

# Slina kao materijal za dijagnostiku infekcije SARS-CoV-2

Monika Burja<sup>1</sup>,  
Magdalena Hajpek<sup>1</sup>  
izv. prof. dr. sc. Vlaho Brailo<sup>2</sup>

[1] studentice 5. godine, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
[2] Zavod za oralnu medicinu, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

U prosincu 2019. godine u gradu Wuhanu u Kini iznenadno se pojavio novi soj emergentnih virusa iz porodice *Coronaviridae*, koji zbog svojih mogućih posljedica zahtjeva brzu prosudbu hitnu reakciju. Riječ je o virusu nazvanom SARS-CoV-2, odnosno *severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2*, uzročniku bolesti *Coronavirus disease 2019*, COVID-19. Vrlo brzo ova je epidemija prešla u pandemiju svjetskih razmjera, što je proglašeno i od strane Svjetske zdravstvene organizacije (1). Najčešći simptomi ove bolesti su vrućica, suhi kašalj i umor, a mogući su i mnogi drugi, uključujući glavobolju, bolove u mišićima, gubitak osjeta okusa i njuha, dijareju, kratak dah. Također, moguć je i letalan ishod (2). Uz kliničku sliku, za dijagnostiku se koristi uzorak prikupljen nazofaringealnim brisom na kojem se zatim provodi laboratorijski *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) test, čime se potvrđuje, odnosno opovrgava, konačna dijagnoza (3). S obzirom na to da ovaj standardni način detekcije zaraženih SARS-CoV-2 virusom ima određene nedostatke, otvara se prostor za razvoj drugih dijagnostičkih alata. Među njima je svakako i slina, koja je u fokusu mnogih istraživanja koja se bave dijagnostikom, kako COVID-a -19, tako i mnogih drugih bolesti.

## Karakteristike sline kao uzorka za detekciju infekcije SARS-CoV-2

Prikupljanje sline neinvazivna je, bezbolna metoda koja ne provocira neugodnost i anksioznost. Jednostavna je i relativno jeftina metoda koja se može koristiti za probir u većoj populaciji. Lako je

primjenjiva za osobe svih dobnih skupina te osobe s poteškoćama u razvoju. Prednost ove metode je i to što se istovremeno može uzeti veći broj uzoraka. Također nije potrebna skupa oprema za uzorkovanje, što bi moglo spriječiti ili bar odgoditi nestašice zaliha. Velika prednost ove metode u odnosu na nazofaringealni bris je to što zdravstvene djelatnike izlaže manjem riziku prijenosa infekcije. Izbjegava se mogućnost iritiranja sluznice farinksa i izazivanja kašlja, odnosno sluznice nosa i izazivanja kihanja. Potreban je i manji broj osoba, koje za ovaj postupak ne trebaju biti izrazito obučeni i vješti, a istovremeno se radna snaga može preraspodijeliti na druge dužnosti u sustavu zdravstva (4, 5). Kontraindikacije za korištenje nazofaringealnih briseva su koagulopatije, antikoagulantna terapija, devijacije septuma nosa (5).

Međutim, u korištenju sline kao uzorka postoje i određene poteškoće. Može doći do razgradnje salivarnih proteina proteolitičkim enzima koji su također prisutni u slini. Ako pacijent koristi lijekove koji utječu na slinovnice, to se može odraziti na sastav i količinu sline. Komponente krvi u slinu pristižu na nepredvidive načine i ne može se uvijek dati točna korelacija između koncentracija u krvi i u slini (4). Iz ovog je vidljivo da postoji još zapreka koje trebaju biti svladane pri korištenju sline za dijagnostiku, kako COVID-a -19, tako i drugih bolesti. Usprkos tome, već postoje razvijeni salivarni testovi za detekciju SARS-CoV-2, ali i za infekcije denga groznice, virusa Zapadnog Nila, ebole, žute groznice, infekcije Zika virusom (5).

## Odakle SARS-CoV-2 u slini?

Na koji način virus SARS-CoV-2 ili njegovi produkti pristižu u slinu nije utvrđeno sa sigurnošću. Postoji nekoliko teorija koje bi mogle diktirati i način na koji bi se slina uzorkovala za testiranje. Debris nazofaringealnog epitela koji se drenira u usnu šupljinu, sulkusna tekućina, zaražene stanice oralne sluznice, gornji i donji respiratorni trakt mogli bi biti izvori iz kojih virus dolazi u slinu (4, 5).

Žlijezde slinovnice mogle bi također biti uključene u snabdijevanje sline virusom i njegovim dijelovima. Jedan od mogućih mehanizama jest endocitoza kojom slinovnice unose virus iz cirkulacije u svoje stanice, te zatim egzocitoza kojom izbacuju viruse u izvodne kanaliće i zatim u usnu šupljinu (5). Drugi mogući mehanizam uključuje receptore ACE2 za koje je dobro poznato da su meta SARS-CoV-2. Ti receptori nalaze se i na stanicama epitela žlijezda slinovnica, što jasno upućuje na zaključak da bi one mogle biti rezervoar virusnih čestica. Taj se receptor nalazi se i na epitelnim stanicama jezika, gingive i bukalne sluznice, ali u nešto manjoj mjeri (4).

Ne treba smetnuti s uma kako bi odabir najbolje metode za dijagnostiku COVID-a -19 mogao ovisiti o samom pojedincu, tj. o načinu na koji kod njega virusne čestice završavaju u slini. Također, moguće je da se neke slučajeve može detektirati samo nazofaringealnim brisom, a neke samo salivarnom dijagnostikom. Postoje i pretpostavke kako različita klinička slika može uvjetovati način na koji je najbolje provesti dijagnostiku (5). Iz prikazanog se

vidi kako je još mnogo nepoznanica u salivarnoj dijagnostici COVID-a -19, čijim će se otkrivanjem ona moći unaprijediti.

### Nazofaringealni/orofaringealni bris vs. slina

Unatoč statusu „zlatnog standarda“, uzorci nazofarinksa daleko su od optimalne osnove za pouzdanu RT-qPCR analizu. U nedavnom istraživanju u kojem je sudjelovalo 205 pacijenata s potvrđenom infekcijom COVID-19, pozitivnost RT-qPCR dosegla je 93% u uzorcima bronhoalveolarnih lavata, u ispljuvku je iznosila 72%, u nazofaringealnom brisu 63%, a samo 32% pozitivnosti u orofaringealnom brisu. Budući da se smatra kako je ACE2 receptor na koji se veže virus gotovo sveprisutan u ljudskom tijelu, takve su razlike u postotcima pozitivnosti itekako opravdane zbog neodgovarajućeg vremena uzimanja uzorka u odnosu na pojavu bolesti, kao i zbog stručnosti u tehnici uzimanja uzorka. (3). Već je ranije spomenuto kako je ACE2 receptor prisutan i u slinovnicama te samim time slina može biti potencijalni izvor i rezervoar zaraze (4). Iz toga razloga, slina se javlja kao moguća alternativa. Uz to, čini se da je slina dobar kandidat za otkrivanje SARS-CoV-2 za slučajeve s umjerenim do teškim simptomima i za asimptomatske ili blage slučajeve. Potonje je posebno važno za provjeru sumnjivih ili asimptomatskih slučajeva, kao i za nadzor zdravstvenih radnika (3).

### Neusklađenost standardizacije uzorkovanja i dijagnostičkih kompleta

Istraživanje Chen i suradnika (14) pokazalo je da je među 13 bolesnika čiji su testovi orofaringealnog brisa bili pozitivni, a od kojih su 4 slučaja također bili pozitivni na uzorke sline. Rezultati meta-analize Czumbel i suradnika (5) pokazali su 91% (CI 80–99%) senzitivnosti uzoraka sline i 98% (CI 89–100%) osjetljivosti za nazofaringealni bris kod pacijenata kod kojih je prethodno potvrđena infekcija SARS-CoV-2. (5). Rezultati sustavnog pregleda literature (eng. *systematic review*) i meta-analize Ricco i suradnika ne razlikuju se

previše od potonje navedenih. Njihovi rezultati govore o specifičnosti sline od 97.7% (95%CI 93.8-99.2) i osjetljivosti od 83.4% (95%CI 73.1–90.4) (3). Međutim, sve studije susreću se s nekoliko bitnih problema, a to su standardizacija uzorkovanja i prikladni reagensi, odnosno, dijagnostički kompleti koji bi trebali biti dizajnirani za uzorak sline. Iako se visoka specifičnost uzorka sline može objasniti kao posljedica namjernog oblikovanja početnica specifičnih za slijed genoma SARS-CoV-2, uzrok relativno niske osjetljivosti može se pronaći u nedostupnosti posebno dizajniranih dijagnostičkih kompleta. Najveći broj istraživanja izvedena su s prenamjenom dijagnostičkih kompleta (kitova) koji nisu posebno dizajnirani za proučavanje uzorka sline. Drugi problem predstavlja i prikupljanje uzoraka sline koje nije standardizirano. Laboratorijske analize također su u određenoj mjeri u neskladu. Posebno su problematične otopine za konzerviranje s obzirom na njihovu heterogenu sposobnost zaštite virusne RNA od razgradnje i mogućeg ometanja ekstrakcijske i qPCR reakcije. Veliki problem predstavlja i uzorkovanje koje nije standardizirano. Različite studije koristile su različite metode za prikupljanje sline, što je svakako moglo imati značajan utjecaj na osjetljivost testa sline (3). Azzi et al. koristili su jednostavnu metodu pasivnog prikupljanja sline koja je zatim pohranjena u 2 ml PBS-a (eng. Phosphate buffer saline) (6). S druge strane, To et al. prikupljali su uzorke sline koja je sadržavala i tekućinu iz stražnjeg dijela orofarinksa dobivenu kašljanjem i pročišćavanjem grla (7). Druga studija (8) zatražila je od pacijenata da skupljaju slinu u ustima prije samog uzorkovanja i pljunu 1-2 ml u posudu za sakupljanje. Prikupljanje sline u ustima može potaknuti dodatno lučenje sline, što bi moglo razrijediti virusno opterećenje u uzorku. Wyllie i sur. koristili su tehniku samoprikupljanja: od pacijenata se tražilo da više puta ispljunu u sterilnu posudu dok se jedna trećina ne napuni (9). Ovakav način također može razrijediti uzorak i razrijediti virusno opterećenje. Dvije studije (7, 9) istaknule su kako

su uzorci prikupljeni rano ujutro da bi se izbjegle potencijalne nepravilnosti nastale jedenjem, pićem i četkanjem zuba. Uzevši sve zajedno u obzir, protokoli prikupljanja uzoraka obuhvaćenih studija prilično su raznoliki. Obećavajuća je činjenica da su čak i bez potvrđenih, standardiziranih protokola prikupljanja, navedene studije dale vrlo slične zaključke o izglednom korištenju sline kao dijagnostičkog materijala za detekciju SARS-CoV-2 (7,8,9).

### Point of Care (POC) dijagnostika – može li ponuditi bolje rješenje?

Nalazimo se u situaciji kada je svakodnevno potrebno masovno testiranje što svakako ostavlja duboke financijske i ekonomske probleme koje pogađaju zdravstvo cijelog svijeta. Ovom gorućem problemu moglo bi se doskočiti uporabom i razvijanjem tzv. *Point of care* testova. To je medicinsko - dijagnostički test koji se provodi na mjestu gdje se bolesniku pruža skrb. Ovaj postupak ne zahtijeva laboratorij, a provode ga osoblje koje nema primarnu laboratorijsku osposobljenost i nema iskustvo u laboratorijskoj medicini (medicinske sestre i tehničari, liječnici) (10). Jedan od primjera POC testova je i Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Ovim se testom u samo jednom koraku amplificiraju nukleinske kiseline ispitivanog virusa, za razliku od PCR metode gdje se amplifikacija nukleinskih kiselina bazira na tzv. termalnom ciklusu, odnosno naizmjeničnim grijanjima i hlađenjima kako bi se olakšala denaturacija dvostruke zavojnice. RT-LAMP ne koristi termalne cikluse te radi na konstantnoj temperaturi između 60° i 65°. Slično kao i u ER-PCR postupku, prvotni postupak je reverzna transkripcija za sintezu c-DNA (komplementarna DNA) nakon čega slijedi amplifikacija komplementarne DNA pomoću enzima DNA polimeraza. RT-LAMP nudi nekoliko prednosti za POC dijagnostiku. Osim što pacijent sam prikuplja uzorak sline i ne zahtijeva ekstrakciju RNA, također pruža i lako razumljive rezultate u roku od 1 sata i ne zahtijeva nikakve laboratorijske ure-

daje ili složene tehnologije, osim toplotnog bloka. Primjer jednog takvog testa je EasyCOV (SkiCell i Sys2Diag / CNRS). To je kolorimetrijski RT-LAMP test namijenjen analizi sline. Rezultati se mogu pročitati promatranjem boje uzorka unutar epruvete. Promjena boje od narančaste do žute pokazuje da je uzorak pozitivan i da je prisutan SARS-CoV-2 (12). Relativno mali broj studija govori o pouzdanosti, odnosno osjetljivosti i specifičnosti ovog testa. EasyCov test procijenjen je pod dvostrukom slijepim kliničkim uvjetima (double blinded randomized control trial), gdje je sudjelovalo 93 asimptomatska volontera zdravstvenog osoblja, 10 aktivno zaraženih pacijenata i 20 bivših zaraženih pacijenata. Rezultati EasyCov uspoređivani su s klasičnim laboratorijskim RT-PCR izvedenim na uzorcima nazofarinksa te pokazuju nešto nižu osjetljivost (72,7%) u usporedbi s osjetljivošću konvencionalnih nazofaringealnih/orofaringealnih briseva (98%) (12, 13). Premda su brzina i jednostavnost primjene bez uporabe dodatne opreme jedni od glavnih prednosti POC

testova, ipak postoje određeni problemi koji koče prelazak na ovu vrstu testiranja. Jedan od problema je svakako i cijena koja može biti i viša od standardnih testova. Odgovori na testove su većinom kvalitativni („da/ne, kolorimetrijski) što znači da pružaju manje informacija od kvantitativnih laboratorijskih testova. Osim toga, obzirom da se više koriste za pojedinačna testiranja, njihova uporaba za testiranja velikog broja ispitanika je upitna (10).

### Zaključak

Slina je vrlo obećavajuća alternativa nazofaringealnom/orofaringealnom brisu za dijagnostiku i praćenje novog COVID 19 virusa. Doista, upotreba sline kao biološkog uzorka za ispitivanje SARS-CoV-2 u velikoj mjeri zaobilazi već ranije navedene kontraindikacije povezana s nazofaringealnim / orofaringealnim brisevima. Uz detaljne upute, svaki pacijent vrlo jednostavno sam može prikupiti uzorke. Na taj bi se način smanjilo opterećenje zdravstvenih radnika, kao i omogućavanje serijskog uzorkovanja potrebnog za praćenje bolesti. Senzitivnost SARS-CoV-2 testa temelje-

nog na slini usporediva je, a prema nekim istraživanjima čak i bolja od senzitivnosti nazofaringealnog/orofaringealnog brisa. Premda uzorci sline za detekciju SARS-CoV-2 djeluju vrlo obećavajuće, široka klinička primjena trenutno je upitna i za sada ne može zamijeniti konvencionalno prikupljanje uzoraka iz nazofarinksa/orofarinksa. Kako bi se slina mogla u budućnosti sigurno i pouzdano koristiti kao medij u dijagnostici SARS-CoV-2 virusne infekcije, od ključne je važnosti standardizirati uzorkovanje i koristiti prikladne dijagnostičke komplete oblikovane za potrebe testiranja na uzorku sline. Potrebno je odabrati i optimizirati jednu od metoda sakupljanja sline koja se trenutno koristi u kliničkom i znanstvenom radu, pronaći optimalno rješenje za prikupljanje, transport i čuvanje uzoraka sline. Svi navedeni postupci moraju biti standardizirani kako bi se dobio pouzdan i osjetljiv test.

## LITERATURA

1. Takeuchi Y, Furuchi M, Kamimoto A, Honda K, Matsumura H, Kobayashi R. Saliva-based PCR tests for SARS-CoV-2 detection. *J Oral Sci.* 2020; 62(3): 350-1. doi: 10.2334/josnusd.20-0267. PMID: 32581183.
2. World Health Organization [Internet]. Geneva: World Health Organization; c2020 [citirano 2020 stu 2]. Dostupno na: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-coronavirus-es#:~:text=symptoms>
3. Riccò M, Ranzieri S, Peruzzi S, Valente M, Marchesi F, Balzarini F i dr. RT-qPCR assays based on saliva rather than on nasopharyngeal swabs are possible but should be interpreted with caution: results from a systematic review and meta-analysis. *Acta Biomed.* 2020; 91(3): e2020025. doi: 10.23750/abm.v91i3.10020. PMID: 32921721.
4. Sapkota D, Sjøland TM, Galtung HK, Sand LP, Gianacchini S, To KKW i dr. COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J Clin Pathol.* 2020; 0: 1-6.

doi: 10.1136/jclinpath-2020-206834.

5. Czumbel LM, Kiss S, Farkas N, Mandel I, Hegyi A, Nagy Á i dr. Saliva as a Candidate for COVID-19 Diagnostic Testing: A Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne).* 2020; 7: 465. doi: 10.3389/fmed.2020.00465.
6. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi PA, Dalla Gasperina D, Genoni A,
7. Fasano M, Sessa F, Tettamanti L, Carinci F, et al. 2020. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect.* 81(1):e45-e50.
8. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. . Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* (2020) 20:565-74.
9. Williams E, Bond K, Zhang B, Putland M, Williamson DA. Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol.* (2020).
10. Wylie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, Campbell M, Tokuyama M, Vijayakumar P, et al. Saliva is more sensitive for SARS-CoV-2 detection in COVID-19 patients than nasopharyngeal swabs. *MedRxiv*

[preprint]. (2020).

11. Đaković Rode O. Point-of-Care (POC) testiranje u dijagnostici infektivnih bolesti. *Croatian Journal of Infection* 32:1, 25-30 (2012).
12. Azzi L. et al. Diagnostic Salivary Tests for SARS-CoV-2. *J Dent Res.* 2020 Oct 31: 0022034520969670.
13. L'Helgouach N, Champigneux P, Santos Schneider F, Molina L, Espeut J, Alali M, Baptiste J, Cardeur L, Dubuc B, Foulongne V, et al. 2020. EasyCOV: LAMP based rapid detection of SARS-CoV-2 in saliva. doi:10.1101/2020.05.30.20117291
14. European Commission (EC). Guidelines on COVID-19 in vitro diagnostic tests and their performance. Available from: [https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/testing\\_kits\\_communication.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/testing_kits_communication.pdf).
15. Chen L, Zhao J, Peng J, et al. Detection of SARS-CoV-2 in saliva and characterization of oral symptoms in COVID-19 patients. *Cell Proliferation.* 2020 Oct:e12923. DOI: 10.1111/cpr.12923.