

COVID-19. Trendy vývoje, zdroje informací

B. Friedecký, J. Kratochvíla

Text je primárně určen jako informace pracovníkům klinických laboratoří a má edukační ambice.

Doporučení pracovní skupiny IFCC Task Force on COVID-19. Monitorování hematologických a biochemických parametrů u pacientů s COVID-19 (1).

Klíčové hematologické analyty a parametry monitoringu hematologických analytů jsou uvedeny v tabulce 1 této práce. Tabulka obsahuje názvy testů, charakter jejich nálezů a stručný klinický význam jejich změn pro onemocnění COVID-19.

V tabulce 2 jsou stejným způsobem uvedeny biochemické analyty a parametry. Konkrétně analyty acidobáze, zánětlivé markery, kardiální markery a biomarkery multisystémových chorob.

Tabulka 1. Seznam biochemických a hematologických markerů k monitoringu COVID-19

	Analyt / parametr	Změna u COVID-19
Hematologické	Lymfocyty	D
	Eozinofily	D
	Neutrofilie	IN
	D-Dimery	IN
	Trombocyty	D
	PT / APTT	IN
Biochemické	Fibrinogen	IN / D
	Acidobazická rovnováha	IN / D
	CRP	IN
	Feritin	IN
	Prokalcitonin	IN
	cTnI/T	IN
	ALT, bilirubin	IN
	Albumin	D
	Kreatinin /močovina	IN
	LD	D

D – snížení; IN – zvýšení; IN / D – vysvětlení v textu článku

Interpretace

Vždy v kontextu s ostatními laboratorními a klinickými nálezy. A s ohledem na hodnoty biologických a analytických variabilit. Změny u některých analytů jsou pro COVID-19 typické (leukocyty, zánětlivé markery, markery koagulace), změny některých analytů pomáhají k diferenciaci mezi asymptomatickými a těžkými průběhy choroby (eosinofily, albumin, LD a další), některé změny monitorují rizika sekundárních komplikací (prokalcitonin), monitorují stav u těžkých forem a komorbidit (acidobáze, troponiny BNP). Podrobněji lze tuto otázku sledovat po rozkliknutí webové adresy, kdy se rozbálí celý text práce (1).

Doporučení pracovní skupiny IFCC Task Force on COVID-19. Sérologické testování protilátek proti SARS-CoV-2 a jejich proteinových antigenů (2).

Indikace vyšetření

- Doplňující vyšetření k molekulárním (NAAT - nucleic acid amplification tests) metodám.
- Vyšetření osob s překonaným onemocněním COVID-19 (posouzení nutnosti karantény, odběr plasmy k terapii).

Indikace vyšetření v budoucnosti

- Ke kvantifikaci imunitní odpovědi
- U dárců krve
- Při testování a monitoringu vakcín

Tato budoucí vyšetření jsou vázána na zásadní zlepšení budoucí metodologie, přechod od kvalitativních ke kvantitativním výsledkům a použití zatím v rutíně nedostupných neutralizačních metod (na principu ředění protilátek).

Principiální problémy soudobých analytických metod

- Není dostatečně známo, které specifické imunoglobuliny jsou klíčové (IgG, IgA, IgM, celková bílkovina)?
- Je známo, že detekce metodami POCT jsou špatně srovnatelné s detekcemi, prováděnými laboratorními metodami.

Analytika

Existuje velká řada metod, stanovujících IgG, IgM, IgA, IgG+IgM, celkový protein a používajících různých metod detekce (laterální chromatografie,

ELISA, chemiluminiscence). Metody vykazují různou kvalitu (od velmi dobré až po málo použitelnou).

Verifikace

- Preciznost
- Vzájemná kontaminace (carry-over) střídáním silně pozitivních a negativních kontrolních vzorků
- Senzitivita
- Specifičnost
- PPV, NPV (pozitivní a negativní prediktivní hodnota)

Podstatou laboratorní verifikace je testování na vlastních pacientech a srovnání dosažených výsledků s údaji výrobců. Cenná mohou být data Public Health England na webové adrese: <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-laboratory-evaluations-of-serological-assays>

Podrobnosti verifikace (počet měření, materiál, statistický postup) získáte po rozkliknutí webové adresy práce, kdy se objeví její plný text.

Doporučení pracovní skupiny IFCC Task Force on COVID-19. Molekulární metody stanovení SARS-CoV-2 (3)

Indikace vyšetření

- Diagnóza infekce v akutní fázi, u asymptomatických pacientů, prevence šíření.

Pacienti

- Se symptomy akutních respiračních chorob
- Vysoce rizikové skupiny

Metody

- PCR jako „zlatý“ standard
- Ostatní metody molekulární analýzy (RT-LAMP, CRISPR a další) mohou zvýšit kapacitu testování, ale budou vyžadovat podrobnou validaci (dosud je k dispozici málo dat).

Cílové geny

- Doporučuje se detekce aspoň dvou z cílových genů (E, N, S, ORF, RdRp)
- Není přehled, které cílové geny optimálně vybírat.

Vzorky

- Horní cesty dýchací (nosohltan jako „zlatý“ standard)
- Dolní cesty dýchací (sputum, bronchoalveolární laváž) nevhodné pro rutinní provedení
- Sliny potřebují další informace a studium
- 20 až 30 % odběrů je údajnou příčinou falešně negativních detekcí.

Analytická a klinická verifikace

- Vodítkem jsou pravidla certifikace FDA-EUA (Food and Drug Administration -Emergency Use Authority). Měla by být pro klinické laboratoře povinná.
- Preciznost detekce (kontrolní komerční negativní a pozitivní vzorky jsou nevhodnější)
- Pravdivost detekce účasti v programu EHK
- Preciznost detekce údajů vlastní laboratoře s daty výrobců.

Trendy v metodologii diagnostiky COVID-19 (4,5).

Stav pandemie COVID-19 dospěl do stavu, kdy je nutné zvyšovat diagnostické kapacity laboratoří. Základními metodami zvyšování jsou zavádění rychlých metod a zavádění vysokokapacitních měřících systémů.

Rychlé metody

Jsou metody s potřebným časem získání výsledků 10-60 minut, bez potřeby sofistikovaných přístrojů k amplifikaci a s jednoduchou detekcí, fotometrickou a často i vizuální nebo pomocí jednoduchého čtecího zařízení typu POCT. Důležitou vlastností (podmiňující jejich rychlost) je eliminace potřeby izolace RNA ze vzorku. Kromě materiálu s výtěrem z nosohltanu (krku) se počítá s použitím materiálu ze slin. K jejich realizaci může být využito metod typu:

- LAMP (look-mediated isothermal amplification)
- CRISPR

U rychlých metod je nutno počítat s jejich signifikantně nižší citlivostí vůči PCR a s potřebou důkladných validačních studií před jejich hromadným nasazením do praxe. První validační studie jsou ovšem již k dispozici. Zájemcům doporučujeme studii LAMP (6), analyzující srovnání s metodami PCR a odhalující některé problémy a studii o metodě CRISPR (7) s cca 90 % shodou v detekci s metodou PCR. Srovnatelnost metod LAMP a CRISPR s metodami PCR je nejlepší při nízkých

hodnotách $Ct \leq 25$ a klesá, když hodnoty Ct rostou nad 33. Čím nižší hodnota Ct , tím vyšší senzitivita měření a virová nálož vzorku.

Vysokokapacitní systémy

Druhou cestou řešení kapacitních problémů je vývoj obrovských systémů a návazných centrálních systémů zpracování výsledků. Zde patří například

- Sekvenční metodologie NGS (Illumina)
- Nanotechnologické materiály (NanoTrap)
- Multiplexní systémy (SARS-CoV-2 + chřipkové viry)

Program vývoje je označován jako RADTech (Rapid Acceleration of Diagnosis Technology). Disponuje finanční subvencí NIH (National Institutes of Health) téměř 500 milionů USD. Rada těchto postupů je předmětem intenzivních testování v některých zemích. Data uvádíme pro orientaci v kapacitních problémech, o kterých se u nás mluví a píše netransparentně a nejasně.

Rychlá detekce SARS-CoV-2 pomocí antigenů

Je určená k rychlému mapování rozšíření infekce v rizikových populačních skupinách. Je založená na rychlé detekci antigenů S (spike) nebo N (nukleokapsid) jednoduchými imunochromatografickými metodami. Odečet je kvalitativní (negativní-pozitivní), realizovaný čtečkou nebo vizuálně. Čas analýzy se pohybuje mezi cca 15-30 minutami. Studie ukazují významně nižší senzitivitu stanovení ve srovnání s metodami PCR, například 70 % senzitivitu v italské práci (8). Z ostatních sdělení (9, 10, 11) plyne, že tato stanovení jsou z hlediska kapacitní spotřeby nevyhnutelná, avšak u klinického hodnocení je nutná opatrnost a sofistikovaný přístup. Výrazně vyšší klinická senzitivita nutí ke konfirmaci negativních výsledků metodou PCR. Z kapacitních důvodů jen tam, kde existují závažné rozpory mezi výsledkem a symptomy choroby. Některé testovací soupravy vykazují i vysoký podíl falešné pozitivita a i tam je doporučován stejně opatrný přístup k interpretaci i s případnou konfirmací pomocí PCR v indikovaných případech. Bylo by tedy vhodné mít vypracovány algoritmy taktiky a strategie postupů.

Rychlost zavádění do praxe neposkytuje čas k dostatečné validaci a získaným zkušenostem, takže je třeba počítat s diferencemi u úrovni kvality nejen ve srovnání s PCR metodami, ale i u různých metod stanovení antigenů.

Aspekty kvantifikace, reference a návaznosti u SARS-CoV-2

Jestliže první stránkou mince COVID-19 je rychlost a kapacita testů, spojené s řadou technologických inovací, pak její druhou stranou je kvalita stanovení. Velká metaanalýza 49 prací o vyšetření SARS-CoV-2 ukazuje na fakt, že velká heterogenita používaných metod a testovacích souprav může být zdrojem systematických chyb stanovení a následně i diagnostiky. Práce ukazuje řadu zdrojů možných chyb, z nichž dominují nedostatečná data o referenci a standardizaci metod a také nedostatečnost použitých demografických dat při hodnocení, zejména pak nízká úroveň informací o úrovni klinických symptomů (12,13).

Červnový dopis IFCC-JCTLM informuje o vývoji referenčních materiálů RNA, které by mohly pomoci dosáhnout exaktnější validace nových metod a principů vyšetření SARS-CoV-2. Uvádí se konkrétně materiál NIST USA (SARS-CoV-2 synthetic RNA Fragments. RGTM 10169) a referenční materiál KISS (SARS-CoV-2 Reference material) Jižní Korea. K vytvoření metrologické návaznosti bude zapotřebí zejména referenční metoda (RMP – reference method procedure). Kandidátem na ni bude patrně některá z metod ddPCR (13).

V situaci, kdy se předpokládá, že i po odeznění pandemie zůstane virus SARS-CoV-2 součástí životního prostředí a za situace neustálého přírůstku metod různých principů a měřících systémů různých proveniencí, vyžadujících srovnání s referencí, bude standardizace v této oblasti nevyhnutelná. Jejimi cíli budou především exaktně stanovené hodnoty limitů detekce (LoD), hodnoty Ct a kalibrace stanovení (14).

Literatura

1. Thompson S, Bohn MK, Mancini M, Loh TP, Wang CHB. a spol.: IFCC Interim guidelines on biochemical/hematological monitoring of COVID-19 patients. Clin Chem Lab Med 2020, Dostupné na: <http://doi.org/10.1515/cclm-2020-1414>
2. Bohn MK, Loh TP, Wang CHB, Mueller B, Koch D. a spol.: IFCC interim guidelines on serological testing of antibodies against SARS-CoV-2. Clin Chem Lab Med 2020, Dostupné na: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1413>
3. Bohn MK, Mancini M, Loh TP, Wang CHB, Grimm M. a spol.: IFCC interim guidelines on molecular testing of SARS-CoV-2 infection. Clin Chem Lab Med 2020, Dostupné na: <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-1412>

4. CLNStat: Another Push to Build COVID-19 Testing Capacity. *Clinical Laboratory News*, říjen 2020. Dostupné na: <https://www.aacc.org/cln/cln-stat/2020/october/1/another-push-to-build-covid-19-testing-capacity>
5. CLNStat: Could Innovation Ease COVID-19 Testing Crunch? *Clinical Laboratory News*, srpen 2020, Dostupné na: <https://www.aacc.org/cln/cln-stat/2020/august/20/could-innovation-ease-the-covid-19-testing-crunch>
6. Dae Thi VL, Herbst K, Boerner K a spol. A colorimetric RT-LAMP and LAMPO.sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med* 2020,12,eabc7075
7. Huang W, Yu L, Wen D a spol. A CRISPR-Cas12a-based specific enhancer for more sensitive detection of SARS-CoV-2 infection. *EBio-Medicine* 2020, Dostupné na: doi:10.1016/j.ebiom.103036
8. Cerutti F, Burdino E, Milia MG a spol. Urgent Leeds of rapid tests for SARS-CoV-2 antigen detection:Evaluation of the SD-Biosensor antigen test. *J Clin Virol* 2020, Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104654>
9. Candel FJ, Barreiro P, San Román Ja a spol. Recommendations for use of antigenic tests in the diagnosis of acute SARS-CoV-2 infection in the second pandemic wave: attitude in different clinical settings. *Advance Access* 2020, Dostupné na: doi:10.37201/req/120.2020
10. DGKL COVID-Antigen Pressemitteilung, October 2020, Dostupné na: www.dgkl.de
11. www.finndx.org/covid-19
12. 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
13. JCTLM newsletter June 2020. Dostupné na: <https://www.bipm.org/utis/common/pdf/JCTLM/JCTLM-Newsletter-2020.pdf>
14. Hu X, Zhu L, Luo Y, Zhao Q, Tan CH. a spol.: Evaluation of the clinical performance of single-, dual-, and triple-target SARS-CoV-2 RT-qPCR methods. *Clin Chim Acta* 2020, 511:143-148