

Vážené kolegyně, vážení kolegovia,

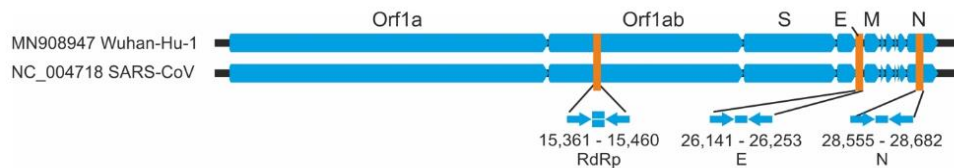
vzhľadom k pomerne neprehľadnej a neustále sa meniacej situácii sme sa rozhodli vás informovať o aktuálne dostupnej laboratórnej diagnostike ochorenia COVID-19. Vopred sa ospravedlňujeme za pomerne značný rozsah dokumentu - bol vytvorený s cieľom podať čitateľovi ucelené a kompletne informácie z viacerých relevantných zdrojov.

V súčasnosti existujú dve možnosti detekcie vírusu SARS-CoV-2 – priame stanovenie nukleovej kyseliny a nepriama diagnostika založená na detekcii špecifických protilátok.

1. Priame stanovenie nukleovej kyseliny RNA SARS-CoV-2

1.1. Metóda

Real-Time PCR založená na amplifikácii špecifických fragmentov genómu vírusu (tzv. N-gene, E-gene a RdRp-gene) a ich následnej detekcii.



Zdroj obrázku: <https://www.who.int/>

1.2. Pokyny pre odber

Pre vyšetrenie sa využíva výter z nasofaryngu a orofaryngu [1,2], sputum, prípadne materiál z bronchoalveolárnej laváže, alebo endotracheálny aspirát.

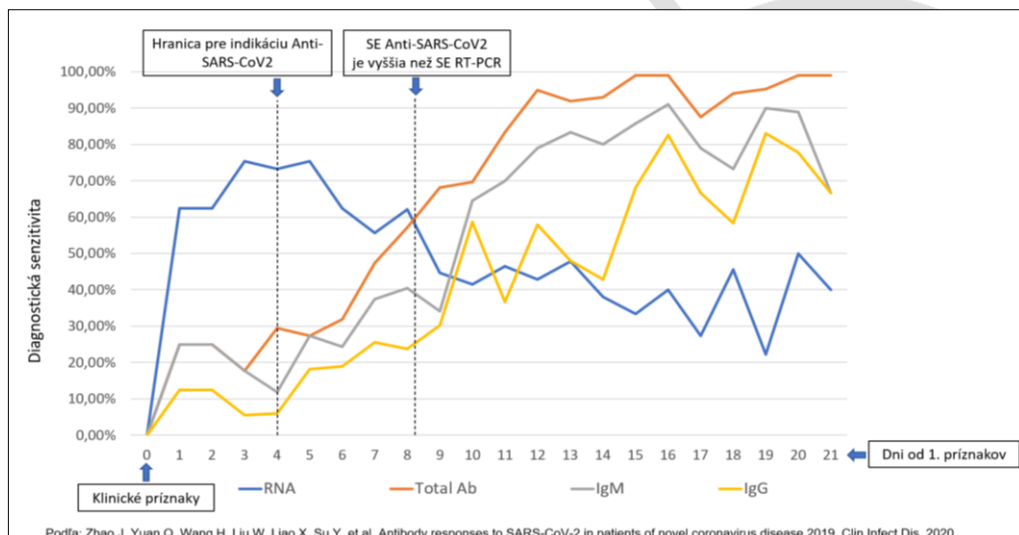
Je nutné použiť špeciálne plastové výterovky s jemnou kefkou zo syntetického materiálu (dacron, nylon, polyester apod.) Výterovka NESMIE obsahovať drevo a vatu, ktoré inhibujú PCR reakciu [2]. Výterovky sa umiestňujú do tekutého transportného média pre vírusy.

1.3. Výpovedná hodnota vyšetrenia

Diagnostika skorej fázy ochorenia - **1.-8. deň** od nástupu príznakov [2-7]. Táto diagnostika má však výraznú limitáciu vo vyšetrovanom materiáli, resp. spôsobe jeho odberu a pre odbery z **horných dýchacích ciest** dosahuje **maximálnu senzitivitu 70-75 %** (u 25-30 % pacientov s COVID-19 je vyšetrenie falošne negatívne) [2,6,7].

Podľa niektorých autorov je senzitivita ešte nižšia - Wang uvádza pre orofaryngeálny výter senzitivitu pre záchyt COVID-19 len 32 %, pre nasofaryngeálny 63 % [1]. Navyše senzitivita RT-PCR prudko klesá s časom trvania infekcie (12. deň od príznakov je na úrovni 30-40 %). Naopak, diagnostická senzitivita protilátok Anti-SARS-CoV-2 v čase stúpa (Graf 1) [6,7].

Graf 1: Zmena diagnostickej senzitivity (SE) laboratórnych vyšetrení COVID-19 v čase



2. Nepriame stanovenie protilátok triedy IgG a IgM proti SARS-CoV-2**2.1. Metóda**

Imunoanalýza, najčastejšie ELISA, alebo chemiluminiscenčná imunoanalýza.

Je nutné **striktne rozlišovať** medzi v súčasnosti rapidne pribúdajúcimi tzv. „**rýchlotestami**“ a certifikovanými, **validovanými (CE IVD) laboratórnymi súpravami**, kde sa dá predpokladať výrazne vyššia analytická kvalita. Pre orientáciu v tejto problematike je možné použiť stránku <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-immuno/>, kde tvorcovia budú postupne pridávať výsledky nezávislého hodnotenia kvality jednotlivých testov.

2.2. Pokyny pre odber

Štandardný odber venózne krvi pre získanie séra - skúmavka bez aditíva (VACUETTE s červeným viečkom)

2.3. Výpovedná hodnota vyšetrenia**2.3.1. Protilátky IgM**

Začínajú sa tvoriť **1-2 týždne od kontaktu s infekciou**, pozitívne sú **od 3.-5. dňa od nástupu príznakov**. **Od 8. dňa** je ich diagnostická senzitivita na úrovni RT-PCR a ďalej stúpa až k maximu **85-90 %** (Graf 1). Pozitivita IgM protilátok **pretrváva 2-4 mesiace**. Doporučené postupy zatiaľ stanovenie Anti-SARS-Cov-2 IgM uvádzajú len ako doplnkové vyšetrenie k RT-PCR pre diagnostiku COVID-19 u asymptomatických osôb a osôb s miernymi príznakmi [2,3].

Podľa recentných štúdií [6,7] je však možné IgM protilátky využiť aj k diagnostike, ich **senzitivita** je od 8. dňa od vzniku symptomatológie dokonca vyššia než senzitivita RT-PCR (Graf 1 a Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Zmena diagnostickej senzitivity laboratórných vyšetrení COVID-19 v čase

Dni od nástupu symptómov	Počet pacientov s COVID 19 a negatívnou RT-PCR RNA*	Počet pacientov s COVID19 a pozitívnymi Anti-SARS-CoV-2 v plazme a negatívnou RT-PCR RNA n (% z RNA negatívnych)		
		Celkové Ig	IgM	IgG
1-3	7	2 (28.6)	2 (28.6)	2 (28.6)
4-7	28	15 (53.6)	12 (42.9)	8 (28.6)
8-14	57	56 (98.2)	45 (78.9)	40 (70.2)
15-39	30	30 (100)	28 (93.3)	22 (73.3)

*RNA bola testovaná zo vzorky výteru z krku, nosa.

Podľa: Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. Clin Infect Dis. 2020.

2.3.2. Protilátky IgG

Začínajú sa tvoriť **2.-4. týždeň od nástupu príznakov**, pozitivita pretrváva niekoľko rokov. Ich vyšetrenie je vhodné predovšetkým k vyhľadávaniu osôb s prekonaným ochorením, alebo asymptomatickým priebehom ako súčasť epidemiologických prehľadov (napr. pre odhad šírenia pandémie, identifikáciu ohnisk nákazy, po ukončení karantény apod.).

Záver pre prax:

- Priamy dôkaz vírusu **RT-PCR RNA** je spolu s klinickými príznakmi a pozitívnou epidemiologickou anamnézou metódou voľby pre **diagnostiku COVID-19 skorej fáze ochorenia (1-4 dni od začiatku symptómov)** a pre

posúdenie infekčnosti pacienta. Senzitivita tejto metódy veľmi závisí na mieste odberu (materiál z DDC je vhodnejší než z HDC) a kvalite odberového materiálu (drevo a vata sú známe inhibítory PCR reakcie).

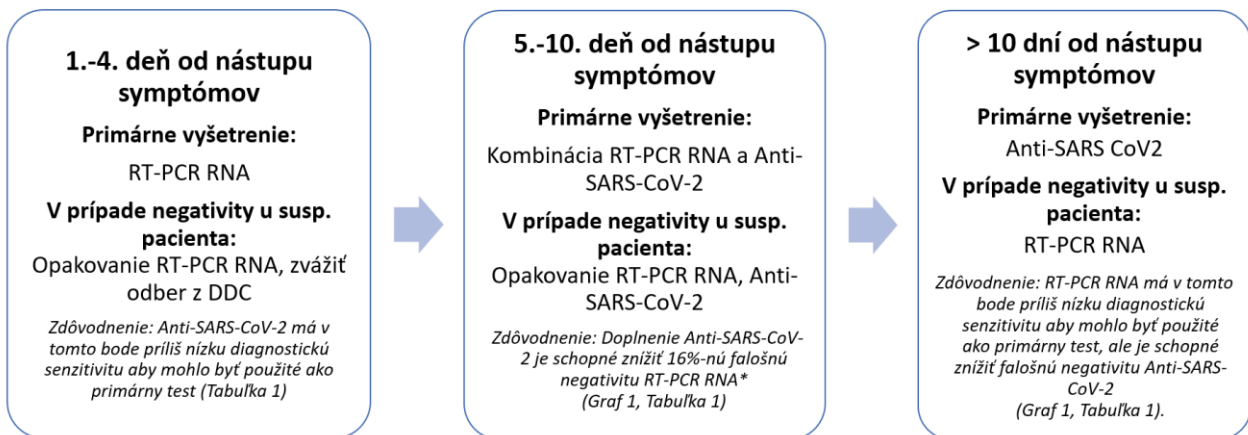
- V súčasnosti je vyšetrenie **Anti-SARS-CoV-2** doporučené **pre epidemiologickú surveillance** - identifikovanie jedincov s prekonaným ochorením, alebo miernym/asymptomatickým priebehom [2-5, 8].
- Z výsledkov posledných štúdií je zrejmé, že každá z metód poskytuje inú, ale v prípade oboch metód diagnosticky cennú informáciu (Tabuľka 1) a vyšetrenie **Anti-SARS-CoV-2 IgM** má svoje miesto v **diagnostike pozdejšej fázy COVID-19 (po 4. dni od začiatku symptómov)**. Pri voľbe metódy nutné zohľadniť zmeny jej senzitivity v priebehu trvania infekcie (Graf 1 a Schéma 1).
- Z hľadiska analytickej kvality by sa malo preferovať stanovenie protilátok CE-IVD certifikovanou a validovanou laboratórnou metódou (ak je dostupné).
- **Najvyššiu diagnostickú výťažnosť** v ktoromkoľvek časovom okamihu je možné dosiahnuť pri multimarkerovej stratégii, t.j. **kombináciou oboch testov**, prípadne **sekvenčným** testovaním (Schéma 1).
- V budúcnosti je pravdepodobný aj vývoj a klinická aplikácia testov detekujúcich Anti-SARS-CoV-2 protilátky **triedy IgA**, ktoré zvýšia záchyt COVID-19 v akútnej fáze ochorenia.
- Izolované vyšetrovanie **RT-PCR RNA u asymptomatických jedincov** s negatívnou epidemiologickou anamnézou je **veľmi sporné** (výsledok odráža len situáciu v momente odberu, nie je možné zistiť fázu ochorenia - riziko vysokej falošnej negativity).

Schéma 1 : Indikácia testov pre diagnostiku COVID-19 s ohľadom na ich diagnostickú senzitivitu.

Schéma 1: Indikácia vyšetrení v závislosti na fáze ochorenia



Výpovedná hodnota Anti-SARS-CoV-2 a RT-PCR RNA vírusu sa dopĺňa. Pri indikácii testov je nutné zohľadniť zmenu diagnostickej senzitivity v čase (Graf 1):



V ideálnom prípade by u suspektného pacienta mali byť k dispozícii **vždy oba výsledky**. To platí obzvlášť v prípadoch, keď nie je možné spoľahlivo určiť dobu od nástupu symptómov.

Možnosti diagnostiky COVID-19 v SK-Lab (stav ku 7.4.2020)

1. Vyšetrenie protilátok Anti-SARS-CoV-2 triedy IgG a IgM

Toto vyšetrenie **máme aktuálne k dispozícii** ako jedno z prvých laboratórií na Slovensku. Pre stanovenie protilátok využívame **CE-IVD validovanú metódu** na princípe chemiluminiscenčnej imunoanalýzy. Odber indikuje a vykonáva ošetrojúci lekár, používa sa štandardná **sérová skúmavka** (VACUETTE, červené viečko). Vyšetrenie aktuálne nie je hrazené zdravotnými poisťovňami, v súčasnosti prebiehajú rokovania o podmienkach úhrady. Pre jednotlivé prípady je postup nasledovný:

- **COVID-19 suspektný pacient** (> 4 dni od nástupu symptómov)
 - Vyplnenie špeciálnej žiadanky - prosíme o dôsledné vyplnenie klinických príznakov a anamnézy a tiež zdravotnej poisťovne a diagnózy pacienta (U07.2, alebo U07.1). Odber v ambulancii ošetrojúceho lekára, alebo na oddelení.
 - Výsledky sú k dispozícii do 24 hodín na našom webovom portáli (<http://labis.sklab.sk>), v papierovej podobe vám budú doručené našimi vodičmi.
- **Zdravotnícky personál, členovia záchranných zložiek** na vlastnú žiadosť
 - Vyplnenie špeciálnej žiadanky - prosíme o uvedenie zdravotnej poisťovne, prípadne ďalších relevantných údajov. Odber v ambulancii lekára, alebo na oddelení.
 - Výsledky sú k dispozícii do 24 hodín na našom webovom portáli (<http://labis.sklab.sk>), v papierovej podobe vám budú doručené našimi vodičmi.
- **Asymptomatický pacient** na vlastnú žiadosť
 - Vyplnenie špeciálnej žiadanky - prosíme o vyplnenie epidemiologickej anamnézy. Odber v ambulancii ošetrojúceho lekára (vo výnimočných prípadoch v SK-Lab po tel. dohovore).
 - Pacient vyšetrenie uhradí v SK-Lab, cena vyšetrenia pre samoplatcu je 20 EUR (zahŕňa vyšetrenie Anti-SARS-CoV-2 IgG aj IgM). Výsledok bude pacientovi vydaný do vlastných rúk po overení totožnosti (OP/pas).

2. Vyšetrenie RT-PCR RNA vírusu SARS-CoV-2

Aktuálne intenzívne pracujeme na spustení prevádzky laboratória pre analýzu extrahumánneho genómu, čo zahŕňa úpravu priestorov, vytvorenie technologického zázemia a potrebné administratívne úkony. Dôležitým predpokladom realizácie je know-how kolegov v našom tíme, ktorí majú s PCR metódami niekoľkoročné rutinné skúsenosti.

Očakávame, že toto vyšetrenie vám budeme môcť ponúknuť v druhej polovici mája 2020. Veríme, že tento krok prispeje k pripravenosti nášho regiónu na vrchol epidémie ochorenia COVID-19, ktorý sa podľa dostupných prognostických modelov očakáva v letných mesiacoch.

3. Ďalšie vyšetrenia

Laboratórny obraz pacienta s miernym/asymptomatickým priebehom COVID-19 sa v základných biochemických a hematologických parametroch **podobá iným vírusovým infekciám** (lymfocytóza, mierne zvýšenie CRP)

Nepriaznivý priebeh COVID-19 je spojený s neutrofiliou, zvýšeným IL-6, PCT a CRP (signalizujú bakteriálnu superinfekciu), lymfopéniou (nízka reakcia imunitného systému na vírus), zvýšením ALT, AST, bilirubínu (hepatopatia), zvýšením kreatinínu (nefropatia), trombocytopéniou, pozitívnymi D-dimérmami, predĺženým protrombínovým časom (počínajúca DIC), zvýšeným troponínom (poškodenie srdcového svalu). Tieto vyšetrenia je **vhodné opakovať** predovšetkým u hospitalizovaných pacientov s **odstupom 2-3 dní**, alebo ihneď pri zmene klinického stavu [4].

V rámci posúdenia prognózy u pacientov s COVID-19 a monitoringu ich stavu je **vhodná aj indikácia vyšetrení zameraných na bunkovú imunitu** (B-Krvný obraz + dif., B-FlowCyto Panel 1, Skúmvka s EDTA – VACUETTE fialové viečko) a **humorálnu imunitu** (S-IgG, S-IgM, S-IgG, skúmvka pre sérum – VACUETTE červené viečko). Vyšetrenia je vhodné indikovať u suspektného pacienta spolu s RT-PCR RNA, alebo Anti-SARS-CoV-2 a v prípade potvrdenia COVID-19 následne opakovať s týždenným odstupom pre posúdenie dynamiky [9].

V prípade akýchkoľvek otázok sme k dispozícii na tel. 047/4333210, 211, a peter.secnik@sklab.sk, peter.secnikjr@sklab.sk

S prianím pevného zdravia,

MUDr. Peter Sečník ml.

MUDr. Juraj Sečník

MUDr. Peter Sečník

Literatúra:

1. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. JAMA. 2020.
2. Dřevínek P., Macková B., Hubáček P.: Odborné stanovisko Společnosti pro lékařskou mikrobiologii České lékařské společnosti J.E. Purkyně k mikrobiologické diagnostice COVID-19. 25.3.2020
3. Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 - <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/lab/guidelines-clinical-specimens.html>, date of access: 7.4.2020
4. IFCC Information Guide on COVID-19 (<https://www.ifcc.org/ifcc-news/2020-03-26-ifcc-information-guide-on-covid-19/>), date of access: 7.4.2020
5. WHO interim guidance for laboratory testing (<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>), date of access: 7.4.2020
6. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. Clin Infect Dis. 2020.
7. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. Lancet Infect Dis. 2020.
8. Loeffelholz MJ, Tang YW. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections - the state of the art. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):747-56.
9. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H et al. Longitudinal Characteristics of Lymphocyte Responses and Cytokine Profiles in the Peripheral Blood of SARS-CoV-2 Infected Patients (2/16/2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3539682> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3539682>

Skratky:

Anti-SARS-CoV-2 – vyšetrenie protilátok proti vírusu spôsobujúcemu ochorenie COVID-19.

RT PCR RNA – vyšetrenie prítomnosti nukleovej kyseliny vírusu spôsobujúceho ochorenie COVID-19 metódou real-time polymerase chain reaction.

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

WHO – World Health Organisation

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

IFCC - International Federation for Clinical Chemistry

EUCDC – European Center for Disease Control and Prevention

SZÚ ČR – Státní zdravotní ústav České republiky

DIC – diseminovaná intravaskulárna koagulácia

HDC – horné dýchacie cesty

DDC – dolné dýchacie cesty