



Studie kolektivní imunity SARS-CoV-2-CZ-Preval

Protokol studie

Autoři:	Kolektiv autorů a garantů studie
Verze:	2.0
Datum:	20. 4. 2020

Obsah

1	Úvod.....	4
2	Garance studie a zapojené instituce.....	4
2.1	Vedení studie	4
2.2	Zadavatel a realizátor studie	4
2.3	Hlavní investigátoři a garanti začleněných populačních kohort	4
2.4	Odborná garance a vedoucí organizační tým	5
2.5	Zapojené instituce.....	5
3	Cíle studie.....	5
3.1	Primární cíl studie	5
3.2	Sekundární cíle studie	6
3.3	Další cíle studie	6
4	Design studie	6
4.1	Cílová populace.....	6
4.1.1	Zařazovací kritéria	6
4.2	Kohorty subjektů hodnocení	7
4.2.1	Kohorta 1: Plošný vzorek subjektů hodnocení.....	7
4.2.2	Kohorta 2: Vzorek subjektů hodnocení z vybraných lokalit.....	7
4.2.3	Kohorta 3: Specifická kohorta chronicky nemocných subjektů hodnocení.....	8
4.3	Trvání studie	8
4.4	Fáze studie.....	8
4.4.1	Přípravná fáze	8
4.4.2	Sběr vzorků	8
4.4.3	Digitalizace dat.....	9
4.4.4	Vyhodnocení dat	9
5	Statistická rozvaha.....	9
5.1	Statistické hodnocení výsledků.....	12
5.1.1	Hodnocení primárního cíle studie.....	12
5.1.2	Hodnocení sekundárních a dalších cílů studie	13
5.1.3	Interim analýza.....	14
6	Výběr subjektů hodnocení	14
6.1	Celopopulační vzorek subjektů hodnocení.....	14

6.1.1	Výběr subjektů hodnocení prostřednictvím databáze výzkumných projektů IKEM a Sociologického ústavu AV ČR	14
6.1.2	Výběr subjektů hodnocení prostřednictvím databáze Výběrového šetření pracovních sil ČSÚ	14
6.2	Vzorek subjektů hodnocení z vybraných lokalit	15
6.3	Vzorek specifické kohorty chronicky nemocných subjektů hodnocení	16
7	Vlastní postup v místě odběru vzorku	16
7.1	Stanovení hladiny protilátek IgG a IgM	17
7.1.1	Rapid test	17
7.1.2	Stanovení hladiny protilátek IgG a IgM (případně dalších tříd) z venózní krve v laboratoři	17
7.2	Diagnostika koronavirové nákazy metodou PCR	17
8	Dokumentace subjektu hodnocení	18
8.1	Souhlasy subjektu hodnocení	18
8.1.1	Informace pro pacienta a Informovaný souhlas se zařazením do studie	18
8.1.2	Souhlas se zpracováním osobních údajů	18
8.2	Dotazníky	18
8.2.1	Vstupní dotazník	18
8.3	Záznam a evidence údajů	19
9	Literatura	19

1 Úvod

Onemocnění COVID-19 je způsobeno novým typem koronaviru s odborným označením SARS-CoV-2. Jedná se o vysoce infekční onemocnění, které se projevuje zejména horečkami, respiračními potížemi, bolestí svalů a únavou. U onemocnění COVID-19 však i přes publikaci stovek prací v odborné literatuře stále chybějí fundamentální informace o šíření a průběhu onemocnění. Jednou z takových klíčových informací je prevalence bezpříznakových jedinců s infekcí SARS-CoV-2, která má významný vliv na dynamiku šíření onemocnění COVID-19 v ČR i v rámci jednotlivých krajů a lokalit.

2 Garance studie a zapojené instituce

2.1 Vedení studie

Vedení studie:

- prof. MUDr. Roman Chlábek, Ph.D., za oblast obsahovou, Klinická skupina COVID MZ ČR
- doc. MUDr. Rastislav Maďar, Ph.D., za oblast epidemiologie, Epidemiologická skupina COVID MZ ČR
- doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., za oblast diagnostickou, Diagnostická skupina COVID MZ ČR
- prof. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D., za oblast analýzy dat a IT podpory, ÚZIS ČR

Ochrana osobních údajů a zabezpečení dat studie:

- RNDr. Jan Mužík, Ph.D., pověřenec pro ochranu osobních údajů ÚZIS ČR

2.2 Zadavatel a realizátor studie

Zadavatelem studie je Ministerstvo zdravotnictví, odbornými garanty jsou:

- prof. MUDr. Roman Prymula, CSc., Ph.D.
- MUDr. Jarmila Rážová, Ph.D.

Realizátorem studie je Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, odbornými garanty jsou:

- prof. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D.
- prof. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D.
- RNDr. Ondřej Májek, Ph.D.

2.3 Hlavní investigátoři a garanti začleněných populačních kohort

Garanty geografických lokalit jsou:

- Populační klinické kohorty IKEM: prof. MUDr. Věra Adámková, CSc.
- Praha: prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., prof. MUDr. David Feltl, Ph.D.
- Litoměřice: prof. MUDr. Vladimír Černý, Ph.D.
- Olomoucký kraj, města Olomouc, Litovel, Uničov a přilehlé oblasti: doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
- Jihomoravský kraj: prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., prof. MUDr. Martin Repko, Ph.D.

2.4 Odborná garance a vedoucí organizační tým

prof. MUDr. Věra Adámková, CSc., prof. MUDr. Vladimír Černý, Ph.D., prof. RNDr. Ladislav Dušek, Ph.D., prof. MUDr. David Feltl, Ph.D., doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., PhDr. Karel Hejduk, prof. MUDr. Roman Chlíbač, Ph.D., prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D., doc. MUDr. Rastislav Maďar, Ph.D., RNDr. Ondřej Májek, Ph.D., RNDr. Jan Mužík, Ph.D., RNDr. Tomáš Pavlík, Ph.D., prof. MUDr. Roman Prymula, CSc., Ph.D., MUDr. Jarmila Rážová, Ph.D., prof. MUDr. Martin Repko, Ph.D., doc. MUDr. Jan Smetana, Ph.D., prof. MUDr. Aleksi Šedo, DrSc., prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D., prof. MUDr. Dalibor Valík, Ph.D., Mgr. Ing. Martin Zelený, Ph.D.

2.5 Zapojené instituce

Zapojenými institucemi jsou:

- 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy (1. LF UK)
- Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci (LF UP)
- Lékařská fakulta Masarykovy univerzity (LF MU)
- Lékařská fakulta Univerzity Karlovy Hradec Králové (LF UK HK)
- Lékařská fakulta Ostravské univerzity (LF OU)
- Fakulta vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (FVZ UO)
- Fakulta zdravotnických studií Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem (FZS UJEP)
- Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)
- Všeobecná fakultní nemocnice Praha (VFN)
- Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL)
- Fakultní nemocnice Brno (FN Brno)
- Krajská zdravotní, a.s., nemocnice Ústeckého kraje (KZ)
- Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha (ÚVN)
- Masarykův onkologický ústav, Brno (MOÚ)
- Akademie věd České republiky, Sociologický ústav (AV ČR)
- Český statistický úřad (ČSÚ)
- Armáda České republiky (AČR)
- Policie České republiky (PČR)
- Hygienická stanice Hlavního města Prahy
- Krajská hygienická stanice Olomouckého kraje se sídlem v Olomouci
- Krajská hygienická stanice Jihomoravského kraje se sídlem v Brně
- Krajská hygienická stanice Ústeckého kraje se sídlem v Ústí nad Labem

3 Cíle studie

Cílem studie SARS-CoV-2-CZ-Preval je kvantifikovat prevalenci jedinců s proběhlou infekcí koronavirem SARS-CoV-2 v české populaci, s výjimkou těch, u kterých bylo onemocnění COVID-19 diagnostikováno metodami založenými na přímém průkazu viru SARS-CoV-2, a to včetně jedinců se subklinickým průběhem onemocnění.

3.1 Primární cíl studie

Primárním cílovým parametrem této studie je odhad kumulativní prevalence osob, které se již setkaly s virem SARS-CoV-2, příp. prodělaly onemocnění COVID-19 s manifestní tvorbou protilátek,

tedy prevalence jedinců s proběhlou infekcí koronavirem SARS-CoV-2 včetně osob se subklinickým průběhem onemocnění.

Statisticky je primární cíl formulován jako odhad kumulativní prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob v geograficky definovaných subpopulacích ČR s deklarovanou spolehlivostí +/- 2 %. Na tento primární cíl je kalkulována nutná velikost vzorku v jednotlivých geografických kohortách.

Pozitivita osob na virus SARS-CoV-2, u kterých onemocnění COVID-19 nebylo diagnostikováno standardní cestou záchytu, bude hodnocena na základě přítomnosti specifických protilátek typu IgM nebo IgG v krvi (protilátkové testy).

Studie má primárně popisný cíl, komparativní analýzy se týkají sekundárních cílů a souvisí se srovnáváním různých subkohort subjektů hodnocení, případně vzorků z různých modelových geografických oblastí.

3.2 Sekundární cíle studie

- **Odhad podílu osob se subklinickým průběhem onemocnění** – kombinace protilátkových testů, dotazníkových šetření a dat NZIS. Tento parametr je klíčový pro prospektivní modelování zátěže a dynamiky onemocnění COVID-19 v ČR.
- **Odhad kumulativní prevalence onemocnění a podílu osob se subklinickým průběhem** dle demografických, sociálních a klinicky relevantních stratifikací – odhad rozsahu komunitní imunity v různých skupinách obyvatel:
 - Demografické a sociální charakteristiky pro stratifikaci budou získány z dotazníkových šetření při samotném náběru subjektů hodnocení;
 - Relevantní klinické charakteristiky budou dílem ze vstupních dotazníků a dále rozbořem osobní anamnézy subjektů hodnocení z dostupných dat NZIS (desetiletá dostupná zdravotní data, od r. 2010).

3.3 Další cíle studie

Dalším cílem studie bude identifikace jedinců v populaci, kteří mohou být návazně osloveni transfuzní službou jako dobrovolní dárci kovalescentní plasmy – kovalescentní plasma je jedna z účinných terapeutických modalit u pacientů s těžkou formou nemoci COVID-19 a v tuto chvíli není v České republice ustavený mechanismus pro jejich identifikaci a oslovení

4 Design studie

Prospektivní, multicentrická, průřezová studie (*cross sectional study design*) spočívající v odběru materiálu k vyhodnocení protilátkové positivity proti viru SARS-CoV-2.

4.1 Cílová populace

Kohorta bezpříznakových jedinců v dětském i dospělém věku, ochotná podstoupit vyšetření k vyhodnocení přítomnosti protilátek na SARS-CoV-2. Subjekt hodnocení musí splnit v době zařazení následující kritéria:

4.1.1 Zařazovací kritéria

- Podepsaný Informovaný souhlas

- Osoby pobývající na území ČR
- Demografická kritéria:
 - osoby ve věku 8-17 let (specifická dětská kohorta)
 - osoby ve věku 18-89 let
- Klinická kritéria:
 - bez akutních zdravotních potíží
 - bez potvrzené diagnózy COVID-19
- Geografická kritéria:
 - dle definice příslušné kohorty
- Časová kritéria:
 - sběr vzorků v období duben-květen 2020, případné dobrovolné opakované odběry dle příslušné kohorty

4.2 Kohorty subjektů hodnocení

Sledovaná populace subjektů hodnocení se bude skládat z populačního výběru, z výběru 4 geografických oblastí s rozdílnou zátěží onemocněním COVID-19 a ze specifické kohorty chronicky nemocných jedinců. Dále bude zařazena specifická sub-kohorta subjektů hodnocení z měst Litovel a Uničov, která umožní podrobnější zhodnocení kvantitativní analýzy přítomnosti protilátek proti SARS-CoV-2.

4.2.1 Kohorta 1: Plošný vzorek subjektů hodnocení

Jedná se o tzv. „pozadovou“, populačně plošnou kohortu (případně regionálně omezenou kvůli dostupnosti odběrových míst), jejíž analýza umožní lépe provést srovnávací analýzu dalších populačních kohort získaných ve specifických geografických oblastech. Jedná o reprezentativní vzorek obyvatel definovaný v rámci již ustavených populačních kohort, které jsou vedeny v rámci:

- výzkumných projektů IKEM a Sociologického ústavu AV ČR
- pravidelných šetření ČSÚ.

4.2.2 Kohorta 2: Vzorek subjektů hodnocení z vybraných lokalit

Jedná se o epidemiologicky definované kohorty s kvótním vzorkováním populace, které bude založeno na demografických parametrech. Jedná se o populace z následujících geografických oblastí:

- 2a Brno/Jihomoravský kraj
 - Jedná se o model populace, která je relativně málo zasažená nemocí COVID-19.
- 2b Olomouc/Olomoucký kraj
 - Jedná se o model populace, která je středně zasažená nemocí COVID-19.
 - Tato sub-kohorta umožní podrobnější zhodnocení kvantitativní analýzy přítomnosti protilátek provedením nejen rapid testu, ale také elektivním odběrem venózní krve a standardní sérologií. Subjekty v této kohortě budou osloveni k možnosti opakovaného odběru dle vývoje stávající epidemiologické populace.
- 2c Hlavní město Praha
 - Jedná se o model populace, která je nemocí COVID-19 relativně hodně zasažená a vzhledem k specifickému způsobu života obyvatel Hlavního města Prahy a vysoké populační hustotě představuje model oblasti umožňující snadné šíření viru komunitním přenosem.
- 2d Město Litoměřice

- Jedná se o model populace, kde je aktuálně epidemie na vzestupu a pravděpodobně probíhá fáze významnějšího komunitního šíření.

Samostatnou sub-kohortou budou:

- 2e Města Litovel a Uničov
 - Může sloužit jako model populace, ve které došlo pravděpodobně k nejmasivnějším šíření viru v ČR.
 - Tato sub-kohorta umožní podrobnější zhodnocení kvantitativní analýzy přítomnosti protilátek provedením nejen rapid testu, ale také odběrem venózní krve a standardní sérologií. Subjekty v této kohortě budou osloveni k možnosti opakovaného odběru dle vývoje stávající epidemiologické populace.

4.2.3 Kohorta 3: Specifická kohorta chronicky nemocných subjektů hodnocení

Jedná se o kohortu zranitelných osob s chronickými kardiovaskulárními potížemi, hypertenzí a případně diabetem.

4.3 Trvání studie

Studie bude dle designu provedena jednorázově v období duben – květen 2020. Kohorty subjektů hodnocení budou na základě informovaných souhlasů identifikovány a archivované kontaktní údaje umožní potenciální opakování studie v podzimních měsících 2020 (dle stavu a vývoje epidemie).

Průřezová studie bude probíhat v druhé polovině dubna s náborem subjektů hodnocení po dobu 7-10 dní. Samostatná sub-kohorta pro města Litovel a Uničov může být prodloužena přibližně o dalších 7 - 14 dní.

Zpracovávána data mohou být využita pro prospektivní hodnocení dlouhodobých ukazatelů zdravotního stavu. Předpokládaná doba finálního vyhodnocení studie ve vztahu k dlouhodobým ukazatelům zdravotního stavu je předpokládána do konce roku 2022.

4.4 Fáze studie

4.4.1 Přípravná fáze

Přípravná fáze bude zahrnovat následující kroky:

- Příprava podrobných manuálů pro jednotlivé kroky a jednotlivá místa realizace studie.
- Sestavení realizačních týmů pro jednotlivé kohorty a jejich poučení, zácvek v provádění postupu studie a odběru vzorků.
- Příprava materiálního zabezpečení studie v jednotlivých kohortách (odběrová místa, zdravotnický materiál, testovací sady, ochranné pomůcky apod.).
- Komunikace se zástupci geografických lokalit a zajištění součinnosti.
- Příprava dotazníků a tisk materiálů.
- Příprava databáze studie formou multicentricky přístupných eCRF.
- Orientační testy specifity a sensitivity používaných rychlostestů i zvažovaných sérologických metod.

4.4.2 Sběr vzorků

Vlastní provedení studie bude zahrnovat následující činnosti:

- Oslovení vybrané populace a zařazení subjektů do studie.
- Odběr materiálu a vyplnění dotazníku studie.
- Vyhodnocení odebraného vzorku.

4.4.3 Digitalizace dat

Bude provedena digitalizace vyplněných dotazníků do elektronické podoby poučenými pracovníky.

Sběr primárních dat bude probíhat pro jednotlivé kohorty následovně:

- Praha, Litoměřice a Jihomoravský kraj bude centrálně digitalizována pomocí lokální instalace aplikace pro sběr dat RedCap.
- Olomoucký kraj, města Olomouc, Litovel, Uničov a přilehlé oblasti bude využit elektronický systém ClinData, který umožňuje kontrolovaný a zajištěný sběr informací, uchování IS a dotazníku v elektronické podobě a parametrizaci klinicko-laboratorních dat (<https://clindata.imtm.cz>) a bude zajištěn export dat do databáze ÚZIS ČR.
- Specifická kohorta IKEM bude digitalizována ve výzkumné databázi IKEM a bude zajištěn export dat do databáze ÚZIS ČR.

4.4.4 Vyhodnocení dat

Provede tým ÚZIS ČR a spolupracujících akademických institucí dle statistické rozvahy.

5 Statistická rozvaha

Modelové kohorty byly vybrány s ohledem na pokrytí české populace prostřednictvím kohort s odlišnou zátěží onemocněním COVID-19 (viz výše), což umožní při omezeném počtu zařazených jedinců kvalitnější odhad primárního cílového parametru studie.

Kalkulace počtu zařazených subjektů vychází z předpokladu zajištění požadované přesnosti (šíře) 95% intervalu spolehlivosti odhadu skutečné prevalence positivity SARS-CoV-2 v jednotlivých geografických kohortách. Kalkulace tedy byla provedena pro každou geografickou kohortu zvlášť tak, abychom zajistili korektní a zároveň specifický odhad positivity SARS-CoV-2 v jednotlivých populacích.

Výpočet velikost vzorku potřebného k odhadu skutečné prevalence se specifikovanou úrovní spolehlivosti a přesnosti je však závislý na kvalitativních parametrech zvoleného testu, senzitivitě (schopnosti testu odhalit skutečně nemocné jedince) a specifitě testu (schopnosti testu odhalit skutečně zdravé jedince). Tuto závislost pro modelovou přesnost (širší intervalu spolehlivosti) odhadu skutečné prevalence +/- 2 % dokumentuje Tab. 1. Z tabulky plyne, že velikost vzorku se v závislosti na kombinaci hodnot senzitivity a specifity použitého testu výrazně liší.

Tabulka 1. Požadované velikosti vzorků při skutečné prevalenci = 10 % a vyžadované přesnosti (šíře) 95% intervalu spolehlivosti ve výši +/- 2 % dle rozsahu hodnot senzitivity a specifity*:

Senzitivita testu	Senzitivita 0.7	Senzitivita 0.8	Senzitivita 0.9	Senzitivita 0.95	Senzitivita 0.99
Specifita testu					
Specifita 0.7	13 470	8 740	6 147	5 269	4 697

Specifická 0.8	7 203	5 133	3 864	3 404	3 096
Specifická 0.9	3 586	2 766	2 215	2 005	1 859
Specifická 0.95	2 314	1 868	1 553	1 428	1 340
Specifická 0.99	1 468	1 248	1 082	1 013	964

* Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ, 2004. A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev. Vet. Med.* 65: 173-188 (<https://epitools.ausvet.com.au/prevalences>).

Stejně tak je třeba brát v potaz závislost velikosti vzorku na hodnotě skutečné (a v tuto chvíli neznámé) prevalence a požadované přesnosti 95% intervalu spolehlivosti. Tuto závislost dokumentuje Tab. 2. Uvedené hodnoty dokládají (za předpokladu senzitivity testu = 0,85 a specifickosti testu = 0,9), že požadovanou přesnost odhadu skutečné prevalence v rozmezí +/- 2 % nám pro široký rozsah hodnot skutečné prevalence zcela zajistí velikost souboru na úrovni 3 000 - 4 000 subjektů hodnocení (od celkem 1 639 subjektů hodnocení až 3 202 subjektů hodnocení pro hodnoty skutečné prevalence v rozmezí 1 - 20 %).

Tabulka 2. Požadované velikosti vzorků při deklarované senzitivě testu = 0,85 a specifickosti testu = 0,9 dle rozsahu hodnot skutečné prevalence a vyžadované přesnosti 95% intervalu spolehlivosti*:

Skutečná prevalence	Prevalence 1 %	Prevalence 2 %	Prevalence 5 %	Prevalence 10 %	Prevalence 20 %
Požadovaná přesnost					
Přesnost +/- 1 %	6 553	6 951	8 100	9 860	12 805
Přesnost +/- 2 %	1 639	1 738	2 025	2 465	3 202
Přesnost +/- 3 %	729	773	900	1 096	1 423
Přesnost +/- 5 %	263	279	324	395	513
Přesnost +/- 10 %	66	70	81	99	129

* Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ, 2004. A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev. Vet. Med.* 65: 173-188 (<https://epitools.ausvet.com.au/prevalences>).

Pro výslednou kalkulaci velikosti geografických kohort (2a-2d) byl východiskem předpoklad senzitivity testu na přítomnost IgG ve výši 85 % a specifickosti 90 % (Liu a kol., 2020, Li a kol., 2020). Pro dosažení přesnosti 95% intervalu spolehlivosti pro odhad skutečné prevalence positivity SARS-CoV-2 v rámci každé z geografických kohort ČR na úrovni +/- 2 % byla minimální celková velikost každé geografické kohorty kalkulována na 3 000 subjektů hodnocení. Pro přesnější odhad výsledku v městě Brně a okolí a Olomouci a okolí navrhujeme v těchto kohortách zařadit 4 000 jedinců. Kohorta hlavního města Praha bude navíc specifická zařazením dětí (N = 1 000 jedinců), což bude znamenat celkovou velikost kohorty 5 000 jedinců.

N = 3 000 subjektů hodnocení, respektive 4 000 subjektů hodnocení v jedné kohortě dokonce umožňuje odhad skutečné prevalence s přesností minimálně +/- 2 %, ve výsledku může být odhad dokonce ještě přesnější. Při kalkulaci sdruženého odhadu pro ČR vážením všech geografických kohort lze dokonce předpokládat výslednou přesnost 95% intervalu spolehlivosti odhadu skutečné prevalence na úrovni +/- 1 %.

Pro zajištění korektního odhadu i v jednotlivých věkových skupinách předpokládáme minimálně 1 000 subjektů v každé ze tří (čtyř v případě hlavního města Prahy) věkových skupin (viz tabulka 3). Navržené členění věkových skupin respektuje zastoupení nejstarších věkových skupin v Litoměřicích (pro nutné zajištění dostatečné míry účasti). Z tabulky 2 pak plyne, že počet 1 000 zařazených subjektů v každé věkové kohortě je plně dostatečný pro odhad věkově specifické prevalence positivity SARS-CoV-2 s přesností okolo +/- 3 %.

Tabulka 3. Navrhovaný počet subjektů hodnocení v rámci jednotlivých geografických kohort (2a-2d) dle věkových kategorií.

Lokalita	Hlavní město Praha	město Brno a okolí	město Olomouc a okolí	město Litoměřice
Věková kategorie				
Věk 8 – 17 let*	1 000	1 000	0	0
Věk 18 – 39 let	1 500	1 500	1 500	1 000
Věk 40 – 59 let	1 500	1 500	1 500	1 000
Věk 60 – 89 let	1 000	1 000	1 000	1 000
Subjektů celkem	5 000	5 000	4 000	3 000

* Dětská kohorta pouze v lokalitě Hlavní město Praha a Brno a okolí

Plošně demograficky reprezentativní kohorta a kohorta specificky zaměřená na pacienty s chronickými nemocemi budou odvozeny od existujících výzkumných projektů, a to v následujících velikostech:

Tabulka 4. Návrh designu: počet subjektů hodnocení dle specifických modelových kohort

Lokalita	Plošně reprezentativní vzorek populace Kohorta ČSÚ	Plošně reprezentativní vzorek populace IKEM, AV ČR	Modelová kohorta chronicky nemocných pacientů IKEM
Věk 18 – 39 let	790	700	200
Věk 40 – 59 let	900	900	900
Věk 60 – 89 let	1210	900	900
Subjektů celkem	2900	2500	2000

V případě geograficky lokalizované kohorty měst Olomouc, Litovel a Uničov, kde bude odebírána venózní krev (v případě města Olomouc elektivně venózní nebo kapilární), což umožní laboratorní ověření (validaci) výsledků rapid-testu a přesnější odhad jeho senzitivity a specifity důležitý pro odhad skutečné prevalence (viz níže), není právě z důvodu této validace nutné dosažení takové velikosti vzorku, jako v případě ostatních kohort. Pro dosažení stejné přesnosti odhadu skutečné prevalence pozitivivity SARS-CoV-2 stačí cca 2 500 subjektů hodnocení, a to i pro hodnoty skutečné prevalence na úrovni 50 % (předpokládáme potenciálně nejvyšší zasažení infekcí SARS-CoV-2 ze všech geografických lokalit). Protokol umožní investigátorům nabrat přibližně o 10-20 % více jedinců jako pojistku pro vyřazení osob, které po kontrole v ISIN nebo NZIS nesplní zařazovací kritéria.

Tabulka 5. Návrh designu: počet subjektů hodnocení v kohortě měst Litovel a Uničov

Lokalita	města Litovel a Uničov v okrese Olomouc
Věková kategorie	
Věk 18 – 39 let	800
Věk 40 – 59 let	900
Věk 60 – 89 let	800
Subjektů celkem	2 500

5.1 Statistické hodnocení výsledků

5.1.1 Hodnocení primárního cíle studie

Odhad skutečné prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob v ČR není možné kalkulovat jako jednoduchý podíl osob s přítomností specifických protilátek typu IgG v krvi subjektu hodnocení ze všech testovaných osob, neboť výsledky testu mohou být zkresleny jeho kvalitativními parametry (Campbell a kol., 2008). Při odhadu skutečné prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob v ČR je tak vhodné zohlednit schopnost aplikovaného testu identifikovat skutečně nemocné a skutečně zdravé jedince, tzv. senzitivitu a specifitu testu. Vztah mezi skutečnou pozitivitou, resp. negativitou jedince a potenciálním výsledkem testu uvádí tabulka 6.

Tabulka 6. Sumarizace výsledků testování SARS-CoV-2 pozitivitu na populaci N jedinců.

Skutečnost	Osoby skutečně SARS-CoV-2 pozitivní	Osoby skutečně SARS-CoV-2 negativní	Celkem
Výsledek testu			
Test pozitivní	A	B	A + B
Test negativní	C	D	C + D
Celkem	A + C	B + D	N

Dále bude využito značení:

N – celkový počet testovaných jedinců, $N = A + B + C + D$,

Se – senzitivita, schopnost testu identifikovat osoby skutečně SARS-CoV-2 pozitivní, $Se = A / (A + C)$,

Sp – specificita, schopnost testu identifikovat osoby skutečně SARS-CoV-2 negativní, $Sp = D / (B + D)$,

T – podíl pozitivních testů z celkového počtu provedených, $T = (A + B) / N$,

P – podíl skutečně SARS-CoV-2 pozitivních osob v populaci, tzv. skutečná prevalence, $P = (A + C) / N$,

Prevalenci SARS-CoV-2 pozitivních osob lze dle autorů Campbell a kol. (2008) kalkulovat (adjustovat) pomocí senzitivity použitého testu, jeho specificity a podílu pozitivních testů následovně:

$$P = [T - (1 - Sp)] / (Se + Sp - 1).$$

Kalkulace prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob proběhne v každé kohortě zvlášť (geografických i modelové) jednak jako hrubý údaj (T), jednak s využitím uvedeného vzorce, tedy s využitím adjustace podílu osob s přítomností specifických protilátek typu IgG v krvi na senzitivitu a specificitu použitého testu. Odhad bude doplněn 95% intervalem spolehlivosti. Odhad proběhne ve dvou krocích: primárně budou kalkulovány věkově specifické odhady pro výše definované věkové kategorie, ty budou následně váženy s pomocí skutečné věkové struktury dané lokality, případně bude zohledněn efekt designu výběrového šetření. V odhadu bude při prezentaci dále zohledněna kumulativní prevalence osob s prokázaným onemocněním COVID-19 dle ISIN.

Následně bude vyhodnocena heterogenita kalkulovaných odhadů prevalence plošných (1a a 1b) i geograficky lokalizovaných (2a až 2e) kohort a bude sestrojena kalibrační křivka závislosti skutečné prevalence na prevalenci identifikované dle hlášení KHS a dle pozitivních nálezů laboratoří, mohou být využity metody metaregrese potenciálně zohledňující rozdílnou přesnost jednotlivých odhadů. Kalibrační data pak budou využita pro extrapolaci výsledků na celou populaci ČR a bude kalkulován sdružený odhad skutečné prevalence pro celou ČR s doplněním 95% intervalu spolehlivosti.

Kohorta měst Litovel a Uničov v okrese Olomouc (kohorta 2e) bude podrobena odběru kapilární krve i odběru venózní krve, což umožní laboratorní ověření výsledku rapid-testu. Pro výpočet prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob v této kohortě tak budou k dispozici kompletní údaje čtyřpolní tabulky (tabulka 6 výše), což umožní standardní výpočet prevalence SARS-CoV-2 pozitivních osob v této populaci pomocí vzorce

$$P = (A + C) / N.$$

(za předpokladu, že přiměřenou metodu kvantitativního stanovení lze považovat za diagnostický standard)

5.1.2 Hodnocení sekundárních a dalších cílů studie

- 1) **Odhad podílu osob se subklinickým průběhem onemocnění** – bude vyhodnocen jako podíl SARS-CoV-2 pozitivních osob, které dle dotazníku nebudou uvádět žádné, ani minimální symptomy v anamnéze, zároveň bude prověřen potenciální nález osoby v registru ISIN nebo dalších registrech NZIS. Odhad bude doplněn 95% intervalem spolehlivosti.
- 2) **Odhad kumulativní prevalence onemocnění a podílu osob se subklinickým průběhem** – dle demografických, sociálních a klinicky relevantních stratifikací – rozdíly mezi subkohortami dle specifikovaných faktorů budou vyhodnoceny s pomocí exaktního Fisherova testu s Bonferroniho korekcí na násobné testování hypotéz.

- 3) **Odhad podílu osob vhodných pro dárčovství kovalsecentní plasmy** – dle prevalence onemocnění v populaci po vyloučení kontraindikací dárčovství krve (věk, zdravotní stav, atd.).

5.1.3 Interim analýza

Pro studii je plánována interim analýza, která má dva hlavní cíle:

1. Umožnit využití pilotních výsledků pro vyhodnocení aktuálního vývoje epidemiologické situace a rozhodování o restriktivních opatřeních.
2. Umožnit rozhodování o případném navýšení velikosti vzorku za účelem zlepšení výsledného odhadu skutečné prevalence skutečně SARS-CoV-2 pozitivních osob.

Plánovaná interim analýza tak není klasickou interim analýzou aplikovanou ve srovnávacích klinických studiích, jedná se o průběžné zhodnocení dosažených výsledků. Interim analýza tak nepovede k zastavení studie, nicméně může být na jejím základě rozhodnuto o případném navýšení velikosti souboru subjektů hodnocení.

Plánovaná interim analýza proběhne v každé definované kohortě zvlášť po dosažení minimálně poloviny plánované velikosti vzorku dané kohorty, a to ve chvíli, kdy bude naplněna polovina plánované velikosti vzorku v každé z definovaných věkových podskupin (z důvodu reprezentativnosti). Je-li tedy např. v jedné kohortě plánováno zařazení 1 000 subjektů hodnocení v rámci tří věkových podskupin, bude interim analýza provedena ve chvíli, kdy i v nejméně četné věkové podskupině bude zařazeno 500 subjektů hodnocení.

Data budou v rámci interim analýzy vyhodnocena dle metodiky uvedené v kapitole Hodnocení primárního cíle studie.

6 Výběr subjektů hodnocení

Výběr subjektů hodnocení je závislý na dané kohortě.

6.1 Celopopulační vzorek subjektů hodnocení

Výběr vhodných subjektů hodnocení, může proběhnout prostřednictvím databáze výzkumných projektů IKEM a AV ČR a databáze Výběrového šetření pracovních sil ČSÚ (po získání souhlasu respondentů).

6.1.1 Výběr subjektů hodnocení prostřednictvím databáze výzkumných projektů IKEM a Sociologického ústavu AV ČR

Jedná se o kohortu, která je již reprezentativně vybrána a již delší dobu spolupracuje na výzkumných projektech. Oslovení této kohorty s nabídkou zapojení do studie proběhne pracovníky IKEM, případně Sociologického ústavu AV ČR. Odběr bude proveden pracovníky IKEM, nebo spolupracujících zdravotnických zařízení.

6.1.2 Výběr subjektů hodnocení prostřednictvím databáze Výběrového šetření pracovních sil ČSÚ

Z hlediska možné práce se souborem domácností (výběrový soubor Výběrového šetření pracovních sil -VŠPS), založeném na pravděpodobnostním výběru, budou využity dostupné telefonické kontakty. Tyto

telefonické kontakty jsou poskytnuty tazatelům pro účely tohoto šetření a nejsou centrálně zpracovávány. Pro přímé oslovení těchto potenciálních subjektů hodnocení je tedy vhodné využít kontakty mezi tazatelem a respondentem. Je takto možné informovat respondenta o studii přímo a domluvit se na jeho zapojení, nebo je možné domluvit předání kontaktu pracovníkům ÚZIS ČR, vždy však se souhlasem domácnosti.

Z hlediska počtu respondentů na příkladu souboru za Hlavní město Praha, tak každá z pěti vln VŠPS obsahuje přibližně 680 respondentů. K oslovení cílového souboru v rozsahu 500 ekonomicky aktivních respondentů by tedy bylo možné využít dvě z vln VŠPS, ca. 640 ekonomicky aktivních respondentů. Míru ochoty sdělit kontakt a účastnit se studie je ale samozřejmě těžké přesně odhadnout. Vybíranou jednotkou je ve VŠPS byt a šetřeny jsou všechny osoby s obvyklým bydlištěm v daném bytě – tj. někteří respondenti budou ze stejného bytu a počet šetřených bytů by byl nižší než počet respondentů (v každé vlně ca. 320 ekonomicky aktivních respondentů v cca 230 různých bytech, pro 640 ekonomicky aktivních respondentů jde o cca 460 různých bytů).

Praktická realizace:

1. ÚZIS ČR vytvoří podrobný manuál telefonického oslovení respondentů.
2. ČSÚ prostřednictvím tazatelů osloví své respondenty
 - a. zda se přímo chtějí zapojit do studie, nebo
 - b. zda souhlasí s oslovením ÚZIS ČR v rámci této studie a předá jejich kontakty ÚZIS ČR, který zajistí oslovení těchto osob s nabídkou zapojení do studie
3. Se subjekty hodnocení, kteří budou souhlasit se zapojením do studie, bude domluven termín odběru v konkrétním odběrovém místě.

Výhodou této varianty oslovení subjektů hodnocení je existující databáze respondentů a ochota ČSÚ se zajištěním souhlasů těchto respondentů prostřednictvím dotazovatelů. Nevýhodou je určitá limitace velikosti vzorku.

6.2 Vzorek subjektů hodnocení z vybraných lokalit

V jednotlivých geografických lokalitách proběhne přímé oslovení subjektů hodnocení, nepravděpodobnostní kvótní výběr subjektů hodnocení. Oslovení bude zajištěno informační kampaní v dané lokalitě se zaměřením na ozřejnění důležitosti a cílů projektu, zdůraznění kritérií pro možnost zařazení do studie, vysvětlení vlastního procesu studie včetně provedených vyšetření a dalších kroků. Bude uváděn odkaz na webové stránky, kde budou další podrobnosti včetně například přesného umístění odběrných míst a možnost dopravy k nim.

Vlastní odběry budou probíhat v mobilních stanech anebo ve vyhrazených prostorách, které budou dostatečně a vhodně vybavené pro zajištění odběru definovaného počtu subjektů hodnocení včetně personálního zajištění a vybavení adekvátními osobními ochrannými prostředky.

Bude dárán důraz na bezpečnost odběrných míst vzhledem k epidemiologickým pravidlům. Odběry budou primárně určené pro osoby, které se budou vyskytovat v okolí odběrového místa a projeví zájem o vstup do studie. Pro osoby nad 65 let bude vyhrazen samostatný čas odběrů pouze pro tuto kohortu, pro zvýšení jejich bezpečnosti a minimalizaci kontaktu s mladšími subjekty.

Praktická realizace:

1. MZ ČR, ÚZIS ČR i jednotlivé zapojené instituce spustí kampaň pro zajištění informovanosti osob z daných lokalit pod jednotnou koordinací tiskového odboru ÚZIS ČR.
2. Po dohodě se zástupci regionů budou vybrána vhodná místa pro postavení odběrových stanů.

3. Bude zajištěno zázemí odběrových míst.
4. Subjektům hodnocení, kteří projeví aktivní zájem o vstup do studie a budou vyhovovat definovaným kritériím v rámci definovaného počtu subjektů hodnocení v dané lokalitě, bude proveden odběr krve (kapilární nebo venózní u vybrané sub-kohorty subjektů-2e).

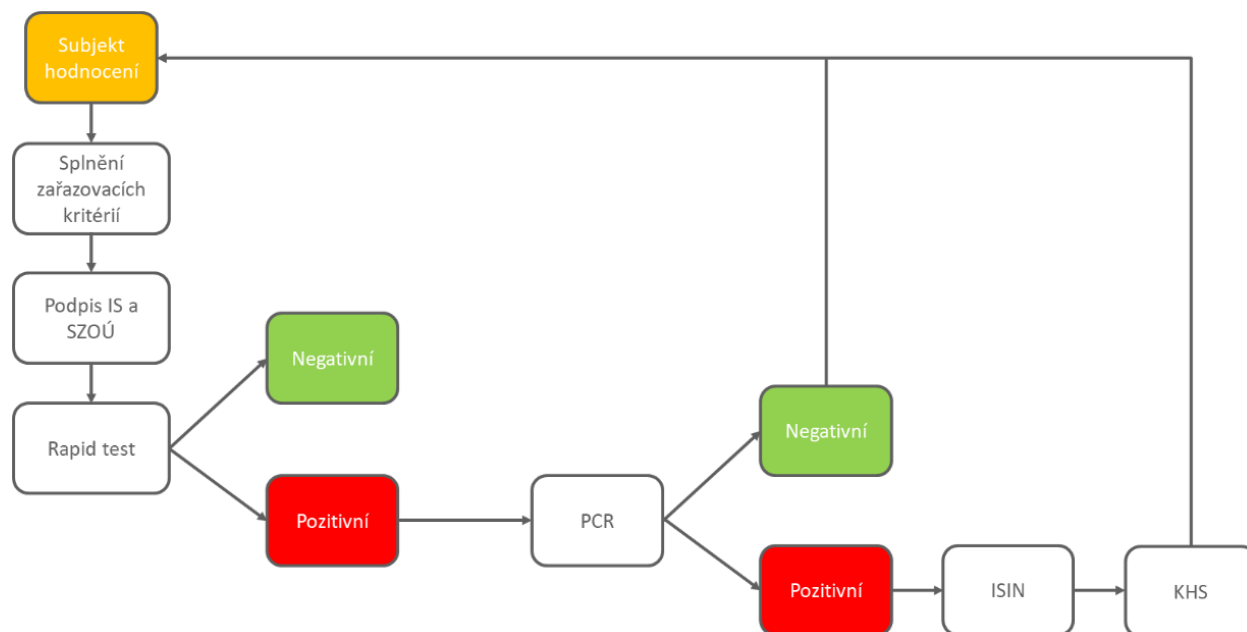
Výhodou této varianty výběru subjektů hodnocení je zajištění velkého množství subjektů hodnocení během relativně krátké doby. Nevýhodou je riziko výběrového zkreslení kvůli nepravděpodobnostnímu výběru. Reprezentativnost bude posílena metodou kvótního vzorkování.

6.3 Vzorek specifické kohorty chronicky nemocných subjektů hodnocení

Jedná se o kohortu, která je vybrána z výzkumné databáze IKEM. Oslovení této kohorty s nabídkou zapojení do studie proběhne pracovníky IKEM. Odběr bude proveden pracovníky IKEM, nebo spolupracujících zdravotnických zařízení.

7 Vlastní postup v místě odběru vzorku

Vlastní postup vyšetření bude probíhat s výslovným souhlasem subjektu hodnocení se zařazením do studie. Po poučení a jeho výslovného souhlasu spolu s podepsáním písemného informovaného souhlasu bude proveden řízený rozhovor a záznam základních vstupních údajů do papírového formuláře. Následně bude proveden odběr kapilární nebo venózní krve a vyšetření rapid-testem a informování o výsledku testu. Výsledek těchto testů bude u každého vzorku zdokumentován čitelnou fotografií, na které bude uvedeno číslo vzorku ve studii (anonymní kód). Žilní krev (5-8 ml) bude uchována na ledu, transportována do laboratoře, zpracována na sérum. Sérum bude uchováno minimálně při -20oC až do zpracování laboratorními analytickými postupy. V případě positivity rapid-testu proběhne indikace a vyplnění žádanky na odběr vzorku z horních cest dýchacích na vyšetření PCR. Vzorek bude dopraven do příslušné laboratoře. Takovému subjektu hodnocení bude doporučena karanténa a protiepidemická opatření do doby, než bude subjekt informován o výsledku stěru. V případě negativity, o které informuje subjekt hodnocení přímo laboratoř, nebude třeba konat další opatření. V případě positivity, bude informován místně příslušný orgán ochrany veřejného zdraví (KHS), který bude postupovat dle standardního procesu pro pacienty s nemocí Covid-19.



7.1 Stanovení hladiny protilátek IgG a IgM

Sérologické testy vzhledem k několikadennímu intervalu od prvních příznaků do nástupu protilátkové odpovědi (takzvané imunologické okno), mají pouze podpůrnou roli a jsou vhodné pro použití v rámci epidemiologického šetření a získání údajů o proběhlé infekci.

7.1.1 Rapid test

Rapid-testem se detekuje přítomnost protilátek proti SARS-CoV-2 ve třídě IgM a IgG pomocí imunochromatografické reakce. Nelze jím detekovat časnou infekci, protilátky se objeví patrně po dvou týdnech od případné infekce. Vlastní testování je zajištěno prostřednictvím testových destiček (jedna na IgM a druhá na IgG protilátky) a lahvičky s rozpouštědlem. Odběr bude proveden vpichem do bříška prstu a odebráním kapilární krve.

7.1.2 Stanovení hladiny protilátek IgG a IgM (případně dalších tříd) z venózní krve v laboratoři

Jedná se o kvantitativní vyšetření hladin protilátek proti SARS-CoV-2 v séru z venózního odběru krve v příslušné laboratoři. Subjektům bude odebíráno 5-8 ml plné venózní krve.

Toto vyšetření bude standardní součástí pouze specifické kohorty 2 měst a přilehlých vesnic Litovel a Uničov. V případě kohorty města Olomouc bude odběr venózní krve pro účastníky studie elektivní.

V rámci Informovaného souhlasu bude pro všechny subjekty hodnocení uvedena možnost zaškrtnout kolonku se souhlasem k budoucímu oslovení pro možnost získání 5-8 ml venózní krve na další vyšetření.

7.2 Diagnostika koronavirové nákazy metodou PCR

Laboratorní diagnostika onemocnění COVID-19 se v současnosti opírá pouze o přímý průkaz nukleové kyseliny SARS-CoV-2 (RT-PCR). Toto vyšetření se bude provádět na základě indikace lékaře dle stávajícího algoritmu u osob s pozitivním výsledkem protilátek IgG anebo IgM.

8 Dokumentace subjektu hodnocení

Každý subjekt hodnocení bude podepisovat souhlas s účastí ve studii a souhlas se zpracováním osobních údajů. Dále bude vyplňovat dotazník.

8.1 Souhlasy subjektu hodnocení

Před zařazením subjektu hodnocení do projektu bude nutné zajistit podpis informovaného souhlasu a souhlasu se zpracováním osobních údajů. Tato dokumentace bude předána na ÚZIS ČR. Druhý podepsaný výtisk obdrží každý subjekt hodnocení. V případě kohort Olomouckého kraje bude dokumentace současně uložena elektronicky v informačním systému studie ClinData.

8.1.1 Informace pro pacienta a Informovaný souhlas se zařazením do studie

Součástí informovaného souhlasu budou stručné informace pro pacienta stran dobrovolnosti vstupu, odůvodnění realizace studie a postupu v případě positivity a možných rizicích.

Pro dětskou kohortu bude specifický Informovaný souhlas podepisovaný zákonným zástupcem dítěte.

8.1.2 Souhlas se zpracováním osobních údajů

Souhlas se zpracováním osobních údajů definuje ÚZIS ČR jako správce osobních údajů, definuje rozsah zpracovávaných údajů a termín do kdy subjekt hodnocení tento souhlas uděluje, včetně možnosti a postupu odvolání souhlasu. Poskytovatel zdravotních služeb je též správce osobních údajů dle zákona o zdravotních službách.

8.2 Dotazníky

Součástí studie jsou dotazníky pro možnost vyhodnocení vztahu výsledků vyšetření a demografických, klinických a epidemiologických charakteristik. Pro dětskou kohortu bude specifický dotazník.

8.2.1 Vstupní dotazník

Vstupní dotazník bude jednak identifikovat subjekty hodnocení jako takové a jednak bude popisovat jeho základní charakteristiky:

Dotazník pro dospělé

- Jméno, příjmení, číslo ve studii, kontaktní údaje
- Datum narození, pohlaví, výška, váha, kuřáctví
- Pracovní anamnéza, velikost domácnosti, pobyt v zahraničí, nařízení karantény v minulosti
- Příznaky infekčních onemocnění dýchacích cest od začátku roku
- Důvod vstupu do studie

Dotazník pro děti

- Jméno, příjmení, číslo ve studii, kontaktní údaje
- Datum narození, pohlaví, výška, váha, počet sourozenců
- Studijní anamnéza, velikost domácnosti, pobyt v zahraničí, nařízení karantény v minulosti
- Příznaky onemocnění dýchacích cest od začátku roku
- Důvod vstupu do studie

8.3 Záznam a evidence údajů

Papírové dotazníky budou převedeny do strukturovaného elektronického záznamu pracovníky realizačního týmu centralizovaně nebo lokálně. Svoz bude zajištěn. Papírové dotazníky a IS budou uchovány na ÚZIS ČR po nezbytně nutnou dobu, poté budou po dohodě s investigátory skartovány. Souhlasy zahrnující uchování biologického materiálu budou uchovány po dobu uchování biologického materiálu ze studie (týká se kohort subjektů hodnocení poskytujících venózní krev).

V souladu se souhlasem se zpracováním osobních údajů budou k záznamům doplněny relevantní údaje o zdravotním stavu z Národního zdravotnického informačního systému.

9 Literatura

1. Campbell, H., Biloglav, Z., & Rudan, I. (2008). Reducing bias from test misclassification in burden of disease studies: use of test to actual positive ratio—new test parameter. *Croatian medical journal*, 49(3), 402-414.
2. Humphry RW, Cameron A, Gunn GJ, 2004. A practical approach to calculate sample size for herd prevalence surveys. *Prev. Vet. Med.* 65: 173-188.
3. Liu, Ying, Liu, Yueping, Diao, B., Ren, F., Wang, Y., Ding, J., Huang, Q., 2020. Diagnostic Indexes of a Rapid IgG/IgM Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 (preprint). *Infectious Diseases (except HIV/AIDS)*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20044883>.
4. Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., Sun, R., Wang, Y., Hu, B., Chen, W., Zhang, Y., Wang, J., Huang, B., Lin, Y., Yang, J., Cai, W., Wang, X., Cheng, J., Chen, Z., Sun, K., Pan, W., Zhan, Z., Chen, L., Ye, F., 2020. Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *J. Med. Virol.* jmv.25727. <https://doi.org/10.1002/jmv.25727>.