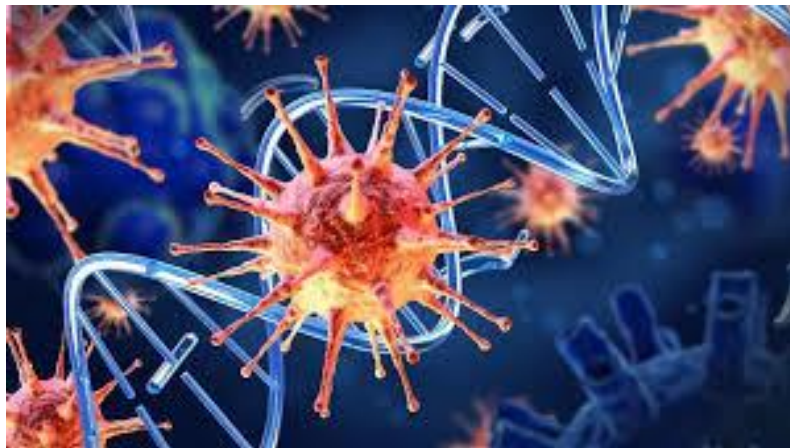


Rīgas Austrumu klīniskā universitātes slimnīca
Nacionālā mikrobioloģijas references laboratorija

**Ieteikumi COVID-19 infekcijas
laboratoriskai diagnostikai**



Rīga

20.05.2020.

Saturs

<i>Ievads</i>	3
<i>Molekulāri bioloģiskie izmeklējumi</i>	4
<i>Seroloģiskie izmeklējumi</i>	7
<i>Covid-19 infekcijas diagnostikai izmantojamais izmeklējamais materiāls</i>	10
<i>Biodrošība</i>	12
<i>Atsauces</i>	16

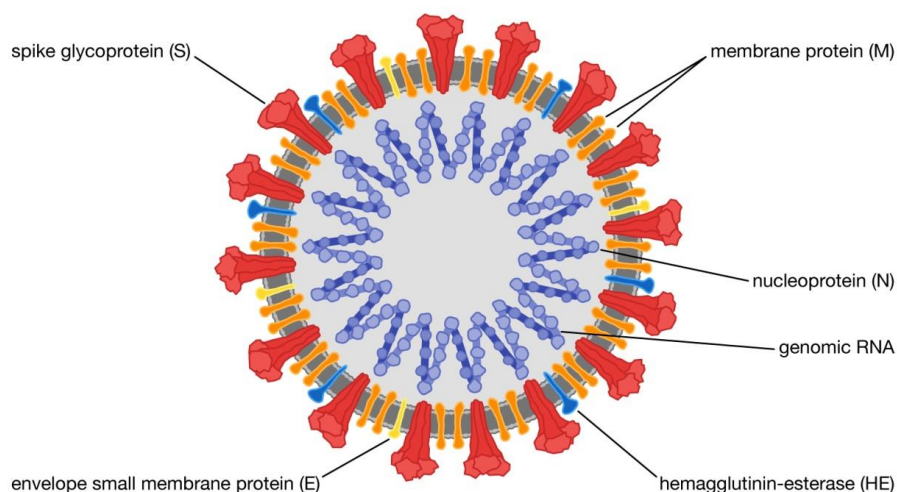
Ievads

COVID-19 infekciju izraisa SARS-CoV-2 vīruss, kurš pieder *Coronaviridae* dzimtai un *Betacoronavirus* apakšdzimtai, kurai pieder arī Tuvo Austrumu elpošanas sindroma koronavīruss (MERS-CoV) un Smagā akūtā elpošanas sindroma koronavīruss (SARS-CoV-1). SARS-CoV-2 ir ribonukleīnskābes (RNS) saturošs vīruss, 200-300 nm diametrā, ar lielāko zināmo vīrusu RNS genomu un ar molekulāro svaru no 27 līdz 32 kDa. Vīrusa genomam ir raksturīga mainība, un uz šodienu ir ģenētiski raksturotas četras genogrupas. Trīs lielākās vīrusu genogrupas ir S, G, V, un ar tām ir saistītas lielākā daļa COVID-19 saslimšanu. Ceturtajā grupā ir iedalīti retāk sastopamie vīrusa varianti. Kopumā *Coronaviridae* dzimtā ietilpst 40 vīrusi, no tiem 7 spēj inficēt cilvēkus. Četri no tiem - HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 un HCoV-HKU1 jau sen ir zināmi un izraisa ap 15% parastās sezonālās saaukstēšanās gadījumus. Trīs - MERS-CoV, SARS-CoV-1 un SARS-CoV-2 spēj izraisīt nopietnas un dzīvību apdraudošas saslimšanas un slimību uzliesmojumus, ieskaitot Covid-19 pandēmiju.

Vīrusa struktūra

SARS-CoV-2 vīrusa genoms kodē četrus strukturālos proteīnus – S (spike), E (envelope), M (membrane) un N (nucleocapsid). N proteīnu satur RNS genoms, S, E un M proteīni veido vīrusa apvalku.

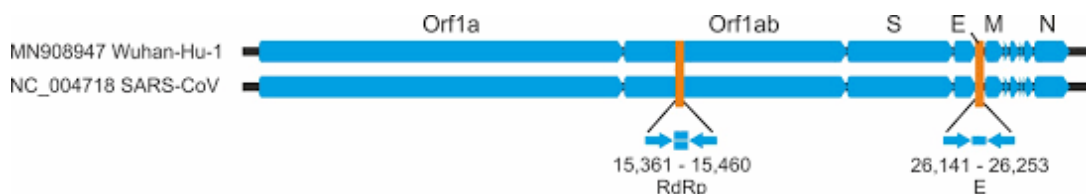
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)



© Encyclopædia Britannica, Inc.

1.att. SARS-CoV-2 vīrusa shematiskais attēls

Jaunajam koronavīrusam SARS-CoV-2 ir sekojoši diagnostiski svarīgi gēni: E gēns, kas ir kopīgs visai *Betacoronavirusu* apakšdzimtai, S gēns, RdRp gēns, kuri ieiet plašākā genoma reģionā, kuru sauc par Orf1ab un N gēns.



2. att. SARS-CoV-2 genoma shematiskais attēls - proteīnu kodējošie reģioni:

ORF - open reading frame, *RdRp*-RNA-dependent RNA polymerase, *S* - surface spike glycoprotein, *N*-nucleoprotein, *M*-membrane protein.

COVID-19 infekcijas laboratoriskā diagnostika lielā mērā ir atkarīga no diagnostisko testu konstrukcijas, to iespējas identificēt SARS-CoV-2 vīrusa raksturojošos gēnus vai specifiskās antivielas.

Molekulāri bioloģiskie izmeklējumi

Pēc Pasaules Veselības organizācijas (PVO) un Eiropas slimību kontroles centra (ECDC) rekomendācijām COVID-19 infekcijas laboratoriskās diagnostikas izvēles metode ir SARS-CoV-2 RNS noteikšana ar PĶR reālā laika (PĶR RL) metodi. Pašlaik ir pieejami gan publicētie protokoli, gan komerciālie komplekti PĶR RL metodes realizācijai. Mērķa vīrusa gēni ir augstāk tekstā minētie - E, S, RdRp un N gēni. Dažādi testēšanas protokoli un komerciālie diagnostiskie komplekti izmanto dažādus gēnus un to kombinācijas. Atbilstoši PVO rekomendācijām, lai apstiprinātu SARS-CoV-2 vīrusa RNS klātbūtni reģionos ar zemu COVID-19 infekcijas izplatību, nepieciešams pierādīt vismaz divus jaunam koronavīrusam specifiskus gēnus, un par vienu no tiem var uzskatīt β -koronavīrusiem kopīgo E gēnu, jo pašreiz citi SARS-līdzīgie vīrusi necirkulē.

Starp komerciāliem komplektiem ir komplekti, kas ir paredzēti lielas paraugu plūsmas izmeklēšanai – no 24 līdz 100 paraugiem vienlaicīgi. Šādos gadījumos izmeklēšanas ilgums ir 3 ½ -6 stundas. Izmeklēšana var būt manuāla vai pilnīgi automatizēta - RNS/DNS izdalīšana un PĶR RL reakcijas veikšana. Ir pieejami komerciālie komplekti ātrai testēšanai, un šādos gadījumos testēšanas ilgums ir 45-60 min. Testēšana ir pilnīgi automatizēta un tā tiek pielietota nelielai paraugu plūsmai, vienlaicīgi izmeklējot 1-4 paraugus. Pašlaik pieejamiem komerciāliem komplektiem, kas paredzēti gan lielai, gan nelielai paraugu plūsmai, it īpaši pilnīgi automatizētām versijām, ir augsts jutīgums un specifiskums.

Testēšanas procesa organizēšana

Rekomendē izmantot divu posmu testēšanas algoritmu: primārās izmeklēšanas testu izmanto viena gēna identifikācijai, piemēram, tikai E, RdRp vai N gēna, apstiprinošai diagnostikai veic vismaz vēl viena gēna atklāšanu. Var veikt izmeklēšanu uz diviem vai

vairākiem gēniem, un rezultāti tiek uzskatīti par pozitīviem tikai tad, ja ir atklāti visi gēni vai noteikta gēnu kombinācija. Ja tāda gēnu kombinācija nav atklāta, rezultātus interpretē kā apšaubāmus vai negatīvus.

Lai saskaņotu apstiprinošās diagnostikas kārtību laboratorijām, uzsākot molekulāri bioloģisko testēšanu uz SARS-CoV-2 vīrusa RNS klātbūtni, par to jāinformē Nacionālā mikrobioloģijas references laboratorija (turpmāk - References laboratorija). Laboratorijām jābūt liecībām par pozitīvo rezultātu augstu reproducējamību, lai uzskatītu, ka divu specifisku gēnu atklāšana vienā testā ir pietiekoša SARS-CoV-2 RNS pierādīšanai. Tas nozīmē, ka ir nepieciešama noteiktas paraugu grupas pārtestēšana ar identisku rezultātu iegūšanu. Ja laboratorijai pašai ir resursi veikt apstiprinošo diagnostiku, tai jāsūta references testēšanai vismaz pirmie 10 apstiprinātie paraugi. Nosūtījumā obligāti jānorāda, ar kādu testu/protokolu tika veikta testēšana un kādi gēni tika atklāti. Turpmāk laboratorijai nepieciešams regulāri veikt noteiktas pozitīvo paraugu grupas pārtestēšanu, vēlams, izmantojot citu protokolu vai komerciālo komplektu. Ja laboratorijai rodas šaubas par protokola vai komerciāla komplekta rezultātu labu reproducējamību, nepieciešams veikt katra pozitīvā rezultāta pārtestēšanu.

Paraugu pārtestēšana pozitīva rezultāta apstiprināšanai ir nepieciešama vismaz šādos gadījumos:

atbilstoši komerciālā komplekta instrukcijas norādījumiem
ja pozitīvais rezultāts ir ar augstu sliekšņa robežu Ct (<i>cycle threshold</i>) ≥ 35 (ja komplekta instrukcijā nav paredzēta cita augsta Ct robeža)
ja ir aizdomas par kontamināciju
ja ir atklāts tikai viens specifiskais gēns personai, kurai diagnoze nebija iepriekš laboratoriski apstiprināta

Paraugu pārtestēšanai rekomendēts izmantot atkārtotu RNS izdalīšanu no oriģinālā arhivētā parauga. Ir pieņemama iepriekš izdalītā RNS pārtestēšana.

Iemesli viltus negatīviem rezultātiem un rezultātiem ar augstu Ct vai pozitīvu rezultātu tikai uz vienu gēnu, var būt dažādi:

mērķa RNS koncentrācija ir tuvu vai zem protokola detekcijas robežas; tā var būt inficēšanās agrīnajā vai rekonvalescences stadijā, kā arī nepareiza parauga paņemšana vai uzglabāšana
mutācija/-as mērķa RNS reģionā
kļūdas metodes izpildījumā; lai sekotu protokola izpildes kvalitātei, vēlams izmantot ne tikai mērķa RNS specifisku pozitīvo kontroli un negatīvo kontroli katrā testēšanas reizē, bet izmantot katru klīnisko paraugu kopā ar iekšējo kontroli gan amplifikācijas, gan arī RNS izdalīšanas posmā

Viens vai vairāki negatīvi rezultāti, it sevišķi augšējo elpceļu iztriepes izmeklēšanas rezultāti, neizslēdz COVID-19 infekciju. Rezultātu klīniskajā interpretācijā nepieciešams ņemt vērā iespējamo inficēšanās laiku, klīnisko simptomu parādīšanos, epidemioloģisko informāciju, kā arī izmeklējamā materiāla veidu, paraugu kvalitāti.

Ja negatīvs rezultāts tiek iegūts no pacienta ar pamatotām aizdomām par SARS-CoV-2 vīrusa infekciju, papildus augšējo elpceļu paraugiem, ir jāņem paraugi arī no apakšējiem elpceļiem un testēšana jāatkārto.

Dažādās COVID-19 infekcijas stadijās var būt atklāti dažādi vīrusa gēni vai tikai viens gēns. Pozitīvo rezultātu prognostiskā nozīme gadījumos, kad ir noteikts tikai viens specifiskais gēns, pieaug, pieaugot infekcijas izplatībai.

Visos gadījumos, kad laboratorijai rodas šaubas par iegūto testēšanas rezultātu, vai ir pieejams tikai viens protokols, kas nedod pietiekošu pārliecību par pārtestēšanas rezultāta prognostisko nozīmi, rekomendēts sūtīt paraugus apstiprinošai testēšanai uz References laboratoriju.

Svarīgs molekulāri bioloģiskās izmeklēšanas posms ir RNS/DNS izolācija. Darbus ar natīviem klīniskiem paraugiem obligāti jāveic II. klases laminārās plūsmas biodrošības skapjos. Paraugu inaktivācija ar termisko apstrādi pirms RNS/DNS izdalīšanas nav rekomendēta.

SARS-CoV-2 vīrusa sekvenēšana

Sekvenēšanas metodes rekomendē pielietot Covid-19 infekcijas neskaidru vai smagu klīnisko gadījumu izmeklēšanā, kā arī nāves gadījumu izmeklēšanā. Sekvenēšana var būt izmantojama atsevišķu pozitīvo rezultātu apstiprināšanai. Tāda pieeja ir it sevišķi aktuāla sakarā ar vīrusa mainīgumu – mutāciju parādīšanos, kas var provocēt vāji pozitīvu vai viltus negatīvu PQR RL testēšanas rezultātu.

Jauno mutāciju parādīšanās izsekojamības nodrošināšanai, tiek rekomendēta regulāra noteiktas klīnisko paraugu grupas izmeklēšana ar sekvenēšanas metodēm. Tiek pielietota Sangera sekvenēšanas metode, pilna genoma sekvenēšana vai šo metožu kombinācijas.

Sekvenēšanas metodes pielieto molekulāri epidemioloģiskiem izmeklējumiem vīrusa izplatīšanās ceļu un radniecības noteikšanai dažādos reģionos, kā arī vīrusa izplatībā dažādu populāciju grupās un intrahospitālās infekcijas gadījumu atšifrēšanai.

Seroloģiskie izmeklējumi

Pieejamie literatūras dati par antivielu veidošanās procesu pret SARS-CoV-2 vēl joprojām ir pretrunīgi. Lielākā daļa autoru uzskata, ka IgA klases antivielas sāk parādīties 2.-5. dienā pēc simptomu parādīšanās, IgM klases antivielas sāk veidoties 5.-6. dienā pēc simptomu parādīšanās. IgA un IgM antivielu noteikšana ir piemērota imūnās atbildes attīstības monitoringam vai kā papildus diagnostiskais tests pacientiem, kuriem ir pozitīvs RNS tests. IgM un IgA testus nerekomendē asimptomātisku personu skrīningam. Specifiskāku IgG klases antivielu titra pieaugums sākas ar otro nedēļu pēc simptomu parādīšanās. Antivielu diagnostikā seroloģisko testu rezultātiem lielāks nozīmīgums ir, ja tiek izmeklēti pacienta pārasins paraugi: viens, kas paņemts slimības akūtās fāzes periodā (pirmajā slimības nedēļā), un otrs atveseļošanās fāzes periodā (3 vai 4 nedēļas vēlāk pēc pirmā parauga paņemšanas). Imūnā atbilde uz SARS-CoV-2 ir variabla, un ir iespējamās krusteniskas reakcijas ar citiem vīrusiem, pirmkārt, ar citiem koronavīrusiem.

Ņemot vērā pretrunīgos datus un vēl neizpētītos jautājumus par antivielu veidošanos, **PVO pašlaik nerekomendē izmantot seroloģiskos testus klīniskai diagnostikai.** Seroloģiskiem testiem ir sava loma Covid-19 infekcijas retrospektīvai diagnostikai, saslimstības intensitātes un populācijas imunitātes noteikšanai, kā arī gadījumos, kad ir negatīvs RNS tests, un ir cieša epidemioloģiskā saikne ar Covid-19 infekciju.

Pašlaik ir pieejami daudzi komerciāli ELISA un ātrie imūnhromotogrāfijas testi IgA, IgM un IgG klases antivielu noteikšanai. Izvēloties seroloģiskos testus, pirmkārt, ir nepieciešams pievērst uzmanību testu jutīgumam un specifiskumam. Testu specifiskumu lielā mērā nosaka ražotāja izmantotie SARS-CoV-2 vīrusa antigēni. Piemēram, vieni no specifiskajiem skaitās antigēni, kas satur N proteīnu, jo tas ir vīrusa genoma sastāvā, vai S1 un S2 proteīni, jo tie ir atbildīgi par vīrusa iekļūšanu saimnieka šūnā.

Pasūtītājs jābrīdina par iespējamām krusteniskām reakcijām un zemiem jutīguma un specifiskuma rādītājiem, kas var ietekmēt izmeklēšanu un dot gan viltus negatīvus, gan viltus pozitīvus rezultātus. Krusteniskās reakcijas visbiežāk var izraisīt citu koronavīrusu ierosinātas infekcijas. Rekomendē izmantot test-sistēmas ar CE-IVD marķējumu.

Diagnostisko testu jutīgums ir atkarīgs no tā, kurā slimības dienā tiek savākts asins paraugs testēšanai. IgG klases antivielu noteikšanas testu jutīgums var svārstīties no 40% 6.-8. dienā pēc simptomu parādīšanās, līdz 100% 12. dienā pēc simptomu parādīšanās. Lielākajai daļai pašlaik pieejamo testu IgA un IgM klases antivielu noteikšanas, testu jutīgums var svārstīties no 20% 6.-8. dienā pēc simptomu parādīšanās, 30% 9.-11. dienā pēc simptomu parādīšanās un 58-70% no 12. dienas pēc simptomu parādīšanās.

1.tabula. Antivielu testa jutīgums, atkarībā no saslimšanas dienas

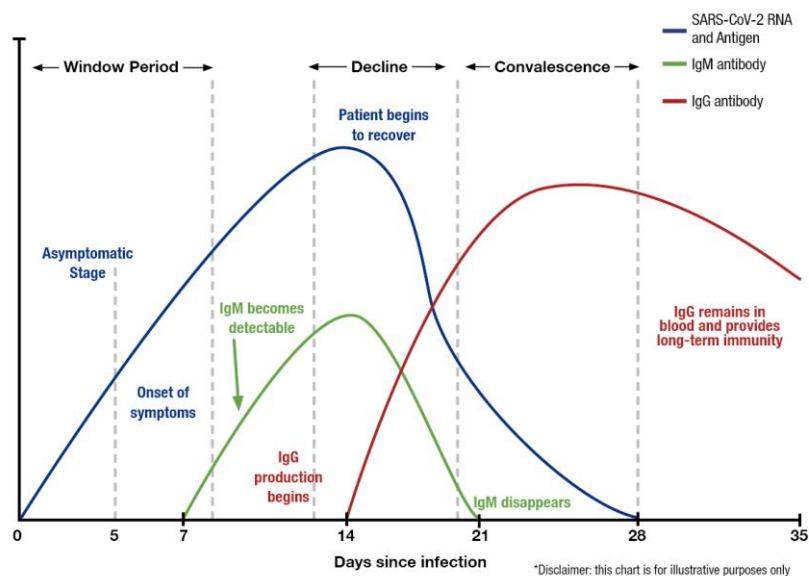
Diena pēc simptomu parādīšanās	IgM/IgA	IgG
	Jutīgums (%)	
6.-8.	20%	40%
9.-11.	30%	85%
pēc 12.	58-70%	līdz 100%
	Specifiskums (%)	
	94.0-99.8%	95.8-99.9%

References laboratorija, veicot seroloģiskos izmeklējumus IgM un IgG klases antivielu noteikšanai ar testa jutīgumu un specifiskumu, kas minēti 1. tabulā, ir ieguvusi sekojošus rezultātus:

2.tabula. References laboratorijas iegūtie rezultāti IgM un IgG noteikšanai

Izmeklējamā grupa	Izmeklējumu skaits	IgM pozitīvo izmeklējumu skaits	IgG pozitīvo izmeklējumu skaits
Pacienti, kam tika apstiprināta Covid-19 infekcija (SARS-CoV-2 RNS pozitīvs)	34	32%	76%
Sociālās riska grupas personas, visiem SARS-CoV-2 RNS negatīvs, ciešs kontakts ar Covid-19 apstiprinātām personām	41	4% robežvērtības rezultāti	49%
Medicīnas darbinieki, kuri piedalījās Covid-19 inficēto pacientu aprūpē un SARS-CoV-2 RNS pozitīvo paraugu izmeklēšanā	50	AV nav atklātas	AV nav atklātas

Seroloģiskai diagnostikai PVO rekomendē izmantot augsti jutīgus un specifiskus (98-99%) ELISA testus IgG klases antivielu noteikšanai, it īpaši, ja ir pierādīta Covid -19 infekcija ar molekulāri bioloģiskiem testiem. Pozitīvie rezultāti var liecināt par imunitātes veidošanos. Tomēr negatīvi rezultāti neliecina par to, ka pacients nav bijis saskarē ar Covid -19 infekcijas ierosinātāju, jo ir pierādīts, ka daļai pacientu IgG antivielas neveidojas, piemēram, imūnās sistēmas darbības traucējumu gadījumos, imūnsupresīviem pacientiem. Netiek rekomendēts izmantot IgM klases antivielu noteikšanas testus akūtas infekcijas stadijas diagnosticēšanai, kas saistīts ar pašlaik pieejamo testu zemo jutīgumu un specifiskumu, kā arī vēl neizpētīto antivielu rašanās laiku.



3. att. SARS-CoV-2 RNS, Ag, IgM un IgG līmeņa dinamiskās izmaiņas

Joprojām notiek pētījumi par donoru konvalescentās plazmas ar Covid-19 antivielām sagatavošanu un to pielietošanu ārstēšanā pacientiem ar smagu vai vidēji smagu slimības gaitu. Veicot asins un asins komponentu donoru atlasi ir nepieciešams noteikt SARS-CoV-2 vīrusa neitralizējošo antivielu titru ar neitralizācijas reakciju, kas ir saistīts ar SARS-CoV-2 vīrusa pavairošanu. Sakarā ar strauju vīrusa mutāciju, biodrošības apsvērumu dēļ, vīrusa pavairošana nav ieteicama. Tāpēc tiek meklēti citi risinājumi, konvalescentās plazmas izmeklēšanai, piemēram, kvantitatīva IgG klases antivielu noteikšana donora asinīs.

Patlaban vairākās Eiropas valstīs ir uzsākti vairāki seroepidemioloģiskie pētījumi. Pēc mums pieejamās informācijas primārie pētījumi ir veikti Somijā, Vācijā un Nīderlandē, to valsts iedzīvotāju populācijā. Iegūtie rezultāti norāda uz zemu antivielu serokonversiju - Somijā 3,4% no 147 izmeklētiem gadījumiem, Nīderlandē – 3,6% no 2100 izmeklētajiem, Vācijā 14% no 500 izmeklētajiem.

Seroepidemioloģiskie pētījumi tiek turpināti un iegūtie rezultāti palīdzēs labāk izprast Covid-19 infekcijas izplatību un prognozēt epidēmijas plašumu un ilgumu.

Covid – 19 inficēto pacientu klīniskā stāvokļa smaguma novērtēšanai rekomendē arī agrīno iekaisuma marķieru noteikšanu. Vairāki pētījumi ir norādījuši uz tā saukto “citokīnu vētru” ar pastiprināto IL-6, IL-1, IL-12 un IL-18 izdalīšanos. Ir nozīme arī citu iekaisuma marķieru noteikšanai – piemēram, CRO, PCT, d-dimēri. Ar to saista paaugstinātu plaušu iekaisuma reakciju, kas apgrūtina skābekļa apmaiņu plaušās pacientiem ar smagu Covid-19 infekciju.

Covid-19 infekcijas diagnostikai izmantojamais izmeklējamais materiāls

Viens no pamatnosacījumiem veiksmīgai laboratoriskai diagnostikai ir kvalitatīva bioloģiskā materiāla noņemšana un ātra tā nogādāšana laboratorijai.

Sekojošā PVO rekomendācijām, SARS-CoV-2 diagnostikai izmanto:

- augšējo elpceļu trakta paraugus - nazofaringiālā un orofaringiālā iztriepe ambulatoriem pacientiem;
- dziļo elpceļu trakta paraugus - krēpas un/vai traheālais aspirāts smagiem pacientiem.

Diferenciālai diagnostikai ar citiem respiratoriem patogēniem noņem atsevišķu augšējo elpceļu trakta paraugu. Paraugu transportēšanai var izmantot speciālās vīrusu un to RNS/DNS stabilizējošās barotnes – komerciālas vai sagatavotas References laboratorijā. Paraugu glābā un transportē pie 2-8°C 24-48 st. laikā.

Seroloģiskai diagnostikai izmanto venozās asinis bez antikoagulanta vai asins serumu.

Pacienta nāves gadījumā ir rekomendēts izmeklēt autopsijas materiālus. Vispiemērotākais autopsijas materiāls COVID-19 infekcijas laboratoriskai diagnostikai ir materiāls no dziļajiem elpceļiem, jo tas satur lielu vīrusa daudzumu. Kopā ar materiālu no dziļajiem elpceļiem ir rekomendēts izmantot arī augšējo elpceļu materiālus. Laboratoriskai izmeklēšanai pielieto RĶR RL metodi SARS-CoV-2 RNS noteikšanai.

Ja autopsijas materiāls tiek noņemts **pie aizdomām** par COVID-19 infekciju, rekomendē izmeklēt:

- pēc nāves, augšējo elpceļu uztriepe - nazofaringeālā uztriepe;
- dziļo elpceļu uztriepe - iztriepe no katras plaušas izdalījumiem;
- plaušas, trahejas gabaliņus no vietas ar vīrusinfekcijai raksturīgo bojājumu;
- atsevišķu uztriepi noņem testēšanai uz citiem respiratoriem patogēniem.

Ja autopsijas materiāls tiks noņemts COVID-19 **apstiprinātai infekcijai**, rekomendē izmeklēt:

- pēc nāves augšējo elpceļu uztriepe, plaušas, trahejas gabaliņu u.c. citus respiratoro patogēnu izmeklējumus.

Plaušas gabaliņu ievieto sterilā stobriņā ar vīrusa transporta barotni, ja tas nav pieejams, izmanto stobriņu ar sterilu fizioloģisko šķīdumu. Paraugu glabā un transportē pie 2-8°C 4 st. laikā. Transportē konteinerā kā bīstamo materiālu.

Plaušu izdalījumu iztriepi ņem ar sterilu tamponu un ievieto transporta barotnē. Paraugu glabā pie 2-8°C līdz 24 st. Transportē konteinerā kā bīstamo materiālu.

Nazofaringeālo iztriepi ņem no abām deguna ejām, tamponu pēc noņemšanas ievieto vīrusu transporta barotnē. Paraugu glabā un transportē pie 2-8°C 24 st. laikā. Transportē konteinerā kā bīstamo materiālu.

3.tabula. Izmeklējamais materiāls

Parauga veids	Parauga savākšanas ierīce/konteiners	Transportēšanas/ glabāšanas līdz testēšanai nosacījumi	Piezīmes
Nazofaringeālā un orofaringeālā iztriepe/RT-PQR	Lokana zonde ar tamponu (dakrona, poliestera vai ekvivalentu; neizmanto kokvilnas un kalcija algināta tamponus!)	+2-8°C / 24-48st.	Iztriepes ievietot vienā stobriņā ar sterilu transporta barotni molekulāri bioloģiskiem izmeklējumiem
Rīkles gala un deguna eju iztriepe stobriņā ar sterilu transporta barotni kopā ar tamponiem/RT-PQR	Zonde ar tamponu (dakrona, poliestera vai ekvivalentu; neizmanto kokvilnas un kalcija algināta tamponus!)	+2-8°C / 24-48st.	Iztriepes ievietot vienā stobriņā ar sterilu transporta barotni molekulāri bioloģiskiem izmeklējumiem
Bronhoalveolārā lavāža, traheālais aspirāts/RT-PI	Sterilais trauks ar aizskrūvējamu vāciņu	+2-8°C / 24.st.	
Krēpas/RT-PQR	Sterilais trauks ar aizskrūvējamu vāciņu	+2-8°C / 24 st.	Pārliecināties, ka materiāls ir ņemts no apakšējiem elpošanas ceļiem
Biopsijas vai autopsijas materiāli: plaušu izdalījumu iztriepes; pēc nāves nazofaringeālo iztriepes; plaušas trahejas biopsijas /RT-PQR	Stobriņš ar sterilu transporta barotni * vai sterilais trauks ar aizskrūvējamu vāciņu	2-8°C /24.st	
Venozas asinis bez antikoagulanta vai asins serums/ ELISA	Asins noņemšanas slēgtās sistēmas bez antikoagulanta (3-5ml pilns asinis), vai serums sterilā plastmasas stobrā ar aizskrūvējamu vāciņu 2-3ml	18°C līdz +25°C ne ilgāk par 12 stundām vai temperatūrā +4°C līdz +8°C ne ilgāk par 24 stundām	Vēlāk par 24 st. Jāatdala serums vai plazma no eritrocītiem un tad var uzglabāt līdz transportēšanai temperatūrā +4°C līdz +8°C no 7-10 dienām

Biodrošība

Vīrusa SARS-CoV-2 laboratoriskā diagnostika jāveic atbilstoši aprīkotās laboratorijās, personālam jābūt apmācītam biodrošības jautājumos. Visos apstākļos jāievēro valsts vadlīnijas par laboratorijas bioloģisko drošību.

Ar vīrusa pavairošanu nesaistītas laboratoriskās darbības un polimerāzes ķēdes reakcijas ar klīniskiem paraugiem, kas ņemti pacientam ar aizdomām vai apstiprinātu COVID-19 vīrusinfekciju, notiek BSL-2 apstākļos, ievērojot standarta medicīnas laboratoriju biodrošības pasākumus. Šādos apstākļos veic:

- pilnas asins, seruma un asins plazmas diagnostiku, ieskaitot hematoloģiskās un bioķīmiskās analīzes,
- inaktivētu paraugu testēšanu ar molekulārās bioloģijas metodēm,
- bakteriālo un sēņu kultūru apskati,
- fiksētu uztriepju krāsošanu un mikroskopiju.

Tomēr visas iespējamās manipulācijas ar potenciāli infekciozu materiālu, kur var rasties vai veidoties šļakatas, pilieni vai aerosols (enerģiska kratīšana, sajaukšana un citas procedūras) jāveic pārbaudītos II. klases laminārās plūsmas biodrošības skapjos:

- paraugu sagatavošanu molekulārajai testēšanai, piemēram, respiratoro vīrusu PĶR pirms parauga inaktivēšanas,
- ne-inaktivētu respiratorā trakta paraugu, izkārnījumu, urīna paraugu sadalīšanu nelielos daudzumos, atšķaidīšanu vai pārliešanu,
- potenciāli SARS-CoV-2 vīrusa saturoša materiāla izmeklēšana citu ierosinātāju noteikšanai (piemēram *Legionella pneumophila* vai *Streptococcus pneumoniae* antigēna noteikšana urīnā),
- darbības ar ne-inaktivētu paraugu, kur var veidoties aerosols,
- natīvā materiāla uztriepju sagatavošanu un fiksēšanu.

Darbs ar SARS-CoV-2 vīrusa izolēšanu un pavairošanu audu kultūrā notiek BSL-3 apstākļos, ievērojot un izpildot trešā biodrošības līmeņa prasības!

Bioloģiski bīstamo aģentu iznīcināšana

Virsmu, laboratorijas trauku, instrumentu dezinfekcijai izmanto dezinfekcijas līdzekļus ar pierādītu aktivitāti pret apvalkotajiem RNS vīrusiem, tādus kā - 0.1% nātrija hipohlorīta šķīdums, 62-71% spirta šķīdums vai 0.5% ūdeņraža peroksīda šķīdums. Jāievēro pielietotā dezinfekcijas līdzekļa ražotāja instrukcijas par dezinfekcijas līdzekļa atšķaidīšanu, iedarbības laiku un uzglabāšanas prasības.

Laboratorijas atkritumus iznīcina atbilstoši iestāžu un valsts noteiktajām procedūrām, ievērojot tādas pašas prasības kā ar citiem bīstamajiem bioloģiskajiem atkritumiem. Nav pierādījumu, kas liecinātu, ka šiem laboratorijas atkritumiem būtu vajadzīgas papildus iepakšanas vai dezinfekcijas procedūras.

Ir pamats domāt, ka automātisko analizatoru atkritumi varētu radīt ievērojamu risku mazā parauga tilpuma un paraugu atšķaidīšanas posmu dēļ. Tādēļ automātisko analizatoru atkritumu apstrādi nerekomendē.

Paraugu iepakšana un transportēšana



Pacienta materiāla paraugu, ar apstiprinātu COVID-19 vīrusinfekciju vai aizdomām par to, transportē *Class 6.2.* transportēšanas konteinerā, marķē kā *UN3373, Biological Substance Category B.*

Individuālie aizsardzības līdzekļi

COVID-19 infekciju izraisošais koronavīruss, galvenokārt, izplatās:

- tieši kontaktējoties ar inficētu personu;
- sīku pilienu veidā, kas rodas inficētajai personai runājot, šķaudot vai klepojot;
- tieši pieskaroties inficētai personai;
- netieša kontakta ceļā, pieskaroties virsmām un priekšmetiem, kam pieskārusies inficētā persona (piemēram, durvju rokturiem).

4.tabula. Laboratorijas personāls lieto šādus individuālos aizsardzības līdzekļus (IAL)

Ieteiktais IAL	IAL attēls	Apraksts
Cimdi		Roku aizsardzībai, darbam ar apstiprinātu COVID-19 vīrusinfekciju vai aizdomām par to
Virsvalks ar garām piedurknēm		Ķermeņa aizsardzībai, garš, ūdensnecaurlaidīgs halāts. Halātam nav obligāti jābūt sterilam.

Brilles vai sejas vizieris (sejas sargs)



FFP2 vai FFP3 maska - respirators



Acu aizsardzībai, novērš vīrusa nokļūšanu acu gļotādā. Brilles un sejas vizieris regulējams.

Elpošanas trakta aizsardzībai, pasargā no sīku pilieni vai daļiņu ieelpošanas.

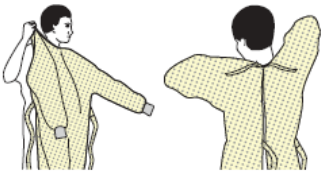


Maska - respirators FFP3 jāizmanto aerosolu veidojošās darbībās!

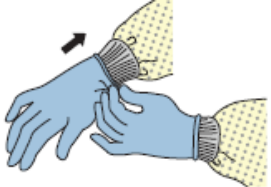
Individuālo aizsardzības līdzekļu uzvilšanas kārtība

Ievērot sekojošas darbības:

- pēc iespējas mazāk pieskarties sejai;
- pēc iespējas mazāk pieskarties dažādām virsmām;
- mainīt cimdus, ja tie ir saplīsuši vai kontaminēti;
- veikt roku mazgāšanu vai dezinfekciju pirms IAL uzvilšanas.

5.tabula. Individuālo aizsardzības līdzekļu uzvilšanas kārtība

1.Uzvilkt atbilstoša izmēra halātu ar garām piedurknēm vai ķirurģisko halātu	
2.Uzvilkt masku-respiratoru FFP2 vai FFP3	
3.Uzvilkt sejas sargu vai brilles	

<p>4.Uzvilkt atbilstoša izmēra cimdus Cimdiem jāpārklāj halāta piedurknes</p>	
--	--

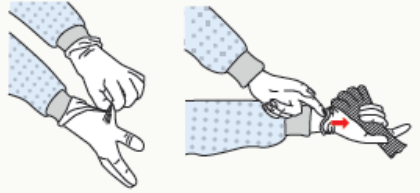




Aerosolu ģenerējošas darbības izpildīt II. klases laminārās plūsmas biodrošības skapjos atbilstoši apģērbtam!

Individuālo aizsardzības līdzekļu novilkšanas kārtība

Ievērot sekojošas darbības:

- IAL novilkt noteiktā secībā;
- novilkt cimdus, ķirurģisko halātu un sejas aizsargu vai brilles darba zonā;
- **atcerēties, ka IAL virspuse var būt kontaminēta!**
- mazgāt vai dezinficēt rokas pēc IAL novilkšanas.

6.tabula. Individuālo aizsardzības līdzekļu novilkšanas kārtība

<p>1.Novilkt cimdus</p>	
<p>2.Pēc cimdu novilkšanas, mazgāt rokas!</p>	
<p>3.Novilkt ķirurģisko halātu</p>	
<p>4. Novilkt brilles vai sejas sargu</p>	
<p>5.Novilkt masku-respiratoru FFP2 vai FFP3. Masku-respiratoru novilkt tīrajā zonā</p>	

PĒC novilkšanas IAL ievieto utilizācijas maisā ar „*Biohazard*” zīmi un maisu no ārpusē dezinficē ar virsmu dezinfekcijas līdzekli vai spirtu saturošās dezinfekcijas salvetēm. Pēc dezinfekcijas pilno utilizācijas maisu aiznes uz atkritumu telpu.

Informācija par izmantojamām veidlapām nosūtījumiem uz SARS-CoV-2 vīrusa noteikšanu un diferciāldiagnostiku ir atrodama RAKUS (aslimnica) mājaslapā <https://www.aslimnica.lv/lv/saturs/nacionala-mikrobiologijas-references-laboratorija>

Atsauces

1. Greenberg, S.B., Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. Semin Respir Crit Care Med, 2016. 37(4): p. 555-71.
2. Collection and Submission of Postmortem Specimens from Deceased Persons with Known or Suspected COVID-19, April 2020. CDC, Atlanta, USA.
3. Interleukin-6 as a potential biomarker of COVID-19 progression, Z.S. Ulhaq, G. V. Soraya, Med Mal Infect. 2020 Apr 4, doi: [10.1016/j.medmal.2020.04.002](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2020.04.002).
4. Summary of probable SARS cases with onset of illness from 1 November 2002 to 31 July 2003., 26. Wang, C., et al., A novel coronavirus outbreak of global health concern. Lancet, 2020. 395(10223): p. 470-473.
5. <http://www.diazyme.com/covid-19-antibody-tests>.
6. <https://gisaid.org/hcov-19-analysis-update>.
7. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2.
8. “Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19, WHO.08.april”. Iegūts no <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>.
9. Centers for Disease Control and Prevention „Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 31 March 2020. Iegūts no <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/lab-biosafety-guidelines.html>.
10. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. Interim guidance 28.01.2020., WHO. Iegūts no [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratory-infection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected).

11. Coronavirus disease (COVID-19) technical guidance: The Unity Studies: Early Investigations Protocols. WHO, 2020. Iegūts no <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/early-investigations>.
12. ECDC Technical Report „Guidance for wearing and removing personal protective equipment in healthcare settings for the care of patients with suspected or confirmed COVID-19”, February 2020. Iegūts no <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/guidance-wearing-and-removing-personal-protective-equipment-healthcare-settings>.
13. Hyukmin Lee, M.D., Cheon Kwon Yoo, Ph.D. and team of authors “Guidelines for Laboratory Diagnosis of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in Korea” Article in Annals of Laboratory Medicine · March 2020. Iegūts no <https://doi.org/10.3343/alm.2020.40.5.351>.
14. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-2CoV) in suspected human cases, Interim guidance, WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.3. Iegūts no <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/laboratory-diagnostics-for-novel-coronavirus>.
15. Laboratory testing strategy recommendations for COVID-19: interim guidance 21 March 2020. Iegūts no <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-strategy-recommendations-for-covid-19-interim-guidance>.
16. Laboratory testing of suspect cases of 2019 nCoV using RT-PCR, 16.01.2020. Iegūts no <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/laboratory-testing-suspect-cases-2019-ncov-using-rt-pcr>.
17. Padhi A., Kumar S., Gupta E., Saxena S.K. (2020) Laboratory Diagnosis of Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Infection. In: Saxena S. (eds) Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control. Springer, Singapore, First Online 30 April 2020. Iegūts no https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-4814-7_9.
18. Public Health England guidance „COVID-19: safe handling and procesing for samples in laboratories”, 25 April 2020. Iegūts no <https://www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-guidance-for-clinical-diagnostic-laboratories/wuhan-novel-coronavirus-handling-and-processing-of-laboratory-specimens>.
19. Victor M Corman et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR, Euro Surveill. 2020 Jan 23; 25(3): 2000045. Iegūts no <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6988269/>.
20. World Health Organisation Interim guidance „Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease (COVID-19), 19 March 2020. Iegūts no [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)).