



Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO

univerzitetni
klinični center ljubljana
University Medical Centre Ljubljana

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za računalništvo in informatiko*

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za družbene vede*



NACIONALNA RAZISKAVA O RAZŠIRJENOSTI BOLEZNI COVID-19 V SLOVENIJI

KONČNO POROČILO

Ljubljana, 09. 12. 2020

Spoštovani udeleženci Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji,

Iskreno se zahvaljujemo za vaše tvorno sodelovanje, odgovarjanje na naše klice ter posredovanje informacij o vašem zdravstvenem stanju in zdravstvenem stanju vaših bližnjih v celotnem obdobju trajanja nacionalne raziskave. Zelo cenimo vaše vztrajanje do zaključka raziskave. Vsi podatki, ki ste nam jih posredovali, so popolnoma zaupne narave in so že trajno anonimizirani. Enako velja za vaše vzorce, ki so po opravljenih testiranjih na COVID-19 tudi že trajno anonimizirani. To pomeni, da so vsi vaši podatki in vzorci shranjeni v obliki, ki onemogoča osebno prepoznavo. Pridobljeni podatki bodo uporabljeni izključno za raziskovalne namene.

Prepričani smo, da bodo rezultati nacionalne raziskave prispevali k boljšemu poznavanju značilnosti bolezni COVID-19 in njene razširjenosti med ljudmi ter na ta način pripomogli k njenemu učinkovitejšemu obvladovanju.

Vsi prebivalci Slovenije trenutno zelo neposredno občutimo, da se pandemija žal še ne umirja, vendar iskreno upamo, da bomo tudi to težko obdobje prebrodili s solidarnostjo, sodelovanjem in optimizmom.

Vam in vašim bližnjim želimo veliko zdravja in še enkrat HVALA za vaše zaupanje in sodelovanje!

KAZALO VSEBINE

I. SEZNAM PRILOG	6
II. SPREMNA BESEDA	7
III. OPREDELITEV KLJUČNIH POJMOV, UPORABLJENIH V KONČNEM POROČILU NACIONALNE RAZISKAVE	9
IV. RAZŠIRJEN POVZETEK	11
1. UVOD.....	16
2. PREISKOVANCI IN METODE	18
2.1 Zasnova raziskave	19
2.1.1 Trajanje raziskave.....	20
2.2 Opis izbire oseb, povabljenih v raziskavo.....	20
2.2.1 Vzorčni načrt.....	20
2.2.2 Velikost vzorca	22
2.2.3 Struktura vzorca	24
2.3 Merila za vključitev, nevljučitev, izključitev v/iz raziskave	26
2.4 Klicni center	27
2.5 Zbiranje kliničnih vzorcev v prvi fazi raziskave	27
2.5.1 Odvzem brisa zgornjih dihal in vzorcev krvi v prvi fazi raziskave	27
2.5.2 Transport kliničnih vzorcev v prvi fazi raziskave	28
2.5.3 Zbiranje podatkov o kliničnih simptomih in znakih ter kontaktih preiskovancev v prvi fazi raziskave	28
2.6 Testiranje kliničnih vzorcev odvzetih v prvi fazi raziskave	28
2.6.1 Testiranje brisov nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA v vzorcih odvzetih v prvi fazi raziskave	28
2.6.2 Testiranje vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG v začetku maja 2020	31
2.6.3 Testiranje vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV- 2 S novembra 2020.....	39
2.6.3.1 Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2	40
2.6.3.2 Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S	43
2.6.4 Izvidi in sporočanje rezultatov udeležencem prve faze raziskave	46
2.7 Longitudinalna aktivna in pasivna kohortna raziskava	46
2.8 Zbiranje kliničnih vzorcev ob zaključku druge faze raziskave.....	47
2.9 Testiranje vzorcev krvi odvzetih ob zaključku druge faze raziskave	47
2.9.1 Testiranje vzorcev krvi odvzetih ob zaključku druge faze raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S novembra 2020	48

2.9.2 Izvidi in sporočanje rezultatov testiranja vzorcev krvi zbranih ob zaključku druge faze raziskave	48
2.10 Statistična obdelava podatkov	49
2.10.1 Enostavni slučajen vzorec	50
2.10.2 Popravek za specifičnost in občutljivost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG za oceno seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 05. 05. 2020 in z dne 15. 06. 2020	51
2.10.3 Popravek za neodziv	54
2.10.4 Popravek za specifičnost in občutljivost testov Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S za oceno seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 25. 11. 2020 ter za oceno seroprevalence v slovenski populaciji oktobra/novembra 2020	55
2.10.4.1 Statistično modeliranje – modeliranje deleža za dva testa	57
2.10.4.2 Popravek za spol, starostne skupine in regije za dva testa	58
2.10.5 Popravek za specifičnost in občutljivost testa cobas SARS-CoV-2 Test za oceno okuženosti slovenske populacije konec aprila 2020	60
2.11 Razvoj aplikacije in informacijska podpora	60
3. REZULTATI	68
3.1 Reprezentativnost vzorca za prvo fazo raziskave	68
3.2 Poročilo klicnega centra	70
3.3 Poročilo terenskega dela za prvo fazo raziskave	72
3.4 Ocena okuženosti oz. razširjenosti aktivne okužbe s SARS-CoV-2 konec aprila 2020 v Sloveniji	73
3.5 Ocena seroprevalence oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki so imeli v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020	73
3.5.1 Ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 05. 05. 2020 - osnovna in popravljena glede na specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG	74
3.5.2 Popravljena ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 glede na oceno specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG z dne 15. 06. 2020	76
3.5.3 Dokončna ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 po dodatnem testiranju vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S z dne 25. 11. 2020	77
3.6 Rezultati šestmesečne longitudinalne aktivne in pasivne kohortne raziskave	78
3.6.1 Rezultati prvega obdobja sledenja (18. 05. 2020 – 24. 05. 2020)	79
3.6.2 Rezultati drugega obdobja sledenja (08. 06. 2020 – 15. 06. 2020)	80
3.6.3 Rezultati tretjega obdobja sledenja (29. 06. 2020 – 05. 07. 2020)	81
3.6.4 Rezultati četrtega obdobja sledenja (20. 07. 2020 – 27. 07. 2020)	82
3.6.5 Rezultati petega obdobja sledenja (10. 08. 2020 – 17. 08. 2020)	83
3.6.6 Rezultati šestega obdobja sledenja (01. 09. 2020 – 07. 09. 2020)	85

3.6.7 Rezultati sedmega obdobja sledenja (21. 09. 2020 – 29. 09. 2020).....	86
3.6.8 Rezultati osmega obdobja sledenja (10. 10. 2020 – 14. 10. 2020).....	87
3.6.9 Povzetek rezultatov šestmesečne longitudinalne aktivne in pasivne kohortne raziskave (zbirni rezultati osmih obdobjih sledenja)	88
3.7 Zbiranje kliničnih vzorcev ter poročilo terenskega dela ob zaključku druge faze raziskave	96
3.8 Reprezentativnost vzorca za oceno seroprevalence SARS CoV-2 v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020)	99
3.9 Ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020).....	103
4. DISKUSIJA.....	105
4.1 Neodgovori.....	105
4.2 Pristranskost zaradi neodgovorov	107
4.3 Uteževanje	110
4.4 Točkovne in intervalne ocene	111
4.5 Umestitev izsledkov slovenske nacionalne raziskave v mednarodni prostor	112
4.5.1 Populacijske raziskave okuženosti oz. razširjenosti trenutno potekajočih aktivnih okužb s SARS-CoV-2	114
4.5.2 Populacijske raziskave seroprevalence SARS-CoV-2 oz. deleža populacije, ki je v trenutku testiranja imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2.....	115
4.5.3 Populacijske raziskave, ki istočasno merijo okuženost in seroprevalenco .	121
5. LITERATURA.....	123
SEZNAM SODELUJOČIH RAZISKOVALCEV.....	132
ZAHVALA.....	135

I. SEZNAM PRILOG

PRILOGA 1	Anonimni vprašalnik raziskave
PRILOGA 2	Spremni dopis preiskovancem
PRILOGA 3	Izjava o zavestni in svobodni privolitvi
PRILOGA 4	Pojasnilo o raziskavi
PRILOGA 5	Vprašalnik ob sledenju
PRILOGA 6	Članek "Low prevalence of active COVID-19 in Slovenia: a nationwide population study on a probability-based sample"

II. SPREMNA BESEDA

Preliminarni rezultati Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji so bili slovenski javnosti prvič predstavljeni na novinarski konferenci 06. 05. 2020 (<https://vzivo.sta.si/>). Preliminarni rezultati so bili predstavljeni v luči spoznanj in dejstev, ki so bili mednarodni znanstveni javnosti poznani konec aprila 2020 oz. na začetku maja 2020.

Zaradi velikega interesa tuje javnosti je bilo gradivo, ki je bilo predstavljeno na novinarski konferenci, in nekateri pripadajoči dokumenti sredi maja 2020 prevedeno v angleščino in posredovano slovenski ambasadorki pri Organizaciji za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD) ter glavnemu tajniku OECD za javno zdravje, ki sta poročilo o zasnovi in preliminarnih izsledkih slovenske raziskave delila z ostalimi državami članicami OECD za interno uporabo.

V **preliminarnem poročilu – različica 1.0, z dne 30. 06. 2020**, je bila povzeta metodologija raziskave, s posebnim poudarkom na opisu izbrane populacije, izbiri diagnostičnih testov, uporabljenih v raziskavi, preliminarnih rezultatih prvega kroga Nacionalne raziskave ter rezultatih prvih dveh obdobj longitudinalnega spremljanja sodelujočih. Rezultati so bili predstavljeni in ovrednoteni v luči spoznanj, ki v času izvajanja prvega dela raziskave ter predstavitve preliminarnih rezultatov še niso bili na voljo in tega, kar smo in so raziskovalci v mednarodnem prostoru odkrili o novem SARS-CoV-2 do sredine junija 2020.

V **preliminarnem poročilu – različica 2.0, z dne 08. 09. 2020**, so bili predstavljeni nadaljnji rezultati longitudinalnega spremljanja sodelujočih in novi izsledki populacijskih raziskav, ki so na podlagi naključnega ali reprezentativnega vzorca prebivalcev, podale oceno razširjenosti (okuženosti in seroprevalence) okužb s SARS-CoV-2 in so bile objavljene v recenzirani znanstveni literaturi do konca avgusta 2020.

V pričujočem, **končnem poročilu** Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji povzemamo vse za javnost pomembne znanstvene in strokovne izsledke raziskave. Končno poročilo nacionalne raziskave je napisano kot relativno kompleksno znanstveno poročilo. Da bi bralcem olajšali razumevanje, smo v naslednjem poglavju opredelili in razložili tri ključne epidemiološke pojme, ki jih uporabljamo v končnem poročilu in zanje podali praktične primere.

Raziskovalci Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji nameravamo izsledke raziskave objaviti v več člankih v recenziranih medicinskih revijah. Prvi članek z naslovom »*Low prevalence of active COVID-19 in Slovenia: a nationwide population study on a probability-based sample*« (priloga 6) je bil objavljen v reviji *Clinical Microbiology and Infection* s faktorjem vpliva IF=7,117 (2019), ki je v globalnem merilu četrta najboljša revija v kategoriji infekcijskih bolezni (Infectious Diseases).

III. OPREDELITEV KLJUČNIH POJMOV, UPORABLJENIH V KONČNEM POROČILU NACIONALNE RAZISKAVE

Okuženost = Delež udeležencev nacionalne raziskave s trenutno potekajočo aktivno okužbo s SARS-CoV-2. Določena je bila s PCR testiranjem brisov nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA v prvi fazi nacionalne raziskave, da bi odgovorili na vprašanje, kolikšen delež ljudi v Sloveniji je bil konec aprila 2020 aktivno okužen z virusom SARS-CoV-2 in niso bili odkriti v okviru rutinskega testiranja in sledenja kontaktov.

Kumulativna okuženost = Minimalen delež določene populacije s PCR potrjeno okužbo s SARS-CoV-2. V poročilu uporabljamo dve kumulativni okuženosti: (i) minimalni delež s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 ugotovljen v populaciji udeležencev **nacionalne raziskave** v času trajanja raziskave (20. 04. 2020 – 10. 11. 2020); in (ii) minimalni delež s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v **celotni populaciji Slovenije**, ocenjen na osnovi števila s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2, kot so jih dnevno poročali slovenski laboratoriji in ki izhaja iz rutinskega in samoplačniškega programa testiranja (vir: <https://www.nijz.si/sl/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19>). V obeh zgoraj navedenih populacijah je kumulativna okuženost verjetno višja od določene, zagotovo pa ni nižja.

Seroprevalenca = Delež udeležencev nacionalne raziskave, ki je v trenutku testiranja imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2. Določena je bila s serološkim testiranjem vzorcev krvi na prisotnost anti-SARS-CoV-2 v **prvi fazi in ob zaključku druge faze nacionalne raziskave**, da bi odgovorili na vprašanje, koliko ljudi v Sloveniji je imelo konec aprila 2020 in oktobra/novembra protitelesa proti virusu SARS-CoV-2. Za nastanek protiteles anti-SARS-CoV-2 je potreben določen čas. Protitelesa se običajno začnejo pojavljati nekaj dni po laboratorijskem dokazu okužbe s PCR v brisu nosnega dela žrela, velika večina okuženih ima merljivo količino protiteles šele 14-30 dni po laboratorijskem dokazu okužbe s PCR. Zato seroprevalence ugotovljene na določen dan, zlasti v pogojih ko se število okuženih dnevno izjemno hitro povečuje, ni mogoče enačiti z deležem oseb v populaciji, ki je do tistega dne prišel v stik z virusom. Primer: če je bila popravljena ocena spodnje meje seroprevalence na dan 11. 11. 2020 ocenjena na 4,16 % (95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]), to pomeni, da na osnovi rezultatov nacionalne raziskave ocenjujemo, da je imelo

11. 11. 2020 **vsaj** 87.188 (ali še natančneje: med 64.972 in 112.967) prebivalcev Slovenije v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2. To pa **ne pomeni**, da je do 11. 11. 2020 samo toliko ljudi prišlo v stik z virusom SARS-CoV-2. V stik z virusom je do 11. 11. 2020 namreč prišlo več ljudi, vendar pri njih od okužbe še ni poteklo dovolj časa, da bi se razvila merljiva količina protiteles proti virusu SARS-CoV-2. Pod predpostavko, da se razmerje med kumulativno okuženostjo in seroprevalenco v 14-dnevnem obdobju med 28. 10. 2020 in 11. 11. 2020 ni preveč spreminjalo, bi lahko predvidevali, da popravljena ocena spodnje meje seroprevalence za 11. 11. 2020 (4,16 %, 95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]) predstavlja minimalen delež oseb v slovenski populaciji, ki je prišel v stik s SARS-CoV-2 vsaj 14 dni (do enega meseca) pred dnevom ocene seroprevalence.

IV. RAZŠIRJEN POVZETEK

Pandemija okužbe z novim koronavirusom SARS-CoV-2 predstavlja verjetno največji izziv za celotno človeštvo po 2. svetovni vojni. Odkrivanje in sledenje širjenja okužb s SARS-CoV-2 še vedno spremljajo negotovost in številne neznanke glede ključnih značilnosti povzročitelja, zlasti njegove nalezljivosti in sposobnosti širjenja v človeški populaciji.

Nacionalna raziskava o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji je bila zasnovana kot monocentrična interdisciplinarna raziskava nacionalnega pomena. Izvedbo raziskave je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko. Nacionalna raziskava je potekala v dveh fazah in sicer od 20. 04. 2020 do 10. 11. 2020.

Najpomembnejši in najuporabnejši cilj **prve faze nacionalne raziskave** je bila ocena okuženosti splošne populacije s SARS-CoV-2 v Sloveniji konec aprila 2020. Na verjetnostnem vzorcu populacije smo skušali v najkrajšem možnem času odgovoriti na vprašanje, koliko ljudi v Sloveniji je bilo konec aprila 2020 aktivno okuženih z virusom SARS-CoV-2 in niso bili odkriti v okviru rutinskega testiranja in sledenja kontaktov. Statistično reprezentativen verjetnostni vzorec prebivalcev Slovenije glede na starost, spol in regijo bivališča je sredi aprila 2020 pripravil Center za raziskovanje javnega mnenja in množičnih komunikacij Fakultete za družbene vede Univerze v Ljubljani (UL) v sodelovanju s Statističnim uradom Republike Slovenije. Velikost vzorca za raziskavo ($n = 3.000$) je bila določena kot ravnotežje med zahtevano natančnostjo ocen in časovnimi omejitvami, ki so se nanašale predvsem na zahtevo, da ocenimo okuženost splošne populacije Slovenije v največ dveh tednih. Vse izbrane osebe smo kontaktirali po pošti in tiste z javno dostopno telefonsko številko dodatno po telefonu. Zaradi strogih etičnih izhodišč, ki veljajo za vse medicinske raziskave v Sloveniji, v nacionalni raziskavi ni bilo dovoljeno nikakršno kontaktiranje in spraševanje oseb, ki se niso odzvale na vabilo, ali so sodelovanje v raziskavi odklonile.

Na Fakulteti za računalništvo in informatiko UL se je sredi aprila 2020 oblikovala močna razvojna ekipa, ki je vzpostavila informacijsko infrastrukturo za izvedbo nacionalne raziskave.

Za potrebe rekrutiranja v raziskavo je izbrani klicni center konec aprila 2020 sprejel 1.277 klicev udeležencev raziskave in izvedel več kot 3.171 odhodnih klicev.

Osebam, ki so pristale na sodelovanje v raziskavi (n = 1.368), so ustrezno usposobljeni zdravstveni delavci od 20. 04. 2020 do 01. 05. 2020 odvzeli bris nosnega dela žrela za molekularno PCR testiranje na SARS-CoV-2 RNA za oceno **okuženosti** oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave s trenutno potekajočo aktivno okužbo s SARS-CoV-2 in vzorec krvi za testiranje na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 za oceno **seroprevalence** oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki je v trenutku testiranja imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2. Usposobljeni zdravstveni delavci so v 12 dnevih opravili 84 enot reševalnih prevozov, prevozili skupno 24.950 km in samo za odvzeme vzorcev porabili več kot 2.000 delovnih ur. Udeležence raziskave smo tudi anketirali o prisotnosti in trajanju morebitnih simptomov okužbe zgornjih dihal in splošnem počutju, številu in značilnostih kontaktov znotraj gospodinjstva in izven njega, obliki dela in različnih aktivnostih.

Pri statistični analizi smo ubrali bayesovski pristop, ki omogoča preprostejše upoštevanje predhodnih informacij, še posebej, ko le-te vsebujejo negotovost (kot je npr. specifičnost testa), in s tem olajša pripravo primernih statističnih modelov. Obenem je interpretacija bayesovskih intervalov preprostejša od interpretacije klasičnih intervalov zaupanja, kjer je interval slučajna spremenljivka.

Za oceno **okuženosti slovenske populacije konec aprila 2020** smo pri 1.366 osebah opravili molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA z uporabo testa cobas SARS-CoV-2. Vzorčno povprečje okuženih je bilo 0,15 % (n = 1.363; aposteriorno upanje = 0,18 %; 95 % CI (CI; *angl. bayesian confidence interval, credible interval*) = [0,03–0,47 %]; 95 % HDR (*angl. highest density region; območje največje gostote*) = [0,01–0,41 %]). Popravek za specifičnost testa ni bil potreben. Aposteriorno upanje prevalence po MRP (popravek za neodziv) je bilo 0,15 % (95 % CI = [0,02–0,44%]; 95 % HDR = [0,01–0,37 %]). Upamo, da je bila informacija o okuženosti s SARS-CoV-2 v splošni slovenski populaciji konec aprila 2020, pridobljena v prvi fazi nacionalne raziskave skupaj s podatki, ki so prihajali iz rednega programa testiranja, v veliko pomoč odločevalcem pri sprejemanju ustreznih odločitev o tem, kdaj začeti z nadzorovanim kratkoročnim in dolgoročnim rahljanjem ukrepov, uvedenih z namenom omejevanja epidemije, postopnim odpiranjem trgovin, šol, podjetij in ponovnim zagonom gospodarstva na začetku maja 2020.

Za oceno **seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020** smo pri 1.316 osebah na začetku maja 2020 opravili testiranje vzorcev krvi na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG z uporabo testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG. Iste vzorce krvi smo novembra 2020 ponovno testirali na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S. Za kar najbolj zanesljivo oceno spodnje in zgornje meje ocene seroprevalence, smo podatke v obeh fazah nacionalne raziskave analizirali v dveh časovnih točkah – dan po zaključku testiranja in 14 dni pred začetkom testiranja. Na dan 02. 05. 2020 je bila nepopravljena spodnja meja ocene seroprevalence 0,87 % (95 % HDR = [0,41 – 1,38 %]), po poststratifikaciji se spodnja meja ocene seroprevalence praktično ni spremenila in je bila na dan 02. 05. 2020 ocenjena na 0,88 % (95 % HDR = [0,41 – 1,38 %]). Na dan 06. 04. 2020 je bila nepopravljena zgornja meja ocene seroprevalence 0,91 % (95 % HDR = [0,40 – 1,42 %]), po poststratifikaciji se tudi zgornja meja ocene seroprevalence praktično ni spremenila in je bila na dan 06. 04. 2020 ocenjena na 0,89 % (95 % HDR = [0,42 – 1,41 %]).

Druga faza raziskave, ki je bila zasnovana kot longitudinalna aktivna in pasivna kohortna raziskava v skupnem trajanju 6 mesecev je potekala od 03. 05. 2020 do 10. 11. 2020. V drugi fazi raziskave smo pri vseh udeležencih aktivno in pasivno spremljali zdravstveno stanje in počutje s periodičnim, tritedenskim preverjanjem pojava kliničnih simptomov in znakov, značilnih za okužbo s SARS-CoV-2 po telefonu. Če smo ob spremljanju ugotovili, da so se pri katerem izmed udeležencev raziskave in/ali članu gospodinjstva pojavili klinični simptomi in znaki, značilni za okužbo s SARS-CoV-2, ali je to udeleženec aktivno javil sam kadarkoli v poteku raziskave, smo mu v primeru, da od začetka simptomov in znakov ni minilo več kot 14 dni, ponovno odvzeli bris nosnega dela žrela ter ga/jih testirali v najkrajšem možnem času. V primeru klinično izrazitejše simptomatike smo udeležencu raziskave svetovali tudi ustrezno zdravniško obravnavo ter pomagali pri takojšnjem dostopu do testiranja na SARS-CoV-2. Udeležence nacionalne raziskave smo v osmih posameznih sledenjih, skupno poklicali 10.924-krat, za kar smo skupno porabili 655,5 delovnih ur. Takoj po zaključku vsakega od osmih obdobj sledenja smo odločevalce o rezultatih posameznega sledenja obvestili po elektronski pošti. Kar 1.290 izmed 1.368 preiskovancev (94,3 %) je sodelovalo v vsaj sedmih sledenjih. Tekom osmih sledenj je skupno 439 preiskovancev poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini. Tekom celotnega

obdobja nacionalne raziskave smo dokazali prisotnost SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela pri 32 (2,3 %) udeležencih. Dinamika kumulativne okuženosti oz. minimalnega deleža s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 ugotovljenega v populaciji udeležencev nacionalne raziskave je v celotnem času trajanja nacionalne raziskave dokaj dobro predvidevala dinamiko in napovedovala kumulativno okuženost slovenske populacije oz. minimalni delež s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v celotni populaciji Slovenije, ugotovljen na osnovi števila s PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2, kot so jih dnevno poročali slovenski laboratoriji in ki izhajajo iz rutinskega in samoplačniškega programa testiranja. Rezultati prvih petih obdobj sledenja so vsakokrat ponovno potrjevali zelo nizko raven aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji tekom poletnih mesecev 2020, ki so jo izkazovali rezultati rednega programa testiranja. Rezultati šestega obdobja sledenja udeležencev nacionalne raziskave (01. – 07. 09. 2020) so prvič jasno napovedali ponoven porast aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji, osmo obdobje sledenja (10. – 14. 10. 2020; več kot dvakratni porast kumulativne okuženosti) je odločevalcem jasno nakazalo, da je število aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji zraslo na raven, ki zahteva čimprejšnjo ponovno zaostritev ukrepov za nadaljnje preprečevanje širjenja okužbe s SARS-CoV-2.

Od 1.368 oseb, ki so bile vključene v prvo fazo raziskave, sta dve osebi umrli (nobena od smrti ni bila povezana s COVID-19) (0,1 %), šest oseb se je odselilo v tujino (0,4 %), 115 oseb je prekinilo sodelovanje (8,4 %), 1.245 oseb (91 %) pa je potrdilo ponovno pripravljenost za odvzem krvi ob zaključku druge faze raziskave za oceno seroprevalence ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020).

Odvzem vzorcev krvi ob zaključku druge faze raziskave je v prvem tednu (17. 10. 2020 – 25. 10. 2020) potekal na različnih stacionarnih odvzemnih mestih po Sloveniji ter naslednja dva tedna (26. 10. 2020 – 10. 11. 2020) na domovih udeležencev. Usposobljeni zdravstveni delavci so v 20 dnevih opravili 77 enot reševalnih prevozov, prevozili skupno 17.129 km in samo za odvzeme vzorcev porabili več kot 1.800 delovnih ur.

Za oceno **seroprevalence v slovenski populaciji oktobra/novembra 2020** smo pri 1.211 osebah opravili testiranje vzorca krvi na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S. Na dan 11. 11.

2020 je bila nepopravljena ocena spodnje meje seroprevalence 4,09 % (95 % HDR = [3,02 – 5,22 %]), po poststratifikaciji se je ocena spodnje meje seroprevalence rahlo zvišala in je bila na dan 11. 11. 2020 ocenjena na 4,16 % (95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]). Na dan 03. 10. 2020 je bila nepopravljena ocena zgornje meje seroprevalence 4,32 % (95 % HDR = [3,19 – 5,43 %]), po poststratifikaciji se je tudi ocena zgornje meje ocene seroprevalence delno zvišala in je bila na dan 03. 10. 2020 ocenjena na 4,40 % (95 % HDR = [3,26– 5,60 %]).

Zaradi naravnega poteka okužbe s SARS-CoV-2, seroprevalence ugotovljene na določen dan, zlasti v pogojih ko se število novookuženih dnevno izjemno hitro povečuje, ni mogoče enačiti z deležem oseb v populaciji, ki je do tistega dne že prišel v stik z virusom. Lahko pa, pod predpostavko, da se razmerje med kumulativno okuženostjo in seroprevalenco v določenem obdobju ne spreminja preveč, predvidevamo, da spodnja meja ocene seroprevalence za določen dan predstavlja minimalen delež oseb v slovenski populaciji, ki je prišel v stik s SARS-CoV-2 vsaj 14 dni (do enega meseca) pred dnevom ocene seroprevalence.

Po podatkih iz recenzirane znanstvene literature, je slovenska nacionalna raziskava druga objavljena nacionalna raziskava okuženosti s SARS-CoV-2 ter prva raziskava, ki je uporabila kombinirani diagnostični pristop za istočasno oceno okuženosti in seroprevalence, na verjetnostnem vzorcu, reprezentativnem za celotno državo, ki vključuje vse starostne kategorije. Slovenska nacionalna raziskava je zaenkrat tudi edina, ki je vključevala longitudinalno aktivno in pasivno spremljanje udeležencev po vključitvi v raziskavo.

1. UVOD

Pandemija okužbe z novim koronavirusom SARS-CoV-2 predstavlja verjetno največji izziv za celotno človeštvo po 2. svetovni vojni. Odkrivanje in sledenje širjenja okužb s SARS-CoV-2 še vedno spremljajo negotovost in številne neznanke glede ključnih značilnosti povzročitelja, zlasti njegove nalezljivosti in sposobnosti širjenja v človeški populaciji. Države se s pandemijo COVID-19 spopadajo bolj ali manj uspešno. Na uspešnost omejevanja pandemije v veliki meri vplivata hitrost in obseg uvajanja ustreznih zaščitnih ukrepov, ki zmanjšujejo možnost hitrega širjenja virusa med populacijo in s tem omogočajo, da je priliv novih bolnikov v bolnišnice še obvladljiv in vzdržen za zdravstveni sistem. Za obvladovanje pandemije je ključnega pomena tudi ustrezno testiranje s preverjenimi, zanesljivimi in validiranimi laboratorijskimi testi, ki jih izvaja usposobljeno laboratorijsko osebje pod nadzorom usposobljenih strokovnjakov, hitro obveščanje o rezultatih ter natančno epidemiološko poizvedovanje o kontaktih z ustreznimi navodili za morebitne okužene in njihove kontakte. Trenutno smo pred odobritvijo prvih cepiv proti okužbi s SARS-CoV-2. Kakšen bo njihov vpliv na obvladovanje pandemije, bomo lahko ugotovili šele po cepljenju velikega dela populacije.

Nadzor nad okužbami s SARS-CoV-2 se je v Sloveniji po navodilih Ministrstva za zdravje konec aprila 2020 osredotočil predvsem na testiranje bolnikov s težjim potekom bolezni, bolnike z blažjim potekom bolezni pa se je testiralo le v primeru, če so bili starejši od 60 let, imeli dejavnike tveganja za težji potek (visok krvni tlak, sladkorna bolezen, srčno-žilne, pljučne, ledvične ali jetrne bolezni) ali če je šlo za osebe z imunskimi pomanjkljivostmi, ne glede na starost. Nacionalna priporočila za testiranje so se med potekom pandemije večkrat spremenila, prav tako kot priporočila za sledenje tesnih stikov. Na podlagi selektivnega testiranja samo tistega dela populacije, ki je izpolnjevalo trenutne kriterije za testiranje, je bilo zato aprila 2020 nemogoče oceniti, kakšen delež splošne populacije v Sloveniji je dejansko aktivno okužen s SARS-CoV-2 oz. t.i. okuženost.

Najpomembnejši in praktično najuporabnejši cilj prve faze nacionalne raziskave je bila ocena okuženosti splošne populacije s SARS-CoV-2 v Sloveniji konec aprila 2020. Na verjetnostnem vzorcu populacije smo skušali v najkrajšem možnem času odgovoriti na vprašanje, koliko ljudi v Sloveniji je bilo konec aprila 2020 aktivno okuženih z virusom

SARS-CoV-2 in niso bili odkriti v okviru rutinskega testiranja in sledenja kontaktov. Upamo, da je bila informacija o okuženosti s SARS-CoV-2 v splošni populaciji, pridobljena v nacionalni raziskavi skupaj s podatki, ki so prihajali iz rednega programa testiranja, v veliko pomoč odločevalcem pri sprejemanju ustreznih odločitev o tem, kdaj začeti z nadzorovanim kratkoročnim in dolgoročnim rahljanjem ukrepov, uvedenih z namenom omejevanja epidemije okužb s SARS-CoV-2, postopnim odpiranjem trgovin, šol, podjetij in ponovnim zagonom gospodarstva na začetku maja 2020.

Natančno šestmesečno aktivno in pasivno longitudinalno spremljanje dobro definirane kohorte udeležencev nacionalne raziskave in njihovih družinskih članov, ki smo ga izvajali od maja do oktobra 2020, je predstavljalo dodatno pomembno orodje, za katerega upamo, da je odločevalcem skupaj z drugimi uradnimi podatki, ki so prihajali iz rutinskega diagnostičnega dela testiranja ter testiranja samoplačnikov, omogočalo pravočasno preventivno ukrepanje ob poslabšanju epidemiološkega stanja v državi.

Po zaključeni drugi fazi raziskave smo iz vzorcev krvi odvzetih konec aprila 2020 in oktobra/novembra 2020, kolikor je bilo mogoče natančno, ocenili seroprevalenco SARS-CoV-2 v splošni populaciji Slovenije, torej delež ljudi v naši državi, ki je imel v času testiranja v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2.

2. PREISKOVANCI IN METODE

Raziskava je bila zasnovana kot monocentrična interdisciplinarna raziskava nacionalnega pomena. Nosilec projekta je bil Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete (MF) Univerze v Ljubljani (UL), ki je raziskavo koordiniral in kjer se je izvajalo celotno molekularno in serološko testiranje na SARS-CoV-2. Podporo pri izvedbi posameznih segmentov raziskave so nudili sodelavci iz naslednjih ustanov:

- Fakulteta za družbene vede UL, Center za raziskovanje javnega mnenja in množičnih komunikacij in Center za družboslovno informatiko (priprava statistično reprezentativnega vzorca prebivalcev Slovenije v sodelovanju s Statističnim uradom Republike Slovenije (SURs), svetovanje in pomoč pri izvedbi vzorčenja in anketiranja, analiza vzorca in uteževanje);
- Fakulteta za računalništvo in informatiko UL, Laboratorij za bioinformatiko (celovita informacijska in podatkovno-analitična podpora projekta, ki je vključevala pripravo centralne baze za zbiranje podatkov, razvoj spletne aplikacije za vnos podatkov, vzpostavitev spletnega vmesnika za nadzor poteka študije, vzpostavitev varnega okolja za shranjevanje administrativnih, kliničnih in z vprašalnikom pridobljenih podatkov, celovita anonimizirana analiza podatkov raziskave);
- Univerzitetni klinični center Ljubljana (sodelovanje pri klinični obravnavi preiskovancev);
- Klinika za infekcijske bolezni in vročinska stanja (sodelovanje pri klinični obravnavi preiskovancev);
- Medicinska fakulteta UL, Katedra za infekcijske bolezni in epidemiologijo (pomoč pri epidemiološki obravnavi in epidemiološki analizi podatkov);
- Reševalna služba Pacient d.o.o. (odvzem kliničnih vzorcev na terenu).

Izvajanje nacionalne raziskave sta finančno omogočila Vlada Republike Slovenije (sklep 16600-2/2020/7 z dne 21. 05. 2020) in Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo UL MF.

2.1 Zasnova raziskave

Raziskava je bila zasnovana v dveh fazah:

- Prva faza: presečna raziskava na verjetnostnem vzorcu populacije za čimbolj natančno oceno okuženosti oz. razširjenosti trenutno potekajočih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v Sloveniji ter oceno seroprevalence oz. deleža slovenske populacije, ki je imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020:
 - pripravljen je bil verjetnostni vzorec populacije prebivalcev Slovenije, vsi so bili kontaktirani po pošti in tisti z javno dostopno telefonsko številko dodatno po telefonu;
 - osebam, ki so pristale na sodelovanje v raziskavi, so ustrezno usposobljeni zdravstveni delavci odvzeli bris nosnega dela žrela za molekularno PCR testiranje na SARS-CoV-2 RNA za oceno okuženosti in vzorec krvi za serološko testiranje na protitelesa anti-SARS-CoV-2 za oceno seroprevalencev slovenski populaciji konec aprila 2020;
 - udeleženci nacionalne raziskave so bili anketirani o prisotnosti in trajanju morebitnih simptomov okužbe zgornjih dihal in splošnem počutju, številu in značilnostih kontaktov znotraj gospodinjstva in izven njega, obliki dela in različnih aktivnostih.

- Druga faza: longitudinalna aktivna in pasivna kohortna raziskava v skupnem trajanju 6 mesecev. Ob zaključku druge faze je bil izveden ponoven odvzem vzorca krvi za serološko testiranje na protitelesa anti-SARS-CoV-2 za oceno seroprevalence oz. deleža slovenske populacije, ki je imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 oktobra/novembra 2020:
 - udeležence raziskave smo vsake 3 tedne aktivno spremljali s telefonskim pogovorom, ki so ga opravljali izpraševalci z ustreznim medicinskim znanjem in izkušnjami;
 - v celotnem obdobju šestmesečnega trajanja druge faze raziskave so udeleženci raziskave lahko kadarkoli telefonsko ali po elektronski pošti kontaktirali koordinatorje raziskave;

- ob pojavu katerega od kliničnih simptomov in znakov okužbe dihal smo se z udeležencem raziskave v primeru, da od začetka simptomov in znakov ni minilo več kot 14 dni, dogovorili za morebitni odvzem brisa nosnega dela žrela in/ali krvi in takojšnje testiranje; to nam je omogočalo aktivno spremljanje širjenja okužbe s SARS-CoV-2 na verjetnostnem vzorcu prebivalcev Slovenije. Simptomatskim udeležencem raziskave in članom gospodinjstva smo ob negativnem testu na SARS-CoV-2 RNA, če je bilo potrebno, omogočali tudi molekularno testiranje na druge povzročitelje okužb dihal. Ob pozitivnem testu na SARS-CoV-2 RNA smo udeležencem raziskave svetovali ustrezno zdravniško obravnavo;
- šest mesecev po začetku raziskave smo udeležencem raziskave ponovno odvzeli vzorec krvi za serološko testiranje na protitelesa anti-SARS-CoV-2 za oceno seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji oktobra/novembra 2020.

2.1.1 Trajanje raziskave

Čas izvajanja prve faze raziskave: 20. 04. 2020 – 03. 05. 2020.

Čas izvajanja druge faze raziskave: 03. 05. 2020 – 10. 11. 2020.

2.2 Opis izbire oseb, povabljenih v raziskavo

Statistično reprezentativen verjetnostni vzorec prebivalcev Slovenije glede na starost, spol in regijo bivališča s podatki o stalnem bivališču je sredi aprila 2020 pripravil Center za raziskovanje javnega mnenja in množičnih komunikacij Fakultete za družbene vede UL v sodelovanju s SURS.

2.2.1 Vzorčni načrt

Vzorec nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji je - tako kot vsi vzorci za zdravstvene, družboslovne ter uradne raziskave iz programa državne statistike v Sloveniji – temeljil na centralnemu registru prebivalstva (CRP), ki ga vzdržuje Ministrstvo za notranje zadeve, za statistično uporabo pa je pristojen SURS.

Slovenija ima, globalno gledano, enega najboljših tovrstnih registrov prebivalstva, zato se ocene na osnovi verjetnostnih oziroma znanstvenih vzorcev, izdelanih iz registra prebivalstva, ujemajo s populacijo – pri vnaprej znanem tveganju – prav v vseh značilnosti (ne le v socio-demografskih). Z drugimi besedami, znanstveni vzorec iz registra prebivalstva je reprezentativen za vse značilnosti oseb v populaciji.

Reprezentativnost je sicer pojem, ki se razmeroma pogosto uporablja neustrezno ali pa se zlorablja. V formalnem smislu namreč reprezentativnost pomeni, da se ocena spremenljivke na vzorcu ujema z vrednostjo v populaciji z natančnostjo oziroma tveganjem, ki je znano vnaprej in se z večanjem vzorca manjša (Vehovar et al., 2016). Na tej točki govorimo seveda le o vzorčni napaki (*angl. sampling error*), ki nastaja zaradi izbiranja enot v vzorec, ne pa o morebitnih napakah v nadaljnjih procesih (npr. merske napake, neodgovori, obdelave, analize ipd.).

Vzorec za raziskavo je izdelal SURS, in sicer na stanje CRP na dan 31. 03. 2020. Odgovarjajoči vzorčni okvir je vključeval celotno populacijo, ki je na ta dan ustrezala kriterijem rezidenčne populacije v Republiki Sloveniji. Kriteriji za presojo, kdo je vključen v rezidenčno populacijo, so kompleksni. Z nekoliko poenostavitve pa bi lahko rekli, da vključuje vse osebe, ki so bile na ta dan v Sloveniji prijavljene stalno ali začasno, in se torej zanje pričakuje, da v Sloveniji tudi prebivajo. Državljanstvo pri tem ni pomembno. Vključena je bila populacija v zasebnih gospodinjstvih, kot tudi institucionalne populacije (npr. domovi za ostarele, zapori itd.), skupno je bilo v vzorčni okvir vključenih 2.114.782 oseb. To se nekoliko razlikuje od drugih uradnih ocen o številu prebivalstva, ki nekatere stalno oziroma začasno prijavljene osebe dodatno izločijo (npr. osebe, ki niso prijavljene dovolj dolgo). Tako je bilo uradno število prebivalcev na dan 01. 01. 2020 v Sloveniji nekoliko manjše, 2.095.861. Kot bomo razpravljali v nadaljevanju, pa v anketnih raziskavah problem oseb, ki dejansko niso rezidenti, rešujemo nekoliko drugače.

Dodati velja, da je zaradi visoke kakovosti registra obseg morebitne neprijavljene populacije, ki trenutno prebiva v Sloveniji, zelo majhen. Ravno tako je register zelo ažuren, saj se spremembe (npr. smrti, rojstva, selitve) na upravnih enotah praviloma vnašajo v realnem času. Če povzamemo, imajo glavno zaslugo za odličen vzorec kakovosten vzorčni okvir (CRP) ter preverjeni postopki izdelovanja vzorcev, ki jih izvaja SURS.

2.2.2 Velikost vzorca

Zaradi pričakovane zelo nizke razširjenosti aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v splošni populaciji Slovenije konec aprila 2020 (ocenjeno glede na trende deleža pozitivnih na SARS-CoV-2 RNA v rutinskem testiranju v nacionalni mreži laboratorijev) je bila najprimernejša velikost populacije za našo raziskavo izbrana predvsem za oceno seroprevalence oz. deleža slovenske populacije, ki ima v krvi merljivo količino protiteles proti SARS-CoV-2 ob zaključku druge faze raziskave. Glede na to, da rutinsko serološko testiranje z zanesljivimi testi za anti-SARS-CoV-2 protitelesa v Sloveniji (enako kot v drugih evropskih državah in ZDA) aprila 2020 še ni bilo uvedeno in v recenzirani znanstveni literaturi ni bilo objav o SARS-CoV-2 seroprevalenci v drugih evropskih državah, pred izvedbo nacionalne raziskave ni bilo mogoče zanesljivo sklepati o morebitni stopnji seroprevalence okužbe s SARS-CoV-2 v Sloveniji konec aprila 2020, kar bi olajšalo izbiro najustreznejše velikosti vzorca.

Velikost ($n = 3.000$) vzorca za raziskavo je bila tako določena kot ravnotežje med zahtevano natančnostjo ocen in časovnimi omejitvami, ki so se nanašali predvsem na zahtevo, da v tovrstnih populacijskih epidemioloških študijah zajem podatkov traja načeloma le en, največ dva tedna. Pomembne so tudi omejitve človeških in drugih (predvsem finančnih) virov, ki so bili za to zahtevno nalogo na voljo (npr. odvzem vzorcev krvi in brisa nosnega dela žrela na domovih, laboratorijsko testiranje, informacijska podpora), zlasti v času pandemije COVID-19. V pogledu natančnosti ocen bi ob pričakovani odzivnosti 50 % neto realizirani vzorec $n = 1.500$ zagotovil oceno seroprevalence, če bi seroprevalenca (P) v populaciji znašala $P = 5\%$ ali več, z natančnostjo najmanj okoli $CV = 10\%$. V praksi to pomeni, da bi v primeru $P = 5\%$ lahko pričakovali, da je običajni 95 % interval zaupanja (IZ) okoli $P = 5 \pm 1\%$. Koeficient variacije (CV ; *angl. coefficient of variation*), ki ga pri tem uporabljamo, je mera relativne natančnosti in izraža razmerje ocene za standardno napako (SE ; *angl. standard error*) ter odgovarjajoče točkovne ocene proučevane ciljne spremenljivke (npr. ocene deleža seroprevalence P). V tem okviru predstavlja meja $CV = 10\%$ običajni kriterij sprejemljive natančnosti v uradnih in družboslovnih anketah. Vzorec $n = 1.500$ pa bi še vedno zagotavljal spodnjo mejo sprejemljive natančnosti ($CV = 33\%$) tudi za ocenjevanje seroprevalence okoli $P = 1\%$.

V tem okviru velja osvetliti nekatere dileme morebitnega povečanja vzorca:

- treba je upoštevati okoliščine v aprilu 2020, ko so se – v svetu in pri nas – ocene in ugibanja o okuženosti in seroprevalenci v populaciji gibala v izjemno širokem razponu. V takratnih razmerah je bilo zato bistveno, da smo rezultate pridobili hitro, ko se je o populacijskih razmerah – predvsem okuženosti s SARS-CoV-2 v splošni populaciji – še široko ugibalo in se je sprejemalo zelo resne odločitve, torej v daleč najbolj kritičnem obdobju. Naša ocena je torej bila, da je boljša nekoliko manj natančna informacija, ki pa je hitra in ima kljub temu dovolj veliko natančnost za vse operativne potrebe, kot pa npr. dvakrat natančnejša ocena čez en ali več mesecev, ko so vse glavne odločitve glede sproščanja ukrepov že sprejete in ukrepi sproščeni;
- kot že opisano zgoraj, je načrtovani vzorec zagotavljal predvsem oceno seroprevalence, ki za deleže 5 % in več (oziroma 1 % in več) ustreza običajnim metodološkim standardom (CV = 10 %);
- upoštevati tudi velja, da je bil osnovni cilj raziskave zagotavljanje nacionalnih ocen, ne pa regionalnih ocen ali ocen po starostnih in/ali spolnih skupinah;
- potrebno se je tudi zavedati, da se z večanjem vzorca natančnost (interval zaupanja) večja le s korenomo povečanja. Če torej vzorec podvojimo (torej bruto 6.000 in neto 3.000), se interval zaupanja zoži le za 1,4 krat. Namesto ocene, izražene v odstotkih (%) kot 5 ± 1 bi dobili oceno 5 ± 0.7 . Povečanje na 4.000 bruto oziroma 2.000 neto, kar bi opazno podražilo in tudi zavleklo raziskavo, pa bi interval zožilo le na 5 ± 0.9 . Večji vzorec in večja natančnost je seveda nadvse ugodna, še posebej, ker večje število enot poleg (sicer nekoliko reduciranega) povečanja natančnosti – linearno večja potenciale za analizo podskupin. Tako bi npr. dvakrat večji vzorec najverjetneje omogočil analize po spolu. Vendar pa večje povečanje vzorca v konkretnem primeru naše raziskave zaradi vrste okoliščin ne bi odtehtalo s tem povezanih težav. V primeru podvojenega vzorca namreč zaradi kompleksne terensko-laboratorijske izvedbe odgovarjajoči stroški ter organizacijske, tehnične in druge težave narastejo več kot za dvakrat. V še večji meri velja to za napore (npr. usposabljanje ekip, podporni administrativni procesi), ki so potrebni za zagotavljanje visoke kakovosti zbranih podatkov. Preveliko hitenje s tako veliko in kompleksno raziskavo bi se lahko slabo končalo, da o časovnem zamiku rezultatov ne govorimo;

- za populacijske epidemiološke raziskave večjega obsega so potrebni meseci in včasih leta skrbnih priprav, zlasti v majhni državi kot je Slovenija. Da je tako, lahko potrdimo že za primer Evropske družboslovne raziskave (ESS), ki jo izvajamo na Fakulteti za družbene vede UL. Podobno velja za obsežne verjetnostne ankete na več deset tisoč enotah, ki jih izvaja SURS ali Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ). Vse navedeno še posebej velja za obsežnejše epidemiološke raziskave, ki temeljijo na longitudinalnem spremljanju oseb (večkratnem anketiranju v daljšem obdobju) (RIVM, 2020). Še enkrat velja tudi ponoviti, da pred našo raziskavo tovrstne raziskave okuženosti in seroprevalence s SARS-CoV-2 na verjetnostnem vzorcu celotne države niso izvedli še v nobeni državi.

Če povzamemo, je bil po mnenju vodilnih raziskovalcev nacionalne raziskave vzorec za vse ključne potrebe dovolj velik, zato je bilo bolje, da se je raziskava izvedla hitro, v času največjih dilem glede sproščanja omejitev, kot pa kasneje, čez mesec ali dva, ko bi sicer lahko pripravili večjo in bolj natančno raziskavo.

2.2.3 Struktura vzorca

V pogledu strukture vzorca, je bilo glede na naravo raziskave (zbiranje vzorcev in anket na domovih sodelujočih) smiselno uporabiti uveljavljeno prakso dvostopenjskega vzorčenja, ki optimizira stroške in natančnost (Kalton in Vehovar, 2001). Na prvi stopnji je bilo zato izbranih 300 enot prve stopnje (PSU; *angl. primary sampling unit*), za kar so bile uporabljene vzorčne enote (SURS, 2001) (gre za okoliše z do nekaj sto osebami), s katerimi SURS operira za potrebe vzorčenja. Izbor PSU je bil narejen z verjetnostjo, sorazmerno velikosti vzorčnih enot (PPS; *angl. probability proportional to size*). Pri tem se je na prvi stopnji upoštevalo predhodno implicitno stratifikacijo (sistematičen izbor PSU na osnovi predhodnega sortiranega seznama PSU) na osnovi 12 statističnih regij in 6 tipov naselij, znotraj katerih so bila naselja dodatno sortirana po velikosti. Tip naselja je definiran z naslednjimi 6 kategorijami: kmečka do 2.000 prebivalcev, nekmečka do 2.000 prebivalcev, naselja z 2.000 do 10.000 prebivalcev, naselja z 10.000 do 100.000 prebivalcev, ter kot ločeni kategoriji posebej še Ljubljana in Maribor.

Na drugi stopnji je bilo znotraj vsake izbrane vzorčne enote (PSU), po postopku sistematičnega naključnega izbora izbrano fiksno število 10 oseb, kar je število, za katerega izkušnje kažejo, da je primerno pri proučevanju pojavov, kjer pričakujemo določeno gostitev oziroma podobnost enot. Za COVID-19 smo namreč ocenjevali, da se spremenljivka seroprevalenca obnaša podobno kot mnenjske spremenljivke. Gre za pojav, da so si osebe znotraj okolišev glede določenih značilnosti bolj ali manj podobne. Delež variance določenega pojava, ki jo pojasnjuje pripadnost okolišu, se označuje in računa z intraklasno korelacijo (ρ_h). Posedovanje kablanskega priključka je ekstremen primer, ko imajo praktično vse osebe v okolišu enako vrednost ($\rho_h = 1$), spol pa je na drugi strani primer spremenljivke, katere delež (okoli 50 %) je v vseh okoliših praktično enak in je torej neodvisen od okoliša ($\rho_h = 0$). Mnenja oziroma stališča imajo intraklasno korelacijo običajno med 0,01 in 0,05 (kar se je nato v nacionalni raziskavi potrdilo tudi za seroprevalenco s SARS-CoV-2 oktobra/novembra 2020) in za tovrstne spremenljivke v terenskih anketah izračuni kažejo, da je primerno izbrati bruto 10 enot oziroma neto okoli 5 enot na okoliš.

Vzorčni načrt zagotavlja, da imajo vsi rezidenti Republike Slovenije enako verjetnost za vključitev v vzorec, in sicer 0,142 % ($3.000/2.114.782$), saj je bila velikost izhodiščnega (bruto) vzorca $n = 3.000$ ($300 \text{ PSU} \times 10 \text{ oseb}$). Takšna struktura ima na pričakovano natančnost ocen, v primerjavi z enostavnim slučajnim vzorcem, kjer bi bilo 3.000 oseb razpršenih po celi Sloveniji, sicer določen negativen učinek, močno pa pripomore k nižanju stroškov in izvedljivosti v kratkem času, kar je bilo za tip raziskave kot je naša nujno. Na osnovi navedenih parametrov je vzorec v skladu z Zakonom o državni statistiki in drugimi predpisi izdelal SURS, pri čemer je, kot že natančno opisano zgoraj, uporabil preverjene standardizirane postopke (SURS, 2017).

Naključno izbrani preiskovanci so bili kontaktirani po pošti, predstavljen jim je bil namen raziskave in zaprošeni so bili za sodelovanje. Spremni dopis in anonimni vprašalnik, ki sta bila preiskovancem poslana po pošti, sta priložena temu poročilu kot priloga 1 in priloga 2. Preiskovanci so lahko svoje sodelovanje potrdili neposredno po elektronski pošti ali s klicem na telefonsko številko v okviru vzpostavljenega klicnega centra. V nadaljevanju raziskave so vsi preiskovanci, ki so pristali na sodelovanje, prejeli nadaljnje informacije o času in kraju odvzema brisa nosnega dela žrela in vzorca krvi.

Pomembno je omeniti da zaradi strogih etičnih izhodišč, ki veljajo za vse medicinske raziskave v Sloveniji, v nacionalni raziskavi ni bilo dovoljeno nikakršno dodatno kontaktiranje in spraševanje oseb, ki se niso odzvale na pisno vabilo, ali so sodelovanje v raziskavi odklonile.

Pred odvzemom kliničnih vzorcev so vsi preiskovanci podpisali Izjavo o zavestni in svobodni privolitvi (priloga 3), s katero so potrdili ustrezno obrazložitev namena raziskave in podali prostovoljni pristanek na sodelovanje v raziskavi. V primeru mladoletne osebe smo za pisno soglasje prosili odgovornega starša oziroma skrbnika. V primeru mladoletne osebe, stare 15 let ali več, smo za soglasje prosili tako preiskovanca kot njegovega starša oziroma skrbnika. Sodelovanje v raziskavi, kot že navedeno zgoraj, je bilo prostovoljno z možnostjo zavrnitve brez pojasnil ali posledic za preiskovanca kadarkoli v času raziskave. Preiskovanci so ob odvzemu vzorcev podpisali tudi Izjavo o zavestni in svobodni privolitvi, eno so skupaj s Pojasnilom o raziskavi (priloga 4) obdržali za svojo evidenco, drugi izvod pa hranimo na IMI MF UL.

Vsi podatki v centralni bazi podatkov so vodeni in obdelani pod dodeljenim identifikatorjem (šifro). Varovanje osebnih podatkov je zagotovljeno skladno s Splošno uredbo o varstvu podatkov (GDPR, *General Data Protection Regulation*). V namene dodatne zaščite podatkov je baza z administrativnimi podatki (npr. ime, starost, naslov) ločena od baze s podatki o anamnezi in rezultati testiranj (več o tem v podpoglavju 2.11).

Pred začetkom raziskave smo za izvedbo raziskave pridobili odobritev Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko (št. odobritve 0120-199/2020/19 z dnem 17. 04. 2020).

2.3 Merila za vključitev, nevključitev, izključitev v/iz raziskave

Merila za vključitev: pisno soglasje, s katerim so preiskovanci potrdili ustrezno obrazložitev namena študije in svoj pristanek na sodelovanje v raziskavi.

Merila za nevključitev/izključitev: zavrnitev sodelovanja v raziskavi, nepravilno označen klinični vzorec ali spremni list, neoznačen klinični vzorec ali spremni list.

2.4 Klicni center

Za potrebe raziskave smo v obdobju od 20. 04. 2020 – 30. 04. 2020 s podjetjem Episcenter vzpostavili brezplačno telefonsko številko 080 3008, kamor so preiskovanci lahko sporočili svojo odločitev glede sodelovanja v nacionalni raziskavi ali dobili dodatne informacije o raziskavi, če so imeli pomisleke. Izbrane preiskovance, ki so imeli javno dostopno telefonsko številko v telefonskem imeniku, je klicni center tudi aktivno poklical in jih obvestil o načrtovani raziskavi, ter zabeležil odgovor na sodelovanje.

2.5 Zbiranje kliničnih vzorcev v prvi fazi raziskave

2.5.1 Odvzem brisa zgornjih dihal in vzorcev krvi v prvi fazi raziskave

Kot primeren vzorec zgornjih dihal se je upošteval bris nosnega dela žrela ali kombinirani bris ustnega in nosnega dela žrela odvzet v ustrezno transportno gojišče.

Kot primeren vzorec krvi se je upoštevala ustrezna količina polne krvi (3-5 ml), odvzeta iz periferne vene v epruveto za vakuumski odvzem z EDTA ali v epruveto za vakuumski odvzem brez antikoagulantna.

Potem ko je preiskovanec pristal na sodelovanje v raziskavi, je ustrezno usposobljen zdravstveni delavec, uslužbenec NMP Pacient d.o.o., za odvzem krvi v prvi fazi raziskave na dogovorjeni dan preiskovanca obiskal na domu, se identificiral, preveril pravilnost osebnih podatkov preiskovanca, pridobil pisno soglasje preiskovanca za sodelovanje v raziskavi in ob strogem upoštevanju vseh preventivnih ukrepov (uporaba ustrezne osebne varovalne opreme glede na anamnezo in epidemiološko situacijo) odvzel bris nosnega dela žrela in ga opremil z ustreznim identifikatorjem (šifra preiskovanca). Nato je odvzel vzorec krvi, ga prav tako opremil z ustreznim identifikatorjem (šifra preiskovanca) in spremni list opremil z ustreznimi podatki o preiskovancu ter dnevom in uro odvzema (standardni postopek pri odvzemu vseh kliničnih kužnin, ki so sprejete in obdelane na IMI MF UL v okviru diagnostične dejavnosti).

2.5.2 Transport kliničnih vzorcev v prvi fazi raziskave

Vsi odvzeti klinični vzorci (brisi nosnega dela žrela in vzorci krvi) so bili ustrezno zaščiteni in zapakirani v transportnem sistemu (dvojno pakiranje) z upoštevanjem standardnih ukrepov za preprečevanje razlitja in kontaminacije. Med transportom so vzorci bili shranjeni pri 4°C in v istem dnevu (<24 h) dostavljeni na IMI MF UL, skupaj s spremnim listom.

2.5.3 Zbiranje podatkov o kliničnih simptomih in znakih ter kontaktih preiskovancev v prvi fazi raziskave

Dodatne klinične in epidemiološke informacije o prisotnosti in trajanju morebitnih simptomov okužb zgornjih dihal in splošnem počutju preiskovancev, številu in značilnostih kontaktov znotraj gospodinjstva in izven njega, obliki dela in različnih aktivnostih, smo pridobili z anketiranjem preiskovancev po priloženem vprašalniku (priloga 1). Tudi ti podatki so v centralno bazo podatkov vneseni pod identifikatorjem (šifro) preiskovancev na IMI MF UL.

2.6 Testiranje kliničnih vzorcev odvzetih v prvi fazi raziskave

Vsi vzorci zbrani v prvi fazi raziskave so bili obdelani in testirani na IMI MF UL po standardnih protokolih, ki veljajo za mikrobiološko diagnostično dejavnost. Vsak vzorec je bil vpisan v laboratorijski informacijski sistem in mu je bila dodeljena neponovljiva laboratorijska protokolna številka. Od tega trenutka dalje do izdaje rezultata so vsi postopki obdelave vzorca potekali izključno pod laboratorijsko protokolno številko.

2.6.1 Testiranje brisov nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA v vzorcih odvzetih v prvi fazi raziskave

Testiranje brisov nosnega dela žrela na prisotnost virusa SARS-CoV-2 z neposrednim dokazovanjem nukleinske kisline (RNA) SARS-CoV-2 z metodo verižne reakcije s polimerazo z reverzno transkripcijo (RT-PCR, *angl. reverse-transcription polymerase chain reaction*) v realnem času je trenutno zlati standard za neposredno dokazovanje oseb, aktivno okuženih s SARS-CoV-2.

Marca in aprila 2020 je bilo na evropskem trgu na voljo le nekaj komercialnih testov za dokazovanje prisotnosti SARS-CoV-2 RNA, še manj od teh pa je bilo prepričljivo klinično validiranih in avtomatiziranih. Dodatno težavo je predstavljala tudi dobava reagentov in potrošnega laboratorijskega materiala v Slovenijo predvsem v prvem delu pandemije, kar je bila posledica strogih omejevalnih ukrepov za zajezitev širjenja okužb ter posledičnega globalnega pomanjkanja osnovnih kemikalij za izdelavo testov zaradi prekinitve proizvodnje ali transportnih poti. Pomanjkanje reagentov in potrošnega laboratorijskega materiala je bilo na evropskem trgu (in v Sloveniji) največje prav v času izvajanja nacionalne raziskave.

IMI MF UL je že konec januarja 2020 uvedel testiranje na SARS-CoV-2 RNA s kombinacijo ročnega in polavtomatskega diagnostičnega postopka, ki temelji na dvotarčni komercialni mešanici RT-PCR začetnih oligonukleotidov in sond LightMix Modular SARS and Wuhan CoV E-gene kit (Tib-Molbiol, Berlin, Nemčija) in ga je za tovrstno diagnostiko od februarja 2020 priporočala Svetovna zdravstvena organizacija (Corman et al., 2020). Čeprav odličen in zanesljiv, se je navedeni diagnostični postopek pokazal za manj primerne, ko je število prejetih vzorcev preseгло 300 na dan. Zato je bilo nujno poiskati alternativno čimbolj avtomatizirano diagnostično rešitev. V tem času je bila edina takšna alternativna možnost (glede na dobavljivost reagentov v zadostni količini za rutinsko delo) popolnoma nov avtomatizirani test cobas SARS-CoV-2 Test (Roche Diagnostics, Alameda, Kalifornija, ZDA). Tako smo konec marca 2020 na IMI MF UL pred uvedbo v rutinsko diagnostiko izvedli natančno klinično evalvacijo testa cobas SARS-CoV-2 Test in sicer s primerjavo z do tedaj standardnim diagnostičnim postopkom, ki temelji na uporabi LightMix RT-PCR mešanic (Poljak in Korva et al., 2020). Primerjava je bila opravljena na dobro definiranem retrospektivnem respiratornem panelu 217 brisov zgornjih dihal in 502 prospektivno odvzetih brisov zgornjih dihal posameznikov, ki so bili 25. in 26. 03. 2020 poslani na rutinsko testiranje na SARS-CoV-2 RNA. Respiratorni panel, s katerim smo želeli preveriti občutljivost in specifičnost testa cobas SARS-CoV-2, je vključeval 64 brisov predhodno pozitivnih na SARS-CoV-2, 17 vzorcev pozitivnih na druge koronavirus, 14 vzorcev pozitivnih na rinovirus, 9 vzorcev pozitivnih na respiratorni sincicijski virus (RSV), 8 vzorcev pozitivnih na človeški metapneumovirus, 8 vzorcev pozitivnih na virus influence B, 6 vzorcev pozitivnih na virus influence A in 1 vzorec pozitiven na parehovirus. Štirje vzorci so bili pozitivni na vsaj dva respiratorna virusa, preostalih 86 vzorcev pa je bilo

negativnih na vse testirane respiratorne viruse. Testa sta izkazala 98,1 % ujemanje pri testiranju retrospektivnega respiratornega panela (211/215; 95 % IZ, 95,0–99,4 %) in 99,6 % ujemanje pri prospektivni primerjavi bolnikov (499/501; 95 % IZ, 98,4–99,9 %). Oba prospektivno vzeta brisa z neujemajočimi rezultati sta bila cobas SARS-CoV-2 pravilno pozitivna.

Glede na rezultate evalvacije smo test cobas SARS-CoV-2 27. 03. 2020 začeli na IMI MF UL uporabljati kot primarni test za dokazovanje SARS-CoV-2 RNA. Test cobas SARS-CoV-2 je 12. 03. 2020 po hitrem postopku odobrila tudi ameriška zvezna Uprava za hrano in zdravila (FDA). Po naši evalvaciji testa cobas SARS-CoV-2 in njeni objavi (Poljak in Korva et al., 2020), ki je bila v svetovnem merilu prva objavljena evalvacija tega diagnostičnega testa, je bilo v recenzirani znanstveni literaturi objavljenih še nekaj neodvisnih raziskav (Basu et al., 2020; Cradic et al. 2020; Broder et al., 2020; Pujadas et al., 2020; Moran et al., 2020), ki dodatno potrjujejo izjemno zanesljivost testa cobas SARS-CoV-2, ki postaja zlati standard v molekularni diagnostiki SARS-CoV-2.

Zaradi dobrih izkušenj smo se odločili tudi v nacionalni raziskavi za testiranje brisov nosnega dela žrela na prisotnost virusa SARS-CoV-2 uporabiti test cobas SARS-CoV-2. Test smo izvedli po navodilih proizvajalca. Spodaj je na kratko opisan postopek testiranja.

Vsi brisi nosnega dela žrela se takoj po prihodu v laboratorij prenesejo v zaščitno komoro, ki z zračnim tokom in stekleno pregrado ščiti laboratorijskega delavca. V zaščitni komori se vzorci odprejo in pripravijo za nadaljnje delo. Bris se vorteksira 1 minuto pri najvišji hitrosti nato se celotna vsebina transportnega gojišča z brisom prelije v t.i. primarno tubico, ki je označena s črtno kodo laboratorijske protokolne številke vzorca. Pred izvedbo testa se pripravi nalepke s protokolnimi številkami, s katerimi se označi t.i sekundarne tubice. Vzorci se pred nadaljnjim postopkom centrifugirajo 1 min pri 8.000 vrtljajih/minuto (rpm; *angl. round per minute*), nato se 650 µL vzorca v zaščitni komori prepipetira iz primarnih v sekundarne tubice. Sekundarne tubice postavimo v posebna stojala, ki jih nato postavimo v za to namenjen del sistema za testiranje (modul za oskrbo z vzorci) cobas 6800.

Brisi nosnega dela žrela se testirajo na prisotnost virusa SARS-CoV-2 s testom cobas SARS-CoV-2 Test. Za dokazovanje prisotnosti virusa SARS-CoV-2 se pri omenjenem testu uporabljata dve tarčni zaporedji: ORF1, del zaporedja v genomu, ki je značilen

samo za SARS-CoV-2 (tarčno zaporedje 1) in visoko ohranjeno zaporedje beljakovine E virusne ovojnice, ki je prisoten tudi pri ostalih koronavirusih (tarčno zaporedje 2). Uspešnost postopka osamitve in RT-PCR pomnoževanja se pri vsaki reakciji preverja z uporabo RNA interne kontrole. V reakcijsko mešanico diagnostičnega testa za dokazovanje SARS-CoV-2 je dodana tudi uracil-N-glikozilaza, encim, ki učinkovito preprečuje kontaminacijo s PCR pridelki, generiranimi z uracilom. Testiranje vzorca v povprečju traja 3 ure. Hkrati se lahko testira 94 vzorcev ter negativna in pozitivna kontrola testa, s katerima preverjamo uspešno izvedbo testa.

cobas SARS-CoV-2 Test se izvaja na avtomatiziranem sistemu cobas 6800 ali cobas 8800. V Laboratoriju za molekularno mikrobiologijo in diagnostiko hepatitisov in aidsa na IMI MF UL je za potrebe rutinske molekularne diagnostike postavljen sistem cobas 6800. Ta avtomatiziran sistem je sestavljen iz naslednjih modulov: modul za oskrbo z vzorci, modul za prenos, modul za procesiranje in analitični modul. Na slednjem poteka tudi analiza podatkov, ki vsakemu vzorcu pripiše rezultat, ki ga lahko vidimo na aparaturi, shranimo kot poročilo ali ga aparatura prenese v laboratorijski informacijski sistem. Glede na navodila proizvajalca smo vzorce, pri katerih je bilo zaznano pomnoževanje tako tarčnih zaporedij 1 in 2 (ORF1 in gena E) ali samo pomnoževanje tarčnega zaporedja 1 (ORF1), opredelili kot pozitivne na SARS-CoV-2 RNA. Vzorce, kjer pomnoževanja ni bilo zaznati, smo opredelili kot SARS-CoV-2 RNA negativne.

2.6.2 Testiranje vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG v začetku maja 2020

Za oceno seroprevalence SARS CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020, smo vse vzorce krvi odvzete v prvi fazi raziskave v začetku maja 2020 testirali na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG. Protitelesa smo določali s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (Euroimmun, Lübeck, Nemčija).

Podobno kot pri molekularnih testih za dokazovanje SARS-CoV-2 RNA je bilo aprila 2020 na evropskem trgu dostopnih relativno malo diagnostičnih testov, ki bi omogočali dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 (anti-SARS-CoV-2) in še za tiste, ki so bili dostopni, v recenzirani znanstveni literaturi ni bilo objavljenih raziskav o njihovi kakovosti in zanesljivosti. Podobno kot pri molekularnih testih je bilo, zaradi globalnega

pomanjkanja osnovnih kemikalij za izdelavo testov zaradi prekinitve proizvodnje ali transportnih poti, največje pomanjkanje reagentov in potrošnega laboratorijskega materiala za izvajanje seroloških testov na evropskem trgu (in Sloveniji) prav v času izvajanja naše nacionalne raziskave. Reagentov in potrošnega materiala zanesljivih proizvajalcev laboratorijskih testov ni bilo mogoče dobiti v zadovoljivem času niti iz držav Evropske unije, kaj šele iz ZDA. Istočasno je bil evropski trg preplavljen s številnimi anti-SARS-CoV-2 serološkimi testi večinoma popolnoma neznanih proizvajalcev, potencialno zelo vprašljive kakovosti in brez raziskav o njihovi kakovosti in zanesljivosti objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi. Zato smo bili pri izbiri testa za določanje protiteles proti SARS-CoV-2 v vzorcih krvi odvzetih v prvi fazi raziskave izjemno omejeni.

Kljub vsem dvomom o kakovosti anti-SARS-CoV-2 seroloških testov smo marca in aprila 2020 raziskovalci na IMI MF UL veliko večino ponujenih seroloških testov klinično evalvirali po večstopenjskem postopku: od začetnega najbolj enostavnega kliničnega panela do bolj zahtevnih panelov za tiste teste, ki so prestali začetno evalvacijo. Od vseh anti-SARS-CoV-2 seroloških testov, ki so bili na razpolago za evalvacijo v Sloveniji in je zanje obstajala realna možnost dobave zadostnih količin za testiranje večjega števila vzorcev konec aprila 2020, se je kot najboljši kandidat po interni evalvaciji izkazal komercialni diagnostični komplet Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (Euroimmun), s katerim se ugotavlja prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG in ki smo ga uporabili za oceno seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020.

Testiranje s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG smo izvedli v začetku maja 2020 in sicer strogo po navodilih proizvajalca, brez kakršnih koli odstopanj od predpisanega protokola testiranja.

Test Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG temelji na indirektni encimskoimunski metodi na trdnem nosilcu (ELISA), oziroma na specifični interakciji med virusnim antigenom, ki je vezan na trden nosilec (polistirenska mikrotitrna ploščica z vdolbinicami) in specifičnimi protivirusnimi protitelesi v serumu preiskovanca. Pri testu Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG se kot antigen uporablja podenota S1 rekombinantnega proteina jedrne ovojnice (N) oz. »spike« protein, ki naj bi bil najbolj specifičen za SARS-CoV-2. Po navodilih proizvajalca se serumi preiskovancev pred izvedbo testa redčijo v pufru za

redčenje v razmerju 1:101. Pred vnosom v vdolbinice na mikrotitrskih ploščah se razredčene vzorce dobro premeša in v vdolbinico A1 doda po 100 μ L kalibratorja, v B1 100 μ L pozitivne kontrole, v C1 100 μ L negativne kontrole in v vse naslednje vdolbinice po 100 μ L redčenih vzorcev. Po tem principu se lahko hkrati testira 93 vzorcev, pri čemer test v povprečju traja 3 ure. V nadaljevanju se vzorce inkubira 60 minut pri 37°C (\pm 1°C). Po inkubaciji se vse vdolbinice po trikrat izpere s po 450 μ L pufra za izpiranje z aparaturom za avtomatsko spiranje BioTek ELx50 (BioTek, Winooski, Virginija, ZDA). Po spiranju se v vse vdolbinice doda 100 μ L encimskega konjugata in inkubira 30 minut pri 37°C (\pm 1°C). Po inkubaciji se ponovi postopek izpiranja. Nato se doda še 100 μ L substrata in ploščice ponovno inkubira 30 minut pri sobni temperaturi. Encimsko reakcijo se ustavi z dodatkom 100 μ L raztopine za ustavitev reakcije, merjenje absorbance se izvede s spektrofotometričnim čitalcem mikrotitrskih ploščic Magellan (Tecan, Maennedorf, Švica), pri čemer se absorbanca meri pri valovni dolžini 450 nm in 620 nm (referenčni filter).

Za končen rezultat se po meritvi za vsak vzorec opredeli njegovo vrednost tako, da se absorbanca kalibratorja deli z absorbanco vzorca. Da izvid opredelimo kot pozitiven na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG, mora biti vrednost, ki smo jo izračunali, višja ali enaka 1,1. Kadar je izračunana vrednost manjša kot 0,8, vzorec opredelimo kot negativen na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG. Vzorce z vrednostmi med 0,8 in 1,1 po navodilu proizvajalca prav tako opredelimo kot negativne.

Ker je bilo sredi aprila 2020 na voljo le izjemno omejeno število diagnostičnih kompletov tega testa, smo za interno evalvacijo testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG pred uporabo v nacionalni raziskavi izbrali za oceno klinične občutljivosti testa le omejen nabor vzorcev bolnikov z molekularno potrjeno okužbo s SARS-CoV-2, ter za oceno klinične specifičnosti testa vzorce bolnikov z drugimi okužbami, ki lahko navzkrižno reagirajo s SARS-CoV-2 antigenom ter vzorcev bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v populaciji.

V interno evalvacijo smo tako skupno vključili 40 vzorcev bolnikov s COVID-19 (od 1. do 32. dneva po prvi molekularni potrditvi okužbe) (razpredelnica 1), 72 vzorcev

bolnikov z drugimi virusnimi in bakterijskimi okužbami ter 120 vzorcev bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019 (razpredelnica 2).

Razpredelnica 1: Interna evalvacija klinične občutljivosti komercialnega testa Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG na vzorcih bolnikov z molekularno potrjeno okužbo z SARS-CoV-2.

Dan bolezni	n	Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG			Občutljivost
		Pozitivno	Mejno	Negativno	
<5	22	3	1	18	13,6 %
5 – 10	7	6	1	1	85,7 %
>10	11	11	0	0	100,0 %

Razpredelnica 2: Interna evalvacija klinične specifičnosti komercialnega testa Euroimmun Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG.

Panel	n	Pozitivno	Specifičnost
Akutna okužba z virusom človeške citomegalije (CMV) ali virusom Epstein-Barr (EBV)	22	0	100 %
Mikoplazemska pljučnica	15	0	100 %
Oslovski kašelj	7	0	100 %
Okužbe z drugimi respiratornimi virusi (človeški koronavirusi, virusi influence, respiratorni sincicijski virus, rinovirusi)	28	0	100 %
Vzorci bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v populaciji	120	0	100 %
Skupno število testiranih vzorcev	192	0	100 %

Kot je prikazano v razpredelnicah 1 in 2, smo z interno evalvacijo komercialnega diagnostičnega testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG ugotovili, da ima le-ta na testnem

panelu sestavljenem iz 192 vzorcev 100 % analitično specifičnost, saj nismo dokazali nobene navzkrižne reaktivnosti pri testiranju vzorcev bolnikov z drugimi virusnimi in bakterijskimi okužbami ter na panelu vzorcev bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v slovenski populaciji. Pri interni evalvaciji analitične občutljivosti testa smo ugotovili, da je občutljivost povezana z dnevom bolezni. Pri vzorcih, ki so bili odvzeti 5 do 10 dni po molekularnem dokazu okužbe, smo specifična protitelesa ugotovili pri 85,7 % bolnikov; medtem ko smo pri vzorcih, ki so bili odvzeti več kot 10 dni po začetku bolezni dokazali specifična protitelesa pri vseh 11 bolnikih.

V času izvedbe nacionalne raziskave, razen navedene interne evalvacije, v recenzirani znanstveni literaturi ni bilo objavljene nobene klinične evalvacije testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG in nobenih primerjalnih ocen različnih komercialnih seroloških testov za dokazovanje anti-SARS-CoV-2 protiteles, ki so bili takrat na evropskem trgu.

Proizvajalec testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ki je evalviral svoj test na podoben način kot naš laboratorij, je poročal o naslednji klinični občutljivosti testa (evalvirana na skupno 71 vzorcih bolnikov z molekularno potrjeno okužbo s SARS-CoV-2): pri vzorcih, ki so bili odvzeti do 10 dni po molekularnem dokazu okužbe, so specifična protitelesa ugotovili pri 22,4 % bolnikov; pri vzorcih, ki so bili odvzeti med 10 in 20 dni po začetku bolezni pri 87,5 % bolnikov in pri vzorcih, ki so bili odvzeti več kot 21 dni po začetku bolezni, so dokazali specifična protitelesa pri vseh 5 bolnikih (navodila proizvajalca z dne 29. 04. 2020). Klinična specifičnost testa, ki jo je določil proizvajalec na skupaj 1.241 vzorcih odvzetih bolnikom z drugimi virusnimi okužbami, bolnikov z revmatoidnim faktorjem ter osebam, ki so jim vzeli kri v času, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v populaciji, je znašala 99,6 % (navodila proizvajalca z dne 29. 04. 2020).

Po končani prvi fazi nacionalne raziskave in predstavitvi preliminarnih rezultatov na začetku maja 2020, smo se raziskovalci odločili, da bomo obdobje pregledovali objave evalvacij testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG v recenzirani znanstveni literaturi in posledično po potrebi popravljali preliminarno ocenjeno stopnjo seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 glede na nove znanstvene izsledke.

Za namen prvega popravka ocene seroprevalence konec aprila 2020, ki je bilo predstavljeno v dokumentu »Preliminarno poročilo – različica 1.0«, smo dne 15. 06. 2020 iskali objave v recenzirani znanstveni literaturi z naslednjimi ključnimi besedami: »Euroimmun«, »anti-SARS-CoV-2«, »antibodies«, »IgG«, »specificity«. Iskanje literature je potekalo v mednarodnih podatkovnih bazah PubMed, ScienceDirect, Medline in Google Scholar. Upoštevali smo samo raziskave, ki so bile objavljene in/ali sprejete v objavo v recenzirani znanstveni literaturi, saj po našem prepričanju odsotnost znanstvene recenzije (*angl. peer review*) lahko vodi v nezanesljivo in neprimerno vrednotenje rezultatov predstavljenih raziskav. Nedavna raziskava je namreč pokazala, da so samo 9 % vseh rokopisov shranjenih v repozitoriju preprintov medRxiv komentirali drugi raziskovalci in je bilo le 10 % rokopisov, ki so shranjeni v repozitoriju preprintov medRxiv, kasneje tudi objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi (Flanagin et al., 2020; Krumholz et al., 2020). Vse to nakazuje na relativno slabo kvaliteto velike večine rokopisov shranjenih v repozitorijih preprintov.

Pri prvem pregledu literature dne 15. 06. 2020 smo našli skupno 14 evalvacij testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ki so bile objavljene do datuma pregleda. Iz tega nabora evalvacij smo izločili eno raziskavo in sicer zaradi velike verjetnosti, da je bilo preverjanje specifičnosti opravljeno na isti populaciji kot v drugi vključeni raziskavi. V končno analizo smo tako vključili 13 neodvisnih recenziranih člankov ter podatke iz poročila proizvajalca, ki so prikazani v razpredelnici 3.

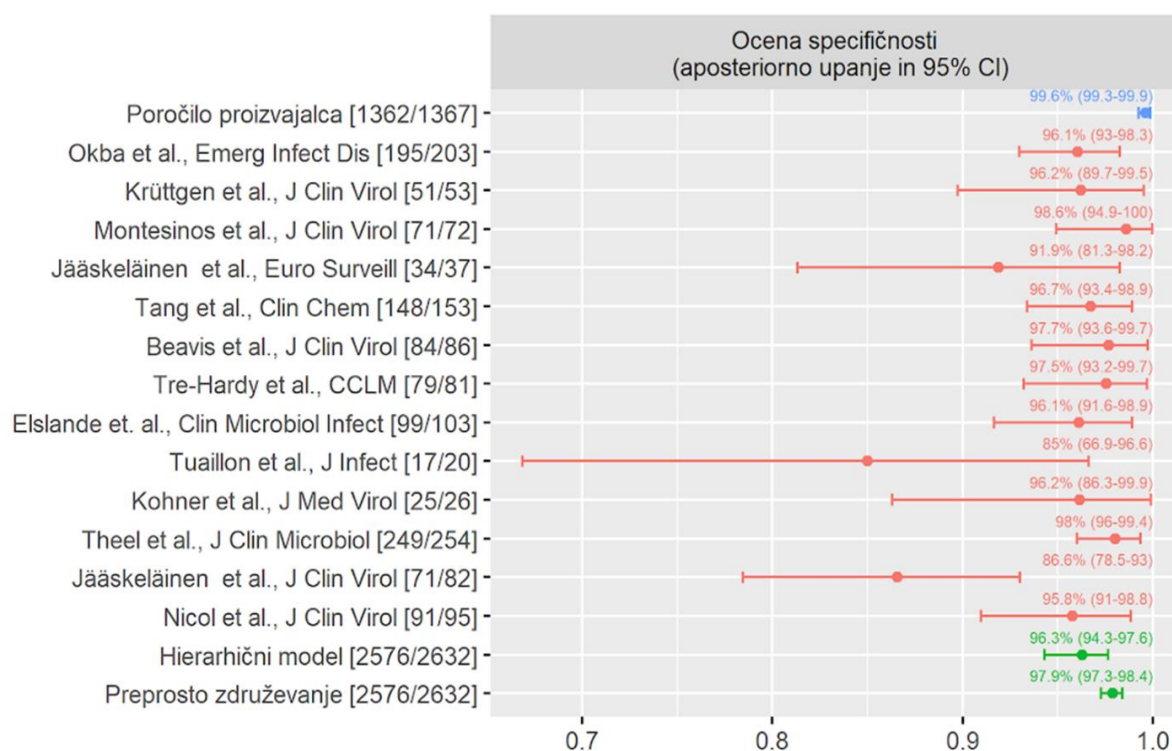
Razpredelnica 3. Poročilo proizvajalca, rezultati interne evalvacije ter pregled objavljenih raziskav o specifičnosti testa anti-SARS-CoV-2 IgG v recenzirani znanstveni literaturi po kronološkem vrstnem redu od konca aprila 2020 do 15. 06. 2020.

	Vir	n/N (negativni/št. vseh negativnih)	Specifičnost (95 % CI, če navedena v originalnem viru)
1	Poročilo proizvajalca	1.362/1.367	99,6 %
2	Interna evalvacija	192/192	100,0 %
3	Okba et al., Emerg Infect Dis, 2020	195/203	96,1 %
4	Krüttgen et al., J Clin Virol, 2020	51/53	96,2 %
5	Montesinos et al., J Clin Virol, 2020	71/72	98,6 % (92,5–99,8 %)
6	Jääskeläinen et al., Euro Surveill, 2020	34/37	91,9 %
7	Tang et al., Clin Chem, 2020	148/153	96,7 % (92,5–98,9 %)
8	Beavis et al., J Clin Virol, 2020	84/86	97,7 % (91,9–99,6 %)
9	Tre-Hardy et al., CCLM, 2020	79/81	98 % (91–99 %)
10	Elslande et. al., Clin Microbiol Infect, 2020	99/103	96,1 % (90,1–98,8 %)
11	Tuailon et al., J Infect, 2020	17/20	85,0 % (70,4–99,6 %)
12	Theel et al., J Clin Microbiol, 2020	249/254	98,0 % (95,3–99,3 %)
13	Kohner et al., J Med Virol, 2020	25/26	96,2 %
14	Nicol et al., J Clin Virol, 2020	91/95	96,7 % (92,4–98,6 %)
15	Jääskeläinen et al., J Clin Virol, 2020	71/82	86,6 %

Za namen prvega popravka seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020, ki je bilo predstavljeno v dokumentu »Preliminarno poročilo – različica 1.0« smo vključili navedenih 13 člankov ter podatke iz poročila proizvajalca, čeprav smo se zavedali, da se kvaliteta objav zelo razlikuje, da so evalvacije in meritve specifičnosti opravljene na zelo heterogenih in glede velikosti in sestave med seboj neprimerljivih populacijah ter z uporabo zelo različnih kriterijev za pričakovani negativen rezultat na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG v testiranih vzorcih, kar je najbolj pomemben dejavnik za meritev specifičnosti.

V prvi vrstici slike 1 je prikazana ocena popravljene specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG glede na navodila proizvajalca (modra barva). Z rdečo barvo so označene ocenjene specifičnosti ugotovljene v posameznih raziskavah, z zeleno pa preprosto združevanje raziskav in ocena specifičnosti s hierarhičnim upoštevanjem vseh

raziskav. V oklepaju poleg imena raziskave najdemo tudi število pravilno klasificiranih negativnih primerov in število vseh negativnih primerov. Groba specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG za dokazovanje prisotnosti anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG glede na našo meta-analizo objav v recenzirani znanstveni literaturi z dne 15. 06. 2020, upoštevajoč vse zgoraj navedene omejitve posameznih raziskav, bi tako znašala 97,9 % (95 % CI = [97,3–98,4 %]) po preprostem združevanju raziskav in 96,3 % (95 % CI = [94,3–97,6 %]) po hierarhičnem upoštevanju vseh raziskav.



Slika 1. Ocene specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG za dokazovanje anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG glede na podatke proizvajalca in objave v recenzirani znanstveni literaturi do 15. 06. 2020.

Pri prvem pregledu literature dne 15. 06. 2020 smo opravili še dva pregleda objav evalvacij testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG v recenzirani znanstveni literaturi in sicer 01. 09. 2020 (za »Preliminarno poročilo - različica 2.0) in 15. 11. 2020 (za »Končno poročilo«). Recenzirano znanstveno literaturo smo pregledovali z enakimi ključnimi besedami ter uporabo enakih mednarodnih podatkovnih baz kot 15. 06. 2020.

Tako je bilo od 15. 06. 2020 (»Preliminarno poročilo - različica 1.0«) do sredine novembra 2020 v recenzirani znanstveni literaturi objavljenih še vsaj 32 dodatnih evalvacij testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ki pa žal niso bistveno vplivale na natančnost ocene specifičnosti testa in so po opravljenih izračunih posledično še dodatno povečale (razširile) interval zanesljivosti ocene seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020. Zato smo se raziskovalci odločili, da za čim bolj natančno oceno intervala seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020 ni smotno nadaljevati s popravljanem ocene seroprevalence glede na specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ugotovljeno v evalvacijah objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi, ampak je potrebno ubrati drugo pot (poglavje 2.6.3).

Pomembno je še omeniti, da sta oba dodatna pregleda recenzirane znanstvene literature pokazala, da je test Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG še vedno zelo pogosto uporabljan test ter tudi najbolj pogosto evalviran anti-SARS-CoV-2 serološki test med več kot 420 serološkimi testi, razpoložljivimi na svetovnem trgu konec novembra 2020. Kljub zelo različnim ocenam specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG ugotovljenim v vsaj 43 evalvacijah objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi do konca novembra 2020, proizvajalec testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG še vedno, tudi v zadnjih dosegljivih posodobljenih navodilih za uporabo testa (z dne 31. 08. 2020) vztraja pri visoki specifičnosti testa in sicer 99,6 %.

2.6.3 Testiranje vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S novembra 2020

Ker z zgoraj opisanim popravljanjem ocene seroprevalence izmerjene na začetku maja 2020, glede na nejasno specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG ugotovljeno v evalvacijah testa objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi, nismo mogli podati natančne ocene intervala seroprevalence SARS-CoV-2 za konec aprila 2020, smo se raziskovalci odločili ponovno testirati vse vzorce krvi odvzete v prvi fazi raziskave na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 z diagnostičnim pristopom, ki zagotavlja skoraj 100% specifičnost.

Tako smo sredi novembra 2020 vse anonimizirane vzorce krvi odvzete v prvi fazi raziskave ponovno testirali na prisotnost skupnih protiteles anti-SARS-CoV-2 in sicer

s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Švica) ter Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics). Oktobra 2020 se je namreč med vodilnimi raziskovalci po svetu in po objavi pomembne islandske raziskave (Gudbjartsson et al., 2020) izoblikovalo mnenje, da je v raziskavah, kot je slovenska nacionalna raziskava, za zanesljivo ugotavljanje seroprevalence potrebno uporabiti vsaj dva različna serološka testa, ki določata različno vrsto anti-SARS-CoV-2 protiteles, ob tem, da ima vsak test specifičnost nad 99,8 % izmerjeno na vsaj 5.000 vzorcih, v katerih je zanesljivo pričakovati negativen rezultat (Spellberg B et al., 2020; Houlihan et al., 2020; Hicks et al., 2020; Gill in Ponsford, 2020; Hanson et al., 2020; Ripperger et al., 2020; Mekonnen et al., 2020; Lisboa Bastos et al., 2020; Bray et al., 2020). Kombinirana uporaba dveh tako visoko specifičnih testov v primeru pozitivnosti vzorca z obema testoma zagotavlja skoraj 100 % specifičnost diagnostičnega pristopa.

Oba uporabljena testa smo izvedli strogo po navodilih proizvajalca, brez kakršnih koli odstopanj od predpisanega protokola testiranja.

Vzorci, ki so bili pozitivni z obema testoma (Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Anti-SARS-CoV-2 S), smo opredelili kot nedvomno pozitivne na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2. Vzorce, ki so bili z obema testoma negativni na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2, smo opredelili kot nedvomno negativne. Vzorce, ki so bili pozitivni z enim ali z drugim testom, smo opredelili kot možno pozitivne na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2.

V nadaljevanju je opisan postopek testiranja z obema testoma: Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Anti-SARS-CoV-2 S.

2.6.3.1 Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) je namenjen kvalitativnemu *in vitro* dokazovanju prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 (vključno z IgG) v vzorcih človeškega seruma ali plazme. Temelji na elektrokemiluminiscenčni imunski metodi (»ECLIA«) in se izvaja na različnih inštrumentih iz družine cobas e (Roche Diagnostics). Za odkrivanje protiteles proti SARS-CoV-2 se v testu kot antigen uporablja za virus specifična rekombinantna nukleokapsidna beljakovina N in na ta način ugotavlja prisotnost ali odsotnost pridobljenega humoralnega imunskega odziva na beljakovino N virusa SARS-CoV-2.

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 temelji na principu »sendvič« metode. Pri prvi inkubaciji 20 µL vzorca seruma ali plazme, biotiniliran SARS-CoV-2-specifičen rekombinantni antigen (beljakovina N) in SARS-CoV-2-specifični rekombinantni antigen (beljakovina N) označen z rutenijevim kompleksom oblikujeta »sendvič« kompleks. Po dodatku mikrodelcev prevlečenih s streptavidinom in v primeru prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 se kompleks veže na površino zaradi interakcije biotina in streptavidina. Reakcijska mešanica se vnese v merilno celico, kjer se mikrodelci magnetno ujamejo na površino elektrode. Nevezane reagentne sere se spere z raztopino ProCell/Procell M. Napetost v elektrodi inducira kemiluminiscenco, ki jo izmeri fotomultiplikator. Računalniški program s primerjavo elektrokemiluminiscentnega signala dobljenega reakcijskega produkta vzorca s signalom mejne vrednosti, predhodno pridobljene ob kalibraciji inštrumenta, določi rezultat. Rezultat testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 je nereaktiven za protitelesa anti-SARS-CoV-2, če je vrednost COI (»cutoff index«) manjša od 1,0 in reaktiven, če je COI vrednost večja ali enaka 1,0. Test je končan v 18 minutah.

Proizvajalec testa Elecsys Anti-SARS-COV-2 je poročal o naslednji klinični občutljivosti testa (evalvirana na skupno 204 vzorcih 69 bolnikov z molekularno potrjeno okužbo s SARS-CoV-2): v vzorcih, ki so bili odvzeti do 6 dni po molekularnem dokazu okužbe so specifična protitelesa ugotovili pri 65,5 % bolnikov; v vzorcih, ki so bili odvzeti med 7 in 13 dni po molekularnem dokazu okužbe pri 88,1 % bolnikov in v vzorcih, ki so bili odvzeti več kot 14 dni po molekularnem dokazu okužbe so dokazali specifična protitelesa pri vseh 29 bolnikih (navodila proizvajalca testa 05-2020, vr. 1.0).

Klinična specifičnost testa Elecsys Anti-SARS-COV-2, ki jo je določil proizvajalec na skupaj 5.272 vzorcih odvzetih bolnikom pred decembrom 2019, krvodajalcem, na panelu bolnikov z običajnim prehladom in panelu bolnikov z molekularno potrjeno okužbo s človeškimi koronavirusi HKU1, NL63, 229E ali OC43 je znašala 99,81 % (navodila proizvajalca testa 05-2020, vr. 1.0).

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 je 03. 05. 2020 po hitrem postopku odobrila ameriška zvezna Uprava za hrano in zdravila (FDA).

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 se je na slovenskem trgu pojavil konec maja 2020. Raziskovalci smo pred uvedbo v rutinsko diagnostiko izvedli dodatno evalvacijo na

slovenskih vzorcih s poudarkom na preverjanju njegove specifičnosti (razpredelnica 4).

Razpredelnica 4: Interna evalvacija klinične specifičnosti komercialnega testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2.

Panel	n	Pozitivno	Specifičnost
Akutna okužba z virusom človeške citomegalije (CMV) ali virusom Epstein-Barr (EBV)	22	0	100 %
Mikoplazemska pljučnica	15	0	100 %
Oslovski kašelj	7	0	100 %
Okužbe z drugimi respiratornimi virusi (človeški koronavirusi, virusi influence, respiratorni sincicijski virus, rinovirusi)	28	0	100 %
Vzorci bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v populaciji	500	0	100 %
Skupno število testiranih vzorcev	572	0	100 %

Kot je prikazano v razpredelnici 4, smo z interno evalvacijo testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 ugotovili, da ima na testnem panelu sestavljenem iz 572 vzorcev 100 % analitično specifičnost, saj nismo dokazali nobene navzkrižne reaktivnosti pri testiranju vzorcev bolnikov z drugimi virusnimi in bakterijskimi okužbami ter na panelu vzorcev bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v slovenski populaciji.

Ker je proizvajalec testa naredil izčrpno evalvacijo analitične občutljivosti testa na 204 vzorcih (glej zgoraj) in smo pridobili rezultate treh od proizvajalca neodvisnih internih evalvacij iz treh evropskih partnerskih laboratorijev opravljenih na skupno 720 vzorcih, dodatne interne evalvacije občutljivost testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 na slovenskih vzorcih nismo izvajali.

Za razliko od testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, kjer so od proizvajalca neodvisne evalvacije, objavljene v recenzirani znanstveni literaturi pokazale zelo širok razpon ugotovljenih specifičnosti navedenega testa, so številne od proizvajalca neodvisne evalvacije testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 objavljene v recenzirani znanstveni literaturi do konca novembra 2020 brez izjeme pokazale izjemno visoko specifičnost, in sicer v vseh evalvacijah nad 99,8 % (Van Elslande et al., 2020b; National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group, 2020; Zilla M et al., 2020; Manthei et al., 2020; Coste et al., 2020). V objavljenih primerjalnih raziskavah večih komercialnih seroloških testov je test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 vedno pokazal najvišjo specifičnost med primerjanimi testi in/ali je bil v skupini testov z najvišjo specifičnostjo (Van Elslande et al., 2020b; National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group, 2020; Zilla M et al., 2020; Manthei et al., 2020; Coste et al., 2020). Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 se v zadnjih treh mesecih tudi vse pogosteje uporablja kot referenčni test pri primerjavah različnih seroloških anti-SARS-CoV-2 testov.

2.6.3.2 Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics) je namenjen kvantitativnemu *in vitro* dokazovanju prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 (vključno z IgG) v vzorcih človeškega seruma ali plazme. Temelji na elektrokemiluminiscenčni imunski metodi (»ECLIA«) in se izvaja na različnih inštrumentih iz družine cobas e (Roche Diagnostics). Za odkrivanje protiteles proti SARS-CoV-2 se v testu kot antigen uporablja za virus specifično receptorsko vezavno mesto (RBD) na virusni beljakovini S (*angl. spike*) ter ugotavlja prisotnost ali odsotnost pridobljenega humoralnega imunskega odziva na beljakovino S virusa SARS-CoV-2. Test tako omogoča kvantitativno določanje visoko afinitetnih protiteles proti SARS-CoV-2, kar lahko pomaga pri longitudinalnem spremljanju dinamike imunskega odziva pri posameznikih.

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 temelji na principu »sendvič« metode. Pri prvi inkubaciji 20 µL vzorca seruma ali plazme, biotiniliran SARS-CoV-2-specifičen rekombinantni antigen (beljakovina S-RBD) in SARS-CoV-2-specifični rekombinantni antigen (beljakovina S-RBD) označen z rutenijevim kompleksom oblikujeta »sendvič« kompleks. Po dodatku mikrodlecev prevlečenih s streptavidinom in v primeru prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 se kompleks veže na površino zaradi

interakcije biotina in streptavidina. Reakcijska mešanica se vnese v merilno celico, kjer se mikrodenci magnetno ujamejo na površino elektrode. Nevezane reagentne sere se spere z raztopino ProCell/Procell M. Napetost v elektrodi inducira kemiluminiscenco, ki jo izmeri fotomultiplikator. Računalniški program s primerjavo elektrokemiluminiscentnega signala dobljenega reakcijskega produkta določi rezultat glede na kalibracijsko krivuljo, ki jo izriše inštrument ob dvotočkovni kalibraciji. Rezultat testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 je nereaktiven za protitelesa anti-SARS-CoV-2, če je koncentracija protiteles manjša od 0,80 U/mL in reaktiven, če je koncentracija protiteles večja ali enaka 0,80 U/mL. Test je končan v 18 minutah.

Proizvajalec testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S je evalviral klinično občutljivost testa na skupno 1.610 vzorcih 402 simptomatskih bolnikov z molekularno potrjeno okužbo s SARS-CoV-2, vključno z 297 vzorci 243 hospitaliziranih bolnikov. V vzorcih, ki so bili odvzeti bolnikom do 6 dni po molekularnem dokazu okužbe, so specifična protitelesa ugotovili pri 88,6 % bolnikov; v vzorcih, ki so bili odvzeti med 7 in 13 dni po molekularnem dokazu okužbe pri 85,5 % bolnikov; v vzorcih, ki so bili odvzeti med 14 in 20 dni po molekularnem dokazu okužbe pri 89,2 % bolnikov; v vzorcih, ki so bili odvzeti med 21 in 27 dni po molekularnem dokazu okužbe pri 98,3 % bolnikov; in v vzorcih, ki so bili odvzeti več kot 28 dni po molekularnem dokazu okužbe, so dokazali specifična protitelesa pri vseh 1.117 bolnikih (navodila proizvajalca testa 09-2020, vr. 1.0).

Klinična specifičnost testa, ki jo je določil proizvajalec na skupaj 5.991 vzorcih odvzetih bolnikom pred oktobrom 2019 v Evropi, krvodajalcem v ZDA ter krvodajalcem v Afriki, je znašala 99,98 % (navodila proizvajalca testa 09-2020, vr. 1.0).

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S je 01. 12. 2020 po hitrem postopku odobrila ameriška zvezna Uprava za hrano in zdravila (FDA).

Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S se je na slovenskem trgu pojavil v začetku oktobra 2020. Raziskovalci smo pred njegovo uporabo pri testiranju vzorcev krvi iz prve in druge faze nacionalne raziskave izvedli dodatno evalvacijo na slovenskih vzorcih s poudarkom na preverjanju njegove specifičnosti na enakem panelu, ki je bil uporabljen za evalvacijo testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (razpredelnica 5).

Razpredelnica 5: Interna evalvacija klinične specifičnosti komercialnega testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S.

Panel	n	Pozitivno	Specifičnost
Akutna okužba z virusom človeške citomegalije (CMV) ali virusom Epstein-Barr (EBV)	22	0	100 %
Mikoplazemska pljučnica	15	0	100 %
Oslovski kašelj	7	0	100 %
Okužbe z drugimi respiratornimi virusi (človeški koronavirusi, virusi influence, respiratorni sincicijski virus, rinovirusi)	28	0	100 %
Vzorci bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v populaciji	500	0	100 %
Skupno število testiranih vzorcev	572	0	100 %

Kot je prikazano v razpredelnici 5, smo z interno evalvacijo testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S ugotovili, da ima na testnem panelu sestavljenem iz 572 vzorcev 100 % analitično specifičnost, saj nismo dokazali nobene navzkrižne reaktivnosti pri testiranju vzorcev bolnikov z drugimi virusnimi in bakterijskimi okužbami ter na panelu vzorcev bolnikov, ki so jim vzeli kri zaradi različnih medicinskih razlogov pred junijem 2019, ko virusa SARS-CoV-2 zagotovo ni bilo v slovenski populaciji.

Ker je proizvajalec naredil izredno izčrpno evalvacijo klinične občutljivosti testa na 1.610 vzorcih (glej zgoraj) in smo pridobili rezultate od proizvajalca neodvisne interne evalvacije občutljivosti testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S iz partnerskega laboratorija, opravljene na skupno 341 vzorcih, dodatne interne evalvacije občutljivosti testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S na slovenskih vzorcih nismo izvajali.

Ker je test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S na trgu šele kratek čas, nismo zasledili nobene evalvacije tega testa objavljene v recenzirani znanstveni literaturi do konca novembra 2020.

2.6.4 Izvidi in sporočanje rezultatov udeležencem prve faze raziskave

Za vse rezultate testiranja na SARS-CoV-2 smo na IMI MF UL izdali uradni izvid, ki smo ga udeležencem raziskave poslali po pošti. V centralno bazo podatkov, ki jo vodijo sodelavci Laboratorija za bioinformatiko Fakultete za računalništvo in informatiko UL, so bili rezultati vpisani pod identifikatorji (šiframi) udeležencev.

V primeru novo dokazane aktivne okužbe s SARS-CoV-2 v brisu nosnega dela žrela je IMI MF UL o izvidu nemudoma obvestil tako samega udeleženca raziskave kot tudi ustrezno epidemiološko službo, ki je postopala po svojih strokovnih protokolih in navodilih. V samo podatkovno bazo je pozitiven izvid vpisan le pod šifro in tako za namen obdelave podatkov niso vidni osebni podatki udeležencev raziskave.

V primeru pozitivnega rezultata na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles in ob negativnem rezultatu testiranja na SARS-CoV-2 RNA iz brisa nosnega dela žrela smo udeleženca raziskave o rezultatu obvestili po pošti, z vključeno natančno pisno obrazložitvijo rezultata ter možnostjo dodatnega telefonskega pojasnila rezultatov.

Vsi vzorci, ki so bili zbrani v sklopu prve faze nacionalne raziskave, so bili po prihodu v laboratorij najprej ustrezno prelit v t.i. primarne tubice, ki so bile označene s črtno kodo laboratorijske protokolne številke vzorca. Zaradi trajne zaščite identitete udeležencev raziskave in v skladu z etičnimi standardi tovrstnih raziskav, so bili po opravljenem testiranju vsi ostanki vzorcev brisov nosnega dela žrela ter vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave sredi maja 2020 nepovratno anonimizirani. Tako smo z vseh primarnih tubic odstranili originalne nalepke s črtno kodo, ki je omogočala povezavo med identiteto udeleženca raziskave in njegovimi osebnimi identifikatorji. Vsem udeležencem raziskave je bila dodeljena nova neponovljiva naključno izbrana šifra, ki ne omogoča več določljivosti posameznika. Primarne tubice smo nato opremili z nalepkami z novimi naključno izbranimi šiframi. Ne glede na nepovratno anonimizacijo kliničnih vzorcev, so za znanstvenoraziskovalne namene možnih prihodnjih analiz in raziskav za vsak shranjen vzorec ohranjeni anonimizirani podatki o spolu, starostni skupini (desetletni) in regiji stalnega prebivališča. Edino evidenco anonimiziranih podatkov hrani odgovorni raziskovalec nacionalne raziskave.

2.7 Longitudinalna aktivna in pasivna kohortna raziskava

V šestmesečnem obdobju po vključitvi v raziskavo smo pri vseh udeležencih nacionalne raziskave aktivno spremljali zdravstveno stanje in počutje s periodičnim,

tritedenskim preverjanjem pojava kliničnih simptomov in znakov, značilnih za okužbo s SARS-CoV-2 po telefonu (vprašalnik ob sledenju – priloga 5). Dodatno so v celotnem obdobju trajanja druge faze raziskave udeleženci lahko kadarkoli telefonsko ali po elektronski pošti kontaktirali koordinatorje raziskave. Če smo ob aktivnem spremljanju ugotovili, da so se pri katerem izmed udeležencev raziskave in/ali članu gospodinjstva pojavili klinični simptomi in znaki, značilni za okužbo s SARS-CoV-2, ali je to udeleženec aktivno javil sam, smo mu v primeru, da od začetka simptomov in znakov ni minilo več kot 14 dni, po protokolu raziskave ponovno odvzeli bris nosnega dela žrela in po potrebi tudi vzorec krvi ter ga/jih testirali v najkrajšem možnem času. V primeru klinično izrazitejše simptomatike smo udeležencem raziskave svetovali tudi ustrezno zdravniško obravnavo ter pomagali pri takojšnjem dostopu do testiranja na SARS-CoV-2 RNA oz. protitelesa anti-SARS-CoV-2.

2.8 Zbiranje kliničnih vzorcev ob zaključku druge faze raziskave

Ob zaključku druge faze raziskave je ob upoštevanju vseh preventivnih ukrepov ustrezno usposobljen zdravstveni delavec, uslužbenec NMP Pacient d.o.o., odvil vzorec krvi in ustrezno opremil tako vzorec kot spremni list. Za razliko od odvzema krvi v prvi fazi, je odzem krvi ob zaključku druge faze (oktobra in novembra 2020) potekal na dva načina. V prvem tednu je odzem krvi potekal na različnih stacionarnih odvzemnih mestih po Sloveniji, kamor smo tekom pogovorov v sklopu osmega obdobja sledenja povabili vse zdrave preiskovance, stare 15 let ali več. Naslednja dva tedna so odvzemi krvi potekali na domu (tako kot v prvi fazi raziskave), predvsem pediatričnih udeležencev in udeležencev, ki so odklonili prihod na stacionarno odzemno mesto ali zaradi drugih razlogov (vključno s zdravstvenimi) niso mogli priti na stacionarno odzemno mesto.

Vsi odvzeti vzorci krvi so bili po odvzemu ustrezno zaščiteni in zapakirani v transportnem sistemu (dvojno pakiranje) z upoštevanjem standardnih ukrepov za preprečevanje razlitja in kontaminacije. Med transportom so vzorci bili shranjeni pri 4°C in v istem dnevu (<24 h) dostavljeni na IMI MF UL, skupaj s spremnim listom.

2.9 Testiranje vzorcev krvi odvzetih ob zaključku druge faze raziskave

Vsi vzorci zbrani ob zaključku drugega dela raziskave so bili obdelani in testirani na IMI MF UL po standardnih protokolih, ki veljajo za mikrobiološko diagnostično

dejavnost. Vsak vzorec krvi je bil vpisan v laboratorijski informacijski sistem in mu je bila dodeljena neponovljiva laboratorijska protokolna številka. Od tega trenutka dalje do izdaje rezultata so vsi postopki obdelave vzorca potekali izključno pod laboratorijsko protokolno številko.

2.9.1 Testiranje vzorcev krvi odvzetih ob zaključku druge faze raziskave na prisotnost protiteles proti SARS-CoV-2 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S novembra 2020

Tako kot vzorce krvi odvzete v prvi fazi raziskave smo sredi novembra 2020 testirali na prisotnost skupnih protiteles anti-SARS-CoV-2 tudi vse vzorce odvzete ob zaključku druge faze raziskave in sicer s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) ter Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S (Roche Diagnostics).

Vzorce, ki so bili pozitivni z obema testoma (Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Anti-SARS-CoV-2 S), smo opredelili kot nedvomno pozitivne na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2. Vzorce, ki so bili z obema testoma negativni na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2, smo opredelili kot nedvomno negativne. Vzorce, ki so bili pozitivni z enim ali z drugim testom, smo opredelili kot možno pozitivne na prisotnost specifičnih protiteles anti-SARS-CoV-2.

Postopek testiranja vzorcev krvi z obema testoma: Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Anti-SARS-CoV-2 S je opisan v poglavjih 2.6.3.1 in 2.6.3.2. Oba uporabljena testa smo izvedli strogo po navodilih proizvajalca, brez kakršnih koli odstopanj od predpisanega protokola testiranja.

2.9.2 Izvidi in sporočanje rezultatov testiranja vzorcev krvi zbranih ob zaključku druge faze raziskave

Za vse rezultate testiranja na protitelesa anti-SARS-CoV-2 v vzorcih krvi zbranih ob zaključku druge faze raziskave smo na IMI MF UL izdali uradni izvid, ki smo ga udeležencem raziskave poslali po pošti. Izvid je vključeval tudi natančno pisno obrazložitev rezultata, udeležencem pa omogočena možnost dodatnega telefonskega pojasnila rezultatov.

V centralno bazo podatkov, ki jo vodijo sodelavci Laboratorija za bioinformatiko Fakultete za računalništvo in informatiko UL, so bili rezultati testiranja vpisani pod identifikatorji (šiframi) preiskovancev.

Zaradi trajne zaščite identitete udeležencev raziskave in v skladu z etičnimi standardi tovrstnih raziskav, so bili po opravljenem testiranju vsi ostanki vzorcev krvi odvzetih ob zaključku druge faze raziskave konec novembra 2020 nepovratno anonimizirani, po postopku opisanem v poglavju 2.6.4.

2.10 Statistična obdelava podatkov

Okuženost oz. razširjenost aktivne SARS-CoV-2 okužbe in seroprevalenco SARS CoV-2 oz. delež populacije, ki ima v trenutku testiranja v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 – s statističnega vidika med njima ni potrebno razlikovati – smo ocenili na tri različne načine. Prvi predpostavlja enostavni slučajni vzorec (*angl. simple random sample*), z drugim in tretjim pa smo preverili vpliva nepopolne občutljivosti in specifičnosti uporabljenega diagnostičnega pristopa in pristranskosti zaradi nepopolnega odziva. Analize smo naredili v programskem okolju R.

Pri statistični analizi smo ubrali bayesovski pristop. Čeprav bi lahko tudi s klasičnim pristopom prišli do podobnih rezultatov, smo se odločili za bayesovsko ogrodje, ki omogoča preprostejše upoštevanje predhodnih informacij, še posebej, ko le-te vsebujejo negotovost (kot je npr. specifičnost testa), in s tem olajša pripravo primernih statističnih modelov. Obenem je interpretacija bayesovskih intervalov preprostejša od interpretacije klasičnih intervalov zaupanja, kjer je interval slučajna spremenljivka.

Bayesovski pristop ima tudi svojo ceno, predvsem v večji računski zahtevnosti in obveznosti, da opredelimo svoje predhodno (apriorno; *angl. prior*) mnenje o parametrih naših statističnih modelov. V tej analizi računski zahtevnosti ni predstavljala ovire, saj smo z uporabo sodobnih vzorčevalnikov iz modelov vzorčili dovolj uspešno in dovolj učinkovito, da napaka aproksimacije ni vplivala na interpretacijo. Apriorno mnenje pa je bilo relativno enostavno določiti, saj so imeli uporabljeni modeli zelo malo parametrov.

Za razliko od klasičnih pristopov pri bayesovski statistiki ne ocenjujemo vrednosti parametrov, temveč posodabljammo naše apriorno mnenje o njih na podlagi podatkov

in izbranega modela. Interpretacija rezultatov bayesovske analize poteka preko t.i. aposteriorne porazdelitve (*angl. posterior distribution, posterior*) parametrov oz., nekoliko poenostavljeno, našega verjetnostnega mnenja o parametrih, ko smo videli podatke. V rezultatih bomo poročali predvsem povzetke aposteriorne porazdelitve parametrov, ki nas zanimajo. Uporabljali bomo aposteriorno upanje (upanje oz. pričakovana vrednost aposteriorne porazdelitve; *angl. posterior mean*), ki povzema centralno tendenco parametra, 95% bayesovski interval zaupanja (CI; *angl. bayesian confidence interval, credible interval*), vedno v smislu intervala med 2,5 in 97,5 percentiloma, ter 95% območje največje gostote (HDR; *angl. highest density region*). Razlog za vključitev HDR leži v tem, da je 95 % intervalov zaupanja v večini primerov poljubno mnogo. Izbrani interval zaupanja, ki temelji na percentilih, je v večini primerov primeren povzetek, v primeru močno nesimetričnih porazdelitev pa ne. Povzetek HDR pa je enolično določen in jasno povzame območje, kjer je verjetnost/gostota največja. V primeru večmodalnih aposteriornih porazdelitev HDR sicer ni nujno interval, a v naših rezultatih s takšnimi porazdelitvami ne bomo imeli opravka.

Interpretacija bayesovskih intervalov, npr. 95 % CI ali 95 % HDR je relativno preprosta: prava vrednost parametra leži v intervalu s 95 % verjetnostjo.

2.10.1 Enostavni slučajni vzorec

Ob predpostavki, da imamo enostavni slučajni vzorec in da v meritvah prevalence ni napak, se lahko omejimo na dva podatka: velikost vzorca (n) in število pozitivnih primerov (y). Prevalenco modeliramo z binomsko porazdelitvijo, kjer je edini parameter prevalenca:

$$y \sim \text{Binomial}(n, \theta)$$

Za apriorno porazdelitev prevalences smo izbrali porazdelitev beta

$$\theta \sim \text{Beta}(a_0, b_0)$$

ki je konjugirana in nam da preprosto aposteriorno porazdelitev prevalences:

$$\theta | y \sim \text{Beta}(a_0 + y, b_0 + n - y).$$

V vseh primerih rezultatov smo uporabili neinformativno (Jeffreysovo) aposteriorno porazdelitev $a_0 = 0,5$, $b_0 = 0,5$. Na tem mestu lahko razpravljamo, če bi bilo bolj

smiselno uporabiti bolj informativno apriorno porazdelitev, ki bi temeljila na strokovnem znanju in podatkih iz drugih držav. Za neinformativno apriorno porazdelitev smo se odločili, saj menimo, da zmanjšanje negotovosti ne bi odtehtalo morebitne pristranskosti, ki bi jo s tem vnesli v raziskavo.

2.10.2 Popravek za specifičnost in občutljivost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG za oceno seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 05. 05. 2020 in z dne 15. 06. 2020

Napake v testiranju lahko pripeljejo do večjih napak pri oceni seroprevalence, še posebej, če je seroprevalenca zelo nizka ali zelo visoka. Naš model za preprost slučajen vzorec bomo sedaj razširili z upoštevanjem možnosti, da občutljivost in specifičnost testa nista 100 %.

Najprej poleg seroprevalence v podatkih vpeljemo še dejansko seroprevalenco θ_{true} . Torej, θ ocenjuje delež pozitivnih testov, θ_{true} pa delež okuženih, ki nas pravzaprav zanima. Seroprevalenci sta povezani z enačbo

$$\theta = w_{sens}\theta_{true} + (1 - w_{spec})(1 - \theta_{true})$$

kjer sta w_{sens} in w_{spec} občutljivost in specifičnost testa (deleža pravilno izmerjenih pozitivnih in negativnih primerov). Občutljivost in specifičnost sta med 0 in 1. V primeru, ko sta 1, sta seroprevalenca v podatkih in dejanska seroprevalenca enaki.

Model za preprost slučajen vzorec lahko sedaj razširimo v model, ki upošteva občutljivost in specifičnost:

$$y \sim \text{Binomial}\left(n, w_{sens}\theta_{true} + (1 - w_{spec})(1 - \theta_{true})\right)$$

$$\theta \sim \text{Beta}(a_0, b_0)$$

Specifičnost w_{spec} smo obravnavali kot parameter, saj je glede njene vrednosti nekaj negotovosti. Tako je bila npr. po podatkih, ki so bili na voljo konec aprila 2020, specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG po navodilih proizvajalca testa približno 99,6 %, kar temelji na 1.367 preizkusih in 5 lažno pozitivnih rezultatih. Smiselno apriorno mnenje o specifičnosti je torej

$$w_{sens} \sim \text{Beta}(1362, 5).$$

Čeprav bi lahko tudi občutljivost w_{sens} obravnavali kot parameter, smo jo obravnavali kot konstanto, ki jo določi uporabnik, saj je v našem primeru občutljivost kombinacije obeh diagnostičnih testov (testa za določanje SARS-CoV-2 RNA in testa za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2) 100 %.

Aposteriorna porazdelitev parametrov θ_{true} in w_{sens} pri tem modelu in izbiri apriornih porazdelitev ni standardna porazdelitev, zato smo se poslužili aproksimacije z MCMC (Markov Chain Monte Carlo; metoda Monte Carlo z markovskimi verigami). Natančneje, model smo implementirali v programskem jeziku Stan (Stan Development Team, 2019) in uporabili privzet vzorčevalnik.

Model v programskem jeziku Stan:

```
data {
  int<lower = 1> n;
  int<lower = 0> y;
  real<lower = 0, upper = 1> sens_true;
  int<lower = 0> spec_tp;
  int<lower = 0> spec_fp;
}

parameters {
  real<lower = 0, upper = 1> p;
  real<lower = 0, upper = 1> spec_true;
}

model {
  spec_true ~ beta(spec_tp, spec_fp);
  p ~ beta(0.5, 0.5);
  y ~ binomial(n, sens_true * p + (1 - spec_true) * (1 - p));
}
```

Pri MCMC smo uporabili 1.000 iteracij za samodejno nastavljanje parametrov vzorčevalnika in 1 milijon iteracij vzorčenja, kar je bilo dovolj, da so vse napake MCMC manjše od decimalnih mest, ki smo jih uporabili pri poročanju rezultatov.

V obdobju po preliminarni analizi rezultatov seroprevalence v prvem tednu maja 2020 je bilo v recenzirani znanstveni literaturi objavljenih več raziskav, ki so (bolj ali manj natančno) evalvirale specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG (glej poglavje 2.6.2). Te nove informacije smo pri ponovni oceni seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 15. 06. 2020 upoštevali tako, da smo združili vse vzorce in vse lažno pozitivne ter uporabili zgornji model. Ta pristop predpostavlja, da so rezultati različnih raziskav med seboj neodvisni in da vse raziskave merijo specifičnost, ki nas zanima. Prva predpostavka je še smiselna, saj raziskave temeljijo na različnih vzorcih, druga predpostavka pa ne, saj se študije razlikujejo glede na populacijo, na katero merijo specifičnost, in glede na sam postopek merjenja (in dodatne merske napake). Da ta predpostavka verjetno ne drži, govorijo tudi sami

podatki. Razlike med rezultati nekaterih raziskav, npr. raziskavo proizvajalca testa in štirimi raziskavami, katerih aposteriorni intervali se ne prekrivajo z intervalom iz podatkov proizvajalca testa, so tako velike, da je skoraj nemogoče, da bi bile zgolj posledica vzorčenja.

Med rezultati različnih raziskav, ki so evalvirale specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG in so bile objavljene v recenzirani znanstveni literaturi v obdobju po prvotni preliminarni analizi rezultatov v prvem tednu maja 2020 so torej razlike, ki jih ne znamo pojasniti. Čeprav jih ne moremo pojasniti, pa jih lahko upoštevamo pri oceni specifičnosti testa. Pripravili smo model, ki hkrati oceni specifičnost in prevalenco. Del za oceno prevalence je enak kot prej:

$$y \sim \text{Binomial}(n, w_{sens}\theta_{true} + (1 - w_{spec})(1 - \theta_{true}))$$

$$\theta_{true} \sim \text{Beta}(a_0, b_0)$$

Namesto znanih konstant za apriorno porazdelitev za w_{spec} pa sedaj uporabimo parametra a in b :

$$w_{spec} \sim \text{Beta}(a, b).$$

Nato predpostavimo, da so deleži pravilno negativno klasificiranih vzorcev (specifičnosti) posameznih študij w_i tudi iz te porazdelitve:

$$w_i \sim \text{Beta}(a, b).$$

Na ta način trdimo, da so si specifičnosti, ki jih ocenjujejo raziskave, podobne, a ne nujno enake, zaradi napak, ki jih bomo upoštevali, a jih ne bomo poskušali pojasniti. Večja razpršenost specifičnosti bo pomenila večjo negotovost v to, kje je prava specifičnost.

Preostane nam samo še, da specifičnost raziskave povežemo s podatki te raziskave, velikostjo vzorca n_i in številom pravilno klasificiranih pozitivnih y_i :

$$y_i \sim \text{Binomial}(n_i, w_i).$$

Z besedami: iz podatkov raziskav ocenimo porazdelitev specifičnosti, iz porazdelitev specifičnosti ocenimo porazdelitev specifičnosti, le-ta pa se upošteva pri oceni porazdelitve seroprevalence.

Aposteriorna porazdelitev parametrov pri tem modelu ni standardna porazdelitev, zato smo se spet poslužili aproksimacije z MCMC. Model v programskem jeziku Stan:

```
data {
  int<lower = 1> n_prev;
  int<lower = 0> y_prev;
  int<lower = 1> m;
  int<lower = 0> n[m];
  int<lower = 0> y[m];
  real<lower = 0, upper = 1> sens_true;
}

parameters {
  real<lower = 0> a;
  real<lower = 0> b;
  real<lower = 0, upper = 1> p;
  real<lower = 0, upper = 1> w[m];
  real<lower = 0, upper = 1> spec_true;
}

model {
  for (i in 1:m) {
    y[i] ~ binomial(n[i], w[i]);
  }

  w ~ beta(a, b);
  spec_true ~ beta(a, b);
  p ~ beta(0.5, 0.5);
  y_prev ~ binomial(n_prev, sens_true * p + (1 - spec_true) * (1 - p));
}
```

Pri MCMC smo uporabili 1.000 iteracij za samodejno nastavljanje parametrov vzorčevalnika in 100.000 iteracij vzorčenja, kar je bilo dovolj, da so vse napake MCMC manjše od decimalnih mest, ki smo jih uporabili pri poročanju rezultatov.

2.10.3 Popravek za neodziv

Predpostavka enostavnega slučajnega vzorca ni realna, saj je bilo v naši raziskavi zaradi praktične izvedljivosti uporabljeno stratificirano dvo-stopenjsko vzorčenje. Poleg tega se niso vsi udeleženci odzvali, kar predstavlja potencialen vir pristranskosti. Te probleme lahko vsaj delno naslovimo tako, da oceno prevalence dopolnimo s podatki, ki so nam na voljo – spolom, letnico rojstva (kategorizirano po desetletjih, pri čemer vsi starejši od 90 let predstavljajo eno kategorijo), tipom naselja in regijo.

V prvem koraku smo modelirali odvisnost med dodatnimi podatki in seroprevalenco. V drugem koraku smo z modelom iz prvega koraka napovedali seroprevalenco za vsak stratum in nato napovedi utežili z velikostmi stratumov. Ta pristop lahko uvrstimo v družino pristopov MRP (*angl. Multilevel Regression with Poststratification*).

Za modeliranje seroprevalence smo uporabili logistično regresijo (binomski posplošeni linearni model s povezovalno funkcijo logit). Kot neodvisne spremenljivke smo

uporabili spol ter interakcije (vse kombinacije) med spolom in letnico rojstva. Letnico rojstva, tip naselja in regijo pa smo modelirali hierarhično (kot t.i. slučajne učinke) ter na ta način omilili morebitne težave zaradi premajhnega števila vzorcev v določeni kategoriji.

Za sklepanje iz modela smo ponovno uporabili MCMC. Uporabili smo paket rstanarm, ki že vsebuje potrebno implementacijo bayesovskih hierarhičnih posplošenih linearnih modelov (stan_glmer). Uporabili smo privzete apriorne porazdelitve. Pri MCMC smo uporabili 1.000 iteracij za samodejno nastavljanje parametrov vzorčevalnika in 100.000 iteracij vzorčenja, kar je bilo dovolj, da so vse napake MCMC manjše od decimalnih mest, ki smo jih uporabili pri poročanju rezultatov.

2.10.4 Popravek za specifičnost in občutljivost testov Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S za oceno seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 25. 11. 2020 ter za oceno seroprevalence v slovenski populaciji oktobra/novembra 2020

Zaradi nejasne specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ugotovljene v evalvacijah testa objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi nismo mogli natančneje oceniti intervala seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020 (podrobno opisano v poglavju 2.6.2). Zato smo sredi novembra 2020 vse vzorce krvi odvzete v prvi fazi raziskave ($n = 1.316$) ponovno testirali na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 z drugačnim diagnostičnim pristopom, in sicer s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 ter Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S (podrobno opisano v poglavju 2.6.2). Z obema navedenima testoma smo testirali tudi vse vzorce krvi ($n = 1.211$) odvezete ob zaključku druge faze raziskave (podrobno opisano v poglavju 2.9.1). Zaradi anonimizacije vzorcev krvi, odvzetih v prvi fazi raziskave, opravljene sredi maja 2020, ne vemo, kateri vzorci iz prve in druge faze raziskave predstavljajo pare vzorcev iste osebe.

Podobno kot smo predpostavili v prvem sklopu analiz, smo tudi tu predpostavili, da 3.000 oseb iz prvotnega načrta vzorčenja predstavlja populacijo. Pri tem največjo težavo predstavlja neodziv. V zadnjem delu druge faze raziskave je bil neodziv še večji, zato smo vse ocene popravili na neodziv s podatki, ki so na voljo. Uporabili smo preprosto linearno regresijo in post-stratifikacijo po spolu, starostni skupini in regiji.

Podatke iz prve in zaključka druge faze raziskave smo analizirali v dveh časovnih točkah – dan po zaključku testiranja v posamezni fazi in 14 dni pred začetkom testiranja v tisti fazi. Analizo v obdobju med začetkom in zaključkom testiranja, predvsem zaradi silovitega razmaha epidemije v Sloveniji v času odvzema vzorcev ob zaključku druge faze raziskave, oteži dejstvo, da vrstni red testiranja udeležencev raziskave ni bil naključen (odvisen je bil tudi od zdravstvenega stanja udeležencev), zato se bomo taki analizi izognili.

V časovni točki dan po zadnjem testiranju v posamezni fazi zato lahko zanesljivo ocenimo le spodnjo mejo seroprevalence:

- osebe, ki so bile testirane in negativne na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 bolj proti začetku posamezne faze raziskave, bi bile lahko do trenutka testiranja že v stiku z virusom SARS-CoV-2. Ker je zbiranje vzorcev krvi v zadnjem delu druge faze raziskave potekalo v obdobju izjemno hitre rasti kumulativne okuženosti (incidence aktivne bolezni COVID-19), je delež takšnih preiskovancev lahko nezanemarljiv, z danimi podatki zato ne moremo zanesljivo oceniti zgornje meje seroprevalence;
- osebe, ki so bile testirane in negativne na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 bolj proti zaključku posamezne faze raziskave, bi tudi bile lahko lažno negativne, saj občutljivost testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2 narašča s številom dni po pojavu prvih simptomov oz. prvem dokazu SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela in testi za določanje prisotnosti protiteles anti-SARS-CoV-2 dosežejo skoraj 100 % raven občutljivosti šele 14 dni ali več po pojavu prvih simptomov oz. prvega dokaza SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela.

Ko smo ocenjevali spodnjo mejo seroprevalence za dan po zadnjem testiranju v posamezni fazi raziskave, smo dodatno predpostavili popolno občutljivost uporabljenih testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2 (brez lažno negativnih). Na ta način dejansko zanesljivo ocenjujemo spodnjo mejo seroprevalence, saj je seroprevalenca zagotovo višja (in zagotovo ne nižja) od ocenjene.

Ocena spodnje meje seroprevalence na dan po zadnjem testiranju v posamezni fazi raziskave obenem predstavlja oceno zgornje meje seroprevalence na dan 14 dni pred prvim testiranjem v posamezni fazi raziskave. Dejanska seroprevalenca na tisti dan

zagotovo ni bila večja od ocene, saj zajame vse, ki so v stik z virusom SARS-CoV-2 prišli 14 dni ali več pred prvim testiranjem na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2, v oceno pa so zajeti tudi tisti, ki so z virusom SARS-CoV-2 prišli v stik 14 dni po prvem testiranju ali kasneje. Podobno kot prej pri dnevu po zadnjem testiranju tudi tu brez dodatnih podatkov ali predpostavk ne moremo dobro oceniti spodnje meje seroprevalence na dan 14 dni pred testiranjem oz. lahko kot spodnjo mejo postavimo kvečjemu oceno seroprevalence iz prve faze raziskave. Pri tem pa ne predpostavimo 100 % občutljivosti uporabljenih testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2, ampak ocene občutljivosti iz specifikacij proizvajalcev posameznih testov (podrobno opisano v poglavju 2.6.3). Po podatkih, ki so bili na voljo konec novembra 2020, je specifičnost testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 ocenjena na 99,81 %, ocena temelji na 5.272 testiranih vzorcih (podrobno opisano v poglavju 2.6.3.1). Specifičnost testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S je ocenjena na 99,98 %, ocena temelji na 5.991 testiranih vzorcih (podrobno opisano v poglavju 2.6.3.2). Občutljivost testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 vsaj 14 dni po prvem dokazu SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela je ocenjena na 100 %, ocena temelji na 29 vzorcih (podrobno opisano v poglavju 2.6.3.1). Občutljivost testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S vsaj 14 dni po prvem dokazu SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela je ocenjena na 89,23 %, ocena temelji na 130 vzorcih (podrobno opisano v poglavju 2.6.3.2).

Ker merita različne vrste protiteles anti-SARS-CoV-2 (proti virusni beljakovini N in virusni beljakovini S), predpostavimo, da se testa Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S motita neodvisno drug od drugega.

2.10.4.1 Statistično modeliranje – modeliranje deleža za dva testa

Namen statističnega modela je oceniti delež. V tem primeru je delež seroprevalence v slučajnem vzorcu, ki bo predstavljal oceno seroprevalence. Za razliko od prvega sklopa analiz imamo tokrat za vsak vzorec krvi rezultat dveh različnih testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2, za katera predpostavimo, da sta neodvisna. Imamo torej štiri možne izide, ki so odvisni od deleža seroprevalence ter morebitnih napak testiranja. Specifičnosti in občutljivosti testa ne vključimo zgolj kot številki, ampak preko apriorne porazdelitve upoštevamo, da sta samo oceni, ki temeljita na testiranju na določenem končnem številu vzorcev.

Model v probabilističnem programskem jeziku Stan:

```
data {
  int<lower = 1> n;
  int<lower = 1> y[n];
  real<lower = 0, upper = 1> sens_p[2];
  real<lower = 0, upper = 1> spec_p[2];
  int<lower = 1> sens_n[2];
  int<lower = 1> spec_n[2];
}

parameters {
  real<lower = 0, upper = 1> p;
  real<lower = 0, upper = 1> spec_true[2];
  real<lower = 0, upper = 1> sens_true[2];
}

model {
  vector[4] probs;

  for (i in 1:2) {
    sens_true[i] ~ beta(sens_n[i] * sens_p[i], sens_n[i] * (1 - sens_p[i]));
    spec_true[i] ~ beta(spec_n[i] * spec_p[i], spec_n[i] * (1 - spec_p[i]));
  }

  p ~ beta(0.5, 0.5);
  // 11, 10, 01, 00
  probs[1] = sens_true[1] * sens_true[2] * p + (1 - spec_true[1]) * (1 - spec_true[2])
* (1 - p);
  probs[2] = sens_true[1] * (1 - sens_true[2]) * p + (1 - spec_true[1]) *
(spec_true[2]) * (1 - p);
  probs[3] = (1 - sens_true[1]) * sens_true[2] * p + (spec_true[1]) * (1 -
spec_true[2]) * (1 - p);
  probs[4] = (1 - sens_true[1]) * (1 - sens_true[2]) * p + (spec_true[1]) *
(spec_true[2]) * (1 - p);
  y ~ categorical(probs);
}
```

Pri MCMC smo uporabili 5.000 iteracij za samodejno nastavljanje parametrov vzorčevalnika in 100.000 iteracij vzorčenja, kar je bilo dovolj, da so vse napake MCMC manjše od decimalnih mest, ki smo jih uporabili pri poročanju rezultatov.

2.10.4.2 Popravek za spol, starostne skupine in regije za dva testa

Da bi popravili ocene z upoštevanjem zastopanosti stratumov v celotni populaciji, smo model razširili tako, da smo delež modelirali odvisno od prispevka spola, starostne skupine in regije (vse tri so kategorične spremenljivke). Njihovo vsoto smo z deležem povezali z inverzom logistične funkcije. V svojem bistvu je torej model logistična regresija deleža iz neodvisnih spremenljivk, na podlagi katerih smo stratificirali. Seveda pa še vedno vsebuje popravke za napake testov.

Model v probablističnem programskem jeziku Stan:

```
data {
  int<lower = 1> n;
  int<lower = 1> y[n];
  real<lower = 0, upper = 1> sens_p[2];
  real<lower = 0, upper = 1> spec_p[2];
  int<lower = 1> sens_n[2];
  int<lower = 1> spec_n[2];

  int age[n];
  int sex[n];
  int reg[n];
}

parameters {
  real<lower = 0, upper = 1> spec_true[2];
  real<lower = 0, upper = 1> sens_true[2];
  real beta_age[9];
  real beta_sex[2];
  real beta_reg[12];
}

model {
  vector[4] probs;
  real p0;
  for (i in 1:2) {
    sens_true[i] ~ beta(sens_n[i] * sens_p[i], sens_n[i] * (1 - sens_p[i]));
    spec_true[i] ~ beta(spec_n[i] * spec_p[i], spec_n[i] * (1 - spec_p[i]));
  }

  beta_age ~ normal(0, 4);
  beta_sex ~ normal(0, 4);
  beta_reg ~ normal(0, 4);

  for (i in 1:n) {
    p0 = inv_logit(beta_age[age[i]] + beta_sex[sex[i]] + beta_reg[reg[i]]);
    probs[1] = sens_true[1] * sens_true[2] * p0 + (1 - spec_true[1]) * (1 - spec_true[2]) * (1 - p0);
    probs[2] = sens_true[1] * (1 - sens_true[2]) * p0 + (1 - spec_true[1]) * spec_true[2] * (1 - p0);
    probs[3] = (1 - sens_true[1]) * sens_true[2] * p0 + (spec_true[1]) * (1 - spec_true[2]) * (1 - p0);
    probs[4] = (1 - sens_true[1]) * (1 - sens_true[2]) * p0 + (spec_true[1]) * spec_true[2] * (1 - p0);
    y[i] ~ categorical(probs);
  }
}

generated quantities {
  real pred[2, 9, 12];

  for (i in 1:2) {
    for (j in 1:9) {
      for (k in 1:12) {
        pred[i, j, k] = inv_logit(beta_age[j] + beta_sex[i] + beta_reg[k]);
      }
    }
  }
}
```

Model smo razširili tudi z napovedjo seroprevalence za vsak stratum v kartezičnem produktu treh neodvisnih spremenljivk. Vzorce iz aposteriorne porazdelitve teh

napovedi utežimo s težo stratumov v predvidenem vzorcu 3.000 oseb, da dobimo popravljeno oceno seroprevalence.

Pri MCMC smo uporabili 5.000 iteracij za samodejno nastavljanje parametrov vzorčevalnika in 10.000 iteracij vzorčenja, saj gre za računsko bolj zahteven model. Napake MCMC so kvečjemu na 2 decimalnem mestu in ne vplivajo na poročane razlike med ocenami in popravljenimi ocenami.

2.10.5 Popravek za specifičnost in občutljivost testa cobas SARS-CoV-2 Test za oceno okuženosti slovenske populacije konec aprila 2020

Občutljivost in specifičnost uporabljenega testa za določanje SARS-CoV-2 RNA (cobas SARS-CoV-2 Test) je ocenjena kot 100 %, zato popravek za občutljivost in specifičnost testa za oceno okuženosti oz. razširjenosti aktivne okužbe z virusom SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 ni bil potreben.

2.11 Razvoj aplikacije in informacijska podpora

Na Fakulteti za računalništvo in informatiko UL se je sredi aprila 2020 v Laboratoriju za bioinformatiko oblikovala močna razvojna ekipa, ki je vzpostavila informacijsko infrastrukturo za izvedbo raziskave. Glavni del razvoja je bila vzpostavitev podatkovne baze, kamor se zapisujejo podatki o sodelujočih in rezultati laboratorijskih preiskav. Ker je pri tovrstni raziskavi ključna zaščita osebnih podatkov in varnost kliničnih rezultatov, se je bazo oblikovalo po principu "varnost na prvem mestu". To pomeni, da so podatki enkriptirani, da ima baza vzpostavljene varnostne kopije, dostop do podatkov pa je omogočen le z dvostopenjsko avtentikacijo. Dostop do baze je tudi z avtentikacijo možen le preko spletnega vmesnika. Razvito bazo podatkov je tekom raziskave – z različnimi nivoji dovoljenega vpogleda – uporabljalo skoraj petdeset sodelavcev, ki vključujejo koordinatorje raziskave, laboratorij, klicni center in sodelavce, ki so na terenu pridobivali vzorce. Osnovno statistiko poteka raziskave je lahko javnost v realnem času spremljala na pričujočih spletnih straneh.

Poleg razvoja podatkovne baze so razvojni inženirji na Fakulteti za računalništvo in informatiko UL pomagali tudi ekipam z obdelavo in vnosom odgovorov iz vprašalnikov. Vsak sodelujoči v raziskavi je namreč izpolnil dvostranski vprašalnik o simptomih,

simptomih družinskih članov, vrsti dela, ki ga opravlja, tipu interakcije s sodelavci in podobno. V raziskavi smo ročno izpolnjene vprašalnike prečitali s čitalcem, na Fakulteti za računalništvo in informatiko UL pa smo razvili program za avtomatično prepoznavo izpoljenih vprašalnikov. Pri tem smo uporabili nekatere moderne tehnike umetne inteligence. Za preverjanje avtomatsko razbranih podatkov smo razvili pregledovalnik vprašalnikov, kjer se na levem delu okna izpiše spletni obrazec z vprašalnikov, na desnem delu pa kopija skeniranega vprašalnika. Pregled vprašalnikov je na ta način veliko hitrejši. S strojno obdelavo vprašalnikov smo privarčevali na času, ki bi bil sicer potreben za ročni vnos in na ta način bistveno hitreje izvedli potrebne analize.

Baze podatkov in aplikacije so bile shranjene na varnih strežnikih Fakultete za računalništvo in informatiko UL. Zaradi izjemnega pomena teh podatkov za Republiko Slovenijo, je bilo poskrbljeno tudi za sprotno izdelavo varnostnih kopij in shranjevanje kopij na ločenih lokacijah.

Ekipe programerjev in inženirjev računalništva s Fakultete za računalništvo in informatiko UL je za razvoj baze podatkov in spletne aplikacije za podporo zbiranja podatkov vložila skoraj tisoč ur dela (razpredelnica 6). Spletna aplikacija je bila za prve vnose nared po praktično v enem tednu. Programerski maraton, ki je vodil k brezhibno delujoči programski podpori projekta, je potekal tudi med vikendi in prazniki (razpredelnica 6).

Razpredelnica 6: V prvih dveh tednih, takoj po sprejetju vabila k sodelovanju na projektu, je ekipa programerjev in inženirjev računalništva s Fakultete za računalništvo in informatiko UL za razvoj baze podatkov in spletne aplikacije za podporo zbiranja podatkov vložila skoraj tisoč ur dela. Spletna aplikacija je bila za prve vnose nared po praktično v enem tednu. Programerski maraton, ki je vodil k brežhibno delujoči programski podpori projekta, je potekal tudi med vikendi in prazniki.

Datum	Dan	Komentar	Ur
10.04.2020	petek	prvi sestanek razvojne ekipe	48
11.04.2020	sobota	oblikovanje zahtev uporabnikov	52
12.04.2020	nedelja	velika noč	59
13.04.2020	ponedeljek	velikonočni ponedeljek	65
14.04.2020	torek		68
15.04.2020	sreda	delujoči prototip baze	91
16.04.2020	četrtek		98
17.04.2020	petek	delujoči spletni vmesniki	100
18.04.2020	sobota	vnos sodelujočih	75
19.04.2020	nedelja	testiranje prve različice	51
20.04.2020	ponedeljek	uporaba na terenu	46
21.04.2020	torek	nadgradnje z laboratorijskim delom	53
22.04.2020	sreda	analiza vprašalnikov	50
23.04.2020	četrtek		67
24.04.2020	petek		42
			965

Na slikah 2 do 8 podajamo nekaj slikovnih izrisov sicer obsežnejšega spletnega vmesnika aplikacije razvite za potrebe raziskave. Vsi podatki na teh izrisih so izmišljeni.

COVID-19 Slovenija admin_ Odjava

Seznam oseb | 3000

Prikaži samo

Prikaži oseb na stran Iskanje

Zap. št.	Primek in ime	Rojen	Naslov	Kraj	Pošta	Tel. št.	Status	Izjava	Spremlj. list	Kri	Bris	Vprašalnik	Sledenje	Odgovori	Aktivni klici	Zadnji kontakt(dni)
3000	Hlebš Janez	1947	SELA 1E	Bukovski Vrh	1241		Prekinil sodelovanje (28.05.20 20:20)	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		1	0	42
2999	Veberič Maja	1983	ŠEROVO 125	Batuje	3240		Prekinil sodelovanje (28.05.20 20:20)	Ne	Da	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		2	0	25
2998	Pančur Josip	1956	GRABE 1B	Bohova	2277		Sodeluje (17.05.20 17:17)	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>	<input type="button" value="Sledenje"/>	1	0	25
2997	Karinger Janez	1990	NOVO 1A	Ciglence	2311		Sodeluje (17.05.20 18:18)	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>	<input type="button" value="Sledenje"/>	1	0	25
2996	Egartner Marko	1963	LIVOLD 178	Adrijanci	1330		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	
2995	Karel Stanka	1980	SPODNJI 111	Cirkuše v Tuhinju	1281		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	
2994	Žerovnik Karel	1957	PAMEČE 1A	Nasovče	2380		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	
2993	Stegovec Zoran	1953	DORNICE 18	Nimno	1217		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	
2992	Toman Stefan	1960	DOLNJE 130	Ilirska Bistrica	8283		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	
2991	Cedlinik Jurij	1994	AJŠEVICA 137	Bukovica	5000		Neznan	Ne	Ne	Ne	Ne	<input type="button" value="Prazen"/>		0	0	

Prejšnja ... Naslednja

Slika 2. Pregledovalnik seznama oseb, ki je na voljo administratorju projekta. Poleg osebnih podatkov je viden status sodelovanja (kolona Status) in podatki o sledenju osebe v drugi fazi projekta (zadnje tri kolone). Administrator lahko iz tega okna pregleduje vprašalnik in vnaša oziroma pregleduje podatke o sledenju. (Podatki so izmišljeni.)

COVID-19 Slovenija

👤 nmp 📄 Odjava

Petrič Borut
Rojen/a: 1949
Zaporedna številka: 1764

Izjava podpisana
 Spremni list izpolnjen
 Vzorec krvi odvzet
 Bris odvzet
 Anketa oddana

Slika 3. Vpisno okno za vnos informacij o obisku pri sodelujočem pri raziskavi. Aplikacijo so na mobilnih napravah (telefonih) so uporabljali sodelavci na terenu, podatki pa so se v trenutku vpisa prenesli na bazo podatkov o raziskavi, tako da je bilo možno sproti slediti statistikam o uspešnosti zbiranja podatkov. (Podatki so izmišljeni.)

COVID-19 Slovenija

👤 izvidi_ 📄 Odjava

Rezultati | 2

Prikaži samo

Prikaži oseb na stran Iskanje

	↕ Priimek in ime ↕	↕ Rojen ↕	↕ PCR vnešen ↕	↕ IgG vnešen ↕	↕ IgA vnešen ↕
<input type="button" value="Neg"/>	Stegovec Zoran	1953	Da	Da	Da
<input type="button" value="Neg"/>	Pančur Josip	1956	Ne	Ne	Ne

COVID-19 Slovenija

👤 izvidi_ 📄 Odjava

Stegovec Zoran
Rojen/a: 1953

PCR*
 Pozitiven
 Negativen

E gen

Orf

Serološki IgG*
 Pozitiven
 Negativen

IgG vrednost

Serološki IgA*
 Pozitiven
 Negativen

IgA vrednost

Slika 4. Pregledovalnik oseb z laboratorijskimi rezultati (levo) in obrazec za vnos laboratorijskih rezultatov (desno). (Podatki so izmišljeni.)

COVID-19 Slovenija vprašalnik

FFBE90
Seja poteče v 04:20

Poklic:
 Naznan
 Predšolski otrok
 Šolski otrok
 Študent
 Delovno aktivna oseba
 Upokojenec
 Gospodinja
 Kmet

Današnji datum (iz ankete): _____

ZDRAVSTVENO STANJE
1. Ali ste opazili/občutili katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov? v zadnjih 2 tednih v zadnjih 2 mesecih

Vročina:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mrzlica:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečina v mišicah:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izcedek iz nosa:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečina v prsnem košu:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izguba vonjava/okusa:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Slabost ali bruhanje:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v trebuhu:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

2. Ali ste zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov poiskali zdravniško pomoč? DA NE
 3. Ali ste bili zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov hospitalizirani? DA NE

DEMOGRAFSKI PODATKI IN PODATKI O TESNIH STIKIH Z DRUGIMI OSEBAMI
1. Ali živite sami? DA NE

2. Če ne, koliko ljudi živi v skupnem gospodinjstvu poleg vas? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je mlajših od 12 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 12 in 17 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 18 in 70 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih od 70 let? _____

3. Ste bili pred razglavitvijo epidemije zaposleni – označite spodaj:
 zaposlen za polni delovni čas
 zaposlen za skrajšan delovni čas
 samozaposlen
 honorarno zaposlen
 nezaposlen

4. Označite, v kateri sektor spada vaš delodajalec:
 zdravstvo in socialno varstvo
 kmetijstvo ali gozdarstvo
 kultura in umetnost
 nepremičnine
 oskrba z elektriko, vodo, plinom
 tehnična popravila, gospodinjstva dela
 zasebne storitve
 industrija
 drugo
 transport
 gospodarstvo
 trgovina
 izobraževanje
 turizem ali hotelirstvo
 gradbeništvo
 javna uprava
 finančni sektor

5. V kakšni obliki poteka vaše delo med epidemijo, če ste zaposleni in delovno aktivni?
 hodim v službo
 delam od doma
 sem na daljavo
 varstvo otroka
 drugo

6. Če hodite v službo, ali ste na delovnem mestu obkroženi z drugimi ljudmi? DA NE

7. Če hodite v službo in imate predšolske otroke/otroke do 12. leta starosti, kako je organizirano njihovo varstvo?
 doma, samo z ljudmi v skupnem gospodinjstvu
 s pomočjo babic ali dedkov
 s pomočjo prijateljev in znancev
 s pomočjo vrstev in let
 doma, skupaj z otroki iz drugih gospodinjstev
 s pomočjo tet ali stricov
 z obšolsko pomočjo
 drugo

8. Ali je kdo od ljudi v skupnem gospodinjstvu v zadnjih dveh mesecih opazil/občutil katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov?

	otroci do 12 let	osebe med 12-17 let	osebe med 18-70 let	osebe starejše od 70 let
Vročina:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v mišicah (mialgija):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

9. Ali lahko ocenite s koliko ljudmi, ki ne živijo z vami v skupnem gospodinjstvu, ste bili v tesnem/heporednem stiku v zadnjih 2 tednih?
 0 1-2 3-6 7-15 16-30 31-60 več kot 60

10. Ali ste bili v zadnjih 2 mesecih v tesnem/heporednem stiku s kom, ki je bil dokazano pozitiven na SARS-CoV-2?
 DA NE

11. Ali ste bili v zadnjih 2 tednih v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE
 12. Ali ste bili v zadnjih 2 mesecih v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE

13. Kako težko vam je dosledno spoštovati vse ukrepe, ki naj bi zajeli širjenje koronavirusa? (1 – zelo težko, 5 – zelo lahko)
 1 2 3 4 5 ne vem

DEMOGRAFSKI PODATKI IN PODATKI O TESNIH STIKIH Z DRUGIMI OSEBAMI
1. Ali žive sami? DA NE

2. Če ne, koliko ljudi živi v skupnem gospodinjstvu poleg vas? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je mlajših od 12 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 12 in 17 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 18 in 70 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih od 70 let? _____

3. Ste bili pred razglavitvijo epidemije zaposleni – označite spodaj:
 zaposlen za polni delovni čas
 zaposlen za skrajšan delovni čas
 samozaposlen
 honorarno zaposlen
 nezaposlen

4. Označite, v kateri sektor spada vaš delodajalec:
 zdravstvo in socialno varstvo
 kmetijstvo ali gozdarstvo
 kultura in umetnost
 nepremičnine
 oskrba z elektriko, vodo, plinom
 tehnična popravila, gospodinjstva dela
 zasebne storitve
 industrija
 drugo
 transport
 gospodarstvo
 trgovina
 izobraževanje
 turizem ali hotelirstvo
 gradbeništvo
 javna uprava
 finančni sektor

5. V kakšni obliki poteka vaše delo med epidemijo, če ste zaposleni in delovno aktivni?
 hodim v službo
 delam od doma
 sem na daljavo
 varstvo otroka
 drugo

6. Če hodite v službo, ali ste na delovnem mestu obkroženi z drugimi ljudmi? DA NE

7. Če hodite v službo in imate predšolske otroke/otroke do 12. leta starosti, kako je organizirano njihovo varstvo?
 doma, samo z ljudmi v skupnem gospodinjstvu
 s pomočjo babic ali dedkov
 s pomočjo prijateljev in znancev
 s pomočjo vrstev in let
 doma, skupaj z otroki iz drugih gospodinjstev
 s pomočjo tet ali stricov
 z obšolsko pomočjo
 drugo

8. Ali je kdo od ljudi v skupnem gospodinjstvu v zadnjih dveh mesecih opazil/občutil katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov?

	otroci do 12 let	osebe med 12-17 let	osebe med 18-70 let	osebe starejše od 70 let
Vročina:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v mišicah (mialgija):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno):	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

9. Ali lahko ocenite s koliko ljudmi, ki ne živijo z vami v skupnem gospodinjstvu, ste bili v tesnem/heporednem stiku v zadnjih 2 tednih?
 0 1-2 3-6 7-15 16-30 31-60 več kot 60

10. Ali ste bili v zadnjih 2 mesecih v tesnem/heporednem stiku s kom, ki je bil dokazano pozitiven na SARS-CoV-2?
 DA NE

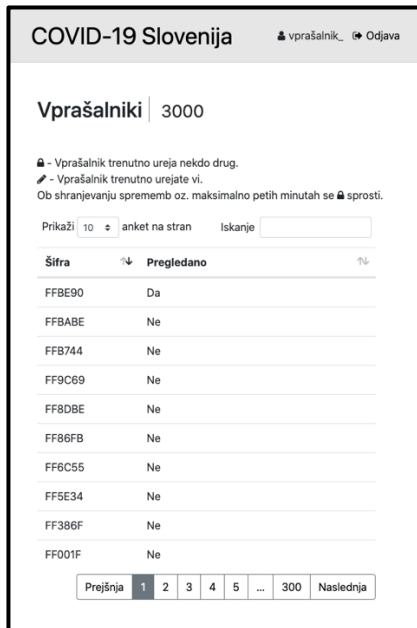
11. Ali ste bili v zadnjih 2 tednih v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE
 12. Ali ste bili v zadnjih 2 mesecih v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE

13. Kako težko vam je dosledno spoštovati vse ukrepe, ki naj bi zajeli širjenje koronavirusa? (1 – zelo težko, 5 – zelo lahko)
 1 2 3 4 5 ne vem

Naprepla hvala za sodelovanje!
2

Prekliči | Shrani | Shrani in prikaži naslednji nepregledan vprašalnik

Slika 5. Vmesnik za pregledovanje rezultatov strojnega branja ročno izpolnjenih vprašalnikov. Na levi strani so rezultati branja, na desni pa slika ročno izpolnjenega vprašalnika. Na primeru so vidne nekatere napake pri branju, ki pa jih v dejanskih primerih praktično ni bilo. Sistem je bil razvit za namene vizualne primerjave originala vprašalnika in prebranih podatkov, ki je potekala dovolj hitro, da smo lahko ročno pregledali vse vprašalnike. (Podatki so izmišljeni.)



COVID-19 Slovenija vprašalnik_ Odjava

Vprašalniki | 3000

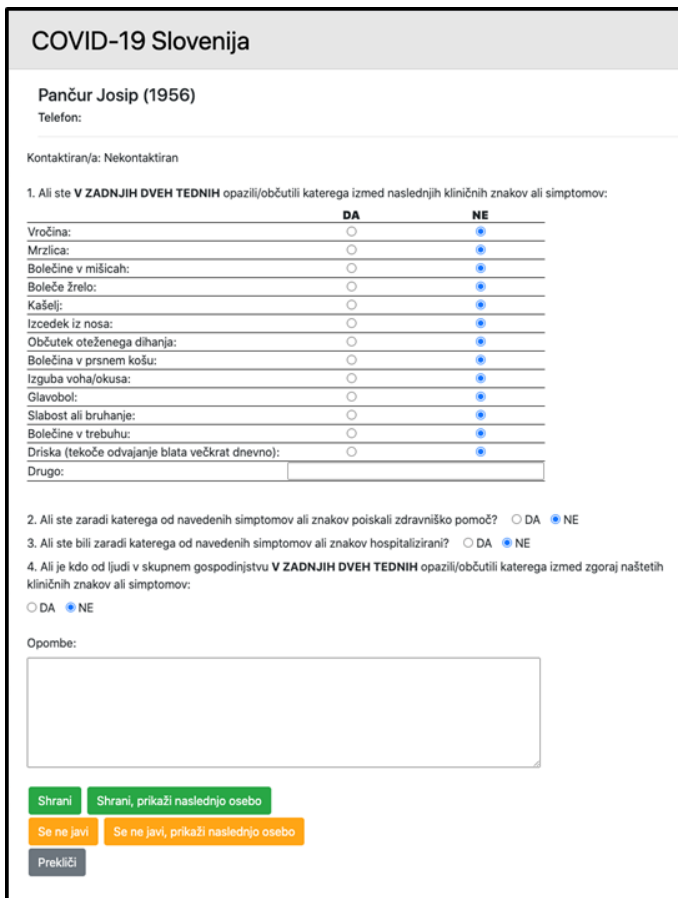
👤 - Vprašalnik trenutno ureja nekdo drug.
👤 - Vprašalnik trenutno urejate vi.
Ob shranjevanju sprememb oz. maksimalno petih minutah se sprosti.

Prikaži 10 anket na stran Iskanje

Šifra	Pregledano
FFBE90	Da
FFBABE	Ne
FFB744	Ne
FF9C69	Ne
FF8DBE	Ne
FF86FB	Ne
FF6C55	Ne
FF5E34	Ne
FF386F	Ne
FF001F	Ne

Prejšnja 1 2 3 4 5 ... 300 Naslednja

Slika 6. Vmesnik namenjen članom projektne skupine, ki so pregledovali podatke iz vprašalnikov in je služil dodeljevanju nalog pregledovalcem.



COVID-19 Slovenija

Pančur Josip (1956)
Telefon:

Kontaktiran/a: Nekontaktiran

1. Ali ste **V ZADNJIH DVEH TEDNIH** opazili/občutili katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov:

	DA	NE
Vročina:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Mrzlica:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Bolečine v mišicah:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Boleče žrelo:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Kašelj:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Izcedek iz nosa:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Občutek oteženega dihanja:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Bolečina v prsnem košu:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Izguba vonja/okusa:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Glavobol:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Slabost ali bruhanje:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Bolečine v trebuhu:	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno):	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>
Drugo:	<input type="text"/>	

2. Ali ste zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov poiskali zdravniško pomoč? DA NE

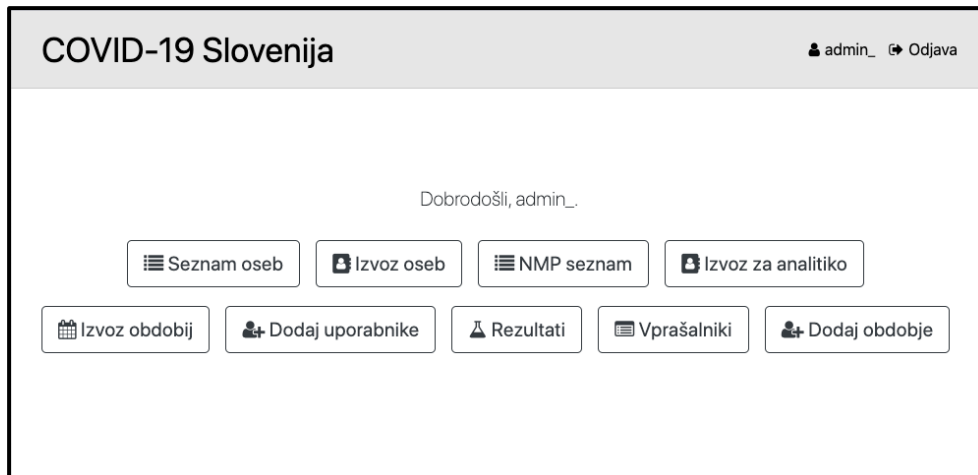
3. Ali ste bili zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov hospitalizirani? DA NE

4. Ali je kdo od ljudi v skupnem gospodinjstvu **V ZADNJIH DVEH TEDNIH** opazili/občutili katerega izmed zgoraj naštetih kliničnih znakov ali simptomov:
 DA NE

Opombe:

Shrani Shrani, prikaži naslednjo osebo
Se ne javi Se ne javi, prikaži naslednjo osebo
Prekliči

Slika 7. Del vmesnika za vnos podatkov o sledenju sodelujočih v raziskavi, ki poteka v drugi fazi projekta. (Podatki so izmišljeni.)



Slika 8. Okno administratorja projekta, ki omogoča dostop do funkcij za upravljanje pravic dostopa do različnih tipov podatkov, pregledovanje in vnos podatkov ter izvoz podatkov v datoteke, namenjene statistični obdelavi rezultatov.

3. REZULTATI

3.1 Reprezentativnost vzorca za prvo fazo raziskave

Vzorčni okvir je omogočil vključitev podatkov o spolu, starosti, regiji in tipu naselja za vseh 3.000 enot, ki so bile vključene v vzorec. Spodnje razpredelnice primerjajo odgovarjajočo strukturo respondentov, ki so sodelovali v prvi fazi raziskave (n = 1.368) (vzorec) s populacijsko strukturo (populacija). Izkaže se, da so odstopanja razmeroma majhna. Edino večje odstopanje je v starosti skupini do 10 let, kjer so starši oz. skrbniki v nekoliko večjem obsegu odklonili sodelovanje svojih otrok v anketi. Namesto tega je bilo sodelovanje nadpovprečno visoko predvsem v skupini od 51 do 60 let. V ostalih starostnih skupinah ni izrazitejših statistično značilnih razlik. Natančna stopnja značilnosti p pri preverjanju razlike vzorčne ocene s populacijskim parametrom je povsod večja od $p > 0,01$. Obstajajo sicer določena odstopanja ($0,01 < p < 0,05$) tudi v skupini 61-70 let (nekoliko boljši odziv) oziroma 21-30 let (nekoliko slabši odziv). Vsa navedena odstopanja v starostni strukturi pa so povsem v skladu z izkušnjami drugih nacionalnih raziskav.

Razpredelnica 7. Naključno izbrani preiskovanci, ki so bili povabljeni k sodelovanju glede na spol po statusu sodelovanja.

	Populacija	Vzorec
	n (%)	n (%)
N	3.000	1.368
Spol		
Moški	1.545 (51,5 %)	665 (48,6 %)
Ženski	1.455 (48,5 %)	703 (51,4 %)

Razpredelnica 8. Primerjava starostne strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave ($n = 1.368$) s populacijsko strukturo.

STAROST	Populacija (%)	Vzorec (%)
0-10	11,0	7,3
11-20	9,4	9,1
21-30	10,8	8,9
31-40	14,1	13,3
41-50	14,6	14,8
51-60	14,3	18,3
61-70	13,0	15,5
71-80	8,0	8,6
81+	4,8	4,2
Skupaj	100,0	100,0

$\chi^2 = 46,65$ ($p = 0,000$)

Razpredelnica 9. Primerjava strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave ($n = 1.368$) s populacijsko strukturo glede na regijo.

REGIJA	Populacija (%)	Vzorec (%)
Pomurska	5,5	6,0
Podravska	15,5	13,8
Koroška	3,4	3,5
Savinjska	12,4	11,5
Zasavska	2,7	2,8
Spodnjeposavska	3,6	3,1
Jugovzhodna	6,9	7,0
Osrednjeslovenska	26,3	28,0
Gorenjska	9,9	11,3
Primorsko-Notranjska	2,5	2,2
Goriška	5,7	5,8
Obalno-Kraška	5,6	5,1
SKUPAJ	100,0	100,0

$\chi^2 = 11,00$ ($p = 0,44$)

Razpredelnica 10. Primerjava strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave ($n = 1.368$) s populacijsko strukturo glede na spol.

SPOL	Populacija (%)	Vzorec (%)
Moški	50,3	48,6
Ženski	49,7	51,4
Skupaj	100,0	100,0

$\chi^2 = 1,53$ ($p = 0,216$)

Razpredelnica 11. Primerjava strukture sodelujočih prvi fazi raziskave ($n = 1.368$) s populacijsko strukturo glede na tip naselja.

TIP NASELJA	Populacija (%)	Vzorec (%)
Nekmečka naselja < 2.000 oseb	28,8	31,6
Kmečka naselja < 2.000 oseb	23,2	22,3
Naselja od 2.000-10.000 oseb	17,1	17,5
Ljubljana	13,5	13,8
Naselja > 10.000 oseb	13,0	11,4
Maribor	4,5	3,2
Skupaj	100,0	100,0

$\chi^2=12,21$ ($p=0,03$)

Kot je razvidno iz razpredelnic 9 in 10, se v pogledu regije in spola porazdelitvi vzorca in populacije statistično značilno ne razlikujeta ($p>0,5$). Do določenega odstopanja prihaja pri tipu naselja (razpredelnica 11), predvsem v kategoriji manjših nekmečkih naselij, kjer je bilo sodelovanje nekoliko večje, vendar ne ekstremno, nadpovprečno ($p=0,011$).

3.2 Poročilo klicnega centra

V obdobju od 20. 04. 2020 – 30. 04. 2020 je izbrani klicni center Episcenter sprejel 1.277 klicev preiskovancev in izvedel več kot 3.171 odhodnih klicev. Podrobno poročilo o opravljenih klicih za telefonsko številko 080 3008 je predstavljeno v razpredelnici 12.

Razpredelnica 12. Poročilo klicnega centra Episcenter o opravljenih klicih za telefonsko številko 080 3008 v obdobju 20. 04. 2020 – 30. 04. 2020.

POROČILO OPRAVLJENIH KLICEV ZA TELEFONSKO ŠTEVILKO	080 3008
Obdobje 20.4.2020 - 30.4.2020	

Število vseh klicev	Dohodni klici	Odhodni klici	Skupaj
	1277	3171	4448

Klici po dnevih			
Datum	Dohodni klici	Odhodni klici	Skupaj
20.04.2020	491	137	628
21.04.2020	264	663	927
22.04.2020	166	790	956
23.04.2020	104	536	640
24.04.2020	128	324	452
25.04.2020	17	141	158
26.04.2020	11	139	150
27.04.2020	9	0	9
28.04.2020	40	266	306
29.04.2020	30	175	205
30.04.2020	17	0	17

Statistika statusov	
<u>Sodeluje</u> <i>(potrdil sodelovanje preko KC ali maila)</i>	1368
<u>Ne želi sodelovati</u> <i>(sodelovanje zavrnil preko KC ali maila)</i>	838
Brez kontakta	654
<u>Oseba ni dosegljiva</u> <i>(preklic najmanj 3x)</i>	140

3.3 Poročilo terenskega dela za prvo fazo raziskave

Ustrezno usposobljeni zdravstveni delavci, uslužbenci NMP Pacient d.o.o., terenski sodelavci IMI MF UL in medicinske sestre iz pediatričnih oddelkov UKC Ljubljana so v 12 dneh med 20. 04. 2020 in 01. 05. 2020 opravili 84 enot reševalnih prevozov, prevozili skupno 24.950 km in samo za odvzeme vzorcev porabili več kot 2.000 delovnih ur. Poročilo NMP Pacient d.o.o. o opravljenem terenskem delu v obdobju med 20. 04. 2020 in 01. 05. 2020 je predstavljeno v razpredelnici 13.

Razpredelnica 13. Poročilo NMP Pacient d.o.o. o opravljenem terenskem delu v obdobju med 20. 04. 2020 in 01. 05. 2020.

	Število	Število	Število	Število
	prevoženih	opravljenih	terenskih	vklučenih
	km	ur	sodelavcev	preiskovancev
20. 04. 2020	92	10,42	4	19
21. 04. 2020	2.989	121,83	20	189
22. 04. 2020	2.265	113,83	20	195
23. 04. 2020	3.043	124,25	22	219
24. 04. 2020	2.854	118,67	22	218
25. 04. 2020	3.361	119,25	22	197
26. 04. 2020	3.347	102,33	24	143
27. 04. 2020	1.759	42,67	11	43
28. 04. 2020	1.078	31,25	7	29
29. 04. 2020	788	20,75	6	30
30. 04. 2020	1.922	46,92	9	51
01. 05. 2020	1.452	35,67	10	35
	24.950	887,83	179	1.368

3.4 Ocena okuženosti oz. razširjenosti aktivne okužbe s SARS-CoV-2 konec aprila 2020 v Sloveniji

Ocena okuženosti oz. razširjenosti aktivne okužbe s SARS-CoV-2 konec aprila 2020 v Sloveniji je bila najpomembnejši in praktično najuporabnejši cilj prve faze nacionalne raziskave.

Vsi intervali, ki jih poročamo, temeljijo na percentilih aposteriorne porazdelitve (2,5 % in 97,5 %).

Pri 1.366 osebah smo opravili molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA. Vzorčno povprečje okuženih je bilo 0,15 % ($n = 1.363$; aposteriorno upanje = 0,18 %; 95 % CI = [0,03–0,47 %]; 95 % HDR = [0,01–0,41 %]). Popravek za specifičnost ni bil potreben, saj je ta pri uporabljenem testu za dokazovanje prisotnosti SARS-CoV-2 RNA ocenjena na 100 %. Aposteriorno upanje prevalence po MRP (popravek za neodziv, glej Statistična obdelava podatkov – Popravek za neodziv) je bilo 0,15 % (95 % CI = [0,02–0,44 %]; 95 % HDR = [0,01–0,37 %]).

Upamo, da je bila informacija o razširjenosti aktivne okužbe s SARS-CoV-2 v splošni populaciji, pridobljena v prvi fazi nacionalne raziskave skupaj s podatki, ki so prihajali iz rednega programa testiranja, v veliko pomoč odločevalcem pri sprejemanju ustreznih odločitev o tem, kdaj začeti z nadzorovanim kratkoročnim in dolgoročnim rahljanjem ukrepov, uvedenih z namenom omejevanja epidemije okužb s SARS-CoV-2, postopnim odpiranjem trgovin, šol, podjetij in ponovnim zagonom gospodarstva na začetku maja 2020.

3.5 Ocena seroprevalence oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki so imeli v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020

Ocena seroprevalence oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki so imeli v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020, je bila sicer znanstveno zelo zanimiv cilj nacionalne raziskave, ampak praktično bistveno manj uporabna kot ocena okuženosti v prvi fazi. Noben ukrep odločevalcev namreč ni bil sprejet na podlagi ocene seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020, ampak le na podlagi ocene okuženosti splošne slovenske populacije

konec aprila 2020. Vsi intervali, ki jih poročamo, temeljijo na percentilih aposteriorne porazdelitve (2,5 % in 97,5 %).

Kot je podrobneje opisano v poglavjih 2.6.2 in 2.6.3, smo zaradi še vedno pomanjkljivega poznavanja protitelesnega imunskega odziva na okužbo s SARS-CoV-2, oceno seroprevalence oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki so imeli v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020, ocenjevali večkrat, in sicer kot:

- osnovno z dne 05. 05. 2020;
- popravljeno glede na specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG z dne 05. 05. 2020;
- dodatno popravljeno glede na nove izsledke o specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG z dne 15. 06. 2020;
- dokončno oceno seroprevalence po dodatnem testiranju vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S z dne 25. 11. 2020.

3.5.1 Ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 z dne 05. 05. 2020 - osnovna in popravljena glede na specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG

Konec aprila smo pri 1.316 osebah opravili testiranje vzorcev krvi na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG z uporabo testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG. Vzorčno povprečje seroprevalence konec aprila 2020, je bilo 3,11 % ($n = 1.318$; aposteriorno upanje = 3,15 %, 95 % CI = [2,27–4,15 %], 95 % HDR = [2,23–4,10 %]).

Glede na to, da se je SARS-CoV-2 najverjetneje prvič pojavil v človeški populaciji šele konec leta 2019, in da so bili vsi testi, s katerimi dokazujemo humoralni imunski odziv na okužbo (protitelesa anti-SARS-CoV-2), razviti pred kratkim (kot opisano v poglavju 2.6.2), so njihove dejanske klinične občutljivosti in specifičnosti še večinoma neznane oz. jih še vedno ni mogoče natančno in zanesljivo določiti. Kljub obilici razpoložljivih seroloških testov na svetovnem trgu konec novembra 2020 (več kot 420 različnih seroloških testov), še vedno ni splošno sprejetega t.i. »zlatega standarda« oz. ene same diagnostične metode za ugotavljanje prisotnosti protiteles anti-SARS-CoV-2, ki bi jo lahko (tako kot na številnih drugih področjih laboratorijske diagnostike in

mikrobiologije) uporabili kot referenčno metodo za ugotavljanje klinične občutljivosti in specifičnosti ostalih testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2. Kljub temu se je konec oktobra 2020 med vodilnimi raziskovalci po svetu in po objavi pomembne islandske raziskave (Gudbjartsson et al., 2020) izoblikovalo mnenje, da je v raziskavah, kot je slovenska nacionalna raziskava, za zanesljivo ugotavljanje seroprevalence potrebno uporabiti vsaj dva različna serološka testa, ki določata različno vrsto anti-SARS-CoV-2 protiteles, pri čemer mora imeti vsak test specifičnost nad 99,8% izmerjeno na vsaj 5.000 vzorcih, v katerih je zanesljivo pričakovati negativen rezultat (Spellberg B et al., 2020; Houlihan et al., 2020; Hicks et al., 2020; Gill in Ponsford, 2020; Hanson et al., 2020; Ripperger et al., 2020; Mekonnen et al., 2020; Lisboa Bastos et al., 2020). Kombinirana uporaba dveh tako visoko specifičnih testov v primeru pozitivnosti vzorca z obema testoma zagotavlja 100 % specifičnost oziroma 100 % negativno napovedno vrednost diagnostičnega pristopa.

Poleg tega je še vedno veliko neznank glede naravnega poteka bolezni COVID-19, zlasti imunskega (humoralnega in celičnega) odziva na okužbo, njegovega trajanja, specifičnosti, pogostosti ponovnih okužb pri predhodno izpostavljenih osebah in možnosti preprečevanja ponovnih okužb, kar glede na dejstvo, da virus SARS-CoV-2 poznamo šele slabo leto, tudi ne preseneča (Long et al. 2020; Robbianni et al. 2020; Spellberg et al., 2020; Anderson et al., 2020; Sekine et al., 2020; Hanson et al., 2020; Ripperger et al., 2020; Iwasaki, 2020; Seow et al., 2020; Weisberg et al., 2020; Ng et al., 2020; Self et al., 2020; Bray et al 2020).

Kot je podrobno opisano v poglavju 2.6.2 v času izvedbe prve faze nacionalne raziskave, razen opisane interne evalvacije testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG ter podatkov proizvajalca o lastnostih testa, v recenzirani znanstveni literaturi ni bilo objavljene nobene klinične evalvacije testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG in nobenih primerjalnih ocen različnih komercialnih seroloških testov za dokazovanje anti-SARS-CoV-2 protiteles, ki so bili takrat na evropskem trgu. Naša interna evalvacija klinične specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, opravljena sredi aprila 2020 na skupno 192 vzorcih, je pokazala 100 % specifičnost uporabljenega testa (razpredelnica 2) ter evalvacija klinične specifičnosti proizvajalca testa, ki je temeljila na testiranju 1.367 vzorcev približno 99,6 % specifičnost testa. Pomembno je tudi omeniti, da na evropskem trgu v času izvedbe prve faze nacionalne raziskave ni bilo drugih komercialnih seroloških testov za dokazovanje anti-SARS-CoV-2 protiteles, ki

bi izkazovali dovolj visoko specifičnost za zanesljivo oceno seroprevalence v populaciji s pričakovano nizko seroprevalenco SARS-CoV-2. Dodatno, konec aprila in v začetku maja 2020 ni bilo mogoče v zadovoljivem času in količini dobiti reagentov in potrošnega materiala zanesljivih proizvajalcev laboratorijskih testov niti iz držav Evropske unije, kaj šele iz ZDA. Zato smo bili pri izbiri testa za določanje protiteles proti SARS-CoV-2 v vzorcih krvi odvzetih v prvi fazi raziskave izjemno omejeni.

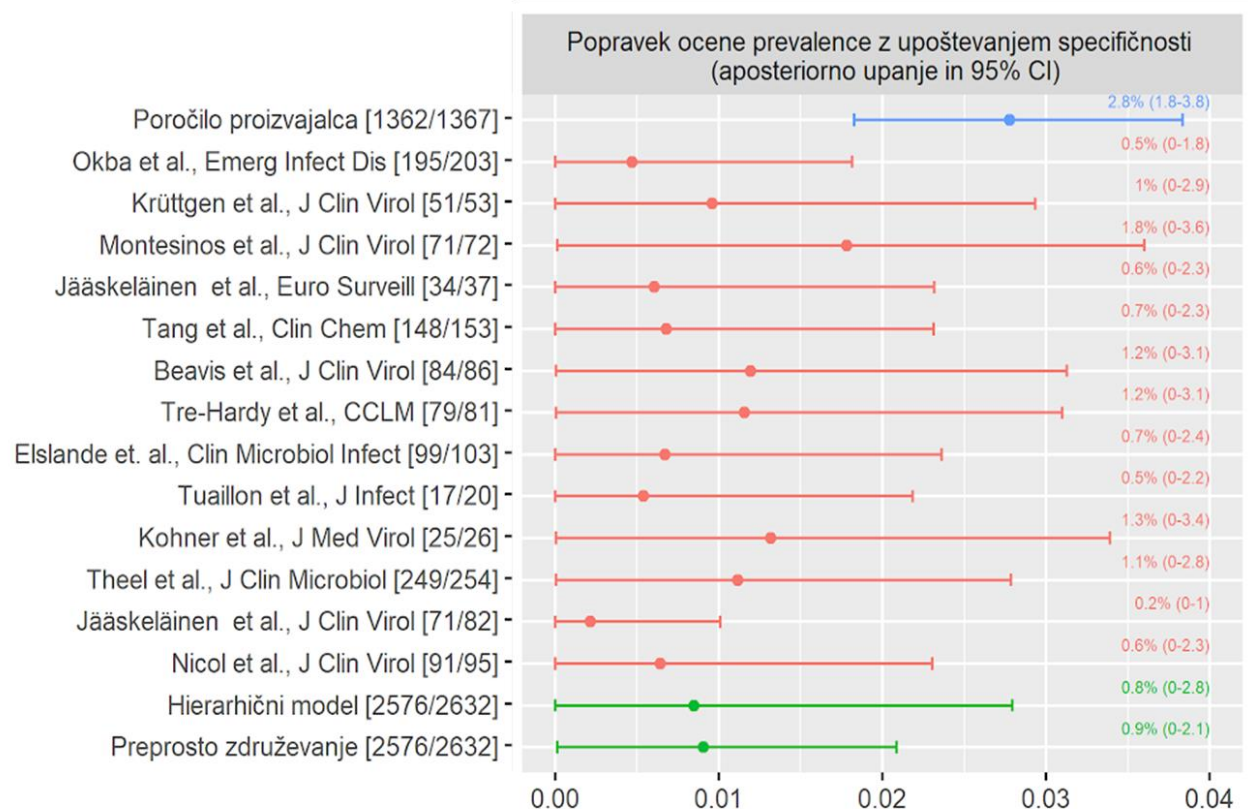
Aposteriorno upanje seroprevalence, popravljeno za specifičnost testa, kot jo navaja proizvajalec testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG in glede na rezultate interne evalvacije testa (razpredelnica 2), je 2,75 % (95 % CI = [1,79–3,80 %], 95 % HDR = [1,77–3,77 %]). Aposteriorno upanje seroprevalence po MRP (popravek za neodziv) je 3,04 % (95 % CI = [2,16–4,09 %], 95 % HDR = [2,09–4,02 %]). Ker se ocena seroprevalence slovenske populacije konec aprila 2020 po popravku specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG ni drastično spremenila, smo se ob prvi javni predstavitvi rezultatov 06. 05. 2020 odločili za poročanje osnovne seroprevalence ter za izračun popravljene seroprevalence počakati na dodatne podatke o specifičnosti uporabljenega testa iz raziskav objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi.

3.5.2 Popravljen ocen seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 glede na oceno specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG z dne 15. 06. 2020

Kot podrobno opisano v poglavju 2.6.2, smo po opravljenem pregledu evalvacij testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi do 15. 06. 2020 opravili meta-analizo ter ugotovili, da upoštevajoč vse omejitve posameznih objavljenih raziskav, groba specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG za dokazovanje prisotnosti anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG znaša 97,9 % (95 % CI = [97,3–98,4 %]) po preprostem združevanju raziskav in 96,3 % (95 % CI = [94,3–97,6 %]) po hierarhičnem upoštevanju vseh raziskav.

Na sliki 9 so prikazane pripadajoče popravljene ocene seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020, ki upoštevajo ocene specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG posameznih raziskav iz razpredelnice 3. Z modro barvo je prikazan popravek ocene seroprevalence z upoštevanjem popravljene specifičnosti testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG glede na navodila proizvajalca. Z rdečo barvo so označeni

rezultati posameznih raziskav, z zeleno pa popravek ocene seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 s preprostim združevanjem raziskav in s hierarhičnim upoštevanjem vseh raziskav. Aposteriorno upanje seroprevalence, ko popravimo za specifičnost testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG po preprostem združevanju vseh raziskav je 0,9 % (95 % CI = [0–2,1 %]) in 0,8 % (95 % CI = [0–2,80 %]) po hierarhičnem upoštevanju vseh raziskav.



Slika 9. Ocena seroprevalence v slovenski populaciji konec aprila 2020 glede na korekcijo specifičnosti uporabljenega testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG glede na podatke proizvajalca in objave v recenzirani znanstveni literaturi do 15. 06. 2020.

3.5.3 Dokončna ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji konec aprila 2020 po dodatnem testiranju vzorcev krvi odvzetih v prvi fazi raziskave s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S z dne 25. 11. 2020

Kot podrobno opisano v poglavju 2.10.3, smo za dokončno oceno seroprevalence v slovenski populaciji oz. deleža udeležencev nacionalne raziskave, ki so imeli v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2 konec aprila 2020, vzorce krvi

odvzete v prvi fazi raziskave dodatno testirali novembra 2020 s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S. Podatke smo analizirali v dveh časovnih točkah – dan po zaključku testiranja in 14 dni pred začetkom testiranja. Na ta način smo lahko zanesljivo ocenili spodnjo in zgornjo mejo ocene seroprevalence v slovenski populaciji v času izvajanja prve faze nacionalne raziskave, pri čemer vsi intervali predstavljajo 95% območje največje gostote aposteriorne porazdelitve.

Na dan 02. 05. 2020 je bila nepopravljena spodnja meja ocene seroprevalence 0,87 % (95 % CI = [0,41 – 1,38 %]), po poststratifikaciji se spodnja meja ocene seroprevalence praktično ni spremenila in je bila na dan 02. 05. 2020 ocenjena na 0,88 % (95 % CI = [0,41 – 1,38 %]). Na dan 06. 04. 2020 je bila nepopravljena zgornja meja ocene seroprevalence 0,91 % (95 % CI = [0,40 – 1,42 %]), po poststratifikaciji se tudi zgornja meja ocene seroprevalence praktično ni spremenila in je bila na dan 06. 04. 2020 ocenjena na 0,89 % (95 % CI = [0,42 – 1,41 %]).

Za pravilno tolmačenje ocenjenih seroprevalenc konec aprila 2020 bralca prosimo, naj upošteva, da zaradi naravnega poteka okužbe s SARS-CoV-2, seroprevalence ugotovljene na določen dan, zlasti v pogojih, ko se število novookuženih dnevno izjemno hitro povečuje, ni mogoče enačiti z deležem oseb v populaciji, ki je do tistega dne že prišel v stik z virusom. Lahko pa, pod predpostavko, da se razmerje med kumulativno okuženostjo in seroprevalenco v določenem obdobju ne spreminja preveč, predvidevamo, da spodnja meja ocene seroprevalence za določen dan predstavlja minimalen delež oseb v slovenski populaciji, ki je prišel v stik s SARS-CoV-2 vsaj 14 dni (do enega meseca) pred dnevom ocene seroprevalence.

3.6 Rezultati šestmesečne longitudinalne aktivne in pasivne kohortne raziskave

Natančno šestmesečno longitudinalno aktivno (telefonski pogovori na tri tedne) in pasivno spremljanje udeležencev raziskave in njihovih družinskih članov (udeleženci so lahko kadarkoli telefonsko ali po elektronski pošti kontaktirali koordinatorje raziskave), ki smo ga izvajali od maja do oktobra 2020, je predstavljalo pomembno dodatno orodje, za katerega upamo, da je odločevalcem skupaj z drugimi uradnimi podatki, ki so prihajali iz rutinskega diagnostičnega dela testiranja ter testiranja samoplačnikov, omogočalo pravočasno preventivno ukrepanje ob spremembah epidemiološkega stanja v državi. Takoj po zaključku vsakega od osmih spodaj opisanih

obdobji sledenja so bili odločevalci o rezultatih posameznega sledenja obveščeni po elektronski pošti.

3.6.1 Rezultati prvega obdobja sledenja (18. 05. 2020 – 24. 05. 2020)

Med 18. 05. 2020 in 24. 05. 2020, smo poklicali vseh 1.368 oseb, vključenih v nacionalno raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 14.

Razpredelnica 14. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v prvem obdobju sledenja (18. 05. 2020 – 24. 05. 2020).

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
18. 05. 2020	148	23,25
19. 05. 2020	212	13
20. 05. 2020	194	12
21. 05. 2020	258	17,5
22. 05. 2020	219	15
23. 05. 2020	237	18,25
24. 05. 2020	100	6
Skupaj	1.368	105

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in članov njihovih gospodinjstev smo opravili s 1.331 (97,3 %) preiskovanci, ostalih nismo uspeli priklicati. Dve osebi sta se odločili, da ne bosta več sodelovali v raziskavi.

29 preiskovancev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih (po odvzemu vzorcev za nacionalno raziskavo):

- o pri 22 od 29 smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker simptomi ne kažejo na COVID-19;
- o pri 7 od 29 oseb smo opravili molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA, vseh 7 testov je bilo negativnih.

Dodatno je 5 preiskovancev poročalo, da so se v preteklih treh tednih zaradi različnih nemedicinskih razlogov odločili za molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 5 testov je bilo negativnih.

3.6.2 Rezultati drugega obdobja sledenja (08. 06. 2020 – 15. 06. 2020)

Med 08. 06. 2020 in 15. 06. 2020 smo poklicali vseh 1.366 oseb, vključenih v nacionalno raziskavo (2 osebi sta se v prvem obdobju sledenja odločili, da ne bosta več sodelovali). Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 15.

Razpredelnica 15. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v drugem obdobju sledenja (08. 06. 2020 – 15. 06. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
08. 06. 2020	78	6
09. 06. 2020	151	7,5
10. 06. 2020	166	10
11. 06. 2020	243	12,5
12. 06. 2020	214	11,5
13. 06. 2020	258	15
14. 06. 2020	238	13,5
15. 06. 2020	18	2,5
Skupaj	1.366	78,5

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in članov njihovih gospodinjstev smo opravili s 1.341 (98,2 %) preiskovanci, ostalih nismo uspeli priklicati.

39 preiskovancev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih (po odvzemu vzorcev za nacionalno raziskavo):

- pri 28 od 39 smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker simptomi ne kažejo na COVID-19 oz. so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna;
- pri 11 od 39 oseb smo opravili molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA, vseh 11 testov je bilo negativnih.

Dodatno sta 2 preiskovanca poročala, da sta se v preteklih treh tednih zaradi različnih nemedicinskih razlogov odločila za molekularno testiranje brisa nosnega dela žrela na prisotnost SARS-CoV-2 RNA, oba testa sta bila negativna.

3.6.3 Rezultati tretjega obdobja sledenja (29. 06. 2020 – 05. 07. 2020)

Med 29. 06. 2020 in 05. 07. 2020 smo poklicali vseh 1.366 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 16.

***Razpredelnica 16.** Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v tretjem obdobju sledenja (29. 06. 2020 – 05. 07. 2020)*

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
29. 06. 2020	85	6,5
30. 06. 2020	282	14,5
01. 07. 2020	200	12,5
02. 07. 2020	127	7
03. 07. 2020	138	8
04. 07. 2020	362	18,5
05. 07. 2020	172	10
Skupaj	1.366	77

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.337 (97,9 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati.

82 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- o pri 21 od 82 je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 21 testov je bilo negativnih;
- o pri 61 od 82 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno je 5 udeležencev poročalo, da so bili v preteklih treh tednih zaradi drugih razlogov testirani na SARS-CoV-2 RNA (4 zaradi hospitalizacije, 1 je bil testiran na Hrvaškem ob vrnitvi iz Bosne in Hercegovine), vsi so bili negativni.

Zaznali smo povečano število blagih respiratornih obolenj pri samih preiskovancih in pri njihovih družinskih članih (še posebej v družinah z majhnimi otroki), ki so minila v roku 2-3 dni, večinoma brez vročine.

18 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani, vsi so bili negativni.

3.6.4 Rezultati četrtega obdobja sledenja (20. 07. 2020 – 27. 07. 2020)

Med 20. 07. 2020 in 27. 07. 2020 smo poklicali vseh 1.366 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 17.

Razpredelnica 17. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v četrtem obdobju sledenja (20. 07. 2020 – 27. 07. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
20. 07. 2020	38	2
21. 07. 2020	195	11,5
22. 07. 2020	196	8,5
23. 07. 2020	321	17
24. 07. 2020	129	5
25. 07. 2020	117	8,5
26. 07. 2020	282	18
27. 07. 2020	88	1,5
Skupaj	1.366	72

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.332 (97,5 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati.

33 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- o pri 9 od 33 oseb je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 9 testov je bilo negativnih;
- o pri 24 od 33 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno je 8 udeležencev poročalo, da so bili v preteklih treh tednih zaradi drugih razlogov testirani na SARS-CoV-2 RNA (zaradi hospitalizacije, tesnega stika, službenih razlogov, potovanja), vsi so bili negativni. Trije preiskovanci so bili v karanteni, dva zaradi tesnega stika, eden po prihodu iz tujine. V času četrtega obdobja sledenja niso bili testirani na SARS-CoV-2 RNA.

15 preiskovancev je poročalo, da so bili v preteklih treh tednih na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva, vsi so bili negativni.

3.6.5 Rezultati petega obdobja sledenja (10. 08. 2020 – 17. 08. 2020)

Med 10. 08. 2020 in 17. 08. 2020 smo poklicali vseh 1.366 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 18.

Razpredelnica 18. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v petem obdobju sledenja (10. 08. 2020 – 17. 08. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
10. 08. 2020	186	14,5
11. 08. 2020	256	15
12. 08. 2020	102	6,5
13. 08. 2020	214	12,5
14. 08. 2020	193	11,5
15. 08. 2020	176	10
16. 08. 2020	162	9,5
17. 08. 2020	77	3,5
Skupaj	1.366	83

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.345 (98,5 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati.

30 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- o pri 10 od 30 oseb je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 10 testov je bilo negativnih;
- o pri 20 od 30 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno so 4 udeleženci poročali, da so bili v preteklih treh tednih zaradi drugih razlogov testirani na SARS-CoV-2 RNA (zaradi hospitalizacije, tesnega stika, službenih razlogov, potovanja), vsi so bili negativni.

11 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva. Pri enem so dokazali aktivno okužbo s SARS-CoV-2 (preiskovanec brez simptomov), preostali so bili negativni.

3.6.6 Rezultati šestega obdobja sledenja (01. 09. 2020 – 07. 09. 2020)

Med 01. 09. 2020 in 07. 09. 2020 smo poklicali vseh 1.366 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 19.

Razpredelnica 19. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v šestem obdobju sledenja (01. 09. 2020 – 07. 09. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
01. 09. 2020	47	2
02. 09. 2020	87	4,5
03. 09. 2020	190	9
04. 09. 2020	322	15,5
05. 09. 2020	392	21
06. 09. 2020	246	13
07. 09. 2020	82	3
Skupaj	1.366	68

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.299 (95,3 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati. Dve osebi sta umrli (nobena od smrti ni bila povezana s COVID-19), ena oseba se je preselila v Bolgarijo.

61 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- o pri 22 od 61 oseb je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, pri dveh je bila dokazana aktivna okužba s SARS-CoV-2, preostali so bili negativni;
- o pri 39 od 61 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno sta dva udeleženca poročala, da sta bila v preteklih treh tednih zaradi drugih razlogov testirana na SARS-CoV-2 RNA (potovanje v tujino), oba sta bila negativna.

15 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva, vsi so bili negativni.

3.6.7 Rezultati sedmega obdobja sledenja (21. 09. 2020 – 29. 09. 2020)

Med 21. 09. 2020 in 28. 09. 2020 smo poklicali vseh 1.363 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 20.

Razpredelnica 20. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v sedmem obdobju sledenja (21. 09. 2020 – 28. 09. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
21. 09. 2020	41	3
22. 09. 2020	12	1
23. 09. 2020	254	10,5
24. 09. 2020	213	9
25. 09. 2020	229	10
26. 09. 2020	332	18
27. 09. 2020	220	8,5
28. 09. 2020	62	2
Skupaj	1.363	62

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.238 (90,8 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati.

78 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- o pri 23 od 78 oseb je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 23 testov je bilo negativnih;
- o pri 55 od 78 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno je 7 udeležencev poročalo, da so bili v preteklih treh tednih zaradi drugih razlogov testirani na SARS-CoV-2 RNA (zaradi hospitalizacije, tesnega stika, službenih razlogov, potovanja), vsi so bili negativni. Zaradi tesnega stika s pozitivno osebo je bila v tem obdobju odrejena karantena 5 udeležencem, vključenim v raziskavo.

29 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva, en družinski član (otrok udeleženke, vključene v raziskavo), je bil pozitiven. Udeleženka je bila zato trenutno v karanteni.

3.6.8 Rezultati osmega obdobja sledenja (10. 10. 2020 – 14. 10. 2020)

Med 10. 10. 2020 in 14. 10. 2020 smo poklicali vseh 1.363 oseb, vključenih v raziskavo. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh je prikazano v razpredelnici 21.

Razpredelnica 21. Število klicanih preiskovancev in število porabljenih ur po posameznih dneh v osmem obdobju sledenja (10. 10. 2020 – 14. 10. 2020)

Datum	Število klicanih preiskovancev	Število porabljenih ur
10. 10. 2020	168	21
11. 10. 2020	229	24,5
12. 10. 2020	228	19
13. 10. 2020	340	23,5
14. 10. 2020	398	22
Skupaj	1.363	110

Telefonski pogovor o zdravstvenem stanju udeležencev in njihovih družin smo opravili s 1.282 (94,1 %) udeleženci, ostalih nismo uspeli priklicati.

87 udeležencev je poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini v zadnjih treh tednih:

- pri 26 od 87 oseb je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, pri 6 je bila dokazana aktivna okužba s SARS-CoV-2, preostali so bili negativni;
- pri 61 od 87 oseb smo se obojestransko dogovorili, da testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in je od njih minilo že več kot 2 tedna oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

18 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva, v treh primerih je bil rezultat testa pozitiven, v dveh primerih je šlo za bližnji stik udeležencev raziskave, ki so bili tudi sami pozitivni, v enem primeru je šlo za mamo udeleženke, ki je bila pozitivna, medtem ko sama udeleženka raziskave ni bila testirana.

V zadnjem obdobju sledenja je bila karantena zaradi tesnega stika s pozitivno osebo odrejena 8 udeležencem, vključenim v raziskavo, dodatno je 8 udeležencev poročalo, da je bila karantena odrejena njihovim družinskim članom.

Ob zadnjem sledenju smo se s preiskovanci dogovorili tudi za termin odvzema vzorca krvi za testiranje na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 v zaključni fazi Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji.

3.6.9 Povzetek rezultatov šestmesečne longitudinalne aktivne in pasivne kohortne raziskave (zbirni rezultati osmih obdobjih sledenja)

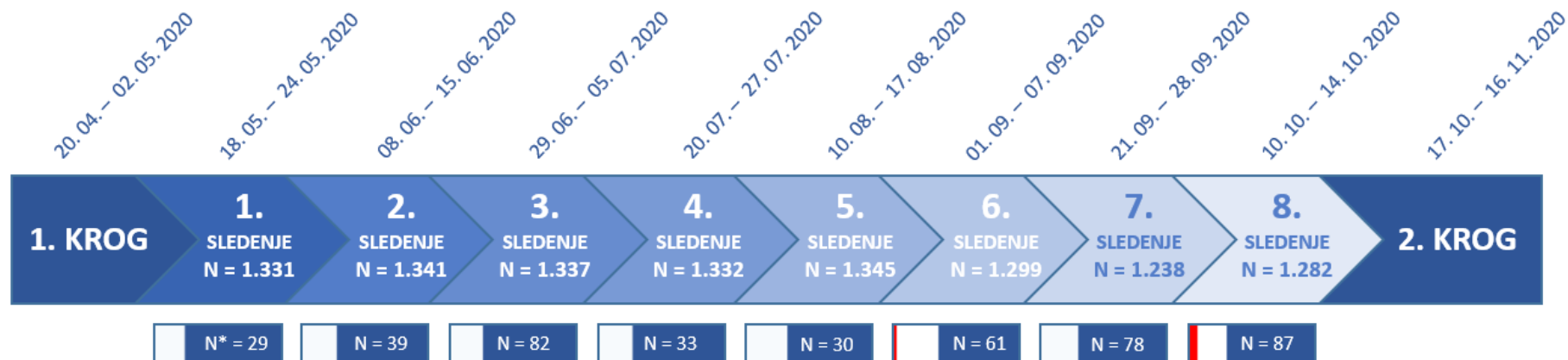
Udeležence nacionalne raziskave smo v celotnem obdobju sledenja, med 18. 05. 2020 in 14. 10. 2020, v osmih posameznih sledenjih, skupno poklicali 10.924-krat. Število uspešno opravljenih telefonskih pogovorov klicanih preiskovancev in število porabljenih ur tekom posameznih sledenj je prikazano v razpredelnici 22.

Razpredelnica 22. Število opravljenih telefonskih pogovorov o zdravstvenem stanju preiskovancev in članov njihovih gospodinjstev in število porabljenih ur po posameznih sledenjih v celotnem obdobju sledenja (18. 05. 2020 – 14. 10. 2020)

Sledenje	Obdobje	Število pogovorov s preiskovanci	Število porabljenih ur
1. sledenje	18. 05. – 24. 05. 2020	1.331	105
2. sledenje	08. 05. – 15. 06. 2020	1.341	78,5
3. sledenje	29. 06. – 05. 07. 2020	1.337	77
4. sledenje	20. 07. – 27. 07. 2020	1.332	72
5. sledenje	10. 08. – 17. 08. 2020	1.345	83
6. sledenje	01. 09. – 07. 09. 2020	1.299	68
7. sledenje	21. 09. – 28. 09. 2020	1.238	62
8. sledenje	10. 10. – 14. 10. 2020	1.282	110
Skupaj		10.505	655,5

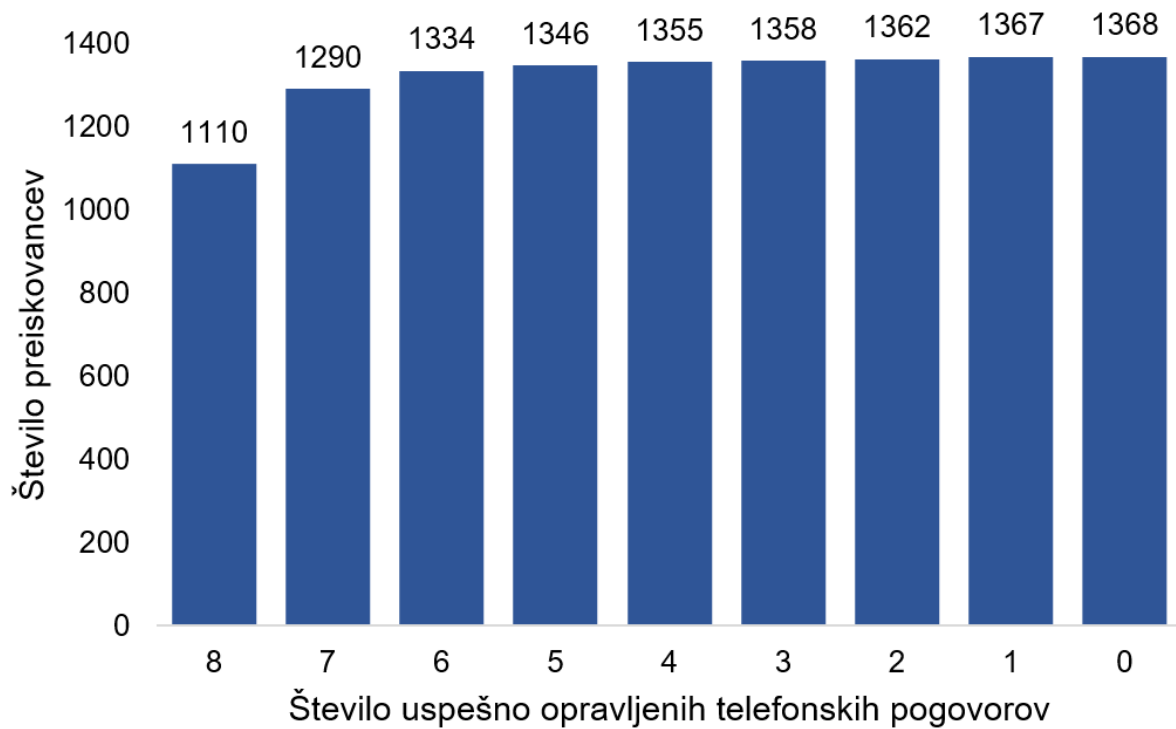
V šestih mesecih sledenja smo tako opravili skupno 10.505 telefonskih pogovorov o zdravstvenem stanju udeležencev in članov njihovih gospodinjstev, kar je predstavljalo 96,2 % vseh opravljenih klicev, ostalih preiskovancev nismo uspeli priklicati. Do zadnjega (osmega) sledenja se je samo pet oseb odločilo, da ne bo več sodelovalo v nacionalni raziskavi.

Sliki 10 in 11 prikazujeta število udeležencev raziskave, ki so sodelovali v drugi fazi nacionalne raziskave. Kar 1.290 izmed 1.368 preiskovancev (94,3 %) je sodelovalo v vsaj sedmih sledenjih (Slika 11).



*N = število udeležencev, ki so poročali o respiratornih simptomih in/ali vročini v določenem sledenju. Z belim polnilom je označen delež oseb, pri katerih je bilo opravljeno PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, z rdečo pa delež dokazanih aktivnih okužb s SARS-CoV-2.

Slika 10. Shematski prikaz poteka Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19



Slika 11. Kumulativni histogram števila uspešno opravljenih telefonskih pogovorov tekom osmih obdobj sledenja.

Tekom osmih sledenj je skupno 439 preiskovancev poročalo o respiratornih simptomih in/ali vročini:

- pri 130 od 439 oseb (29,6 %) je bilo opravljeno RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, pri 8 je bila dokazana aktivna okužba s SARS-CoV-2 (večina v osmem obdobju sledenja), preostali so bili SARS-CoV-2 RNA negativni;
- samo pri treh izmed 122 (2,5 %) preiskovancev, ki so poročali o simptomih respiratorne okužbe in niso imeli dokazane SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela s testom RT-PCR, smo ob zaključku druge faze raziskave v vzorcih odvzete krvi dokazali prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2, kar potrjuje visoko negativno napovedno vrednost testa RT-PCR;
- pri 309 od 439 oseb smo se obojestransko dogovorili, da RT-PCR testiranje na SARS-CoV-2 RNA ni potrebno, ker so bili simptomi zelo blagi in/ali je od njih minilo že več kot 14 dni, oz. ker simptomi niso kazali na COVID-19.

Dodatno je skupno 45 preiskovancev poročalo, da so se v preteklih treh tednih zaradi različnih nemedicinskih razlogov sami (zunaj raziskave) odločili za RT-PCR testiranje brisa nosnega dela žrela na SARS-CoV-2 RNA, vseh 45 opravljenih testov je bilo negativnih.

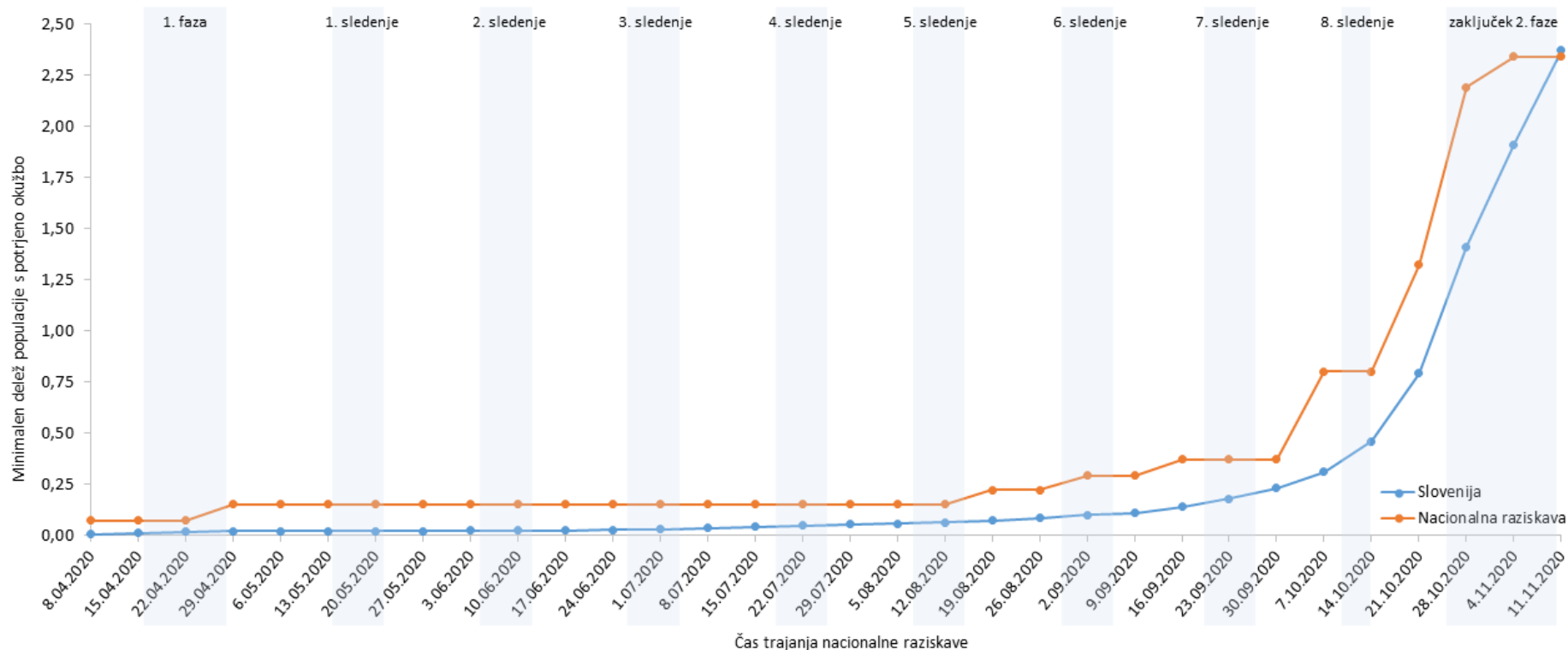
Skupno 106 preiskovancev je poročalo, da so bili na SARS-CoV-2 RNA s testom RT-PCR testirani njihovi družinski člani iz skupnega gospodinjstva, 5 družinskih članov je bilo SARS-CoV-2 RNA pozitivnih.

Kot je razvidno iz razpredelnice 23 in slike 12, smo tekom celotnega obdobja nacionalne raziskave (20. 04. 2020 – 10. 11. 2020) v kohorti dokazali prisotnost SARS-CoV-2 RNA v brisu nosnega dela žrela pri 32 (2,3 %) udeležencih nacionalne raziskave (kumulativna okuženost).

Razpredelnica 23. Primerjava dinamike kumulativnega števila z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v Sloveniji kot so jih dnevno poročali slovenski laboratoriji in ki izhaja iz rutinskega in samoplačniškega programa testiranja (vir: <https://www.nijz.si/sl/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19>) ter kumulativnega števila z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v nacionalni raziskavi v času trajanja raziskave (20. 04. 2020 – 10. 11. 2020). Minimalen delež populacije s potrjeno okužbo v Sloveniji je bil ocenjen glede na uradno število prebivalcev na dan 01. 01. 2020 v Sloveniji ($N = 2.095.861$) (vir: SURS).

	SLOVENIJA		NACIONALNA RAZISKAVA	
	Kumulativno število z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb	Minimalen delež populacije z RT-PCR potrjeno okužbo (%)	Kumulativno število z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb	Minimalen delež populacije z RT-PCR potrjeno okužbo (%)
08. 04. 2020	1.125	0,054	1	0,073
15. 04. 2020	1.269	0,061	1	0,073
22. 04. 2020	1.367	0,065	1	0,073
29. 04. 2020	1.429	0,068	2	0,146
06. 05. 2020	1.449	0,069	2	0,146
13. 05. 2020	1.464	0,070	2	0,146
20. 05. 2020	1.468	0,070	2	0,146

27. 05. 2020	1.473	0,070	2	0,146
03. 06. 2020	1.477	0,070	2	0,146
10. 06. 2020	1.488	0,071	2	0,146
17. 06. 2020	1.511	0,072	2	0,146
24. 06. 2020	1.546	0,074	2	0,146
01. 07. 2020	1.633	0,078	2	0,146
08. 07. 2020	1.776	0,085	2	0,146
15. 07. 2020	1.897	0,091	2	0,146
22. 07. 2020	2.033	0,097	2	0,146
29. 07. 2020	2.139	0,102	2	0,146
05. 08. 2020	2.223	0,106	2	0,146
12. 08. 2020	2.332	0,111	2	0,146
19. 08. 2020	2.536	0,121	3	0,219
26. 08. 2020	2.755	0,131	3	0,219
02. 09. 2020	3.032	0,145	4	0,292
09. 09. 2020	3.390	0,162	4	0,292
16. 09. 2020	4.059	0,194	5	0,365
23. 09. 2020	4.815	0,230	5	0,365
30. 09. 2020	5.865	0,280	5	0,365
07. 10. 2020	7.510	0,358	11	0,804
14. 10. 2020	10.687	0,510	11	0,804
21. 10. 2020	17.662	0,843	18	1,32
28. 10. 2020	30.716	1,47	30	2,19
04. 11. 2020	41.117	1,96	32	2,34



Slika 12. Primerjava dinamike kumulativnega števila s RT-PCR potrjenih aktivnih okužb z SARS-CoV-2 v Sloveniji kot so jih dnevno poročali slovenski laboratoriji in ki izhaja iz rutinskega in samoplačniškega programa testiranja (vir: <https://www.nijz.si/sl/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19>) (označeno z modro barvo) ter kumulativnega števila z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb z SARS-CoV-2 v nacionalni raziskavi v času trajanja raziskave (20. 04. 2020 – 10. 11. 2020) (označeno z oranžno barvo). Minimalen delež populacije s potrjeno okužbo v Sloveniji je bil ocenjen glede na uradno število prebivalcev na dan 01. 01. 2020 v Sloveniji ($N = 2.095.861$) (vir: SURS). Z modrimi stolpci so označeni prva faza in obdobja sledenja v drugi fazi nacionalne raziskave.

Čeprav je kumulativna okuženost s SARS-CoV-2 ugotovljena med udeleženci nacionalne raziskave v absolutnih številkah relativno majhna ($n = 32$) in jo je s kumulativno okuženostjo s SARS-CoV-2 v Sloveniji potrebno primerjati zelo previdno, je iz razpredelnice 23 in slike 12 razvidno, da je dinamika kumulativne okuženosti oz. minimalnega deleža z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 ugotovljenega v populaciji udeležencev nacionalne raziskave v celotnem obdobju poteka nacionalne raziskave dokaj dobro predvidevala dinamiko in napovedovala kumulativno okuženost slovenske populacije oz. minimalni delež z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v celotni populaciji Slovenije, ki je bil ugotovljen na osnovi števila z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb s SARS-CoV-2, kot so jih dnevno poročali slovenski laboratoriji in ki izhaja iz rutinskega in samoplačniškega programa testiranja. Rezultati prvih petih obdobj sledenja so vsakokrat ponovno potrjevali zelo nizko raven aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji tekom poletnih mesecev 2020, ki so jo izkazovali tudi rezultati rednega programa testiranja v Sloveniji (slika 12). Rezultati šestega obdobja sledenja udeležencev nacionalne raziskave (01. – 07. 09. 2020) so prvič jasno napovedali ponoven porast aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji. Osmo obdobje sledenja (10. – 14. 10. 2020; več kot dvakratni porast kumulativne okuženosti) je odločevalcem jasno nakazalo, da je število aktivnih okužb s SARS-CoV-2 v slovenski populaciji zraslo na raven, ki zahteva čimprejšnjo ponovno zaostritev ukrepov za nadaljnje preprečevanje širjenja okužbe s SARS-CoV-2.

Upoštevajoč vse zgoraj navedene omejitve in pričakovano višjo kumulativno okuženost v populaciji udeležencev nacionalne raziskave v primerjavi s kumulativno okuženostjo v slovenski populaciji, predvsem zaradi teoretično hitrejšega in lažjega dostopa do testa RT-PCR za udeležence nacionalne raziskave, je potrebno poudariti, da 32 RT-PCR-pozitivnih udeležencev raziskave predstavlja le minimalno kumulativno število z RT-PCR potrjenih aktivnih okužb, ki bi bilo zagotovo višje, če bi z RT-PCR testirali večje število udeležencev in pogosteje (tudi takšne brez simptomov). Tega v nacionalni raziskavi nismo smeli narediti, ker protokol raziskave, ki ga je odobrila etična komisija, ni dovoljeval aktivnega napeljevanja k testiranju z RT-PCR in je bilo testiranje z RT-PCR dovoljeno samo v primeru udeleženčeve pobude.

Številni udeleženci raziskave so nas žal velikokrat kontaktirali prepozno (ali nam o simptomih poročali le pri aktivnem tritedenskem spremljanju), da bi bilo RT-PCR testiranje glede na pretekle simptome še medicinsko opravičljivo. Številni med njimi so

imeli simptome in znake v času bivanja v tujini (največkrat dopust), ko testiranja ni bilo možno organizirati.

Na splošno je bila organizacija testiranja z RT-PCR za udeležence, ki so tekom osmih obdobjih sledenja poročali o simptomih in znakih znotraj 14-dnevnega diagnostičnega okna, velikokrat zelo zahtevna, predvsem zaradi oddaljenosti mesta bivanja od ustreznega laboratorija. Potrebno je tudi poudariti, da je teoretično hitrejši in lažji dostop do testa RT-PCR za udeležence nacionalne raziskave (v primerjavi s slovensko populacijo), dejansko obstajal le na začetku druge faze raziskave. Kasneje (od junija 2020 dalje) namreč zaradi povečevanja kapacitet za testiranje na SARS CoV-2 v vseh laboratorijih v Sloveniji razlike med dostopnostjo do testa RT-PCR med udeleženci nacionalne raziskave v primerjavi s slovensko populacijo praktično ni bilo več, ali vsaj ni bila pomembnejša.

3.7 Zbiranje kliničnih vzorcev ter poročilo terenskega dela ob zaključku druge faze raziskave

Od 1.368 oseb, ki so bile vključene v prvo fazo raziskave sta v času druge faze raziskave dve osebi umrli (nobena od smrti ni bila povezana s COVID-19) (0,1 %), šest oseb se je odselilo v tujino (0,4 %), 115 oseb je prekinilo sodelovanje (8,4 %), 1.245 (91 %) oseb pa je potrdilo pripravljenost za odvzem krvi ob zaključku druge faze raziskave.

Odvzem vzorcev krvi ob zaključku druge faze raziskave je v prvem tednu (17. 10. 2020 – 25. 10. 2020) potekal na različnih stacionarnih odvzemnih mestih po Sloveniji, kamor smo tekom pogovorov v sklopu osmega obdobja sledenja povabili vse zdrave preiskovance, rojene leta 2006 ali kasneje. Naslednja dva tedna (26. 10. 2020 – 10. 11. 2020) so odvzemi krvi potekali na domovih pediatričnih udeležencev in udeležencev, ki so odklonili prihod na stacionarno odvzemno mesto ali zaradi drugih razlogov (vključno z zdravstvenimi) niso mogli na stacionarno odvzemno mesto. Odvzemi krvi na domu udeležencev raziskave so potekali kot v prvi fazi raziskave (glej poglavje 2.5.).

Skupno so odvzemi krvi na stacionarnih odvzemnih mestih potekali na 47 različnih lokacijah v 63 različnih terminih, večinoma v sodelovanju z različnimi prostovoljnimi gasilskimi društvi (PGD). Lokacije stacionarnih odvzemnih mest so bile sledeče:

- osrednjeslovenska regija: Savska cesta 3 v Ljubljani, PGD Vrhnika, PGD Domžale, PGD Grosuplje, PGD Škofljica, PGD Kamnik in PGD Preska-Medvode;
- gorenjska regija: PGD Kranj Britof, PGD Radovljica, Gasilska zveza Škofja Loka in PGD Blejska Dobrava;
- goriška regija: PGD Nova Gorica in Krajevna skupnost (KS) Ajdovščina;
- obalno-kraška regija: PGD Hrvatini in PGD Lokev;
- primorsko-notranjska regija: PGD Stari trg pri Ložu, PGD Pivka in Dom na Vidmu v Ilirski Bistrici;
- jugovzhodna Slovenija: PGD Novo mesto – Šmihel, PGD Mirna, PGD Kočevje in PGD Črnomelj;
- zasavska regija: PGD Trbovlje, KS Izlake, PGD Litija in PGD Laško;
- spodnjeposavska regija: PGD Brežice, PGD Sevnica in PGD Krško;
- savinjska regija: PGD Celje Gabrje, PGD Slovenske Konjice, PGD Slivnica pri Celju, PGD Polzela, PGD Steklarna Rogaška Slatina in PGD Velenje;
- koroška regija: PGD Slovenj Gradec in PGD Ravne na Koroškem;
- podravska regija: PGD Malečnik Maribor, PGD Hajdina, PGD Šentilj v Slovenskih Goricah, PGD Zgornja Bistrica, PGD Lenart v Slovenskih Goricah, PGD Ruše in PGD Ormož;
- pomurska regija: PGD Murska Sobota, PGD Lendava in PGD Gornja Radgona.

Ustrezno usposobljeni zdravstveni delavci, uslužbenci NMP Pacient d.o.o., terenski sodelavci IMI MF UL in medicinske sestre iz pediatričnih oddelkov UKC Ljubljana so v obdobju med 17. 10. 2020 in 16. 11. 2020 tako opravili 77 enot terenskih prevozov, prevozili skupno 17.129 km in samo za odvzeme vzorcev krvi porabili več kot 1.800 delovnih ur (razpredelnici 24 in 25). Poročilo NMP Pacient d.o.o. o opravljenem terenskem delu v obdobju med 17. 10. 2020 in 1. 11. 2020 je predstavljeno v razpredelnici 24. Poročilo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo UL MF o opravljenem terenskem delu v obdobju med 02. 11. 2020 in 16. 11. 2020 je predstavljeno v razpredelnici 25.

Razpredelnica 24. Poročilo NMP Pacient d.o.o. o opravljenem terenskem delu v obdobju med 17. 10. 2020 in 01. 11. 2020.

	Število prevoženih km	Število opravljenih ur	Število terenskih sodelavcev	Število vključenih preiskovancev
17. 10. 2020	1.197	97,25	15	165
18. 10. 2020	716	61,75	11	118
19. 10. 2020	1.607	56,33	19	113
20. 10. 2020	1.535	59,57	21	105
21. 10. 2020	1.046	46,58	15	120
22. 10. 2020	1.512	52,25	19	119
23. 10. 2020	1.322	47,42	17	77
24. 10. 2020	1.437	57,13	12	92
25. 10. 2020	1.612	76,33	15	97
26. 10. 2020	0	0	1	1
27. 10. 2020	342	8,42	2	11
28. 10. 2020	97	6	2	16
29. 10. 2020	1.346	30,08	6	43
30. 10. 2020	421	7,50	2	19
31. 10. 2020	830	22,50	6	42
01. 11. 2020	1.317	32,92	8	47
Skupaj	16.337	662	171	1.185

Razpredelnica 25. Poročilo Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo UL MF o opravljenem terenskem delu v obdobju med 02. 11. 2020 in 16. 11. 2020.

	Število prevoženih km	Število opravljenih ur	Število terenskih sodelavcev	Število vključenih preiskovancev
02. 11. 2020	213	11	3	16
03. 11. 2020	0	0	1	1
08. 11. 2020	579	14	2	8
10. 11. 2020	0	0	1	1
16. 11. 2020	0	0	1	1
Skupaj	792	25	8	27

3.8 Reprezentativnost vzorca za oceno seroprevalence SARS CoV-2 v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020)

Spodnje razpredelnice primerjajo odgovarjajočo strukturo respondentov ob zaključku druge faze raziskave (vzorec 2; $n_2 = 1.245$) s strukturo respondentov v osnovnem vzorcu (vzorec 1; $n_1 = 1.368$) in s populacijsko strukturo (populacija; $N = 2$ milijona). Že pri primerjavi vzorca prve faze (n_1) s populacijo (N) se je izkazalo, da so odstopanja zelo majhna (poglavje 3.1). Odstopanja med vzorcema prve faze in ob zaključku druge faze raziskave (n_1 in n_2) so tokrat še bolj minimalne. To je tudi razumljivo, saj gre le za 123 enot razlike, oziroma za 9 % zmanjšanje izhodiščnega vzorca z začetka raziskave, kar je za tak tip raziskave zelo malo. Vse spremembe zaradi izpada dodatnih 123 udeležencev raziskave, so v pogledu primerjalne strukture statistično neznačilne.

Če namreč primerjamo vzorec 1 in vzorec 2 (n_1 in n_2), so vse vrednosti p (natančne stopnje značilnosti) visoko neznačilne, z vrednostmi nad $p=0,90$ (χ^2_a testi v preglednicah X-Y, n_1 vs n_2). Poudariti pa velja, da so vse spremembe konsistentne z učinki iz primerjav vzorca prve faze s populacijo. Posledično so se tudi v primerjavi vzorca 2 s populacijo (χ^2_b testi v preglednicah X-Y, n_2 vs N) malenkost povečala že prej opažena odstopanja (χ^2_c za n_1 in N); z edinim res večjim odstopanjem v starosti skupini do 10 let, kjer starši očitno za svojega otroka še v nekoliko večjem obsegu niso dovolili sodelovanja v nacionalni raziskavi (delež otrok se je zmanjšal iz 7,3 % na 6,6 %, pri

čemer je populacijski delež 11,0 %). Namesto tega je bilo sodelovanje nadpovprečno visoko predvsem v skupini 50-80 let. Tako je tokrat:

- še nekoliko več starejših starostnih skupin (50-80 let) in predvsem manj otrok (0-10) ter delno tudi drugih iz mlajših skupin respondentov; nekoliko manj je tudi najstarejših (81+)
- še nekoliko več je tokrat oseb v nekmečkih naseljih (<2.000) in v Ljubljani, na drugi strani pa nekoliko manj v ostalih tipih naselja;
- pri ostalih kategorijah razlike niso statistično značilne, posebej ne pri regiji, podobno velja za spol, čeprav se tokrat nakazuje nekoliko več žensk in nekoliko manj moških.

V spodnjih razpredelnicah je poleg χ^2_a na osnovi obeh vzorcev (n_1 in n_2), ter χ^2_b na osnovi n_2 in N , ponovno naveden tudi χ^2_c , ki kaže na primerjavo med osnovnim vzorcem iz prve faze raziskave in populacijo (n_1 in N).

Razpredelnica 26. Primerjava starostne strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave (vzorec 1, $n_1 = 1.368$) in ob zaključku druge faze raziskave (vzorec 2, $n_2 = 1.245$) s populacijsko strukturo.

STAROST	Populacija (%)	Vzorec 1 (%)	Vzorec 2 (%)
0-10	11,0	7,3	6,6
11-20	9,4	9,1	8,9
21-30	10,8	8,9	8,4
31-40	14,1	13,3	14,0
41-50	14,6	14,8	14,9
51-60	14,3	18,3	18,9
61-70	13,0	15,5	15,9
71-80	8,0	8,6	8,7
81+	4,8	4,2	3,9
Skupaj	100,0	100,0	100,0

$\chi^2_a = 2,29$ ($p = 0,97$), $\chi^2_b = 57,84$ ($p = 0,000$), $\chi^2_c = 46,65$ ($p = 0,000$)

V pogledu spola in regije se porazdelitvi vzorca prve faze raziskave in vzorca ob zaključku druge faze raziskave statistično značilno ne razlikujeta v primerjavi s populacijo (razpredelnici 27 in 28).

Razpredelnica 27. Primerjava strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave (vzorec 1, $n_1 = 1.368$) in ob zaključku druge faze raziskave (vzorec 2, $n_2 = 1.245$) s populacijsko strukturo glede na regijo.

REGIJA	Populacija (%)	Vzorec 1 (%)	Vzorec 2 (%)
Pomurska	5,5	6,0	5,9
Podravska	15,5	13,8	13,7
Koroška	3,4	3,5	3,5
Savinjska	12,4	11,5	11,9
Zasavska	2,7	2,8	2,9
Spodnjeposavska	3,6	3,1	3,3
Jugovzhodna	6,9	7,0	7,1
Osrednjeslovenska	26,3	28,0	27,5
Gorenjska	9,9	11,3	11,7
Primorsko-Notranjska	2,5	2,2	2,3
Goriška	5,7	5,8	5,5
Obalno-Kraška	5,6	5,1	4,7
SKUPAJ	100,0	100,0	100,0

$\chi^2_a = 1,43$ ($p = 0,99$), $\chi^2_b = 11,08$ ($p = 0,43$), $\chi^2_c = 11,00$ ($p = 0,44$)

Razpredelnica 28. Primerjava strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave (vzorec 1, $n_1 = 1.368$) in ob zaključku druge faze raziskave (vzorec 2, $n_2 = 1.245$) s populacijsko strukturo glede na spol.

SPOL	Populacija (%)	Vzorec 1 (%)	Vzorec 2 (%)
Moški	50,3	48,6	48,4
Ženski	49,7	51,4	51,6
Skupaj	100,0	100,0	100,0

$\chi^2_a = 0,01$ ($p = 0,90$), $\chi^2_b = 1,73$ ($p = 0,187$), $\chi^2_c = 1,53$ ($p = 0,216$)

Do določenega odstopanja je že pri primerjavi osnovnega vzorca (n_1 in N) prišlo pri tipu naselja, predvsem v kategoriji manjših nekmečkih naselij, kjer je bilo sodelovanje nekoliko nadpovprečno ($p=0,011$). To se je v vzorcu 2 ponovilo in nekoliko poglobilo (razpredelnica 29).

Razpredelnica 29. Primerjava strukture sodelujočih v prvi fazi raziskave (vzorec 1, $n_1 = 1.368$) in ob zaključku druge faze raziskave (vzorec 2, $n_2 = 1.245$) s populacijsko strukturo glede na tip naselja.

TIP NASELJA	Populacija (%)	Vzorec 1 (%)	Vzorec 2 (%)
Nekmečka naselja < 2.000 oseb	28,8	31,6	32,5
Kmečka naselja < 2.000 oseb	23,2	22,3	21,8
Naselja od 2.000-10.000 oseb	17,1	17,5	16,9
Ljubljana	13,5	13,8	14,1
Naselja > 10.000 oseb	13,0	11,4	11,2
Maribor	4,5	3,2	3,3
Skupaj	100,0	100,0	100,0

$\chi^2_a = 0,88$ ($p = 0,97$), $\chi^2_b = 14,4$ ($p = 0,013$), $\chi^2_c = 12,21$ ($p = 0,03$)

Zaključimo lahko, da je struktura udeležencev ob zaključku druge faze raziskave ostala praktično enaka. Obstoječa odstopanja (predvsem izpad otrok, ki ga je kompenzirala večja udeležba generacij 50-80 let), ki so bila zaznana že v osnovnem vzorcu respondentov v prvi fazi raziskave, so se za malenkost še povečala. Ne glede na to, primerjava med vzorcem udeležencev, ki so sodelovali v zadnjem delu druge faze preiskave (n_2) in populacijo (N) ne kaže – glede na primerjavo vzorca prva faze raziskave (n_1) in populacije – skoraj nobenih sprememb in se torej ohranja tudi v primerjavah panelistov s populacijo (n_1 in N); saj so razlike med obema vzorcema (n_2 in n_1) povsem zanemarljive (vse natančne stopnje značilnost za primerjavi kontrolnih spremenljivk imajo $p > 0,90$). Zaradi navedenega tudi primerjava kakšnih drugih spremenljivk (npr. delovni status) med vzorcema respondentov (n_1 in n_2), ki je sedaj načeloma mogoča (za razliko od primerjav z N , kjer smo imeli le štiri kontrolne spremenljivke), zagotovo ne bi pokazala statistično značilnih razlik. Osip oziroma izpad (v času trajanja druge faze raziskave) se je torej očitno zgodil sorazmerno in na način, ki je deloval že na osnovni vzorec respondentov. Ker gre pri prehodu iz n_1 v n_2 za zelo

majhen osip (9 %), ki v primerjavi s populacijo (n_1 vs N in n_2 vs N) ne spreminja in se tudi sicer kaže v smeri pričakovanih odstopanj, ponovno računanje uteži (na točki vzorca 2) ni posebej smiselno. Dodatni učinek na ocene bi bil povsem zanemarljiv. Še posebej pa vse navedeno velja v luči dejstva, da se ključne ocene izračunavajo z modelskim pristopom, ki vsa navedena odstopanja že vključuje v model.

3.9 Ocena seroprevalence SARS-CoV-2 v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020)

Od 1.245 udeležencev raziskave, ki so potrdili pripravljenost za odvzem krvi ob zaključku druge faze raziskave, pri 33 osebah (2,5 %) odvzem krvi ni bil možen zaradi različnih medicinskih razlogov in pri eni osebi je bil vzorec krvi odvzet po uradnem zaključku nacionalne raziskave (16. 11. 2020). Tako smo v končno oceno seroprevalence v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave vključili 1.211 oseb.

Kot podrobno opisano v poglavju 2.9, smo za oceno seroprevalence v slovenski populaciji ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020) vzorce krvi testirali s testoma Elecsys Anti-SARS-CoV-2 in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S ter podatke analizirali v dveh časovnih točkah – dan po zaključku testiranja in 14 dni pred začetkom testiranja. Na ta način smo lahko zanesljivo določili spodnjo in zgornjo mejo ocene seroprevalence v slovenski populaciji ob zaključku druge faze nacionalne raziskave, pri čemer vsi intervali predstavljajo 95 % območje največje gostote aposteriorne porazdelitve.

Na dan 11. 11. 2020 je bila nepopravljena ocena spodnje meje seroprevalence 4,09 % (95 % HDR = [3,02 – 5,22 %]), po poststratifikaciji se je ocena spodnje meje seroprevalence rahlo zvišala in je bila na dan 11. 11. 2020 ocenjena na 4,16 % (95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]). Na dan 03. 10. 2020 je bila nepopravljena ocena zgornje meje seroprevalence 4,32 % (95 % HDR = [3,19 – 5,43 %]), po poststratifikaciji se je tudi ocena zgornje meje seroprevalence delno zvišala in je bila na dan 03. 10. 2020 ocenjena na 4,40 % (95 % HDR = [3,26 – 5,60 %]). Razlika zaradi poststratifikacije je bila pričakovano večja ob zaključku druge faze raziskave, kjer je bil neodziv večji, a relativno majhna v primerjavi s siceršnjo negotovostjo ocene. Razlike v zastopanosti stratumov so v vzorcih sicer bile, a je povezava med spolom, starostjo in/ali regijo in rezultati testov relativno majhna.

Za pravilno tolmačenje ocenjenih seroprevalenc, tako v prvi fazi kot ob zaključku druge faze raziskave (oktober/november 2020), je pomembno poudariti, da je za nastanek protiteles anti-SARS-CoV-2 potreben določen čas. Protitelesa se običajno začnejo pojavljati nekaj dni po laboratorijskem dokazu okužbe z RT-PCR v brisu nosnega dela žrela, velika večina okuženih ima merljivo količino protiteles šele 14-30 dni po laboratorijskem dokazu okužbe z RT-PCR. Zato seroprevalence SARS-CoV-2 ugotovljene na določen dan, zlasti v pogojih, ko se število okuženih dnevno izjemno hitro povečuje, ni mogoče enačiti z deležem oseb v populaciji, ki je do tistega dne prišel v stik z virusom. Primer: če je bila popravljena ocena spodnje meje seroprevalence na dan 11. 11. 2020 ocenjena na 4,16 % (95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]), to pomeni, da na osnovi rezultatov nacionalne raziskave ocenjujemo, da je imelo 11. 11. 2020 **vsaj** 87.188 (ali še natančneje: med 64.972 in 112.967) prebivalcev Slovenije v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2. To **ne pomeni**, da je v Sloveniji do 11. 11. 2020 samo toliko ljudi prišlo v stik z virusom SARS-CoV-2. V stik z virusom je v Sloveniji do 11. 11. 2020 namreč prišlo več ljudi, vendar pri njih od okužbe še ni preteklo dovolj časa, da bi se razvila merljiva količina protiteles proti virusu SARS-CoV-2. Pod predpostavko, da se razmerje med kumulativno okuženostjo in seroprevalenco v 14-dnevnem obdobju med 28. 10. 2020 in 11. 11. 2020 ni preveč spreminjalo, bi lahko predvidevali, da popravljena ocena spodnje meje seroprevalence za 11. 11. 2020 (4,16 %, 95 % HDR = [3,10 – 5,39 %]) predstavlja **minimalen delež oseb v slovenski populaciji, ki je prišel v stik s SARS-CoV-2 vsaj 14 dni (do enega meseca) pred dnevom ocene seroprevalence.**

4. DISKUSIJA

4.1 Neodgovori

Kot je značilno za vse anketne raziskave, posebej za tiste, kjer je potrebno od vsake osebe vnaprej pridobiti izrecno pisno soglasje (*angl. informed consent*), se tudi pri nacionalni raziskavi vse izbrane osebe na vabilo niso odzvale. Za to obstaja vrsta objektivnih in subjektivnih razlogov, kar smo pri vzorčnem načrtu tudi predpostavili in vnaprej pričakovali okoli 50 % odziv.

Za sodelovanje v nacionalni raziskavi se je odločilo 1.368 oseb. Če upoštevamo mednarodno uveljavljene standarde za izračun stopnje odgovorov (AAPOR) (AAPOR, 2016) lahko stopnjo odgovorov ocenimo na $RR2 = 47\%$. Pri tem smo upoštevali oceno, da je 2,5 % populacije, čeprav je v registru navedena kot rezidenčna, v resnici neustrezne (*angl. ineligible*). Gre za osebe, ki so bile vključene v vzorec, dejansko pa niso rezidenti (npr. umrli v zadnjem mesecu, pred kratkim odseljeni, zgolj formalno prijavljeni v Sloveniji ipd.). Ocena izhaja iz drugih raziskav, ki so imele enak vzorčni načrt in enak vzorčni okvir (CRP), vendar pa so lahko – za razliko od naše raziskave – izvajale nadaljnje poizvedbe med nesodelujočimi, kar v primeru nacionalne raziskave zaradi izrecnih omejitev Etične komisije ni bilo mogoče.

Upoštevati velja, da imajo danes tovrstne raziskave tudi sicer v splošnem nizke stopnje odgovorov. To velja tako za družboslovne (Vehovar in Beullens, 2018) kot tudi za epidemiološke (Galea in Tracy, 2007) in druge zdravstvene (Mindell et al., 2015) anketne raziskave. Le pri redkih družboslovnih, zdravstvenih in uradnih anketah lahko danes dosežemo za 10 % (z izjemnimi naporimi morda celo 15 %) višjo stopnjo odgovora kot je bila zaznana v nacionalni raziskavi. To velja za celotni razviti svet in tudi za razmere v Sloveniji, kjer ankete praktično ne presežejo 70 % stopnje sodelovanja. Tako npr. anketa Slovensko javno mnenje in Evropska družboslovna raziskava s težavo in velikimi naporimi presežeta 60 %. Podobno velja tudi za zdravstvene ankete NIJZ in uradne ankete SURS.

Realizirana stopnja sodelovanja (47 %) je zato za raziskavo tega tipa v bistvu zelo ugodna. Povzemimo vse značilnosti nacionalne raziskave, ki so neugodno vplivale na stopnjo odgovorov:

- na voljo ni bilo toliko časa za odziv, kot je to v drugih anketnih raziskavah, ki imajo navadno vsaj en mesec, pogosto pa dva meseca ali celo tri in več;
- kontaktiranje izbranih oseb je bilo omejeno na največ dva kontakta, in še to pisemska, pri čemer velja dodati, da je bila zaradi izrazito oteženih okoliščin, ki jih je povzročila pandemija COVID-19, tudi poštna komunikacija do določene mere okrnjena in počasnejša kot sicer. V drugih raziskavah je načeloma mogoče izvesti do pet osebnih kontaktov. Običajno anketno upravljanje (npr. tri, štiri ali pet kontaktov) je bilo pri nacionalni raziskavi neizvedljivo tudi z vidika izjemno omejenega časovnega okvira izvedbe. Podobno so stroga etična izhodišča raziskave onemogočala tudi kompleksnejša nagovarjanja k sodelovanju ali celo »konverzije«, kjer bi tiste, ki so zavrnili sodelovanje, poskušali prepričati, da si premislijo;
- v raziskavi ni bilo nobenih daril, niti simboličnih, ki se sicer v drugih anketnih raziskavah pogosto uporabljajo;
- izbrane osebe se v drugih anketnih raziskavah za potrebe pristanka k sodelovanju obiskuje na domovih, pri tej raziskavi pa obiskov in nagovarjanj na domu ni bilo, ampak je glede na stroga etična izhodišča raziskave morala izbrana oseba svoje soglasje sporočiti vnaprej po telefonu oziroma elektronski pošti;
- celoten sistem dogovarjanja, priprav in usklajevanja je običajno premišljen, kompleksen in dolgotrajen, česar v pričujoči raziskavi nikakor ni bilo mogoče pripraviti v celoti;
- po načelni potrditvi sodelovanja v nacionalni raziskavi po telefonu ali po elektronski pošti so preiskovanci (v primeru otrok starši) morali podpisati še posebno Izjavo o zavestni in svobodni privolitvi v sodelovanje, kar pri družboslovnih in uradnih anketah običajno ni potrebno;
- od udeležencev se je pričakovalo, da bodo pristali na odvzem brisa nosnega dela žrela in venozni odvzem krvi (torej iz žile in ne iz prsta), kar je neprimerno bolj invaziven vstop v posameznikovo zasebnost kot le zastavljanje vprašanj;
- raziskava je potekala v času, ko se je strogo omejevalo stike in je vsak obisk neznanih oseb pomenil določeno nevarnost okužbe s SARS-CoV-2.

Dobljeno stopnjo odgovorov lahko primerjamo z nekaterimi drugimi podobnimi verjetnostnimi raziskavami seroprevalence ali okuženosti s SARS-CoV-2 v mednarodnem okolju. Ugotovimo lahko, da je dosežena stopnja primerljiva s stopnjo

sodelovanja v Avstriji (SORA, 2020) in okraju Los Angeles v ZDA (Sood et al., 2020), nekoliko zaostaja za Španijo (Pollán M et al., 2020), kjer so zaradi posebnih okoliščin dosegli izjemen rezultat in presegli 60 % stopnjo odgovorov, visoko pa smo v slovenski raziskavi presegli stopnjo odgovorov (33,7 %) v raziskavi opravljeni v Islandiji (Gudbjartsson et al., 2020).

Pomembno je tudi omeniti, da so različni raziskovalci v Sloveniji več let poskušali izvesti raziskavo, v kateri bi zbrali vzorce krvi na verjetnostnem vzorcu populacije, ampak po dosegljivih podatkih iz literature, to do nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji ni uspelo nikomur.

4.2 Pristranskost zaradi neodgovorov

Glavna težava neodgovorov je, da lahko prihaja zaradi razlik med neudeleženci in udeleženci do pristranskosti ocen (*angl. bias*). V hipotetičnem scenariju slovenske nacionalne raziskave, kjer bi npr. vsi neudeleženci (tj. 53 % ustreznih enot) razvili protitelesa anti-SARS-CoV-2, bi bila končna ocena seroprevalence višja za 53 %. Čeprav je verjetnost za tak ekstremen scenarij seveda zanemarljivo majhna, pa neposredni protidokazi ne obstajajo, zato lahko vsak, ki to želi, v katerikoli anketni raziskavi z neodgovori oporeka rezultatom. Problem neodgovora je namreč ravno v tem, da statusa nesodelujočih ne poznamo. Obstajajo po pomembni posredni dokazi, ki kažejo, da nevarnost pristranskosti sicer obstaja, vendar je v primeru naše raziskave zelo malo verjetnosti, da bi bila značilna:

- številne študije so sicer pokazale, da se nerespondenti lahko razlikujejo od respondentov (Callegaro et al., 2015), kar je značilno tudi za zdravstvene raziskave (Christensen et al., 2015), posebej ob fizičnem merjenju (Sakshaug et al., 2010), vendar pa razlike niso izjemno velike (npr. dvakrat ali trikrat). Razlike redko presežejo relativno spremembo za nekaj deset odstotkov;
- izkušnje tudi kažejo, da je velika večina spremenljivk v raziskavah z razmeroma ugodno stopnjo odgovorov (npr. okoli 50 %), precej neobčutljiva na neodgovore. To potrjujejo številne raziskave, ki so izvedene z izjemno nizko stopnjo sodelovanja (celo pod 10 %) in celo na ne-verjetnostnih vzorcih, saj dajejo kljub temu preverjeno dobre ocene (npr. volilni rezultati). Seveda pa obstajajo spremenljivke, ki so na neodgovore nekoliko bolj občutljive (npr. brezposelnost);

- osnovni problem neodgovorov je možnost, da obstaja mehanizem povezanosti med verjetnostjo za neodgovor ter vrednostjo manjkajočega odgovora, pri čemer je ta mehanizem neodvisen od obstoječih kovariat (npr. starost, spol, regija ipd.), s katerimi razpolagamo. Glede morebitne povezanosti med okuženostjo/seroprevalenco in neodgovori velja zato osvetliti naslednje potencialne razloge:
 - nobenega znanega teoretskega razloga ni, da bi bila pri osebah, ki ne vedo in tudi ne sumijo, da so okuženi/seropozitivni, okuženost/seropozitivnost povezana s pripravljenostjo za sodelovanje v raziskavi. Tvrstna povezanost seveda lahko obstaja, vendar je glede na odsotnost neke jasne teoretske povezave manj verjetna;
 - načeloma bi tovrstno povezanost lahko pričakovali pri osebah, ki ne vedo, vendar sumijo, da so okuženi/seropozitivni. Take osebe bi lahko kazale večjo (ali pa tudi manjšo) pripravljenost za sodelovanje. Vendar je na eni strani oseb s tovrstnim sumom v populaciji razmeroma malo, zato pri 2,1 milijonih oseb in verjetnostnem vzorcu to ne more imeti večjega učinka. Povsem drugače bi seveda bilo, če bi vzorec temeljil na prostovoljcih. Raziskave v drugih državah, npr. na Islandiji (Gudbjartsson et al., 2020) kažejo, da v pogledu okuženosti med dovolj velikimi vzorci prostovoljcev in verjetnostnimi vzorci pravzaprav ni bistvenih razlik, čeprav je bila ocena okuženosti v prostovoljnih vzorcih pričakovano nekoliko večja (npr. 0,8 % proti 0,6 %);
 - povezanost bi sicer lahko pričakovali za osebe, ki vedo, da so (oz. so bile) okužene, vendar je bilo v slovenski populaciji z rutinskim ciljnim RT-PCR testiranjem do konca aprila 2020 potrjenih le okoli 1.400 COVID-19 pozitivnih oseb in rutinsko testiranje na protitelesa anti-SARS-CoV-2 ni bilo uvedeno v laboratorijsko prakso, kar je v primerjavi z 2,1 milijoni povsem zanemarljivo. Za vse zgornje razloge bi tudi težko našli neko teoretsko povezavo (razlog), zaradi katere bi bila lahko navedena stališča povezana s samo okuženostjo/seropozitivnostjo;
 - na drugi strani so pri približno 55.000 ciljno testiranih osebah v Sloveniji do konca aprila 2020, kjer je bil klinični sum oz. epidemiološka anamneza očitno tako izrazita oziroma utemeljena, da so bile osebe napotene na testiranje na SARS-CoV-2 RNA, ustrezni testi do konca aprila 2020

pokazali okuženost zgolj pri okoli 1.400 osebah. To pomeni, da je celo med osebami, pri katerih se sumi na okužbo s SARS-CoV-2, okuženost zelo majhna. Čeprav je seveda treba ločevati populacijski delež okuženosti od populacijskega deleža seroprevalence (ki sta v kompleksnem razmerju), je na osnovi navedene primerjave neosnovano pričakovati, da je med vsemi nerespondenti večji delež okuženih ali seropozitivnih kot med respondenti. Bolj verjetno je, da je med nerespondenti delež okuženih/seropozitivnih kvečjemu manjši (vendar tudi za to ni neke prepričljive utemeljitve) in je zato dobljena ocena konservativna, torej seroprevalenca verjetno nekoliko precenjuje.

Zgoraj navedene argumentacije so seveda zelo splošne, saj z ustreznimi podatki o nerespondentih ne razpolagamo. V nacionalni raziskavi zaradi strogih etičnih izhodišč (ki veljajo za vse medicinske raziskave v Sloveniji) namreč ni bilo dovoljeno nikakršno spraševanje in kontaktiranje nerespondentov. Ravno tako nacionalna raziskava zaradi specifičnih okoliščin ni imela vključenih nobenih kovariat (dodatnih spremenljivk), ki bi lahko pojasnjevale neodgovore (npr. izobrazba, zdravstveno stanje, druženje, socialni kapital, zaupanje v ljudi), kar močno otežuje analizo neodgovorov. Potencialne analize nerespondentov so zato zelo omejene. Zaenkrat lahko na osnovi razpoložljivih podatkov rečemo le, da so otroci do 10 let manj pogosto sodelovali v raziskavi. Ostali učinki so bolj nejasni oziroma jih zaenkrat ni mogoče odkriti.

Tudi sicer velja poudariti, da je trenutno razmeroma nejasno, ali velja za spremenljivke, povezane s COVID-19, kak poseben mehanizem manjkajočih vrednosti, ki ga ni mogoče pojasniti z obstoječimi kovariatami. Zaenkrat namreč še ni empiričnih raziskav, ki bi to podrobneje osvetlile, razen splošne konceptualne obravnave problematike (Post et al., 2020) ter nekaj preliminarnih indicev nezanesljivega mehanizma manjkajočih vrednosti za nekatere vrste s COVID-19 povezanega obnašanja v raziskavi (Schaurer et al., 2020), ki nakazuje, da je določeno obnašanje (npr. umivanje rok, zmanjšani družbeni stiki) pogosteje prisotno pri osebah z nekaterim osebnostnimi značilnostmi (npr. samopodoba lene in nezanesljive osebe).

4.3 Uteževanje

Vzorec sodelujočih je bil utežen glede na zgornje kontrolne spremenljivke, pri čemer sta se za osnovno uteževanje uporabili povezani margini za spol × starost ter regija × tip naselja. Uteževanje je sicer postopek, s katerim izenačimo deleže kontrolnih spremenljivk v strukturi vzorca s strukturo populacije. Če je npr. moških v vzorcu 40 % namesto 50 % kot v populaciji, dobijo vsi moški utež 50/40. Večja kot so odstopanja, večji učinek lahko pričakujemo na spremembo ocen za ciljne spremenljivke, seveda ob dodatnem predpogoju, da so kontrolne spremenljivke povezane s ciljno spremenljivko.

Glede na zgoraj identificirane razlike v kontrolnih spremenljivkah, ki so bile razmeroma majhne, lahko pričakujemo, da bi uteževanje povečalo delež starostne skupine 0-10 let in s tem tudi lastnosti te skupine. V ostalem se vzorec v pogledu kontrolnih spremenljivkah ne razlikuje izraziteje od populacije, zato tudi uteževanje na osnovi teh spremenljivk ne more imeti večjega učinka. Tudi sicer je v verjetnostnih anketah, ki dosegajo stopnje sodelovanja okoli 50 % ali več (še posebej, če ne vključujejo otrok), običajno, da uteži nimajo večjega vpliva na ocene, saj so razlike v kontrolnih spremenljivka praviloma premajhne, povezave med kontrolnimi in ciljnimi spremenljivkami pa prešibke.

Tako se v primeru uporabe osnovnih uteži, ki temeljijo na prilagoditvi glede na zgoraj navedene kontrolne spremenljivke, ocene spremenijo v smeri blagega znižanja ocen okuženosti in seroprevalence. Število aktivno okuženih s SARS-CoV-2 odkritih v prvi fazi raziskave se tako npr. premakne od 2 enot v vzorcu na 1,89.

Seveda pa vsako uteževanje nekoliko poveča vzorčno varianco. Razpon uteži pri osnovnem uteževanju je namreč v intervalu 0,27 – 3,65, standardni odklon normalizirane uteži pa je $SD = 0,39$. Če izračunamo srednjo kvadratno napako (MSE; *angl. mean squared error*), ki upošteva tako spremembo v oceni (pristranskost) kot odgovarjajoči porast v vzorčni varianci (Kalton in Vehovar, 2001), se izkaže, da uteževanje pravzaprav ni upravičeno. Porast v vzorčni varianci namreč v vseh uteževanjih presega 10 % (kar pomeni razširjanje intervalov zaupanja za okoli 5 %), medtem ko so popravki ocen minimalni. Zato je MSE v primeru uteževanja večji, kot brez uteževanja. Posledično so se v vseh nadaljnjih analizah uporabili neuteženi podatki, saj so bili bolj točni (*angl. accurate*), torej z manjšo MSE kot pa uteženi

podatki, čeprav imajo neuteženi podatki nekoliko slabši »kozmetičen« videz (npr. struktura spola je malce drugačna kot v populaciji).

Dodajmo, da vse navedeno velja tudi za skrajni primer uteževanja, kjer bi med uteži dodatno vključili tudi inverzno vrednost stopnje odgovora na prvi stopnji v 300 PSU (npr. vsaka enota v PSU, kjer so odgovorile 3 od 10 enot, bi dobila utež 10/3), kar točkovno oceno za okuženost premakne še nekoliko bolj izrazito, in sicer na 1,61. Res pa je, da izkušnje kažejo, da so tovrstne ocene, pridobljene z ekstremnim uteževanjem – čeprav formalno niso optimalna, ker jih spremlja prevelika MSE –, kažejo v pravo smer; pogosto je prava vrednost še nekoliko dlje v tej smeri.

Pri točkovni in tudi intervalni oceni okuženosti oziroma seroprevalence se je zato uporabilo neuteženi vzorec. Predpostavilo se je tudi enostavni slučajni vzorec (SRS), čeprav smo seveda imeli (implicitno stratificirani) dvostopenjski vzorec, ki npr. varianco ocene za seroprevalenco zaradi intraklasne korelacije ($\rho = 0,025$) zvišuje za okoli 10 %. Zaradi majhnega deleža seroprevalence sta odgovarjajoče povečanje variance in intraklasna korelacija ocenjeni razmeroma nenatančno, zato se zaradi njune majhne vrednosti ta učinek brez večje škode lahko izpusti. V še večji meri velja to tudi za okuženost, saj sta bili v vzorcu le dve taki enoti.

Dodati velja, da je za posamezne ocene (npr. seroprevalenco) enakovreden oziroma alternativni pristop uteževanju lahko tudi popravek ocene na osnovi določenega modela. V tem okviru je bil za okuženost in seroprevalenco tak popravek tudi izveden, in sicer popravek ocen za neodziv na osnovi modelskega pristopa MRP (poglavje 2.10.5). Popravek je upošteval margine vseh kontrolnih spremenljivk (spol, starost, regija, tip naselja), kar je imelo podoben učinek (nekoliko manjši, ker ni vključeval interakcije regija \times tip naselja), kot smo ga navedli pri uteževanju, torej blago nižanje siceršnjih ocen. Poleg tega se zaradi dodanih informacij kontrolnih spremenljivk, ki jih z MRP modelom upoštevamo pri oceni, nekoliko izboljša tudi odgovarjajoča natančnost ocen (ožji IZ).

4.4 Točkovne in intervalne ocene

V pričujočem poglavju (Diskusija) smo se ukvarjali predvsem z vzorčnim načrtom, neodgovori ter uteževanjem. Vprašanje končnih ocen (točkovnih in intervalnih) za

okuženost in seroprevalenco je bilo podrobno obdelano v poglavjih 3.5.2 in 3.5.3. Pri populacijskih ocenah je namreč potrebno – poleg vzorčnih napak – upoštevati tudi popravke zaradi občutljivosti in specifičnosti merjenja, torej za napake, ki izhajajo iz samih uporabljenih laboratorijskih testov. Vsak laboratorijski test, tudi najbolj uveljavljen, namreč lahko z določeno verjetnostjo pokaže napačno pozitiven rezultat, čeprav je dejansko stanje negativno, in tudi obratno, zlasti v populacijah z nizko prevalenco bolezni.

4.5 Umestitev izsledkov slovenske nacionalne raziskave v mednarodni prostor

Kljub več kot 67 milijonov laboratorijsko dokazanih primerov bolezni COVID-19 in več kot 1,6 milijonov smrti zaradi okužbe s SARS-CoV-2 do začetka decembra 2020 so populacijski podatki o okuženosti kot tudi seroprevalenci, še vedno v veliki meri nepoznani. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je marca 2020 pripravila priporočila za izvedbo nacionalnih starostno stratificiranih epidemioloških raziskav, ki bi zapolnile to vrzel manjkajočih podatkov; 17. 03. 2020 pa je objavila tudi raziskovalni protokol z namenom, da olajša in spodbudi zbiranje in izmenjavo epidemioloških podatkov o COVID-19 v standardizirani obliki med različnimi državami (WHO, 2020). Glede na priporočila SZO, vsaka država, ki bi se odločila za izvedbo take populacijske raziskave, lahko prilagodi različne vidike protokola raziskave (vključno z diagnostičnim pristopom) glede na kapacitete javnozdravstvenih organizacij, laboratorijev in bolnišnic v državi, razpoložljivost virov in tudi glede na javno sprejemljivost takšnih raziskav. V nadaljevanju diskusije bomo predstavili in primerjali populacijske raziskave, ki so na podlagi naključnega ali reprezentativnega vzorca prebivalcev podale oceno razširjenosti okužb s SARS-CoV-2 na nacionalni ali širši regionalni ravni, z nacionalno raziskavo. Za lažjo primerjavo smo raziskave razdelili v tri kategorije:

- populacijske raziskave na nacionalni ali širši regionalni ravni, ki so uporabile le diagnostični pristop molekularnega testiranja na SARS-CoV-2 RNA in podale oceno o populacijski okuženosti oz. razširjenosti trenutno potekajočih aktivnih okužb s SARS-CoV-2;
- populacijske raziskave na nacionalni ali širši regionalni ravni, ki so uporabile le diagnostični pristop serološkega testiranja na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 in podale oceno o populacijski seroprevalenci oz. deležu populacije, ki je

v trenutku testiranja imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2;

- populacijske raziskave na nacionalni ali širši regionalni ravni, ki so uporabile kombiniran pristop molekularnega in serološkega testiranja ter istočasno podale populacijsko oceno okuženosti in seroprevalence (tako kot slovenska nacionalna raziskava v prvi fazi raziskave).

Ker se, kot omenjeno, število raziskav kot tudi njihovi izsledki objavljeni v recenzirani znanstveni literaturi dnevno kopičijo s predhodno nepredstavlljivo hitrostjo, smo pri umestitvi izsledkov slovenske raziskave v mednarodni prostor vodilni raziskovalci nacionalne raziskave skrbno in kritično spremljali recenzirano znanstveno literaturo. Za vsako od treh zgoraj navedenih kategorij populacijskih raziskav smo tako povzeli primerjalne rezultate ostalih raziskav in slovenske nacionalne raziskave v štirih časovnih točkah: času prve predstavitve rezultatov nacionalne raziskave (prvi teden maja 2020), v času priprave »Preliminarnega poročila – različica 1.0« (konec junija 2020), v času priprave »Preliminarnega poročila – različica 2.0« (konec avgusta 2020) ter za pričujoče »Končno poročilo« (prvi teden decembra 2020).

Za umestitev izsledkov slovenske raziskave v mednarodni prostor smo v štirih obdobjih iskali objave v recenzirani znanstveni literaturi z naslednjimi ključnimi besedami: »COVID-19«, »SARS-CoV-2«, »anti-SARS-CoV-2«, »incidence«, »prevalence«, »seroprevalence« in »survey«. Iskanje literature je potekalo v mednarodnih podatkovnih bazah PubMed, ScienceDirect, Medline in Google Scholar. Upoštevali smo samo raziskave, ki so bile objavljene in/ali sprejete v objavo v recenzirani znanstveni literaturi, saj po našem prepričanju odsotnost znanstvene recenzije (angl. *peer review*) lahko vodi k nezanesljivemu in neprimernemu vrednotenju rezultatov naše raziskave. Kot že omenjeno, je nedavna raziskava pokazala, da so samo 9 % vseh rokopisov shranjenih v repozitoriju preprintov medRxiv komentirali drugi raziskovalci in je bilo le 10 % shranjenih rokopisov v repozitoriju preprintov medRxiv nazadnje tudi objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi (Flanagin et al., 2020; Krumholz et al, 2020). Vse to nakazuje na relativno slabo kvaliteto velike večine rokopisov shranjenih v repozitorijih preprintov. Zato populacijskih raziskav okuženosti in seroprevalence na nacionalni ali širši regionalni ravni, ki so še vedno brez ustrezne znanstvene recenzije pridobljenih rezultatov in objavljene le na različnih spletnih

portalih/strane, zaradi nezanesljivosti rezultatov v naša poročila nismo vključevali, razen izjemoma, če so za to obstajali utemeljeni razlogi.

4.5.1 Populacijske raziskave okuženosti oz. razširjenosti trenutno potekajočih aktivnih okužb s SARS-CoV-2

Prva nacionalna raziskava, ki je ugotavljala razširjenost aktivnih okužb s SARS-CoV-2 na verjetnostnem vzorcu prebivalcev, in je objavljena v recenzirani znanstveni literaturi, je bila izvedena v začetku aprila 2020 na Islandiji (Gudbjartsson et al., 2020), torej slab mesec pred slovensko nacionalno raziskavo. V skupini preiskovancev, ki so bili naključno izbrani, je bilo 2.283 udeležencev, starih od 20 do 70 let, ki so jih testirali z nekomercialno različico RT-PCR; 0,6 % (95 % CI = 0,3–0,9 %) je imelo aktivno okužbo s SARS-CoV-2. Podobna okuženost (0,8 %; 95 % CI = 0,6–1,0 %) je bila potrjena tudi v skupini 10.797 preiskovancev, ki so se odzvali na odprto vabilo k testiranju in je bila pričakovano nižja od skupine preiskovancev, ki so bili ciljano testirani zaradi visokega tveganja za okužbo in/ali prisotnosti simptomov (Gudbjartsson et al., 2020). Čeprav slovenska raziskava zaradi različnih pristopov testiranja, različne starostne strukture testirane populacije (0-99 let v naši raziskavi, 20-70 let v islandski raziskavi) in različne dinamike poteka epidemije ni neposredno primerljiva z islandsko raziskavo, smo pri naši raziskavi opravljeni konec aprila 2020 po pričakovanih zaznali podobno nizek diagnostični izplen testiranja na verjetnostnem vzorcu (pozitivnih 0,15 % testiranih vzorcev) v primerjavi s ciljanim diagnostičnim testiranjem, opravljenim med februarjem in majem 2020 (pozitivnih 2,6 % testiranih vzorcev), še zlasti pa v primerjavi s ciljanim diagnostičnim testiranjem v štirih diagnostično najbolj intenzivnih tednih v času prvega vala epidemije v Sloveniji (pozitivnih 4,1 % testiranih vzorcev).

Po podatkih iz literature, je torej slovenska nacionalna raziskava druga nacionalna raziskava okuženosti s SARS-CoV-2 objavljena v recenzirani znanstveni literaturi (Maver Vodičar in Oštrbenk Valenčak et al., 2020).

Konec novembra 2020 je bil objavljen znanstveni članek o največji populacijski raziskavi razširjenosti trenutno potekajočih aktivnih okužb, narejen v mestu Wuhan na Kitajskem. Po zaključku strogega zaprtja mesta, ki je bilo prvo žarišče epidemije SARS-CoV-2, so med 14. majem in 1. junijem 2020 izvedli testiranje z RT-PCR na

9.899.828 prebivalcih, oziroma na kar 92,9 % vseh prebivalcev Wuhana, starejših od 6 let (Cao et al., 2020). Odkrili so samo 300 asimptomatskih primerov okužbe (stopnja okuženosti je znašala 0,303 na 10.000 prebivalcev (95 % CI = 0,270 – 0,339/10.000)), medtem ko so med 34.424 prebivalci, ki so predhodno preboleli COVID-19, odkrili 107 takih, ki so imeli ponovno pozitiven rezultat RT-PCR testiranja (Cao et al., 2020). Za vseh 300 novo odkritih primerov in 107 ponovno/še vedno pozitivnih PCR primerov so izvedli tudi testiranje kužnosti virusa na celičnih kulturah, ampak pri nobenem od primerov niso dokazali prisotnosti virusa, sposobnega replikacije. Dodatno tudi s tesnim sledenjem kontaktov odkritih primerov niso odkrili nobenega prenosa okužbe s SARS-CoV-2 (Cao et al., 2020). Kitajska raziskava je dokazala, da je bila prevalenca aktivnih okužb s SARS-CoV-2 5–8 tednov po sprostitvi strogih omejitev v Wuhanu izjemno nizka.

Poleg islandske, slovenske in kitajske raziskave v Wuhanu je bilo mogoče na spletu do začetka decembra 2020 zaslediti le nekaj kratkih in nerecenziranih poročil o podobnih raziskavah v drugih državah, med drugim poročilo o dveh krogih nacionalne presečne raziskave o razširjenosti okužb s SARS-CoV-2 v Avstriji, opravljenih na naključnem reprezentativnem vzorcu prebivalcev, kjer je bila v prvem krogu v začetku aprila 2020 okuženost ocenjena na 0,33 % (95 % CI = 0,12–0,76 %), v drugem krogu nekaj tednov pozneje pa se je ocena okuženosti še znižala (Statistik Austria, 2020; SORA, 2020; Beullens et al., 2020). Čeprav rezultati teh raziskav še vedno niso objavljeni v recenzirani znanstveni literaturi (kljub temu, da je od izvedbe raziskave minilo že šest mesecev), smo jih tu predstavili zaradi dejstva, da je Avstrija naša sosedka.

4.5.2 Populacijske raziskave seroprevalence SARS-CoV-2 oz. deleža populacije, ki je v trenutku testiranja imel v krvi merljivo količino protiteles proti virusu SARS-CoV-2

Raziskav, ki bi ocenjevale populacijsko seroprevalenco na nacionalni ali širši regionalni ravni in bile objavljene v recenzirani znanstveni literaturi, med izvedbo prve faze slovenske nacionalne raziskave konec aprila 2020 še ni bilo.

Prvo tovrstno recenzirano znanstveno poročilo je bilo objavljeno sredi junija 2020 in je ocenilo seroprevalenco pri odrasli populaciji v okrožju Los Angeles v Kaliforniji (ZDA) na 4,6 % (95 % CI = 2,84–5,60 %) (Sood et al., 2020).

Druga raziskava, objavljena v recenzirani znanstveni literaturi konec junija 2020, je bila narejena na verjetnostnem vzorcu predhodno definirane kohorte prebivalcev Ženevskega kantona v Švici, starejših od 5 let. Zasnovana je kot ponovljena presečna raziskava, ki je/bo v predvidoma 12 zaporednih tednih vsak teden testirala naključno izbrane udeležence in člane njihovih gospodinjstev na prisotnost anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG (Stringhini et al., 2020). V prvem tednu testiranja (april 2020) je bila seroprevalenca ocenjena na 4,8 % (n = 341; 95 % CI = 2,4–8,0 %); ocena seroprevalence se je v drugem tednu povečala na 8,5 % (n = 469; 95 % CI = 5,9–11,4 %), v tretjem tednu na 10,9 % (n = 577; 95 % CI = 7,9–14,4 %) v četrtem tednu je bila seroprevalenca 6,6 % (n = 604; 95 % CI = 4,3–9,4 %), v petem tednu pa 10,8 % (n = 775; 95 % CI = 8,2–13,9 %) (Stringhini et al., 2020). Preiskovanci, stari 5–9 let in starejši od 65 let, so imeli bistveno manjše tveganje za anti-SARS-CoV-2 seropozitiven status kot preiskovanci, stari 20–49 let (relativno tveganje [RR] 0,32 [95 % CI = 0,11–0,63] pri starosti 5–9 let in RR 0,50 [95 % CI = 0,28–0,78] pri starejših od 64 let) (Stringhini et al., 2020). Švicarski raziskovalci so za ugotavljanje prisotnosti anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG uporabili enak serološki test kot mi v prvi fazi slovenske nacionalne raziskave (Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG), zanimivo pa je omeniti, da so v osnovnem tekstu članka podali le ocene osnovne seroprevalence (nepopravljene za specifičnost testa), saj naj bi z interno evalvacijo na 176 vzorcih ugotovili 100 % specifičnost uporabljenega testa Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG.

Španska raziskovalna skupina je v začetku maja 2020 izvedla raziskavo na naključno izbranem reprezentativnem vzorcu 61.072 oseb (iz 35.883 gospodinjstev), pri čemer so populacijsko seroprevalenco ocenili glede na rezultate testiranja z dvema serološkima testoma: hitri test (*angl. point-of-care test*) Gene Biotech COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Cassette (Orient, Zhejiang, Kitajska) ter encimsko imunski test SARS-CoV-2 IgG (Abbott Laboratories, Chicago, ZDA) (Pollán et al., 2020). Za oceno intervala seroprevalence so uporabili dva različna pristopa. Za določitev spodnje meje intervala so privzeli, da ima oseba protitelesa anti-SARS-CoV-2, le če je pozitivna z obema testoma. Za določitev zgornje meje intervala pa so upoštevali, da ima oseba protitelesa anti-SARS-CoV-2, če je pozitivna vsaj z enim od dveh uporabljenih

seroloških testov. Na ta način so s 95-odstotno verjetnostjo ocenili, da je seroprevalenca v španski populaciji med 3,3 % in 6,6 %, kar pomeni, med 1,5 milijonov in 3,1 milijonov oseb. Pomembno je omeniti, da je velikanska razlika v oceni seroprevalence v španski populaciji (negotovost več kot 1,5 milijonov ljudi) nastala kljub uporabi testov, za katere so španski raziskovalci zatrjevali, da imajo zelo visoko analitično specifičnost. Čeprav je odvzem vzorcev krvi za špansko raziskavo potekal 15 dni (od 27. 04. 2020 do 11. 05. 2020) in podobno kot odvzem vzorcev ob zaključku druge faze v slovenski nacionalni raziskavi v obdobju hitre rasti kumulativne okuženosti oz. incidence aktivne bolezni COVID-19 v Španiji (npr. 3.046 novih primerov dne 10. 05. 2020), španski raziskovalci niso podali ocene seroprevalence za določen dan, ampak za celotno obdobje od 27. 04. 2020 do 11. 05. 2020. Poročali so tudi o izraziti geografski variabilnosti med različnimi regijami, pri čemer je bila najvišja ocenjena seroprevalenca okoli Madrida (>10 %) in najnižja v obalnih predelih (<3 %) (Pollán et al., 2020).

Konec avgusta 2020 so bili objavljeni tudi rezultati pomembne nacionalne raziskave iz Islandije (Gudbjartsson et al., 2020). V raziskavo so med aprilom in junijem 2020 vključili 30.576 oseb, starih večinoma med 20 in 65 let, in ocenili seroprevalenco v treh skupinah: pri osebah s RT-PCR-dokazano okužbo s SARS-CoV-2 ($n = 1.237$), pri osebah, ki jim je bila odrejena karantena ($n = 4.222$) in pri osebah, ki domnevno niso prebolele COVID-19 ($n = 23.452$). Za dokazovanje protiteles anti-SARS-CoV-2 so uporabili šest različnih testov. Za končno oceno seroprevalence so izbrali dva pan-anti-SARS-CoV-2- testa, ki sta pokazala najvišjo analitično in klinično specifičnost: Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) in SARS-CoV-2 Ab ELISA (Wantai, Peking, Kitajska). Test Elecsys Anti-SARS-CoV-2 smo uporabili tudi v slovenski nacionalni raziskavi pri ponovnem testiranju vzorcev krvi iz prve faze ter za testiranje vzorcev krvi zbranih ob zaključku druge faze slovenske nacionalne raziskave. V islandski raziskavi so kot dokončno pozitivne upoštevali le osebe pozitivne z obema uporabljenima testoma. Seroprevalenco so v prvi skupini ocenili na 91,1 % (95 % CI = 89,4–92,6 %), v drugi skupini na 2,3 % (95 % CI = 1,9–2,8 %) in v tretji na 0,3 % (95 % CI = 0,2–0,4 %) (Gudbjartsson et al., 2020). Podobno kot španski raziskovalci, so tudi raziskovalci iz Islandije ugotovili veliko neskladje v oceni seroprevalence v treh populacijah, če so kot anti-SARS-CoV-2 pozitivne upoštevali osebe pozitivne z obema testoma ali pozitivne z enim od uporabljenih testov, čeprav so zatrjevali zelo visoko

analitično specifičnost obeh uporabljenih testov za določanje protiteles anti-SARS-CoV-2.

Indijska skupina raziskovalcev je konec oktobra 2020 objavila članek, v katerem je opisala obsežno populacijsko raziskavo izvedeno med 11. majem 2020 in 4. junijem 2020 v 700 vaseh iz 70 okrožij in 21 zveznih držav Indije, stratificiranih v 4 kategorije na podlagi poročane incidence primerov bolezni COVID-19 (Muhrekar et al., 2020). V raziskavi so testirali 28.000 posameznikov, starejših od 18 let na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2 razreda IgG z uporabo testa COVID Kavach ELISA kit (Cadila Healthcare Limited, Ahmedabad, Indija). Vse seropozitivne vzorce so ponovno testirali s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ki smo ga uporabili tudi v prvi fazi slovenske nacionalne raziskave: kot dokončno pozitivne so upoštevali le tiste vzorce, pri katerih je bil rezultat obeh testov pozitiven. Utežena seroprevalenca po popravljeni oceni glede na občutljivost in specifičnost obeh uporabljenih testov je na nacionalni ravni znašala 0,73 % (95 % CI = 0,34–1,13 %), vsekakor pa je bila maja 2020 Indija še na začetku epidemije (Muhrekar et al., 2020).

Novembra 2020 je bilo objavljeno tudi kratko znanstveno poročilo o oceni seroprevalence na Ferskih otokih, geografsko izoliranem območju z nekaj več kot 50.000 prebivalci, kjer so v zadnjem tednu aprila 2020 izvedli testiranje na naključno izbranem reprezentativnem vzorcu 1.075 oseb (povprečna starost 42,1 let, razpon 0–100 let) z uporabo testa SARS-CoV-2 Ab ELISA (Wantai). Nepopravljena ocena seroprevalence je bila 0,6% (95 % CI = 0,2–1,2 %) in popravljena glede na oceno specifičnosti in občutljivosti testa 0,7 % (95 % CI = 0,3–1,3 %) (Petersen et al., 2020).

Dvakrat ponovljena presečna raziskava seroprevalence v Braziliji je bila izvedena v 133 brazilskih mestih v vseh zveznih državah Brazilije (Hallal et al., 2020). V njej so naključno izbrali gospodinjstva, nato pa znotraj gospodinjstev enega posameznika, starejšega od 1 leta. Skupno je bilo vključenih 25.025 posameznikov v prvi presečni raziskavi, izvedeni 14.–21. maja 2020, ter 31.165 posameznikov v drugi presečni raziskavi, izvedeni 4.–7. junija 2020, pri katerih so določali prisotnost specifičnih protiteles razreda IgG in IgM s hitrim testom SARS-CoV-2 (Wondfo Biotech, Guangzhou, Kitajska). Združena ocena seroprevalence za 83 mest (62 % zajetih mest) z najmanj 200 vključenimi preiskovanci je znašala 1,9 % (95 % CI = 1,7–2,1 %) in 3,1 % (95 % CI = 2,8–3,4 %) v dveh krogih raziskave, razpon seroprevalence na nivoju

mest pa je bil vse od 0 % do 25,4 % (Hallal et al., 2020). Opazili so precejšnje geografske razlike, saj je bila največja seroprevalenca v obeh krogih dokazana v 2.000 km dolgem pasu vzdolž reke Amazonke na severu Brazilije, z znatnim porastom seroprevalence na severovzhodu države v drugem krogu, medtem ko je bila seroprevalenca nižja na jugu in zahodu države. Poleg tega je bila seroprevalenca bistveno višja pri avtohtonih prebivalcih (6,4 % (95 % CI = 4,1–9,4 %)) v primerjavi z belskim prebivalstvom (1,4 % (95 % CI = 1,2–1,7 %)) ter pri pripadnikih najrevnejšega socialno-ekonomskega razreda (3,7 % (95 % CI = 3,2–4,3 %)) v primerjavi z najbogatejšim prebivalstvom (1,7 % (95 % CI = 1,4–2,2 %)).

Nekatere populacijske seroprevalenčne raziskave so izključevale otroško populacijo, ali pa je bila ta v vzorcu slabše zastopana. Konec oktobra 2020 je bila objavljena raziskava, narejena na vzorcih 15.771 otrok starih od 1 do 18 let, živečih na Bavarskem, ter vzorcih posušenih kapelj krvi 1.916 novorojenčkov, kjer so z imunoprecipitacijo določali prisotnost protiteles proti tarčnemu mestu RBD (*angl. receptor-binding domain*) na beljakovini S ter protitelesa proti beljakovini N virusa SARS-CoV-2 (Hippich et al., 2020). Protiteles anti-SARS-CoV-2 niso ugotovili v nobenem od 3.887 testiranih vzorcev krvi, zbranih v letu 2019. V letu 2020 so na 11.884 vzorcih krvi zaznali naraščajočo seroprevalenco: 0,08 % v obdobju od januarja do marca 2020, 0,61 % v aprilu 2020, 0,74 % v maju 2020, 1,13 % v juniju 2020 in 0,91 % v juliju 2020. Seroprevalenca pri novorojenčkih je bila ocenjena na 0,47 %. V aprilu 2020 je seroprevalenca bila 6-krat večja od uradnega števila poročanih laboratorijsko dokazanih okužb s SARS-CoV-2 (kumulativna okuženost) pri otrocih na Bavarskem (Hippich et al., 2020).

Nekaj raziskav, ki po naravi niso prave populacijske raziskave, je seroprevalenco določalo iz ostankov vzorcev krvi; med njimi je daleč najboljšežnejša raziskava ameriške raziskovalne skupine iz CDC (*angl. Centers for Disease Control and Prevention*), ki je rezultate objavila konec novembra 2020 (Bajema et al., 2020). Ta večstopenjska presečna raziskava s štirimi ponovitvami med julijem in septembrom 2020 je zajela skupno 177.919 ostankov vzorcev krvi iz dveh komercialnih laboratorijev iz vseh ameriških držav, rezultati pa so pokazali veliko heterogenost med državami, saj je bil razpon ocene seroprevalence od manj kot 1 % do 23 % (Bajema et al., 2020). V 42 od 49 držav v ZDA, kjer so testirali zadostno število vzorcev za zanesljivo oceno seroprevalence, ta ni presegala 10 % (Bajema et al., 2020). V raziskavi so uporabljali

tri različne vrste seroloških testov, in sicer Architect SARS-CoV-2 IgG Test (Abbott Laboratories), VITROS Anti-SARS-CoV-2 IgG Tests (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey), in Elecsys Anti-SARS-CoV-2 (Roche Diagnostics) (Bajema et al., 2020).

Ker ostala poročila o populacijskih seroprevalenčnih raziskavah, ki jih najdemo na različnih spletnih portalih/strane, še niso znanstveno recenzirana, ker so v njih uporabljali različne serološke teste, so starostne strukture testiranih preiskovancev v teh raziskavah pomembno različne, in so časovna obdobja izvedbe teh raziskav znotraj prvega vala pandemije različna, je primerjalno vrednotenje rezultatov, predstavljenih v takšnih nerecenziranih poročilih, lahko problematično, zavajajoče in nezanesljivo kljub morebitni uporabi standardnega znanstvenega pristopa. Tako so bile v teh raziskavah ugotovljene pomembne razlike v stopnji seroprevalence in v veliki večini primerov nepopravljene glede na občutljivost in specifičnost uporabljenih seroloških testov (Bendavid et al., 2020; Studie kolektivni imunity, 2020).

Navedena dejstva o izjemni metodološki heterogenosti seroprevalenčnih raziskav, tako tistih objavljenih v recenzirani znanstveni literaturi, kot tistih opisanih v poročilih shranjenih na spletnih portalih/strane, ter skoraj nemogoče primerjanje rezultatov posameznih seroprevalenčnih raziskav, so potrdila tudi štiri pregledna poročila in meta-analize (Rostami et al., 2020; Lai et al., 2020; Meyerowitz-Katz in Merone, 2020; Ioannidis, 2020).

V začetku oktobra 2020 je bilo objavljeno pregledno poročilo, ki je povzelo rezultate različnih populacijskih seroprevalenčnih raziskav z vsega sveta (Lai et al., 2020). Članek zajema zelo heterogene, tako recenzirane kot še nerecenzirane raziskave z velikim razponom števila in strukture vključenih preiskovancev; nekatere so bile narejene na verjetnostnem vzorcu posamezne države (vse tovrstne raziskave so že podrobno predstavljene zgoraj), druge pa na skupinah prostovoljcev, krvodajalcev, hospitaliziranih bolnikov ali ostankih vzorcev krvi iz različnih laboratorijev, zajete pa so tudi raziskave z ocenami seroprevalence točno določenih skupin, kot so zdravstveni delavci, nosečnice in otroci. Zanimivo je, da niso ugotovili nikakršne trdne povezave med poročano kumulativno okuženostjo laboratorijsko potrjenih primerov bolezni COVID-19 v posameznih državah in ugotovljeno seroprevalenco v teh državah. Zaradi izjemne heterogenosti vseh vključenih raziskav avtorji preglednega članka tudi

zaključujejo, da poročane seroprevalence v raziskavah odražajo izključno situacijo v točno določenem času in kraju in ob uporabi točno določene laboratorijske metode za določanje prisotnosti protiteles anti-SARS-CoV-2 (Lai et al., 2020). Glede na trenutno hitro naraščanje števila primerov aktivnih okužb s SARS-CoV-2 povsod po svetu je ocena izmerjene seroprevalence močno odvisna od trenutka vzorčenja in je verjetno resnično seroprevalenco nemogoče oziroma izredno težko natančno izmeriti.

Konec oktobra 2020 je bil objavljen tudi sistematični pregled z meta-analizo, v katerem so poskusili oceniti globalno seroprevalenco s SARS-CoV-2 s pregledom 47 raziskav (dostopnih do 14. avgusta 2020) iz 23 držav na skupno 399.265 ljudeh, ocena seroprevalence v raziskavah pa je bila od 0,37 % do 22,1 % (Rostami et al., 2020). Združena ocena globalne seroprevalence je znašala 3,38 % (95 % CI = 3,05–3,77 %), z velikimi variacijami med geografskimi področji, nekaj te variabilnosti pa je bilo povezano tudi z uporabo različnih seroloških testov (Rostami et al., 2020). Čeprav avtorji govorijo o oceni seroprevalence v splošni populaciji, pa je uporaba tega izraza nekoliko zavajajoča, saj je bilo med 47 raziskavami v meta-analizi zelo veliko takih, ki so se osredotočale na točno določeno populacijo (npr. krvodajalci, šolarji in šolski delavci po izbruhu bolezni, obiskovalci v bolnišnici, industrijski delavci) ali pa so bile narejene na ostankih vzorcev krvi, torej ni šlo za prave populacijske raziskave na verjetnostnem vzorcu, poleg tega je bilo kar 22 vključenih raziskav še nerecenziranih in niso bile objavljene v znanstvenih revijah.

4.5.3 Populacijske raziskave, ki istočasno merijo okuženost in seroprevalenco

Po podatkih iz literature je slovenska nacionalna raziskava prva raziskava objavljena v recenzirani znanstveni literaturi, ki je uporabila kombinirani diagnostični pristop za istočasno oceno okuženosti in seroprevalence, na verjetnostnem vzorcu, reprezentativnem za celotno državo, ki vključuje vse starostne kategorije (Maver Vodičar in Oštrbenk Valenčak et al., 2020). Po dosegljivih podatkih je slovenska nacionalna raziskava zaenkrat tudi edina, ki vključuje longitudinalno spremljanje preiskovancev po vključitvi v raziskavo.

Podobno kot v prvi fazi slovenske raziskave, so konec avgusta 2020 ameriški raziskovalci iz zvezne države Indiana (ZDA) istočasno ocenili okuženost prebivalcev te države na 1,74 % (95 % CI = 1,10–2,54 %) ter seroprevalenco na 1,09 % (95 % CI

= 0,76–1,45 %). Med 25. in 29. aprilom 2020 so v raziskavo vključili 3.658 oseb, starih 12 let ali več, glede na rezultate raziskave je bila verjetno Indiana konec aprila 2020 šele v zgodnji fazi epidemije.

Še ena podobno zasnovana raziskava, je znanstveno še vedno nerecenzirana raziskava CON-VINCE, ki je ocenila okuženost v populaciji prebivalcev Luksemburga, starih od 18 do 79 let konec aprila in na začetku maja 2020 na 0,30 % (95 % CI = 0,03–0,56 %) ter seroprevalenco na 2,09 % (95 % CI = 1,37–2,82 %) (Snoeck et al., 2020). Podobno kot švicarski raziskovalci (Stringhini et al., 2020), so tudi raziskovalci v Luksemburgu za ugotavljanje prisotnosti anti-SARS-CoV-2 protiteles razreda IgG uporabili enak serološki test kot v prvi fazi slovenske nacionalne raziskave (Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG). Tudi oni so, podobno kot švicarski raziskovalci, podali le oceno osnovne seroprevalence, nepopravljene za specifičnost uporabljenega serološkega testa.

Avgusta 2020 je bil objavljen tudi protokol zanimive populacijske raziskave, ki bo istočasno merila okuženost in seroprevalenco s SARS-CoV-2 v ZDA, eni izmed najbolj prizadetih držav na svetu po številu okuženih in mrtvih (Siegler et al., 2020). Na reprezentativni vzorec naključno izbranih naslovov bodo poslali vabila in pripomočke za samoodvzem brisa nosnic za testiranje na SARS-CoV-2 RNA z RT-PCR in posušene kaplje krvi iz prsta za testiranje na prisotnost protiteles anti-SARS-CoV-2, ki jih bodo določali dvostopenjsko: najprej presejalno s testom SARS-CoV-2 ELISA (BioRad, Hercules, CA), nato pa še potrditveno s testom Anti-SARS-CoV-2 ELISA IgG, ki smo ga uporabili v prvi fazi slovenske nacionalne raziskave. Znotraj vsakega gospodinjstva bodo naključno izbrali eno osebo, starejšo od 18 let za odvzem vzorca in izpolnjevanje vprašalnika, 10 % gospodinjstev pa bodo testirali na način, da bodo vključili vse člane gospodinjstva, starejše od 2 let (Siegler et al., 2020). Izračuni moči raziskave kažejo, da bo reprezentativni vzorec 4.000 gospodinjstev omogočil istočasno oceno okuženosti in seroprevalence s sprejemljivo ozkim intervalom zaupanja, načrtujejo pa tudi povečano vzorčenje v 7 najgosteje naseljenih državah ZDA, s čimer bi predvidoma dobili podatke več kot 9.000 udeležencev iz skoraj 7.500 gospodinjstev (Siegler et al., 2020). Vključevanje udeležencev in zbiranje podatkov se je začelo julija 2020, rezultati raziskave pa zaenkrat še niso na voljo.

5. LITERATURA

Anderson RM, Vegvari C, Truscott J, Collyer BS. Challenges in creating herd immunity to SARS-CoV-2 infection by mass vaccination. *Lancet* 2020;396:1614-6.

Bajema KL, Wiegand MS, Cuffe K, et al. Estimated SARS-CoV-2 seroprevalence in the US as of September 2020. *JAMA Intern Med* 2020, v tisku.

Basu A, Zinger T, Inglima K, et al. Performance of Abbott ID NOW COVID-19 rapid nucleic acid amplification test in nasopharyngeal swabs transported in viral media and dry nasal swabs, in a New York City academic institution. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01136-20.

Beavis KG, Matushek SM, Abeleda APF, et al. Evaluation of the EUROIMMUN Anti-SARS-CoV-2 ELISA Assay for detection of IgA and IgG antibodies. *J Clin Virol* 2020;129:104468.

Bendavid E, Mulaney B, Sood N, et al. COVID-19 antibody seroprevalence in Santa Clara County, California. *medRxiv* 2020; published online April 30.

Beullens K, Matsuo H, Loosveldt G, Vandenplas C. Quality report for the European Social Survey. London: European Social Survey ERIC 2014.

Österreichische Bundesministerium. COVID-19 Studie. <https://www.bmbwf.gv.at/Themen/Forschung/Aktuelles/COVID-19-Studie.html> (Dostopano: 21. 05. 2020).

Bray RA, Lee JH, Brescia P, Kumar D, Nong T, Shih R, Woodle ES, Maltzman JS, Gebel HM. Development and validation of a multiplex, bead-based assay to detect antibodies directed against SARS-CoV-2 proteins. *Transplantation* 2020, v tisku.

Broder K, Babiker A, Myers C, et al. Test agreement between Roche Cobas 6800 and Cepheid GeneXpert Xpress SARS-CoV-2 assays at high cycle threshold ranges. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01187-20.

Cao S, Gan Y, Wang C, et al. Post-lockdown SARS-CoV-2 nucleic acid screening in nearly ten million residents of Wuhan, China. *Nat Commun* 2020;11:5917.

Callegaro M, Manfreda KL, Vehovar V. V: Web survey methodology, poglavje: Nonresponse. SAGE Publications. 2015.

Christensen AI, Ekholm O, Gray L, Glümer C, Juel K. What is wrong with non-respondents? Alcohol-, drug- and smoking-related mortality and morbidity in a 12-year follow-up study of respondents and non-respondents in the Danish Health and Morbidity Survey. Version 2. *Addiction* 2015;110:1505-12.

Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2000045.

Coste AT, Jatou K, Papadimitriou-Olivgeris M, Greub G, Croxatto A. Comparison of SARS-CoV-2 serological tests with different antigen targets. *J Clin Virol* 2020;134:104690.

Cradic K, Lockhart M, Ozbolt P, et al. Clinical evaluation and utilization of multiple molecular in vitro diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2. *Am J Clin Pathol* 2020;154:201-7.

Flanagin A, Fontanarosa PB, Bauchner H. Preprints involving medical research - Do the benefits outweigh the challenges? *JAMA* 2020;324:1840-3.

Galea S, Tracy M. Participation rates in epidemiologic studies. *Ann Epidemiol* 2007; 17:643-53.

Gill D, Ponsford MJ. Testing for antibodies to SARS-CoV-2: Not as simple as ABC. *Br Med J* 2020;371:m4288.

Gudbjartsson DF, Helgason A, Jonsson H, et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N Engl J Med* 2020;382:2302-15.

Gudbjartsson DF, Norddahl GL, Melsted P, et al. Humoral immune response to SARS-CoV-2 in Iceland. *N Engl J Med* 2020;383:1724-34.

Hallal PC, Hartwig FP, Horta BL, et al. SARS-CoV-2 antibody prevalence in Brazil: results from two successive nationwide serological household surveys. *Lancet Glob Health* 2020;8:e1390-8.

Hanson KE, Caliendo AM, Arias CA, et al. Infectious Diseases Society of America Guidelines on the Diagnosis of COVID-19: Serologic Testing. Clin Infect Dis 2020; v tisku.

Hicks SM, Pohl K, Neeman T, et al. A dual antigen ELISA allows the assessment of SARS-CoV-2 antibody seroprevalence in a low transmission setting. J Infect Dis 2020; v tisku.

Hippich M, Holthaus L, Assfalg R, et al. A public health antibody screening indicates a 6-fold higher SARS-CoV-2 exposure rate than reported cases in children. Med (N Y) 2020, v tisku.

Houlihan CF, Beale R. The complexities of SARS-CoV-2 serology. Lancet Infect Dis 2020;20:1350-1.

Ioannidis JPA. Infection fatality rate of COVID-19 inferred from seroprevalence data. Bull WHO 2020, v tisku.

Iwasaki A. What reinfections mean for COVID-19. Lancet Infect Dis 2020; v tisku.

Jääskeläinen AJ, Kekäläinen E, Kallio-Kokko H, et al. Evaluation of commercial and automated SARS-CoV-2 IgG and IgA ELISAs using coronavirus disease (COVID-19) patient samples. Euro Surveill 2020;25:2000603.

Jääskeläinen AJ, Kuivanen S, Kekäläinen E, et al. Performance of six SARS-CoV-2 immunoassays in comparison with microneutralisation. J Clin Virol 2020;129:104512.

Kalton G, Vehovar V. Vzorčenje v anketah. 2001. http://uploadi.mi.ris.org/editor/1416233475VEHOVAR_01.pdf (Dostopano: 30. 06. 2020).

Kohmer N, Westhaus S, Rühl C, Ciesek S, Rabenau HF. Clinical performance of different SARS-CoV-2 IgG antibody tests. J Med Virol 2020, v tisku.

Krumholz HM, Bloom T, Sever R, Rawlinson C, Inglis JR, Ross JS. Submissions and downloads of preprints in the first year of medRxiv. JAMA 2020, v tisku.

Krüttgen A, Cornelissen CG, Dreher M, Hornef M, Imöhl M, Kleines M. Comparison of four new commercial serologic assays for determination of SARS-CoV-2 IgG. *J Clin Virol* 2020;128:104394.

Lai CC, Wang JH, Hsueh PR. Population-based seroprevalence surveys of anti-SARS-CoV-2 antibody: An up-to-date review. *Int J Infect Dis* 2020;101:314-22.

Lisboa Bastos M, Tavaziva G, Abidi SK, et al. Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2020;370:m2516.

Long QX, Tang XJ, Shi QL, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med* 2020;26:1200-4.

Manthei DM, Whalen JF, Schroeder LF, et al. Differences in performance characteristics among four high-throughput assays for the detection of antibodies against SARS-CoV-2 using a common set of patient samples. *Am J Clin Pathol* 2020:aqaa200.

Maver Vodičar P, Oštrbenk Valenčak A, Zupan B, et al. Low prevalence of active COVID-19 in Slovenia: a nationwide population study of a probability-based sample. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1514-9.

Mekonnen D, Mengist HM, Derby A, et al. Diagnostic accuracy of serological tests and kinetics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antibody: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol* 2020, v tisku.

Muhrekar MV, Bhatnagan T, Selvaraju S, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in India: Findings from the national serosurvey, May-June 2020. *Indian J Med Res* 2020;152:48–60.

Menachemi N, Yiannoutsos CT, Dixon BE, et al. Population point prevalence of SARS-CoV-2 infection based on a statewide random sample - Indiana, April 25-29, 2020. *Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69:960-4.

Meyerowitz-Katz G, Merone L. A systematic review and meta-analysis of published research data on COVID-19 infection fatality rates. *Int J Infect Dis* 2020;101:138-48.

Mindell JS, Giampaoli S, Goesswald A, et al. Sample selection, recruitment and participation rates in health examination surveys in Europe-experience from seven national surveys. *BMC Med Res Methodol* 2015;15:78.

Montesinos I, Gruson D, Kabamba B, et al. Evaluation of two automated and three rapid lateral flow immunoassays for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies. *J Clin Virol* 2020;128:104413.

Moran A, Beavis KG, Matushek SM, et al. The detection of SARS-CoV-2 using the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 and Roche cobas SARS-CoV-2 assays. *J Clin Microbiol.* 2020;58:e00772-20.

Murhekar MV, Bhatnagar T, Selvaraju S, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in India: Findings from the national serosurvey, May-June 2020. *Indian J Med Res* 2020;152:48-60.

National Institute for Public Health and the Environment, Netherlands. The PIENTER Corona study. 2020. <https://scimremreren.tk/en/pienter-corona-study> (Dostopano: 30. 06. 2020).

National SARS-CoV-2 Serology Assay Evaluation Group. Performance characteristics of five immunoassays for SARS-CoV-2: a head-to-head benchmark comparison. *Lancet Infect Dis* 2020;20:1390-1400.

Ng KW, Faulkner N, Cornish GH, et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans. *Science* 2020:eabe1107.

Nicol T, Lefeuvre C, Serri O, et al. Assessment of SARS-CoV-2 serological tests for the diagnosis of COVID-19 through the evaluation of three immunoassays: two automated immunoassays (Euroimmun and Abbott) and one rapid lateral flow immunoassay (NG Biotech). *J Clin Virol* 2020;129:104511.

Okba NMA, Müller MA, Li W, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-Specific antibody responses in coronavirus disease patients. *Emerg Infect Dis* 2020;26:1478-88.

Petersen MS, Strøm M, Christiansen DH, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-specific antibodies, Faroe Islands. *Emerg Infect Dis* 2020;26:2761-3.

Poljak M, Korva M, Knap Gašper N, et al. Clinical evaluation of the cobas SARS-CoV-2 test and a diagnostic platform switch during 48 hours in the midst of the COVID-19 pandemic. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00599-20.

Pollán M, Pérez-Gómez B, Pastor-Barriuso R, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 in Spain (ENE-COVID): a nationwide, population-based seroepidemiological study. *Lancet* 2020;396:535-44.

Post J, Class F, Kohler U. Unit nonresponse biases in estimates of SARS-CoV-2 prevalence. *Survey Research Methods* 2020;14:115–21.

Pujadas E, Ibeh N, Hernandez MM, et al. Comparison of SARS-CoV-2 detection from nasopharyngeal swab samples by the Roche cobas 6800 SARS-CoV-2 test and a laboratory-developed real-time RT-PCR test. *J Med Virol* 2020;92:1695-8.

Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M, et al. Orthogonal SARS-CoV-2 serological assays enable surveillance of low-prevalence communities and reveal durable humoral immunity. *Immunity* 2020;53:925-33

Robbiani DF, Gaebler C, Muecksch F, et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* 2020;584:437-42.

Rostami A, Sepidarkish M, Leeflang MMG, et al. SARS-CoV-2 seroprevalence worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2020; v tisku.

Sakshaug JW, Couper MP, Ofstedal MB. Characteristics of physical measurement consent in a population-based survey of older adults. *Med Care* 2010;48:64-71.

Self WH, Tenforde MW, Stubblefield WB, et al. Decline in SARS-CoV-2 antibodies after mild infection among frontline health care personnel in a multistate hospital network - 12 States, April-August 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69:1762-6.

Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell* 2020;183:158-68.

Siegler AJ, Sullivan PS, Sanchez T, et al. Protocol for a national probability survey using home specimen collection methods to assess prevalence and incidence of SARS-CoV-2 infection and antibody response. *Ann Epidemiol* 2020;49:50–60.

Schaurer I, Weiß B. Investigating selection bias of online surveys on coronavirus-related behavioral outcomes. *Survey Research Methods* 2020;14:103–8.

Seow J, Graham C, Merrick B, et al. Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nat Microbiol* 2020;5:1598-607.

Snoeck CJ, Vaillant M, Abdelrahman T, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in the Luxembourgish population – the CON-VINCE study. *medRxiv* 2020; published online May 18.

Sood N, Simon P, Ebner P, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-specific antibodies among adults in Los Angeles County, California, on April 10–11, 2020. *JAMA* 2020;323:2425-7.

SORA Institute for Social Research and Consulting, Austria. Spread of SARS-CoV-2 in Austria. April 30, 2020. https://www.sora.at/fileadmin/downloads/projekte/Austria_Spread_of_SARS-CoV-2_Study_Report.pdf (Dostopano: 30. 06. 2020).

SORA. Studienberichte zur 1. SARS-CoV-2. April 30, 2020. <https://www.sora.at/nc/news-presse/news/news-einzelansicht/news/covid-19-praevalenz-1006.html> (Dostopano: 21. 05. 2020).

Spellberg B, Nielsen TB, Casadevall A. Antibodies, immunity, and COVID-19. *JAMA Intern Med* 2020, v tisku.

Stan Development Team. RStan: the R interface to Stan. R package version 2.19.1, 2019. <http://mc-stan.org> (Dostopano: 21. 05. 2020).

Statistični urad Republike Slovenije. Metodološka navodila za popis raziskovalno-razvojne dejavnosti v poslovnem sektorju. Avgust 12, 2019. <https://www.stat.si/StatWeb/File/DocSysFile/8357> (Dostopano: 30. 03. 2020).

Statistični urad Republike Slovenije. Metodološka navodila za popis raziskovalno-razvojnne dejavnosti v poslovnem sektorju. 2012. https://www.stat.si/doc/pub/MG-1-12%20R_RD_PS.pdf (Dostopano: 30. 06. 2020).

Statistični urad Republike Slovenije. Smernice za zagotavljanje kakovosti, 2. Izdaja. 2017. https://www.stat.si/dokument/9532/smernice_za_zagotavljanje_kakovosti.pdf (Dostopano: 30. 06. 2020).

Statistik Austria. COVID-19 Prävalenzstudie: maximal 0,15% der Bevölkerung in Österreich mit SARS-CoV-2 infiziert. Maj 4, 2020. http://www.statistik.at/web_de/presse/123051.html (Dostopano 21. 05. 2020).

Stringhini S, Wisniak A, Piumatti G, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *Lancet* 2020;396:313-9.

Studie kolektivní imunity SARS-CoV-2-CZ-Preval. Maj 6, 2020. <https://covid-imunita.uzis.cz/> (Dostopano: 21. 05. 2020).

Tang MS, Hock KG, Logsdon NM, et al. Clinical performance of two SARS-CoV-2 serologic assays. *Clin Chem* 2020:hvaa120.

The American Association for Public Opinion Research (AAPOR). Standard definitions: final dispositions of case codes and outcome rates for surveys, 9th edition. 2016. [https://www.aapor.org/Standards-Ethics/Standard-Definitions-\(1\).aspx](https://www.aapor.org/Standards-Ethics/Standard-Definitions-(1).aspx) (Dostopano: 30. 06. 2020).

Theel ES, Haring J, Hilgart H, Granger D. Performance characteristics of four high-throughput immunoassays for detection of IgG antibodies against SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* 2020;58:e01243-20.

Tré-Hardy M, Wilmet A, Beukinga I, Dogné JM, Douxfils J, Blairon L. Validation of a chemiluminescent assay for specific SARS-CoV-2 antibody. *Clin Chem Lab Med* 2020;58:1357-64.

Tuailleon E, Bolloré K, Pisoni A, et al. Detection of SARS-CoV-2 antibodies using commercial assays and seroconversion patterns in hospitalized patients. *J Infect* 2020;81:e39-e45.

Van Elslande J, Houben E, Depypere M, et al. Diagnostic performance of seven rapid IgG/IgM antibody tests and the Euroimmun IgA/IgG ELISA in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1082-7.

Van Elslande J, Decru B, Jonckheere S, et al. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. *Clin Microbiol Infect* 2020;26:1557.e1-7. Vehovar V, Beullens K. Cross-national issues in response rates. V: *The Palgrave handbook of survey research*. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?lang=eng&id=116191>. Cham, str. 29–42 (Dostopano: 30. 06. 2020).

Vehovar V, Toepoel V, Steinmetz S. "Non-probability Sampling." *The SAGE Handbook of Survey Methodology*. Wolf C, Joye D and W. Smith T. SAGE Publications Ltd, 2016. 329-345. (Dostopano: 30. 06. 2020).

Weisberg SP, Connors TJ, Zhu Y, et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nat Immunol* 2020, v tisku.

WHO. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 virus infection. Marec 17, 2020. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331656/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.1-eng.pdf> (Dostopano: 21. 05. 2020).

Zilla M, Wheeler BJ, Keetch C, et al. Variable performance in 6 commercial SARS-CoV-2 antibody assays may affect convalescent plasma and seroprevalence screening. *Am J Clin Pathol* 2020:aqaa228.

SEZNAM SODELUJOČIH RAZISKOVALCEV

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Naloge: Zasnova in vodenje raziskave, koordinacija raziskave, neposredna komunikacija z udeleženci raziskave, delo na terenu (zbiranje vzorcev in vprašalnikov), laboratorijsko testiranje vzorcev, analiza rezultatov testiranja.

prof. dr. Mario Poljak, vodja raziskave, odgovorni raziskovalec

prof. dr. Miroslav Petrovec, vodja skupine

akad. prof. dr. Tatjana Avšič - Županc, vodja laboratorijskega testiranja

doc. dr. Polona Maver Vodičar, koordinator raziskave

znan. sod. dr. Anja Oštrbenk Valenčak, koordinator raziskave

znan. sod. dr. Miša Korva, koordinator laboratorijskega testiranja

znan. sod. dr. Nataša Knap, koordinator laboratorijskega testiranja

Poleg zgoraj navedenih odgovornih oseb je pri izvajanju raziskave sodelovalo več kot 130 zaposlenih na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo MF UL, bodisi neposredno (izvajanje laboratorijskega testiranja, telefonska in elektronska komunikacija z udeleženci raziskave, terenska koordinacija obiskov in odvzemov, priprava materialov za raziskavo, priprava in izdajanje izvidov) bodisi posredno (prevzem vsakodnevnih diagnostičnih obveznosti tistih, ki neposredno sodelujejo v raziskavi).

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko

Naloge: Informacijska podpora, razvoj baze podatkov, spletne rešitve, podatkovna analitika.

prof. dr. Blaž Zupan, vodja skupine, podatkovna analitika

Rafael Frančišek Irgolič, vodja razvoja aplikacije

dr. Matjaž Pančur, strežniške tehnologije, varnost

Jaka Kokošar, baza podatkov, backend razvoj

Robert Cvitkovič, baza podatkov, backend razvoj

Gregor Krmelj, strežniške tehnologije, varnost

Nejc Debevec, uporabniški vmesniki

Andreja Kovačič, testiranje, GDPR, obdelava obrazcev

Nejc Hirci, razvoj spletne strani

doc. dr. Tomaž Hočevar, obdelava obrazcev

prof. dr. Janez Demšar, podatkovna analitika

prof. dr. Erik Štrumbelj, podatkovna analitika

dr. Andrej Čopar, strežniške tehnologije

Ajda Pretnar, dokumentacija, spletne strani

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za družbene vede

Naloga: Metodološko svetovanje.

viš. znan. sod. dr. Slavko Kurdija, metodološko svetovanje, predlog vzorčnega načrta

prof. dr. Vasja Vehovar, analiza vzorca in predlog za uteženje

dr. May Doušak, svetovanje za informacijsko podporo

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Naloga: Spremljanje in periodično kontaktiranje preiskovancev v longitudinalni fazi nacionalne raziskave

Sara Ručigaj

Joanna Prusnik

Andrej Lipužič

Tanja Adamlje

Tjaša Pugelj

Manca Bregar

Boris Podobnik

Katja Strouhal

Gjoko Markoski

Rok Gerbec

Veronika Pučnik

Martin Janakjiev

Ana Benedik

ZAHVALA

Najprej bi se radi zahvalili vsem udeležencem Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji, ki so sprejeli vabilo in prostovoljno sodelovali v raziskavi. Iskreno se jim zahvaljujemo za tvorno sodelovanje, odgovarjanje na naše klice ter posredovanje informacij o njihovem zdravstvenem stanju in zdravstvenem stanju njihovih bližnjih v celotnem obdobju trajanja nacionalne raziskave. Zelo cenimo njihovo vztrajanje do zaključka raziskave.

Izvedba raziskave ne bi bila mogoča brez predanega dela mnogih ljudi: sodelavcev, ki so navezovali prvi stik z udeleženci preiskave po potrditvi sodelovanja in so načrtovali vse poti terenskih ekip za odvzem kliničnih vzorcev (Mateja Škamperle, Tina Triglav, Barbara Šoba Šparl, Tjaša Cerar Kišek, Sabina Islamović, Anja Šterbenc, Mateja Pirš, Miša Pavletič, Karin Kregar, Ivana Velimirović, Maja Lunar, Jana Mlakar, Grega Gimpelj Domjanič, Anja Erbežnik, Katarina Ogrin); sodelavcev, ki so bili koordinatorji odvzema vzorcev na terenu (Mateja Pirš, Anja Šterbenc, Lara Hudej, Grega Gimpelj Domjanič, Mitja Gajski, Tadej Pliberšek, Petra Hrvat, Jasmina Livk, Petra Čamernik, Nataša Krošelj, Tanja Kozinc, Polona Pretnar, Danijela Petrović, Maja Accetto Kos, Katka Pohar, Jana Boben, Rok Tomazin, Veronika Pavlič, Aljoša Obreza, Anja Erbežnik, Katarina Ogrin); celotne diagnostične ekipe (Mateja Jelovšek, Robert Krošelj, Blanka Kušar, Katarina Resman Rus, Katja Strašek Smrdel, Maja Lunar, Marko Kolenc, Martin Sagadin, Monika Jevšnik Virant, Nina Žigon, Petra Markočič, Rok Kogoj, Tina Uršič, Urška Glinšek Biškup, Maja Accetto Kos, Tina Štamol, Lara Hudej); pregledovalcev anonimiziranih vprašalnikov (Lea Korva, Sabina Islamović, Jasmina Zlotrg) in prostovoljk, ki sta pomagali pri administrativnem delu raziskave (Kaja Kotnik in Larissa Slodej) .

Zahvala gre vsem zaposlenim na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, zdravstvenim delavcem Reševalne službe Pacient d.o.o. in zaposlenim v klicnem centru Episcenter.

Zahvaljujemo se tudi Statističnemu uradu Republike Slovenije za njihovo pomoč pri oblikovanju verjetnostnega vzorca preiskovancev.

Zahvaljujemo se tudi prostovoljnim gasilskim društvom (PGD) in drugim organizacijam po celi Sloveniji, ki so nam v svojih prostorih omogočili izvedbo zadnjega dela druge faze raziskave: PGD Vrhnika, PGD Domžale, PGD Grosuplje, PGD Škofljica, PGD

Kamnik, PGD Preska-Medvode, PGD Kranj Britof, PGD Radovljica, GZ Škofja Loka, PGD Blejska Dobrava, PGD Nova Gorica, KS Ajdovščina, PGD Hrvatini, PGD Lokev, PGD Stari trg pri Ložu, PGD Pivka, Dom na Vidmu, PGD Novo mesto – Šmihel, PGD Mirna, PGD Kočevje, PGD Črnomelj, PGD Trbovlje, KS Izlake, PGD Litija, PGD Laško, PGD Brežice, PGD Sevnica, PGD Krško, PGD Celje Gabrje, PGD Slovenske Konjice, PGD Slivnica pri Celju, PGD Polzela, PGD Steklarna Rogaška Slatina, PGD Velenje, PGD Slovenj Gradec, PGD Ravne na Koroškem, PGD Malečnik Maribor, PGD Hajdina, PGD Šentilj v Slovenskih Goricah, PGD Zgornja Bistrica, PGD Lenart v Slovenskih Goricah, PGD Ruše, PGD Ormož, PGD Murska Sobota, PGD Lendava in PGD Gornja Radgona.

Izvajanje nacionalne raziskave sta finančno omogočila Vlada Republike Slovenije (sklep 16600-2/2020/7 z dne 21. 05. 2020) in Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo UL MF.

PRILOGA 1

Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
Zaloška 4, 1000 Ljubljana

NALEPITI ŠIFRO
PREISKOVANCA

NACIONALNA RAZISKAVA O RAZŠIRJENOSTI BOLEZNI COVID-19 V SLOVENIJI

Anonimni vprašalnik

Prosimo vas, da pozorno preberete vprašanja in nanje odgovorite tako, da označite kvadrato pred odgovorom, ki velja za vas, oziroma vpišete odgovor. Na posamezno vprašanje je možno odgovoriti z več ponujenimi odgovori. Ko boste vprašalnik izpolnili, ga vložite v priloženo ovojnico in jo zalepite. Vaši odgovori bodo anonimni.

Današnji datum: _____

ZDRAVSTVENO STANJE

1. Ali ste opazili/občutili katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov:

	v zadnjih 2 tednih	v zadnjih 2 mesecih
Vročina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mrzlica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v mišicah	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izcedek iz nosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečina v prsnem košu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izguba voaha/okusa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Slabost ali bruhanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v trebuhu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Drugo (prosim navedite):		

2. Ali ste zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov poiskali zdravniško pomoč? DA NE

3. Ali ste bili zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov hospitalizirani? DA NE

DEMOGRAFSKI PODATKI IN PODATKI O TESNIH STIKIH Z DRUGIMI OSEBAMI

1. Ali živite sami? DA NE

2. Če ne, koliko ljudi živi v skupnem gospodinjstvu poleg vas? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je mlajših od 12 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 12 in 17 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starih med 18 in 70 let? _____
 Koliko ljudi v skupnem gospodinjstvu je starejših od 70 let? _____

3. Ste bili pred razglasitvijo epidemije zaposleni – označite spodaj:

- zaposlen za polni delovni čas
- zaposlen za skrajšan delovni čas
- samozaposlen
- honorarno zaposlen
- nezaposlen

4. Označite, v kateri sektor spada vaš delodajalec:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> zdravstvo in socialno varstvo | <input type="checkbox"/> transport |
| <input type="checkbox"/> kmetijstvo ali gozdarstvo | <input type="checkbox"/> gospodarstvo |
| <input type="checkbox"/> kultura in umetnost | <input type="checkbox"/> trgovina |
| <input type="checkbox"/> nepremičnine | <input type="checkbox"/> izobraževanje |
| <input type="checkbox"/> oskrba z elektriko, vodo, plinom | <input type="checkbox"/> turizem ali hotelirstvo |
| <input type="checkbox"/> tehnična popravila, gospodinjska dela | <input type="checkbox"/> gradbeništvo |
| <input type="checkbox"/> zasebne storitve | <input type="checkbox"/> javna uprava |
| <input type="checkbox"/> industrija | <input type="checkbox"/> finančni sektor |
| <input type="checkbox"/> drugo | |

5. V kakšni obliki poteka vaše delo med epidemijo, če ste zaposleni in delovno aktivni?

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> hodim v službo | <input type="checkbox"/> delam od doma |
| <input type="checkbox"/> sem na čakanju | <input type="checkbox"/> varstvo otroka |
| <input type="checkbox"/> drugo | |

6. Če hodite v službo, ali ste na delovnem mestu obkroženi z drugimi ljudmi? DA NE

7. Če hodite v službo in imate predšolske otroke/otroke do 12. leta starosti, kako je organizirano njihovo varstvo?

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> doma, samo z ljudmi v skupnem gospodinjstvu | <input type="checkbox"/> doma, skupaj z otroki iz drugih gospodinjstev |
| <input type="checkbox"/> s pomočjo babic ali dedkov | <input type="checkbox"/> s pomočjo tet ali stricev |
| <input type="checkbox"/> s pomočjo prijateljev in znancev | <input type="checkbox"/> z občinsko pomočjo |
| <input type="checkbox"/> s pomočjo vrtcev in šol | <input type="checkbox"/> drugo |

8. Ali je kdo od ljudi v skupnem gospodinjstvu v zadnjih dveh mesecih opazil/občutil katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov:

	otroci do 12 let	osebe med 12-17 let	osebe med 18-70 let	osebe starejše od 70 let
Vročina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v mišicah (mialgija)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

9. Ali lahko ocenite s koliko ljudmi, ki ne živijo z vami v skupnem gospodinjstvu, ste bili v tesnem/neposrednem stiku v **zadnjih 2 tednih**?

- 0 1-2 3-6 7-15 16-30 31-60 več kot 60

10. Ali ste bili v **zadnjih 2 mesecih** v tesnem/neposrednem stiku s kom, ki je bil dokazano pozitiven na SARS-CoV-2?

- DA NE

11. Ali ste bili v **zadnjih 2 tednih** v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE

12. Ali ste bili v **zadnjih 2 mesecih** v kateri od zdravstvenih ustanov v Sloveniji? DA NE

13. Kako težko vam je dosledno spoštovati vse ukrepe, ki naj bi zajezili širjenje koronavirusa? (1 – zelo težko, 5 – zelo lahko)?

1 2 3 4 5 ne vem

Najlepša hvala za sodelovanje!

NACIONALNA RAZISKAVA O RAZŠIRJENOSTI BOLEZNI COVID-19 V SLOVENIJI

Spoštovani/Spoštovana,

pandemija bolezni COVID-19 oziroma njenega povzročitelja virusa SARS-CoV-2 predstavlja največji izziv za celotno človeštvo v zadnjih desetletjih. Spremljajo jo negotovost in številne neznanke glede značilnosti virusa in njegove sposobnosti širjenja med ljudmi.

V Sloveniji smo z veliko discipline, sodelovanja in solidarnosti vseh prebivalcev – za kar se vam tudi ob tej priložnosti zahvaljujemo – uspeli preprečiti najhujši scenarij, skupaj nam uspeva obvladovati epidemijo in s tem ščititi vse naše bližnje, ki spadajo v najranljivejše skupine.

Ustrezne odločitve o tem, kdaj je primeren čas za rahljanje ukrepov, ki so bili uvedeni z namenom omejevanja epidemije, lahko najbolje sprejemamo na podlagi realnih podatkov. Zato smo v sodelovanju z Vlado Republike Slovenije pripravili Nacionalno raziskavo o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji.

Bili ste izbrani v naključni vzorec 3000 prebivalcev Slovenije, ki smo jih zaprosili za sodelovanje v raziskavi. Izjemno hvaležni bomo, če se boste odzvali našemu povabilu, saj je kakovost zbranih podatkov odvisna prav od vsakega posameznika, ki je pripravljen sodelovati. Vse podrobnosti o raziskavi si lahko preberete v **POJASNILU O RAZISKAVI**.

Če ste pripravljeni sodelovati v raziskavi, vas prosimo, da nam svoje sodelovanje potrdite na elektronski naslov korona@imi.si ali pokličete na telefonsko številko 080 3008 od 20. 4. do 24. 4. 2020 med 8.00 in 20.00 uro.

Po vašem pristanku na sodelovanje v raziskavi vas bodo poklicali naši sodelavci in vam sporočili dan in uro, ko vas bo na domu obiskal ustrezno usposobljen zdravstveni delavec, ki vam bo odvzel bris zgornjih dihal (za ugotavljanje morebitne aktivne okužbe s SARS-CoV-2) in vzorec krvi (za ugotavljanje, če ste bolezen COVID-19 morda že preboleli). Za namene raziskave vas prosimo tudi, da izpolnite kratek vprašalnik, ki je priložen temu dopisu.

Za vaše sodelovanje se vam že vnaprej najlepše zahvaljujemo. Samo z vašo pomočjo nam bo uspelo čim prej narediti prve korake k vrnitvi v normalno življenje.

Hvala in ostanite zdravi!

Odgovorni raziskovalec
prof. dr. Mario Poljak, dr. med.



Predstojnik Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo
izr. prof. dr. Miroslav Petrovec, dr. med.



IZJAVA O ZAVESTNI IN SVOBODNI PRIVOLITVI ZA SODELOVANJE V RAZISKAVI

Spodaj podpisani/a (ime in priimek-tiskano): _____, rojen/a _____ izjavljam, da sem bil/a pisno in ustno seznanjen/a s potekom, namenom in cilji »Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji«, da sem podrobno prebral/a »Pojasnilo o raziskavi«, oziroma mi je bila razlaga podana ustno in da sem dobil/a odgovore na vsa moja vprašanja v zvezi z raziskavo oz. vem, da lahko kadar koli zaprosim za dodatne informacije in jih tudi dobim.

Vem, kako bo poskrbljeno za mojo varnost in se zavedam, da je sodelovanje v raziskavi prostovoljno in da lahko v vseh fazah raziskave sodelovanje prekinem brez pojasnila in posledic za mojo nadaljnjo zdravstveno obravnavo.

Razumem, da bodo vsi podatki, ki bodo zbrani v raziskavi, popolnoma zaupni in dovoljujem, da se moji demografski in zdravstveni podatki uporabijo v anonimizirani obliki za analizo in objavo v znanstveno-raziskovalne namene. Dovoljujem, da se morebitni ostanki kliničnih vzorcev, ki so mi bili odvzeti med raziskavo, uporabljajo tudi v nadaljnjih raziskavah, vendar izključno v raziskovalne namene.

S podpisom prostovoljno pristajam na sodelovanje v naslednjih delih raziskave:

Izpolnitev vprašalnika	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Odvzem brisa zgornjih dihal	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Odvzem vzorca krvi	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Uporabo mojih kontaktnih podatkov v prihodnosti koordinatorju raziskave (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, MF UL) za namene te raziskave	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne

Podpis (sodelujoči):

Ime, priimek in poklic raziskovalca – tiskano:

Podpis raziskovalca:

**IZJAVA O ZAVESTNI IN SVOBODNI PRIVOLITVI STARŠA OZIROMA SKRBNIKA ZA SODELOVANJE V
RAZISKAVI**

Spodaj podpisani starš/roditelj oziroma skrbnik (ime in priimek starša/roditelja oz. skrbnika – tiskano):
_____, rojen/a _____

izjavljam, da sem bil/a pisno in ustno seznanjen/a s potekom, namenom in cilji »Nacionalne raziskave o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji«, da sem podrobno prebral/a »Pojasnilo o raziskavi«, oziroma mi je bila razlaga podana ustno in da sem dobil/a odgovore na vsa moja vprašanja v zvezi z raziskavo oz. vem, da lahko kadar koli zaprosim za dodatne informacije in jih tudi dobim.

Vem, kako bo poskrbljeno za varnost mojega otroka oz. varovanca in se zavedam, da je sodelovanje v raziskavi prostovoljno in da lahko v vseh fazah raziskave sodelovanje prekinem brez pojasnila in posledic za nadaljnjo zdravstveno obravnavo mojega otroka oz. varovanca.

Razumem, da bodo vsi podatki, ki bodo zbrani v raziskavi, popolnoma zaupni in dovoljujem, da se demografski in zdravstveni podatki mojega otroka oz. varovanca uporabijo v anonimizirani obliki za analizo in objavo v znanstveno-raziskovalne namene. Dovoljujem, da se morebitni ostanki kliničnih vzorcev, ki so mu bili odvzeti med raziskavo, uporabljajo tudi v nadaljnjih raziskavah, vendar izključno v raziskovalne namene.

S podpisom prostovoljno pristajam na sodelovanje mojega otroka oz. varovanca (ime in priimek preiskovanca): _____, rojene/ga _____
v naslednjih delih raziskave:

Izpolnitev vprašalnika	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Odvzem brisa zgornjih dihal	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Odvzem vzorca krvi	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne
Uporabo mojih kontaktnih podatkov v prihodnosti koordinatorju raziskave (Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, MF UL) za namene te raziskave	<input type="checkbox"/> Da <input type="checkbox"/> Ne

Datum:

Datum:

Podpis (starš/roditelj oziroma skrbnik):

Ime, priimek in poklic raziskovalca – tiskano:

Podpis raziskovalca:

POJASNILO O RAZISKAVI

Spoštovani,

vabljeni ste k sodelovanju v Nacionalni raziskavi o razširjenosti bolezni COVID-19 v Sloveniji. Raziskava je izjemnega pomena za vse prebivalce Slovenije, saj bodo njeni rezultati pomagali pri odločanju o rahljanju ukrepov, ki so bili uvedeni z namenom omejevanja epidemije okužb s SARS-CoV-2.

Namen nacionalne raziskave je, da na naključnem vzorcu prebivalcev Slovenije ugotovimo, kakšna je dejanska razširjenost okužb z virusom SARS-CoV-2 v Sloveniji: koliko ljudi v Sloveniji je v tem trenutku aktivno okuženih, pa morda tega niti ne vedo, in koliko ljudi je do zdaj že prišlo v stik z virusom SARS-CoV-2 in prebolelo bolezen COVID-19.

UDELEŽBA JE PROSTOVOLJNA

Sodelovanje v raziskavi je prostovoljno in ga lahko prekinete v vseh fazah brez pojasnila in posledic za vašo nadaljnjo zdravstveno obravnavo.

POTEK RAZISKAVE

Raziskava bo potekala v dveh fazah.

Prva faza:

Izbrani ste bili v naključni vzorec 3000 prebivalcev Slovenije, ki smo jih zaprosili za sodelovanje v raziskavi. Če se boste z raziskavo strinjali in potrdili svoje sodelovanje, vas bo na domu obiskal ustrezno usposobljen zdravstveni delavec, ki vam bo odvzel bris zgornjih dihal (za ugotavljanje morebitne aktivne okužbe z virusom SARS-CoV-2) in vzorec krvi (za ugotavljanje že prebolele bolezni COVID-19). Hkrati vas bomo prosili, da zdravstvenemu delavcu oddate izpolnjen priloženi vprašalnik.

Druga faza:

Ta del preiskave bo potekal naslednjih 6 mesecev. Vsakih 14 dni vas bomo po telefonu poklicali in vas povprašali o vašem zdravju in počutju. Če boste povedali, da imate katerega od simptomov in znakov okužbe dihal, bomo ponovno organizirali odvzem brisa zgornjih dihal in odvzem krvi.

Po 6 mesecih vam bomo ponovno odvzeli kri in preverili, ali ste v tem obdobju prišli v stik z virusom SARS-CoV-2, ne glede na to, če ste kadarkoli imeli okužbo dihal ali ne.

REZULTATI TESTIRANJA

Za vse rezultate testiranja na virus SARS-CoV-2 boste prejeli uradni izvid, ki ga bo bomo izdali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo in vam ga poslali po pošti, skupaj z razlago rezultatov.

Če bomo pri vas odkrili aktivno okužbo z virusom SARS-CoV-2, bomo nemudoma obvestili tudi ustrezno epidemiološko službo, ki vas bo poklicala in ustrezno obravnavala.

Prednosti in slabosti sodelovanja v raziskavi

Prednost sodelovanja v raziskavi je, da boste v vsakem trenutku imeli takojšnji dostop do testiranja na okužbo s SARS-CoV-2, svetovanja in zdravniške obravnave, če se bodo v času trajanja raziskave pri vas pojavili simptomi in znaki okužbe dihal. Poleg tega boste ob zaključku raziskave na podlagi testiranja vašega vzorca krvi zagotovo vedeli, ali ste v času epidemije prišli v stik z virusom SARS-CoV-2 ali ne.

Slabost sodelovanja v raziskavi je le to, da je odvzem brisa zgornjih dihal lahko neprijeten, vendar je postopek za zdravje nenevaren. Pri odvzemu krvi lahko pri zelo majhnem deležu ljudi pride do omedlevice (t. i. vazovagalne sinkope), vendar bodo odvzem krvi izvajali izkušeni zdravstveni delavci, ki so sposobni pravilno odreagirati na vse predvidene in nepredvidene morebitne neželene reakcije.

Varstvo vaših osebnih podatkov

Ob vstopu v raziskavo vam bo dodeljena posebna, neponovljiva šifra, s katero bo označen tudi vprašalnik, ki ga boste izpolnili. Vsi podatki, ki bodo zbrani v namen te raziskave, bodo dostopni le raziskovalcem, ki sodelujejo v raziskavi.

S podpisom izjave o zavestni in svobodni privolitvi boste dovolili analizo in objavo podatkov, ki bodo zbrani v raziskavi, vendar ti ne bodo vsebovali nobenih informacij o vaši identiteti.

Objava rezultatov

O rezultatih testiranja vaših vzorcev vas bomo obvestili na način, kot je opisano zgoraj.

Ker gre za raziskavo nacionalnega pomena, bodo skupni rezultati raziskave objavljeni tako v sredstvih množičnega obveščanja za informiranje širše javnosti, kot tudi v znanstveni literaturi, s čimer bomo doprinesli k boljšemu razumevanju širjenja okužb z virusom SARS-COV-2 in ustreznih ukrepov za omejevanje epidemije.

Pravica, da zavrnete ali prekinete sodelovanje v raziskavi

Kot je bilo omenjeno že zgoraj, imate vso pravico, da kadarkoli zavrnete sodelovanje v tej raziskavi. Sodelovanje v raziskavi je prostovoljno in vaša odločitev bomo spoštovali.

KONTAKT VODJE RAZISKAVE

Če vas v zvezi z raziskavo in vašim sodelovanjem zanima še kaj ali opazite hujše poslabšanje simptomov, se obrnite na vodjo raziskave prof. dr. Maria Poljaka, dr. med., kadarkoli prek spletne pošte mario.poljak@mf.uni-lj.si ali na telefonsko številko 031 666 915 vsak delavnik med 8:00 in 15:00.

NACIONALNA RAZISKAVA O RAZŠIRJENOSTI BOLEZNI COVID-19 V SLOVENIJI
SPREMLJANJE PREISKOVANCEV

ŠIFRA PREISKOVANCA: _____
 DATUM KONTAKTIRANJA: _____
 ZAPOREDNA ŠTEVILKA KONTAKTIRANJA: _____
 TELEFONSKI KLIC OPRAVIL: _____

ZDRAVSTVENO STANJE

1. Ali ste **V ZADNIH DVEH TEDNIH** opazili/občutili katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov:

	DA	NE
Vročina	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mrzlica	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v mišicah	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Boleče žrelo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kašelj	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izcedek iz nosa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Občutek oteženega dihanja	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečina v prsnem košu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Izguba voha/okusa	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Glavobol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Slabost ali bruhanje	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bolečine v trebuhu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Driska (tekoče odvajanje blata večkrat dnevno)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Drugo (prosim navedite):		

2. Ali ste zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov poiskali zdravniško pomoč? DA NE

3. Ali ste bili zaradi katerega od navedenih simptomov ali znakov hospitalizirani? DA NE

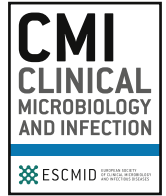
4. Ali je kdo od ljudi v skupnem gospodinjstvu **V ZADNIH DVEH TEDNIH** opazili/občutili katerega izmed naslednjih kliničnih znakov ali simptomov: DA NE

OPOMBE:



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Low prevalence of active COVID-19 in Slovenia: a nationwide population study of a probability-based sample

P. Maver Vodičar^{1,†}, A. Oštrbenk Valenčak^{1,†}, B. Zupan², T. Avšič Županc¹, S. Kurdija³,
M. Korva¹, M. Petrovec¹, J. Demšar², N. Knap¹, E. Štrumbelj², V. Vehovar³, M. Poljak^{1,*}

¹ Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

² Faculty of Computer and Information Science, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

³ Faculty of Social Sciences, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 June 2020

Received in revised form

8 July 2020

Accepted 10 July 2020

Available online 18 July 2020

Editor: L. Leibovici

Keywords:

COVID-19

PCR

Prevalence

Probability-based sample

SARS-CoV-2

Serology

ABSTRACT

Objectives: Accurate population-level assessment of the coronavirus disease 2019 (COVID-19) burden is fundamental for navigating the path forward during the ongoing pandemic, but current knowledge is scant. We conducted the first nationwide population study using a probability-based sample to assess active severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, combined with a longitudinal follow-up of the entire cohort over the next 6 months. Baseline SARS-CoV-2 RNA testing results and the first 3-week follow-up results are presented.

Methods: A probability-based sample of the Slovenian population comprising data from 2.1 million people was selected from the Central Population Register ($n = 3000$). SARS-CoV-2 RNA was detected in nasopharyngeal samples using the cobas 6800 SARS-CoV-2 assay. Each participant filled in a detailed baseline questionnaire with basic sociodemographic data and detailed medical history compatible with COVID-19. After 3 weeks, participants were interviewed for the presence of COVID-19-compatible clinical symptoms and signs, including in household members, and offered immediate testing for SARS-CoV-2 RNA if indicated.

Results: A total of 1368 individuals (46%) consented to participate and completed the questionnaire. Two of 1366 participants tested positive for SARS-CoV-2 RNA (prevalence 0.15%; posterior mean 0.18%, 95% Bayesian confidence interval 0.03–0.47; 95% highest density region (HDR) 0.01–0.41). No newly diagnosed infections occurred in the cohort during the first 3-week follow-up round.

Conclusions: The low prevalence of active COVID-19 infections found in this study accurately predicted the dynamics of the epidemic in Slovenia over the subsequent month. Properly designed and timely executed studies using probability-based samples combined with routine target-testing figures provide reliable data that can be used to make informed decisions on relaxing or strengthening disease mitigation strategies. **P. Maver Vodičar, Clin Microbiol Infect 2020;26:1514**

© 2020 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The World Health Organization (WHO) announced a coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) on 11 March

2020 after rapid global spread of the disease. Starting as a local emergence in late 2019 [1–3], almost 12 million cases and 550 000 SARS-CoV-2-related deaths had been confirmed worldwide as of 7 July 2020. Because of the wide variety of clinical presentation, which range from asymptomatic infection to severe respiratory failure requiring intensive care treatment and mechanical ventilation, the burden of disease varies across the world, and the true prevalence of both active and resolved COVID-19 is still largely unknown.

Countries' success in curbing the first wave of the SARS-CoV-2 epidemic was greatly influenced by the speed and extent of

* Corresponding author: M. Poljak, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Zaloška cesta 4, 1000, Ljubljana, Slovenia.

E-mail address: mario.poljak@mf.uni-lj.si (M. Poljak).

† The first two authors contributed equally to this article, and both should be considered first author.

healthcare authorities' containment efforts and mitigation strategies to reduced the spread among the population, keeping the influx of new COVID-19 patients into hospitals manageable and sustainable for the healthcare system's capacities [4–7].

Cultural differences and community discipline were additional important factors influencing the level of compliance with decisions by healthcare authorities and politicians. Currently, the main uncertainty is how to determine the point on the epidemic curve when reopening society and cautiously relaxing measures is safe and sustainable. Accurate assessment of the COVID-19 burden at the community level is fundamental, and a survey using a probability-based sample is an essential component needed to make informed decisions on measures to help navigate the path forwards during the evolving epidemic [8].

We present the study design and baseline results of SARS-CoV-2 RNA detection in nasopharyngeal samples, as well as the first 3-week follow-up results of an ongoing nationwide population study on the SARS-CoV-2 burden in Slovenia using a probability-based population sample with a planned 6-month longitudinal follow-up. To our knowledge, this study is the first to use a probability-based sample representative of the whole country and across all age categories, combined with a longitudinal follow-up of the cohort over the next 6 months. The low prevalence of active COVID-19 infection assessed in this study provided important complementary data to daily epidemiologic surveillance and routine target-testing data. Combining both approaches accurately predicted the epidemic dynamic in Slovenia over the subsequent month, and provided a basis for informed decisions on the gradual and controlled relaxation of mitigation strategies, which ultimately led to Slovenia's being the first country in Europe to officially declare the end of the first wave of the epidemic, as of 31 May 2020.

Methods

Study design

This Slovenian national study using a probability-based sample was planned in two phases (Fig. 1). The first cross-sectional phase, which took place between 20 April and 1 May 2020, was performed to determine the burden of active SARS-CoV-2 infections in the general population that may have gone undetected within the past and current testing approaches and epidemiologic contact tracing. Selected persons were sent an invitation letter and a two-page questionnaire by postal mail about their household structure, their recent contacts and travel history, and their own and household members' potential COVID-19-compatible symptoms experienced in the past 2 months. According to General Data Protection Regulation rules, we were only allowed to contact these persons using regular post and publicly available landline and mobile telephone numbers. Respondents expressed their willingness via telephone or e-mail; however, in line with the study's protocol, refusals were asked no further questions and were not reapproached. Those who did not respond were sent a reminder by post 1 week after the first invitation. The study design is shown in Fig. 1.

The second phase included longitudinal tracking of the cohort, allowing close and active monitoring of the epidemic dynamics at the population level in the following 6 months. Participants were interviewed by medically qualified personnel every 3 weeks for the presence of COVID-19-compatible clinical symptoms and signs, including in household members. If infection was suspected, they were offered immediate testing. In addition, the participants were provided with a dedicated mobile number and e-mail address so they could actively report their own and household members' health status at any time during the study. The first follow-up calls took place between 18 May and 24 May 2020.

After 6 months of follow-up, exit anti-SARS-CoV-2 serologic testing of the entire cohort is planned for October 2020 to determine the cumulative incidence of SARS-CoV-2 infections in the general population.

Participants

The sample was created following a well-established national practice for probability-based official, academic and public health surveys. The sample was selected on 31 March 2020 from the Central Population Register (CPR), which is maintained by the Ministry of the Interior and which includes all permanent and temporary residents of Slovenia (Fig. 1). The chosen gross sample size ($n = 3000$) matched the available resources and time limitations (1–2 weeks of fieldwork) and was also sufficient for the study aims. The sampling design minimized fieldwork costs, which involved ten to 12 trained medical teams with ambulances per day, by selecting 300 census enumeration areas as primary sampling units. The selection of these units followed the implicit stratification according to region and settlement type. Within each unit, ten persons were randomly selected; data from the CPR on age, sex, region and size and type of settlement were also attached.

All study participants provided written informed consent; for participants under 18, consent was provided by parents or guardians. To ensure confidentiality, all samples and questionnaires were coded and analysed anonymously. The study was approved by the National Medical Ethics Committee of the Republic of Slovenia (consent 0120-199/2020/19) and registered with ClinicalTrials.gov (NCT04376996).

SARS-CoV-2 RNA testing

Detection of SARS-CoV-2 RNA in nasopharyngeal samples was performed using the clinically validated, fully automated sample-to-result two-target PCR-based assay cobas 6800 SARS-CoV-2 (Roche, Branchburg, NJ, USA) according to the manufacturer's instructions, as previously described in detail [9]. Briefly, the sample was considered positive if either both the *ORF1* (target 1) and *E* (target 2) genes, or only the *ORF1* gene tested positive. Internal validation showed the assay's excellent 100% sensitivity and 100% specificity [9]. The assay received US Food and Drug Administration emergency use authorization on 12 March 2020.

Statistical analysis

We estimated the prevalence θ with a binomial beta conjugate model with noninformative (Jeffrey's) prior on prevalence:

$$y \sim \text{Binomial}(n, \theta); \theta \sim B\left(\frac{1}{2}, \frac{1}{2}\right),$$

with n being the sample size and y the number of positive cases. The analysis was performed in R software [10]. We used 1000 warmup and 1 million sampling iterations, which is sufficient for the sampling-based approximation error to be lower than the number of decimal places reported. Confidence intervals (CI) are based on the 2.5% and 97.5% percentiles of the posterior distribution.

Results

The response rate, adjusted for noneligible persons, was 47% American Association for Public Opinion Research (AAPOR) (Fig. 1). The study included 1368 participants, 663 men (48.5%) and 705

women (51.5%). The mean age was 46.0 years (range, 3 months to 99 years). Of these, 1366 participants were tested for SARS-CoV-2 RNA between 20 April and 1 May 2020. The sample matched the population structure well; the differences in sex, region and settlement type were not statistically significant (χ^2 , $p > 0.01$). The age structure was mismatched only for the age groups 0 to 10 years

(7.3% instead of 11.0%) and 51 to 60 years (18.3% instead of 14.0%). However, as a result of small differences, the weighting procedures had little effect, and when optimizing the mean squared error, the corresponding reduction in the bias component was smaller than the related increase in the variance component due to weighting.

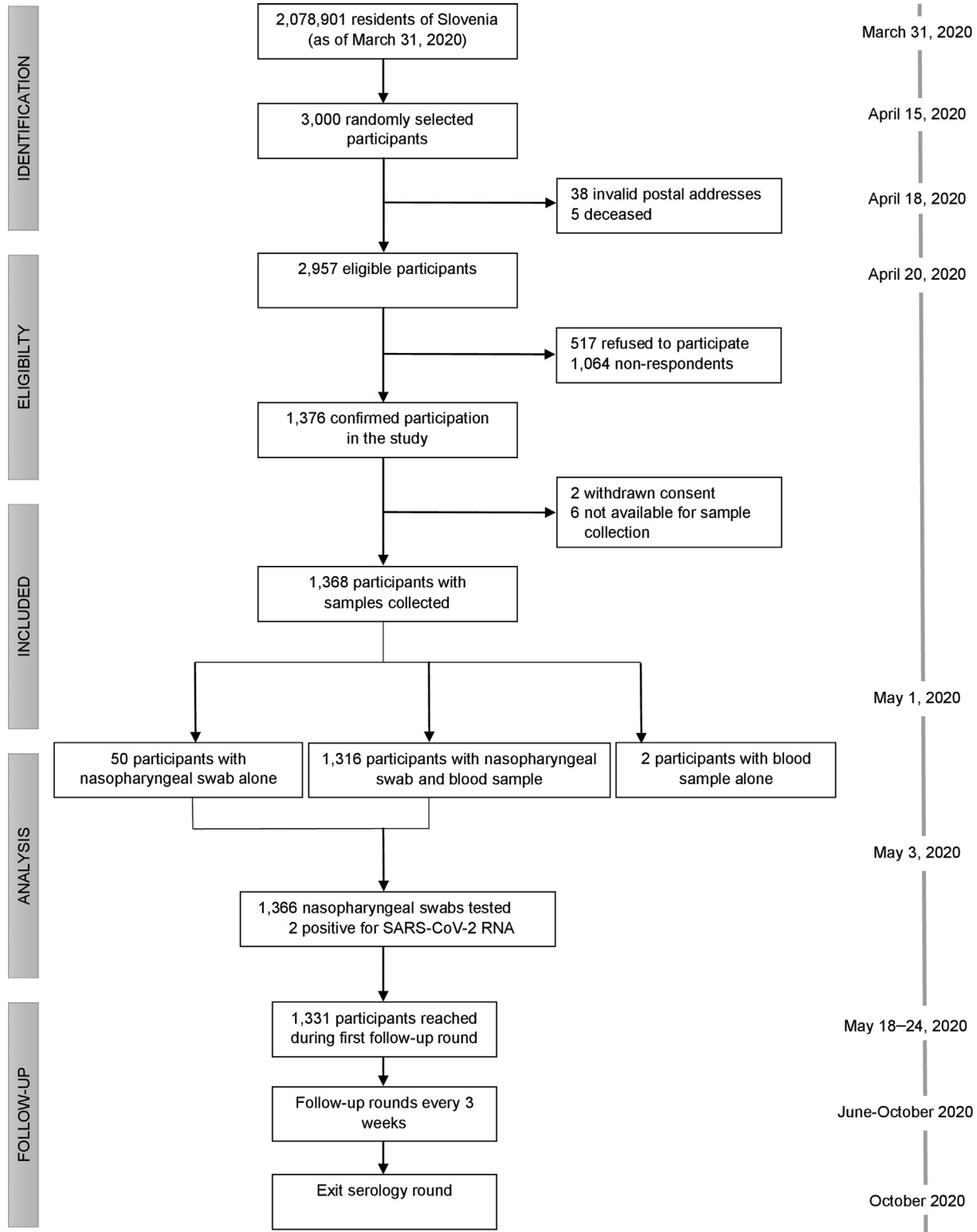


Fig. 1. Study design.

Therefore, the study results, as reported here, are based on the unweighted data.

Of 1366 nasopharyngeal swabs, two tested positive for SARS-CoV-2 RNA using the cobas 6800 SARS-CoV-2 assay, corresponding to a prevalence of 0.15% (posterior mean = 0.18%, 95% Bayesian CI 0.03–0.47; 95% highest density region (HDR) 0.01–0.41). Both cobas SARS-CoV-2 RNA-positive samples were additionally confirmed to be positive by two-target reverse transcriptase PCRs (SARS-CoV-2 specific and pan-*Sarbecovirus*) using commercially available primers and FAM-labeled hydrolysis probes [11]. No correction of the estimate of prevalence for sensitivity or specificity was performed. One participant was newly diagnosed with COVID-19 and one had previous PCR-confirmed SARS-CoV-2 infection; both participants experienced COVID-19-defining symptoms 2 and 5 weeks before study sampling, respectively.

Between 18 May and 24 May 2020, all enrolled participants were contacted again. Of 1331 participants (97.3%) reached by 24 May 2020, a total of 29 reported acute respiratory symptoms and/or fever during 3 weeks after initial sampling and were offered SARS-CoV-2 RNA testing. During detailed telephone medical consultation, for 22 participants it was jointly agreed not to test for SARS-CoV-2 RNA because of the high probability that the symptoms recalled were linked to other medical conditions. Finally, seven participants were tested for SARS-CoV-2 RNA; all had negative results. In addition, five participants informed us that they sought testing for SARS-CoV-2 RNA during the 3 weeks after the initial sampling at their own discretion and for nonmedical reasons; all were SARS-CoV-2 RNA negative and reported no COVID-19-compatible symptoms.

Discussion

Despite almost 12 million recorded cases, knowledge about the population COVID-19 burden is scant. To address this knowledge gap, the WHO recently recommended nationwide population-based, age-stratified epidemiologic surveys and designed an investigation study protocol to facilitate the collection and sharing of COVID-19 epidemiologic data in a standardized format [12]. Each country that performs such a survey may tailor different aspects of the study protocol (including the diagnostic approach) according to its public health, laboratory and clinical capacities, availability of resources and cultural acceptance [12]. However, as of early June 2020, very few population studies have been performed using a probability-based sample assessing the COVID-19 burden on a national or broader regional level, and even fewer have been published in the peer-reviewed literature [13,14].

To our knowledge, so far, the only peer-reviewed study surveying the active COVID-19 burden using a national probability-based sample was performed in April 2020 in Iceland [13]. In the probability-based sample arm, 2283 participants (20–70 years old) were tested, and 0.6% (95% CI 1.3–0.9) samples were positive for SARS-CoV-2 RNA. A similar prevalence (0.8%; 95% CI 0.6–1.0) was recorded in an open-invitation arm (10 797 participants), but it was significantly higher in the targeted-testing arm (13.3%). Although not directly comparable because of different testing approaches, different age populations tested (0–99 years vs. 20–70 years) and the different epidemic dynamic of both countries, the diagnostic yield of targeted testing in Slovenia was also expectedly higher (2.6%; 4.1% in the four diagnostically most intensive weeks) than that assessed in our study's probability-based sample (0.15%) (Fig. 2).

In addition to the Icelandic and Slovenian studies, our intensive language-nonrestricted literature search identified a non-peer-reviewed notice of two rounds of an Austrian cross-sectional study on a probability-based sample that estimated active COVID-19

prevalence at 0.33% (95% CI 0.12–0.76) in the first-round survey, which further decreased in the second-round survey [15–17]. A non-peer-reviewed CON-VINCE Luxembourgian study estimated an active COVID-19 prevalence of 0.3% (95% CI 0.03–0.56) in people 18 to 79 years old [18]. Although these studies surveyed different age populations using different diagnostic approaches and are highly sensitive to differences in timing within the epidemic curve, all yielded results comparable to our study. As a result of the non-peer-reviewed nature of the identified reports, direct comparison of results using a critical scientific approach is impossible [19,20]; however, this is temporary because many studies are currently underway or have reporting backlogs.

Although baseline blood samples were already collected, because of the current uncertainty regarding the accuracy of anti-SARS-CoV-2 assays (especially specificity and consequently low positive predictive value when testing low-prevalent and random populations) [21–24], we have decided to publish seroepidemiologic part of our study after collecting both baseline and exit blood samples for each study participant. We hope that in the meantime a consensus regarding reference-standard serologic assays will have been reached or some form of confirmatory algorithm for screen-positive results developed. A similar approach was also recently taken by the US Centers for Disease Control and Prevention [25].

As summarized in Fig. 2, as of 10 June 2020, a total of 86 994 SARS-CoV-2 tests (41 426 tests per million inhabitants) have been performed in Slovenia, which has detected 1488 laboratory-confirmed COVID-19 cases and reported 109 deaths (<https://covid-19.sledilnik.org/en/stats>). This study further confirmed the effectiveness of the draconian containment measures in Slovenia during the first wave of the epidemic, which were introduced simultaneously with the official declaration of the epidemic on 12 March 2020. On 16 March, public transport was shut down, and all educational institutions (preschools, schools and universities) and public institutions such as museums, libraries, theatres and sport facilities were closed. Nonessential medical procedures were cancelled, all nonessential shops and services were closed, and public gatherings were prohibited. In addition, international travel was restricted, and national borders were completely closed. On 29 March 2020, population mobility was further restricted to home municipalities, with strict police control. Containment and mitigation efforts, the early availability of reliable and clinically validated PCR tests, and prompt and central reporting of the results and immediate epidemiologic contact tracing were fundamental in limiting the epidemic's spread in Slovenia in its early phases. However, the national testing recommendations changed several times during the course of the epidemic, starting with a very conservative approach and initially testing only those with severe clinical presentation from 14 March to 7 April 2020 (mainly due to the limited supply of reagents and consumables), then later expanding recommendations to include patients with milder disease if they were over 60 or had any risk factors for a more severe disease course. In addition, the contact tracing recommendations also changed several times; unfortunately, limited personnel capacity meant that no direct epidemiologic contact tracing was in place and no quarantine officially introduced from 30 March to 20 April 2020.

There are some important limitations of our study that must be considered. Although SARS-CoV-2 RNA testing is indispensable for estimating the burden of active COVID-19 infections in epidemiologic surveys using a probability-based sample, the prevalence of disease assessed at a single time point can be predictive only for a limited time frame. Furthermore, such an approach has the limited potential to detect smaller focal outbreaks and is probably most appropriate in environment with low virus circulation. An additional limitation is that negative SARS-CoV-2 RNA testing result

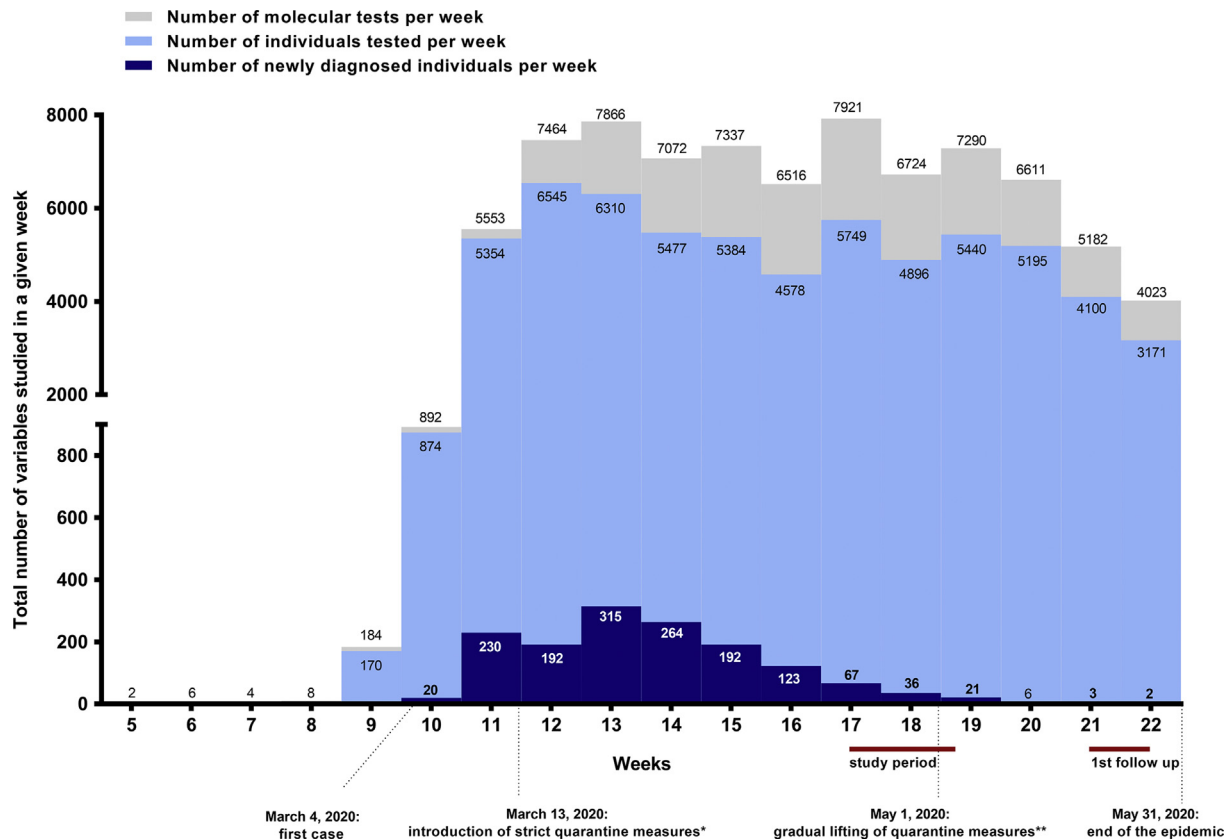


Fig. 2. Total number of molecular tests performed, individuals tested and newly diagnosed individuals with SARS-CoV-2 infection in a given week in the COVID-19 epidemic in Slovenia. On 4 March 2020, the first case of COVID-19 infection was confirmed in Slovenia. *As of 13 March 2020, strict quarantine measures were introduced, including closing the borders with neighbouring countries (Italy, Croatia, Austria and Hungary); closing preschools, primary schools, high schools and universities; shutdown of public transport; closure of all nonessential shops and services, including cancellation of nonessential medical procedures; and, later, restriction on movement outside one's municipality of residence. **The gradual lifting of quarantine measures started on 1 May 2020, with removal of restrictions on travel outside the municipality of residence, reopening all health and dental services, restarting public transport and reopening preschools and schools for selected age groups.

does not necessarily rule out COVID-19 if the sample is taken during a diagnostic window or in case of suboptimal quality of sampling. Lastly, nonrespondents could present potential limitation of our study. However, the study sample matched the population structure well, and weighting did not change the prevalence estimates. Additionally, for nonresponse bias, a content-specific missing data mechanism must exist linking participation with prevalence, and there is little evidence to support the assumption that persons who are more likely to be infected might also be more willing to participate. Thus, we believe that nonresponse bias in the present study is relatively small, and the study reliably estimated the true prevalence of active COVID-19 infection in Slovenia.

Properly designed and executed studies using probability-based sample combined with target-testing figures are extremely important for accurate and timely disease burden estimates and close monitoring of epidemic dynamics. They cannot be replaced by modeling studies and extensive testing campaigns using an open-invitation (nonprobability) sample. We believe that our study provides timely insight into the COVID-19 burden in the general population; our strategies may be considered a suitable alternative to more expensive large-scale testing campaigns using an open-invitation sample. The study results also confirmed the overall effectiveness of the timely, strict implementation of rigorous lockdown measures in Slovenia. The study contributed to the accurate prediction of disease dynamics and subsequent near disappearance of active cases in the following weeks. Only 37 new cases were identified in the entire country in the month after the study, despite

extensive testing (25 093 tests; average 810 tests per day; average 385 tests per day per million inhabitants) (Fig. 2).

On the basis of the favourable epidemiologic situation in the country, supported by the study results, mobility restrictions within the country were lifted on 1 May 2020, followed by gradual reopening of healthcare and dental services (9 May), reopening of public transport (11 May) and partial opening of preschools and schools (16 May). All of this ultimately led to Slovenia's being the first country in Europe to officially declare the end of the first wave of the epidemic as of 31 May 2020. With close follow-up of our cohort, coupled with ongoing, extensive routine and commercial testing in the following weeks (500 to 900 tests per day per million inhabitants), we hope to be able to closely monitor the epidemic dynamics in the coming months and predict possible COVID-19 recurrence in Slovenia, allowing us to remain alert and prepared to take the necessary preventive measures in a timely manner.

Transparency declaration

This work was funded by the Government of the Republic of Slovenia, the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, Slovenia, and the Slovenian Research Agency (grants P5-0399, P2-0209, P5-0410, P5-0151 and P3-0083). The funders had no role in the study design, data collection, analysis, interpretation of the results, writing of the

article or decision to submit the work for publication. All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Acknowledgements

We would like to thank all the participants in the study that accepted the invitation and volunteered to participate in the study. This study would not have been possible without the dedicated work of many people: the colleagues responsible for first-contact surveying of the participants and organization of sample collection: Mateja Škamperle, Tina Triglav, Barbara Šoba Šparl, Tjaša Cerar Kišek, Sabina Islamović, Anja Šterbenc, Mateja Pirš, Miša Pavletič, Karin Kregar and Ivana Velimirovič; the fieldwork coordinators: Mateja Pirš, Anja Šterbenc, Lara Hudej, Grega Gimpelj Domjanič, Mitja Gajski, Tadej Pliberšek, Petra Hrvat, Jasmina Livk, Petra Čamernik, Nataša Krošelj, Tanja Kozinc, Polona Pretnar, Danijela Petrovič, Maja Accetto Kos, Katka Pohar, Jana Boben and Rok Tomazin; the entire COVID-19 diagnostic team: Mateja Jelovšek, Robert Krošelj, Blanka Kušar, Katarina Resman Rus, Katja Strašek Smrdel, Maja Lunar, Marko Kolenc, Martin Sagadin, Monika Jevšnik Virant, Nina Žigon, Petra Markočič, Rok Kogoj, Tina Uršič and Urška Glinšek Biškup; the computer science students and teaching assistants that rapidly developed a data collection platform: Rafael Francišek Irgolič, Robert Cvitkovič, Andrej Čopar, Gregor Krmelj, Nejc Debevc, Andreja Kovačič, Jaka Kokošar, Nejc Hirci, Tomaž Hočevar, Matjaž Pančur and Ajda Pretnar; the questionnaire reviewers: Lea Korva, Sabina Islamović and Jasmina Zlotrg; the longitudinal follow-up medical student team: Sara Ručigaj, Joanna Prusnik, Andrej Lipužič, Tanja Adamlje, Tjaša Pugelj, Boris Podobnik and Manca Bregar; and IT support: May Doušak. In addition, we would like to thank all the employees of the Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Ljubljana, as well as healthcare workers of the Patient service and employees of the Episcenter call centre. We also thank the Statistical Office of the Republic of Slovenia for their help with the sample selection.

References

- [1] Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020;395:497–506.
- [2] Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270–3.
- [3] Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020;382:727–33.
- [4] Lee VJ, Chiew CJ, Khong WX. Interrupting transmission of COVID-19: lessons from containment efforts in Singapore. *J Travel Med* 2020;27. taaa039.
- [5] Baker M, Kvalsvig A, Verrall AJ, Telfar-Barnard L, Wilson N. New Zealand's elimination strategy for the COVID-19 pandemic and what is required to make it work. *N Z Med J* 2020;133:10–4.
- [6] Cousins S. New Zealand eliminates COVID-19. *Lancet* 2020;395:1474.
- [7] Wang CJ, Ng CY, Brook RH. Response to COVID-19 in Taiwan: big data analytics, new technology, and proactive testing. *JAMA* 2020. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3151> [Online ahead of print].
- [8] Angulo FJ, Finelli L, Swerdlow DL. Reopening society and the need for real-time assessment of COVID-19 at the community level. *JAMA* 2020.
- [9] Poljak M, Korva M, Knap Gasper N, Fujs Komloš K, Sagadin M, Uršič T, et al. Clinical evaluation of the cobas SARS-CoV-2 test and a diagnostic platform switch during 48 hours in the midst of the COVID-19 pandemic. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00599–20.
- [10] Stan Development Team. RStan: the R interface to Stan. R package version 2.19.1. Available at: <http://mc-stan.org/>; 2019.
- [11] Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020;25:2000045.
- [12] World Health Organization. Population-based age-stratified seroepidemiological investigation protocol for COVID-19 virus infection. 17 March. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331656/WHO-2019-nCoV-Seroepidemiology-2020.1-eng.pdf>; 2020.
- [13] Gudbjartsson DF, Helgason A, Jonsson H, Magnusson OT, Melsted P, Norddahl GL, et al. Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic population. *N Engl J Med* 2020;382:2302–15.
- [14] Sood N, Simon P, Ebner P, Eichner D, Reynolds J, Bendavid E, et al. Seroprevalence of SARS-CoV-2-specific antibodies among adults in Los Angeles county, California, on April 10–11, 2020. *JAMA* 2020.
- [15] Statistik Austria. COVID-19 Prävalenzstudie: maximal 0,15% der Bevölkerung in Österreich mit SARS-CoV-2 infiziert. 4 May. Available at: http://www.statistik.at/web_de/presse/123051.html; 2020.
- [16] SORA Studienberichte zur 1. SARS-CoV-2. Available at: <https://www.sora.at/nc/news-presse/news/news-einzelsicht/news/covid-19-praevalenz-1006.html>.
- [17] Beullens K, Matsuo H, Loosveldt G, Vandenplas C. Quality report for the European social survey. London: Eur Soc Surv ERIC 2014. Österreichische Bundesministerium. COVID-19 Studie. Available at: <https://www.bmbwf.gv.at/Themen/Forschung/Aktuelles/COVID-19-Studie.html>. Online ahead of print.
- [18] Snoeck CJ, Vaillant M, Abdelrahman T, Satagopam VP, Turner JD, Beaumont K, et al. Prevalence of SARS-CoV-2 infection in the Luxembourgish population—the CON-VINCE study. *medRxiv* 2020. 18 May.
- [19] Armstrong S. Research on COVID-19 is suffering 'imperfect incentives at every stage'. *BMJ* 2020;369:m2045.
- [20] Gopalakrishna G, Bouter L, Mayer T, Steneck N. Assuring research integrity during a pandemic. 8 June. Available at: <https://blogs.bmj.com/bmj/2020/06/08/assuring-research-integrity-during-a-pandemic/>; 2020.
- [21] Torres R, Rinder HM. Double-edged spike: are SARS-CoV-2 serological tests safe right now? *Am J Clin Pathol* 2020;153:709–11.
- [22] Abbasi J. The promise and peril of antibody testing for COVID-19. *JAMA* 2020;323:1881–3.
- [23] US Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidelines for COVID-19 antibody testing. 23 May. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>; 2020.
- [24] Weinstein MC, Freedberg KA, Hyle EP, Paltiel AD. Waiting for certainty on COVID-19 antibody tests—at what cost? *N Engl J Med* 2020.
- [25] CDC COVID-19 Response Team, Jordan MA, Rudman SL, Villarino E, Hoferka S, Patel MT, et al. Evidence for limited early spread of COVID-19 within the United States, January–February 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2020;69:680–4.