

Štandardný postup pre mikrobiologickú diagnostiku pri suspektnej infekcii vírusom SARS-CoV-2 pre laboratóriá klinickej mikrobiológie (v2.0/19. 2. 2021)

Autorský kolektív: MUDr. Monika Czirfuszová, PhD., doc. RNDr. Danica Valkovičová Staneková, PhD., doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., doc. MUDr. Elena Nováková, PhD., MUDr. Miroslava Horniačková, PhD., MPH., MUDr. Eva Schréterová, PhD., MUDr. Emília Miková, Mgr. Edita Staroňová, PhD., prof. MUDr. Anna Líšková, PhD., prof. RNDr. Shubhada Bopegamage, CSc., doc. MUDr. Adriana Liptáková, PhD.

1. Charakteristika SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 patrí do čeľade Coronaviridae, rodu Betacoronavirus. Je to obalený pleomorfný vírus špirálovitej symetrie, veľkosti 60 – 140 nm. Dreň vírusu predstavuje jednovlákonová RNA plus polarity (+ssRNA), ktorá má dĺžku asi 30 000 nukleotidov. Z obalu vírusu vyčnievajú glykoproteínové výbežky kyjovitého tvaru, ktoré slúžia ako ligandy na väzbu na receptory vnímavej bunky. Genóm SARS-CoV-2 kóduje 29 proteínov, vrátane RNAdependentnej RNA polymerázy (RdRp) a štyroch štrukturálnych proteínov. Patrí medzi ne povrchový glykoproteín výbežkov (S), malý obalový proteín (E), matricový proteín (M) a nukleokapsidový proteín (N). Gén S kóduje receptor viažuci proteín, ktorý umožňuje vírusu infikovať bunky. Tento proteín sprostredkuje väzbu na receptor a fúziu s membránou bunky, determinuje tropizmus vírusu. Glykoproteín S je zložený z dvoch podjednotiek (S1 a S2). Glykoproteín SARS-CoV-2S nesie 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 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 výbežkov a sú potrebné pre replikáciu a patogenézu koronavírusov (Udugama, 2020).

Na serologickú diagnostiku infekcie COVID 19 pomocou testu ELISA IgM/IgG sa ako antigén používa nukleokapsidový proteín N z koronavírusu netopierov SARSr-CoV Rp3, pretože tento proteín zdieľa 92% aminokyselinovú identitu s N proteínom SARS-CoV-2 a nevykazuje skríženú reaktivitu s inými ľudskými koronavírusmi okrem SARSr-CoV (Wang et al, 2018). Gén RdRp kóduje na RNA-závislú RNA polymerázu, ktorá zabezpečuje v spojení s neštrukturálnymi proteínmi udržanie stability vírusového genómu. Ukázalo sa, že oblasť génu RdRp u SARS-CoV2 je veľmi podobná oblasti génu RdRp u koronavírusu netopierov RaTG13 a na 96% podobná celkovej genómovej sekvencii RaTG13.

Sekvenčná analýza genómu COVID-19, izolovaného od pacienta s klastrom s atypickou pneumóniou po návšteve Wu-chanu, vykazovala 89% identitu s netopierým SARS-CoVZXC21 a 82% s ľudským SARS-CoV (Chan a kol., 2020). Skutočnosť, že nový koronavírus vykazoval 96,3% podobnosť sekvencii s netopierym koronavírusom BatCoV RaTG13 SARS-CoV-2 potvrdzuje hypotézu, že s SARS-CoV-2 sa dostal do ľudskej populácie z netopierov (Paraskevis, 2020).

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 v Thajsku, 15. januára v Japonsku a 19. januára v Južnej Kórey. WHO oficiálne vyhlásila pandémiu infekcie COVID 19 spôsobenej SARS-CoV-2 11. marca 2020. V súčasnosti je infekcia SARS-CoV-2 rozšírená celosvetovo s viac ako 108 miliónmi potvrdených prípadov a s viac ako 2,4 miliónmi potvrdených prípadov úmrtí (podľa údajov WHO k 16. 2. 2021, <https://covid19.who.int>).

SARS-CoV-2 spôsobuje respiračné ochorenie COVID-19. Inkubačná doba je obvykle do 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 vírus-neutralizačnom efekte týchto protilátok. 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.

2. Kritériá pre zaradenie laboratória klinickej mikrobiológie do siete laboratórií testujúcich vzorky biologického materiálu ľudí na prítomnosť vírusu SARS-CoV-2

A. Minimálne personálne a materiálno-technické vybavenie laboratória:

- lekár so špecializáciou v odbore klinická mikrobiológia alebo
- laboratórny diagnostik so špecializáciou v odbore laboratórne a diagnostické metódy v klinickej mikrobiológii,
- laborant so špecializáciou v odbore laboratórne vyšetровacie metódy v klinickej mikrobiológii plne zaškolený v laboratórnom diagnostickom postupe na detekciu RNA SARS-CoV-2,
- vysokoškolsky vzdelaný odborník so špecializáciou v odbore virológia, mikrobiológia alebo molekulárna biológia,
- 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 pre izoláciu RNA SARS-CoV-2,
- prístroje a diagnostiká pre vykonávanie RT-PCR SARS-CoV-2,
- všetky používané laboratórne prístroje a pomôcky musia mať platný doklad o validácii

- ochranné pracovné pomôcky pre personál, ktorý vykonáva odber biologického materiálu a izoláciu RNA vhodné pre ochranu pred infekciou vírusom SARS-CoV-2 v súlade s aktuálnym usmernením hlavného hygienika Slovenskej republiky,
- odberové súpravy, ktoré obsahujú vírusové transportné médium a 2 dakrónové odberové tampóny.

B. Kompetentnosť laboratória:

- úspešné absolvovanie externej kontroly kvality aspoň jednej molekulárno-biologickej metódy za posledných 12 mesiacov,
- úspešné overenie postupu testovania SARS-CoV-2 RNA sériou 5 až 10 kontrolných vzoriek poskytnutých Národným referenčným centrom pre chrípku ÚVZ SR a priebežné konfirmačné testovanie kontrolnými vzorkami z ÚVZ SR pri zmene testovacej súpravy. úspešná validácia postupu na testovanie SARS-CoV-2 RNA sériou 5 až 10 kontrolných vzoriek, ktoré poskytne Národné referenčné centrum pre chrípku na Úrade verejného zdravotníctva Slovenskej republiky úspešné absolvovanie externej kontroly kvality diagnostiky SARS-CoV-2 sériou 5 až 10 kontrolných vzoriek poskytnutých Národným referenčným centrom pre chrípku Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky v priebehu každých 6 mesiacov.

C. Postupy pre dezinfekciu, dekontamináciu a manipuláciu s kontaminovanými pomôckami

- prevádzkový poriadok pracoviska, ktorého súčasťou je laboratórium klinickej mikrobiológie,
- postupy pre dezinfekciu, dekontamináciu a manipuláciu s kontaminovanými pomôckami. Laboratórium musí mať zavedené a zdokumentované postupy dezinfekcie pracovných plôch chemickými dezinfekčnými prípravkami a UVC žiarením, dekontaminácie použitých laboratórnych pomôcok použitím dezinfekčných prípravkov s dokázanou účinnosťou voči obaleným vírusom (vrátane SARS-CoV-2). Laboratórium musí mať zavedené a zdokumentované postupy pre bezpečnú manipuláciu a následnú likvidáciu kontaminovaných laboratórnych pomôcok a ochranných pracovných prostriedkov. Podrobnejšie vid' odsek č. 6.

D. Požiadavky na informačné technológie laboratória:

- napojenie na centrálnu evidenciu laboratórnych výsledkov: IS COVID-19 prostredníctvom ÚVZ SR (laboratórium poskytne ÚVZ SR kontaktnú osobu na IT, kontaktná osoba ÚVZ SR Mgr. Mária Ondeková, maria.ondekova@uvzs.sk),
- laboratórny informačný systém zapojený v systéme Moje eZdravie s prepojením na aplikáciu COVID-PASS NCZI a IS EPIS.

3. Postup pre laboratória klinickej mikrobiológie, ktoré požadujú začlenenie do siete laboratórií vyšetrujúcich SARS-CoV-2 v Slovenskej Republike

- Laboratórium, ktoré spĺňa vyššie uvedené podmienky o zaradenie do siete laboratórií, ktoré vyšetrujú SARS-CoV-2 v Slovenskej Republike, zašle Ministerstvu zdravotníctva Slovenskej republiky žiadosť a dokumentáciu podľa bodu 2.
- Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky po schválení postúpi žiadosť Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, ktorý rozhodne o zaradení laboratória na základe vyššie uvedených kritérií.
- Národné referenčné laboratórium pre chrípku na Úrade verejného zdravotníctva Slovenskej republiky overí kompetentnosť laboratória na vyšetovanie SARS-CoV-2 úspešným absolvovaním validácie diagnostického postupu laboratória a poskytne kontrolné vzorky. Kontakt: Mgr. Edita Staroňová, PhD. edita.staronova@uvzsr.sk,
- Na základe úspešného absolvovania validácie diagnostického postupu na vyšetovanie SARS-CoV-2 vedúca Národného referenčného centra pre chrípku požiada kompetentnú osobu o napojenie na IS COVID.
- Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky písomnou alebo elektronickou formou oznámi Ministerstvu zdravotníctva Slovenskej republiky úspešného absolvovania validácie diagnostického postupu na vyšetovanie SARS-CoV-2. Kontakt: PhDr. Tomáš Kúdela, MPH, tomas.kudela@health.gov.sk.
- Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky na základe informácie úspešného absolvovania validácie diagnostického postupu na vyšetovanie SARS-CoV-2, ktorú zaslal Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, uverejní úspešné laboratórium do zoznamu laboratórií, ktoré vyšetrujú SARS-CoV-2, ktorý je uverejnený na webovom sídle Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky.

4. Odber a transport vzoriek na molekulárno-biologický dôkaz RNA SARS-CoV-2

Biologický materiál: výter z nazofaryngu, orofaryngu, aspirát alebo výplach z nazofaryngu, spútum, BAL, endotracheálny aspirát, bioptická vzorka alebo kefkový ster odobraté pri fibrobronchoskopii. Málo preukazné vzorky biol. materiálu: stolica, krv, moč.

Odberová súprava:

Výtery z nazofaryngu, orofaryngu a bioptické vzorky sa odoberajú do vírusového transportného média, ktoré inaktivuje sprievodnú mikrobiálnu flóru, stabilizuje nukleové kyseliny a je kompatibilné s aktuálne používanou izolačnou súpravou. Súčasťou odberovej súpravy sú 2 ks dakrónových odberových tampónov. Ostatný biologický materiál sa odoberá do sterilnej nádoby alebo skúmavky.

Spôsob odberu biologického materiálu: Osobitný spôsob odberu výterov z nazofaryngu a orofaryngu pri podozrení na infekciu COVID19 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.

Podmienky transportu vzoriek:

Vzorky odobraté do vírusového transportného média sú stabilné v teplotnom rozmedzí 4 – 25 °C niekoľko dní (podľa odporúčania výrobcu vírusového transportného média). Sekréty, aspiráty a iné tekuté vzorky z dýchacích ciest odobraté do sterilnej nádoby je možné transportovať pri 2- 8 °C maximálne 2 dni. Pri dlhšom transporte je potrebné tieto vzorky zamraziť na teplotu -70 °C a transportovať na suchom ľade (WHO, 2020).

V prípade nedostatku transportného média je možné médium pripraviť podľa návodu:

- 8 g bovínny sérový albumín pH 7.0 (Microbiological grade, pre tkanivové kultúry, Himedia)
- 8 mg amphotericin B (Solubilized, for R&D use only, Sigma)
- 40 ml penicilín (10 000 U/ml)- streptomycín (10 000u/ml) – (Suspension for research use only, Lonza)
- 4 ml gentamicín sulfát (For cell culture , Lonza)
- 360 ml PBS pH 7.2

Pripraviť PBS, sterilizovať autoklávaním pri 121 °C po dobu 30 minút. Do vychladnutého PBS pridať všetky zložky (priamo od výrobcu, sú v sterilnom stave) za aseptických podmienok v biologickom bezpečnostnom boxe BSL2. Premiešať a rozplniť po 2 ml do pripravených sterilných skúmaviek so skrutkovacím uzáverom. Množstvo vystačí na 200 skúmaviek. (zdroj: ÚVZ SR)

5. Dôkaz RNA vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR

A. Izolácia vírusovej RNA

Izolácia vírusovej RNA sa vykonáva v biologickom bezpečnostnom boxe BSL 2, za použitia ochranných pracovných pomôcok – respirátor FFP3/FFP2, okuliare/štit, jednorazový oblek, sterilné bezpúdrové rukavice. Je možné použiť manuálne izolačné súpravy alebo súpravy na automatizovanú izoláciu validovanú Národným referenčným centrom pre chrípku ÚVZ SR.

B. Detekcia vírusovej RNA metódou RT-PCR

RT – PCR je polymerázová reťazová reakcia s reverznou transkripciou, pri ktorej sa RNA prepisuje do komplementárnej DNA (cDNA) prostredníctvom reverznej transkriptázy. Následne sa DNA amplifikuje štandardným spôsobom polymerázovej reťazovej reakcie.

V rámci skriningového testovania infekcie COVID-19 pomocou real-time PCR s reverznou transkripciou je vhodné v 1. línii použiť gén E, kódujúci obalový proteín, a na konfirmáciu použiť gén RdRp kódujúci RNA-závislú RNA polymerázu /Corman, 2020/. **Za pozitívny možno považovať len test s potvrdenou konfirmáciou.**

V prípade ak pri pozitívite E-génu sa následnou konfirmáciou nepotvrdí prítomnosť SARS-CoV-2, výsledok RT-PCR je neurčitý, odporúča sa opakovať odber a RT-PCR opakovať za dôsledného dodržiavania pracovného postupu deklarovaného výrobcom diagnostickej súpravy s osobitným zreteľom na zabránenie kontaminácie vzorky pozitívnou kontrolou.

Dostupné testy sú založené na detekcii génov N, E, S a RdRP (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 - gén S kóduje výbežky obalu vírusu, ktorými sa vírus viaže na receptor vnímavej bunky. Vykazuje menej ako 75%-nú identitu nukleotidovej sekvencie s genómom skôr opísaných SARS-CoV, s výnimkou 93,1% nukleotidovej identity s netopierom RaTG13. **Priméry v teste pre S gén sú schopné odlišiť SARS-CoV-2 od všetkých ostatných ľudských koronavírusov vrátane netopierieho SARS-CoV WIV1, ktorý zdieľa 95% identitu so SARS-CoV.**

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

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

<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. Prednostne si vyberajte testovacie súpravy spĺňajúce požiadavky nariadenia EP 98/79/EC (značka CE IVD). Použitie testovacej súpravy v podmienkach konkrétneho laboratória musí byť overená 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 bioptickej 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).

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

C. Interpretácia výsledkov dôkazu RNA vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR

Metóda RT-PCR deteguje prítomnosť genetického materiálu vírusu SARS-CoV-2, nerozlišuje však, či je vo vzorke prítomný vírus schopný vyvolať infekciu. Metóda taktiež neumožňuje objektívne posúdenie kvantity infekčných vírusových častíc vo vzorkách z horných dýchacích ciest, vzhľadom na množstvo faktorov ovplyvňujúcich diagnostický proces.

Faktory ovplyvňujúce množstvo infekčných vírusových častíc v odobratej vzorke na RT-PCR SARS-CoV-2:

- kvalita odberu biologického materiálu,
- množstvo vírusu SARS-CoV-2 v mieste odberu,
- prítomnosť inhibítorov v mieste odberu.

Laboratórne faktory vplyvajúce na množstvo vírusových častíc v analyzovanej vzorke biologického materiálu odobratého na dôkaz vírusu SARS-CoV-2 metódou RT-PCR:

- použité transportné médium/objem transportného média,
- spôsob izolácie RNA vírusu SARS-CoV-2,
- objem reagentov použitých v jednotlivých krokoch RT-PCR,
- voľba diagnostickej súpravy na RT-PCR.

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 označuje Ct (cycle threshold). Typická RT-PCR analýza má 40 termálnych cyklov. **Ct hodnota je semikvantitatívna, umožňuje rozlišovať medzi vysokou a nízkou vírusovou náložou. Čím nižšia je Ct hodnota, tým vyššia je vírusová nálož v analyzovanej vzorke.**

Ct hodnoty získané z 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 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 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.

Poznámka:

Za určitých okolností je možné používať hodnotu Ct na kvantifikáciu vírusových kópií na bunku v pôvodnej vzorke. Musia byť však splnené nasledujúce predanalytické podmienky:

- štandardizované množstvo vzorky biologického materiálu s kvantifikáciou obsahu buniek,
- štandardný protokol pre riedenie testovanej vzorky.

Rutinné laboratóriá nevykonávajú vyššie uvedenú kvantifikáciu vzoriek z horných dýchacích ciest, preto hodnoty Ct v našich podmienkach nie je možné použiť ako objektívny parameter pre kvantifikáciu vírusovej nálože vo vzorke.

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

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

6. 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 aerosolu (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-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19))

Manipulácia s biologickým materiálom obsahujúcim vysoké koncentrácie aktívneho vírusu sa riadi osobitnými pravidlami v podmienkach zodpovedajúcich biologickej bezpečnosti 3. stupňa. Takéto výkony rutinné laboratóriá klinickej mikrobiológie nevykonávajú.

7. Uchovávanie vzoriek pre účely confirmácie z forenzných dôvodov

Laboratórium vykonávajúce molekulárno-biologické testovanie vzoriek na prítomnosť SARSCoV-2 je povinné zabezpečiť uchovávanie primárnych vzoriek s pozitívnym výsledkom RT-PCR pri teplote -20 °C, ideálne však pri teplote pod -70 °C. V prípade nedostatočného množstva primárnej vzorky sa odporúča uchovávať eluát s izolovaným RNA takisto pri teplote -20 °C, ideálne však pri teplote pod -70 °C.

8. Stanovenie protilátok proti vírusu SARS-CoV2

Sérologické testy umožňujú detekciu celkových špecifických protilátok, alebo špecifických protilátok v triedach IgM, IgA a IgG, ktoré sa počas infekcie vytvárajú voči imunogénnym antigénom vírusu SARS- CoV-2. Protilátková odpoveď je súčasťou komplexnej imunitnej odpovede organizmu na infekciu. Tá je do veľkej miery individuálna a je 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. Skutočný charakter a význam poinfekčnej imunity po prekonaní SARS CoV-2 nie je doposiaľ objasnený.

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. Stanovenie tvorby protilátok proti SARS- CoV-2 ako komplementárny test má aj potenciálny význam pre vyhľadávanie infikovaných s asymptomatickým klinickým priebehom, ktorí môžu predstavovať riziko pre ďalšie šírenie vírusu v populácii.

Špecifické a dostatočne citlivé testy na dôkaz protilátok proti vírusu SARS- CoV-2 sú založené na princípe ELISA (enzýmová imunoanalýza) alebo CMIA (chemiluminiscenčná imunoanalýza). Môžu byť prínosom v diagnostike pri pretrvávajúcom klinickom podozrení u pacienta s negatívnym výsledkom RT-PCR, a aj pri vyhľadávaní prípadov s asymptomatickým priebehom infekcie.

Výsledky dostupných štúdií:

Dni po nástupe príznakov	Počet testovaných pacientov	Detekcia RNA Podiel a % pozitívnych	Celkové protilátky (ELISA)	IgM (ELISA)	IgG (ELISA)	RNA+cel. protilátky
0-7	94	58/66,7%	36/38,3%	27/28,7%	18/19,1 %	74/78,4%
8-14	135	67/54 %	121/89,6%	99/73,3%	73/54,1%	131/97,0%
15-39	90	25/45,5 %	90/100 %	71/79,8 %	71/79,8%	90/100%

Podľa Zhao, 2020

V štúdiu 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/ Vzhľadom na relatívne vysokú mieru falošne negatívnych výsledkov pri PCR sú sérologické testy užitočným doplnkom k pri detekcii RNA. Súčasne kombinácia molekulárne biologických a sérologických metód zlepšuje identifikáciu pozitívity v rôznych fázach choroby. 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/.

Stále nie je jasné, 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. Takéto úvahy sú zatiaľ len hypotetické a vychádzajú zo štúdií infekcií vyvolaných príbuzným vírusom SARS-CoV-1. S postupom času a vývojom pandémie, kedy bude postupne stúpať premorenosť populácie, sa budú zvyšovať nároky na sérologické testy, ktoré by mohli spoľahlivo potvrdiť prekonanie infekcie. Overovaniu a zavádzaniu takýchto sérologických metód sa intenzívne venuje WHO.

9. Detekcia antigénov vírusu SARS-CoV2

Tieto testy detegujú prítomnosť vírusového antigénu v sekréte z dýchacích ciest na princípe ich väzby so špecifickými protilátkami viazanými na nitrocelulózuvej membráne. Testy fungujú na princípe imunochromatografie. Výsledok je hotový do 30 minút. Ich nevýhodou je však ich možnosť použitia iba v rannom štádiu infekcie kedy sa vírus aktívne replikuje a jeho antigény sú exprimované v dostatočnom množstve. Citlivosť týchto testov varíruje medzi 34 až 80 %. Výsledok je do značnej miery ovplyvnený kvalitou odobratej vzorky, časovaním odberu a kvalitou diagnostickej súpravy.

Príloha č.1 Algoritmus pre mikrobiologickú diagnostiku pacientov s príznakmi infekcie dýchacích ciest spĺňajúcich klinické kritériá pre podozrenie z infekcie COVID19

Príloha č.2 Algoritmus pre mikrobiologickú diagnostiku asymptomatických pacientov po kontakte s infekciou COVID 19

Literatúra:

1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
2. Chan JF, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KK, Yuan S, Yuen KY. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):221-236.
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. 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>)
5. 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.-19_Coronavirus_Ultraviolet_Susceptibility
6. Li Z et al. Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis. *J Med Virol* 2020 Feb 27; [e-pub]. (<https://doi.org/10.1002/jmv.25727>)
7. Liferiver: Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT – PCR Kit (Detection for 3 Genes).
8. Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog.* 2018 Aug;14(8):e1007236. [PMC free article] [PubMed]
9. Pan et al: Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet*, April 02, 2020.
10. Paraskevis D et al: Full-genome evolutionary analysis of the novel corona virus (2019-nCoV) rejects the hypothesis of emergence as a result of a recent recombination event: *Infection, genetics and evolution*, 79:104212 · January 2020
11. Příbalový leták Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgA)
12. Příbalový leták Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA (IgG)
13. Diasorin tlačová správa: <https://www.diasorin.com/en/news/liaisonr-sars-cov-2-igg>
14. Příbalový leták IBL TECAN Coronavirus Covid-19 IgG ELISA
15. Příbalový leták IBL TECAN Coronavirus Covid-19 IgM ELISA
16. Příbalový leták EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgG ELISA kit
17. Příbalový leták EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgM ELISA kit
18. Příbalový leták SD biosensor STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Duo Test
19. TIB Molbiol: LightMix® Modular EAV RNA Extraction Control 2020
20. TIB Molbiol: LightMix® Modular Wuhan CoV RdRP-gene 2020.
21. TIB Molbiol: LightMix® Modular SARS and Wuhan CoV E-gene 2020
22. Udugama B et al: Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano.* 2020 Mar 30
23. 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>

24. Wang N, et al. Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China. *Viol. Sin.* 2018;33:104–107.
25. 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>
26. Wang et al: Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. March 11, 2020
27. Walls et al: Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 180, 1–12
28. WHO: Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance, 2.march 2020
29. WHO: Advice on the use of point-of care immunodiagnostic tests for COVID -19, 8. April 2020
30. World Health Organization (WHO). Coronavirus. Geneva: WHO; 2020 [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus>
31. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-mediabriefing-on-covid-19---11-march-2020>
32. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
33. 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.
34. Zhang Y-Z. Novel 2019 coronavirus genome. *Virological*. [Accessed 21 Jan 2020]. Available from: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>
35. Zhao J et al: Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020 Mar 28. 2020.
36. 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
37. <https://www.gov.uk/government/publications/cycle-threshold-ct-in-sars-cov-2-rt-pcr>