

FORUM DIAGNOSTICUM

PRODIA DIAGNOSTICS EDUCATIONAL SERVICES



COVID-19

PEMERIKSAAN LABORATORIUM DIAGNOSIS COVID-19

Elva Aprilia Nasution



PENDAHULUAN

Pada bulan Desember 2019, dilaporkan sejumlah pasien dengan gejala pneumonia yang tidak diketahui etiologinya di Kota Wuhan, Provinsi Hubei, Cina Tengah. Sekuensing genom yang dilakukan menunjukkan bahwa gejala pneumonia tersebut disebabkan oleh coronavirus (CoV) jenis yang baru, yaitu *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (1,2).

Sejak dilaporkannya infeksi pertama tersebut, virus ini telah menyebar ke hampir semua negara dan benua, sejumlah besar kasus infeksi terjadi di Italia, Iran, Amerika Serikat, Afrika Selatan, Indonesia dan banyak negara lainnya. Menurut data WHO sampai 20 Desember 2020, virus ini telah menginfeksi sekitar 80 juta orang dengan 1,7 juta

kematian yang terjadi di berbagai daerah dan negara. Dari data Kemenkes, kasus COVID-19 di Indonesia pertanggal 20 Desember 2020 tercatat sebanyak 598.933 kasus konfirmasi positif dengan 18.336 kematian. Mempertimbangkan ancaman secara global, pada tanggal 11 Maret 2020 *World Health Organization* (WHO) menyatakan COVID-19 sebagai pandemi (1,2).

Pandemi COVID-19 telah memberikan tantangan besar bagi laboratorium klinis, mulai dari diagnosis awal hingga pemantauan dan perawatan pasien. Respons terhadap pandemi ini melibatkan pengembangan, produksi, dan distribusi tes molekuler diagnostik yang belum pernah terjadi sebelumnya, yang menyebabkan diberlakukannya persyaratan validasi minimal, sehingga terdapat kekhawatiran mengenai akurasi diagnostik dalam

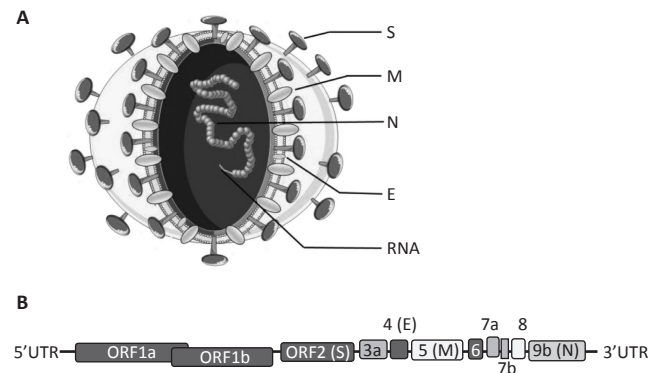
manajemen klinis. Selain pemeriksaan berbasis molekuler, terdapat uji serologis untuk mendeteksi antibodi terhadap SARS-CoV-2. Penting dilakukan validasi, evaluasi serta rekomendasi penggunaan uji molekuler, serologis, dan biokimiawi yang tepat untuk penggunaan klinis terkait epidemiologi, patogenesis, diagnosis laboratorium dan manajemen COVID-19, dalam mendukung penanganan global terhadap pandemi COVID-19 (3).

STRUKTUR SARS-CoV-2

Coronavirus (CoV) merupakan subfamili *Orthocoronavirinae* yang termasuk ke dalam keluarga *Coronaviridae*, ordo *Nidovirales*. Terdapat 4 genus dalam subfamili *Orthocoronavirinae*, yaitu *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) dan *Deltacoronavirus* (δ -CoV). Genom CoV merupakan virus *single-stranded* RNA positif dengan ukuran bervariasi antara 26-32 kb, genom terbesar dari virus RNA yang dikenal. Genus α - dan β -CoV diketahui menginfeksi mamalia, sementara δ - dan γ -CoV menginfeksi burung. Dua wabah virus yang mengakibatkan terjadinya pneumonia, yaitu *severe acute respiratory syndrome* (SARS) dan *Middle East Respiratory syndrome* (MERS) disebabkan oleh β -CoV. Pada tahun 2002, wabah SARS pertama kali dilaporkan di Cina dan kemudian menyebar dengan cepat ke seluruh dunia, mengakibatkan ratusan kematian dengan tingkat kematian 11%. Pada 2012, MERS pertama kali muncul di Arab Saudi dan kemudian menyebar ke negara lain, dengan tingkat kematian 37%. Pada kedua epidemi ini, virus disebutkan mungkin berasal dari kelelawar yang kemudian menginfeksi manusia melalui hewan inang perantara lainnya, seperti musang (*Paguma larvata*) untuk SARS-CoV dan unta untuk MERS-CoV (4,5).

SARS-CoV-2 merupakan Virus dengan genus CoV yang baru ditemukan dan dapat menyebabkan pneumonia. Genom SARS-CoV-2 mengkode poliprotein non-struktural yang besar (ORF1a/b) yang selanjutnya dipecah secara proteolitik untuk menghasilkan 15/16 protein, 4 protein struktural, dan 5 protein aksesori (yang ditunjukkan pada Gambar 1). Keempat protein struktural terdiri dari glikoprotein permukaan *spike* (S), protein

membrane (M), protein *envelope* (E) dan protein *nucleocapsid* (N) serta protein aksesori lainnya. *Spike* merupakan glikoprotein berbentuk tonjolan-tonjolan yang menyerupai mahkota yang berperan penting dalam patogenesis dengan bantuan reseptor sel tubuh yang spesifik (1,4,5).



Gambar 1. Struktur dan genom *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) (1).

Pada awalnya, virus ini diketahui memiliki kesamaan dengan SARS-CoV dan MERS CoV, namun dari hasil evaluasi genomik isolasi dari 10 pasien, didapatkan hasil mencapai 99% menunjukkan virus ini merupakan virus baru, dan menunjukkan kesamaan (identik 88%) dengan *bat-derived severe acute respiratory syndrome* (SARS)-like coronaviruses, bat-SL-CoVZC45 dan bat-SL-CoVZXC21, yang diambil pada tahun 2018 di Zhoushan, Cina bagian Timur, sedangkan kemiripan dengan SARS-CoV adalah 79% dan MERS-CoV (50%) (4,5,6).

ETIOLOGI DAN PATOGENESIS COVID-19

SARS-CoV-2 merupakan famili CoV ke-7 yang dapat menginfeksi manusia. Empat human CoV sebelumnya (HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoVOC43 dan HCoV-HKU1) dapat menyebabkan berbagai infeksi saluran pernapasan atas (flu biasa), sedangkan SARS-CoV dan MERS-CoV dapat menyebabkan pneumonia atipikal. Tempat infeksi yang berbeda mungkin terkait dengan *dipeptidyl peptidase 4* (DPP4) dan *angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2) di saluran pernapasan bawah, yang merupakan reseptor utama untuk glikoprotein permukaan *spike* (S) MERS -CoV dan SARS-CoV. Sekuens genetik SARS-CoV-2 dengan kemiripan

≥70% dengan SARS-CoV menunjukkan kemungkinan bahwa SARS-CoV-2 juga menggunakan reseptor entri sel yang sama seperti SARS-CoV untuk menginfeksi manusia dengan menarget ACE2 sebagai reseptor masuk dan menggunakan serine protease TMPRSS2 untuk *priming* S protein. Salah satu sifat yang membedakan kedua virus ini adalah afinitas terhadap ACE2 dari *receptor binding domain* (RBD) protein Spike pada SARS-CoV-2 yang secara signifikan lebih kuat dibandingkan SARS-CoV. Hal ini menunjukkan bahwa SARS-CoV-2 memiliki risiko yang lebih tinggi dalam proses penyebarannya (1,6,7,8).

Setelah masuk ke dalam sel epitel alveolar, SARS-CoV-2 bereplikasi dengan cepat dan memicu respons imun yang kuat, menyebabkan sindrom badai sitokin dan kerusakan jaringan paru. Sindrom badai sitokin, juga dikenal sebagai hipersitokinemia merupakan sekelompok gangguan yang ditandai oleh produksi sitokin pro-inflamasi yang tidak terkontrol dan menyebabkan *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) dan gagal organ multipel. Analisis terhadap 99 kasus pertama yang dikonfirmasi infeksi SARS-CoV-2 menunjukkan bahwa sindrom badai sitokin terjadi pada pasien dengan COVID-19 yang berat; 17 pasien (17%) dengan ARDS, 11 pasien (11%) memburuk dalam waktu singkat dan meninggal karena gagal organ multipel. Selain itu, jumlah sel T total, sel T CD4+ dan sel T CD8+ menurun pada pasien infeksi SARS-CoV-2, dan tidak ditemukan sel T survival fungsional menunjukkan penurunan fungsi kekebalan tubuh pada pasien yang terinfeksi SARS-CoV-2. Terjadinya ARDS, penurunan fungsi kekebalan tubuh dan infeksi sekunder semakin memperburuk kegagalan pernapasan yang terjadi pada pasien infeksi SARS-CoV-2 (1).

PEMERIKSAAN COVID-19

Penularan SARS-CoV-2, sama seperti SARS-CoV, menyebar melalui kontak, tetesan, aerosol, dan lingkungan yang terkontaminasi; berbagai studi menunjukkan risiko penularan yang lebih tinggi dari pasien yang mempunyai gejala infeksi pernapasan, tetapi tidak menutup kemungkinan dari pasien tanpa gejala. Identifikasi pasien

COVID-19 asimtomatik dan simtomatik merupakan poin penting dalam strategi untuk menghentikan penyebaran epidemi; selain itu mengidentifikasi subjek yang pernah kontak dengan pasien infeksi SARS-CoV-2 juga penting dalam strategi epidemiologi (9).

Seperti pada semua infeksi virus, diagnosis infeksi SARS-CoV-2 didasarkan pada identifikasi langsung RNA atau antigen virus atau identifikasi tidak langsung dari respons antibodi spesifik. Diagnosis langsung dengan identifikasi langsung RNA merupakan *gold standard* untuk infeksi aktif, sedangkan deteksi antibodi spesifik terhadap SARS-CoV-2 dilakukan untuk identifikasi kontak dengan kasus konfirmasi COVID-19, baik untuk tujuan diagnosis maupun epidemiologi. Protokol skrining harus disesuaikan dengan situasi lokal. Definisi kasus ditinjau dan diperbarui secara berkala yang akan disesuaikan dengan setiap informasi baru yang ditemukan (9,10).

Pengumpulan dan pemeriksaan spesimen secara cepat dari pasien yang memenuhi definisi kasus suspek COVID-19 merupakan prioritas manajemen klinis dan pengendalian wabah. Kasus yang dicurigai harus dilakukan skrining untuk mendeteksi virus dengan *nucleic acid amplification test* (NAAT), seperti *reverse transcription - polymerase chain reaction* (RT-PCR) (10).

Selama pandemi COVID-19, deteksi virus dengan kultur penting untuk penelitian patogenesis virus, namun dikarenakan siklus kultur yang terlalu lama, sehingga tidak dapat diterapkan untuk deteksi cepat virus pada saat infeksi akut. Pemeriksaan asam nukleat (NAAT) dapat dengan cepat dan sensitif mengidentifikasi patogen pada pasien yang dicurigai atau dikonfirmasi COVID-19, tetapi adanya variasi genetik dalam jumlah besar pada virus RNA, dan ketidakcocokan primer, probe, dan urutan target dapat menyebabkan penurunan sensitivitas dan dan menyebabkan hasil negatif palsu. Oleh karena itu, interpretasi hasil NAAT harus dilakukan dengan hati-hati (10).

Pemeriksaan Virus SARS-CoV-2

Identifikasi virus terdiri dari pemeriksaan untuk mendeteksi asam nukleat atau antigen SARS-CoV-2 dengan menggunakan sampel dari sistem pernapasan (*swab* nasofaring dan *swab* orofaring) untuk menentukan apakah ada infeksi SARS-CoV-2. Pemeriksaan virus dilakukan untuk mendiagnosis infeksi akut pada individu yang bergejala maupun tanpa gejala, pelacakan kontak, pilihan pengobatan, dan persyaratan isolasi. Pemeriksaan virus mungkin dapat dilakukan langsung di tempat perawatan, dengan hasil mungkin dalam waktu kurang dari satu jam ataupun dikirim ke laboratorium yang mungkin memakan waktu setidaknya 1-2 hari (11).

Gambaran klinis orang yang terinfeksi SARS-CoV-2 dapat tidak mempunyai gejala (kasus asimtomatik), sebelum gejala muncul (pre-simtomatik), atau mengalami gejala (simtomatik). Gejala pada pasien COVID-19 dapat bermacam-macam pada tahap awal, gejala yang ditunjukkan mungkin sangat ringan, serupa pneumonia, demam/sepsis, dan gejala gastroenteritis atau neurologis. Jika diperlukan untuk tatalaksana kasus, dapat dilakukan pemeriksaan patogen lain sesuai rekomendasi panduan tatalaksana klinis lokal, namun tanpa menunda pemeriksaan untuk SARS-CoV-2. Koinfeksi SARS-CoV-2 dengan patogen lain sudah dilaporkan, sehingga hasil tes positif untuk patogen lain tidak menyingkirkan kemungkinan COVID-19 dan sebaliknya. Kasus hasil tes positif palsu antibodi dengue menggunakan *rapid diagnostic test* (RDT) dengue telah dilaporkan terjadi pada pasien COVID-19. Risiko hasil tes positif palsu atau negatif palsu SARS-CoV-2 dapat terjadi jika tes tidak dilakukan sesuai standarisasi (12,13).

Sejak urutan genetik SARS-CoV-2 pertama diunggah ke platform *Global Initiative on Sharing All Influenza Data* (GISAID) pada 10 Januari 2020, perusahaan dan produsen diagnostik dengan cepat mengembangkan pemeriksaan berbasis NAAT, mayoritas dengan metode RT-PCR untuk mendeteksi SARS-CoV-2 RNA dalam berbagai spesimen klinis, terutama *swab* nasofaring dan/atau orofaring. Pengembangan tes molekuler menjadi sangat penting bagi respons pandemi, memandu perawatan pasien dan keputusan terkait kesehatan masyarakat secara global (14).

NAAT saat ini merupakan *gold standard* untuk mendiagnosis dugaan infeksi SARS-CoV-2. Metode RT-PCR adalah jenis umum NAAT yang paling banyak diterapkan untuk pemeriksaan molekuler dan digunakan oleh *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dan *World Health Organization* (WHO). Pemeriksaan dengan RT-PCR membutuhkan waktu lebih lama, sehingga terdapat kebutuhan terhadap *rapid test diagnostic* (misalnya tanpa ekstraksi dan pemurnian RNA), yang dapat digunakan pada *point-of-care* (POC), terutama untuk penilaian pasien rawat jalan atau ketika diperlukan triase dengan segera. Kinerja diagnostik termasuk sensitivitas dan spesifisitas pemeriksaan POC lebih rendah, umumnya disebabkan target molekuler yang berbeda dan terutama *limit of detection* target gen yang digunakan (14).

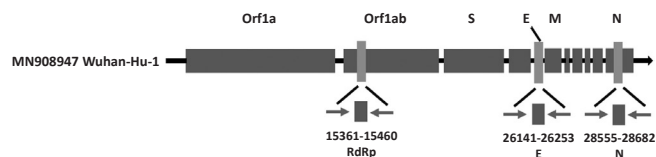
Seperti penyakit menular lainnya, pengumpulan spesimen yang tepat adalah salah satu langkah kunci dalam diagnosis laboratorium COVID-19. Spesimen yang dapat diterima meliputi spesimen saluran pernapasan atas, spesimen saluran pernapasan bawah, spesimen tinja, spesimen darah lengkap, dan spesimen serum, dan sekresi pernapasan. SARS-CoV-2 telah terdeteksi pada sampel *swab* nasofaring, *swab* orofaring, *swab* tenggorokan, dahak, *bronchoalveolar lavage fluid* (BALF), darah, serum, tinja, urin, saliva, *swab* rektal dan *swab* konjungtiva (12,14).

Satu atau lebih hasil negatif tidak selalu menyingkirkan kemungkinan infeksi SARS-CoV-2. Sejumlah faktor dapat menyebabkan hasil negatif palsu pada orang yang terinfeksi, seperti kualitas spesimen yang tidak sesuai karena terlalu sedikit material pasien, spesimen yang diambil terlalu lama setelah onset penyakit, atau spesimen diambil dari bagian tubuh yang tidak mengandung virus, penanganan dan/atau pengiriman spesimen yang tidak tepat, dan alasan-alasan teknis, seperti hambatan pada teknis PCR atau mutasi virus (10).

Real-time quantification RT-PCR

Menurut genom SARS-CoV-2 yang dirilis di GISAID, target gen yang digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV-2 meliputi gen *nucleocapsid* (N), *envelope* (E), *spike* (S),

RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) dan *open reading frame1ab* (ORF1ab). Sebagai pemeriksaan *gold standard* untuk identifikasi SARS-CoV-2, RT-PCR adalah tes konfirmasi rutin yang direkomendasikan oleh WHO. Pemeriksaan untuk diagnosis molekuler harus menggunakan minimal dua target gen untuk meminimalkan risiko negatif palsu, potensi reaksi silang dengan coronavirus lainnya dan *genetic drift* SARS-CoV-2 (12).



Gambar 2. Posisi target amplicon SARS-CoV-2. Genom Wuhan-Hu-1 (GenBank MN908947) sebagai referensi. ORF: *open reading frame*; RdRp : RNA-dependent RNA polymerase gene; S : gen protein spike; E : gen protein envelope; M : gen protein membrane; N : gen protein nucleocapsid (12).

Pada situs web WHO memuat beberapa protokol RT-PCR untuk deteksi SARS-CoV-2 di berbagai negara. Target gen untuk deteksi SARS-CoV-2 di China (gen ORF1ab dan N), Jerman (gen RdRp, E dan N), Amerika Serikat (tiga target dalam gen N), Prancis (dua target dalam RdRp), Thailand (Gen N), dan Jepang (pancorona dan beberapa target, protein spike). Primer dari E dan RdRp adalah yang paling sensitif dan banyak digunakan di Eropa. Pemeriksaan RT-PCR dan primer SARS-CoV-2 di berbagai institusi ditunjukkan pada Tabel 1. Posisi relatif target pada genom SARS-CoV-2 ditunjukkan pada Gambar 2 (12,15).

Chantal dkk. menggunakan transkrip RNA yang diisolasi dari pasien COVID-19 untuk membandingkan sensitivitas

analitik dari 4 tes RT-PCR yang ditetapkan di Amerika Serikat, Jerman, Hongkong, dan Cina. Penelitian tersebut menemukan bahwa SARS-CoV-2 dapat dideteksi di semua set probe primer yang diterapkan dalam tes RT-PCR, tetapi terdapat perbedaan yang signifikan dalam batas deteksi dan kemampuan untuk mengidentifikasi negatif dan positif dengan viral load yang lebih rendah. Set probe primer dengan sensitivitas tertinggi ditemukan di E-Sarbeco (Jerman), 2019-nCoV_N1 (Amerika Serikat), dan HKU-ORF1 (Hongkong), sensitivitas terendah diamati di RdRp-SARSr (Jerman), yang mungkin terkait dengan ketidakcocokan pada *reverse primer*. Selain itu, Konrad et al. membandingkan tes qRT-PCR pada sistem PCR dan reagen komersial yang berbeda menggunakan sampel swab nasofaring atau sputum pasien COVID-19 di Jerman. Ketika primer dan probe yang sama digunakan, terdapat perbedaan dalam sensitivitas analitis antara sistem PCR yang berbeda, yaitu target gen E lebih sensitif daripada target RdRp saat menggunakan sistem satu langkah qRT-PCR (12,14,16).

Diagnosis COVID-19 dengan metode RT-PCR dinyatakan terdeteksi jika terdapat akumulasi sinyal fluoresensi. Nilai *cycle threshold* (Ct) adalah jumlah siklus yang dibutuhkan sampai sinyal fluoresensi sampel melebihi ambang (*threshold*). Nilai Ct secara proporsional berbanding terbalik dengan jumlah target asam nukleat dalam sampel. Dengan kata lain, semakin rendah nilai Ct dari suatu gen tertentu, semakin banyak gen atau jumlah asam nukleat yang ada dalam sampel. Nilai Ct sangat bergantung dengan beberapa hal teknis, mulai dari metode

Tabel 1. Pemeriksaan RT-PCR/ primer SARS-CoV-2 pada berbagai institusi (12)

Institute	Gene target	Probe (5'-3')	Former primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
China cdc	ORF1ab gene	FAM-CCGT CTG CGGT ATGT GGA AAGTT ATGG-BHQ1	CCCTGTGGGTTTACACTTAA	ACGATTGTGCATCAGCTGA
	N gene	FAM-TTGCT GCTG CTT GACAGA TT-TAMRA	GGGGAACCTCTCTGCTAGAAT	CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG
US CDC	N1 target	FAM-ACCCCGCAITAC GTT TGGTGGACC-BHQ1	GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT	TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG
	N2 target	FAM-ACAATTGCCCCAGCGC TTCAG-BHQ1	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA	GCG CGA CAT TCC GAA GAA
	N3 target	FAM-AYCACATTGGCACC CGCA ATCTG-BHQ1	GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A	TGT AGC ACG ATT GCA GCA TTG
France Pasteur Institute	RdRp1 target	HEX-AGATGCTCTGTGCTGCCG GTA-BHQ1	ATGAGCTTAGTCTGTTG	CTCCCTTTGTTGTTGT
	RdRp2 target	FAM-TCATACAAACACGCCAG G-BHQ1	GGTAACCTGGTATGATTTCG	CTGGTCAAGGTTAATATAGG
Japan National Institute of Infectious Disease	N gene	FAM-ATGTCGCGCATTTGGCATG GA-BHQ	AAATTTGGGGACCCAGGAAC	TGGCAGCTGTGAGGTCAAC
Germany Charité	RdRp gene	FAM-CAGGTGGAACCTCATCAG GAGATGC-BBQ	GTGARATGGTCATGTGTGGCGG	CARATGTTAAACACTATTAGCATA
	E gene	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BBQ	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	ATATTGCAGCAGTACGCACACA
Thailand National Institute of Health	N gene	FAM-CAACTGGCAGTAACCA-BQH1	CGTTTGGTGGACCCCTCAGAT-	CCCCACTGCGTTTCCATT
Hong Kong University	ORF1b-nsp14 gene	FAM-TAGTTGTGATGCWATCATGACTAG-TAMRA	TGGGGYTTTACRGTTAACCT	AACRCGCTTAAACAAGCACTC
	N gene	FAM-GCAATTGTGCAATTTGCGG-TAMRA	TAATCAGACAAGGAACGATTGA	CGAAGGTGTGACTTCCATG

pengambilan sampel, jumlah materi genetik atau gen target yang terkandung dalam sampel, metode ekstraksi yang digunakan, serta kit PCR yang dipakai. Sehingga perlu kehati-hatian dalam menggunakan nilai Ct sebagai dasar penanganan pasien. Penggunaan nilai Ct dapat bermanfaat apabila dikaitkan dengan berbagai aspek dan dipantau langsung oleh dokter yang menangani pasien (16,17).

Beberapa studi menunjukkan pemanfaatan nilai Ct dapat membantu pengambilan keputusan dalam penanganan pasien (menentukan masa isolasi, dll). Namun perlu diperhatikan saat menggunakan nilai Ct sebagai indikator pengganti ‘kuantitas’ dalam tes PCR kualitatif (“*viral load*”), di mana hasil tidak dapat dibandingkan melalui tes yang berbeda, target gen yang berbeda, dan jenis spesimen yang berbeda, sehingga pemantauan yang dilakukan serial harus dikerjakan di platform yang sama. Beberapa studi yang menunjukkan pemanfaatan nilai Ct adalah:

- Studi Megleby menunjukkan Ct *value* berkorelasi dengan angka kematian, di mana pada 678 pasien COVID-19 di rumah sakit, jumlah kematian dengan “*viral load* tinggi” (Ct <25; n = 220) sebanyak 35%, “*viral load* sedang” (Ct 25- 30; n = 216) sebanyak 17,6%, dan “*viral load* rendah” (Ct >30; n = 242) sebanyak 6,2%.
- Studi Lesho dengan sampel serial prospektif dari 70 pasien 9-36 hari setelah onset gejala menunjukkan nilai Ct berkorelasi dengan klinis, yaitu nilai Ct 24 (“*viral load* tinggi”), dan nilai Ct >40 (“negatif”).
- Studi Salvatore pada 93 anggota keluarga yang terkonfirmasi infeksi SARS-CoV-2 menunjukkan nilai Ct paling rendah segera setelah onset gejala; dalam waktu 7 hari setelah onset gejala nilai median Ct 26,5, dibandingkan dengan nilai median Ct 35 pada 21 hari setelah onset.
- Studi Singanayagam dengan kultur virus dari 324 sampel (dari 253 kasus) yang dites positif SARS-CoV-2 dengan RT-PCR menunjukkan nilai Ct berkorelasi kuat dengan hasil kultur virus. Probabilitas kultur virus menurun menjadi 8% pada sampel dengan Ct >35 dan menjadi 6% (95% CI: 0,9-31,2%) 10 hari setelah onset gejala.

***Nested* RT-PCR**

Pemeriksaan *nested* RT-PCR dengan sensitivitas tinggi dapat digunakan untuk mendeteksi SARS-CoV-2 dengan jumlah kopi rendah yang terjadi pada tahap awal penyakit. Teknik baru ini dapat digunakan pada spesimen tanpa pemurnian RNA untuk mendeteksi COVID-19 atau virus lainnya. Pada awal wabah COVID-19, deteksi SARS-CoV-2 dengan metode *nested* RT-PCR telah diverifikasi di Jepang. Pada 8 Februari 2020, metode ini telah berhasil mengidentifikasi 25 pasien positif di Jepang. Ji dkk. merancang uji *one-step nested* RT-PCR (OSN-qRT-PCR) dengan menargetkan gen SARS-CoV-2 ORF1ab dan N. Sensitivitas uji adalah 1 kopi/uji dan 10 kali lipat lebih tinggi daripada uji qRT-PCR komersial (10 kopi/uji). Analisis dengan *nested* RT-PCR menunjukkan sensitivitas dan spesifisitas yang lebih tinggi, sehingga lebih sesuai untuk aplikasi klinis dalam mendeteksi SARS-CoV-2 dengan *viral load* rendah. Namun, *nested* RT-PCR dapat menyebabkan kontaminasi silang laboratorium, sehingga mengakibatkan hasil positif palsu (12,18).

Biaya deteksi menggunakan *nested* RT-PCR lebih rendah dan dapat digunakan untuk laboratorium yang tidak memiliki peralatan RT-PCR. *Nested* PCR sangat sensitif dan dapat mendeteksi setidaknya 1 kopi per kurva pengenceran standar menggunakan lebih dari 1 set primer diagnostik, di mana jika virus corona bermutasi di salah satu nukleotida yang merupakan kunci amplifikasi, masih dapat menggunakan set primer lainnya. Urutan virus sintesis harus dikelola sesuai dengan rekomendasi diagnosis dengan PCR, untuk mengurangi risiko kontaminasi (12,18).

***Droplet digital* PCR**

Droplet digital PCR (ddPCR) dapat memberikan LOD yang lebih rendah, untuk meningkatkan sensitivitas dan akurasi dalam mendeteksi SARS-CoV-2. Suo dkk. menganalisis kelayakan ddPCR untuk deteksi SARS-CoV-2 RNA dibandingkan dengan RT-PCR menggunakan set primer/probe seperti yang dikeluarkan oleh CDC China dengan menargetkan gen ORF1ab atau N. 26 pasien COVID-19 dengan hasil RT-PCR negatif dikonfirmasi positif dengan ddPCR. Sensitivitas dan akurasi ditingkatkan dari 40% dan 47% untuk RT-PCR menjadi 94% dan 95% untuk ddPCR.

Dalam 5-12 hari setelah keluar rumah sakit, 6/14 pasien (42,9%) terbukti positif dengan ddPCR. Studi tersebut menunjukkan bahwa ddPCR dapat mengurangi hasil negatif palsu RT-PCR. Analisis kinerja ddPCR dan RT-PCR menggunakan 8 set primer/probe dengan sampel dan kondisi yang sama menunjukkan bahwa semua primer/probe yang digunakan dalam RT-PCR tidak dapat membedakan positif dan negatif secara bermakna pada *viral load* rendah (pengenceran 10^{-4}). Sehingga didapatkan hasil positif palsu dari tes RT-PCR dari set primer/probe CDC-N1, N2 dan CDC-N China. Namun, ddPCR juga memiliki beberapa kekurangan, diantaranya setiap pengujian dilakukan dengan menggunakan instrumen khusus dan bahan habis pakai sehingga harganya lebih mahal dibandingkan RT-PCR (12).

Point-of-care Nucleic Acid Tests Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)

Metode RT-LAMP dikembangkan sebagai alternatif pemeriksaan yang efektif dan cepat untuk membantu diagnosis SARS-CoV-2. Metode RT-LAMP membutuhkan satu set dengan 4 primer spesifik gen target untuk meningkatkan sensitivitas, menggabungkan LAMP dengan tahap *reverse transcription* untuk deteksi RNA. Produk amplifikasi dapat dideteksi melalui fotometri, mengukur kekeruhan yang disebabkan oleh endapan magnesium pirofosfat dalam larutan sebagai produk sampingan dari amplifikasi. Reaksi ini dapat diikuti secara *real time* baik dengan mengukur kekeruhan atau dengan fluoresensi menggunakan pewarna interkalasi. Uji diagnostik *real time* RT-LAMP hanya membutuhkan pemanasan dan pengamatan visual sehingga menjadi salah satu pemeriksaan yang menjanjikan untuk deteksi virus (12).

Beberapa tes molekuler menggunakan metode *real time* RT-LAMP yang tersedia saat ini untuk mendeteksi SARS-CoV-2, seperti tes ID NOW COVID-19 dari Abbott Diagnostics merupakan POCT (13 menit atau kurang) pada sampel swab pernapasan bagian atas, tetapi kekurangannya karena terbatas satu sampel per pemeriksaan (12,19).

Basu dkk. menunjukkan walaupun uji amplifikasi asam nukleat isothermal menjanjikan, namun memiliki sensitivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan RT-PCR untuk deteksi RNA SARS-CoV-2, lebih kompleks, melibatkan lebih banyak primer dan dan rumit, menekankan pentingnya pemilihan target dan desain primer (12).

Nanoparticles-based amplification

Nanopartikel pada sistem amplifikasi asam nukleat diketahui dapat meningkatkan sensitivitas dan spesifisitas deteksi SARS-CoV-2. Parikesit dkk. merancang tes kolorimetri mata telanjang berdasarkan nanopartikel emas (AuNPs) dengan *antisense oligonucleotides* (ASO) thiol termodifikasi yang menargetkan gen N SARS-CoV-2 dengan LoD 0,18 ng/ μ L viral load SARS-CoV-2. LOD dengan *nanoparticles-based biosensor* (NBS) ditambah dengan RT-LAMP adalah 12 kopi/tes. Sensitivitas analitik pada pasien COVID-19 adalah 100% (33/33) dengan spesimen swab orofaring, dan spesifisitas pengujian 100% (96/96). *Nanoparticles-based amplification* adalah metode yang menjanjikan untuk mendiagnosis infeksi SARS-CoV-2 di laboratorium klinis lini pertama, terutama di daerah dengan sumber daya medis yang sulit. Namun biayanya lebih mahal daripada qRT-PCR dan langkah-langkah pra-perawatannya yang rumit. Selain itu, seperti halnya sistem yang menggunakan pembawa organik lainnya, risiko *photobleaching* dapat menyebabkan berkurangnya sensitivitas dan hasil negatif palsu (12,20).

Portable benchtop-sized analyzers

Platform diagnostik molekuler otomatis menunjukkan metode yang sensitif dan akurat untuk identifikasi cepat SARS-CoV-2. Pada laboratorium tanpa pelatihan PCR, pengujian tersebut dapat memberikan keputusan yang cepat dan inovasi teknologi. Namun terdapat laporan mengenai kinerja yang tidak konsisten dari berbagai platform *Portable benchtop-sized analyzers* untuk deteksi SARS-CoV-2 (12).

Benoit dkk. mengevaluasi Panel QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 untuk deteksi SARS-CoV-2. Platform ini menunjukkan sensitivitas yang sebanding dengan RT-PCR dengan LOD 1000 kopi/mL. Pada 69 analisis sampel klinis,

persentase keseluruhan QIAstat-DX SARS dan RT-PCR yang direkomendasikan oleh WHO adalah 97%, dengan spesifisitas 93% (27/29) dan sensitivitas 100% (40/40), dan tidak ada reaksi silang dari virus atau bakteri pernapasan lain. Hasil ini menunjukkan bahwa Panel QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 memiliki sensitivitas yang sebanding dengan uji RT-PCR (12,20).

Rhoads dkk. menemukan bahwa terdapat 94% *positive percent agreement* (PPA) antara tes ID NOW dan tes yang dikembangkan oleh laboratorium CDC, sementara studi lain menunjukkan bahwa ID NOW memiliki PPA yang lebih rendah, berkisar 75-87%. Dibandingkan dengan pengujian Xpert Xpress (~46 menit) dan pengujian ePlex (~1,5 jam), ID NOW memberikan waktu deteksi tercepat untuk setiap sampel (~17 menit), tetapi dengan biaya analisis lebih tinggi dan kinerja klinis dengan LOD tertinggi dan PPA terendah. Selain itu, Stephanie et al. menunjukkan spesifisitas uji ini adalah 100%, tetapi 13 dari 46 sampel positif SARS-CoV-2 adalah negatif palsu sehingga sensitivitasnya lebih rendah 71,7%. ID NOW memiliki kinerja yang dapat diterima untuk sampel yang mengandung RNA virus yang tinggi atau sedang, tetapi mungkin kurang sensitif pada sampel yang positif lemah (12).

Femke dkk. mengevaluasi Xpert Xpress (sistem Cepheid GeneXpert) yang menargetkan gen SARS-CoV-2 E dan gen N2 di 3 laboratorium medis di Belanda. Pengujian tersebut dapat mendeteksi SARS-CoV-2 dengan LOD 8,26 kopi/mL di ketiga laboratorium. Sedangkan Wei et al. melaporkan pemeriksaan Xpert Xpress yang menargetkan SARS-CoV-2 E-gen dan N2-gen dengan LOD 100 kopi/mL. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan metode yang digunakan untuk menentukan konsentrasi dan memerlukan verifikasi lebih lanjut. Dalam penelitian Wei, Xpert Xpress memiliki LOD terendah (100 kopi/mL) dibandingkan dengan ID NOW (20.000 kopi/mL) dan ePlex (1000 kopi/mL), dan PPA tertinggi (98,3%) dibandingkan dengan ID NOW (87,7%) dan ePlex (91,4%). Informasi mengenai kinerja pengujian yang tidak konsisten dan alur kerja sangat penting untuk membuat keputusan yang tepat waktu pada pengujian laboratorium (12).

Analisis Hembusan Napas dengan *Gas Chromatography*

Analisis *volatile organic compounds* (VOC) yang dihembuskan dalam napas menggunakan kromatografi gas baik *mass spectrometry* (GC-MS) atau *ion mobility spectrometry* (GC-IMS) telah diusulkan untuk diagnosis COVID-19 dan pneumonia. Analisis hembusan napas dapat digunakan di lokasi *point of care*, hasil cepat (<10 menit), pengambilan sampel non-invasif dengan tingkat *bio-security* rendah; dan dapat digunakan di mana saja termasuk di lingkungan dengan sumber daya rendah seperti lingkungan komunitas atau perawatan primer. COVID-19 adalah kondisi multi-sistem, sehingga kombinasi VOC inflamasi dan respons host akan membedakan antara napas pasien dengan COVID-19 dan mereka yang memiliki masalah pernapasan atau jantung lainnya (21).

Senyawa yang diidentifikasi dalam penelitian Dorota dkk. sesuai dengan kombinasi metabolik ekstrapulmonari, manifestasi gastrointestinal COVID-19 di dalam tubuh serta respons inflamasi saluran napas. Pengikatan langsung SARS-CoV-2 ke ACE2 pada sel-b di pankreas telah diusulkan sebagai patologi yang berkontribusi terhadap defisiensi insulin dan hiperglikemia pada pasien COVID-19. Sebanyak 64% kasus yang menunjukkan ketosis, awalnya tidak memiliki diabetes, di mana ketosis dicatat sebagai indikasi perkembangan COVID-19 yang lebih serius dengan peningkatan waktu rawat inap dan mortalitas. Metanol yang dihembuskan dikaitkan dengan mikrobiota usus yang bekerja pada buah dan sayuran (pektin), serta pemecahan aspartam dan karboksil-metil ester. Penurunan kadar metanol urin telah diamati pada kondisi inflamasi gastrointestinal (misalnya kolitis ulserativa dan penyakit Crohn). Selain kerusakan jaringan usus multi-faktor (peradangan, kerusakan pembuluh darah dan kerusakan jaringan langsung dari virus), terdapat kemungkinan interaksi SARS-CoV-2 dengan mikrobiota usus yang mengarah pada berkurangnya aktivitas dan produksi metanol. Penurunan aldehida bersama dengan hidrokarbon berasal dari peroksidasi lipid dan proses inflamasi dan telah dilaporkan terjadi dalam berbagai kondisi pernapasan (20).

Deteksi ARDS melalui analisis hembusan napas menggunakan GC-MS terkait dengan peroksidasi lipid (oktan, etanal dan 3-metilheptana) dengan AUROC 0,8. Studi klinis GC-IMS telah menunjukkan perbedaan COVID-19 dari influenza A. GC-IMS dipilih karena instrumen dan metode dapat digunakan di unit gawat darurat, dengan biaya operasional yang rendah dan NASA-Task Load Index (NASA-TLX) yang rendah. Teknik pengambilan sampel cepat dan sederhana sehingga tidak menimbulkan risiko paparan virus bagi dokter dan tidak memerlukan perlindungan *bio-security* tambahan, karena tidak melibatkan tekanan positif dan tidak dianggap sebagai prosedur yang menimbulkan aerosol. Namun, GC-IMS rentan terhadap kontaminasi; Oleh karena itu, diperlukan kehati-hatian dalam memilih lokasi instrumen dan cara mengoperasikannya. Selain itu diperlukan manajemen desinfeksi dan pembersihan secara rutin. Diet memengaruhi VOC yang dihembuskan dan berpotensi memberikan hasil yang rancu dan salah jika tidak dikelola dengan hati-hati (21).

Pemeriksaan Antigen SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 terdiri dari beberapa protein virus, termasuk protein S, N, E, dan M. Di antara protein tersebut, S dan N adalah dua target antigenik utama dari antibodi SARS-CoV-2. Di bawah aksi protease mirip furin sel inang, protein S dibagi menjadi dua polipeptida terpisah di sebagian besar CoV, S1 dan S2. Meskipun protein S sangat penting untuk masuknya virus dan ada di permukaan virus, protein N adalah protein dominan imun yang paling tereksresi, lebih berinteraksi dengan RNA dan lebih *conserved* daripada protein S (12,22).

Pada 11 September 2020, WHO telah mengeluarkan *guideline* penggunaan Antigen *rapid diagnostic test* (RDT) untuk tata laksana pasien. Reagen Antigen yang digunakan sesuai ketentuan WHO memiliki kinerja minimal sensitivitas $\geq 80\%$ dan spesifisitas $\geq 97\%$ dibandingkan NAAT. Pemeriksaan ini dapat digunakan untuk mendiagnosis SARS-CoV-2 pada kondisi NAAT tidak tersedia atau waktu ketersediaan hasilnya terlalu lama. Pemeriksaan dilakukan 5-7 hari setelah munculnya untuk mengoptimalkan kinerja reagen (10,12,22).

Saat ini ratusan perusahaan telah memproduksi reagen Rapid antigen. Dari data Find dx per November 2020,

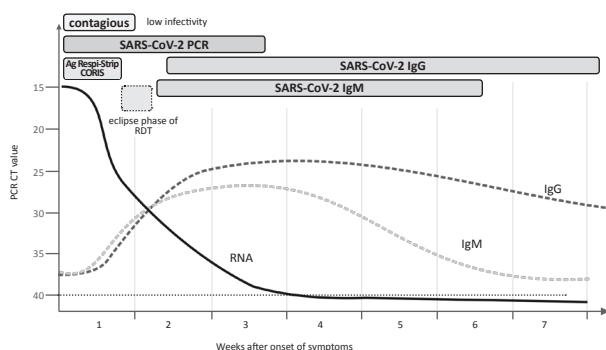
telah terdapat 87 reagen yang tersedia (64 - CE/IVD, 7 FDA-EUA, 14 RUO, 2 lainnya). Umumnya reagen yang tersedia menggunakan *lateral flow test* format dengan metode *sandwich immunodetection* dengan target protein nucleocapsid virus. Sensitivitas reagen yang beredar sangat bervariasi mulai dari nol hingga 94% dan spesifisitas $>97\%$. Reagen ini umumnya memberikan kinerja yang baik pada Ct value ≤ 25 atau >106 kopi/mL, yang biasanya terjadi pada fase prasimtomatik (1-3 hari sebelum munculnya gejala) dan fase simtomatik awal (dalam waktu 5-7 hari pertama penyakit) namun setiap penggunaan reagen perlu divalidasi terlebih dahulu karena sering kali klaim pabrik tidak sesuai seperti yang telah dilaporkan WHO (10,22).

Sensitivitas pemeriksaan antigen SARS-CoV-2 antigen bervariasi, lebih rendah sehingga angka negatif palsu cukup tinggi. Sensitivitas adalah persentase kasus positif menurut standar referensi NAAT yang terdeteksi positif oleh pemeriksaan antigen SARS-CoV-2. Selain itu antigen umumnya terdeteksi dalam rentang waktu yang pendek yaitu 1-3 hari sebelum muncul gejala atau 5-7 hari setelah muncul gejala saja mungkin disebabkan karena pemeriksaan ini langsung mendeteksi protein virus sehingga diperlukan banyak protein virus untuk menempel pada antibodi dan memberikan hasil yang dapat dideteksi. Pemeriksaan antigen kualitatif membutuhkan sampel yang mengandung ribuan protein virus untuk menghasilkan tes yang positif. Jika sampel tidak memiliki cukup virus atau seseorang mengalami infeksi tingkat rendah, tes dapat memberikan hasil negatif palsu - dan orang yang sakit tersebut akan diberi tahu bahwa mereka tidak terinfeksi. Dalam skala besar, hal ini dapat mengakibatkan tidak terdiagnosisnya banyak individu yang sebenarnya terinfeksi sehingga akan meningkatkan potensi penyebaran (10,12,22).

Positivitas deteksi antigen dengan spesimen nasofaring paling tinggi pada saat viral load tinggi di minggu pertama setelah timbulnya gejala/risiko penularan SARS-CoV-2. Pada minggu kedua infeksi COVID-19 antigen tidak terdeteksi, namun antibodi mulai dapat dideteksi. Fase eclipse dapat diketahui dengan menggunakan kombinasi pemeriksaan antigen dan antibodi. Hasil penelitian

Veyrence dkk menunjukkan bahwa dengan melakukan pemeriksaan antigen dan antibodi maka sensitivitasnya meningkat menjadi 84%.

Review Sistematis Cochrane dari 5 studi dengan 943 sampel memberikan sensitivitas yang bervariasi, yaitu 56.2% (0%-94%) dan spesifisitas 99.5% (98.1% - 99.9%). Studi dilakukan menggunakan 5 reagen Antigen RDT yang berbeda (2 FIA dan 3 CGIA). Sensitivitas dengan sampel high viral load ($CT \leq 25$): 21%-100% sedangkan pada sampel dengan low viral load ($Ct \leq 30$): 8%-72% (12,22,24).



Gambar 3. Variasi waktu penanda biologi untuk diagnosis COVID-19 (24) .

PEMERIKSAAN ANTIBODI TERHADAP SARS-CoV-2

Anti SARS-CoV-2 (Kualitatif)

Tes serologi merupakan tes berbasis darah yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi apakah orang telah terpapar patogen tertentu. Tes berbasis serologi menganalisis komponen serum dari *whole blood*. Serum mencakup antibodi untuk komponen spesifik patogen, yang disebut antigen. Antigen-antigen ini dikenali oleh sistem kekebalan tubuh sebagai benda asing dan menjadi target respons imun (10,12).

Virus SARS-CoV-2 merupakan virus RNA yang diselubungi protein (enveloped virus), pada sel yang terinfeksi virus maupun transfeksi plasmid akan mengekspresikan protein N. Protein N ini diperlukan virus corona untuk pembuatan RNA. Protein N ditemukan dalam jumlah yang banyak selama proses perbanyakan virus, protein N berikatan dengan virus RNA dan membentuk helik nucleocapsid. Protein N ini merupakan

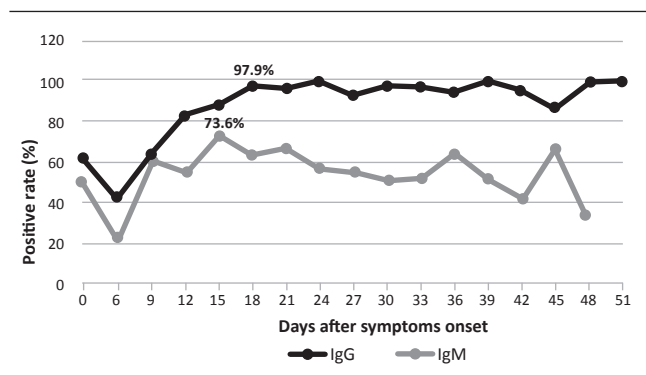
phosphoprotein yang sangat immunogenik (merangsang pembentukan antibody) dan jarang berubah (*conserved region*). Nukleoprotein memiliki jumlah paling banyak dan ditemukan pada virus atau sel yang terinfeksi. Oleh sebab itu protein N ini digunakan untuk dasar pembuatan tes serologi SARS CoV-2 (12).

SARS-CoV-2 adalah patogen yang baru ditemukan, pemahaman mengenai respons antibodi yang ditimbulkannya masih terus berkembang, sehingga penggunaan tes deteksi antibodi harus dilakukan dengan hati-hati, dan tidak dilakukan untuk menentukan infeksi akut. Pemeriksaan non-kuantitatif (seperti *lateral flow*) tidak dapat mendeteksi peningkatan titer antibodi, berbeda dengan pemeriksaan semi-kuantitatif atau kuantitatif (12).

Deteksi antibodi sebaiknya tidak digunakan sebagai alat diagnosis tunggal dalam mengidentifikasi infeksi akut dalam perawatan klinis atau untuk tujuan pelacakan kontak. Interpretasi harus dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa faktor seperti waktu penyakit, klinis, epidemiologi dan prevalensi di lingkungan tertentu, jenis tes yang digunakan, metode validasi, dan keandalan hasilnya (12).

Serokonversi pada pemeriksaan Anti SARS-CoV-2 diamati lebih kuat dan lebih cepat terjadi pada pasien-pasien dengan penyakit parah dibandingkan dengan pasien dengan penyakit ringan atau infeksi asimtomatik. Antibodi mulai dapat terdeteksi pada akhir minggu pertama penyakit pada sebagian pasien, umumnya 2-3 minggu setelah pertama kali terpapar atau 7-10 hari setelah onset gejala (jika bergejala), tetapi pada pasien-pasien dengan infeksi subklinis atau ringan mungkin memerlukan waktu berminggu-minggu. Berdasarkan publikasi terbaru, menunjukkan bahwa antibodi IgM dan IgG muncul pada waktu yang hampir bersamaan pada sekitar minggu ke 3 dari sejak terpapar virus SARS-CoV-2, sehingga tidak diperlukan pemeriksaan yang dapat memisahkan deteksi antara IgM dan IgG untuk mendeteksi antibodi akibat paparan SARS-CoV-2. Sensitivitas antibodi total maupun IgG adalah 100% setelah ≥ 14 hari konfirmasi PCR positif (10,12,24).

Studi Hu *et al.* Menunjukkan bahwa positività IgG lebih tinggi dibandingkan IgM. Pada mayoritas kasus IgG menetap lebih lama dari IgM, sehingga dapat digunakan untuk menentukan tindak lanjut pemulihan pasien dan untuk menilai kekebalan (terhadap infeksi ulang).



Gambar 4. Kinetik antibodi pasien rawat inap

Sensitivitas respons antibodi yang baik terjadi pada tahap penyembuhan, di mana intervensi klinis atau interupsi transmisi penyakit sudah lewat. Oleh karena itu, serologi tidak dapat menggantikan pemeriksaan virologis untuk membantu pelacakan kontak atau tatalaksana klinis. Lama waktu bertahanya antibodi yang dihasilkan sebagai respons terhadap SARS-CoV-2 masih perlu diteliti lebih lanjut. Selain itu, keberadaan antibodi yang mengikat SARS-CoV-2 tidak menjamin bahwa antibodi tersebut adalah antibodi yang menetralkan atau memberikan imunitas perlindungan (10,12).

Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Niko dkk. membandingkan kinerja pemeriksaan ELISA untuk deteksi antibodi IgG menggunakan protein N rekombinan dan pemeriksaan antibodi IgG menggunakan protein S rekombinan pada berbagai tahap infeksi SARS-CoV-2. Sensitivitasnya adalah 70,6% untuk ELISA dengan protein N rekombinan dan 58,8% untuk ELISA dengan protein S rekombinan pada hari ke 5-9 setelah COVID-19 yang dikonfirmasi oleh PCR. Pada 10-18 hari setelah konfirmasi, sensitivitasnya adalah 100% untuk ELISA dengan protein N rekombinan dan 93,8% untuk ELISA dengan protein S rekombinan. Demikian pula, Liu dkk. mengevaluasi dua kit ELISA berdasarkan protein S dan protein N SARS-CoV-2 untuk mendeteksi antibodi IgG dan IgM, menunjukkan sensitivitas antibodi IgG SARS-CoV-2 <60% menggunakan tes ELISA berbasis protein S pada 6-10 hari setelah onset penyakit,

dan sensitivitas meningkat hingga >90% pada 16-20 hari setelah onset. Sensitivitas ELISA IgG dan IgM berbasis protein S masing-masing 74,3% dan 77,1%, dan ELISA IgG berbasis protein N dan IgM masing-masing sebesar 70,1% dan 68,2% (12).

Immunofluorescence Assay (IFA)

Antibodi IgM dan IgG SARS-CoV-2 dalam serum dari kasus COVID-19 pertama di Finlandia diidentifikasi dengan *immunofluorescence assay* (IFA). Serum pasien terus diencerkan dan diinkubasi selama 30 menit untuk IgG dan 2 jam untuk IgM dalam sel Vero E6. Meskipun antibodi tidak terdeteksi pada hari ke 4 sejak gejala pertama, titer IgM dan IgG meningkat menjadi 1:80 pada hari ke 9, 1:32 dan 1:128 pada hari ke 20. Sampel serum dari kelompok kontrol tidak terlihat pengikatan spesifik pada pengenceran lebih dari 1:20. Niko dkk. membandingkan kinerja tes IFA dan netralisasi pada berbagai tahap infeksi SARS-CoV-2. Sensitivitas tes IFA dan netralisasi meningkat dari 76,5% pada hari ke 5-9 setelah konfirmasi dengan PCR menjadi 100% pada hari ke 10-18. Meskipun IFA menjanjikan dalam diagnosis dini, fluoresensi non-spesifik dapat menyebabkan penilaian yang salah dan sensitivitasnya juga perlu dievaluasi lebih lanjut (12).

Chemiluminescence Immunoassay (CLIA)

Chemiluminescence immunoassay (CLIA) adalah salah satu tes imunologi paling populer dalam mengidentifikasi penyakit menular dengan keunggulan deteksi kuantitatif. Metode yang digunakan pada pemeriksaan dengan Elecsys Anti SARS-CoV-2 adalah *ECLIA Sandwich principle direct* menggunakan protein rekombinan yang merepresentasikan antigen nucleocapsid (N) untuk mendeteksi antibodi terhadap SARS-CoV-2. Pada pemeriksaan *direct* ini yang dideteksi adalah antibodi *mature* yang spesifik terhadap SARS-CoV-2, sedangkan metode *indirect* mendeteksi seluruh jenis antibodi termasuk yang *immature*. Reagen Elecsys Anti SARS-CoV-2 (Roche) memiliki sensitivitas klinis 88.1% pada 7-14 hari setelah konfirmasi PCR, serta 100% pada ≥ 14 hari setelah konfirmasi PCR, dan spesifisitas klinis 99.81% dari sampel rutin, donor darah, *Common Cold Panel*, dan *Coronavirus Panel* (10,12,25).

Pemeriksaan Antibodi Rapid dan *Point-of-Care Lateral Flow Assay*

Deteksi kualitatif atau semi-kuantitatif SARS-CoV-2 IgM dan antibodi IgG dalam serum, plasma dan sampel darah vena *in vitro* dapat dilakukan dengan metode *lateral flow assay* (LFA). Isabel dkk. mengevaluasi tiga tes IgG/IgM LFA dan dua *immunoassay* otomatis kuantitatif untuk mendeteksi SARS-CoV-2 IgG, IgM dan IgA antibodi dalam sampel serum dari 128 pasien COVID-19 yang dikonfirmasi oleh RT-PCR. Tes menyajikan spesifisitas 100% dalam analisis sampel kontrol negatif. Sensitivitas keseluruhan dari tiga tes LFA adalah sekitar 70% dan tidak ada perbedaan signifikan yang diamati. Sensitivitas semua tes meningkat pada minggu kedua setelah timbulnya gejala, dan semua tes mencapai tingkat sensitivitas yang sama (91-94%) setelah 14 hari (12,25).

Microarray dan microfluidic chip

Platform microarray dan microfluidic dapat dengan mudah diubah menjadi POC dengan portabilitas, miniaturisasi, otomatisasi, dan integrasi berbagai fungsi ke dalam chip. Dengan ukuran kecil, sensitivitas tinggi, dan analisis *throughput* tinggi, microarray dan chip mikrofluida sangat baik untuk identifikasi patogen. Rafael dkk. mendeskripsikan antigen microarray yang mengandung 65 antigen penyebab infeksi saluran pernapasan akut dari SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, dan virus pernapasan umum lainnya. Antigen SARS-CoV-2 termasuk domain protein N, protein S, RBD, S1 dan S2. Sampel kasus COVID-19 yang dikonfirmasi sangat reaktif terhadap antigen SARS-CoV-2, dan reaktivitas pada IgG lebih jelas daripada IgA. Mirip dengan IgG, IgA menunjukkan reaktivitas yang lebih tinggi terhadap protein SARS-CoV-2 N, domain S2, dan S *full-length*, reaktivitas silang dengan protein SARS-CoV N, tetapi tidak dengan antigen MERS-CoV. Berbagai studi menunjukkan kinerja tinggi dalam menganalisis antibodi dan antigen spesifik SARS-CoV-2 pada pasien COVID-19 dengan microarray dan microfluidic chip. Namun, beberapa protein pada microarray diamati tidak diekspresikan dalam sistem sel mamalia sehingga perlu dioptimalkan lebih lanjut (12).

Anti SARS-CoV-2 Kuantitatif

Antibodi netralisasi adalah bagian dari antibodi yang dapat menghambat replikasi virus dan merupakan mekanisme utama imunitas humoral melawan infeksi virus. Pada infeksi SARS-CoV-2, antibodi netralisasi mengenali beberapa region dalam glikoprotein Spike, terutama RBD. Fungsi perlindungan antibodi netralisasi terutama dimediasi oleh blokade awal Spike yang mengikat ACE2, yang akan menghambat masuknya virus ke sel, sehingga dapat mencegah infeksi virus. Berdasarkan mekanisme kerjanya tersebut, sehingga mayoritas antibodi netralisasi merupakan antibodi yang bertugas untuk melawan protein permukaan virus (26,27).

Antibodi monoklonal terhadap protein S1 yang menunjukkan aktivitas netralisasi sedang dikembangkan sebagai terapi potensial untuk COVID-19, salah satunya sebagai bahan aktif utama plasma konvalesen yang digunakan untuk mengobati pasien COVID-19 dengan gejala berat. Selain itu, hampir semua vaksin COVID-19 yang sedang dikembangkan menargetkan protein S dengan tujuan untuk menginduksi antibodi netralisasi anti-S. Studi vaksin di awal menunjukkan korelasi antara titer antibodi netralisasi dengan efikasi proteksi perlindungan pada hewan coba. Semua studi tersebut menunjukkan bahwa protein S adalah target utama antibodi netralisasi terhadap SARS-CoV-2, dan antibodi netralisasi anti-S mempunyai peran utama dalam imunitas COVID-19 (26,27).

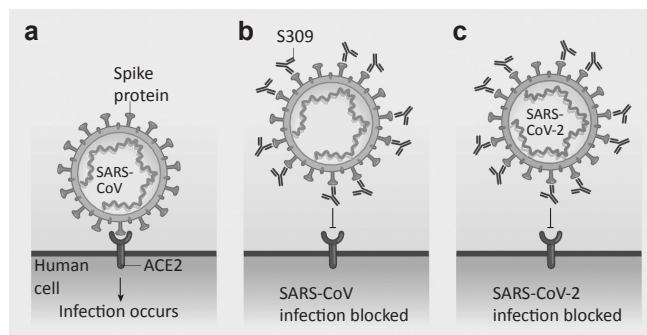
Pemeriksaan netralisasi virus merupakan *gold standard* untuk mendeteksi keberadaan antibodi fungsional, namun pemeriksaan ini memerlukan staf yang sangat terampil dan fasilitas kultur BSL 3 oleh karena itu tidak sesuai untuk digunakan dalam tes diagnostik rutin (10,12).

Untuk memenuhi kebutuhan pemeriksaan yang dapat melihat titer antibodi yang diperkirakan mempunyai daya netralisasi pada pasien yang pernah positif COVID-19 serta untuk menilai efektivitas vaksinasi yang rencananya akan dilakukan dalam skala besar di Indonesia serta monitoring titer antibodi pasca vaksinasi disediakan pemeriksaan Anti SARS-CoV-2 Kuantitatif. Pemeriksaan Anti SARS-CoV-2 dilakukan untuk mengukur antibodi kuantitatif *in vitro*

(termasuk IgG) terhadap *receptor binding domain* (RBD) protein *Spike* (S) SARS-CoV-2 yang bertujuan untuk menilai respons imun humoral adaptif terhadap protein *Spike* SARS-CoV-2 (25,28).

Pemeriksaan Anti SARS-CoV-2 Kuantitatif menggunakan protein rekombinan mewakili RBD antigen S dalam format double-antigen sandwich assay, mengukur antibodi spesifik dengan afinitas tinggi terhadap SARS-CoV-2 secara kuantitatif untuk membantu pemantauan longitudinal dinamika respons antibodi pada setiap pasien (25).

Protein Nucleocapsid (N) pada SARS-CoV-2 memiliki kesamaan sekitar 70% dengan virus SARS-CoV, sehingga protein N tidak terlalu spesifik terhadap SARS-CoV-2. Namun, deteksi antibodi terhadap antigen ini dapat digunakan sebagai screening awal karena antibodi terhadap N muncul terlebih dahulu dibandingkan antibodi terhadap S. Protein S terdiri dari dua subunit fungsional, yaitu S1 dan S2. Subunit S1 memiliki *receptor binding domain* (RBD) yang digunakan oleh virus untuk masuk ke dalam sel manusia menggunakan reseptor ACE-2. RBD diketahui memicu pembentukan antibodi netralisasi, dimana target utamanya yaitu protein S memediasi masuknya virus ke dalam sel manusia dan merupakan target utama untuk antibodi netralisasi (25,28,29).



Gambar 5 a. SARS-CoV menginfeksi sel manusia dengan mengikat protein ACE2. b, antibodi (bernama S309) yang terikat pada protein Spike SARS-CoV mencegah infeksi virus. c, antibodi yang terikat ke wilayah serupa dari protein spike SARS-CoV-2 mencegah infeksi SARS-CoV-2 (29).

Berapa titer antibodi yang terbukti mempunyai efikasi mencegah timbulnya gejala, berapa titer yang mampu untuk mencegah terjadinya penularan dan berapa lama antibodi

bertahan harus mempertimbangkan rasio manfaat-risiko dari sisi keamanan (*safety*). hal ini adalah pertanyaan-pertanyaan yang paling sering ditanyakan, untuk menjawab pertanyaan tersebut umumnya membutuhkan waktu pengujian kurang lebih 5-15 tahun. Sehingga prinsip saat ini adalah semakin tinggi titer, semakin baik daya netralisasi terhadap virus SARS-CoV-2.

Pada tanggal 17 Desember 2020, WHO menetapkan Metode acuan dan satuan standar titer Antibodi SARS-CoV-2 disebut Binding Antibody Unit (BAU)/mL yang mengukur berapa banyak antibodi yang berpotensi netralisasi terhadap SARS-CoV-2 dan dilakukan kalibrasi untuk mendapatkan angka konversi dan korelasi terhadap satuan BAU/mL dari berbagai metode yang ada.

Saat ini Prodia menggunakan satuan titer U/mL, di mana hasil transposisi matematis U ke BAU dari Standar Internasional WHO mengikuti persamaan $U = 0,972 * BAU$ yang menyebabkan perbedaan numerik minimal dan berada dalam rentang variasi pengujian, sehingga Hasil U/mL dianggap ekuivalen dengan BAU/mL.

Pada tanggal 4 Februari 2021, *Food and Drug Administration* (FDA) menerbitkan revisi *Emergency Use Authorization* (EUA)

Tabel 2. Penetapan Kriteria Titer Berbagai Manufaktur Pada Terapi Plasma Konvalesen COVID-19 (30).

Tests Acceptable for Use in the Manufacture of High Titer COVID-19 Convalescent Plasma		
Manufacturer (listed alphabetically)	Assay	Qualifying Result
Abbott	SARS-CoV-2 IgG (ARCHITECT and Alinity)	Index (S/C) ≥ 4.5
Beckman Coulter	Access SARS-CoV-2 IgG	S/CO ≥ 3.3
EUROIMMUN	Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)	Ratio ≥ 3.5
GenScript	cPass SARS-CoV-2 Neutralization Antibody Detection Kit	Inhibition $\geq 68\%$
Kantaro	COVID-SeroKlir, Kantaro Semi-Quantitative SARS-CoV-2 IgG Antibody Kit	Spike ELISA >47 AU/mL
Mount Sinai	COVID-19 ELISA IgG	Spike ELISA titer $\geq 1:2880$
Ortho	VITROS Anti-SARS-CoV-2 IgG	S/C ≥ 9.5
Roche	Elecsys Anti-SARS-Cov-2 S	≥ 132 U/mL
Siemens	ADVIA Centaur SARS-CoV-2IgG (COV2G)	Index ≥ 4.8

terkait penggunaan darurat terapi plasma konvalesen dalam tata laksana pasien rawat inap COVID-19 (30).

Salah satu bagiannya berupa penetapan kriteria titer antibodi Anti SARS-CoV-2 Kuantitatif yang layak sebagai donor plasma konvalesen dari berbagai metode, salah satunya menggunakan satuan U/mL, yaitu ≥ 132 U/ml (Elecys Anti-SARS-CoV-2 S) (30).

PENUTUP

Keputusan untuk melakukan pemeriksaan harus didasarkan pada faktor klinis dan epidemiologis. Pengambilan spesimen yang sesuai pada pasien yang diduga kuat mengalami infeksi COVID-19 dan diagnosis laboratorium yang akurat pada pasien tersebut adalah dua prioritas yang mendukung tatalaksana klinis pasien dan langkah pengendalian infeksi SARS-CoV-2. Bukti kuat infeksi virus bersumber dari deteksi fragmen-fragmen virus, seperti protein atau asam nukleat, melalui tes virologis. Orang yang terinfeksi dapat memberikan hasil tes positif asam nukleat virus atau protein virus tanpa menunjukkan gejala (asimtomatik) atau sebelum munculnya gejala (prasimtomatik), dan selama episode penyakit (simtomatik). Pemeriksaan serologi dapat menjadi indikator penyebaran virus, sedangkan pemeriksaan RT-PCR dapat menunjukkan siapa yang saat ini terinfeksi SARS-CoV-2. Kombinasi uji molekuler dan serologis diperlukan untuk meningkatkan akurasi diagnostik COVID-19.

DAFTAR PUSTAKA

- Li H, Liu S, Yu X, Tang S, Tanga C. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 55(5): 105951.
- Coronavirus [Internet]. Who.int. 2021 [cited 20 December 2021]. Available from: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1
- Soto AB. The role of laboratory medicine specialists in the COVID-19 pandemic. *Adv Lab Med*. 2020; 20200037.
- Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;395(10224):565-74.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Krüger N, Müller M, Drosten C, Pöhlmann S. The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS- 1 coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. *bioRxiv*. [PrePrint] 2020.
- Li F, Li W, Farzan M. Harrison SCORF3a, ORF6, ORF7, ORF8 dan ORF9. Structural biology: Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science*. 2005;309(5742):1864-8.
- Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci China Life Sci*. 2020;63(3):457-60.
- Russo A, Minichini C, Starace M, Astorri R, Calò F, Coppola. Current Status of Laboratory Diagnosis for COVID-19: A Narrative Review. *Infection and Drug Resistance*. 2020;13:2657-65.
- World Health Organization. Interim Guidance : Diagnostic testing for SARS-CoV-2 [Internet]. 2021. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>.
- COVID-19 and Your Health [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 5 January 2021]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html>.
- Li C, Zhao C, Bao J, Tang B, Wang Y, Gu B. Laboratory diagnosis of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Clinica Chimica Acta*. 510;2020:35-46.
- World Health Organization, Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>.

14. Bohn MK, Mancini N, Loh TP, Wang C, Grimmer M, Gramegna M, et al. IFCC interim guidelines on molecular testing of SARS-CoV-2 infection. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2020; 58(12).
15. Abduljalil JM. Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2: available approaches and limitations. *New Microbe and New Infect*. 2020; 36: 100713.
16. Chang MC, Hur J, Park D. Interpreting the COVID-19 Test Results: a Guide for Psychiatrists. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. 2020.
17. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. 2020;581:465-9.
18. Meza-Robles C, Barajas-Saucedo CE, Tiburcio-Jimenez D, Mokay-Ramírez KA, Melnikov V, Rodriguez-Sanchez IP. One-step nested RT-PCR for COVID-19 detection: A flexible, locally developed test for SARS-CoV2 nucleic acid detection. *J Infect Dev Ctries*. 2020;14(7):679-84.
19. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Central Science*. 2020;6(5): 591-605.
20. Visseaux B, Le Hingrat Q, Collin G, Bouzid D, Lebourgeois S, Le Pluart D, et al. Evaluation of the QIAstat-Dx respiratory SARS-CoV-2 panel, the first rapid multiplex PCR commercial assay for SARS-CoV-2 detection. *J. Clin. Microbiol*. 2020.
21. Ruszkiewicz DM, Sandersb D, O'Briencv R, Hempeld F, Reedc MJ, Riepe AC. Diagnosis of COVID-19 by analysis of breath with gas chromatography ion mobility spectrometry - a feasibility study E. *Clinical Medicine*. 2020;29:30.
22. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays [Internet]. Who. int. 2021 [cited 20 December 2020]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2infection-using-rapid-immunoassays>.
23. Porte L, Legarraga P, Vollrath V, Aguilera X, Munita JM, Araos R., et al. Evaluation of a novel antigen-based rapid detection test for the diagnosis of SARS-CoV-2 in respiratory samples. *Int J Infect Dis*. 2020;99:328-33.
24. Veyrenchea N, Bolloréa K, Pisonia A, Bedina A, Mondainb A, Ducosb J, et al. Diagnosis value of SARS-CoV-2 antigen/antibody combined testing using rapid diagnostic tests at hospital admission. medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.19.20197855>.
25. Elecsys Anti SARS CoV 2 Immunoassay for the qualitative detection of antibodies against SARS CoV-2. Sell Sheet. Roche
26. Carillo J, Izquierdo-Useros N, Avila-Nieto C, Pradenas E, Clotet B, Blanco J. Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;1-5.
27. Li L. Neutralizing Antibodies to SARS-CoV-2: An Important Mechanism of Immunity. *Ortho Clinical Diagnostics*. 2020;3:1-4.
28. Post N, Eddy D, Huntley C, van Schalkwyk MCI, Shrotri M, Leeman D, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS ONE* 15(12):e0244126.
29. Whittaker GR, Daniel S. Going back in time for an antibody to fight COVID-19. *Nature* 2020;583:203-4.
30. Food and Drug Administration. Letter of Authorization, Reissuance of Convalescent Plasma EUA. 2021

FORUM DIAGNOSTICUM

ISSN 0854-7173 | No. 6/2020

Redaksi Kehormatan

Drs. Andi Wijaya, Ph.D.

Prof. Dr. dr. FX Budhianto Suhadi

Ketua Dewan Redaksi/Penanggung Jawab

Dr. Trilis Yulianti, M.Kes.

Alamat Redaksi

PT. Prodia Widyahusada

Jl. Kramat Raya 150, Jakarta 10430

Telepon: (021) 3144182 (Hunting)

Fax: (021) 3926675

e-mail: produk@prodia.co.id

website: www.prodia.co.id

Anggota Dewan Redaksi

Elva Aprilia Nasution, S.Farm.

Rina Triana, M.Farm., Apt.

Siska Darmayanti, S.Si., M.Farm.

Gianni Yosephine, S.Si., M.Farm

Ardian Susanto, M.Farm.

Matthew Justyn, S.Si.



Certificate Number : JKT 0403247
Certified to QMS