštite. U slučaju epidemije COVID-19 najučinkovitije mjere prevencije su:

- Redovito pranje ruku sapunom i vodom u trajanju od 20 sekundi, te nakon toga dezinficiranje ruku s antiseptičkim sredstvom
- Izbjegavanje dodirivanja očiju, nosa i usta
- Kašljati i kihati u savinuti lakat ili papirnatu maramicu
- Nakon uklanjanja maske s lica obavezno oprati i dezinficirati ruke
- Održavanje distance između osoba najmanje 2 metra ukoliko osoba ima neki od respiratornih simptoma



Prema dokumentu Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo „*Racionalna uporaba osobne zaštitne opreme (OZO) za koronavirusnu bolest*“ OZO za djelatnika u laboratoriju koji manipulira uzorcima/brisevima čine:

- Medicinska maska
- Ogrič
- Rukavice
- Zaštita očiju (medicinske naočale i/ili vizir)

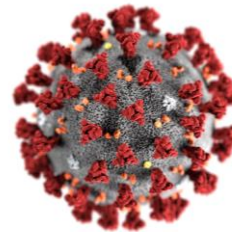
PREPORUKE

Preporuka 1. Dostava i primitak uzoraka sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19

1. Važna je pravovremena komunikacija kliničkog i laboratorijskog osoblja kako bi se smanjio rizik infekcije uzrokovan rukovanjem uzorcima s COVID-19. Iz tog razloga prije dostave uzoraka u laboratorij kliničko osoblje telefonski treba najaviti dostavu istih.

2. Poželjno je da jedan, po mogućnosti dvoje laboratorijska djelatnika u smjeni budu zadužena za prihvaćanje, pripremu i analizu uzoraka

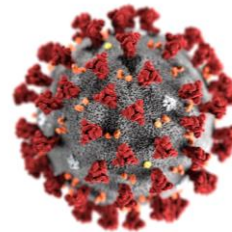
3. U laboratoriju treba biti jasno naznačeno mjesto odlaganja uzoraka sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19 odvojeno od ostalih uzoraka zbog lakšeg pronalaženja uzorka i moguće dodatne manipulacije uzorkom.



4. Uzorci unutar iste ustanove trebaju biti dostavljeni u *ziplock* vrećici dok se kod transporta uzoraka između ustanova mora osigurati da uzorci budu transportirani u čvrstim posudama.
5. Svi uzorci moraju biti jasno označeni i popraćeni uputnicom s naznačenim laboratorijskim pretragama prema postojećim pravilima označavanja uzoraka za laboratorijsku analizu
6. Prije obrade uzorak je poželjno izvana prebrisati dezinficijensom (npr. 70%-tni alkohol)

Preporuka 2. Prijeanalitička faza laboratorijskog rada

1. Uzorke centrifugirati u zasebnoj centrifugi koja se na kraju smjene treba dezinficirati standardnim laboratorijskim postupcima dezinficiranja laboratorijskog prostora i opreme. Alternativno, u slučaju da nije moguće osigurati zasebnu centrifugu, uzorak je potrebno centrifugirati odvojeno od ostalih uzoraka, a nakon toga centrifugu dezinficirati.
2. Nakon centrifugiranja i prije nego se otvori epruveta pričekati 10-ak minuta da se potencijalni aerosol nastao centrifugiranjem spusti
3. Sve analize je poželjno raditi iz primarnog uzorka koji je nakon analize potrebno ponovno začepiti. Ako je potrebno uzorak ručno alikvotirati, obavezna je upotreba svih zaštitnih sredstava, a površinu na kojoj se radi alikvotiranje uzorka potrebno je nakon postupka dezinficirati.

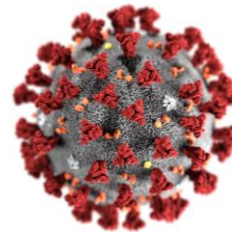


Preporuka 3. Analitička faza laboratorijskog rada

1. Ako organizacija laboratorija to omogućava sve analize provesti iz primarne zatvorene epruvete.
2. Uzorke analizirati na zasebnom *rack*-u jasno označenom da se radi o uzorku sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19.
3. Kod izdavanja kompletne krvne slike i ako rezultati analize to dozvoljavaju izdati diferencijalnu krvnu sliku s uređaj, ne raditi razmaz krvi za mikroskopsku analizu. Ako postoji sumnja na točnost dobivenih rezultata, npr. sumnja na pseudotrombocitopeniju, prisutnost blasta, nezrelih stanica, kontaktirati liječnika te prema kliničkoj indikaciji i potrebi da se na vrijeme poduzmu daljnji dijagnostički postupci napraviti razmaz periferne/kapilarne krvi i mikroskopski provjeriti dobivene vrijednosti. Prilikom toga djelatnik treba koristiti OZO. U suprotnom, ako liječniku nije potreban nalaz mikroskopskog pregleda razmaza periferne/kapilarne krvi na nalazu obavezno navesti „diferencijalna krvna slika s uređaja“ ili „auto dif“ uz dodatnu naznaku da je nalaz izdan u dogovoru s liječnikom.
4. Sve površine koje su bile u kontaktu s uzorkom dezinficirati standardnim laboratorijskim postupkom dezinficiranja prostora i opreme.

Preporuka 4. Dodatna ispitivanja

Ako postoji zahtjev liječnika za dodatnom analizom iz već postojećeg uzorka i ako to stabilnost analita dozvoljava isto treba napraviti uz upotrebu OZO navedene pod „Osobna zaštitna oprema“.



Preporuka 5. Pohrana uzoraka

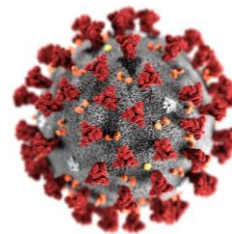
Uzorke pohranjivati u zatvorenim epruvetama prema postojećim laboratorijskim smjernicama/preporukama o pohrani uzoraka, na zasebni stalak jasno označenom da se radi o uzorcima sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19.

Preporuka 6. Zbrinjavanje otpada

Otpad nastao prilikom analize uzoraka te uzorke sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom COVID-19 zbrinjavati prema nacionalnim propisima, tj. kao i svaki drugi potencijalno infektivni laboratorijski otpad. Do sada ne postoje dokazi kojima bi zbrinjavanje tog otpada trebalo provesti na drugačiji način.

Preporuka 7. Korištenje uređaja za pretrage uz bolesnika (POCT dijagnostika)

Za uvođenje uređaja za pretrage uz bolesnika (POCT, engl. *point of care testing*) treba postojati jasna i opravdana klinička potreba i korist u njihovoj primjeni u smislu bržeg zbrinjavanja bolesnika o čemu odlučuje POCT tim (prema važećim Pravilnicima: *Pravilnik o načinu obavljanja medicinsko-biokemijske djelatnosti u liječničkim ordinacijama* i *Pravilnik o načinu obavljanja medicinsko-biokemijske djelatnosti uz bolesnika*). POCT uređaji koji se koriste moraju biti verificirani te se mora osigurati odgovarajuća kontrola kvalitete rada istih, bilo automatskom kontrolom ili zasebnim kontrolnim uzorcima koje treba analizirati kliničko osoblje. Nakon svake analize uzoraka sa sumnjom na COVID-19 ili s potvrđenom dijagnozom na COVID-



19 potrebno je uređaj dezinficirati, a preostali uzorak zbrinuti kao svaki drugi potencijalno infektivni uzorak.

DOSTAVA I PRIMITAK BRISEVA ZA TESTIRANJE NA COVID-19

1. Brisevi se uzimaju sa štapićima izrađenim od isključivo sintetskih materijala i trebaju biti uronjeni u minimalno 1,5 mL fiziološke ili Hanks otopine u spremniku bez antikoagulansa ili aktivatora zgrušavanja.

2. Spremnik s brisom mora biti označen imenom i prezimenom te datumom rođenja

3. Brisevi se transportiraju u dvostrukoj *ziplock* vrećici, a u prvu vrećicu je, uz spremnik, potrebno staviti i adsorbirajući papir za slučaj razlijevanja medija.

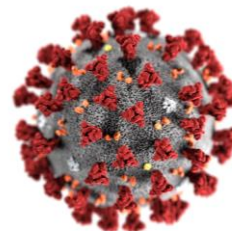
4. Ako je predviđen transport uzorka izvan matične ustanove, vrećicu s uzorkom je potrebno staviti u čvrstu plastičnu kutiju, a u slučaju dužeg transporta, uzorci se dostavljaju na hladnom.

5. Po dostavi, laboratorijski djelatnik obavezno dezinficira vrećicu s uzorkom izvana sa 70%-tim etanolom ili odgovarajućim dezinficijensom te ga obilježenog internim protokolom sprema u predviđeni spremnik za briseve do izrade analize.

Administrativni dio (upis u laboratorijski informacijski sustav) radi drugi djelatnik da bi se smanjila mogućnost kontaminacije radnog prostora (tipkovnica, miševa, stolova..).

6. Za postupak izolacije RNA potrebno je slijediti upute smještaja i okoliša prema SZO.

7. Za postupak izolacije RNA koristiti zaštitnu opremu (kapu, FFP2 ili FFP3 masku, zaštitne naočale, antiviralni zaštitni ogrtač, dugačke nitrilne rukavice (s razinom



zaštite od kemikalija i mikroorganizama) i nazuvke), a sami postupak je obavezno raditi u mikrobiološkom kabinetu (razina biozaštite 2 ili 3).

8. Sav otpad nastao tijekom postupaka izolacije RNA (uključujući jednokratnu zaštitnu opremu) odložiti u vreće za infektivni otpad te ju zavezati, a zavezanu smjestiti u kantu za infektivni otpad.

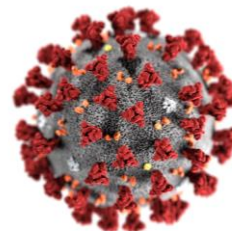
9. Materijal koji se iznosi iz prostora u kojem se radi izolacija RNA (kabinet i prostorija) potrebno je izvana dobro dezinficirati 70%-tnim etanolom.

SEROLOŠKI TESTOVI ZA COVID-19

Trenutno se razvijaju serološki testovi, odnosno testovi za specifična antitijela u uzorcima seruma/plazme. Zhang i sur. otkrili su imunoglobulin G i M (IgG i IgM) iz humanog seruma bolesnika sa COVID-19 pomoću imunokemijskih metoda.

Specifični IgM (akutna faza infekcije) i IgG (konvalescencija) protiv SARS-CoV-2 počinju se povećavati prema nekim autorima oko 5 dana nakon početka simptoma. U većine bolesnika serokonverzija se pojavljuje unutar tri tjedna. Ova antivirusna antitijela nemaju dijagnostičku vrijednost, nego služe za retrospektivnu procjenu izloženosti pojedinca virusu, procjenu humoralnog odgovora domaćina i u epidemiološke svrhe.

Serološki testovi kada budu dostupni na tržištu, kao i svaka druga metoda koja se uvodi u laboratoriju mora proći verifikaciju metode prije rutinskog korištenja. Uz analitičku verifikaciju, a za pravilnu interpretaciju nalaza potrebno je osigurati kliničke i epidemiološke podatke.

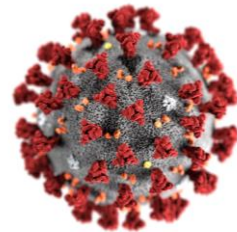


DODATAK Podaci o zastupljenosti SARS CoV-2 virusa u humanim uzorcima koji se analiziraju u laboratoriju

Preuzeto iz: Wang W, Xu Y, Gao R et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. Published online March 11, 2020. doi:10.1001/jama.2020.3786. Dostupno na: <https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/> Datum pristupa: 21.4.2020.

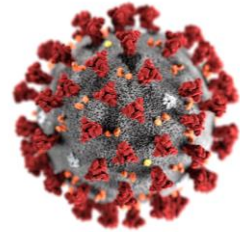


Vrsta uzorka	Udio pozitivnih na SARS-CoV-2
Bronhoalveolarni ispirak	93% (14/15)
Sputum	72% (72/104)
Bris nosa	63% (5/6)
Uzorak sekreta fibrobrohoskopijom	46% (6/13)
Faringealni bris	32% (126/398)
Stolica	29% (44/153)
Krv	1% (3/307)
Mokraća	0% (0/72)



LITERATURA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Nichols JH, Rauch AC. A Laboratory Risk Assessment During the Coronavirus (COVID-19) Pandemic. The Journal of Applied Laboratory Medicine, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa061>, Dostupno na: <https://academic.oup.com/jalm/article/doi/10.1093/jalm/jfaa061/5815983> , Datum pristupa: 19.4.2020.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Interim laboratory biosafety guidelines for handling and processing specimens associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html>. Datum pristupa: 19.4.2020.
3. Jing Cao, Sridevi Devaraj, COVID-19 in Pediatrics: A Laboratory Perspective, The Journal of Applied Laboratory Medicine, jfaa065, <https://doi.org/10.1093/jalm/jfaa065> (Dostupno na: <https://academic.oup.com/jalm/article/doi/10.1093/jalm/jfaa065/5820516>). Datum pristupa: 19.4.2020.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): APHL Risk Assessment Best Practices. Dostupno na: <https://www.aphl.org/programs/preparedness/Documents/APHL%20Risk%20Assessment%20Best%20Practices%20and%20Examples.pdf>. Datum pristupa: 19.4.2020.
5. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. 2020, 382 (8), 727–733.
6. Zhang W, Du R-H, Li B, Zheng X-S, Yang X-L, Hu B at al. Molecular and Serological Investigation of 2019-nCoV Infected Patients: Implication of Multiple Shedding Routes. Emerging Microbes Infect. 2020, 9 (1): 386–389.
7. Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC at al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. ACS Nano, March 30 2020. Dostupno na: <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>. Datum pristupa: 20.4.2020.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Planning for Laboratory Operations During a Disaster; Approved Guideline. CLSI document GP36-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from



Occupationally Acquired Infections, Fourth edition. CLSI M29, 4th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2014

10. Racionalna uporaba osobne zaštitne opreme (OZO) za koronavirusnu bolest (COVID-19). Dostupno na: <https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2020/03/racionalna-uporaba-OZO-zadnje.pdf>. Datum pristupa: 15.4.2020.
11. Upute za pakiranje infektivnih uzoraka - video prilog (Datum objave 6.2.2020.). Dostupno na: <http://www.bfm.hr/page/koronavirus>. Datum pristupa: 18.4.2020.
12. Laboratory Waste Management. Dostupno na: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/lab-biosafety-guidelines.html#lab-waste>. Datum pristupa: 18.4.2020.
13. Pravilnik o načinu obavljanja medicinsko-biokemijske djelatnosti u liječničkim ordinacijama. Dostupno na: https://www.hkmb.hr/dokumenti/propisi/2019_06_28_Pravilnik_o_nacinu_obavljanja_medicinsko-biokemijske_djelatnosti_u_lijecnickim_ordinacijama.pdf. Datum pristupa: 15.4.2020.
14. Pravilnik o načinu obavljanja medicinsko-biokemijske djelatnosti uz bolesnika. Dostupno na: <https://www.hkmb.hr/dokumenti/propisi/HKMB-pravilnik-o-MBD-uz-bolesnika-2003.htm>. Datum pristupa: 15.4.2020.
15. Centrifuge safety. Dostupno na: <https://ehs.stanford.edu/reference/centrifuge-safety>. Datum pristupa: 16.4.2020.
16. Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19). Dostupno na: [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19)). Datum pristupa: 22.4.2020.