

# Souprava Erba MDx SARS-CoV-2 RT-PCR druhé generace

S dalším vývojem globální pandemie přichází také odezva laboratoří ve formě změny strategie diagnostiky onemocnění COVID-19. V situaci, kdy jsou dostupné vakcíny, mají laboratoře po celém světě příležitost zvolit si spolehlivé, robustní a dlouhodobě prověřené testy, které umožňují s nižšími náklady dosahovat výrazně vyšší výkonnosti laboratoře. Společnost Erba Mannheim věnovala velké úsilí vývoji vysoce kvalitní a zároveň cenově dostupné druhé generace PCR testů s označením ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR. Každý aspekt soupravy byl navržen tak, aby maximálně vyhovoval aktuálním potřebám laboratoří. Mez detekce je velice nízká, výrazně se zvýšila citlivost a specifita testu. Nově souprava umožňuje spolu se standardním testováním nasofaryngeálních (NP) a orofaryngeálních (OP) výtěrů také testování ze slin či testování metodou poolingů vzorků. Výhodou soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR i nadále zůstává přeprava a skladování kitů bez potřeby chlazení.

## Reakce na vývoj pandemie COVID-19

Na začátku pandemie COVID-19 byla schopnost rozpoznat infekci virem SARS-CoV-2 stěžejním krokem pro výběr adekvátní strategie v boji proti globálnímu šíření nákazy. Například v USA dne 4. února 2020 získal americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pravomoc udělovat tzv. povolení pro nouzové použití (EUs) pro diagnostické prostředky, u kterých existoval důvodný předpoklad jejich účinnosti. Podobná opatření byla přijímána celosvětově, což významně urychlilo schvalovací procesy a zefektivnilo požadované předkládání dokumentace a validačních postupů. Zmírnění požadavků pro vstup testovacích kitů na trh využila řada diagnostických firem, které do té doby čelily výzvě zajistit laboratořím nedostupné diagnostické soupravy. K 31. červenci schválil FDA k používání 163 diagnostických testů COVID-19 (1) a následovaly další země. Dne 29. října bylo Indickou radou pro lékařský výzkum (ICMR) již schváleno více než 300 různých souprav (2).

Zatímco rozsáhlé používání EUs jistě vyřešilo problém kvantity, přineslo s sebou zároveň otázky týkající se kvality nabízených produktů. Je pochopitelné, že prostředky uvedené na trh za nouzové situace

v průběhu pandemie nemusí vyhovovat standardním potřebám a požadavkům ať už na rozsah testování kitů, jejich validaci či vlastnosti jako jednoduchost používání a náklady na pořízení soupravy. Regulační orgány po celém světě již začaly EUAs eliminovat a začínají se tak uplatňovat diagnostické soupravy druhé generace. Do popředí se opět dostává primárně vysoká a ověřená kvalita souprav. Zdravotnické autority přesouvají své zaměření na dlouhodobé strategie s důrazem na spolehlivost testů. Také na nově se formujících trzích vzniká poptávka po standardizaci, což má význam zejména pro příznivý vývoj pandemie z globálního hlediska.

## Cílové genové oblasti

První celogenomová sekvence viru SARS-CoV-2 byla publikována 10. ledna 2020 (3) a umožnila tak vznik mnoha real-time RT-PCR testů po celém světě v následujících několika málo měsících. První qRT-PCR testy vyvinuté Německem, Hongkongem, Čínou, USA a Francií byly zacíleny na dvě nebo tři různé oblasti v genech RdRp (RNA-dependentní RNA-polymeráza), N (nukleokapsidový protein), E protein (obalový protein), ORF1ab nsp10 (nestrukturální protein 10) a ORF1b nsp14 (nestrukturální protein 14). V květnu 2020 bylo provedeno porovnání těchto testů za účelem určení vhodných cílových oblastí v souvislosti se senzitivitou testu. Výsledkem analýzy bylo zjištění, že testy zaměřené na oblasti genů N (Čína CDC), N1 (USA CDC) a RdRp IP2 a IP4 patří mezi nejcitlivější (4). Pro cílení na sekvenci nukleokapsidu SARS-CoV-2 byly americkým Centrem pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) vyvinuty sady primerů a sond TaqMan® N1, N2 a N3. Sada primerů N3 byla následně FDA vyloučena z důvodu falešně pozitivních výsledků a současného ovlivňování výsledků generovaných primery N1 a N2. Zatímco u primerů N2 byly zaznamenány degenerace, primery N1 vykazovaly 100% zachování sekvencí dostupných v GenBank od května 2020 (5). Primery N1 byly proto vybrány jako součást soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR. Zacílení na sekvenci RNA polymerázy (RdRp) pomocí sady primerů Charite RdRp bylo doporučeno Světovou zdravotnickou organizací (6). Oblast, na kterou tyto primery cílí, je považována za velmi stabilní napříč různými variantami SARS-CoV-2, a proto byla vybrána jako druhá cílová oblast v soupravách ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR druhé generace.

## Citlivost a mez detekce

Mez detekce se pro molekulární diagnostické COVID testy udává jako nejnižší koncentrace hledané RNA,

kterou lze detekovat při  $\geq 95\%$  opakovaných měření. Mez detekce kvantifikuje analytickou citlivost spíše než klinickou citlivost, která měří poměr v testu pozitivních a skutečně infikovaných osob. Vysoké citlivosti a nízké meze detekce bylo v soupravách ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR dosaženo uvážlivým výběrem cílových oblastí a schopností testu přizpůsobit se velkým objemům extraktu vzorku. Přesnost diagnostiky onemocnění COVID-19, resp. její nedostatek, je přetrvávajícím problémem od rozšíření tohoto onemocnění. Mez detekce aktuálně dostupných testů amplifikace nukleových kyselin pro SARS-CoV-2 se liší až 10 000krát, a lze tedy předpokládat také významné rozdíly v oblasti klinické citlivosti (7, 8).

Výsledky studií v USA a Švýcarsku s přibližně 27 000 a 19 800 výsledky testů COVID-19 a 6 037, resp. 4 172 pozitivními případy, poukázaly na širokou distribuci hodnot virové nálože u infikovaných jedinců, která pokrývala hodnoty v rozsahu téměř 9 řádů, od méně než 100 kopií/ml až po 2,5 miliardy kopií/ml (7, 9). Podobně další studie od Fajnzylbera et al. (10) prokázala, že se virové nálože významně liší jak mezi jednotlivci v různém stádiu a závažnosti onemocnění, tak mezi použitými typy vzorků. Vylučování viru SARS-CoV-2, epidemiologie a dynamika klinických projevů onemocnění ještě stále nejsou zcela objasněny a k hlubšímu poznání faktorů ovlivňujících vztah virové nálože a samotného onemocnění jsou zapotřebí další studie. Tato široká škála hodnot virové nálože, kterou lze pozorovat také u jiných respiračních virů (9), reflektuje mnoho preanalytických i analytických proměnných, patofyziologické a demografické vlivy, stejně jako dobu odběru podle stádia onemocnění. To mimo jiné poukazuje na důležitost použití testů s vysokou analytickou senzitivitou pro minimalizaci počtu falešně negativních výsledků.

Falešně negativní výsledky jsou znepokojivým problémem jak pro jednotlivé laboratoře, tak pro celou společnost. Každý infikovaný pacient, který obdrží falešně negativní výsledek, může v průběhu svého každodenního života nevědomky šířit virus v populaci s mylným pocitem bezpečí právě díky negativnímu testu. To značně podkopává snahu zdravotnických institucí s pandemií bojovat a může přispět k potřebě zavedení rozsáhlých restrikcí na úrovni populace. Každý falešně negativní test je zároveň slabým článkem v trasování kontaktů. Zdravotnické instituce i jednotlivé laboratoře by tak měly při výběru testů klást velký důraz na co nejvyšší citlivost a nízké meze detekce používaných souprav.

Další výhodou používání testů s nízkou mezí detekce je možnost implementace poolingů vzorků. Metoda poolingů je způsob testování, kdy je smícháno několik (nízkorizikových) vzorků dohromady a následně

je testován sdružený vzorek. V oblastech s nízkou prevencí může být pooling velmi efektivní, což zvyšuje výkonnost a zároveň snižuje náklady na testování. Spolehlivost této metody však závisí na citlivosti použitého testu. Například jeden pozitivní vzorek smíchaný se čtyřmi negativními vzorky povede k pětinašobnému snížení koncentrace viru ve sdruženém vzorku, proto je možné detekovat virus v ředěných vzorcích pouze prostřednictvím soupravy s nízkou hodnotou meze detekce. Společnost Erba Mannheim si je vědoma skutečnosti, že vysoce citlivé testy s nízkou mezí detekce jsou zásadním nástrojem v globálním boji proti onemocnění COVID-19, a navrhla proto soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR tak, aby byly vysoce citlivé a s hodnotou meze detekce pouhých 200 kopií/ml. Tím významně snižuje množství falešně negativních výsledků a umožňuje detekci vyššího počtu infikovaných pacientů, čím přispívá k pandemickým kontrolním opatřením.

## Manipulace s kity a snadnost použití

V rámci snahy zpřístupnit vysoce kvalitní IVD produkty laboratořím po celém světě se společnost Erba Mannheim zabývá také výzvami v oblasti logistiky, mezi které patří například problém chlazení při přepravě a skladování kitů. Souprava ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR druhé generace byla vyvinuta tak, aby byla v jakékoli fázi přepravy a skladování zcela bez nutnosti chlazení. Činidla v soupravě ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR jsou lyofilizována, takže zůstává zachována aktivita tepelně labilních enzymů, a souprava je tím pádem stabilní i při běžné laboratorní teplotě po celou dobu manipulace. Tato vlastnost souprav ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR významně snižuje nároky na podmínky uvnitř dodavatelského řetězce, stejně jako na skladování přímo v diagnostických laboratořích, kde často bývá kapacita chladicích zařízení limitující. Soupravy se tak stávají dostupnější také pro země s teplejším podnebím a méně rozvinutou logistickou sítí.

Mnohé PCR kity vyžadují přípravu reagentů v několika krocích a z několika různých lahvíček. V praxi to znamená pracnější a zdlouhavější postup přípravy, vyšší riziko chyby a vyšší náklady na spotřební materiál a personál laboratoře. Při vývoji soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR bylo cílem maximálně zjednodušit postup použití testu. PCR vyšetření soupravou ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR tak eliminuje potřebu rozsáhlé přípravy reagentů a umožňuje provést přípravu v jediném kroku pomocí jednolahvičkového mastermixu obsahujícího všechna potřebná amplifikační činidla, včetně primerů a Taq-Man® sond. Vysoce kvalitní lyofilizovaný mastermix přispívá ke krátké době zpracování, kdy jsou výsledky

testu k dispozici za méně než dvě hodiny. Samozřejmě je také dodání pozitivních i negativních kontrol uvnitř soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR.

Soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR druhé generace jsou validovány pro použití s běžně dostupnými extrakčními kity, automaty a real-time PCR analyzátoři. Počet komerčních extrakčních souprav a PCR analyzátorů kompatibilních se soupravami ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR neustále narůstá tak, aby byly zajištěny podmínky pro bezproblémový upgrade stanovení i v laboratořích se specifickými požadavky.

První dostupné PCR soupravy k diagnostice onemocnění COVID-19 umožňovaly pouze standardní nasofaryngeální (NP) a orofaryngeální (OP) výtěry, které obvykle vyžadují odběr vzorků klinickým lékařem nebo speciálně zaškolenou osobou. Pokud je selftesting u tohoto způsobu odběru možný, má zpravidla tendenci snižovat přesnost stanovení. Rostou tak nároky na zaměstnance zdravotnických zařízení a omezuje se počet proveditelných testů na úrovni populace. Řešením se ukázalo být rozšíření univerzálnosti testů v podobě odběru vzorků ze slin testovaných osob. A také soupravy ErbaMDx SARS-CoV-2 RT-PCR druhé generace touto možností disponují.

Studie z USA zahrnující celkem 70 hospitalizovaných pacientů s onemocněním COVID-19 srovnávala vzorky slin odebraných přímo samotnými pacienty se vzorky z NP výtěrů odebraných ve stejný okamžik proškoleným zdravotnickým personálem. Pomocí metody qRT-PCR bylo ve vzorcích slin nalezeno více kopií RNA SARS-CoV-2 než v NP vzorcích. Zároveň bylo zjištěno, že přetrvávající pozitivita vzorků sledovaných až 10 dnů od stanovení diagnózy se vyskytuje ve vyšším procentu u vzorků slin než u NP vzorků. Současně bylo v průběžně odebíraných materiálech ze slin pozorováno menší množství odchylek v hladinách RNA oproti materiálům odebíraným z nasopharyngu v průběhu trvání onemocnění (11). Z uvedených zjištění lze vyvodit, že z hlediska citlivosti mohou být vzorky slin považovány za srovnatelný, ne-li vhodnější, biologický materiál pro detekci SARS-CoV-2. S ohledem na pohodlnost a bezbolestnost odběrů tak vzorky slin nabývají klíčový význam zejména při potřebách hromadného screeningu v populaci.

## Literatura

1. Shuran J & Stenzel T. Covid-19 Molecular Diagnostic Testing — Lessons Learned. *N Engl J Med* 2020; 383:e97. Dostupné na: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp2023830>
2. Indian Council of Medical Research (ICMR). Dostupné na: <https://www.icmr.gov.in/>
3. Holmes EC. Novel 2019 coronavirus genome [Internet]. 2020 [cit. 2020 Mar 24]. Dostupné na: <http://virological.org/t/novel-2019-coronavirus-genome/319>
4. Etievant S et al. Sensitivity assessment of SARS-CoV-2 PCR assays developed by WHO referral laboratories. *J Clin Med*. 2020 Jun 16; 9(6):1871
5. GenBank Overview. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
6. World Health Organization. Dostupné na: [https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2)
7. Arnaout R et al. SARS-CoV2 Testing: The Limit of Detection Matters. *bioRxiv* 2020.06.02. Dostupné na: <https://doi.org/10.1101/2020.06.02.131144>
8. Matthew J. MacKay MJ et al. The COVID-19 XPRIZE and the need for scalable, fast, and widespread testing. *Nature Biotechnology* 2020 Sep; 38: 1021–1024. Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0655-4>
9. Jacot D et al. Viral load of SARS-CoV-2 across patients and compared to other respiratory viruses. *Microbes and Infection* 22 (2020) 617e621
10. Fajnzylber J et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. *Nat Commun* 11, 5493 (2020). Dostupné na: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19057-5>
11. Wyllie AL et al. Saliva or Nasopharyngeal Swab Specimens for Detection of SARS-CoV-2. *N Engl J Med* 2020; 383:1283-1286. Dostupné na: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc2016359>