



Popri prebiehajúcej pandémie virózy COVID-19 s klinicky podobnými symptómami (akútne respiračné ochorenie) a čiastočne aj podobnými epidemiologickými charakteristikami (kvapôčkovo prenášaná infekcia, pôvodne antropozoonóza šíriaca sa ďalej interhumánnym prenosom) zostáva chrípka jednou z najväčších výziev v oblasti verejného zdravia na svete.

## Využitie cobas® Liat® System v diagnostike chrípky

J. PREDNÝ<sup>1</sup>, M. DUBINOVÁ<sup>1</sup>, M. STRAKA<sup>1</sup>, A. LONGAUEROVÁ<sup>1</sup>,  
A. KRAJČÍKOVÁ<sup>1</sup>, V. CUCAK<sup>2</sup>, M. NOVOTNÝ<sup>4</sup>, P. JARČUŠKA<sup>4</sup>,  
K. VLČKOVÁ<sup>3</sup>, A. LIPTÁKOVÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK;

<sup>2</sup> Roche Slovensko s.r.o, Bratislava, SK; <sup>3</sup> I. Interná klinika, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK; <sup>4</sup> Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika a Univerzitetnej nemocnice L. Pasteura, Košice, SK

Tzv. „Španielska chrípka“, spôsobená vírusom chrípky A (subtypom H1N1) zo začiatku 20. storočia s takmer 50 miliónmi odhadovaných obetí na ľudských životoch zostáva reálnym príkladom katastrofickej pandémie bez možnosti efektívnej intervencie zo strany ľudstva v tej dobe. Najväčšia mortalita v nej postihovala predovšetkým kohorty malých detí, ale aj seniorov (Taubenberger JK., 2006). Situácia s celosvetovým šírením pandemických kmeňov chrípky typu A sa opakovala aj v ďalších desaťročiach

(chrípka ázijská, hongkongska, ruská, vtáčia), naposledy v roku 2009 to bola pandémia tzv. „prasacej chrípky“ (takisto subtyp H1N1) (Fitzgerald DA., 2009). Podobne ako je to pri vážnom priebehu COVID-19, obeť infekcie pandemickými kmeňmi chrípky zomierajú najčastejšie na ťažký zápal pľúc sprevádzaný masívnou „cytokínovou búrkou“ ako pri sepe. Okrem globálneho šírenia pandemických kmeňov vírusu typu A, ktoré sa objavujú sporadicky a bez sezonality, prebiehajú každoročne sezónne epidémie chrípky vyvolávané vírusmi oboch typov A a B. Vznikajú v chladných mesiacoch roka a ohrozujú predovšetkým seniorov a osoby so zníženou imunitou, pokiaľ neboli včas zaočkované aktuálnou vakcínou. Aj toto ochorenie môže mať vážny priebeh. WHO odhaduje, že každý rok sa globálne objaví až 1 miliarda prípadov ochorenia vyvolaných vírusmi chrípky. Asi 5 miliónov z nich sú závažné prípady, ktoré vedú k 290 000 až 650 000 úmrtiam

### Prístroj



Kompaktný a prenosný PCR systém určený pre testovanie v miestach starostlivosti o pacienta

### Diagnostická súprava



Flexibilná jednorázová zkušovacia trubica o veľkosti tužky obsahuje všetky analytické činidlá – iba sa aplikuje vzorek

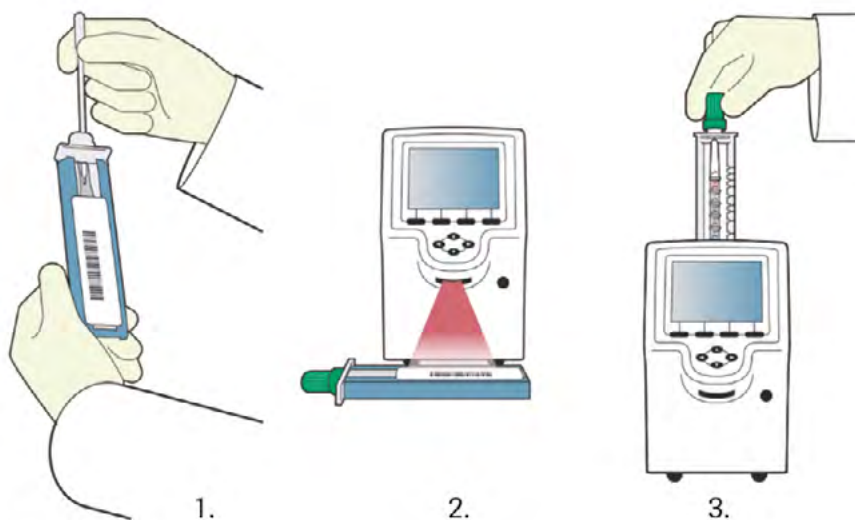
### Testy

- Flu A  
Flu B
- Flu A,  
Flu B,  
RSV
- *C. diff*
- Strep A

▲ Obr. č. 1: cobas® Liat® System



▲ Obr. č. 2: Odber nazofaryngeálneho výteru



▲ Obr. č. 3: Príprava vzorky na diagnostiku pomocou cobas® Liat® System. 1. nanosenie eluátu vzorky do súpravy, 2. identifikácia súpravy so vzorkou, 3. vloženie diagnostickej súpravy s nanosenou vzorkou do prístroja

súvisiacim s respiračným postihnutím v dôsledku ťažkého priebehu chrípky (WHO, 2019). Nová stratégia, ktorú vyvinula WHO pre chrípku, platí vo veľkej miere aj pre COVID-19. Má dva hlavné ciele:

1. Vybudovať silnejšie kapacity každej krajiny na sledovanie a manažment choroby, prevenciu, kontrolu a pripravenosť. Na dosiahnutie tohto cieľa žiada, aby každá krajina mala prispôbený chrípkový program, ktorý prispieva k národnej a globálnej pripravenosti a zdravotnej bezpečnosti.
2. Vyvinúť lepšie nástroje na prevenciu, odhaľovanie, kontrolu a liečbu chrípky, ako sú účinnejšie vakcíny, antivirotiká a liečbu, s cieľom ich sprístupnenia pre všetky krajiny.

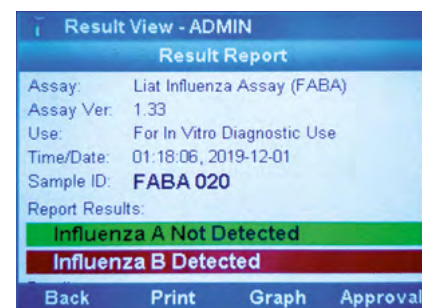
V súlade s touto stratégiou a s potrebou rýchlej diferenciálnej diagnostiky pri akútnych respiračných ochoreniach (ARO) sme s podporou ROCHE a za aktívnej pomoci kolegov z I. internej kliniky LF UK v Univerzitnej nemocnici v Bratislave, rovnako aj Kliniky infektológie a cestovnej medicíny LF UPJŠ v Univerzitnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach zaviedli „Point-of-Care testy“ (POCT alebo „bedside testy“) na rýchly molekulárno-genetický dôkaz RNA vírusov

chrípky A a B v individuálnych vzorkách. Tieto real time PCR (rt PCR) testy majú voči všetkým iným virologickým metódam (kultivácia, priamy dôkaz antigénu vo výteroch, sérológia) vysokú analytickú senzitivnosť a špecifickosť, a v spojení s expresnou analýzou ihneď po odbere biologického materiálu najvyššiu klinickú plauzibilitu.

### Metóda

Diagnostika v skúšobnom režime prebiehala od októbra 2019 do mája 2020, čiže v obvyklom období chrípkovej sezóny a počas pandémie COVID-19. Ako klinický materiál bol pri 89 pacientoch s podozrením na chrípku odoberatý nazofaryngeálny výter (obr. č. 2), ktorý bol vložený do univerzálneho transportného média a bezprostredne analyzovaný bez potreby transportu a skladovania. Pôvodcovia chrípky sú obalené RNA vírusy, ktoré sú všeobecne citlivé na vonkajšie faktory prostredia, preto bezprostredná analýza materiálu po odbere zvyšuje významne možnosť pozitívnej detekcie ich genetického materiálu. Detekcia vírusu chrípky vo vzorke prebiehala pomocou súprav cobas® Influenza A/B Assay na prístroji

cobas® Liat® System. Súpravy umožňujú dôkaz prítomnosti vírusu chrípky vo vzorke pomocou multiplex rt PCR prostredníctvom reverznej transkripcie vírusovej RNA do komplementárnej DNA a jej následnej amplifikácie s chemiluminiscenčnou detekciou produktu. Prístroj je malý, kompaktný, plnoautomatizovaný a umožňuje nenáročnú obsluhu (obr. č. 3) (identifikácia obslužného pracovníka a vzorky, nanosenie eluátu vzorky do súpravy, vloženie a identifikácia diagnostickej súpravy s nanosenou vzorkou do prístroja, stiahnutie alebo odoslanie výsledku do laboratórneho informačného systému), expresný proces analýzy (20 minút) a presný výsledok (obr. č. 4). Nie je určený na sériové vyšetrenia.



▲ Obr. č. 4: Vyhodnotenie testu pomocou cobas® Liat® System (chrípka A nedetegovaná, chrípka B pozitívna)



### Súbor pacientov

Výšetrenie bolo indikované a vykonané na základe symptómov ARO pri vyšetrení v prijímacej ambulancii I. internej kliniky LF UK v Univerzitetnej nemocnici v Bratislave. Jednalo sa vo väčšine prípadov o osoby vo vyššom veku. Súbežne prebiehalo vyšetovanie pacientov s ARO na Klinike infektológie a cestovnej medicíny LF UPJŠ v Univerzitetnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach.

### Výsledky

V UN v Bratislave bola chrípka typu A diagnostikovaná u 9 (13 %) pacientov, chrípka typu B u 7 (10 %). Zvyšných 53 (77 %) vzoriek bolo negatívnych. Väčšina testovaných boli muži, a to 42 (61 %). Z toho pozitívnych bolo 11 (6 – typ A, 5 typ B). Z 27 (39 %) testovaných žien bolo pozitívnych 5 (3 – typ A, 2 - typ B). Priemerný vek pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná chrípka A/B, bol 60 rokov.

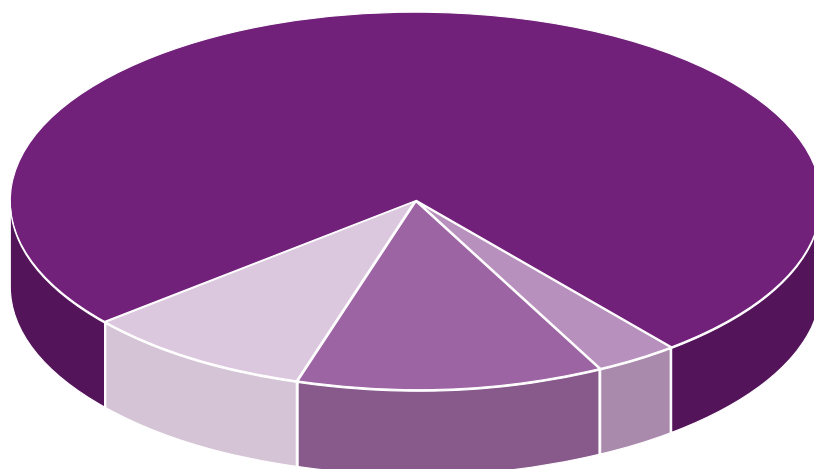
V UNLP v Košiciach bolo realizovaných 20 vyšetrení, u troch pacientov bola potvrdená chrípka (15 %), z toho chrípka typu A bola potvrdená u dvoch mužov (10 %) (78 a 48 rokov) a chrípka typu B

bola zachytená u jednej ženy (31 rokov). Výsledky boli potvrdené aj z NRC pre chrípku. Do NRC pre chrípku bol odoslaný celkovo materiál od 10 pacientov, pričom všetky výsledky korelovali s našimi výsledkami – 7 negatívnych, 2x chrípka A a 1x chrípka B.

3x sa nepodarilo analyzovať vzorku, avšak u jedného pacienta bolo použité iné transportné médium, ako je odporúčané. Podiel diagnostikovaných a potvrdených pacientov z oboch pracovísk je znázornený na obr. č. 5.

### Diskusia

POCT je definované ako klinické diagnostické testovanie na mieste starostlivosti alebo v jeho blízkosti - to znamená v čase a mieste bezprostrednej starostlivosti o pacienta (ambulancie, nemocničné oddelenia a pod.) (Liptáková A. et al., 2019). Rýchle POCT molekulárno-genetické (MG) testy založené na dôkaze špecifického úseku RNA vírusov chrípky, ako aj ich paralelné druhové odlišenie už do 20 minút po odobratí vzorky od pacienta predstavujú veľmi významný pokrok v klinickej virologickej diagnostike. POCT testovanie je ideálne pre triáž pacientov počas epidémie, za účelom začať prípadnú racionálnu liečbu takmer ihneď po prijatí a/alebo možnosť vykonať preventívne protiepidemické opatrenia bezprostredne po prvotnom vyšetrení pacienta podobne, ako sme tomu v týchto dňoch svedkami pri boji s pandémiou COVID-19. Navyše, v prípade dokázanej prítomnosti vírusu chrípky v odobratom klinickom materiáli pomocou MG POCT je možné odoslať rovnakú vzorku výteru nosa a/alebo hrdla na izoláciu vírusu v rámci racionálnej a komplexnej diagnostiky v laboratóriu Národného referenčného centra (NRC) pre chrípku tak, ako to odporúča WHO vo svojej



■ chrípka A   ■ chrípka B   ■ negatívne   ■ nediodiagnostikované

▲ Obr. č. 5: Podiel diagnostikovaných pacientov s podozrením na chrípku z UN Bratislava a UNLP v Košiciach



aktuálnej stratégii. Tieto následné komplexné vyšetrenia sú súčasťou plnenia epidemiologického sledovania za účelom typizácie sezónnych, resp. odlišenia prípadných pandemických kmeňov (izolácia vírusu na bunkových kultúrach, identifikácia vírusových izolátov hemaglutinačno-inhibičným testom, molekulárno-biologické metódy a pod.). Diagnostika v NRC je vykonávaná primárne v rámci sledovania, nie pre klinickú diagnostiku, a zahŕňa aj vyšetrenia z odberov iných vzoriek na komplementárne analýzy, napr. vyšetrenia krvi (séra) na prítomnosť špecifických protilátok (ELISA, komplement-fixačná reakcia) (ÚVZ SR, 2020). V tomto prípade sa v odobranej vzorke vyšetrujú protilátky proti viacerým respiračným patogénom vrátane chrípky. Pri chrípke ide však o viac-menej retrospektívne, ale nie klinické vyšetrenie, nakoľko ako pozitívny nález sa hodnotí len významný (signifikantný) nárast hladiny protilátok v druhej vzorke séra odobratej v odstupe niekoľko dní, resp. až do dvoch týždňov. Hladina protilátok stanovená iba v prvej vzorke teda nie je dôkazom aktuálne prebiehajúcej infekcie chrípky.

Bazálna hladina antivírusových protilátok stanovená v prvej vzorke môže byť len reziduálna po prekonaní predchádzajúcich infekcií chrípky, alebo po predchádzajúcich očkovaniach proti chrípke. Pre pacienta a rovnako aj lekára nepredstavuje bezprostredný prínos pri diagnostike a liečbe ARO, ani signifikantný nárast hladiny špecifických protilátok. Vzhľadom na potrebu časového odstupu medzi oboma odbermi krvi a charakteristický priebeh chrípky ako akútneho ochorenia je výsledok pre klinické využitie k dispozícii oneskorene, na rozdiel od priameho rýchleho testu, akým je nami zvolené MG vyšetrenie vzorky z nosohltanu, resp. alternatívne dôkaz antigénu v ňom.

Hoci diagnostická senzitivnosť testovania v našom súbore 89 pacientov bola ovplyvnená nástupom pandémie COVID-19 (povinné nosenie rúška a iné protiepidemické opatrenia ovplyvnili zásadne aj šírenie vírusov chrípky a iných respiračných patogénov), adherenciou zdravotníckeho personálu k vyšetreniu (napr. rozdielny vzťah lekárov k využívaniu automatu na POCT) a súbor pacientov

bol relatívne malý, výsledky boli pozoruhodné – až 22 % analyzovaných vzoriek (celkovo 19) bolo pozitívnych. Zároveň zaujímavý bol aj vysoký podiel diagnostikovaných kmeňov vírusu chrípky B voči typu A (8/11). Pre porovnanie – pri izolátoch, ktoré diagnostikovali úrady verejného zdravotníctva v SR za chrípkovú sezónu 2018 – 2019, bol pomer 3/254.

## Záver

Zavedenie MG POCT diagnostiky vírusov chrípky A a B bolo jednoznačne veľkým prínosom v rámci klinickej diagnostiky ARO na oboch našich pracoviskách a bolo vďaka zvolenej platforme aj relatívne jednoduché, rýchle a spoľahlivé. Zároveň sa tým zabezpečilo naplnenie prijatej globálnej stratégie WHO u nás. Veľmi zaujímavá sa nám javí perspektívna možnosť paralelného vyšetřovania vzoriek od pacientov s ARO na chrípku A/B a SARS-CoV 2 na nami odskúšanej platforme cobas® Liat® System v nasledujúcej chrípkovej sezóne 2020 – 2021 tak, ako to avizuje ROCHE.



### RNDr. Ján Predný

Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK  
Kontakt: jan.predny@fmed.uniba.sk

Vš pedagóg na Mikrobiologickom ústave LF UK a UN Bratislava. V minulosti viedol spoločnosť HPL (súkromné mikrobiologické laboratóriá), predtým aj zastúpenie zahraničnej spoločnosti v oblasti laboratórnej diagnostiky. V súkromí sa okrem rodiny a priateľov venuje svojim stredoázijským vľčiakom, domu, záhrade a koníčkum – náučnej literatúre, umeniu, histórii, architektúre a cestovateľstvu.

## LITERATÚRA

Fitzgerald, DA. (september 2009). „Human swine influenza A [H1N1]: practical advice for clinicians early in the pandemic“. *Paediatr Respir Rev.*, s. 154-58.  
Liptáková, A. a kol. (2019). *Lekárska mikrobiológia*. Bratislava: Herba s. r. o.  
Taubenberger, JK., M. D. (January 2006). „1918 Influenza: the mother of all pandemics“. *Emerging Infectious Diseases*, s. 15-22.

ÚVZ SR. (2020). *Výročná správa národných referenčných centier zriadených na báze ÚVZ SR a RÚVZ SR za rok 2019*.

WHO. (2019). <https://www.who.int/news-room/detail/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy>.