

Aspekty kvality stanovení SARS-CoV-2 a anti-SARS-CoV-2 protilátek

B. Friedecký, R. Bolehovská, J. Kratochvíla

Předkládáme několik informací o charakteru a kvalitě stanovení SARS-CoV-2 metodami RT-PCR a protilátek proti SARS-CoV-2. Jsou určeny zejména pracovníkům klinických laboratoří, kteří se přímo neúčastní provádění těchto v dnešní době zásadních laboratorních vyšetření a lze proto předpokládat, že jim informace tohoto druhu budou k užítiku. Hlavní součástí sdělení je stručná charakteristika programů a výsledků externího hodnocení kvality. Dále jsou stručně uvedeny i další, kvalitu ovlivňující faktory tématu.

Programy externího hodnocení kvality

QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) - Randox

V roce 2020 (květen - srpen) bylo provedeno externí hodnocení kvality QCMD, kterého se celkem zúčastnilo 810 laboratoří ze 70 zemí (celkem zaslá-

no 1011 výsledkových formulářů). 992 formulářů obsahovalo kvalitativní výsledky (98,1 %) a pouze u 19 formulářů byly uvedeny kvantitativní výsledky (1,9 %).

Rozesláno bylo osm vzorků, z nichž šest vzorků bylo hodnoceno (pět pozitivních s různou koncentrací SARS-CoV-2, jeden negativní vzorek obsahující pouze transportní médium) a dva vzorky tzv. edukační (obsahovaly jiné druhy koronavirů – HCoV NL63, HCoV OC43, možnost otestování tzv. negativní specifity PCR reakcí).

Při absenci mezinárodního standardu nebo certifikovaného referenčního materiálu (CRM) používala QCMD interní referenční materiál (IRM) s kvantitativními hodnotami stanovenými pomocí digital droplet PCR (ddPCR) s cílem zvýšit stabilitu a robustnost EHK vzorků. Zároveň kvantitativní parametr mohl posloužit pro srovnání napříč laboratořemi. Pozitivní vzorky měly koncentraci SARS-CoV-2 v rozmezí 2,30 až 5,30 log₁₀ kopií/ml. Hodnocení probíhalo pouze v kvalitativní stupnici, tj. pozitivní/negativní.

V prvních týdnech epidemie převládaly in-house PCR metody, které byly postupně nahrazeny komerčními kitovými metodami - v celkovém reportu EHK byl konečný poměr mezi in-house metodami a komerčními metodami ve prospěch komerčních (ve výsledkových formulářích bylo 195 in-house metod, tj. 19,3 %, a 816 komerčních kitů, tj. 80,7 %). V komentáři hodnocení kvality testovacích souprav je uvedeno, že in-house PCR byly přinejmenším stejně dobré jako komerční nebo ještě lepší.

Tabulka 1. Korektní výsledky kvalitativního hodnocení QCMD 2020 (%) a hodnoty C_q

Vzorek	koncentrace, složení	% korektního hodnocení			C _q (medián)	
		průměr	in-house PCR	komerční kity		
1	4,30 log ₁₀ kopií/ml SARS-CoV-2	98,5 %	99,5 %	98,3 %	29,1	
2	4,64 log ₁₀ kopií/ml HCoV NL63	97,1 %	96,9 %	97,2 %	-	edukační vzorek
3	3,30 log ₁₀ kopií/ml SARS-CoV-2	96,6 %	97,4 %	96,4 %	32,2	
4	4,03 log ₁₀ kopií/ml HCoV OC43	97,5 %	97,9 %	97,4 %	-	edukační vzorek
5	negativní	98,2 %	99,5 %	97,9 %	-	
6	4,30 log ₁₀ kopií/ml SARS-CoV-2	98,6 %	100 %	98,3 %	29,1	
7	5,30 log ₁₀ kopií/ml SARS-CoV-2	99,2 %	100 %	99,0 %	25,9	
8	2,30 log ₁₀ kopií/ml SARS-CoV-2	85,5 %	83,1 %	86,0 %	35,0	

Poznámka: Hodnoty C_q(Ct) „cycle of treshold“ jsou počty replikačních cyklů, po kterých začne fluorescenční signál PCR reakce, detekující stanovovaný templát DNA, strmě narůstat.

V tabulce 1 jsou uvedeny procenta správnosti in-house metod a komerčních souprav u jednotlivých vzorků a průměrná hodnota Cq (Ct), podle které je možné kvantitativně hodnotit vzorky. Rozmezí Cq hodnot bylo mezi 10 až 45, pouze u vzorku s nejnižší koncentrací bylo rozmezí Cq hodnot mezi 18,6 až 50 cykly.

Z výsledků EHK dále vyplývá, že 6 základních vzorků pro hodnocení mělo správně 83,7 % výsledkových formulářů (tj. 846), při hodnocení celého panelu včetně edukačních vzorků byly správně údaje u 82,1 % formulářů. U vzorku 5 bylo v 1,8 % vydán pozitivní výsledek, u vzorků 2 a 4 umožňujících otestování specifčnosti PCR reakcí byl vydáno celkově 2,9 % chybně pozitivních výsledků. Jednotlivé metody jsou založeny na detekci různých genů E gen, N gen, RdRP gen, ORF1ab gen, S gen nebo na kombinaci některých uvedených genů (např. E gen, N gen a RdRP gen). Ze získaných dat vyplývá, že pro správnost detekce je nejlepší použití metody kombinující více genů pro detekci RNA SARS-CoV-2.

Závěry z dat:

- Vysoká úspěšnost kvalitativní detekce s výjimkou vzorku o nejnižší koncentraci (2,3 log₁₀ kopie/ml).
- Velmi široký interval hodnot Cq, ukazující nízkou úroveň standardizace.
- Výsledky rozlišují mezi dobrou (například Abbott, Roche) a horší kvalitou komerčních metod (Certest, Generon).
- V detekci SARS-CoV-2 je nejčastější použití kombinace některých genů, následně detekce pouze E genu, správnost detekce SARS-CoV-2 je nejvyšší u použití PCR založené na multiplexní detekci více genů, kvalita detekce není významně závislá na cílových genech, pouze s výjimkou vzorků o nejnižší koncentraci, kdy při použití PCR založené na samostatném použití RdRp genu nebo S genu je pozorována nižší správnost (jedná se o otázku citlivosti daných PCR).
- In house metody poskytly výsledky srovnatelné kvality s ostatními.
- Nízká četnost vysokokapacitních, plně automatizovaných metod (Roche, Abbott).
- Vzorek s nejnižší koncentrací viru (2,30 log₁₀ kopií/ml) generoval relativně vysokou četnost falešně negativních výsledků (1).

INSTAND e.V, cyklus 340, duben/květen 2020

Další externí kontrolou kvality detekce SARS-CoV-2 byl na rozhraní dubna a května 2020 INSTAND s 980 účastníky. K hodnocení použito čtyř kontrolních vzorků, tři další měly „edukační“ charakter.

Dva pozitivní vzorky, izolované z buněčných kultur a inaktivované teplem s ředěními 1:10 000, 1:1 000 000 (2), jeden vzorek negativní s obsahem jiného koronaviru (HCoV 229E) jako kontrola specifčnosti PCR reakcí a jeden negativní, tvořený transportním roztokem.

Kvantifikace počtu kopií/ml provedena metodami dPCR (digitální PCR) jako průměr výsledků 21 účastníků.

Kvalitativní hodnocení provedeno podle:

- výrobce a metody
- cílového genu
- stupně ředění
- hodnoty Cq

Výsledky shrnuty v tabulkách 2-4.

Tabulka 2. Korektní kvalitativní detekce (%)

Vzorek	Ředění	% korektní detekce
3062	negativní	98,6
3063	1:10 000	98,6
3061	1:1 000 000	93,0
3065	NEGATIVNÍ, HCoV 229E – kontrola specifčnosti	92,4
Laboratoře - úspěšné u všech vzorků		92,8

Tabulka 3. Hodnocení podle cílových genů a hodnoty Cq (demonstrace na vzorku 3061)

Gen	Počet metod	% korektní detekce	Cq medián	Cq interval
E	24	97,6	32	15-40
N	20	91,6	33	20-41
ORF ab	12	97,2	31	20-39
RdRP	13	97,8	34	19-43
S	8	99,0	31	20-39

Tabulka 4. Kvantitativní stanovení SARS CoV-2 metodami dPCR

Počet účastníků	Počet metod
Kontrolní limit pozitivity	21
Kontrolní limit negativity	$\pm 1 \log 10$ kopie/ml
Korektní výsledky pozit. vzorek 1:10 000 (%)	73,5
Korektní výsledky pozit. vzorek 1:1 000 000 (%)	73,5
Negativní vzorek	97,1

Komentář k tabulkám 3-4

Asi 7 % výsledků bylo detekováno jako falešně negativní. Stejně, jak u studie QCMD použili účastníci velkého počtu metod s relativně nízkým podílem metod vysokokapacitních, vysoce automatizovaných. Hodnoty Ct mají mimořádně široké rozpětí jakožto důsledek malé standardizace. Gen E je nejčastěji používaný jako cílový a úspěšnost jeho kvalitativní detekce je srovnatelná s ostatními geny. Vyššímu ředění pozitivního vzorku (1:1 000 000) odpovídá nižší úspěšnost kvalitativní detekce. Specifičnost detekce je cca 93 %. Pokus 21 laboratoří o kvantitativní stanovení metodami ddPCR byl málo úspěšný se skóre 73,5 % při cca 25% tolerančním limitu).

Lze shrnout, že korektnost detekce je vysoká, ale ne stoprocentní.

Národní program EHK pro SARS-CoV-2, Jižní Korea

Použity vzorky izolované z kultur Vero buněk, inaktivované teplotou 70 °C (3). Před rozesláním do laboratoří účastníků byly testovány na homogenitu a stabilitu. Zúčastnilo se 118 laboratoří, ve srovnání s evropskými programy EHK rovněž vysokou úrovní metodické unifikace. 67 % laboratoří použilo metodu PowerChek (Kanada), 36 % metody Allplex-Seegene (Jižní Korea). Všechny metody PCR měly certifikát Korejské pobočky FDA. Jako u PowerCheku byly použity cílové geny E a RdRP, u metody Allplex geny E, RdRP a N.

Počet korektních klasifikací u kvalitativního hodnocení všech vzorků 93,2 % byl v podstatě ekvivalentní programům QCMD a INSTAND. Rozpětí hodnot Ct ve srovnání s výsledky programů INSTAND a QCMD je u jednotlivých vzorků signifikantně užší (s hodnotami CV < 10 %), než u programů QCMD a INSTAND.

Vzorky byly použity jak u materiálů z horních, tak i dolních cest dýchacích. U vzorků z dolních cest

podle očekávání byla zjištěna výrazně nižší citlivost (79 %) a jejich výsledky nebyly zařazeny do statistického zpracování. Celková úspěšnost detekce SARS-CoV-2 byla téměř shodná s výsledky obou uvedených evropských cyklů. Vysoký stupeň unifikace ve srovnání s předchozími cykly je velmi zajímavý, a to jak strategicky, tak ekonomicky.

Pozn.: Vzorky z dolních dýchacích cest je vhodné analyzovat pouze v případě těžkých stavů (např. SARS-CoV-2 virové pneumonie), kdy dochází k tomu, že stěry z nosohltanu jsou již negativní a vzorky z dolních dýchacích cest mohou vykazovat silnou pozitivitu.

Kvalita měření SARS-CoV-2 v Rakousku

Byly použity tři pozitivní vzorky, jeden negativní. Pozitivní vzorky připraveny ředěním nosohltanového výtěru pacientů a charakterizovány hodnotami Ct genu E. Účastnilo se 52 laboratoří (4).

52 účastníků použilo 27 extrakčních a 22 amplifikačních systémů opět s nízkou četností vysokokapacitních měřících systémů.

Správnost kvalitativní detekce u všech tří vzorků dosáhla jen 60 %, což je o více než 30 % horší výsledek než u studií QCMD a INSTAND. Důvodem byl třetí pozitivní vzorek s nízkým obsahem virů, charakterizovaný hodnotou Ct =38,5 (pro gen E), kde bylo dosaženo 37 % falešně negativity. Riziko falešně negativity, způsobené nízkým obsahem viru nebude v programech EHK zanedbatelné, dokud se spolehlivě neznají a nerespektují hodnoty mezi detekcí.

V programech EHK stanovení viru SARS-CoV dominují zatím metody RT-PCR. Zatím jsou k dispozici jen výsledky kvalitativních detekcí viru. Kvantitativní stanovení, vyjádřené počtem kopií RNA i běžné rutinní použití metod ddPCR je ještě v rutíně nereálné.

Kvalita stanovení anti-SARS-CoV-2 protilátek, program RfB Německo

Pilotní studie použila 8 vzorků patientských krvinek v 15 laboratořích (5). Akceptovatelné kvality hodnocení bylo dosaženo jen u IgG protilátek. Podle očekávání je nejkritičtější stránkou hodnocení úroveň senzitivity. Ta byla v programu RfB vysoká u IgG (98 %), nižší u IgA (88 %) a slabá u IgM (67 %). Rozdíly mezi metodami byly signifikantní, například pilotní studie i následný rutinní cyklus CoVimm 2/20 (6) vylčily jako zcela nevhodnou metodu Nova Tec. Hodnocení IgM neposkytlo vý-

sledky, které by bylo možné úspěšně interpretovat a je pro další cyklus zatím eliminováno. Mělo by být pokusně nahrazeno hodnocením IgA.

Při stanovení IgG v cyklu CoVimm 2/20 dominovala kvalita kitů Roche, Abbott, překvapivě málo úspěšná byla stanovení DiaSorin.

U IgM byl jedinou metodou s akceptovatelnými výsledky EpiTop Diagnostic (ELISA). Ve světové literatuře je publikován velký počet prací o vysoké úrovni, dobré senzitivitě a prediktivních hodnotách stanovení protilátek proti SARS-CoV-2. Tyto optimistické výsledky nebyly však v programu EHK v dostatečné míře potvrzeny.

Tabulka 5. Výsledky čtyř vzorků u prvního rutinního testu v programu RfB CoVimm 2/20

Vzorek/Matrice	% úspěšnosti IgG.
1 (krev pozitivního pacienta se silnou formou COVID-19)	71
2 (krev asymptomatického pacienta s pozitivní PCR)	98
3 (krev pacienta s negativní PCR reakcí)	100
4 (krev pacienta po překonaném COVID-19 bez zjištěných protilátek v ref. laboratoři)	90

Norská studie (NOKLUS) rychlostě k detekci protilátek proti SARS-CoV-2 vhodně doplnila obraz, poskytnutý programem RfB.

Předmětem studie bylo 17 kitů s jednoduchým provedením (proužkové a kazetové kity), vhodným svým designem k POCT provedení (7). Analýzou sta vzorků byly spočteny hodnoty klinických senzitivit a specifických. Závěry autorů jsou v podstatě souhlasné s výsledky EHK RfB Bonn CoVimm.

Doporučuje se:

- omezit se jen na detekci IgG a metody se specifickostí nad 97 %,
- a to bez ohledu na status, CE značku a jiné atributy,
- ze 17 metod lze podle studie jen 8 akceptovat k použití,
- u nás propagovaná metoda i-Chroma, patří v této studii mezi neakceptovatelné.

Vzhledem k nadějím, vkládaným v poslední době do POCT souprav například k stanovení proteinových antigenů SARS-CoV-2 k urychlení diagnózy COVID-19 je to zdravé varování před přílišným optimismem v budoucnosti, nepotvrzeným kontrolou kvality.

Nyní byl již vyhodnocen další cyklus RfB CoVimm 3/20 s hodnocením IgA namísto IgM. Výsledky IgA byly ještě kontroverznější, než IgM, u výsledků IgG byly rovnocenné s cyklem CoVimm 2/2.0

Problémy kvality z hlediska laboratoř

Existuje řada extraanalytických příčin falešné negativity a falešné pozitivity stanovení SARS-CoV-2. Chybný odběr vzorků, chyby jeho skladování a transportu, hrubé administrativní chyby, záměny vzorků jsou hlavními příčinami falešné negativity (8). Kontaminace RNA vyšetřovaných vzorků, jejich záměny, chybné identifikace a administrativní chyby jsou zdrojem falešné pozitivních výsledků a riziko roste s počtem vyšetření (9). Možnosti preanalytických chyb, možnosti kontaminace a hrubých administrativních chyb jsou za podmínek pandemie a omezení lidských zdrojů vysoké.

Laboratoře mají bez ohledu na lokalizaci a statut velmi podobné tíživé problémy s dodávkami laboratorních potřeb, reagensů a kitů, plastů (špiček, reakčních zkumavek), personálních a přístrojových zdrojů a také zejména s odběry a transporty vzorků. To jsou velmi podstatné faktory úrovně kvality, v podmínkách pandemie často rozhodující (10, 11). Stav těchto problémů ilustrují dotazníky, uvedené v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6. Dotazníky QCMD Recover project květen 2020 a AACC Testing COVID-19, srpen 2020. TAT, kapacita, spolupráce

AACC srpen 2020		QCMD Recover project květen 2020	
	% odpovědí		% odpovědí
Výsledek ≤ 48 hod	98 %	TAT ≤ 24 hod	76 %
FDA-EUA metody	73 %	kapacita testů/den > 250	48 %
In house metody	18 %	efektivita referenčních laboratoř	70 %
anti IgG	59 %		
anti IgG+IgM	31 %		
anti IgG+IgA	8 %		
anti total	28 %		

Tabulka 7. Dotazníky QCMD Recover Project květen 2020 a AACC. Testing COVID-19. Četnost problémů v odpovědích laboratořích.

AACC		QCMD Recover	
	% odpovědí		% odpovědí
dodávky potřeb k analýze	69 %	personál a čas	42 %
bezpečnost personálu	63 %	přístroje	42 %
problémy s transportem vzorků	62 %	dodávky kitů	36 %
problémy s odběrem	67 %	dodávky reagensů a pomůcek	15 %
materiály k validaci	25 %	nedostatek kontrolních materiálů	9 %
potřeba nových informací	18 %	nedostatek výcviku	16 %

Komentář k tabulkám 6-7

Možnost dosažení hodnot TAT 24 až 48 hod. je vysoká. Klíčové pro rutinní laboratoře se zdají problémy s dodávkami laboratorních potřeb, od souprav přes pomůcky až po kontrolní materiály. Stejně tak jsou intenzivně pociťovány problémy s odběry vzorků, jejich kvalitou, transportem a v neposlední řadě s nedostatečným množstvím laboratorního personálu (1,10).

FDA-EUA

Certifikáty EUA (Emergency Use of Authorization) nezbytné pro stanovení SARS-CoV-2, protilátek proti němu a antigenů COVID-19 jsou uvedeny a průběžně doplňovány v seznamu na stránkách <https://www.fda.gov>. V Evropě je vedle požadavku na certifikát EUA uplatňováno i možné využití certifikátu CE-IVD, v Japonsku a Jižní Koreji mají právo poskytovat certifikát EUA i místní pobočky FDA. Počty certifikátů pro stanovení SARS-CoV-2, protilátky proti SARS-CoV-2 a antigeny SARS-CoV-2 jsou enormní (hodně přes 100). Avšak nutnost certifikátu není stoprocentní záruka potřebné kvality.

Standardizace a kvantifikace

Nevyhnutelným krokem dalšího vývoje bude kvantifikace a návaznost měření pomocí referenční metody a certifikovaných referenčních materiálů RNA (11) k omezení rizika bias a možnosti chybné diagnostické klasifikace.

Kvantifikace je podmíněna kalibrací metody referenčním materiálem. V procesu je vývoj prvních referenčních materiálů **RNA NIST RGTM 10169**

a korejského **KRISS SARS-CoV-2 reference materiál** (12). Jednotkami měření po kvantifikaci stanovení v budoucnosti mohou být buď hodnoty Ct (Cq), nebo počty kopií/ml. Referenční materiály, které budou používané ke kalibraci a také kontrole bias vyžadují vývoj referenčních metod. Kandidáty k vytvoření referenční metody jsou bezpochyby zejména metody ddPCR.

Literatura

1. Matheussen V, Corman V, Donaso Mantke O, McCulloch E, Lammers C a spol. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/may 2020. Euro Surveill 2020 25(27) <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.27.2001223>
2. Zeichhardt H, Kammel M.: Zusammenfassung der Probeneigenschaften und Sollwerte zum INSTAND Ringversuch (340) Virusgenom-Nachweis. Dostupné na: <https://www.instand-ev.de/System/rv-files/Zusammenfassung%20der%20Probeneigenschaften%20und%20Sollwerte%20Virologie%20340%20Juni%20Juli%202020%20200911a.pdf>
3. Sang H, Han HG, Yoo ChK, Lee SW, Chung YS. A spol.: Nationwide external quality assessment of SARS-CoV-2 molecular testing. South Korea. Emerging Infectious Disease CDC 2020, 26, 10, October 2020. Dostupné na: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/10/20-2551_article
4. Gorzer L, Buchta C, Chiba R, Benka B, Camp JV, Holzmann H. a spol.: First results of a national external quality assessment scheme for the detection of SARS-CoV-2 genome sequences. J Clin Virol 2020, 129. Dostupné na: doi: 10.1016/j.jcv.2020.104537
5. Hasselmann V, Özcürümeç K, Klawonn F, Ast V, Gerhards C, a spol.: Results of the first pilot study external quality assessment (EQA) scheme for anti-SARS-CoV 2-antibody testing. Clin Chem Lab Med 2020, Dostupné na: <http://doi.org/10.1515/cclm-2020-1183>
6. Wölfel R, Haselmann V.: Ringversuch zur Virus-Immunologie CoVimm 2/20. Dostupné na: https://www.rfb.bio/cgi/results?rv_type=-CoVimm&rvTypeForDetails=CoVimm&year=2020&rv_num=2&analyte=all&searchType=rv_type
7. Tollanes MC, Abildnes E, Baevre-Jensen RM,

- Jenum PA, Sandberg S. a spol.: Evaluation of 17 rapid tests for detection of antibodies against SARS-CoV-2. Report 2. Noklus 2020 (june). Dostupné na: <https://www.noklus.no/aktuelt/2020/juni/rapport-klar-utproving-av-17-hurtigtester/>
8. Lippi G, Simundic AM, Plebani M. Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis in COVID-19- Clin Chem Lab Med 2020,58:1070-1076
 9. Yates TA, Cooke GS, Mac Pherson P. Rationale use of SARS-CoV-2 polymerase chain reaction tests within institution caring for the vulnerable. F1000Res 2020 DOI:10.12688/f1000research.10.12688/f1000research.
 10. AACC-COVID 19 Testing Survey www.aacc.org
 11. Axell-House DB, Lavingia R, Rafferty M, Clark E, Amirian ES. a spol.: The estimation of diagnostic accuracy of tests for COVID-19: A scoping review. J Infect 2020, Dostupné na: doi:10.1016/j.jinf.2020.08.043
 12. JCTLM special issue July 2020. Member and stakeholder activities in COVID-19. <https://www.bipm.org/jctlm>