



Názov:

**Štandardný postup pre mikrobiologickú diagnostiku
pri suspektnej infekcii vírusom SARS-CoV-2
pre laboratóriá klinickej mikrobiológie
1. revízia**

Autori:

**MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.,
doc. RNDr. Danica Valkovičová Staneková, PhD.,
doc. MUDr. Milan Nikš, Csc.,
MUDr. Miroslava Horniačková, PhD., MPH.,
doc. MUDr. Elena Nováková, PhD.,
MUDr. Emília Miková,
MUDr. Eva Schréterová, PhD.,
Mgr. Edita Staroňová, PhD.,
prof. MUDr. Anna Líšková, PhD.,
prof. RNDr. Shubhada Bopegamage, CsC.,
MUDr. Rudolf Botek,
MUDr. Zuzana Bečková,
MUDr. Zuzana Kónyová,
RNDr. Boris Klempa,
DrSc., prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.,
prof. MUDr. Jozef Šuvada, PhD., MPH, MBA,
MUDr. Elena Prokopová**

Špecializačný odbor:

Klinická mikrobiológia

Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky podľa § 45 ods. 1 písm. c) zákona 576/2004 Z. z. o zdravotnej starostlivosti, službách súvisiacich s poskytovaním zdravotnej starostlivosti a o zmene a doplnení niektorých zákonov v znení neskorších predpisov vydáva štandardný postup:

Štandardný postup pre mikrobiologickú diagnostiku pri suspektnej infekcii vírusom SARS-CoV-2 pre laboratória klinickej mikrobiológie – 1. revízia

Číslo ŠP	Dátum predloženia na Komisiu MZ SR pre ŠDTP	Status	Dátum účinnosti schválenia ministrom zdravotníctva SR
0164	15. júna 2021	schválené	17. júna 2021
0164R1		schválené	26. október 2021

Autori štandardného postupu

Autorský kolektív:

MUDr. Monika Czirfuszová, PhD., doc. RNDr. Danica Valkovičová Staneková, PhD., doc. MUDr. Milan Nikš, Csc., MUDr. Miroslava Horniačková, PhD., MPH., doc. MUDr. Elena Nováková, PhD., MUDr. Emília Míková, MUDr. Eva Schréterová, PhD., Mgr. Edita Staroňová, PhD., prof. MUDr. Anna Líšková, PhD., prof. RNDr. Shubhada Bopegamage, CsC., MUDr. Rudolf Botek, MUDr. Zuzana Bečková, MUDr. Zuzana Kónyová, RNDr. Boris Klempa, DrSc., prof. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc., prof. MUDr. Jozef Šuvada, PhD., MPH, MBA, MUDr. Elena Prokopová

Odborná podpora tvorby a hodnotenia štandardného postupu

Prispievatelia a hodnotitelia: členovia odborných pracovných skupín pre tvorbu štandardných diagnostických a terapeutických postupov MZ SR; hlavní odborníci MZ SR príslušných špecializačných odborov; hodnotitelia AGREE II; členovia multidisciplinárnych odborných spoločností; odborný projektový tím MZ SR pre ŠDTP a patientske organizácie AOPP v Slovenskej republike; Inštitút zdravotníckej politiky; NCZI; Sekcia zdravia MZ SR, Kancelária WHO na Slovensku.

Odborní koordinátori: doc. MUDr. Peter Jackuliak, PhD., MPH; prof. MUDr. Mariana Mrázová, PhD., MHA; prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP

Recenzenti

členovia Komisie MZ SR pre ŠDTP: PharmDr. Zuzana Baťová, PhD.; PharmDr. Tatiana Foltánová; prof. MUDr. Jozef Holomáň, CSc.; doc. MUDr. Martin Hrubíško, PhD., mim.prof.; doc. MUDr. Peter Jackuliak, PhD., MPH; doc. MUDr. Jozef Kalužay, PhD.; MUDr. Jana Kelemenová; MUDr. Branislav Koreň; prof. MUDr. Ivica Lazúrová, DrSc.; PhDr. Mária Lévyová; MUDr. Boris Mavrodiev; Mgr. Katarína Mažárová; prof. MUDr. Mariana Mrázová, PhD., MHA; MUDr. Mária Murgašová; Ing. Jana Netriová, PhD. MPH; prof. MUDr. Juraj Payer, PhD., MPH, FRCP; Mgr. Renáta Popundová; MUDr. Jozef Pribula, PhD., MBA; MUDr. Ladislav Šinkovič, PhD., MBA; prof. MUDr. Mária Šustrová, CSc.; MUDr. Martin Vochyan; MUDr. Andrej Zlatoš

Technická a administratívna podpora

Podpora vývoja a administrácia: Ing. Peter Čvapek; Mgr. Barbora Vallová; Mgr. Ľudmila Eisnerová; Mgr. Mário Fraňo; Ing. Petra Hullová; JUDr. Marcela Virágová, MBA; Ing. Marek Matto; prof. PaedDr. PhDr. Pavol Tománek, PhD., MHA; JUDr. Ing. Zsolt Mány, PhD., MHA; Mgr. Tomáš Horváth; Ing. Martin Malina; Ing. Barbora Kováčová; Ing. Katarína Krkošková; Mgr. Miroslav Hečko; Mgr. Anton Moises; PhDr. Dominik Procházka; Ing. Andrej Bóka

Podporené grantom z OP Ľudské zdroje MPSVR SR NFP s názvom: "Tvorba nových a inovovaných postupov štandardných klinických postupov a ich zavedenie do medicínskej praxe" (kód NFP312041J193)

Kľúčové slová

pandémia COVID 19, SARS-CoV-2, real-time RT-PCR, protilátky proti SARS-CoV-2, mikrobiologická diagnostika

Zoznam skratiek a vymedzenie základných pojmov

ACE2	angiotenzín konvertujúci enzým 2 (angiotensin converting enzyme 2)
BAL	bronchoalveolárna laváž
BSL	úroveň biologickej bezpečnosti (biosafety level)
CE IVD	in vitro diagnostikum spĺňajúce kritériá európskej smernice 98/79/EC
cDNA	komplementárna deoxyribonukleová kyselina
CLIA	chemiluminiscenčná imunoanalýza
CMIA	chemiluminiscenčná imunoanalýza na mikročasticiach
COVID 19	koronavírusová choroba 2019 (coronavirus disease 2019)
Ct	cyklus, v ktorom termocyklér zaznamená tvorbu PCR produktu v reakcii (cycle threshold)
ELISA	enzýmová imunoanalýza
FFP2	filtračná maska na tvár (filtering face piece) triedy 2
FFP3	filtračná maska na tvár (filtering face piece) triedy 3
FIA	fluorescenčná imunoanalýza
MERS	respiračný syndróm na Blízkom východe (Middle East Respiratory Syndrome)
M proteín	matricový proteín
MZ SR	Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky
NCZI	Národné centrum zdravotníckych informácií
N proteín	nukleokapsidový proteín
POCT	test vykonávaný pri lôžku pacienta (point of care test)
Real-time RT-PCR	polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou v reálnom čase (real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
RBD	receptorová väzbová doména (receptor binding domain)
RdRp	RNA závislá RNA polymeráza (RNA dependent RNA polymerase)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
RÚVZ	Regionálny úrad verejného zdravotníctva
SARS-CoV-2	koronavírus 2 spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)
S proteín	glykoproteín výbežkov (spike)
ÚVZ SR	Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky
WHO	Svetová zdravotnícka organizácia (World Health Organisation)

Zhrnutie odôvodnenia vývoja štandardu

Prvé prípady pneumónie neznámej etiológie v meste Wuhan v provincii Hubei v Číne boli hlásené čínskou štátnou kanceláriou WHO 31. decembra 2019 (WHO, 2020). Nový koronavírus ako pôvodca týchto infekcií bol oficiálne potvrdený čínskymi autoritami 7. januára 2020. Genómová sekvencia vírusu bola dostupná cez virological.org 10. januára 2020 (Wuhan-Hu-1, GenBank accession number MN908947 (Zhang, 2020), následne 12. januára 2020 boli uložené ďalšie 4 genómy v databáze GISAID (Corman, 2020). Vírus bol potvrdený mimo Číny u cestovateľov z mesta Wuhan už 13. a 17. januára 2020 v Thajsku, 15. januára 2020 v

Japonsku a 19. januára 2020 v Južnej Kórei. Pandémia infekcie COVID 19 spôsobenej SARS-CoV-2 bola oficiálne vyhlásená WHO 11. marca 2020. V súčasnosti je infekcia SARS-CoV-2 rozšírená celosvetovo s viac ako 141,5 miliónmi potvrdených prípadov a s viac ako 3 miliónmi potvrdených prípadov úmrtí (podľa údajov WHO k 20. 04. 2021, <https://covid19.who.int>). Na Slovensku bol potvrdený prvý prípad infekcie vírusom SARS-CoV-2 dňa 06.03.2020, laboratórna diagnostika bola realizovaná v Národnom referenčnom centre pre chrípku na ÚVZ SR s následnou konfirmáciou vo Virologickom inštitúte Univerzity medicíny Charité v Berlíne. Postupne boli do diagnostického procesu zapájané laboratóriá v sieti regionálnych úradov verejného zdravotníctva a laboratóriá vykonávajúce laboratórnu diagnostiku v odbore klinická mikrobiológia. Zlatým štandardom diagnostiky infekcie COVID 19 je real-time RT-PCR. Diagnostiku dopĺňa dôkaz imunitnej odpovede organizmu na prítomnosť vírusu, v rutinej praxi sa v súčasnosti využíva stanovenie tvorby protilátok voči imunogénnym antigénom vírusu SARS-CoV-2. Pri vyhľadávaní infikovaných sú nápomocné skriningové metódy, ktoré umožňujú odhalenie infikovaných v reálnom čase s možnosťou okamžitej izolácie a vyhľadávania kontaktov. Laboratórna diagnostika má kľúčový význam v boji proti pandémie COVID 19.

Kompetencie indikácie

Laboratórnu diagnostiku na priamy dôkaz infekcie vírusom SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR u pacienta spĺňajúceho kritériá pre suspektný, pravdepodobný alebo potvrdený prípad COVID-19 v zmysle aktuálneho znenia Usmernenia hlavného hygienika Slovenskej republiky v súvislosti s ochorením COVID-19 spôsobeným koronavírusom SARS-CoV-2 indikuje ošetrojúci lekár, epidemiológ alebo verejný zdravotník príslušného RÚVZ v súlade s aktuálnou verziou Klinického protokolu indikácií testovania metódou RT-PCR na dôkaz SARS-CoV-2. Doplnkovú nepriamu diagnostiku stanovenia protilátok voči imunogénnym antigénom vírusu SARS-CoV-2 indikuje všeobecný lekár pre dospelých, všeobecný lekár pre deti a dorast, infektológ, pneumoftizeológ, imunoalergológ, v ústavných zdravotníckych zariadeniach ošetrojúci lekár na oddelení pre pacientov s potvrdenou infekciou COVID 19, alebo ošetrojúci lekár iného nemocničného oddelenia u pacienta s klinickým podozrením na COVID 19 pri negatívnom výsledku real-time RT-PCR SARS-CoV-2.

Kompetencia realizovania testovania

Testovanie vzoriek na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR vykonávajú laboratóriá úradov verejného zdravotníctva a diagnostické laboratóriá spĺňajúce kritériá na zaradenie laboratória do siete laboratórií, ktoré vyšetrujú vzorky biologického materiálu osôb na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR podľa osobitného metodického pokynu MZ SR.

Aktuálny zoznam laboratórií je zverejnený na webovom sídle MZ SR: <https://www.health.gov.sk/?covid-19-laboratoria>

Dôkaz protilátok voči imunogénnym antigénom SARS-CoV-2 za účelom zisťovania stavu postinfekčnej alebo postvakcinačnej imunity vykonávajú laboratóriá klinickej mikrobiológie ako doplnkovú diagnostiku na základe indikácie ošetrojúceho lekára.

Rýchle metódy dôkazu infekcie SARS-CoV-2 u symptomatických pacientov pri podozrení na COVID 19 vykonávajú zdravotnícki pracovníci ambulantných a lôžkových zdravotníckych

zariadení vrátane laboratórií zabezpečujúcich nepretržitú diagnostiku pre lôžkové zdravotnícke zariadenia v rámci iniciálnej diagnostiky v záujme včasného rozpoznania infekcie a následnej okamžitej izolácie a liečby pacienta. Antigénové testy sú využívané aj na vyhľadávanie kontaktov a bezpríznakových ľudí s infekciou COVID 19 v rámci skriningového vyšetrenia obyvateľstva prostredníctvom mobilných odberových miest.

Úvod

SARS-CoV-2 pôvodca infekcie COVID 19 patrí do čeľade *Coronaviridae*, rodu Betacoronavirus. Je to obalený pleomorfný vírus špirálovitej symetrie, veľkosti 60 – 140 nm. Dreň vírusu predstavuje jednovláknová RNA s pozitívnou polaritou (+ssRNA), ktorá má dĺžku asi 30 000 nukleotidov. Z obalu vírusu vyčnievajú glykoproteínové výbežky kyjovitého tvaru, ktoré slúžia ako ligandy na receptory vnímavej bunky. Genóm SARS-CoV-2 kóduje 29 proteínov, vrátane RNA závislej RNA polymerázy (RdRp) a štyroch štrukturálnych proteínov. Patrí medzi povrchový glykoproteín výbežkov (S alebo „spike“ proteín), malý obalový proteín (E), matricový proteín (M) a nukleokapsidový proteín (N). Gén S kóduje proteín viažuci receptor, ktorý umožňuje vírusu infikovať bunky. Tento proteín sprostredkuje väzbu na ACE2 receptor a fúziu s membránou bunky, determinuje tropizmus vírusu. Glykoproteín S je zložený z dvoch podjednotiek (S1 a S2). Glykoproteín S obsahuje štiepne miesto furínu na hranici medzi podjednotkami S1/S2, ktoré je procesované počas biogenézy, čím sa tento vírus odlišuje od koronavírusov súvisiacich so SARS-CoV-1 a MERS (Walls, 2020). Podjednotka S2 je vysoko konzervatívna. Receptor viažuca doména S1 vykazuje iba 40 % aminokyselinovú identitu s inými SARS-CoV. V SARS-CoV-2 gén S je divergentný s < 75 % podobnosťou nukleotidovej sekvencie v porovnaní so všetkými predtým opísanými koronavírusmi súvisiacimi so SARS. Ostatné tri štrukturálne proteíny E, N a M sú konzervatívnejšie ako glykoproteín S a sú potrebné pre replikáciu a patogenézu koronavírusov (Udugama, 2020).

Na nepriamu diagnostiku infekcie COVID-19 pomocou testu ELISA IgM/IgG/IgA a iných imunoanalytických metód (napr. CMIA, CLIA, FIA) sa ako antigén používa nukleokapsidový proteín N z koronavírusu netopierov SARS-related-CoV Rp3. Alternatívne sa využíva modifikovaný N proteín SARS-CoV-2, ktorý nevykazuje krížovú reaktivitu s N proteínmi iných koronavírusov, prípadne S proteín, jeho S1 podjednotka alebo receptor-viažuca doména RBD (Okba et al, 2020, Jääskeläinen et al, 2020). Gén RdRp kóduje RNA-závislú RNA polymerázu, ktorá zabezpečuje v spojení s neštrukturálnymi proteínmi udržanie stability vírusového genómu.

SARS-CoV-2 spôsobuje respiračné ochorenie COVID-19. Inkubačná doba je obvykle od 3 až 7 dní až do 2 týždňov, najdlhšia doba od infekcie po nástup príznakov bola 12,5 dní. Podľa štúdie Zhao a kol, 2020 je priemerná doba sérokonverzie pre celkové protilátky 11. deň, pre IgM 12. deň a pre IgG 14. deň. Zatiaľ nie je dostatok informácií o vplyve týchto protilátok na neutralizáciu vírusu. Zistilo sa, že myšacie polyklonálne protilátky voči SARS-CoV S silne inhibovali vstup vírusu do buniek sprostredkovaný SARS-CoV-2S, čo naznačuje, že po vakcinácii možno vyvolať krížovo neutralizujúce protilátky namierené proti konzervovaným S epitopom (Walls, 2020).

Rovnako ako iné koronavírusy, SARS-CoV-2 je citlivý na ultrafialové žiarenie a teplo. Môže byť účinne inaktivovaný lipidovými rozpúšťadlami vrátane éteru (75 %), etanolu,

dezinfekčného prostriedku obsahujúceho chlór, kyseliny peroxyoctovej a chloroformu s výnimkou chlórhexidínu.

Klasifikácia testov

Zlatým štandardom priamej diagnostiky infekcie COVID 19 je molekulárno-biologický dôkaz vírusu SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR. Ako doplnková diagnostika pri klinickom podozrení na COVID 19 pri negatívnom výsledku real-time RT-PCR a aj ako možnosť nepriameho dôkazu prekonanej infekcie COVID 19 slúži dôkaz protilátok izotypu IgG, IgA a IgM voči imunogénnym antigénom vírusu SARS-CoV-2, predovšetkým proti nukleokapsidovému proteínu. Stanovenie protilátok je jednou z možností sledovania postvakcinačnej odpovede, ktorá je charakterizovaná tvorbou protilátok izotypu IgG, IgA a IgM proti vakcinačnému antigénu (pri použitých mRNA vakcínach a subjednotkových vakcínach predovšetkým proti antigénu S a jeho podjednotkám vrátane RBD). Popri protilátkovej odpovedi na infekciu SARS-CoV-2 pravdepodobne ešte významnejšiu úlohu zohráva úloha špecifických T lymfocytov. Predbežné štúdie ukazujú, že špecifické T lymfocyty možno po prekonaní infekcie dokazovať podstatne dlhšiu dobu ako samotné protilátky. Možno očakávať, že v blízkej budúcnosti budú k dispozícii laboratórne testy na dôkaz prebiehajúcej, ale aj postinfekčnej/postvakcinačnej imunitnej odpovede na báze detekcie špecifických pamäťových T-lymfocytov.

Rýchle metódy dôkazu infekcie COVID 19 majú význam pre včasnú diagnostiku a následné okamžité prijatie protiepidemických opatrení a včasnej liečby pacienta. Dostupné sú rýchle molekulárno-biologické metódy dôkazu vírusovej RNA, ktoré sú viazané na prístrojovú techniku a metódy dôkazu antigénov vírusu SARS-CoV-2, ktoré sú síce menej citlivé, sú však jednoduché a väčšina z nich nevyžaduje špeciálnu prístrojovú techniku.


Proces diagnostiky - odporúčania (Minimálny štandard)

1. Molekulárno – biologický dôkaz RNA SARS-CoV-2 metódou real - time RT-PCR

a) Odber a transport vzoriek

Vzorky z dýchacích ciest sú základným biologickým materiálom pre diagnostiku infekcie vírusom SARS-CoV-2. Vzorky z horných dýchacích ciest sú adekvátne vo včasnom štádiu infekcie najmä pri asymptomatickom alebo miernom priebehu. Výter z nazofaryngu a výter z orofaryngu odobratý do skúmavky s vírusovým transportným médiom zvyšuje senzitivitu detekcie a spoľahlivosť výsledku. Vzorky z dolných dýchacích ciest (spútum, endotracheálny aspirát, BAL) sa odoberajú v neskoršom štádiu infekcie najmä v prípadoch, keď vzorky z horných dýchacích ciest boli negatívne testované na COVID 19 a u pacienta pretrváva klinické podozrenie na infekciu vírusom SARS-CoV-2.

Tabuľka č. 1 Odber a transport biologického materiálu na dôkaz RNA SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR (podľa WHO: Diagnostic testing for SARS-CoV-2, Interim guidance, 11.september 2020, annex 1)

 Odber a transport biologického materiálu na dôkaz RNA SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR				
Biologický materiál	Odberová súprava	Časovanie odberu	Poznámka	Podmienky uchovávania a transportu
výter z nazofaryngu a orofaryngu	skúmavka s vírusovým inaktivačným transportným médiom, 2 ks dakrónových alebo polyésterových tampónov typu flocced	včasné symptomatické štádium v prípade úzkeho kontaktu s pozit. testovanou osobou u asymptomatického človeka najskôr 8. deň po kontakte*	je potrebné zabezpečiť, aby dospelá osoba / dieťa minimálne 2 hodiny pred odberom nekonzumoval jedlo, nepil, nežul žuvačku, nefajčil, nevykonával ústnu hygienu a podobne.	+2 až +8 °C ≤ 2 dni -70 °C > 2 dni
nazofaryngeálny výplach/aspirát	sterilná nádobka, sterilná skúmavka s vírusovým inaktivačným transportným médiom	včasné symptomatické štádium		+2 až +8 °C ≤ 2 dni -70 °C > 2 dni
spútum	sterilná nádobka, sterilná skúmavka	v neskoršom štádiu suspektnej infekcie, v prípadoch keď vzorky z horných dýchacích ciest boli negatívne testované na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2		+2 až +8 °C ≤ 2 dni -70 °C > 2 dni
endotracheálny aspirát, BAL	sterilná nádobka, sterilná skúmavka s vírusovým inaktivačným transportným médiom	a u pacienta pretrvávajúce klinické podozrenie na infekciu COVID 19		+2 až +8 °C ≤ 2 dni -70 °C > 2 dni
bioptická vzorka z pľúc, kefkový ster odobraté pri fibrobronchoskopii	sterilná nádobka, sterilná skúmavka s fyziologickým roztokom alebo s vírusovým inaktivačným transportným médiom			+2 až +8 °C ≤ 24 h -70 °C > 24 h
Stolica	sterilná nádobka s lopatkou	od 2. týždňa susp. ochorenia COVID 19, v prípade keď vzorky z dýchacích ciest boli negatívne testované na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2	metóda extrakcie RNA musí byť validovaná na použitie pre vzorky stolíc	+2 až +8 °C ≤ 5 dní -70 °C > 5 dní

*Vyhláška Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorou sa nariaďujú opatrenia pri ohrození verejného zdravia k izolácii osôb pozitívnych na ochorenie COVID-19 a karanténe osôb, ktoré prišli do úzkeho kontaktu s osobou pozitívnu na ochorenie COVID-19, Vestník vlády SR z 3.marca 2021, ročník 31, čiastka 40

Alternatívne vzorky biologického materiálu

V špecifických prípadoch, keď je odber výteru z nazofaryngu a orofaryngu obtiažne realizovateľný, napr. hromadný skrining v školách a domovoch sociálnych služieb, v prípade detí do 12 rokov a u pacientov s kontraindikáciou odberu formou výteru z dýchacích ciest z dôvodu anatomickej odchýlky alebo ochorenia dýchacích ciest na žiadosť všeobecného lekára alebo špecialistu je možné zvoliť ako alternatívny spôsob odberu predovšetkým výplach z ústnej dutiny a hltana kloktaním (validácia metódy tvorí špeciálny doplnok štandardu) a vo výnimočných prípadoch aj odber slín. Odber alternatívnych typov biologického materiálu sa vykonáva do certifikovaných odberových súprav za dôsledného dodržania pokynov výrobcu odberovej súpravy.

Riziká alternatívnych spôsobov odberu a odporúčanie pre prax: pri použití odberu kloktaním a odberu slín sú Ct hodnoty v real-time RT-PCR vyššie ako pri použití nazofaryngeálnych výterov a zároveň pri týchto vzorkách je reálne riziko falošne negatívneho výsledku real - time RT-PCR SARS-CoV-2 pri nízkej vírusovej náloži u pacienta. V záujme zachovania štandardného postupu diagnostiky a porovnateľnosti výsledkov, je nutné uprednostiť spôsoby odberu biologického materiálu na detekciu SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR uvedené v tabuľke č.1 a uvádzať Ct hodnotu vždy v spojitosti s typom biologického materiálu. Ct hodnoty z rôznych spôsobov odberu nie sú porovnateľné.

Spôsob odberu biologického materiálu:

Osobitný spôsob odberu výterov z nazofaryngu a orofaryngu pri podozrení na infekciu COVID-19 sa nachádza v Štandardnom postupe pre rýchle usmernenia klinického manažmentu detských a dospelých pacientov s novým koronavírusom 2019 (COVID-19) dostupný na https://standardnepostupy.sk/files/200000238-5165751659/SDTP_korona_web.pdf

Ostatné vzorky sa odoberajú v súlade so štandardnými postupmi v klinickej mikrobiológii.

b) Dôkaz RNA vírusu SARS-CoV-2 metódou real - time RT-PCR

I. Izolácia RNA vírusu SARS-CoV-2

Izolácia vírusovej RNA sa vykonáva v biologickom bezpečnostnom boxe BSL 2, za použitia ochranných pracovných pomôcok – respirátor FFP3/FFP2, ochranné okuliare/štit, jednorazový oblek, sterilné bezpúdrové rukavice. Je možné použiť manuálne izolačné súpravy alebo súpravy na automatizovanú izoláciu s certifikátom CE IVD.

II. Detekcia RNA vírusu SARS-CoV-2

Real-time RT – PCR je polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou, pri ktorej sa RNA prepisuje do komplementárnej DNA (cDNA) pomocou reverznej transkriptázy. Následne sa DNA amplifikuje štandardným spôsobom polymerázovej reťazovej reakcie s priebežnou analýzou. Pre potvrdenie pozitívneho výsledku je potrebné detegovať vždy viac cieľových génov pre vylúčenie prípadných mutácií.

Počet cyklov/opakovaní v PCR by sa mal pohybovať v rozmedzí 40 – 50. Finálne vyhodnotenie PCR prebieha v súlade s príbalovým letákom výrobcu certifikovanej

diagnostickej súpravy. Súčasťou každej PCR musí byť negatívna a pozitívna kontrola a vnútorná kontrola s cieľom vylúčiť falošnú negativitu (inhibícia PCR, kvalita RNA a pod.). Dostupné testy sú založené na detekcii génov N, E, S a RdRP, ORF1ab (WHO, 2020).

Test na E-gén, N- gén – deteguje koronavírus spôsobujúci SARS , SARS-CoV-2 a všetky koronavírusy izolované z populácie netopierov spôsobujúcich SARS (Sarbecovirus). Skrížená reaktivita s bežnými ľudskými respiračnými koronavírusmi typu CoV NL63, 229E, HKU, OC43 alebo MERS nebola zaznamenaná.

Test na RdRp gén - deteguje fragment z konzervatívneho úseku génu pre RNA-dependentnú RNA polymerázu (RdRP). **Tento test deteguje prítomnosť SARS-CoV-2, nedeteguje ostatné SARS koronavírusy.** Skrížená reaktivita s bežnými ľudskými respiračnými koronavírusmi typu CoV NL63, 229E, HKU, OC43 alebo MERS nebola zaznamenaná.

Test na S gén - podľa súčasných vedeckých poznatkov je známe, že práve táto oblasť vírusového genómu sa vyznačuje vysokou náchylnosťou k mutáciám, preto nie je vhodná na využitie ako genetický cieľ pre detekciu metódou RT-PCR v klinickom materiáli. Na základe týchto skutočností je však oblasť S-génu veľmi vhodnou pre následný skríning mutácií a detekciu variantov vírusu SARS-CoV-2.

Webové stránky s odporúčaniami WHO a zoznamom dostupných komerčných diagnostických súprav:

<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>


<https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>

https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2

Pri výbere testovacích súprav je potrebné riadiť sa odporúčaniami WHO a vybrať si z testovacích súprav spĺňajúcich požiadavky nariadenia EP 98/79/EC (značka CE IVD). Použitie testovacej súpravy v podmienkach konkrétneho laboratória musí byť overené kontrolnými vzorkami poskytnutými Národným referenčným centrom pre chrípku ÚVZSR.

Štúdia, v ktorej otestovali 1070 vzoriek pomocou real-time PCR od 205 symptomatických COVID-19 infikovaných pacientov ukázala najvyšší podiel pozitívnych výsledkov z bronchoalveolárnej laváže (93 %) a zo spúta (72 %), menej z výterov z nosa (63 %) a z bioprickej vzorky odobratej pri fibrobronchoskopii (46 %) a najmenej z výterov z faryngu (32 %), zo stolice (29 %), z krvi (1 %). Zo vzoriek moču nezaznamenali žiadny pozitívny nález. (Wang a kol., 2020).

Tabuľka č. 2 Porovnanie podielu pozitívnych nálezov RNA SARS-CoV-2 z rôznych typov biologického materiálu v rôznych časových intervaloch po nástupe príznakov

 Porovnanie podielu pozitívnych nálezov RNA SARS-CoV-2 z rôznych typov biologického materiálu v rôznych časových intervaloch po nástupe príznakov			
Termín odberu	Typ vzorky	Závažný priebeh Počet a percento pozitívnych vzoriek	Mierny priebeh Počet a percento pozitívnych vzoriek
0 - 7 dní po nástupe príznakov	Hrdlo	12/20 (60.0)	46/75 (61.3)
	Nos	11/15 (73.3)	147/204 (72.1)
	Spútum	8/9 (88.9)	37/45 (82.2)
	BAL	-	-
8 - 14 dní po nástupe príznakov	Hrdlo	18/36 (50.0)	8/27 (29.6)
	Nos	34/47 (72.3)	96/179 (53.6)
	Spútum	15/18 (83.3)	32/43 (74.4)
	BAL	12/12 (100)	0/3 (0)
> 15 dní po nástupe príznakov	Hrdlo	14/38 (36.8)	1/9 (11.1)
	Nos	17/34 (50.0)	6/11 (54.5)
	Spútum	11/18 (61.1)	3/7 (42.9)
	BAL	11/14 (78.6)	-

Podľa Yang, 2020

III. Interpretácia výsledkov dôkazu RNA SARS-CoV-2

Metóda real-time RT-PCR deteguje prítomnosť genetického materiálu vírusu SARS-CoV-2, ale nerozlišuje či vírus, ktorý je prítomný vo vzorke má schopnosť vyvolať infekciu. Metóda zároveň neumožňuje objektívne posúdenie kvantity infekčných vírusových častíc vo vzorke z horných dýchacích ciest z dôvodu existencie faktorov, ktoré ovplyvňujú diagnostický proces. Medzi faktory, ktoré ovplyvňujú množstvo infekčných vírusových častíc v odobratej vzorke patrí kvalita odberu biologického materiálu, množstvo vírusu SARS-CoV-2 v mieste odberu biologického materiálu a prítomnosť inhibítorov v mieste odberu biologického materiálu. Medzi laboratórne faktory, ktoré ovplyvňujú množstvo vírusových častíc v analyzovanej vzorke biologického materiálu patrí použité transportné médium, objem transportného média, spôsob izolácie RNA vírusu SARS-CoV-2, objem reagensov použitých v jednotlivých krokoch analýzy a voľba diagnostickej súpravy na analýzu vzorky.

V reakcii RT-PCR sa zaznamenáva počet opakovaných cyklov potrebných na namnoženie nukleovej kyseliny. Cyklus, v ktorom termocyklér zaznamená tvorbu PCR produktu v reakcii sa nazýva Ct (cycle threshold). Ct hodnota je semikvantitatívna a umožňuje rozlišovať medzi vysokou a nízkou vírusovou náložou. Čím je nižšia hodnota Ct, tým je vyššie množstvo vírusu vo vzorke.

Hodnotu Ct laboratórium, ktoré vykoná analýzu vzorky na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 pomocou metódy RT-PCR, zaznamená do IS COVID.

Za štandardný formát výsledku real time RT-PCR testu Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky považuje iba výsledok s uvedením Ct hodnoty, ako súčasť výsledku.

Ct hodnoty získané z real-time RT-PCR analýz vykonaných rôznymi diagnostickými súpravami nie je možné porovnávať v dôsledku odlišností medzi súpravami, ako sú reagencie, cieľové gény, parametre cyklov, metódy prípravy vzoriek, metódy extrakcie RNA, rôzne detekčné limity atď.

Nízke Ct hodnoty (vysoká vírusová nálož) sú pravdepodobným indikátorom akútnej infekcie a vysokej infekčnosti pacienta.

Klinický význam výsledkov pozitívnych v teste real-time RT-PCR SARS-CoV-2 s vysokou hodnotou Ct (nízkou vírusovou náložou) je možné interpretovať iba v kontexte s klinickým stavom a anamnézou pacienta. Interpretáciu nie je možné vykonávať na základe jednej hodnoty Ct, je vhodnejšie mať sériu Ct hodnôt pacienta stanovených v konkrétnom laboratóriu s rovnakým postupom izolácie a detekcie RNA SARS-CoV-2.

Pozitívny výsledok real-time RT-PCR SARS-CoV-2 s vysokou hodnotou Ct sa vyskytuje:

- pri asymptomatickej infekcii s neznámym infekčným rizikom,
- vo včasnom štádiu infekcie,
- v prípade nesprávne odobratých alebo znehodnotených vzorkách pri nesprávnom uchovávaní a transporte,
- u pacientov v rekonvalescencii s klesajúcou vírusovou náložou,
- u imunokompromitovaných pacientov a pacientov hospitalizovaných so závažným priebehom infekcie s tendenciou dlhodobého vylučovania potenciálne infekčných vírusových častíc.

Podľa Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR, PHE, October 2020, <https://www.gov.uk/government/publications/cycle-threshold-ct-in-sars-cov-2-rt-pcr>

IV. Neposúdené vzorky na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2

V rámci skriningového testovania infekcie COVID-19 pomocou real-time PCR s reverznou transkripciou je vhodné v 1. línii použiť ako genetický cieľ pre PCR gén E, ktorý kóduje obalový proteín a na konfirmáciu použiť gén RdRp, ktorý kóduje RNA - závislú RNA polymerázu (Corman, 2020). Alternatívou je stanovenie skriningového a konfirmačného génu paralelnou detekciou v jednom multiplex PCR teste. Za pozitívny výsledok možno považovať len výsledok analýzy s potvrdenou konfirmáciou.

Ak sa pri pozitívite E-génu následnou konfirmáciou nepotvrdí prítomnosť SARS-CoV-2, výsledok PCR je neurčitý. Ak je výsledok analýzy neurčitý, musí sa vykonať opakovaný odber vzorky a analýzu pomocou metódy RT-PCR opakovať. Opakovaná analýza vzorky, ak je výsledok neurčitý, sa vykoná podľa štandardného pracovného postupu s osobitným zreteľom na zabránenie kontaminácie vzorky pozitívnou kontrolou.

Laboratórium, ktoré vydá neurčitý výsledok je povinné kontaktovať žiadateľa o vyšetrenie na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 a informovať o potrebe vykonať opakovaný odber a vyšetrenie vzorky.

Laboratórium zaznamená výsledok do IS COVID podľa aktuálneho integračného manuálu a ukončí protokol.

Informáciu o neurčitom výsledku a zaslanie nového termínu na odber vzorky zašle laboratórium/NCZI pacientovi/osobe formou SMS alebo telefonicky.

c) Biologická bezpečnosť a postupy pre zabránenie kontaminácie pri testovaní vzoriek biologického materiálu pacientov s podozrením na infekciu SARS-CoV-2

Vzorky pacientov podozrivých z infekcie COVID-19 majú byť transportované ako vzorky biologického materiálu kategórie B pod označením UN3373. So vzorkami biologického materiálu pacientov s podozrením na infekciu SARS-CoV-2 je potrebné manipulovať vo validovanom biologickom bezpečnostnom boxe zodpovedajúcom biologickej ochrane kategórie 2 (BSL 2). Personál laboratória musí mať doklad o preškolení pre manipuláciu so vzorkami potenciálne obsahujúcimi SARS-CoV-2. Všetky postupy, pri ktorých hrozí riziko vzniku aerosólu (otváranie nádobiek s biologickým materiálom, centrifugácia, vortexovanie) musia byť vykonávané vo validovanom biologickom bezpečnostnom boxe zodpovedajúcom biologickej ochrane kategórie 2 (BSL 2). Pracovníci laboratória vykonávajúci postupy izolácie vírusovej nukleovej kyseliny majú nosiť ochranné pracovné prostriedky (plášť, respirátor FFP2/FFP3, ochranné okuliare alebo štít, sterilné bezpúdové rukavice).

Je potrebné mať zavedené a zdokumentované postupy dezinfekcie pracovných plôch, dekontaminácie použitých laboratórnych pomôcok použitím dezinfekčných prípravkov s dokázanou účinnosťou voči obaleným vírusom (vrátane SARS-CoV-2) ako sú chlórnan sodný 0,1 % pre pravidelnú dezinfekciu povrchov, 1 % - pre dezinfekciu pri kontaminácii biologickým materiálom, 62 – 71 % etanol; 0,5 % peroxid vodíka; kvartérne amóniové zlúčeniny, fenolové zlúčeniny v koncentrácii podľa návodu výrobcu. Je potrebné dodržať expozičnú dobu podľa návodu výrobcu. Vírus SARS-CoV-2 podobne ako ostatné koronavírusy vrátane SARS koronavírusov je citlivý na UVC žiarenie (vlnová dĺžka 100 - 280 nm). D90-dávka potrebná na 90 %-nú inaktiváciu vírusu je v prípade koronavírusov v rozmedzí 7 až 241 J/m². Pre SARS-CoV-2 je odhadovaná hodnota D90 okolo 67 J/m² (Kowalski, 2020).

Je potrebné mať zavedené a zdokumentované postupy pre bezpečnú manipuláciu a následnú likvidáciu kontaminovaných laboratórnych pomôcok a ochranného oblečenia. Odporúčané: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021.1>. Manipulácia s biologickým materiálom, ktorý obsahuje vysoké koncentrácie aktívneho vírusu sa riadi osobitnými pravidlami v podmienkach zodpovedajúcich biologickej bezpečnosti 3. stupňa. Takéto výkony rutinné laboratória klinickej mikrobiológie nevykonávajú.

d) Uchovávanie vzoriek pre účely confirmácie z forenzných dôvodov

Laboratórium, ktoré vykonáva molekulárno-biologické testovanie vzoriek na prítomnosť SARS-CoV-2 zabezpečuje uchovávanie primárnych vzoriek s pozitívnym výsledkom RT-PCR pri teplote pod -70 °C minimálne po dobu po dobu 14 dní, optimálne však po dobu 30 dní. V prípade nedostatočného množstva primárnej vzorky sa odporúča uchovávať eluát s izolovanou RNA takisto pri teplote pod -70 °C po dobu 30 dní, ak to nie je možné, tak pri teplote pod -20 °C po dobu 14 dní. Primárne vzorky pitevného materiálu s pozitívnym výsledkom RT-PCR sa neuchovávajú, uchováva sa eluát s izolovanou RNA takisto pri teplote pod -20 °C po dobu 14 dní.

V súvislosti so sekvenovaním vzoriek pre potreby spätnej kontroly detekcie a výskytu nových mutácií laboratórium, ktoré vykonáva molekulárno-biologické testovanie vzoriek na prítomnosť SARS-CoV-2 je povinné zabezpečiť uchovávanie primárnych vzoriek s pozitívnym výsledkom RT-PCR v zmysle horeuvedených nastavení. Podrobnosti v súvislosti so sekvenovaním vzoriek sú uvedené v metodickom pokyne ministra zdravotníctva a v štandardnom postupe pre sekvenáciu vzoriek.

3. Stanovenie protilátok proti vírusu SARS-CoV-2

Sérologické testy umožňujú detekciu celkových špecifických protilátok, alebo špecifických protilátok v triedach IgM, IgA a IgG, ktoré sa počas infekcie alebo po očkovaní vytvárajú voči imunogénnym antigénom vírusu SARS-CoV-2. Protilátková odpoveď je súčasťou komplexnej imunitnej odpovede organizmu na infekciu, ktorá je do veľkej miery individuálna a podmienená interakciou imunogénnych súčastí mikroorganizmu a imunitných mechanizmov hostiteľa. Je ovplyvnená ďalšími faktormi, ako sú veľkosť infekčnej dávky, spôsob vniknutia do organizmu, spracovanie a prezentácia antigénov, imunitné mechanizmy nešpecifickej imunity, vek a pridružené ochorenia hostiteľa. Stále nie je jednoznačne potvrdené, či symptomatická alebo aj asymptomatická infekcia vytvára ochrannú imunitnú odpoveď a ako dlho budú tí, ktorí boli infikovaní, chránení pred opakovanou infekciou alebo závažným ochorením.

Skutočný charakter a význam poinfekčnej imunity po prekonaní SARS-CoV-2 nie je zatiaľ objasnený. Popri protilátkovej odpovedi na infekciu SARS-CoV-2 pravdepodobne ešte významnejšiu úlohu zohráva úloha špecifických T lymfocytov. Predbežné štúdie ukazujú, že špecifické T lymfocyty možno po prekonaní infekcie dokazovať podstatne dlhšiu dobu ako samotné protilátky. Možno očakávať, že v blízkej budúcnosti budú k dispozícii laboratórne testy na dôkaz prebiehajúcej, ale aj postinfekčnej/postvákinačnej imunitnej odpovede na báze detekcie špecifických pamäťových T-lymfocytov.

Detekcia špecifických protilátok proti vírusu SARS-CoV-2 získala svoje miesto predovšetkým ako podporná diagnostika v prípade symptomatických pacientov s klinickým podozrením na infekciu COVID19 pri negatívnom výsledku testu RT-PCR.


Špecifické a dostatočne citlivé testy na dôkaz protilátok proti vírusu SARS-CoV-2 sú založené na princípe ELISA (enzýmová imunoanalýza), CLIA (chemiluminiscenčná imunoanalýza) alebo FIA (fluorescenčná imunoanalýza). Môžu byť prínosom v diagnostike pri pretrvávaní klinického podozrenia u pacienta s negatívnym výsledkom real-time RT-PCR, a aj pri vyhľadávaní prípadov s asymptomatickým priebehom infekcie.

V štúdií Guo a kol. vykazovalo testovanie pomocou PCR vyššiu pravdepodobnosť potvrdenia infekcie oproti dôkazu IgM protilátok v období od 5,5. do 7. dňa po nástupe príznakov, po tomto období bola situácia opačná. Kombinované testovanie PCR s IgM významne zvýšilo pravdepodobnosť potvrdenia infekcie od 5,5 dňa na 98,6 % v porovnaní s 51,9 % úspešnosťou iba pomocou PCR ($p < 0,001$) (Guo a kol., 2020). Kombinované testovanie môže zlepšiť včasnú diagnostiku COVID-19 a ako aj upresniť epidemiologickú situáciu infekcie COVID-19 v komunitách osôb, ktoré infekciu COVID-19 už prekonali. Zvýšenie hladín protilátok nie je vždy spojené s klírensom RNA (Wilson, 2020).

Sérologické testy je možné použiť okrem diagnostiky aj na prevalenčné a postvákinačné sledovanie vývoja a pretrvávania protilátok u jednotlivcov a populačných skupín. Na základe prítomnosti protilátok proti jednotlivým antigénom vírusu SARS COV 2 je možné odlišiť postinfekčnú alebo postvákinačnú špecifickú protilátkovú odpoveď. Postvákinačná odpoveď je charakterizovaná protilátkami izotypu IgG, IgA a IgM proti vakcinačnému antigénu (pri použitých mRNA vakcínach a subjednotkových vakcínach predovšetkým proti antigénu S a jeho podjednotkám vrátane RBD). Postinfekčný protilátkový obraz závisí na použitej škále detekčných antigénov. Počas ochorenia sa tvoria protilátky proti všetkým antigénom vírusu (RBD, N, S1, S2, E). Rovnako tomu je pri použití celobunkovej vakcíny. Hodnotenie

jednotlivých špecifícit protilátok musí zohľadniť dynamiku ich prítomnosti v priebehu infekcie. Zisťovanie protilátok proti N antigénu v jednotlivých triedach (izotypoch) s charakteristickou distribúciou v čase sa používa na stanovenie postinfekčnej imunitnej odpovede. Pri interpretácii výsledkov dôkazu protilátok proti vírusu SARS-CoV-2 v súčasnosti je potrebné zohľadniť stav vakcinácie pacienta.

Tabuľka č. 3 Interpretácia sérologických testov podľa izotypov (tried protilátok)
(Nováková E. UMI JLFU UK, Miková E., Medirex a.s.)

 Interpretácia sérologických testov podľa izotypov (tried protilátok)			
Interpretácia	IgM	IgA	IgG
Bez sérokonverzie v čase testovania. Je potrebné zvážiť správnosť načasovania odberu.	negat	Negat	negat
Akútna infekcia, alebo možná nešpecifická prípadne skrížená reaktivita pri detekcii protilátok triedy IgM. Je odporúčané doplnenie SARS CoV2 RNA PCR.	pozit	negat alebo pozit	negat
Postakútne obdobie infekcie alebo postvakcinačné obdobie od 14. dňa po 1. dávke. Možná odoznievajúca infekcia respektíve odoznelá infekcia. Je odporúčané doplnenie SARS CoV2 RNA PCR.	pozit	negat alebo pozit	pozit
Pravdepodobne nedávno odoznelá infekcia, prípade protilátky po prekonaní infekcie alebo po očkovaní.	negat	Negat	pozit
Možná odoznievajúca infekcia prípadne reexpozícia očkovaného alebo osoby s prekonanou infekciou vírusu SARS COV 2. Je odporúčané doplnenie SARS CoV2 RNA PCR.	negat	Pozit	pozit

4. Rýchle diagnostické metódy dôkazu infekcie COVID 19

a) Rýchle PCR metódy

Detekcia RT-PCR v reálnom čase je najbežnejším prístupom k detekcii SARSCoV-2 a vďaka svojej špecifickosti a presnosti sa stala zlatým štandardom. Vzhľadom na potrebu detekcie SARS-CoV-2 vírusu v reálnom čase, point-of-care testy (POCT) by sa mali stať súčasťou diagnostických algoritmov a majú napomáhať zdravotníckym zariadeniam pri prevencii a kontrole šírenia vírusu. Point of care PCR metódy slúžia na urýchlenie a zjednodušenie diagnostického procesu detekcie vírusu SARS-CoV-2, umožňujú včasné odhalenie infekcie alebo nosičstva vírusu SARS-CoV-2 a preto by mali byť prvotným nástrojom triáže pacientov na urgentných príjmoch a príjmových ambulanciách lôžkových zdravotníckych zariadení. POCT metódy integrujú extrakciu RNA, amplifikáciu, detekciu v kompaktnom uzavretom systéme, výsledok je k dispozícii do 30 minút. Využívajú kvalitatívnu detekciu nukleových kyselín vírusu SARS-CoV-2, alebo multiplexnú detekciu viacerých respiračných vírusov vo výteroch z nazofaryngu na princípe real-time RT-PCR, alebo metódou izotermickej amplifikácie, ktorá ponúka zjednodušenú praktickú alternatívu k amplifikácii nukleových kyselín založenej na tepelnom cykle. Technológie POCT PCR dostupné v EÚ prešli klinickou validáciou na stanovenie ich špecifickosti, citlivosti, pozitívnej prediktívnej hodnoty (PPV) a negatívnej prediktívnej hodnoty (NPV) porovnaním s real-time RT-PCR. Tieto parametre sú základnými kritériami kvality a rozhodujúcimi faktormi pri výbere konkrétnej testovacej platformy. Vzhľadom na skutočnosť, že sa jedná o skriningovú metódu, POC PCR nenahrádza

klasickú real-time RT-PCR metódu. Výsledok POC PCR má byť potvrdený následným vyšetrením real-time RT-PCR SARS-CoV-2.

b) Detekcia antigénov vírusu SARS-CoV-2

Diagnostické testy na dôkaz antigénov vírusu SARS-CoV-2 sú navrhnuté na priamu detekciu proteínov vytvorených pri aktívnej replikácii vírusu v sekréte z dýchacích ciest.

Tieto testy fungujú na princípe imunochromatografie s vizuálnym hodnotením alebo hodnotením pomocou prístroja. Výsledok je stanovený do 30 minút. Pri výbere optimálneho biologického materiálu je potrebné riadiť sa návodom výrobcu diagnostickej súpravy. Senzitivita a špecifickosť testu pri konkrétnom spôsobe odberu je stanovená na súbore pozitívnych a negatívnych vzoriek porovnaním s metódou real time RT-PCR a výsledky porovnávačej štúdie sú uvedené v príbalovom letáku diagnostickej súpravy. Citlivosť týchto testov by mala byť $\geq 80\%$ a špecifickosť $\geq 97-100\%$. Antigénové testy sú najpriekaznejšie u pacientov s vysokou vírusovou náložou 1-3 dni pred nástupom klinických príznakov a vo včasnom symptomatickom štádiu v priebehu prvých 5 až 7 dní ochorenia. Umožňujú včasnú diagnostiku a zabránenie prenosu infekcie okamžitou izoláciou infikovaného pacienta a jeho kontaktov. Výsledok je do značnej miery ovplyvnený kvalitou odobratej vzorky, časovaním odberu a kvalitou diagnostickej súpravy. Tieto testy je možné používať aj na skrining v kolektívach ako sú školy, pracoviská, sociálne zariadenia atď. a je možné ich aplikovať aj na diagnostiku infekcie u asymptomatických kontaktov.

c) Biologická bezpečnosť pri testovaní vzoriek biologického materiálu s podozrením na infekciu SARS-CoV-2 rýchlymi diagnostickými metódami

Odber vzoriek má byť vykonávaný v priestore s dobrým vetraním za prísneho dodržiavania protiepidemických opatrení na zabránenie prenosu šírenia infekcie. Pracovníci vykonávajúci odber vzoriek majú nosiť osobné ochranné pracovné prostriedky (plášť, respirátor FFP2/FFP3, ochranné okuliare alebo štít, rukavice). Na dezinfekciu pracovných plôch je potrebné použiť prípravky s dokázanou účinnosťou voči obaleným vírusom (vrátane SARS-CoV-2) ako sú chlórnan sodný 0,1 %, 62 – 71 % etanol; kvartérne amóniové zlúčeniny, fenolové zlúčeniny v koncentrácii podľa návodu výrobcu. Je potrebné dodržať expozičnú dobu podľa návodu výrobcu. Vírus SARS-CoV-2 podobne ako ostatné koronavírusy vrátane SARS koronavírusov je citlivý na UVC žiarenie (vlnová dĺžka 100 - 280 nm). V miestnosti kde sa vykonáva odber vzoriek a manipulácia s odobratým biologickým materiálom je odporúčané umiestniť germicídny žiarič. Kontaminované diagnostické pomôcky a osobné ochranné pracovné prostriedky sa ukladajú do biologických bezpečnostných boxov a sú likvidované ako nebezpečný biologický odpad. Odporúčané: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021.1>

Odôvodnenie testovania

Testovanie ľudí so suspektnými príznakmi infekcie COVID 19 a skrining asymptomatických kontaktov ako aj plošný skrining obyvateľstva sú dôležitými nástrojmi boja proti pandémie. Priame metódy dôkazu vírusu SARS-CoV-2 umožňujú rozpoznať infikovaných a prijatím protiepidemických opatrení spomaliť šírenie vírusu v populácii. Včasné odhalenie infekcie umožňuje skoršie nasadenie liečby a prípadne aj odvrátenie nepriaznivého až fatálneho priebehu infekcie. Nepriame metódy dôkazu infekcie slúžia ako doplnková diagnostika pri

pretrvávajú klinického podozrenia u ľudí s negatívnym výsledkom priamych metód dôkazu infekcie, resp. umožňuje rozpoznávanie ľudí ktorí prekonali infekciu bezpríznakovo.

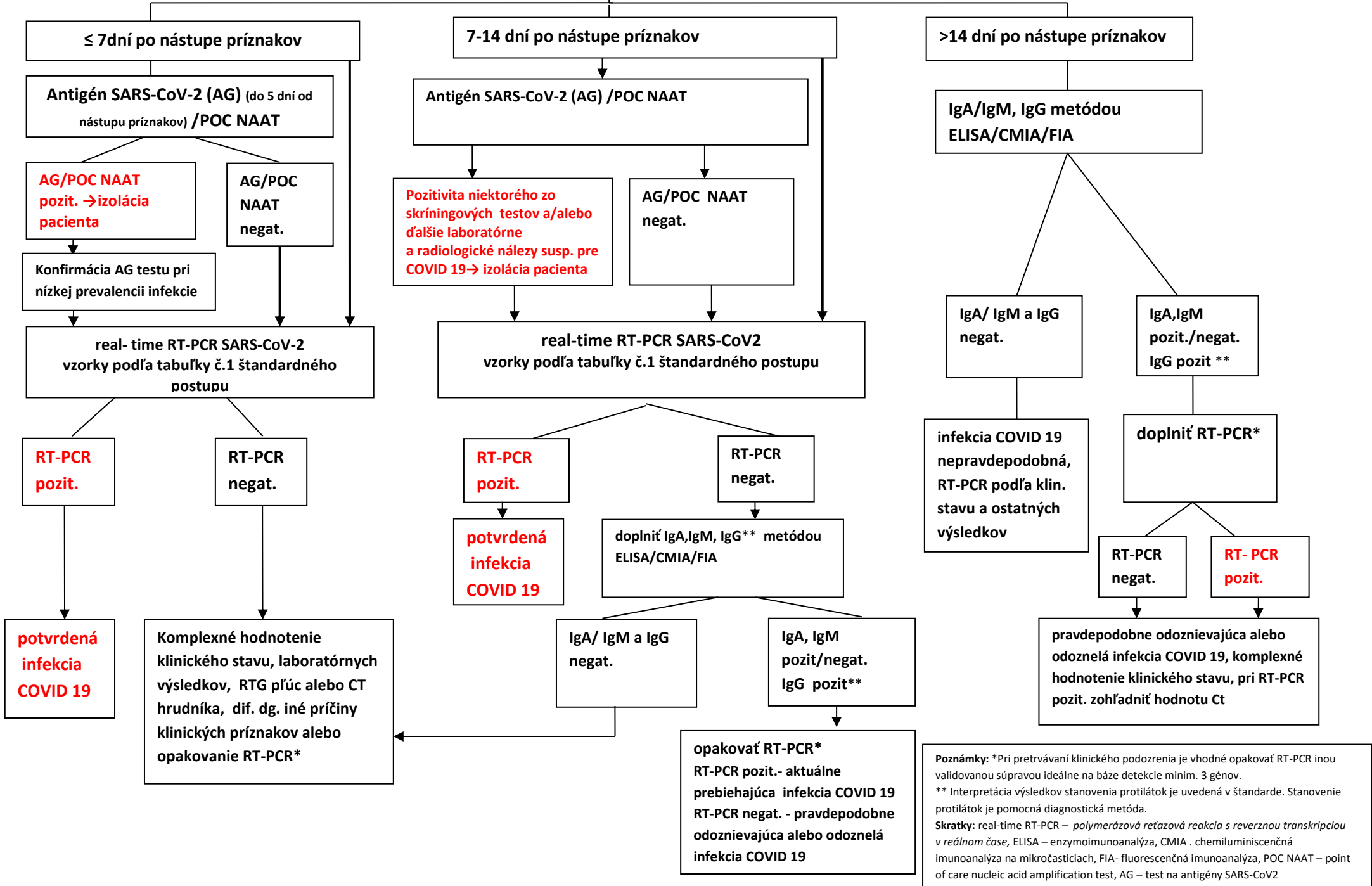
Laboratórny algoritmus

Laboratórny algoritmus č. 1 – Pacient indikovaný na vyšetrenie na základe klinických príznakov v súlade s klinickým protokolom indikácií testovania SARS-CoV-2

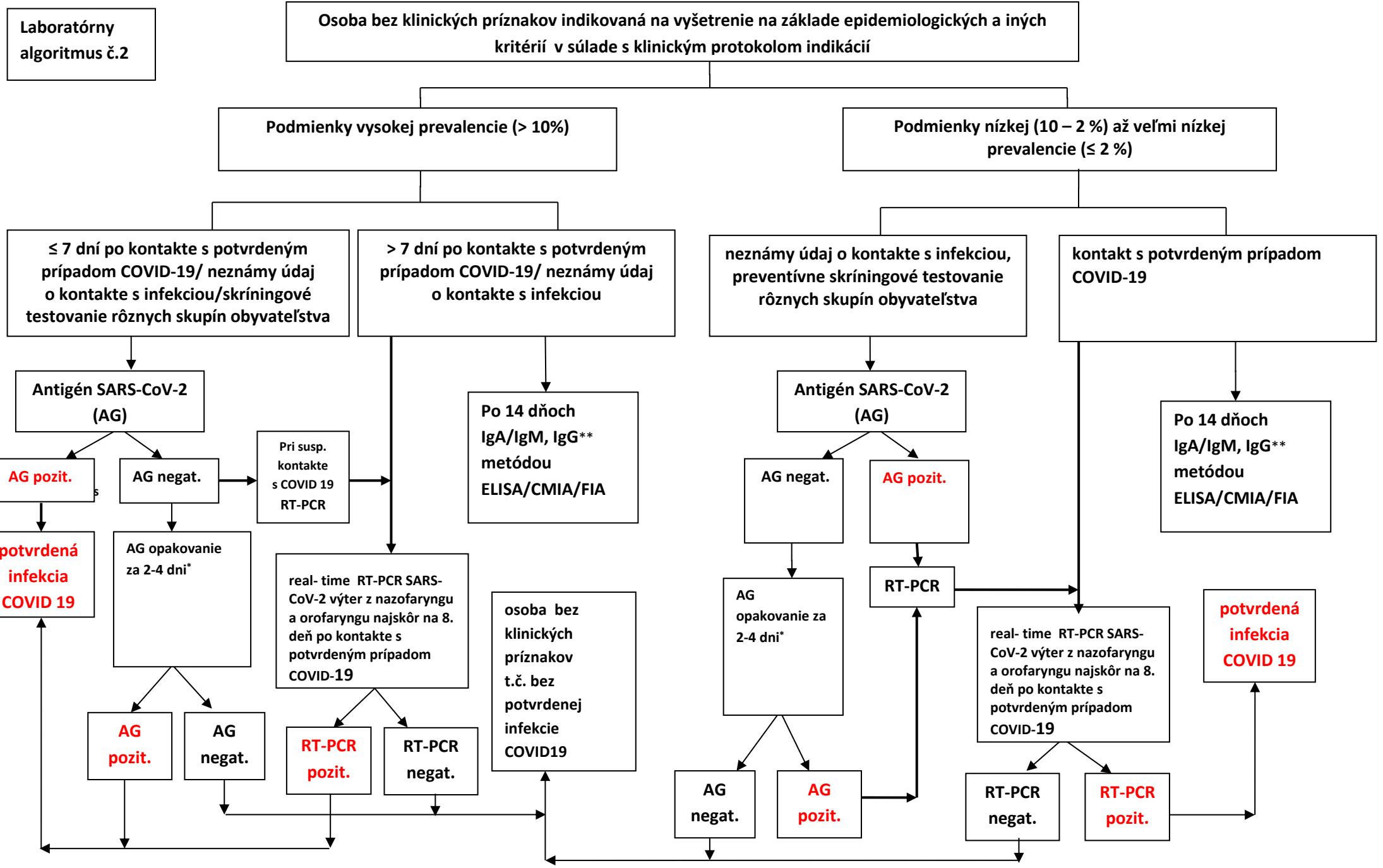
Laboratórny algoritmus č. 2 – Osoba bez klinických príznakov indikovaná na vyšetrenie na základe epidemiologických a iných kritérií v súlade s klinickým protokolom indikácií

Laboratórny algoritmus č.1

Pacient indikovaný na vyšetrenie na základe klinických príznakov v súlade s klinickým protokolom indikácií testovania SARS-CoV-2



Poznámky: *Pri pretrvávajúcom klinickom podozrení je vhodné opakovať RT-PCR inou validovanou súpravou ideálne na báze detekcie minim. 3 génov.
** Interpretácia výsledkov stanovenia protilátok je uvedená v štandarde. Stanovenie protilátok je pomocná diagnostická metóda.
Skratky: real-time RT-PCR – polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou v reálnom čase, ELISA – enzýmoimunoanalýza, CMIA . chemiluminiscenčná imunoanalýza na mikročasticách, FIA- fluorescenčná imunoanalýza, POC NAAT – point of care nucleic acid amplification test, AG – test na antigény SARS-CoV2



Upravené podľa ECDC, 2020 (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/options-use-rapid-antigen-tests-covid-19-eueea-and-uk>)

**Interpretácia výsledkov stanovenia protilátok je uvedená v štandarde. Stanovenie protilátok je pomocná diagnostická metóda.

real-time RT-PCR – polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou v reálnom čase, ELISA – enzýmoimunoanalýza, CMIA . chemiluminiscenčná imunoanalýza na mikročasticiach, FIA- fluorescenčná imunoanalýza

AG – test na antigény SARS-CoV2

Dokumentácia a oznamovanie výsledkov

Laboratória vykonávajúce diagnostiku infekcie COVID-19 a mobilné odberové miesta vykonávajúce skrining obyvateľstva antigénovými testami hlásia výsledky testov do databázy NCZI a do informačného systému ÚVZ SR s názvom IS COVID. Spôsob napojenia na tieto informačné systémy a ďalšie podrobnosti ohľadne evidencie testovaných a hlásenia výsledkov sú uvedené v osobitnom metodickom pokyne MZ SR.

Minimálne materiálo-technické zabezpečenie

Laboratórium vykonávajúce real-time RT-PCR na dôkaz RNA vírusu SARS-CoV-2 musí mať nasledujúce dispozičné a materiálo-technické vybavenie:

- samostatná miestnosť vybavená biologickým bezpečnostným boxom triedy 2 s platným certifikátom o validácii a germicídnym žiaričom s dokladom o účinnosti na základe dokumentovaného počtu prevádzkových hodín,
- prístroje a diagnostiká na izoláciu RNA SARS-CoV-2,
- prístroje a diagnostiká na vykonávanie real-time RT-PCR SARS-CoV-2,
- laboratórne prístroje a pomôcky musia mať platný doklad o validácii v súlade s aktuálnymi právnymi predpismi a medzinárodnými normami,
- ochranné pracovné pomôcky pre personál, ktorý vykonáva odber biologického materiálu a izoláciu RNA určené na ochranu pred infekciou vírusom SARS-CoV-2 v súlade s aktuálnym usmernením hlavného hygienika Slovenskej republiky,
- odberové súpravy, ktoré obsahujú špecifické vírusové transportné inaktivačné médium pre biologické riziko triedy 2 a 2 dakrónové odberové tampóny, na zaistenie bezpečnosti laboratórnych pracovníkov musí ísť o médium so schopnosťou inaktivovať vírus (vírus inaktivačné médium) a zároveň chrániť RNA pri transporte (napr. teplotné podmienky v súlade s požiadavkami výrobcu), musí spĺňať požiadavky EN 14476
- inaktivačné médium musí umožňovať zachovanie nezmenenej kvality a množstva RNA pri skladovaní po dobu minimálne 30 dní,
- dezinfekčné prípravky s dokázanou účinnosťou voči SARS-CoV-2,
- biologické bezpečnostné boxy pre zber a likvidáciu kontaminovaných jednorázových laboratórnych pomôcok.

Pre vykonávanie rýchlych diagnostických metód priameho dôkazu vírusu SARS-CoV-2 je potrebné zabezpečiť:

- dobre vetranú miestnosť s germicídnym žiaričom s dokladom o účinnosti na základe dokumentovaného počtu prevádzkových hodín,
- ochranné pracovné pomôcky pre personál, ktorý vykonáva odber a spracovanie biologického materiálu určené na ochranu pred infekciou vírusom SARS-CoV-2 v súlade s aktuálnym usmernením hlavného hygienika Slovenskej republiky,
- potrebnú prístrojovú techniku s platným dokladom o validácii/certifikácii v súlade s aktuálnymi právnymi predpismi a medzinárodnými normami,
- diagnostické súpravy a pomôcky,
- dezinfekčné prípravky s dokázanou účinnosťou voči SARS-CoV-2,
- biologické bezpečnostné boxy pre zber a likvidáciu kontaminovaných jednorázových laboratórnych pomôcok.

Minimálne personálne zabezpečenie

Výkon vykonáva lekár mikrobiológ so špecializáciou v špecializačnom odbore Klinická mikrobiológia, laboratórny diagnostik so špecializáciou v špecializačnom odbore Laboratórne a diagnostické metódy v klinickej mikrobiológii, zdravotnícki laboranti alebo diplomovaní medicínsko-technickí laboranti so špecializáciou v špecializačnom odbore Vyšetrovacie metódy v klinickej mikrobiológii, zdravotnícki laboranti s VŠ vzdelaním 1. alebo 2. stupňa v odbore Laboratórne vyšetrovacie metódy v zdravotníctve.

Interpretácia výsledkov testov

Interpretáciu výsledkov vykonáva lekár mikrobiológ.

Odhadované náklady

Náklady na vykonávanie diagnostiky real-time RT-PCR zahŕňajú vytvorenie priestorov a zaobstaranie prístrojového vybavenia pre izoláciu a detekciu RNA SARS-CoV-2, náklady na odberové a diagnostické súbory, osobné ochranné pracovné pomôcky pre personál laboratória, dezinfekčné prostriedky, germicídne žiariče, biologické bezpečnostné boxy pre nebezpečný odpad, odvoz nebezpečného odpadu, kancelárske pomôcky, počítač, tlačiareň pre evidenciu vzoriek a vybavovanie výsledkov.

Náklady na stanovenie protilátok proti antigénom vírusu SARS-CoV-2 zahŕňajú náklady na prístrojové vybavenie, diagnostické súbory, , osobné ochranné pracovné pomôcky, dezinfekčné prostriedky, germicídne žiariče, biologické bezpečnostné boxy pre nebezpečný odpad, odvoz nebezpečného odpadu, kancelárske pomôcky, počítač, tlačiareň pre evidenciu vzoriek a vybavovanie výsledkov.

Náklady na POCT testy zahŕňajú vybavenie odberovej miestnosti, náklady na odberové súbory, osobné ochranné pracovné pomôcky pre personál, náklady na prístrojovú techniku a diagnostické súbory, dezinfekčné prostriedky, germicídne žiariče, biologické bezpečnostné boxy pre nebezpečný odpad, odvoz nebezpečného odpadu, kancelárske pomôcky, počítač, tlačiareň pre evidenciu vzoriek a vybavovanie výsledkov.

Zabezpečenie a organizácia starostlivosti I realizácie diagnostiky

Národné referenčné centrum pre chrípku na Úrade verejného zdravotníctva Slovenskej republiky je referenčným pracoviskom pre diagnostiku real-time RT-PCR SARS-CoV-2, vykonáva overenie kompetentnosti diagnostických laboratórií a vykonáva dohľad nad ich odbornou činnosťou prostredníctvom externej kontroly kvality. Podrobnosti o kritériách a postupe zaradenia laboratória do siete laboratórií, ktoré vyšetrujú vzorky biologického materiálu osôb na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2 metódou real-time RT-PCR sa nachádza v osobitnom metodickom pokyne MZ SR.

Doplňkové otázky manažmentu pacienta a zúčastnených strán

Upravuje štandardný postup procesu na zaradenie laboratória do siete laboratórií na diagnostiku vírusu SARS-CoV-2 v biologickom materiáli s využitím metód molekulárnej biológie

Špeciálny doplnok štandardu

Alternatívny spôsob odberu biologického materiálu metódou výplachu ústnej dutiny kloktaním za účelom detekcie SARS-CoV-2 metódou real –time RT-PCR - výsledky porovnávacích štúdií realizovaných Biomedicínskym centrom SAV

Prehľad literatúry

Výplach ústnej dutiny kloktaním predstavuje alternatívny spôsob odberu klinického materiálu pre diagnostiku SARS-CoV-2, ktorý poskytuje viacero výhod v porovnaní s súčasným zlatým štandardom, teda nazofaryngeálnym výterom (NFV). Ide o neinvazívnu metódu, ktorá nevyžaduje prítomnosť zdravotníckeho personálu, znižuje riziko expozície zdravotníckeho personálu aerosolom, znižuje nároky na osobné ochranné pomôcky a v neposlednom rade predstavuje aj výrazne nižší diskomfort pre pacienta. Súčasné vedecké poznatky jednoznačne ukazujú, že ústna dutina je miestom, kde je vírus detekovateľný (Guo et al., 2020; To et al., 2020; Xu et al., 2020; Pasomsub et al., 2020; Cerom et al., 2020)), čo vyplýva už aj zo samotného spôsobu prenosu vírusu. Kloktanie navyše prináša aj výhodu získania vzorky reprezentujúcej celú ústnu dutinu vrátane zadnej časti ústnej časti hltana, nosohltana, jazyka, ústnej sliznice, slín, či spúta. Okrem toho, v procese kloktania prichádza k uvoľňovaniu epiteliálnych buniek, ktoré predstavujú nielen významný zdroj vírusovej RNA pre detekciu (Guo et al., 2020), ale pri použití fyziologického roztoku a uchovaní bunkovej intaktnosti zabezpečujú aj predĺženú stabilitu vírusovej RNA počas transportu a krátkodobého skladovania vírusu.

Vhodnosť výplachu ústnej dutiny kloktaním ako spoľahlivej alternatívy k nazofaryngeálnemu výteru pri diagnostike SARS-CoV-2 pomocou RT-qPCR bolo už publikovaných niekoľko štúdií. Kandel et al., (2021) vo svojej štúdií zahŕňajúcej viacero ambulantných pracovísk v Toronte ukázali rovnakú citlivosť výplachu kloktaním („saline gargle“) ako NFV a poukázali na ich výhody najmä u ľudí, ktorí musia podstupovať opakované testovanie. Podobne, Goldfarb et al. (2021) dokonca prišli k záveru, že samoodber výplachom ústnej dutiny kloktaním v ich štúdií ukázal vyššiu akceptovateľnosť účastníkov a zároveň lepšiu analytickú výkonnosť ako NFV robený zdravotníckym personálom. Vzorky získané kloktaním sú taktiež využiteľné aj pri použití tzv. direct PCR, kedy je vynechávaný krok extrakcie RNA (Maricic et al., 2020). O vhodnosti tohto materiálu nepriamo svedčí aj množstvo štúdií, vrátane meta-analýz, ktoré ukazujú vhodnosť využitia slín, ktoré su pri výplachu kloktaním bezpochyby vo vzorke prítomné (Yokota et al., 2020; Wong et al., 2020; Huber et al., 2021; Khiabani and Amirzade-Iranq, 2021)

Tento spôsob odberu je systematicky využívaný napríklad v Kanade (<http://www.bccdc.ca/health-info/diseases-conditions/covid-19/testing/mouth-rinse-and-gargle>). Vo Viedni ho „Vienna COVID-19 Detection Initiative“ využíva dlhodobo pri testovaní zamestnancov Viedenských univerzít a publikovala k tomu aj svoju SOP (https://www.maxperutzlabs.ac.at/fileadmin/user_upload/VCDI/News/COVID19_Testing_VCDI_v1.1_.pdf). Tento spôsob odberu využíva pri testovaní taktiež aj v domovoch sociálnych služieb (<https://www.maxperutzlabs.ac.at/vcdi/vcdi-news/research-pilot-project-in-nursing-homes>) a rovnako aj v školách (Willeit et al., 2021), pričom takisto využíva aj možnosť spájania vzoriek.

Odber vzoriek

Výplach ústnej dutiny a hltana (tzv. oropharynxu) kloktaním sa uskutočňuje so sterilným infúznym roztokom (0,9% NaCl) v objeme 5ml. Takýto odber výplachu má na zachytenie vírusu porovnateľnú účinnosť ako výter, pretože vírus SARS-CoV-2 sa v ústnej dutine množí najmä na povrchu oropharynxu, na koreni jazyka, na lícných slizniciach a je prítomný aj v slinách. V RT-qPCR testoch je často používaná ako interná kontrola detekcia transkriptu pre ľudskú RNÁzu P. Jeho amplifikácia slúži ako dôkaz prítomnosti buniek ústnej dutiny a hltana a indikuje správnosť odberu. Táto kontrola, pôvodne používaná pre kontrolu kvality odberu výterom je rovnako dobre využiteľná aj pri odbere kloktaním.

Výplach ústnej dutiny a hltana sa uskutočňuje jednoduchým spôsobom s ústami a nosom prekrytými rúškom, čím sa znižuje riziko nákazy inej osoby aerosólom alebo kvapôčkami.

Najmenej jednu hodinu pred odberom nie je vhodné jesť, piť, umývať si zuby, vyplachovať ústa, žuvať žuvačku a fajčiť.

POSTUP ODBERU VZORIEK POMOCOU VÝPLACHU ÚSTNEJ DUTINY

Postup bol prevzatý a upravený na základe inštrukcií BCCDC v Kanade (http://www.bccdc.ca/Health-Info-Site/Documents/COVID-gargle_youth.pdf) a Vienna COVID-19 Detection Initiative (https://www.maxperutzlabs.ac.at/fileadmin/user_upload/VCDI/News/COVID19_Testing_VCDI_v1.1.1_.pdf). Odporúča sa, aby si každý tento postup vyskúšal deň vopred doma s vodou.

1. Pred odberom, počas preplachovania ústnej dutiny a kloktania a po odbere je potrebné mať rúško.
2. Najprv si treba dôkladne umyť ruky mydlom pod tečúcou vodou.
3. Následne si treba prevziať skúmavku a papierovú vreckovku. Je potrebné si overiť meno na skúmavke.
4. Po otvorení skúmavky treba stiahnuť rúško a obsah skúmavky vyliat' do ústnej dutiny.
5. Po zavretí úst treba opäť nasadiť rúško a urobiť 6 cyklov striedavého preplachovania ústnej dutiny a kloktania v hrdle, vždy po dobu 5 sekúnd, spolu 60 sekúnd. Preplachovanie sa robí so vzpriamenou hlavou aktívnym pumpovaním lícnymi svalmi, aby sa zo slizníc uvoľnilo čo najviac buniek. Kloktanie sa robí so zaklonenou hlavou, pričom treba dbať na to, aby nedošlo k prehlnutiu roztoku.
6. Na konci cyklu treba stiahnuť rúško a obsah ústnej dutiny vypl'ut' späť do pôvodnej skúmavky. Skúmavku treba pevne uzavrieť.
7. Ústa si treba utrieť vopred pripravenou papierovou vreckovkou, ktorú treba následne odhodiť do určeného vrečka na infekčný laboratórny odpad. Opätovne si treba nasadiť rúško.
8. Skúmavku treba zvonku dezinfikovať pomocou papierového obrúska navlhčeného dezinfekčným roztokom a vložiť späť do stojana.
9. Nakoniec je potrebné si umyť alebo vydezinfikovať ruky.

Uchovávanie a transport odobratých vzoriek

Odobraté vzorky je potrebné spracovať v priebehu 48h. Počas tejto doby môžu byť uchovávané a transportované pri +2 až +8 °C. Vzorky nie je vhodné mraziť, nakoľko počas následného rozpúšťania môže prichádzať k degradácii vírusovej RNA.

Špecifiká laboratórnej diagnostiky vzoriek odobratých výplachom ústnej dutiny kloktaním na prítomnosť RNA vírusu SARS-CoV-2

V laboratórnom spracovaní sa ku vzorkám odobraným kloktaním v princípe pristupuje veľmi podobne ako ku vzorkám, odobratým nazofaryngeálnym výterom. Pre extrakciu RNA je použitý rovnaký objem, ako je v danom laboratóriu používaný aj pri nazofaryngeálnom výtere (napr. v našom prípade 200ul). Pri spracovaní výplachov kloktaním je dôležité zabezpečiť, aby časť vzorky odoberaná na RNA extrakciu obsahovala dostatočné množstvo bunkovej frakcie. Je preto dôležité vzorku nechať sedimentovať po dobu minimálne 10 minút a následne vzorku odoberať z vrchnej časti sedimentu.

Následne vzorka vstupuje do štandardného procesu extrakcie RNA podľa špecifik konkrétneho laboratória.

Vzorky odobraté pomocou kloktania je možné aj spájať do tzv. poolov a to ideálne nie viac ako 10 vzoriek. V procese poolovania sa z každej vzorky odoberá 1-2 ml vzorky do jednej spoločnej vzorky. Z nej sa následne odoberá vzorka pre RNA extrakciu rovnakým postupom, ako je popísané vyššie pre individuálnu vzorku. Pri poolovaní treba počítať s 10-násobným poklesom citlivosti, ktorý je však pri použití vysoko citlivých RT-PCR kitov zachytávajúcich 1-10 kópií vírusovej RNA v reakcii takmer zanedbateľný (napr. aj hranične pozitívna vzorka s CT 35 by aj po 10-násobnom zriedení poolovaním mala v teste vykázať CT hodnotu 38-39 a mala by byť vyhodnotená ako pozitívna).

Spôľahlivosť výsledkov a analýza rizík

Výsledky pilotných a validačných štúdií ukazujú, že RT-PCR diagnostika takto odobraných vzoriek je porovnateľne spoľahlivá a citlivá ako RT-PCR s použitím nazofaryngeálnych výterov. Napriek tomu **sa nedá predpokladať, že by boli priamo porovnateľné aj CT hodnoty. Pri použití kloktania treba počítať s vyššími CT hodnotami ako pri použití nazofaryngeálnych výterov a Ct hodnoty z rôznych spôsobov odberu nebudú porovnateľné.** Napriek tomu sa z doterajších skúseností, najmä u ľudí v počiatkovej fáze ochorenia, počas prvých desiatich dní od prepuknutia príznakov, je citlivosť tejto metódy v porovnaní s výterom prakticky 100%. Naopak, zdá sa, že odber kloktaním je menej citlivý na kvalitu prevedenia odberu, keďže sú opakovane pozorované aj prípady, kedy je pri paralelných odberoch ako pozitívna vzorka vyhodnotená len vzorka kloktaním, zatiaľ čo výter je negatívny.

Skúsenosti s kloktaním v Biomedicínskom centre SAV (BMC SAV)

V BMC SAV je odber vzoriek kloktaním analyzovaný už niekoľko mesiacov v rôznych situáciách. Celkovo sa naše pozitívne skúsenosti dajú rozdeliť do štyroch situácií, pri ktorých bol tento spôsob odberu využívaný.

1. Klinická štúdia vykonaná na pacientoch v spolupráci s Klinikou infektológie a geografickej medicíny UNB v Bratislave (KIGM).
2. Pilotná štúdia testovania detí v školách pomocou kloktania s spolupráci s Intervenčným tímom MZ
3. Dlhodobé pravidelné (týždenné) testovania zamestnancov SAV
4. Porovnávací štúdia u ľudí zachytených na mobilných odberových miestach pri testovaní antigénovými testami

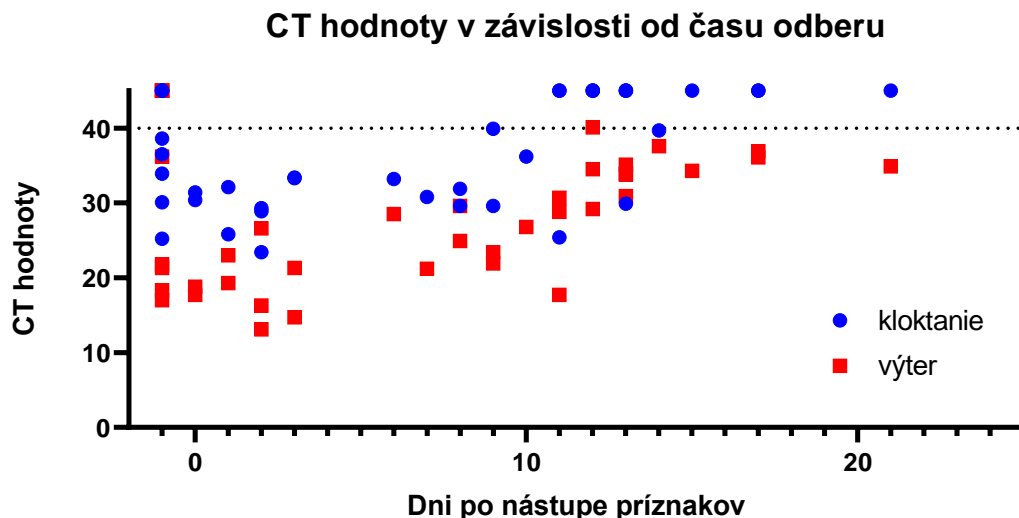
1. Klinická štúdia na pacientoch KIGM

V štúdiu na pacientoch z nemocnice bolo porovnávaných 123 paralele odoberaných vzoriek. Táto štúdia ukázala dôležitosť časového úseku v ktorom je vzorka odoberaná vzhľadom k nástupu príznakov. Pozorovali sme, že pri vzorkách odoberaných v čase 0-8 dní od prvých príznakov bola zhoda až 96.4% (len 1 z 28 vzoriek nebola pozitívna v kloktaní). Pri analýze vzoriek odoberaných v čase 0-10 dní to bola 90.2% (37/41), pričom v zostávajúcich vzorkách bolo v troch prípadoch negatívne kloktanie a v jednom prípade naopak výter.

Na druhej strane, v 19 vzorkách v ktorých bolo pri pozitívnom výtere kloktanie negatívne, priemerný čas od prvých príznakov bol 13.8 dňa. Keďže vo všeobecnosti sú pacienti 10 dní po prvých príznakoch uvoľňovaní z karantény, pretože sa v tom čase už predpokladá ich neinfekčnosť, javí sa odber kloktaním u symptomatických pacientov dokonca ako vhodnejší, pretože minimalizuje klinicky irelevantnú dlhodobú pozitivitu RT-PCR testov v dôsledku ich mimoriadne vysokej citlivosti.

Z hľadiska priemerných CT hodnôt štúdia ukázala, že u klinicky chorých pacientov sú CT hodnoty pri kloktaní v priemere o 4.4 cykly nižšie, čo však môže závisieť práve od času odobratia vzorky a v danej štúdiu bol vysoký podiel ľudí, ktorí boli v neskoršom štádiu ochorenia, keďže išlo u hospitalizovaných pacientov.

V rámci štúdie však bolo analyzovaných aj 47 vzoriek od bezpríznakových ľudí (najmä nemocničný personál). V tejto podskupine bola zhodný výsledok zaznamenaný u 45 vzoriek (95.7%), pričom u dvoch vzoriek s rozporom bola jedna pozitívna len vo výtere a jedna len v kloktaní. Pre takúto skupinu bezpríznakových ľudí je teda kloktanie rovnako vhodný spôsob odberu ako výter.



Obr. 1 Ukážka CT hodnôt v RT-PCR teste pri použití nazofaryngeálneho výteru alebo kloktania v závislosti od počtu dní od nástupu príznakov. Všetky vzorky od bezpríznakových osôb sú v grafe znázornené ako v dni -1. Z grafu je zrejmé, že rozdiely v pozitivite sú len u vzoriek odoberaných po viac ako ôsmich dňoch od nástupu príznakov.

2. Pilotná štúdia testovania detí na školách

V pilotnej štúdiu detí testovaných v školách bolo celkovo otestovaných 67 spojených vzoriek ("poolov") z dvoch škôl (škola 1 n=38; škola 2 n=29) pochádzajúcich celkovo z 932 osôb (!). Účastníci štúdie boli zároveň testovaní pomocou antigénového testu. V tejto štúdiu boli vzorky

odobraté kloktaním spájané podľa tried priamo na mieste a nebolo teda možné následné overenie pozitivity v individuálnych vzorkách, k tomu mal slúžiť práve paralelne urobený Ag test. Počet osôb v jednom poole nebola konštantná, nakoľko pôvodná predstava bola spájať vzorky po triedach a počet účastníkov štúdie v jednotlivých triedach značne kolísal (5-30).

Počas laboratórneho testovania sa nevyskytli žiadne zásadné problémy. Interná kontrola v podobe detekcie ľudskej RNaseP ukazovala konzistentné hodnoty v 66/67 poolov, 1 pool bolo treba opakovať. Celkovo bolo pozitívne testovaných 6 poolov. Pozitivita poolov na školách bola 5.3% (2/38) a 13.8% (4/29). Len v štyroch prípadoch pozitivita poolu zodpovedala prítomnosti jednej osoby s pozitívnym Ag testom. V dvoch prípadoch nebola v pozitívnom poole zaznamenaná žiadna Ag pozitívna osoba, čím by bol výsledok poolovanej RT-PCR potvrdený. Preto intervenčný tím MZ zorganizoval hneď na druhý deň získanie individuálnych kloktacích vzoriek od osôb z dvoch pozitívnych poolov bez pozitívneho Ag testu. K každej skupine bola následne identifikovaná jedna osoba s pozitívnym individuálnym RT-PCR testom.

Celkovo bola dosiahnutá výborná korelácia medzi individuálnymi Ag testami a poolovanými RT-PCR testami z kloktania. Testovanie poolovaných vzoriek z kloktania pomocou vysoko citlivej RT-qPCR je z hľadiska citlivosti vhodnejšia metóda ako individuálne Ag testy.

3. Dlhodobé pravidelné testovanie zamestnancov SAV

Veľmi bohaté a praktické skúsenosti s využívaním kloktania a poolovania kloktacích vzoriek máme vďaka dlhodobému využívaniu tejto metódy pri testovaní zamestnancov SAV. Počas dvanástich týždňov zahŕňajúcich február-apríl 2021 (teda aj kulmináciu pandémie na Slovensku) bolo pomocou RT-PCR poolovaných kloktacích vzoriek otestovaných celkovo 12833 vzoriek. V týždenných intervaloch bolo priemerne otestovaných 1074 vzoriek v 124 pooloch po 8 vzoriek. Priemerná pozitivita testov bola 0.47%, priebehu testovania bola pomerne stabilná a dosahovala hodnoty medzi 0.08% (na konci apríla) a 0.87% (na začiatku marca) a od polovice apríla postupne klesala.

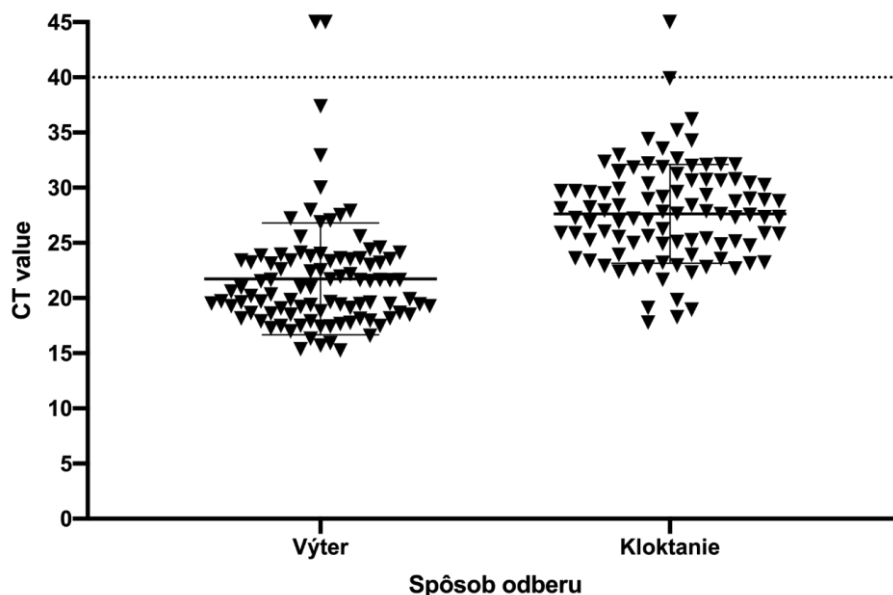
Aj keď v tomto prípade nejde o porovnávaciu štúdiu a teda sa nedá posúdiť spoľahlivosť v porovnaní s výtermi, takéto dlhodobé masívne využitie ukazuje, že počas používania tejto metódy neprichádzalo na pracoviskách SAV k výraznejšiemu zhoršovaniu situácie, incidencia bola konzistentne pod priemerom v celkovej populácii, a teda sa dlhodobo podarilo (aj v časoch kulminácie pandémie na Slovensku) udržať pracovisko bezpečné.

4. Porovnávacia štúdia u ľudí zachytených na mobilných odberových miestach (MOM) pri testovaní antigénovými testami

Veľmi dôležitým zdrojom poznatkov je aj porovnávacia štúdia, ktorú BMC SAV urobilo v spolupráci s MOM v Bratislave a Malackách. Na rozdiel od štúdie v bode číslo 1, kde primárne išlo o pacientov s rozvinutým ochorením, v tejto štúdii ide o ľudí, ktorí navštevujú MOM primárne kvôli potrebe negatívneho testu a teda ide o ľudí bezpríznakových alebo len s prvotnými miernymi príznakmi, teda o ľudí vo veľmi včasnej fáze infekcie. Je to teda vzorka lepšie reprezentujúca situáciu primárnej diagnostiky.

V tejto štúdii sme analyzovali 113 paralelne odobratých vzoriek od ľudí, ktorí mali pozitívny antigénový test. Až v 17 prípadoch boli obidve odobraté vzorky negatívne, veľmi pravdepodobne poukazujúce na falošnú pozitivitu antigénnych testov. V 93 prípadoch boli obidve vzorky zhodne pozitívne. Len v troch prípadoch nebola medzi rôznymi spôsobmi

odberu zhoda, pričom lev jednom prípade bola negatívna kloktacia vzorka, zatiaľ čo v dvoch prípadoch bol negatívny výter. Z tohto pohľadu bola potom citlivosť pri kloktaní 99.0%, zatiaľ čo pri výtere 97.9%. Aj napriek vyššej citlivosti kloktania sme z hľadiska priemerných CT hodnôt sme pozorovali podobný trend ako v štúdiu na pacientoch, kde hodnoty priemeru aj mediánu boli pri kloktaní signifikantne vyššie (priemer 227.6 vs. 21.7, medián 27.5 vs. 20.8).



Obr. 2. CT hodnoty u paralelných odberov u osôb primárne identifikovaných ako pozitívne pomocou antigénového testu.

Použitá literatúra pre „Alternatívny spôsob odberu biologického materiálu metódou výplachu ústnej dutiny kloktaním za účelom detekcie SARS-CoV-2 metódou real –time RT-PCR“

1. Guo, W. L. et al. Effect of throat washings on detection of 2019 novel coronavirus. *Clin. Infect. Dis.* (2020) doi:10.1093/cid/ciaa416.
2. To, K. K. W. et al. Consistent Detection of 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clin. Infect. Dis.* 71, 841–843 (2020).
3. Xu, R. et al. Saliva: potential diagnostic value and transmission of 2019-nCoV. *International Journal of Oral Science* vol. 12 1–6 (2020).
4. Pasomsub, E. et al. Saliva sample as a non-invasive specimen for the diagnosis of coronavirus disease 2019: a cross-sectional study. *Clin. Microbiol. Infect.* 0, (2020).
5. Maricic T, Nickel O, Aximu-Petri A, Essel E, Gansauge M, Kanis P, et al. (2020) A direct RT-qPCR approach to test large numbers of individuals for SARS-CoV-2. *PLoS ONE* 15(12): e0244824. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244824>
6. Kandel et al., *Infection Control & Hospital Epidemiology* (2021), 1–5. doi:10.1017/ice.2021.2
7. Goldfarb et al. (2021), *J Clin Microbiol.* 2021 Mar 19;59(4):e02427–20. doi: 10.1128/JCM.02427–20.
8. P. Willeit et al. / *The Lancet Regional Health - Europe* 5 (2021) 100086 <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100086>
9. Yokota et al., *Clin Infect Dis* . 2020 Sep 25;ciaa1388. doi: 10.1093/cid/ciaa1388.
10. Wong et al., *Posterior Oropharyngeal Saliva for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)*. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 71, Issue 11, 1 December 2020, Pages 2939–2946, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa797>
11. Huber M, Schreiber PW, Scheier T, Audigé A, Buonomano R, Rudiger A, Braun DL, Eich G, Keller DI, Hasse B, Böni J, Berger C, Günthard HF, Manrique A, Trkola A. High Efficacy of Saliva in Detecting SARS-CoV-2 by RT-PCR in Adults and Children. *Microorganisms*. 2021 Mar 19;9(3):642. doi: 10.3390/microorganisms9030642.
12. Khiabani K, Amirzade-Iranaq MH. Are saliva and deep throat sputum as reliable as common respiratory specimens for SARS-CoV-2 detection? A systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 2021 Mar 24;S0196-6553(21)00140-1. doi: 10.1016/j.ajic.2021.03.008.

Odporúčania pre ďalší audit a revíziu štandardu

Vzhľadom na neustále pribúdanie poznatkov a skúseností v súvislosti s diagnostikou infekcie COVID-19 odporúčame priebežnú revíziu a aktualizáciu štandardu podľa potreby.

Literatúra

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
2. Bonifacius A., Tischer-Zimmermann S., Dragonet AC. al. :COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses. *Immunity*. 2021 Feb 9; 54(2): 340–354
3. Corman VM et al: Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan 23; 25(3)
4. Goldfarb et al. (2021), *J Clin Microbiol*. 2021 Mar 19;59(4):e02427-20. doi: 10.1128/JCM.02427-20.
5. Guo L et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID19). *Clin Infect Dis* 2020 Mar 21; [e-pub]. (<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa310>)
6. Jääskeläinen A.J. et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. *Euro Surveill*. 2020; 25(18). <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.2000603>
7. Kandel et al., *Infection Control & Hospital Epidemiology* (2021), 1–5. doi:10.1017/ice.2021.2
8. Kowalski J.W. et al. 2020 COVID-19 Coronavirus Ultraviolet Susceptibility. Purplesun Inc. Technical report, march 2020; https://researchgate.net/publication/339887436_2020_COVID_www.-9_Coronavirus_Ultraviolet_Susceptibility
9. Le Bert, N., Tan, A.T., Kunasegaran, K. et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature* **584**, 457–462 (2020).
10. Okba N. M. A et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerging infectious diseases* Volume 26, Number 7, July 2020 https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/7/20-0841_article
11. PHE: Understanding cycle threshold (Ct) in SARS-CoV-2 RT-PCR, October 2020, <https://www.gov.uk/government/publications/cycle-threshold-ct-in-sars-cov-2-rt-pcr>
12. Rezaei M. et al. Point of Care Diagnostics in the Age of COVID-19. *Diagnostics* 2021, 11(1), 9; <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010009>
13. TIB Molbiol: LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control 2020
14. TIB Molbiol: LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-gene 2020
15. TIB Molbiol: LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene 2020
16. Udugama B et al: Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020 Mar 30
17. Wang N, et al. Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China. *Viol. Sin.* 2018;33:104–107
18. Wang et al: Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. March 11, 2020
19. Walls et al: Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 180, 1–12
20. WHO: Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays, Interim guidance, 11 september 2020
21. WHO: Covid -19 Clinical management, Living guidance, WHO, 25 January 2021
22. WHO: Diagnostic testing for SARS-CoV-2, Interim guidance, 11.september 2020
23. World Health Organization (WHO). Coronavirus. Geneva: WHO; 2020 [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
24. Wilson: Serologic Tests for SARS-CoV-2: First Steps on a Long Road, reviewing Guo L et al. *Clin Infect Dis* 2020 Mar 21 Zhao J et al. *Clin Infect Dis* 2020 Mar 28 Li Z et al. *J Med Virol* 2020 Feb 27, <https://www.jwatch.org/na51255/2020/03/31/serologic-tests-sars-cov-2-first-steps-long-road>
25. Yang Y, Yang M-, Shen CG, et al. Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. medRxiv 2020; published online Feb 17. DOI: 10.1101/2020.02.11.20021493
26. Zhang Y-Z. Novel 2019 coronavirus genome. *Virological*. [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>
27. Zhao J et al: Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. 2020
28. Zhou, P.; Yang, X.-L.; Wang, X.-G.; Hu, B.; Zhang, L.; Zhang, W.; Si, H.-R.; Zhu, Y.; Li, B.; Huang, C.-L. A Pneumonia Outbreak Associated with a New Coronavirus of Probable Bat Origin. *Nature* 2020

Poznámka:

Ak klinický stav a osobitné okolnosti vyžadujú iný prístup k prevencii, diagnostike alebo liečbe ako uvádza tento štandardný postup, je možný aj alternatívny postup, ak sa vezmú do úvahy ďalšie vyšetrenia, komorbidity alebo liečba, teda prístup založený na dôkazoch alebo na základe klinickej konzultácie alebo klinického konzília.

Takýto klinický postup má byť jasne zaznamenaný v zdravotnej dokumentácii pacienta.

Účinnosť

Tento štandardný postup nadobúda účinnosť 26. októbra 2021.

Vladimír Lengvarský
minister zdravotníctva