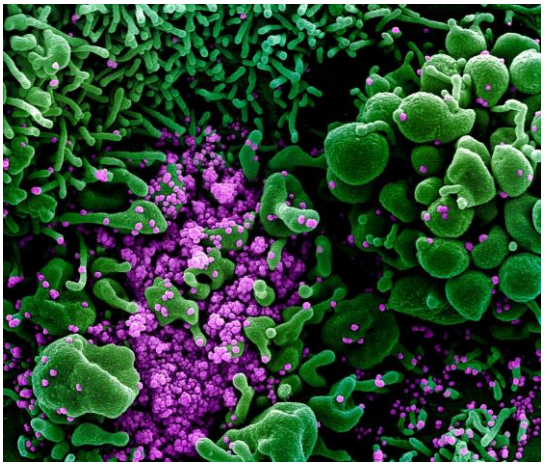
Laboratorní aspekty diagnózy a monitorování COVID-19. (O čem by bylo dobré vědět?)

B. Friedecký, J. Kratochvíla
SEKK

srpen 2021

Snímek, pořízený elektronovým mikroskopem- virus SARS-CoV-2 napadá zdravé buňky



Role klinických laboratoří při nemoci COVID-19 (IFCC GUIDE verze duben 2021, www.cskb.cz)

Diagnostika

Molekulární metody(NAAT) detekce SARS-CoV-2:

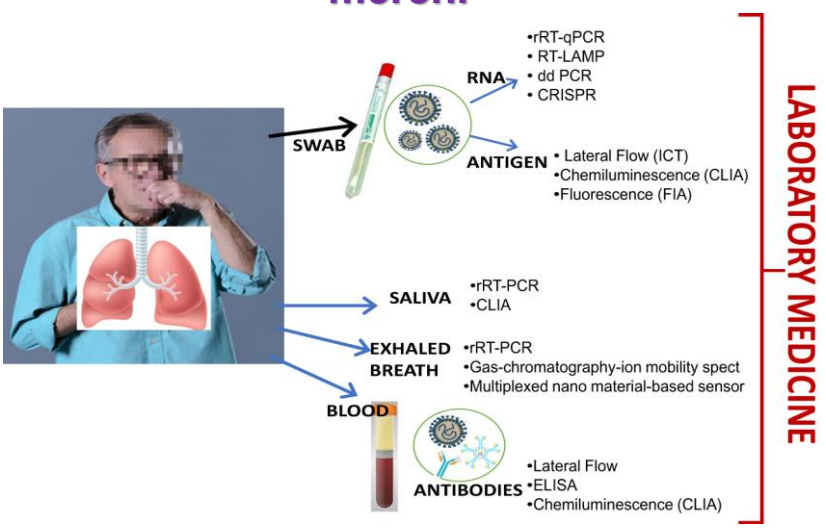
PCR (zlatý standard)
LAMP, CRISPR(POCT)

Antigenní testy-detekce SARS-CoV-2
(rychlé resp. POCT)

Epidemiologie
stanovení anti SARS-CoV-2

Sledování stavu choroby
biochemické a hematologické analyty

COVID-19 a laboratoř-názorné shrnutí principů odběru materiálu a metodologie měření



Detekce SARS-CoV-2 molekulárními metodami (PCR)

Amplifikace cílových genů SARS-CoV-2 s použitím validovaných primerů DNA metodami qPCR, RT-PCR (real time PCR)
Používané cílové geny

- E (envelope)
- N (nukleocapsid)
- ORF 1a, b
- RdRp
- S-protein (s možností odhadu přítomnosti mutace)

Výsledek detekce SARS-CoV-2 se považuje za pozitivní, pokud jsou

detekovány aspoň dva cílové geny.

Výsledky rutinních měření jsou hodnoceny kvalitativně, tedy jako **negativní - pozitivní - neprůkazný**

Primery SARS-CoV-2

- Specifické krátké jednořetězové sekvence DNA bází pro PCR metody. Asi 20 sekvencí pro 1 primer
- Pro každý gen jsou primery produkovány a validovány některou z referenčních institucí
- Základ na trhu dodávaných souprav pochází z:

CDC USA-N gen

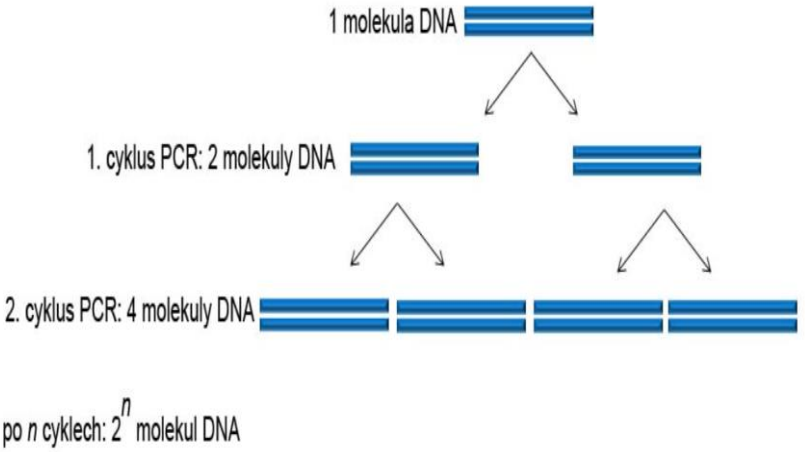
Pasteurův institut – E gen

Charité Berlín RdRp- E gen-N gen

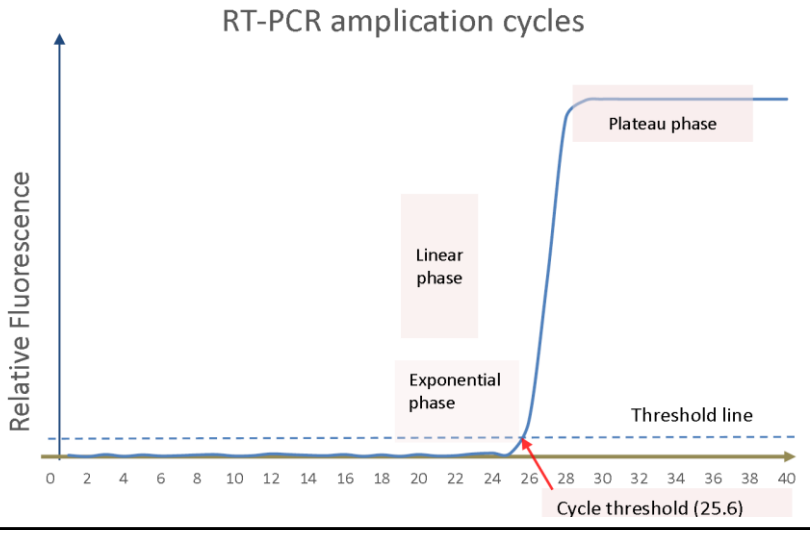
Japan National N gen-S gen- ORF gen

China National ORF gen-N gen

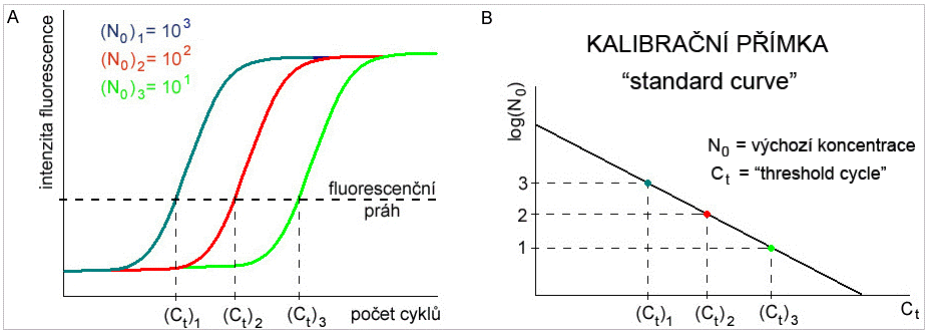
Princip PCR metody



Průběh PCR, pojem Ct



Vztahy mezi fluorescencí a Ct hodnotami (mezi Ct a virovou náloží). Hodnota Ct je nepřímo úměrná počtu amplifikovaných kopií RNA (virové náloži).



Počty cyklů Ct (cycle of threshold)

- Hodnota Ct je počet replikačních cyklů, který umožní odlišení šumu od detekčního fluorometrického signálu
- Pohybuje se u NAAT metod v intervalu **15 až 40**
- Vyšší hodnota **Ct** koresponduje s nižší virovou náloží vzorku
- Optimální hodnoty Ct 15 až 35 (37) u PCR, Ct ≤ 25 u antigenní detekce

Vzorky, odběr, transport

Odběr

Do VTM (viral transport medium). Inaktivace vzorku. Stabilita -2° až 8° C, ≤ 72 hod.

Horní cesty dýchací

Výtěr z nosohltanu-standardní materiál pro detekci SARS-CoV-2 metodami PCR a antigenním testem. Alternativně pro antigenní stanovení je možný výtěr z nosu.

Sliny

alternativní neinvazivní materiál pro PCR (první certifikát EUA-FDA v prosinci 2020) a pro antigenní testy (plán pro rok 2021)

Krev (žilní, kapilární), sérum, plasma

pro anti-SARS-CoV-2(protilátky)

Dolní cesty dýchací

BAL (bronchoalveolární laváž, sputum) pro speciální případy a k dosažení vyšší citlivosti

Preanalytika, chyby, TAT

PREANALYTIKA

- Podmínky transportu a skladování vzorků
- Inaktivace vzorků
- Zásady bezpečnosti práce (podle WHO)

Příčiny falešné negativity

- Vysoká u Ag-testů při Ct hodnotě ≥ 25
- Vysoká u PCR při hodnotách Ct > 35 až 37)
- Chybný odběr
- Chybné načasování odběru
- Chyba analytického procesu

Příčiny falešné pozitivity

Vzájemná kontaminace vzorků, zejména při izolaci RNA a u nízké automatizace procesu

TAT (čas odezvy)

Požadavek TAT ≤ 24 hod u PCR. Do asi 30 min. u Ag-testů

Izolace RNA u metod PCR

- Pomocí komerčních izolačních testovacích souprav (např. Qiagen)
- **Odběrem do vhodných VTM, inaktivujících vzorek a umožňujících přímou amplifikaci**
- Termoinhibicí vzorku (56° až 70°C)

Potřeba separátní izolace RNA zvyšuje hodnotu TAT a riziko kontaminace. **Použití vhodného VTM zkrátilo dobu TAT na přijatelnou hodnotu**

RT-PCR. Ideální pracovní podmínky

- Plná automatizace
- Integrace izolace RNA do procesu detekce SARS-CoV-2
- Certifikát EUA-FDA
- Kontrola kontaminace
- Konektivita analytické a postanalytické fáze

- Kapacita vyšetření na běžných analytických systémech je asi 1000 testů / 8 hod.

Rychlé NAAT metody LAMP, CRISPR

- LAMP- loop mediated isothermal amplification
- Kombinace LAMP s CRISPR-Cas 12

- Fotometrická, vizuální nebo jednoduchá fluorometrická detekce
- Doba stanovení 15 až 30 minut
- Určeno pro POCT systémy, ale nerozšířeno podle původního očekávaní

Detekce SARS-CoV-2 antigeny

- Založena na detekci povrchových antigenů SARS-CoV-2, buď S (spike) nebo N (nukleocapsid) imunochemickými reakcemi
- Vizuální nebo chemiluminiscenční detekce fotometrickou reakcí komplexu Ag-Ab (například koloidním Au). Doba detekce 10 až 30 minut
- Snížená senzitivita ve srovnání s PCR
- Senzitivita je silně ovlivněná hodnotou Ct PCR metod
- Asymptomatický průběh COVID-19 poskytuje významně nižší senzitivitu (cca 52 %), než symptomatický (cca 78 %)
- Ideální je detekce vzorků s **Ct ≤ 25**, provedená **do 3 dnů** po nástupu symptomů
- Potřeba externího hodnocení kvality (EHK) řešena např. u programů CAP USA, RCP QAP AUS, RfB Bonn GE ale ne dostatečně v ČR!

Klinická senzitivita detekce antigenů - demonstrace dat z literárních zdrojů

Výrobce	Ct	Senzitivita (%)
SD-Biosensor	≤25	97
	≤33	93
Abbott	≤25	96
	≤33	89
Roche	≤25	67 až 100
	25 až 30	50 až 87
Coris	All	50

Doporučení WHO o antigenních testech k diagnostice COVID-19

- K diagnostice lze použít testů o senzitivitě **≥ 80 %** a specifičnosti **≥ 97 %**
- Schválené a doporučené Ag-testy testované dle tohoto kritéria lze najít na webech *EUA-FDA Antigen SARS-CoV-2, Paul Ehrlich Institut, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte:*
- https://www.fda.gov
- https://www.bfarm.de
- https://www.pei.de
- K provádění testů a odběrů je zapotřebí **vyškolených** pracovníků a potenciálně nakažení mají být testováni v intervalu 48 až 72 hodin

Předběžné doporučení IFCC pro POCT antigenní testy (Květen 2021).

- Vyžaduje se verifikace preciznosti, senzitivity a specifičnosti před zavedením do používaní. K verifikaci by se mělo použít po 50 PCR negativních a pozitivních vzorků.
- Nedostatek (absence) verifikačních experimentů je základní problém klinických laboratoří v ČR

Protilátky anti-SARS-CoV-2-shrnutí

- Materiál k analýze - krev (žilní, kapilární), plasma, sérum
- Imunochemická detekce IgG, IgM, IgA, jejich kombinace nebo sumy celkových protilátek- TAb
- Vazba reagenčních protilátek na povrchové antigeny viru (N-protein nebo S-protein)
- Detekce vizuální (laterální chromatografie po reakci s koloidním Au), nebo ELISA, nebo chemiluminiscence s použitím standardní instrumentace
- Hodnocení kvalitativní na ordinální škále **negativní – pozitivní**
- Kvantitativní hodnocení

Anti-SARS-CoV protilátky-souhrn parametrů metod globálních výrobců

Výrobce	Protilátka	Vazebná místa	Senzitivita po 14 dnech (%)	PPV/NPV (%)
Abbott	IgG	N	100	94/100
Beckmann	IgG	S	99	94/100
BioRad	IgG	N	97	92/100
DiaSorin	IgG	S	98	87/100
Ortho	Total Ab	S	100	100/100
Ortho	IgG	S	86	100/99
Euroimmun	IgG	S	94	93/100
Euroimmun	IgA	S	100	41/100
Roche	Total Ab	N	100	96/100
Siemens	Total Ab	S	100	97/100

Návrh konsenzu kanadské společnosti klinické chemie ukazuje dobrou shodu u citlivosti, vysoké NPV a několik rozdílů u PPV. Dominantní role IgG, resp. celkového proteinu, Hodnoty PPV/NPV jsou uvedeny pro prevalenci 5 %. Orientace metod na N-protein nebo S-protein nepůsobí zásadní rozdíly .

Doporučení AACC (Clin Chem 2021): *Practical Recommendations for Implementing and Interpreting SARS-CoV-2 EUA and LDT Serologic Testing in Clinical Laboratories*

Klinické cíle stanovení anti-SARS-CoV-2

- Hodnocení dárců plasmy pro rekonvalescenční léčbu COVID-19
- Monitoring vakcinace

Validace metod

- Preciznost
- Senzitivita
- Specifičnost
- Hodnoty PPV a NPV (pozitivní, negativní prediktivní hodnota)

Analyty

- IgG
- Tab (celkové protilátky)

Anti-SARS-CoV-2 a stanovení neutralizační kapacity

- Korelace protilátek anti-SARS-CoV-2 k neutralizačním protilátkám Nabs (schopným eliminace jeho infekčnosti viru vazbou na jeho antigeny
- Nelze použít kvalitativních metod
- Studie jednotlivých metod zjistily hodnoty korelace v rozmezí asi r = 0,5 až 0,85
- Je nutná kvantifikace měření
- Jednotky měření anti-SARS-CoV-2 nejsou harmonizované (AU/ml, kAU/l, COI a další)
- Výsledky vyjadřovat poměrem **Signál/cutoff** (výsledek měření/rozhodovací mez).

Certifikace

- Molekulární (NAAT) antigenní testy a sérologické metody, aplikované v laboratoři i při POCT, by měly disponovat certifikáty Emergency Authorized Use (EUA) nebo CE-IVD (Evropská unie).
- Seznam metod s uděleným EUA je k dispozici na webových stránkách FDA (Food and Drug Administration) - https://fda.gov
- Je jich uděleno více než tisíc

Externí hodnocení kvality - EHK

Poskytovatel EHK	Programy EHK
CAP (College of American Pathologists) USA	• COV-2 (PCR) • COVAG (Antigeny) • COVSQ (sérologie – IgG, IgM)
QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics - Randox) UK	• Certifikační programy • Edukační programy (s přídavkem interferentů)
UK NEQAS (United Kingdom National External Quality Assessment Schemes) UK	• SARS-CoV-2 Antibody • SARS-CoV-2 Molecular
INSTAND DE	• Certifikační programy SARS-CoV-2 (imunologie, antigeny, genom) • Edukační programy SARS-CoV-2 (s potenciálními interferenty)
RfB Bonn (Referenzinstitut für Bioanalytik) DE	• CoVimm (Sérologie IgG, IgM) • CoVag (detekce antigenů) • CoVpcr (detekce PCR a jeho variant-mutací)

EHK- výsledky, poznatky

- Kontrolní materiály pro molekulární (NAAT) metody, připravované z buněčných kultur, obsahují kompletní genom viru, jsou inaktivované, validované na komutabilitu
- Kontrolní materiály pro sérologii - směsi sér pacientů bez symptomů a se symptomy COVID-19
- Úspěšnost u vzorků s Ct ≤34 obvykle 90 až 99 %, u vzorků s Ct >35 prudce klesá (k asi 60 % i méně).
- Akceptovatelné výsledky u EHK sérologie vykazovala jen detekce IgG a TAb
- Programy EHK pro **kvantitativní hodnocení metod SARS-CoV-2** existují sporadicky (CAP USA, RCPA QAP AUS, RfB Bonn DE) a nevykazují uspokojivé výsledky
- Aktuální, ale nevyhnutelný trend EHK je detekce variant (mutací) SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 a metrologická návaznost

Referenční systém, nutný pro metrologickou návaznost výsledků měření by měl být tvořen

- Referenční metodou měření na principu ddPCR (droplet-digital)
- Certifikovaným referenčním materiálem k hodnocení pravdivosti měření (z*atím je dostupný materiál NIST-RGTM 10169 (Reseach Grade Test Material ID – NIST – USA bez znalostí jeho aplikace)*

Sledování těžké formy COVID-19

- Kompletní krevní obraz (lymfocyty, leukocyty, trombocyty, eosinofily)
- ABR (krevní plyny, saturace kyslíkem, laktát)
- Markery zánětu a sepse (prokalcitonin, CRP, feritin)
- Metabolické poruchy (kreatinin, albumin, LD, ALT)
- Koagulopatie (D-Dimery)
- Kardiální markery (cTnI nebo cTnT, NT-pro BNP, BNP)
- Cytokinová bouře - interleukiny (Il-6)

Rutinní analyty klinické biochemie a hematologie u COVID-19

Analyt	Změna u COVID-19	Závažnost choroby detekuje
LD	↑	Několikanásobné zvýšení
ALT	↑	
Kreatinin	↑	
Albumin	↓	Snížení až na 16 až 20 g/L
Prokalcitonin	↑	Asi pětinásobné zvýšení
D-Dimery	↑	Mnohonásobné zvýšení
Feritin	↑	Mnohonásobné zvýšení
CRP	↑	Zvýšení o 1-2 řády
Lymfocyty	↓	
Eosinofily	↓	
Trombocyty	↓	

↑ zvýšení ↓ snížení

Rychlá detekce mutací SARS-CoV-2 (PCR-MALDI-TOF). Přístroj MassARRAY-System (AGENA)

Dechové testy k detekci COVID-19

Stav pacientů a populace po COVID-19

- K sledování těchto vztahů je publikováno mnoho literatury, ke které se patrně začne vyjadřovat intenzivně i české písemnictví.
- Velmi aktuální se zdají být vztahy k troponinům, natriuretickým peptidům (srdeční choroby), HbA_{1c}, glukóze (diabetes), zejména z hlediska predikce stavu chorob
- Zde nejde ani tak o stav choroby COVID-19, ale o stav závažných chronických chorob pacientů a stav populace po prodělání COVID-19

Na závěr

- Komplexní přístup cestou „laboratorní medicíny“ (integrace, digitalizace, konsolidace) jen u privátních subjektů (motiv???)…
- Řízení veřejného prostoru v nesouladu s regulací laboratorní činnosti - seznamy místo validací
- Celková situace v ČR je v souhlase se stavem komunikace, racionality a úrovně sdělovacích prostředků a morálního stavu společnosti
- Moc se mluví, málo se poslouchá, moc se píše, málo publikuje, moc se křičí, málo se diskutuje